



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

"CARACTERIZACION DEL RECEPTOR POSTSINAPTICO  
DE GLICINA EN LA RETINA DE LA RANA:  
POSIBLE MODULACION POR PROTEINAS CINASAS"

T E S I S

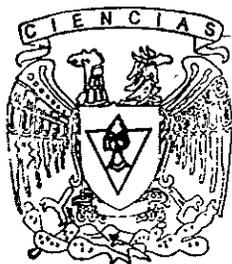
Que para obtener el Titulo de  
BIOLOGA

p r e s e n t a:

MARISELA AGUIRRE RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. ROCIO SALCEDA SACANELLES



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



2000

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

277472



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**



Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Caracterización del receptor postsináptico de glicina en la retina de la rana: Posible modulación por proteínas cinasas".

realizado por Marisela Aguirre Ramírez

con número de cuenta 9231361-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

*Rocío Salceda*

Propietario

Dra. Annie Pardo Semo

*Annie Pardo*

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

*Luis Felipe Jiménez*

Suplente

Dra. María Eugenia Gonsbatt Bonaparte

*María Eugenia Gonsbatt*

Suplente

Dr. Octavio Quesada García

*Octavio Quesada*

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM.

*Edna M. Suárez D.*  
Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

**El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección de la doctora Rocío Salceda Sacanelles, del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.**

**El trabajo se elaboró bajo el apoyo económico del Programa de Becas de Tesis de Licenciatura (PROBETEL) de la Fundación UNAM.**

*A mis padres (o mejor dicho a mis viejos),  
por haber apoyado siempre mi carrera.*

*A mis padres postizos (a los 6),  
por haberme formado a su  
imagen y semejanza.*

*A mi eterno compañero (Marco),  
por el ser ese motor que mueve  
a mi alma.*

*A mi mentor mas odiado  
(Jesús).*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a aquellas personas que con su paciencia y apoyo logré concluir esta etapa de mi vida:

A la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, por ayudarme a aprender de los errores y a comprender un poco más a la naturaleza. Gracias, también por su valiosa amistad. A la Sra. Natalia Aguilar, Naty, por su disposición para apoyarme en la elaboración de los experimentos y por su agradable compañía.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Carmen, Gustavo, Jorge, Estuardo, Daniel, Víctor, Alejandro y Raymundo.

A Laura y Andrea, por su cariño incondicional, a pesar del tiempo.

Agradezco especialmente a aquellas personas que durante mi carrera siempre fueron alegría y, sobre todo paciencia. Muchas gracias amigas: Adriana, Paloma e Isabel.

*"El dilema fundamental de la humanidad, el problema que subyace a todos los demás y que destaca por encima de ellos, es precisar qué puesto corresponde al hombre en la naturaleza y cuáles es su relación con el cosmos. El origen de nuestra especie, los límites que condicionan nuestro influjo sobre la naturaleza y el de ésta sobre nosotros, el objetivo que pugnamos por alcanzar, son problemas que se presentan una y otra vez, con indeclinable vigor, a todos los seres vivos de la Tierra".*

*Thomas H. Huxley.*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABREVIATURAS</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
El Ojo	3
Desarrollo De La Retina	6
La Retina	5
Estructura	8
Función	10
Neurotransmisión En La Retina	14
La Glicina Como Neurotransmisor En La Retina	15
El Receptor De Glicina	21
El papel de la gefirina	25
La subunidad $\beta$	25
La subunidad $\alpha$	26
La regulación del RGly	29
Actividad de la glicina sobre el receptor de tipo NMDA	31
<b>OBJETIVOS</b>	33
<b>METODOLOGÍA</b>	34
<b>RESULTADOS</b>	37
<b>DISCUSIÓN</b>	52
<b>CONCLUSIONES</b>	61
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	62

## RESUMEN

La glicina actúa como neurotransmisor inhibitor en diferentes regiones del Sistema Nervioso Central, incluyendo a la retina. La glicina actúa sobre un receptor postsináptico, que es un canal de cloro, que hiperpolariza a la membrana plasmática de las neuronas glicinoceptivas. La estricnina es el antagonista específico del receptor de glicina (RGly).

*Estudios autorradiográficos e inmunohistoquímicos demuestran la presencia de glicina en varios tipos celulares que constituyen a la retina, como son las células amacrinas, interplexiformes, bipolares y ganglionares. En particular, las células amacrinas inhibitoras regulan la actividad de células bipolares, ganglionares y células amacrinas excitadoras. El receptor postsináptico de glicina presenta sitios potenciales de fosforilación, que pueden modular la actividad del RGly.*

En el presente trabajo se caracterizó el receptor de glicina en la retina completa de la rana, utilizando el método de unión específica de ligandos radiactivos. Las características del RGly resultaron ser semejantes a las observadas en las membranas aisladas de sinaptosomas. La unión específica de glicina y estricnina se afectó por la presencia del ion  $\text{Na}^+$  y cambios en la temperatura. Asimismo, la unión de ambos ligandos radiactivos se modificó por drogas que inhiben o activan a las proteínas cinasas A y C, lo que sugiere una posible regulación del RGly, a través de su fosforilación.

## ABREVIATURAS

<b>Ach</b>	acetilcolina
<b>AMPc</b>	monofosfato de adenocina cíclico
<b>B<sub>max</sub></b>	unión máxima
<b>CG</b>	capa de células ganglionares
<b>CNI</b>	capa nuclear interna
<b>CPE</b>	capa plexiforme externa
<b>CPI</b>	capa plexiforme interna
<b>EPR</b>	epitelio pigmentario de la retina
<b>FH<sub>4</sub></b>	tetrahidrofolato
<b>FP</b>	fosfato de piridoxal
<b>GABA</b>	ácido-gama aminobutírico
<b>GCS</b>	sistema de degradación de la glicina
<b>GMPc</b>	monofosfato de guanosina cíclico
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina
<b>IBMX</b>	3-isobutil-1-metil xantina
<b>K<sub>D</sub></b>	constante de disociación
<b>M1-M4</b>	segmentos transmembranales del 1 al 4
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PKA</b>	proteína cinasa A
<b>PKC</b>	proteína cinasa C
<b>PMA</b>	12-miristrato-13-acetato
<b>R5HT<sub>3</sub></b>	receptor tipo 3 de serotonina
<b>RGABA<sub>A</sub></b>	receptor tipo A de GABA
<b>RGly</b>	receptor postsináptico de glicina
<b>RKB</b>	Ringer-Krebs-Bicarbonato
<b>RnACh</b>	receptor nicotínico de acetilcolina
<b>SHMT</b>	serina hidroximetil transferasa
<b>SNC</b>	sistema nervioso central
<b>V<sub>max</sub></b>	velocidad máxima

## INTRODUCCIÓN

La fototransducción, proceso por el cual un estímulo luminoso es transformado en una señal química, juega una papel importante en la supervivencia de las especies, ya que a través de ella los organismos pueden sintetizar carbohidratos (plantas) esenciales para su alimentación, orientarse con respecto a la cantidad de luz que haya en el medio (*Chlamydomonas*) o reconocer el medio que los rodea, así como a sus depredadores y presas (artrópodos y vertebrados). La fototransducción es el primer paso del proceso visual, el cual lleva a cabo una función de percepción e interpretación de formas y colores. Dicha función se lleva a cabo en órganos especializados (la retina) presentes en los animales con una organización tisular compleja, ya que requiere de la actividad e interacción de una gran cantidad de células que responden a diversos estímulos provocados por moléculas específicas, conocidas como neurotransmisores. Con el fin de contribuir al conocimiento del complicado proceso visual, en el presente trabajo se estudió al receptor postsináptico de glicina, utilizando como modelo la retina de la rana.

### *EL OJO*

La estructura del ojo permite que la luz sea enfocada sobre la retina y, además, permite la gradación de la intensidad luminosa (Salceda, 1991). El ojo de los vertebrados es un órgano que desempeña una compleja actividad, por lo que está constituido por diferentes tejidos celulares (Fig. 1). La capa más externa del ojo se denomina esclerótica, que en la parte anterior del ojo constituye a la córnea. La capa subsecuente, la coroides, presenta una alta vascularización y está encargada de proveer de nutrientes a los tejidos oculares; además, en la

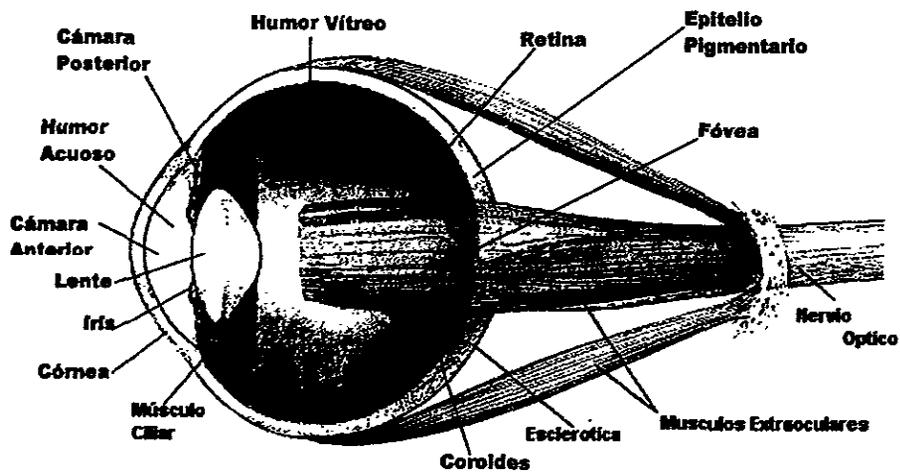


Figura 1. Esquema del ojo de los vertebrados (modificado de Hubel, 1986).

parte anterior forma el cuerpo ciliar, del cual depende la posición del lente. La continuación del cuerpo ciliar constituye el iris y divide al segmento anterior del ojo en las cámaras anterior y posterior. La primera está llena de un líquido transparente o humor acuoso. La cámara posterior está llena de una sustancia transparente viscosa, denominada humor vítreo. Ambas cámaras están conectadas a través de la abertura del iris, la pupila, la cual puede dilatarse o contraerse y de ésta manera, regular la cantidad de luz que entra al ojo.

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) tiene contacto directo con la coroides por la lamina basal. El EPR protege a la retina de los niveles excesivos de luz (gracias al alto contenido de gránulos de melanina), favorece la renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores (debido a su actividad fagocítica) y forma parte de la barrera hemato-retiniana. La retina es un órgano fotosensible que se localiza en el fondo del globo ocular, en su parte distal hace contacto con el EPR (Farber y Adler, 1986).

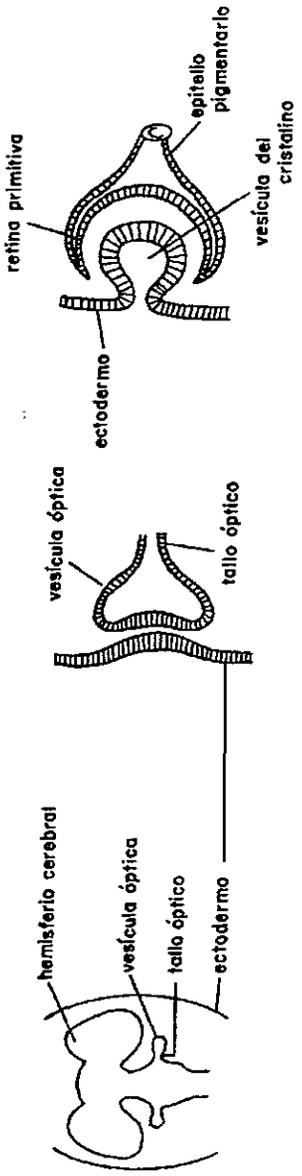
El ojo se mueve por la actividad de seis músculos extraoculares, los cuales consisten de tres pares que se mueven de manera opuesta y que se adhieren al tallo óptico. Las motoneuronas del núcleo oculo-motor que provienen del cerebro, hacen contacto con la fibras musculares. Los impulsos de dichas motoneuronas provocan que los ojos se muevan de manera coordinada y simultánea; por ejemplo, cuando miramos hacia la derecha el ojo izquierdo gira hacia adentro y el ojo derecho gira hacia afuera, sucediendo ambos eventos al mismo tiempo (Hubel, 1988).

## *DESARROLLO DE LA RETINA*

La placa neural del ectodermo anterior forma el tubo neural, del cual se forman las tres vesículas primarias llamadas procencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Martin, 1989). El procencéfalo se subdivide, posteriormente, en telencéfalo y diencéfalo.

El primordio óptico aparece a los 21 días de gestación del humano, como resultado de una evaginación de la pared del diencéfalo (Fig. 2a). La vesícula óptica, al hacer contacto con la superficie del ectodermo, induce la formación del primordio del cristalino (Fig. 2b) (Salceda, 1991). La vesícula óptica está formada por dos capas (Fig. 2c), la externa, que dará lugar al EPR y el cuerpo ciliar y la interna, que dará lugar a la retina neural, el epitelio ciliar no pigmentado y el epitelio posterior del iris. Ambas capas continúan su crecimiento hacia lo que, próximamente, será la ora serrata (donde se desarrollará el iris), y la región del tallo óptico (futuro nervio óptico) (Farber y Adler, 1986). El tallo óptico forma un continuo con la capa externa de la retina, el cual sirve como camino para los axones hacia el cerebro (Salceda, 1991).

El neuroepitelio de la capa interna de la copa óptica aparece como una formación homogénea de células epiteliales en proliferación, las cuales se extienden desde la región vítrea hasta la capa esclerótica. A la par de la proliferación celular las células comienzan a moverse y desarrollar fibras nerviosas (Farber y Adler, 1986). Las células comienzan a diferenciarse una vez que se ha formado la copa óptica, presentándose distintos grados de



A

B

C

**Figura 2.** Esquema del desarrollo del ojo de los vertebrados. A) Región anterior del tubo neural dividida en vesículas; B) vesícula óptica que al hacer contacto con el ectodermo lo induce a formar el cristalino y C) copa óptica embrionaria. (Tomado de Farber y Adler, 1986).

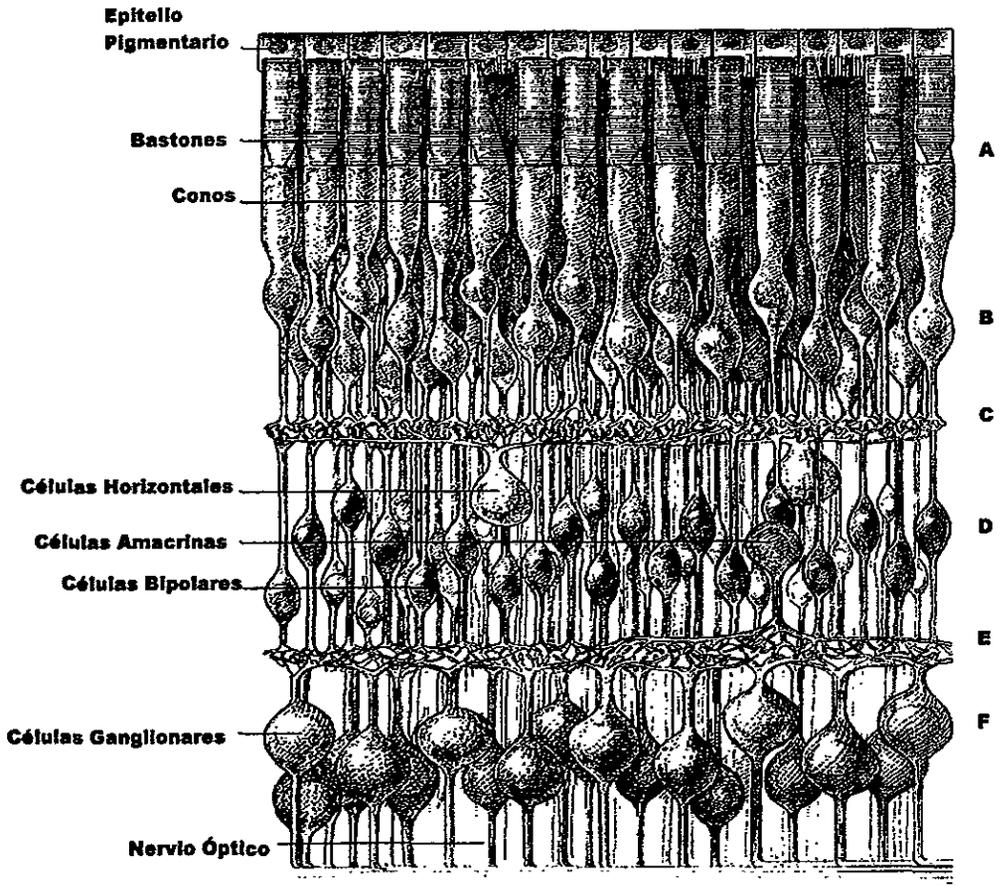
maduración; diferenciándose primero la parte central de la retina y después la periférica, cercana a la ora serrata (Salceda, 1991). Las primeras células en diferenciarse son las ganglionares, seguidas de las amacrinas, horizontales, conos, bipolares, células de Müller y bastones. Las conexiones entre las células dependen de la aparición de moléculas de reconocimiento que presenten un patrón de localización específico (Salceda, 1998). La funcionalidad de la retina se da paralelamente al desarrollo y formación de las sinapsis.

## LA RETINA

### Estructura.

La retina es un tejido que forma parte del Sistema Nervioso Central (SNC) y presenta una citoarquitectura organizada en diferentes capas celulares (Fig. 3). La primer capa está formada por los fotorreceptores, los cuales se localizan adyacentes al EPR. La siguiente capa está formada por los somas de las células horizontales, bipolares, interplexiformes y amacrinas, que forman la capa nuclear interna (CNI). Finalmente, se encuentra la capa de células ganglionares (CG) cuyos axones constituyen el nervio óptico. Las células gliales de Müller se localizan a lo largo de las capas de la retina (Farber y Adler, 1986).

La retina presenta dos regiones de unión sináptica entre las células: la capa plexiforme externa (CPE), donde hacen sinapsis los fotorreceptores con las células bipolares y horizontales; y la capa plexiforme interna (CPI), donde hacen contacto sináptico los axones de las células bipolares y amacrinas con las células ganglionares. Las células interplexiformes extienden sus procesos hacia las capas plexiforme interna y externa (Farber y Adler, 1986).



**Figura 2.** Esquema de las capas y tipos neuronales que constituyen a la retina de los vertebrados. A) Segmentos externos (SE); B) capa nuclear externa (CNE); C) capa plexiforme externa (CPE); D) capa nuclear interna (CNI); E) capa plexiforme interna (CPI) y F) capa de células ganglionares (CCG) (modificado de Hubel, 1986).

### Función.

La luz que entra al ojo a través de la pupila llega a los fotorreceptores (conos y bastones) y éstos convierten la señal luminosa en impulsos eléctricos, los cuales son enviados hacia el cerebro a través del nervio óptico (Salceda, 1991). El proceso de transformación de un fotón en señal eléctrica se conoce como fototransducción.

La fototransducción a nivel molecular se lleva cabo por una serie de reacciones químicas (Fig. 4) que inician con la absorción de un fotón de luz por la rodopsina (una proteína integral de membrana), que conduce a la fotoisomerización del 11-*cis*-retinal en *todo-trans*-retinal y su posterior descomposición en opsina (proteína) y su cromóforo, el retinaldehído (Hubbard y Wald, 1952; Furterman y Adrews, 1964). La rodopsina activa a la transducina (proteína G), la cual se une al trifosfato de guanosina (GTP), ésta activa a su vez a la fosfodiesterasa (enzima que convierte el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) en monofosfato de guanosina (GMP).

Los fotorreceptores presentan en su segmento externo un canal catiónico que produce una corriente entrante de  $\text{Na}^+$ , que en la oscuridad mantiene despolarizadas a las células fotorreceptoras, favoreciendo la liberación de glutámico de la terminal sináptica. Este canal se abre en presencia de GMPc; en la oscuridad los canales se mantienen abiertos, debido a que la concentración de GMPc es alta. La absorción de luz por parte de la rodopsina da como

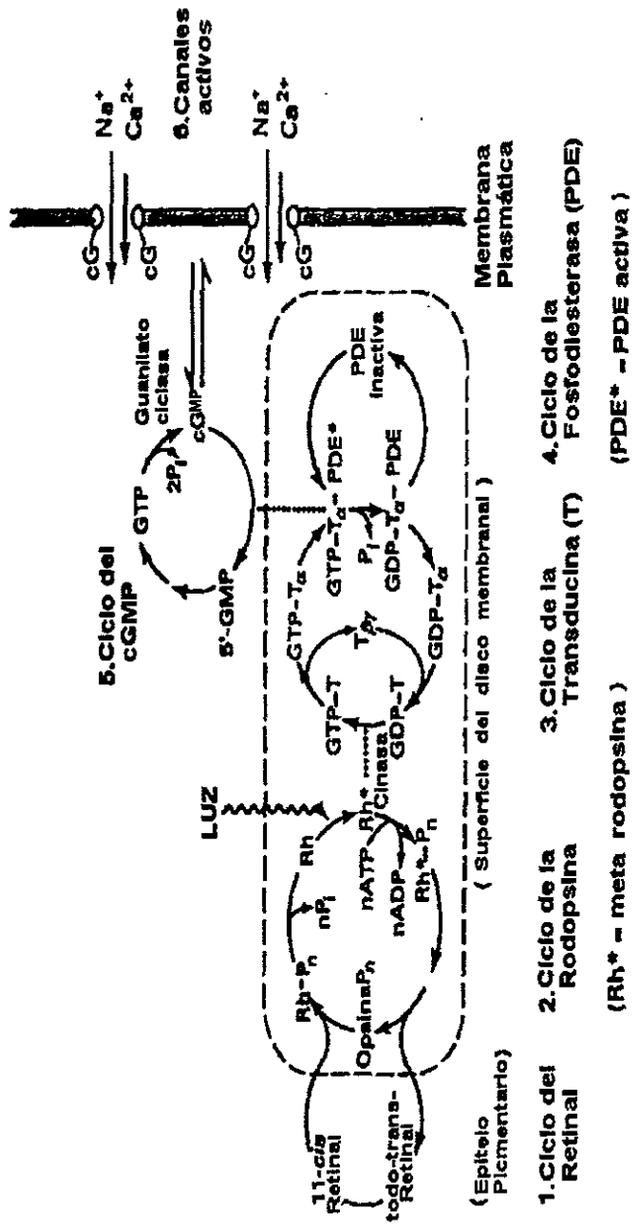
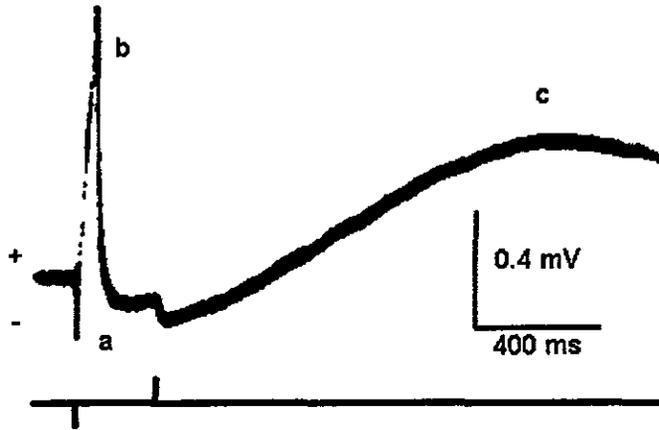


Figura 4. Reacciones cíclicas de la transducción visual (modificación de Lamb, 1986).

resultado el cierre de los canales y la hiperpolarización de la célula, la cual reduce la liberación del neurotransmisor (Farber, 1995).

Estudios electrofisiológicos han demostrado que bajo un estímulo luminoso la retina presenta una respuesta eléctrica inicial de tipo negativo (Fig. 5), denominada onda "a". Ésta corresponde a la hiperpolarización de los fotorreceptores. Posteriormente, se presenta una respuesta lenta de tipo positivo, denominada onda "b", y que corresponde a la repuesta de las células de la capa nuclear interna. Con frecuencia se observa una tercer repuesta u onda "c", correspondiente a la actividad del epitelio pigmentario (Brown, 1968).

La transmisión que se da entre los fotorreceptores, células bipolares y ganglionares se conoce como comunicación vertical de la retina. Los fotorreceptores responden con una hiperpolarización gradual (onda a), que es proporcional a la intensidad luminosa. Las células bipolares responden a una despolarización o una hiperpolarización sostenida, sin generar un potencial de acción. Finalmente, las células ganglionares responden a la estimulación de las bipolares generando un potencial de acción. La modulación de dicha transmisión se debe a dos tipos de interneuronas: las células horizontales y la amacrinas (Pasantes-Morales y Morán, 1988).



**Figura 5.** Registro del electroretinograma del gato. El inicio y término del estímulo están indicados por una línea vertical del registro inferior, las letras muestran las diferentes ondas por las cuales esta compuesto (modificación de Brown, 1968).

## NEUROTRANSMISIÓN EN LA RETINA

En la retina se presentan dos tipos de comunicación sináptica, la primera es de tipo eléctrico y ocurre a través de uniones comunicantes; la segunda es tipo químico y se presenta en la sinapsis entre las terminales de las células y está mediada por un mensajero, ésta última es el tipo de comunicación preferente en la retina. Un impulso nervioso induce la liberación del mensajero o neurotransmisor, el cual viaja a través del espacio sináptico hasta interactuar con un receptor específico de la neurona postsináptica. Dicha interacción puede provocar un cambio en la permeabilidad de la membrana a distintos iones, induciendo una respuesta de tipo inhibitorio o excitatorio (Kandel, 1991).

En 1966, Werman estableció los siguientes criterios para considerar a una sustancia como neurotransmisor:

- 1.- Anatómico: la presencia del transmisor en las terminales nerviosas.
- 2.- Bioquímicos: la existencia de mecanismos de síntesis y almacenamiento del neurotransmisor, así como mecanismos de eliminación del espacio sináptico y de liberación de las terminales sinápticas como resultado de la estimulación presináptica.
- 3.- Fisiológicos: Identidad de acción, implica que el supuesto transmisor debe reproducir los procesos iónicos membranales evocados por la liberación del transmisor natural.
- 4.- Farmacológicos: agentes farmacológicos que inhiben específicamente la síntesis, eliminación del espacio sináptico, liberación o interacción con el receptor postsináptico deben inhibir la transmisión sináptica.

Estudios anteriores en la retina han reportado como posibles neurotransmisores a la acetilcolina (ACh), el ácido glutámico, al ácido aspártico, el ácido-gama aminobutírico (GABA), la serotonina, la glicina, entre otros. El glutamato, el GABA y la glicina funcionan en el 90% de las sinapsis de la retina de los vertebrados (Morgan, 1985; Wu y Maple, 1998).

Existen evidencias bioquímicas y electrofisiológicas que apoyan la participación del glutamato y/o aspartato como neurotransmisores en los fotorreceptores, células bipolares y ganglionares. El GABA es el neurotransmisor característico de las células amacrinas y horizontales. Algunos subtipos de célula amacrinas presentan a otros neurotransmisores como la ACh, dopamina, serotonina, epinefrina y norepinefrina. La glicina es, también, un neurotransmisor característico de las células amacrinas, interplexiformes y ganglionares (Iuvone, 1995; Wu y Maple, 1998).

#### *LA GLICINA COMO NEUROTRANSMISOR EN LA RETINA*

La glicina es el aminoácido más sencillo y está presente en todos los tejidos; además, participa en un gran número de reacciones metabólicas y se ha propuesto como transmisor inhibitor de varias regiones del SNC, incluyendo a la retina (Salceda, 1983; Marc, 1985).

La retina de los vertebrados presenta grandes concentraciones de glicina que van de 1 a 7  $\mu\text{mol/g}$ , lo cual coincide con los valores reportados para la médula espinal (3 a 5  $\mu\text{mol/g}$ ) (Marc, 1985).

Los niveles de glicina en el tejido nervioso se mantienen por la alimentación a través de los vasos capilares o por sus síntesis a partir de glucosa, serina o glioxalato. La glicina se forma a partir de la serina; en la síntesis de ésta, se han descrito dos rutas principales: la primera involucra un proceso de fosforilación, utilizando la deshidrogenasa del ácido fosfoglicérico; la segunda implica la deshidrogenación del D-glicerato. En la primera reacción, el 3-fosfoglicerato es oxidado por una enzima dependiente de  $\text{NAD}^+$  y la síntesis de serina está dada por una subsecuente transaminación e hidrólisis.

La síntesis de glicina a partir de serina (Fig. 6) ocurre a través de dos reacciones principales: la primera reacción se lleva a cabo por la serina hidroximetil transferasa (SHMT), la cual utiliza como cofactores al fosfato de piridoxal (FP), al tetrahidrofolato ( $\text{FH}_4$ ) y al manganeso. Probablemente, esta vía sea la ruta principal de síntesis de glicina en el SNC, ya que su distribución está correlacionada con la presencia de glicina. Además, su actividad es de dos a tres veces mayor que en los tejidos no glicinérgicos (Salceda, 1983; Aprison y Daly, 1978). La SHMT presenta dos isoformas, una de ellas se localiza en la mitocondria y la otra es citosol. La síntesis del neurotransmisor glicina, a partir de serina, ocurre en la mitocondria (Fig. 7).

Estudios anteriores han demostrado que la glicina se libera de la retina de los diferentes vertebrados, que es dependiente de calcio y se produce por estímulos despolarizantes, eléctricos y lumínicos (Tabla 1) (Bauer, 1977; López-Colomé et al, 1978a y 1978b; Marc, 1985; Salceda, 1989).

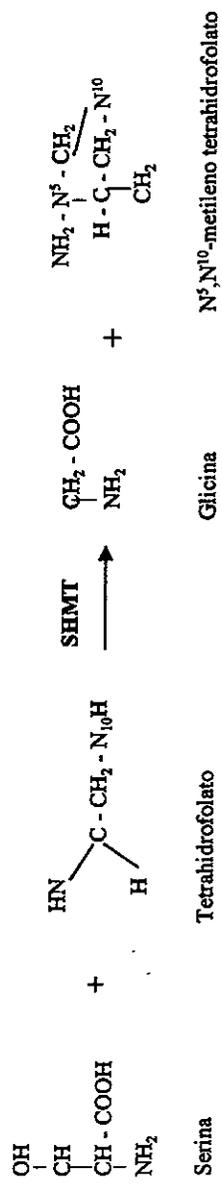
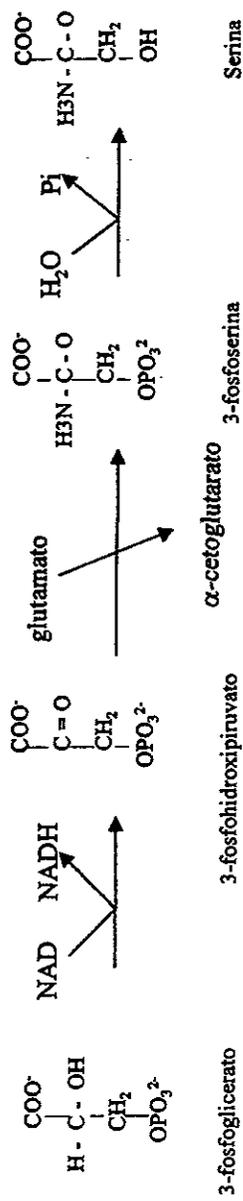
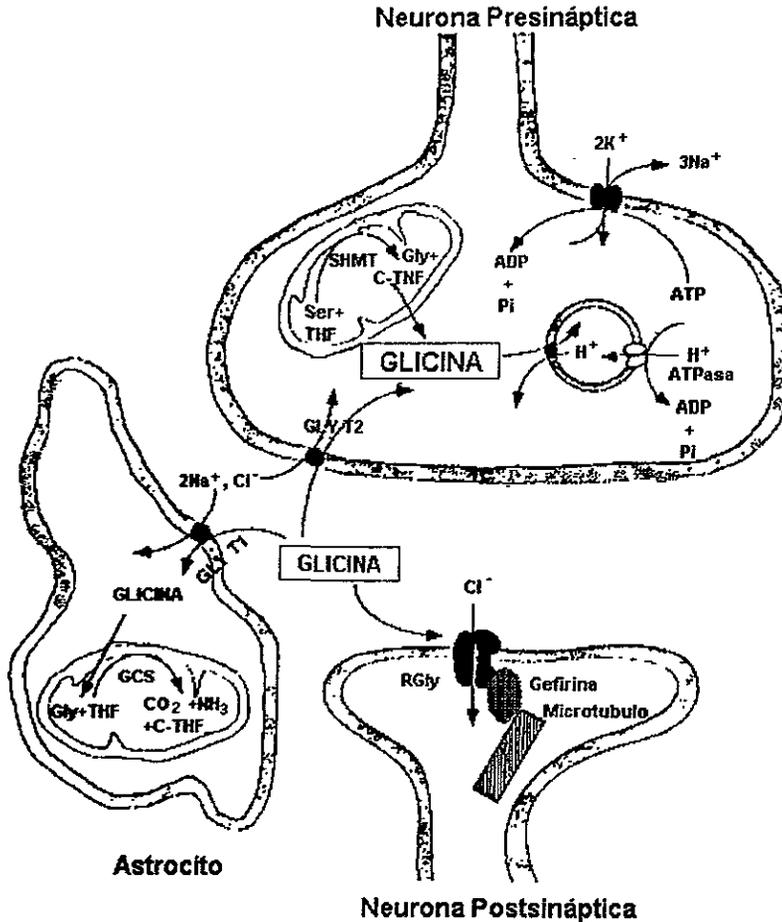


Figura 6. La síntesis y degradación de la glicina se lleva a cabo por la serina-hidroxi-metil-transferasa (SHMT) (tomado de Salceda, 1983).



**Figura 7.** Esquema de una sinapsis axodendrítica glicinérgica. La glicina se sintetiza en la mitocondria de las terminales presinápticas por la enzima serina-hidroxi-metil-transferasa (SHMT), es acumulada en las vesículas sinápticas por una proteína dependiente del transporte de protones y es liberada al espacio sináptico. El potencial inhibitorio postsináptico se genera por una corriente de cloro producida por la activación del recepto de glicina (RGly). La acción de la glicina es terminada por los transportadores específicos dependientes de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, localizados en la membrana plasmática de la presinápsis (GLYT1) y de la glia (GLYT2). La glicina es degradada en la mitocondria de la astroglia por el sistema de degradación de la glicina (GCS) (modificado de Zaffa, 1997).

**Tabla 1. Liberación de glicina en la retina de los vertebrados.**

Organismo	Estímulo	Dependiente de Ca <sup>++</sup>
Pez dorado	40, 56 mM K <sup>+</sup>	Sí
Rana	Espontanea	No
(sinaptosomas)	50 mM K <sup>+</sup>	Sí
<i>Xenopus laevis</i>	56 mM K <sup>+</sup>	Sí
Pollo (sinaptosomas)	40 mM K <sup>+</sup>	Sí
	24 mM A23187	Sí
Rata	40 mM K <sup>+</sup>	Sí
	6 Hz de destellos luminosos	---
Conejo	Destellos luminosos,	Sí
	40 mM K <sup>+</sup>	
	10 μM Glutamato	Sí
	10 μM Glicina	No
Gato ( <i>in vivo</i> )	Destellos luminosos	---

Modificada de Marc, 1985.

La glicina, además, es removida del espacio sináptico a través de un mecanismo de transporte de alta afinidad ( $K_m$  de 20 a 100  $\mu\text{M}$ ) dependiente de  $\text{Na}^+$  (Logan y Snyder, 1972), presente en la retina de los diferentes vertebrados (Salceda, 1989; López-Vera, 1997).

La degradación de la glicina en el SNC ocurre a través de un heteroligómero (GCS) que se asocia a la membrana interna de la mitocondria y está formado por cuatro proteínas (denominadas proteínas P, H, T y L). La proteína P cataliza la descarboxilación de la glicina (reacción dependiente de fosfato de piridoxal) y transfiere a la glicina al residuo metálico del grupo lipoprostético de la proteína H. La proteína T cataliza la formación de amonio a partir del intermediario anclado a la proteína H. Finalmente, la proteína L oxida a la proteína H (Okamura-Ikeda et al, 1992).

Estudios de autorradiografía e inmunohistoquímica han demostrado que la glicina se acumula en las células amacrinas (varias subpoblaciones) de la retina de diferentes vertebrados. Además, existen otros tipos celulares que son considerados como glicinérgicos. En los anfibios particularmente, la glicina se localiza en dos tipos de células amacrinas, en células ganglionares, interplexiformes y bipolares (Morgan, 1985; Pourcho y Goebel, 1990).

## EL RECEPTOR DE GLICINA.

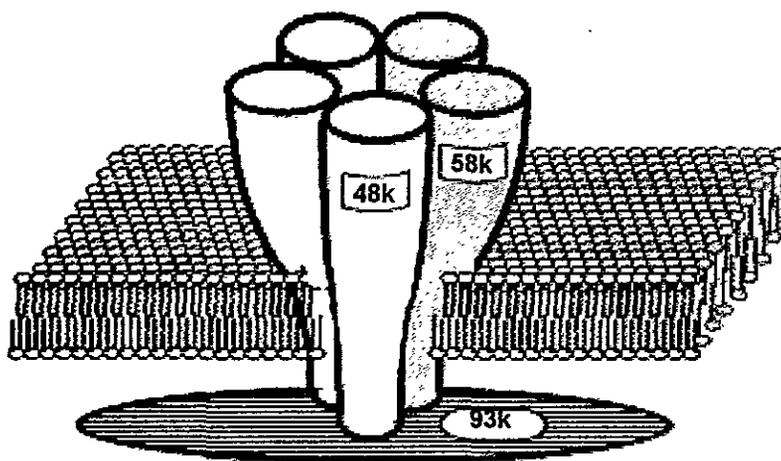
Evidencias electrofisiológicas han demostrado que la glicina induce un potencial postsináptico inhibitorio (Werman, 1968; Curtis, 1968) debido a que activa una corriente de  $\text{Cl}^-$  (Curtis, 1974). Evidencias de tipo farmacológico, bioquímico, inmunológico y molecular indican que la glicina actúa de manera específica sobre un receptor postsináptico, a través del cual, permea el  $\text{Cl}^-$  hacia el interior de las células, induciendo una hiperpolarización (Betz y col., 1994). Al analizar la corriente inducida por glicina sobre el canal de  $\text{Cl}^-$ , se demostró que este canal pasa por diferentes subestados de conductancia y que su apertura depende de la unión de dos moléculas del agonista (Bormann, 1990).

La estriquina, un alcaloide convulsivante extraído de la planta *Strychnos nuxvomica*, ha sido una herramienta de gran utilidad para la caracterización del receptor postsináptico de glicina (RGly), debido a que es el antagonista específico que provoca una inhibición de la respuesta electrofisiológica inducida por glicina. En la médula espinal, la estriquina presenta una unión de alta afinidad saturable, con una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 5 a 10nM. La unión de estriquina radiactiva a dicho receptor es de tipo alostérica, ya que el desplazamiento de una molécula de estriquina se efectúa por dos moléculas de glicina (Yong y Snyder, 1974a); sin embargo los sitios de reconocimiento de ambas moléculas no son los mismos (Marvizón y col., 1986). Además, dentro de los estudios de caracterización del receptor en la retina se encontró que la unión de estriquina radiactiva fue inhibida por  $\beta$ -alanina, L-serina, L-alanina, D-alanina y taurina (Pérez-León y Salceda, 1996); las cuales son consideradas como

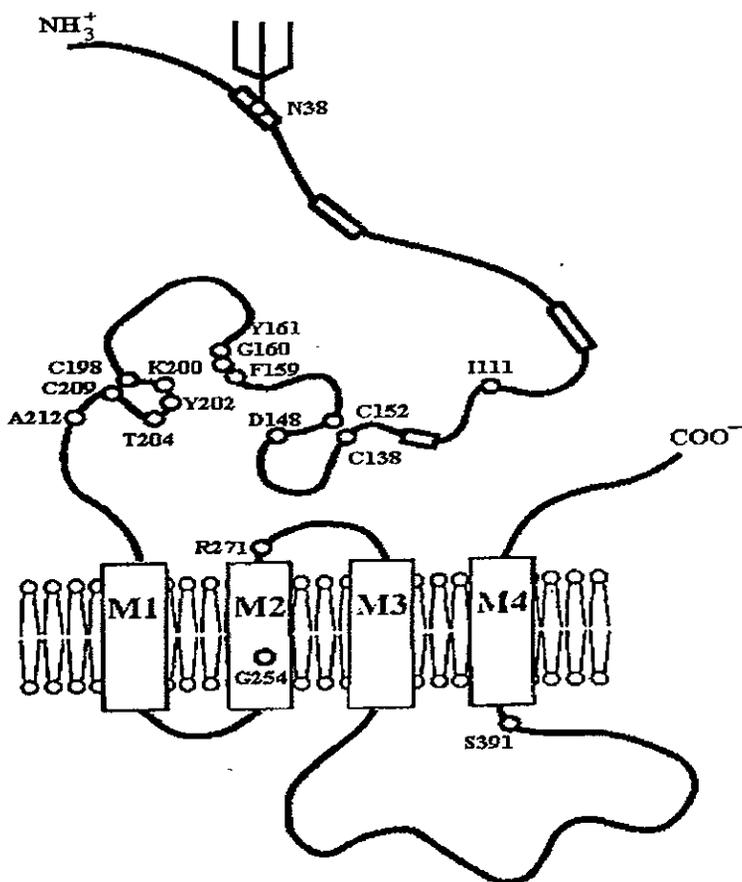
agonistas de dicho receptor, debido a que producen la misma respuesta electrofisiológica que la glicina en neurona aisladas del telencéfalo (Tokutomi y col. 1989).

Utilizando el receptor de glicina de la médula espinal purificado y solubilizado, y con ayuda de la 2-amino estricnina acoplada a una matriz de agarosa (Pfeiffer y col., 1982) se pudo conocer la estequiometría del mismo. Con estos resultados, se propuso un modelo estequiométrico para el receptor de glicina (Fig. 8) formado por una estructura pentamérica constituida, generalmente, por dos subunidades transmembranales  $\alpha$  de 48 kDa y 3 subunidades transmembranales  $\beta$  de 58 kDa (Langosh y col., 1988). Esta última se encuentra asociada a una proteína intracelular denominada gefirina, la cual tiene un peso molecular de 93 kDa y está asociada directamente al citoesqueleto (Pfeiffer y col., 1982; Schmitt, 1987). Esta proteína es determinante para formar agregados del receptor de glicina en las terminales postsinápticas de las células (Froehner, 1993).

Existe una semejanza del 50 al 70% en la estructura primaria de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del RGly (Fig. 9). Los cuatros segmentos hidrofóbicos intramembranales (M1-M4); los cuales se extienden a través de la membrana formando estructuras de tipo  $\alpha$  hélice, están altamente conservados. (Grenningloh y col., 1987). El arreglo anterior es semejante al observado en el receptor nicotínico de ACh (RnACh) (Noda y col., 1982), el receptor tipo 3 de serotonina (R5HT<sub>3</sub>) (Maricq y col., 1991), el canal de cloro inducido por



**Figura 8.** Esquema de la estructura oligomérica del receptor postsináptico de glicina (RGly). Los sitios de reconocimiento del agonista se localizan sobre las subunidades de 48kDa y la subunidad de 93kDa sirve para anclar el complejo al citoesqueleto (tomado de Storm-Mathisen, 1990).



**Figura 9.** Esquema de la estructura de la subunidad  $\alpha 1$  del RGly. Los rectángulos representan los dominios transmembranales M1-M4. La G254 ocupa el sitio más estrecho del canal de cloro en el segmento M2. Los rectángulos pequeños del extremo amino terminal representan los sitios involucrados en el ensamblaje de las subunidades. La glicosilación ocurre en el residuo N38 y la fosforilación, probablemente, en el S391. Los residuos I111 y A212 forman parte del sitio de unión de baja afinidad para la  $\beta$ -alanina y la taurina; así como, el D148 modula la unión de estricnina (tomado de Zaffra, 1997).

glutamato de *Caenorhabditis elegans* (Cully y col., 1994) y el receptor tipo A de GABA (RGABA<sub>A</sub>) (Schofield y col., 1987); los cuales, junto con el RGly (Pfeiffer y col., 1982), forman parte de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando (Grenningloh y col., 1987; Schofield y col., 1987).

#### El papel de la gefirina.

La gefirina es una proteína citoplasmica que se localiza tanto en las membranas postsinápticas glicinérgicas (Triller y col., 1985, Altschuler y col., 1986), como en las GABAérgicas (Sassoé-Pognetto y col., 1995). Asimismo, la gefirina se une a la tubulina y/o a los microtúbulos con una alta afinidad (Kirsch y col., 1991), por lo que se ha propuesto que esta proteína es importante para la formación de agregados del RGly en las terminales postsinápticas (Kirsch y col., 1993b), así como de la inmovilización del receptor en la membrana (Betz y col., 1994).

#### La subunidad $\beta$ .

La subunidad  $\beta$  del RGly, al ser expresada homológamente en ovocitos de *Xenopus*, fue capaz de responder al estímulo por glicina, generando una corriente de Cl<sup>-</sup> sensible a estriknina (Grenningloh y col., 1990b). Estos experimentos indican que la subunidad  $\beta$  es necesaria para la formación del receptor; sin embargo, es posible encontrar receptores con subunidades homólogas ( $\alpha$  o  $\beta$ ), ya que la subunidad  $\beta$  se ha encontrado (por métodos inmunohistoquímicos) en regiones donde no se localiza a la subunidad  $\alpha$ , por lo que es posible que existan otras isoformas de la subunidad  $\alpha$  o que se encuentren homoligómeros de la subunidad  $\beta$  (Betz, 1991). Sin embargo, el

mayor estado de conductancia se obtiene cuando se forma el heteroligómero (Pérez-León y Salceda, 1996); además, errores de traducción de la subunidad  $\beta$  (productos de una mutación) (Mulhadt y col., 1994) disminuyen el número de receptores, lo cual indica que es importante para un eficiente ensamblaje del RGly (White y Heller, 1982; Becker y col., 1992). También, se ha encontrado que, en el dominio transmembranal de la subunidad  $\beta$  se localiza una secuencia de aminoácidos que participa en el reconocimiento entre las diferentes subunidades para su posterior asociación (Kushe y col., 1993).

Por otro lado, la subunidad  $\beta$ , en su segmento transmembranal M2, presenta un sitio insensible a picrotoxina (un bloqueador de canales de cloro), ya que se ha observado que esta droga es un antagonista competitivo de la glicina en la subunidad  $\alpha 1$  (Lync y col. 1995); y no así, en el heteroligómero  $\alpha/\beta$  (Pribilla y col., 1992). Además, en la subunidad  $\beta$  se encuentra el sitio de interacción con la gefirina, localizado en el asa intracelular M3-M4 (aminoácidos 394-411) (Meyer y col., 1995).

### La subunidad $\alpha$ .

Los primeros experimentos de fotoafinidad con estricnina-H3 sobre el RGly demostraron que el sitio de unión de ligandos se localiza en la subunidad  $\alpha$  (Graham y col., 1981 y 1983). La estricnina a concentraciones nanomolares bloquea la apertura del canal de cloro provocada por glicina en la subunidad  $\alpha$  del RGly expresada heterológamente en ovocitos de *Xenopus* (Schmieden y col., 1989). Experimentos de tipo bioquímico y con DNA complementario (DNAc) han

reportado varios subtipos de la subunidad  $\alpha$ ; las secuencias de dichas subunidades presentan una alta homología con la subunidad  $\alpha 1$  del adulto.

El primer subtipo ( $\alpha 2$ ) fue encontrado al observar el desarrollo ontogenético de la médula espinal; éste se expresa durante las etapas embrionaria y neonatal. El  $\alpha 2$  difiere en su afinidad por el antagonista, en su masa molecular (49kDa) y en los anticuerpos que lo reconocen. Durante las dos primeras semanas postnatales el RGly neonatal se reemplaza completamente por la isoforma adulta ( $\alpha 1$ ) (Becker y col., 1988).

Por medio de búsquedas en librerías genómicas, se encontraron otras isoformas, denominadas  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ , la primera se obtuvo de una librería genómica de la rata y que se expresa diferencialmente tanto en la rata como en el humano (Kushe y col., 1990a,b); y la  $\alpha 4$  proviene de cerebro del ratón adulto (Matzenbach y col., 1994). El RNAm de la subunidad  $\alpha 3$  se expresa principalmente en estadios postnatales (Kuche y col., 1990a). Se desconoce el estadio en el cual se expresa el RNAm de la subunidad  $\alpha 4$ , ya que en el cerebro del roedor adulto se encuentra en bajas concentraciones (Betz, 1991).

Los transcritos de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  expresados en ovocitos de *Xenopus* formaron canales de  $Cl^-$  que se bloquean por concentraciones nanomolares de estricnina (Schmieden y col., 1989; Sontheimer y col., 1989; Grenningloh y col., 1990; Kushe y col., 1990b). Además, se encontró una variante de la subunidad  $\alpha 2$  que disminuye hasta 500 veces su afinidad por la estricnina y que corresponde a una

isoforma que se expresa en estadios neonatales en la médula espinal de la rata. Esta isoforma se denominó  $\alpha 2^*$ , la cual presenta un cambio en la glicina 167 por glutamato (Kushe y col., 1990a).

Los transcritos de la subunidad  $\alpha 1$  se han encontrado principalmente en la médula espinal, el tallo cerebral y el colículo; en el caso de  $\alpha 2$ , ésta se expresa en diferentes regiones del cerebro como el hipocampo, la corteza cerebral y el tálamo. La subunidad  $\alpha 3$  se ha observado en el bulbo olfatorio, el hipocampo y cerebelo. Por otro lado, la subunidad  $\beta$  se expresa homogéneamente en el cerebro y la médula espinal (Betz, 1990).

En la retina, a través de experimentos de inmunohistoquímica, se demostró que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se expresan en la CPI de la retina de los mamíferos (Jager y Wässel, 1993). Particularmente, en la retina de la rata, se ha demostrado que los mensajeros de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se localizan en la parte externa e interna de la CNI, respectivamente, y en las células ganglionares. También, se encontró la colocalización de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\beta$  y de la gefirina en la CNI y la capa de células ganglionares (Greferath y col., 1994).

En el caso de los anfibios, se observó la presencia de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta$  en las CPI y CPE (Smiley y Yazulla, 1990; Yazulla y Studholme, 1991; Yang y Wu, 1993; Pérez-León y Salceda, 1998). Así mismo, las células de Müller se han marcado con anticuerpos que reconocen a las diferentes subunidades del

RGly (Pérez-León y Salceda, 1998); sin embargo, no se conoce el tipo de *isoformas* que presentan.

#### La regulación del RGly.

A través de experimentos de mutagénesis se demostró que la glicina-160 forma parte del sitio de unión de alta afinidad de glicina (Kushe y col., 1990a) y la isoleucina-111 y alanina-212 son parte del sitio de unión de baja afinidad (y al que se unen la  $\beta$ -alanina y la taurina) (Fig. 10); otros residuos importantes para la unión del antagonista son la tirosina-202 y la lisina-200 (Schofield y col., 1996). Adicionalmente, las citeínas-198 y 209 parecen ser importantes para mantener la conformación de la proteína y, por lo tanto, su función (Schofield y col., 1996).

El estado de mayor conductancia del RGly de la médula espinal se presenta cuando se forman *receptores heterólogos*  $\alpha/\beta$ . Sin embargo, en la sección transmembranal M2 de la subunidad  $\alpha$  se localiza un sitio (aminoácido 254) importante para la determinación de estados de conductancia en las distintas *isoformas* (glicina en la subunidad  $\alpha 1$  y la alanina en la  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ); asimismo existe un sitio que le confiere sensibilidad al cianotrifetilborato (bloqueador no competitivo del canal de RGly) (Schofield y col., 1996).

El sitio de activación de la corriente del receptor se localiza en la arginina-271, ya que transformaciones de este sitio, causan que el efecto de la  $\beta$ -alanina y la taurina sobre el receptor se vuelva *antagónica* (Rajendra y col., 1995a).

Además, dicha transformación disminuye la corriente provocada por glicina en toda la célula. Asimismo, transformaciones hechas en aminoácidos del asa extracelular localizada entre los segmentos M2 y M3 disminuyen la transducción de señales provocadas por los agonistas (Lynch y col., 1995; Schofield y col., 1996).

Por otro lado, se ha demostrado que en distintos ambientes de oxidación y reducción la unión de estricnina-H3 se modifica (Ruíz-Gómez y col., 1991a), por lo que se puede suponer que dichos ambientes modulan el funcionamiento del RGly.

Estudios electrofisiológicos del receptor expresado en ovocitos de *Xenopus*, demostraron que la actividad de la proteína cinasa C (PKC) inhibe la corriente de Cl<sup>-</sup> producida por la glicina; observándose un efecto contrario al activar a la proteína cinasa A (PKA) (Vaello y col., 1994). Este mismo efecto fue observado en la médula espinal de la rata (Song y Huang, 1990; Uchiyama y col, 1994). Sin embargo, en células aisladas del hipocampo, la PKA no produjo un cambio en la corriente de Cl<sup>-</sup> del receptor de glicina, pero sí se observó un efecto estimulador por parte de la PKC (Schönrock y Bormann, 1995). Actualmente se sabe que la serina-319 de la subunidad  $\alpha$  puede ser fosforilada por la PKC (Ruíz-Gómez y col., 1991b). Se desconoce el sitio específico de fosforilación del RGly silvestre por la PKA; sin embargo, existe una secuencia consenso, la cual es producto de una edición alternativa del RGly, en la cual puede actuar la PKA (Malosio y col. 1991a).

La gefirina, también, es susceptible de ser fosforilada pero a través de mecanismos que involucran cinasas dependientes de calmodulina, donde éstas al fosforilar a la tubulina, la vuelve incapaz de interactuar con proteínas asociadas y de autoensamblarse; lo cual sería un factor importante en la regulación de la gefirina (Langosh y col., 1992).

Por medio de experimentos de desplazamiento se determinó que, los esteroides se unen de manera competitiva al RGly, sobre un sitio diferente a los que se conocen para los agonistas y antagonistas (Wu y col., 1990); además, cierto tipo de esteroides son capaces de aumentar la afinidad por el receptor (Prince y Simmonds, 1992).

El zinc es un metal que puede localizarse en las vesículas sinápticas donde se almacenan los neurotransmisores (Assaf y Chung, 1984). Se ha visto que bajas concentraciones de zinc (menor de  $10\mu\text{M}$ ) aumentan la respuesta por glicina; contrariamente, altas concentraciones de zinc (mayor de  $100\mu\text{M}$ ) inhiben dicha respuesta (Bloomenthal y col., 1995). El zinc es capaz de regular al RGly debido a que en la región amino terminal de la subunidad  $\alpha$  se localiza en el sitio de unión de dicho metal (Laube y col., 1995).

#### Actividad de la glicina sobre el receptor de tipo NMDA.

La glicina puede actuar como agonista sobre un sitio específico dentro de los receptores de glutamato que responden al N-metil-D-aspartato (NMDA) (Gasic y Hollmann, 1992). La respuesta electrofisiológica que produce la glicina sobre el

receptor de NMDA, se presenta a concentraciones mayores de  $0.1\mu\text{M}$ ; además, este sitio de unión de la glicina se puede distinguir debido a que es insensible a estriknina. Por otro lado, la serina y la alanina (agonista del RGly) (Sarensaari y Oja, 1992) son agonistas de la glicina en el receptor NMDA; mientras que, el HA-966, el ácido 7-clorokinurénico y el zinc son antagonistas. La glicina reduce la unión de los antagonistas del glutamato, pero aumenta la unión de éste último; por lo tanto, es capaz de regular la actividad fisiológica del receptor (Leeson y Iversen, 1994). El receptor de tipo NMDA participa en procesos de plasticidad neuronal, aprendizaje, desarrollo y muerte neuronal (Nakanishi, 1992). Estudios de ensayos de unión de glicina- $\text{H}^3$  y glutámico- $\text{H}^3$  demostraron que el receptor de tipo NMDA no se encuentra en las fracciones sinaptosomales de la retina de la rana (Pérez-León, 1999).

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es caracterizar al receptor postsináptico de glicina en la retina completa de la rana y demostrar su posible modulación por la actividad de las proteínas cinasas A o C. Para ello se tienen los siguientes objetivos particulares:

- Caracterizar la cinética de unión específica de glicina- $H^3$  y estircnina- $H^3$  al RGly en la retina completa.
- Caracterizar farmacológicamente al RGly utilizando agonistas y antagonistas.
- Identificar una posible modulación por fosforilación debido al efecto de las PKA y PKC sobre la unión específica de glicina- $H^3$  y estircnina- $H^3$ .

## METODOLOGÍA

### Obtención del tejido.

Las ranas (*Rana moctezuma*) fueron adaptadas a la oscuridad con un mínimo de dos horas. Posteriormente, se sacrificaron por decapitación y se obtuvo el globo ocular, el cual se hemisectó y la retina se separó de la copa óptica en Ringer Krebs-Bicarbonato (RKB; NaCl 118mM; KCl 4.7mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mM; CaCl<sub>2</sub> 2.5mM; MgSO<sub>4</sub> 1.17mM; glucosa 5.6mM; NaHCO<sub>3</sub> 25mM; pH 7.4). El procedimiento se realizó bajo luz tenue roja.

### Obtención de rebanadas de médula espinal de rata.

Las ratas (cepa Long-Evans) se sacrificaron por decapitación y se disecó una fracción cervical de la médula espinal, la cual se conservó en RKB frío. Posteriormente, con ayuda de un rebanador McIlwain (Mickle Laboratory Engineering), se hicieron cortes transversales de 250 a 400  $\mu$ m de grosor.

### Ensayo de unión de glicina y estircnina.

El tejido se incubó en RKB durante 10 minutos a diferentes temperaturas en presencia de 10nM de glicina-H<sup>3</sup> (43, 45 Ci/mmol) o estircnina-H<sup>3</sup> (23 Ci/mmol); en condiciones de oscuridad, la unión específica se determinó utilizando sistemas de incubación paralelos, en los cuales se incubó el tejido en presencia del compuesto radiactivo y de glicina 1mM o estircnina 100  $\mu$ M respectivamente. Al término de la incubación el tejido se lavó a 4°C en 3ml de

RKB durante 2 minutos, se pesó y digirió a 48°C en 500 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% por 30-40 minutos. Más tarde, se agregó al tejido 5ml de tritosol (Fricke, 1975) y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo líquido, Beckman LS 1701. El análisis de Rosenthal se realizó con ayuda del programa computacional ORIGIN versión 3.0.

Cuando se estudió el efecto de diferentes drogas sobre la unión de glicina- $H^3$  y estricnina- $H^3$ , éstas se agregaron al mismo tiempo que los compuestos radiactivos. El efecto del  $Na^+$  sobre la unión específica de glicina- $H^3$  y estricnina- $H^3$  se estudió sustituyendo el NaCl por diferentes concentraciones de cloruro de colina o cloruro de litio.

La forskolina, estaurosporina y el 12-miristrato-13-acetato (PMA) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y la concentración final del solvente no fue mayor de 0.001%. La 3-isobutil-1-metil xantina (IBMX) y la teofilina fueron disueltas en una solución alcalina.

#### Niveles de nucleótidos cíclicos.

El tejido se incubó en un RK sin  $Na^+$  a temperatura ambiente (25°C) por 10 minutos, en presencia de 10nM de glicina y/o de drogas que modifican los niveles de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc). Al término de la incubación, las retinas se homogeneizaron en 500 µl de 0.4M de  $HClO_4$  y las proteínas se sedimentaron por centrifugación a 1500 r.p.m. El sobrenadante se neutralizó con

100µl de KOH, 1.4M + KHCO<sub>3</sub>, 1.2M y el sedimento se eliminó por centrifugación. La determinación en extractos perclóricos de los niveles de nucleótidos cíclicos se hizo a través de un radioinmunoensayo, utilizando los reactivos comerciales de Amersham.

#### Quantificación de proteínas.

Las proteínas precipitadas con HClO<sub>4</sub> se disolvieron con NaOH 1N y se determinó su concentración en un microensayo, con los reactivos comerciales de Bio-Rad, basado en el método reportado por Lowry y colaboradores (1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

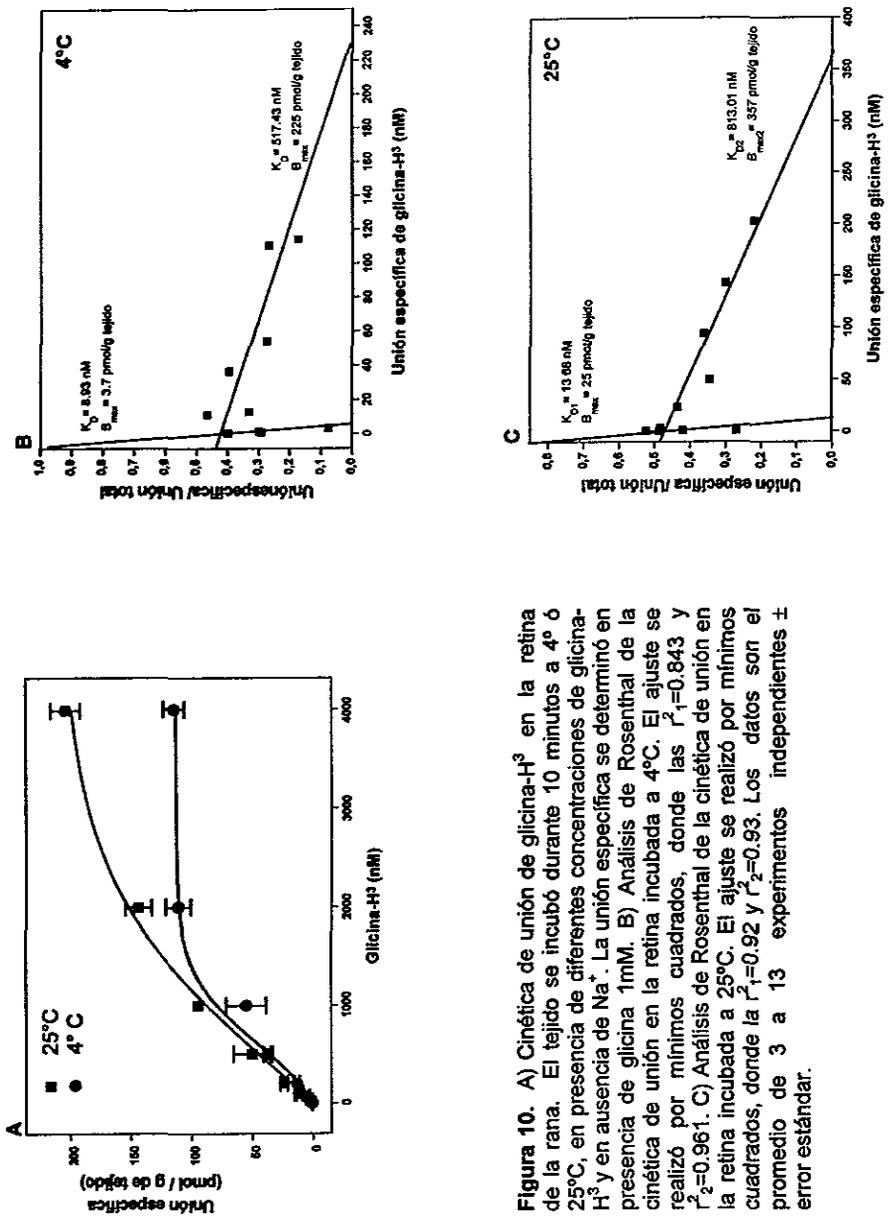
## RESULTADOS

### Ensayos de unión de glicina- $H^3$ y estircina- $H^3$ .

Con el fin de determinar eficientemente la unión de glicina y asegurar que ésta no corresponde a los sitios del transportador, las incubaciones se realizaron a temperaturas de 4°C y 25°C. Sin embargo, se desconoce si a 4°C el transportador une a la glicina. Dado que el transporte de glicina depende de  $Na^+$ , realizamos los experimentos en presencia y ausencia del mismo.

En la retina de la rana, los experimentos de unión de ligandos radiactivos, realizados en un medio carente de  $Na^+$ , demostraron que la unión específica de glicina- $H^3$ , a una concentración de 10nM, presenta valores de  $0.66 \pm 0.09$  pmol/g de tejido y de  $1.21 \pm 0.09$  pmol/g de tejido a 4° y 25°C, respectivamente; dichos valores representan el 30% de la radiactividad total unida.

La unión específica de glicina- $H^3$  se estudió a 4°C en presencia de diferentes concentraciones y presentó una cinética hiperbólica, la cual es saturable a una concentración de 2 $\mu$ M (Fig. 10a). A través del análisis de Rosenthal (Fig. 10b), se determinó la presencia de dos sitios de unión; los cuales presentan constantes de alta afinidad ( $K_D= 517.43$ nM y  $K_D=8.93$ nM) y valores de unión máxima ( $B_{max}$ ) de 225 pmol/g de tejido y 3.7 pmol/g de tejido, respectivamente. A 25°C, la unión específica de glicina- $H^3$  presentó una cinética hiperbólica (Fig. 10a) y se saturó a una concentración de 4 $\mu$ M; a altas concentraciones, la unión específica es mayor que a 4°C. Por medio del análisis de Rosenthal, se pudo observar la presencia de



**Figura 10.** A) Cinética de unión de glicina- $H^3$  en la retina de la rana. El tejido se incubó durante 10 minutos a 4° ó 25°C, en presencia de diferentes concentraciones de glicina- $H^3$  y en ausencia de  $Na^+$ . La unión específica se determinó en presencia de glicina 1mM. B) Análisis de Rosenthal de la cinética de unión en la retina incubada a 4°C. El ajuste se realizó por mínimos cuadrados, donde las  $r^2_1=0.843$  y  $r^2_2=0.961$ . C) Análisis de Rosenthal de la cinética de unión en la retina incubada a 25°C. El ajuste se realizó por mínimos cuadrados, donde la  $r^2_1=0.92$  y  $r^2_2=0.93$ . Los datos son el promedio de 3 a 13 experimentos independientes  $\pm$  error estándar.

dos sitios de unión de alta afinidad ( $K_D = 813.01\text{nM}$  y  $K_D = 13.68\text{nM}$ ) y valores de  $B_{\text{max}}$  de 25 y 357 pmol/g de tejido (Fig. 10c).

Los valores de unión específica de estriquina- $\text{H}^3$  (10nM), resultaron ser semejantes a los de la glicina ( $0.64 \pm 0.11$  pmol/g de tejido y  $0.8 \pm 0.06$  pmol/g de tejido) a  $4^\circ$  y  $25^\circ\text{C}$  respectivamente; sin embargo, éstos valores representan el 20% de la radiactividad total unida.

La unión específica de estriquina- $\text{H}^3$ , también, se estudió a diferentes concentraciones y presentó una cinética hiperbólica, que fue saturable a una concentración de  $1\mu\text{M}$  (Fig. 11a). Al realizar el análisis de Rosenthal, se observó la presencia de 2 sitios de unión de alta afinidad ( $K_D = 95.24$  y  $K_D = 250\text{nM}$ ) y los valores de  $B_{\text{max}}$  fueron de 63 pmol/g de tejido y 81 pmol/g de tejido (Fig. 11b). Cuando se incubó el tejido a  $25^\circ\text{C}$ , la unión específica aumentó 10% en presencia de altas concentraciones del ligando; dicha unión se saturó a una concentración de 600nM de estriquina- $\text{H}^3$ ; observándose, nuevamente, dos sitios de unión pero con valores de  $K_D$  de 166.66nM y  $1\mu\text{M}$  y  $B_{\text{max}}$  de 59 y 195 pmol/g de tejido, respectivamente (Figura 11c).

#### Efecto de cationes monovalentes sobre la unión de glicina- $\text{H}^3$ y estriquina- $\text{H}^3$ .

El efecto del  $\text{Na}^+$  en la unión específica de glicina y estriquina se estudió a  $4^\circ\text{C}$  y a una concentración de ligando de 10nM. La unión específica de glicina fue mayor al incubar el tejido en presencia de  $\text{Na}^+$  ( $3.31 \pm 0.4$  pmol/g de tejido), que en

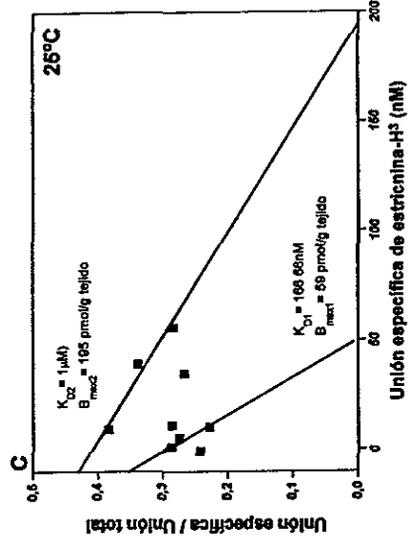
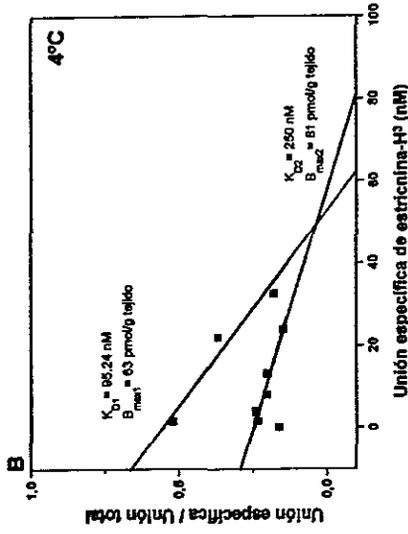
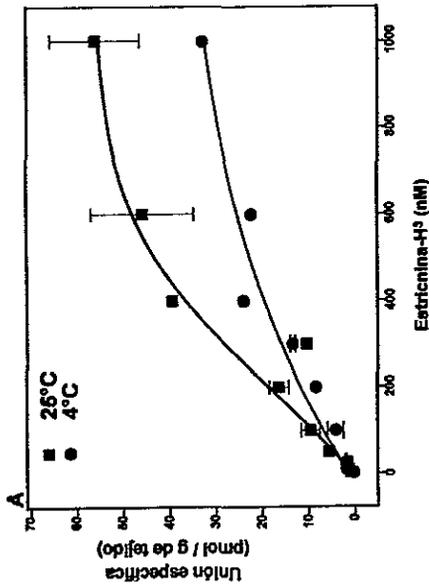
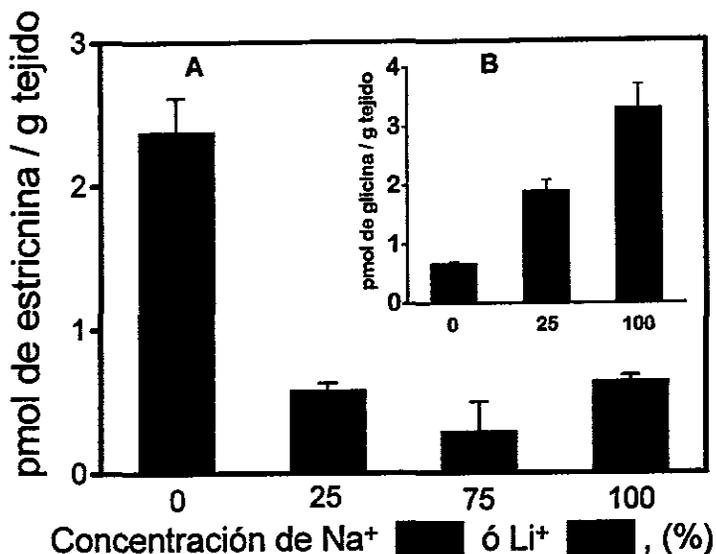


Figura 11. A) Cinética de unión de estrichina- $H^3$  en la retina de la rana. El tejido se incubó en la oscuridad durante 10 minutos a  $4^\circ$  ó  $25^\circ C$ , en presencia de diferentes concentraciones de estrichina- $H^3$ . La unión específica se determinó en presencia de estrichina  $100 \mu M$ . B) Análisis de Rosenthal de la cinética de unión en la retina incubada a  $4^\circ C$ . El ajuste se realizó por mínimos cuadrados, donde las  $r^2_1=0.97$  y  $r^2_2=0.97$ . C) Análisis de Rosenthal de la cinética de unión en la retina incubada a  $25^\circ C$ . El ajuste se realizó por mínimos cuadrados, donde la  $r^2_1=0.95$  y  $r^2_2=0.91$ . Los datos son el promedio  $\pm$  error estándar.

ausencia de  $\text{Na}^+$  ( $0.68 \pm 0.02$  pmol/g de tejido) (Fig. 12b). Dicho efecto no fue observado al sustituir el  $\text{Na}^+$  por la misma concentración de  $\text{Li}^+$ .

Por el contrario, la unión específica de estricnina- $\text{H}^3$  fue mayor cuando las retinas se incubaron en un medio carente de  $\text{Na}^+$  (Fig. 12a); dicha unión disminuyó hasta en un 50% en presencia de bajas concentraciones de  $\text{Na}^+$  (30mM). Mientras que la unión total de estricnina- $\text{H}^3$  tiende a aumentar al incubar el tejido en presencia de  $\text{Na}^+$ , la unión específica disminuye. La unión específica de estricnina- $\text{H}^3$  es igualmente afectada por la presencia de  $\text{Li}^+$ ; es decir, la sustitución del  $\text{Na}^+$  por  $\text{Li}^+$  causó disminución en la unión de estricnina- $\text{H}^3$ .

Con el objeto de conocer la especificidad del efecto del  $\text{Na}^+$  en la unión de glicina- $\text{H}^3$  y estricnina- $\text{H}^3$  en la retina, se realizaron experimentos similares en rebanadas de médula espinal de la rata; las rebanadas se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  con glicina- $\text{H}^3$  o estricnina- $\text{H}^3$  (10nM) en presencia y ausencia de  $\text{Na}^+$ . En estos experimentos observamos (Tabla 2) que la unión total de glicina- $\text{H}^3$  aumentó cuando se incubó en presencia de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, la unión específica fue la misma en presencia y en ausencia de  $\text{Na}^+$ . Por otro lado, los valores de la unión total y específica de estricnina- $\text{H}^3$  en las rebanadas de médula espinal no se modificaron en presencia o en ausencia de  $\text{Na}^+$  (Tabla 3).



**Figura 12.** Efecto de cationes monovalentes sobre la unión específica de (A) glicina- $H^3$  y (B) estricnina- $H^3$  en la retina de la rana. El tejido se incubó en la oscuridad durante 10 minutos en presencia de diferentes concentraciones de  $Na^+$  o  $Li^+$  en el medio de incubación y en presencia de los ligandos radiactivos. La unión específica se determinó en presencia de glicina 1mM o estricnina 100 $\mu$ M respectivamente. Los datos son el promedio de 3 a 16 experimentos independientes  $\pm$  error estándar.

**Tabla 2. Unión de glicina-H<sup>3</sup> en rebanadas de médula espinal de la rata y en retina de la rana.**

<i>Unión</i>	<b>Médula espinal</b>		<b>Retina</b>	
	<i>Total</i>	<i>Específica</i>	<i>Total</i>	<i>Específica</i>
	(pmol / g tejido)		(pmol / g tejido)	
Con Na <sup>+</sup>	2.28 ±0.17	0.58 ±0.38	6.51 ±0.68	3.31 ±0.40
Sin Na <sup>+</sup>	1.14 ±0.16	0.55 ±0.11	2.42 ±0.29	0.68 ±0.02

La incubación de las rebanadas de médula espinal se llevó a cabo a 4°C durante 30 minutos y la de la retina se realizó en la oscuridad durante 10 minutos. Ambos tejidos se incubaron en presencia 10nM del ligando radiactivo. La concentración de Na<sup>+</sup> en el medio de incubación es de 128mM y en el medio sin Na<sup>+</sup>, el NaCl fue sustituido por cloruro de colina. Los valores de unión específica se obtuvieron incubando en presencia de 100µM de estricnina. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes ± error estándar.

**Tabla 3. Unión de estricnina-H<sup>3</sup> en rebanadas de médula espinal de la rata y en la retina de la rana.**

<i>Unión</i>	<b>Médula espinal</b>		<b>Retina</b>	
	<i>Total</i>	<i>Específica</i>	<i>Total</i>	<i>Específica</i>
	(pmol/g tejido)		(pmol/g tejido)	
Con Na <sup>+</sup>	2.84 ±0.31 (4)	0.44 ±0.13 (4)	6.02 ±0.50 (7)	0.64 ±0.03 (5)
Sin Na <sup>+</sup>	3.32 ±0.28 (4)	0.49 ±0.17 (4)	3.58 ±0.28 (9)	1.25 ±0.25 (6)

La incubación de las rebanadas de médula espinal se llevó a cabo a 4°C durante 30 minutos y la de la retina se realizó en la oscuridad durante 10 minutos. Ambos tejidos se incubaron en presencia 10nM del ligando radiactivo. La concentración de Na<sup>+</sup> en el medio de incubación es de 128mM y en el medio sin Na<sup>+</sup>, el NaCl fue sustituido por cloruro de colina. Los valores de unión específica se obtuvieron incubando en presencia de 1mM de glicina. Los datos son el promedio de (n) experimentos independientes ± error estándar.

Debido a que se observó un incremento en la unión específica de glicina al incubar la retina en un medio con  $\text{Na}^+$ , lo cual puede corresponder a una posible unión al transportador, los subsecuentes experimentos de unión se realizaron a  $4^\circ\text{C}$  en medios carentes de  $\text{Na}^+$ .

#### Farmacología de la unión de glicina- $\text{H}^3$ y estriquina- $\text{H}^3$ .

Con el fin de completar la caracterización del RGly se realizaron ensayos de unión de glicina- $\text{H}^3$  y estriquina- $\text{H}^3$  (10nM) en presencia de agonistas (glicina y  $\beta$ -alanina), el antagonista específico del receptor (la estriquina) y el inhibidor específico del transportador (la sarcosina). Los experimentos se realizaron a  $4^\circ\text{C}$  y  $25^\circ\text{C}$  (Tabla 4). La unión específica de glicina- $\text{H}^3$  se desplazó por estriquina, sarcosina y la propia glicina a ambas temperaturas. Las combinaciones de sarcosina más glicina, sarcosina-estriquina y la  $\beta$ -alanina presentaron un mayor desplazamiento, comparado con la propia glicina.

La unión específica de estriquina- $\text{H}^3$  fue desplazada a  $4^\circ\text{C}$  por glicina en un 77%. Por el contrario, la sarcosina y las combinaciones de sarcosina-glicina y sarcosina-estriquina no desplazaron significativamente a la estriquina- $\text{H}^3$ . Sin embargo, a  $25^\circ\text{C}$ , estas mismas combinaciones lograron desplazar 50% más que la propia estriquina.

**Tabla 4. Unión específica de glicina-H<sup>3</sup> y estricnina-H<sup>3</sup> en la retina de la rana.**

<i>Desplazador</i>	Glicina-H <sup>3</sup>		Estricnina-H <sup>3</sup>	
	4°C (pmol / g tejido)	25°C (pmol / g tejido)	4°C (pmol / g tejido)	25°C (pmol / g tejido)
Glicina 1mM	0.66 ±0.09 (6)	1.21 ±0.09 (13)	0.83 ±0.09 (8)	0.39 ±0.05 (6)
Estricnina100µM	0.58 ±0.024 (6)	1.30 ±0.11 (6)	0.64±0.11 (12)	0.80 ±0.06 (16)
Sarcosina 1mM	0.73 ±0.04 (12)	1.14 ±0.07 (6)	00.00 (16)	0.15 ±0.14 (9)
Sarcosina 1mM + Glicina 1mM	0.93 ±0.13 (7)	1.62 ±0.12 (6)	0.07 ±0.01 (12)	1.63 ±0.13 (6)
Sarcosina1mM+ Estricnina100µM	0.93 ±0.14 (7)	0.97 ±0.07 (6)	00.00 (15)	1.38 ±0.16 (6)
β-alanina 1mM	1.28 ±0.20 (4)	1.42 ±0.10 (4)	1.66 ±0.17 (4)	2.16 ±0.17 (4)

La incubación del tejido se llevó a cabo a 4°C en la oscuridad, durante 10 minutos en presencia 10nM del ligando radiactivo. Los valores de unión específica se obtuvieron incubando en presencia de 1mM de glicina. Los datos son el promedio de (n) experimentos independientes ± error estándar.

Por otro lado, se realizaron experimentos de unión de glicina-H<sup>3</sup> y estricnina-H<sup>3</sup> a una concentración de 2nM (Tabla 5). A ésta concentración, la unión de la glicina-H<sup>3</sup> presentó valores similares cuando se usó como desplazador a la propia glicina, la sarcosina y las combinaciones de sarcosina-glicina y sarcosina-estricnina. Sin embargo, la estricnina solamente desplazó un 7% de la unión total de glicina. En el caso de la unión de estricnina-H<sup>3</sup>, ésta no se desplazó por glicina, sarcosina y las combinaciones sarcosina-glicina y sarcosina-estricnina.

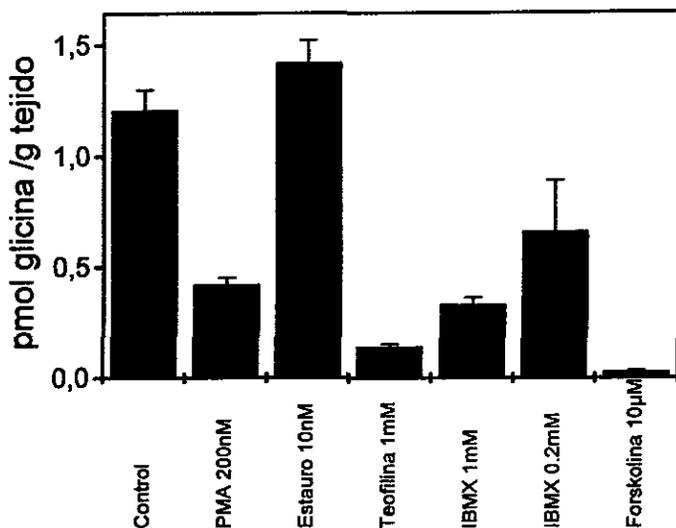
**Tabla 5. Unión específica de glicina-H<sup>3</sup> y estriçnina-H<sup>3</sup> en la retina de la rana.**

<i>Desplazador</i>	<b>Glicina-H<sup>3</sup></b> (pmol / g tejido)	<b>Estriçnina-H<sup>3</sup>*</b>	(pmol / g tejido)
Glicina 1mM	0.253 ± 0.046	Nd	
Estriçnina 100µM	0.047 ± 0.013	0.20 ± 0.014	
Sarcosina 1mM	0.234 ± 0.014	Nd	
Sarcosina1mM+Glicina 1mM	0.242 ± 0.014	0.04 ± 0.005	
Sarcosina1mM+ Estriçnina 100µM	0.207 ± 0.031	0.013 ± 0.01	

La incubación del tejido se llevó a cabo a 4°C en la oscuridad, durante 10 minutos en presencia 2nM del ligando radiactivo. Los datos son el promedio de 4 a 9 experimentos independientes ± error estándar. Nd= no detectado.

Efecto de drogas que inhiben o activan proteínas cinasas en la unión específica de glicina-H<sup>3</sup> y estriçnina-H<sup>3</sup>.

Para determinar la posible modulación del receptor de glicina por proteínas cinasas, se realizaron ensayos de unión de glicina-H<sup>3</sup> y estriçnina-H<sup>3</sup> (10nM) a 25°C en presencia de drogas que modifican la actividad de las proteínas cinasas A y C. La presencia de 1mM de IBMX o de teofilina (inhibidores de la fosfodiesterasa); así como de forskolina (10µM, activador de la adenilato ciclasa) en el medio de incubación, causaron una disminución de más del 50% en la unión específica de glicina-H<sup>3</sup> (Fig. 13). El mismo efecto se observó en presencia del activador de la PKC, el PMA. Sin embargo, un inhibidor de la PKC, la



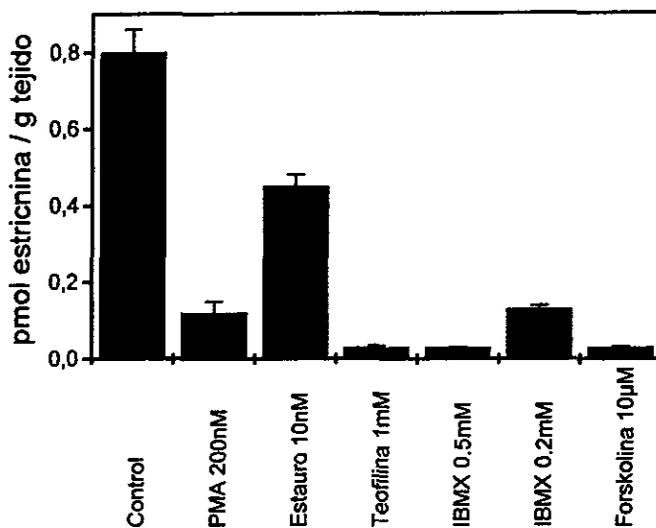
**Figura 13.** Efecto de activadores e inhibidores de las proteínas cinasas C y A sobre la unión específica de glicina- $H^3$  en la retina de la rana. El tejido se incubó en la oscuridad durante 10 minutos a 25°C en presencia del ligando radiactivo y las diferentes drogas. La unión específica se determinó en presencia de glicina 1mM. Los datos son el promedio de 3 a 7 experimentos independientes  $\pm$  error estándar.

estaurosporina, no produjo ningún cambio en la unión específica de glicina- $H^3$  con respecto al control.

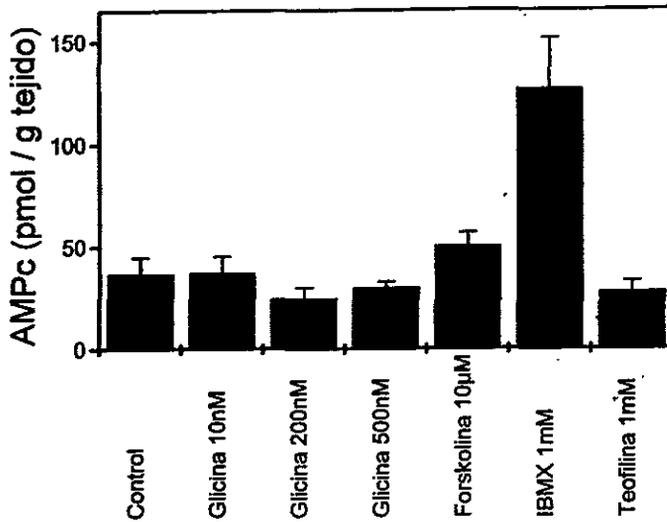
Asimismo, la unión específica de estricnina- $H^3$  (10nM) (Fig. 14) se disminuyó notablemente en presencia de IBMX, teofilina, forskolina y de PMA. Mientras que, la estaurosporina, causó una disminución del 50% en la unión específica de estricnina.

Paralelamente a éstos experimentos, bajo las mismas condiciones de incubación se evaluaron los niveles de nucleótidos cíclicos en la retina de la rana. Como se puede ver en la figura 15, diferentes concentraciones de glicina no modificaron los niveles de AMPc comparados con los del control. Aunque la IBMX provocó un aumento del 70% en los niveles de AMPc; la teofilina y la forskolina no modificaron significativamente dichos niveles.

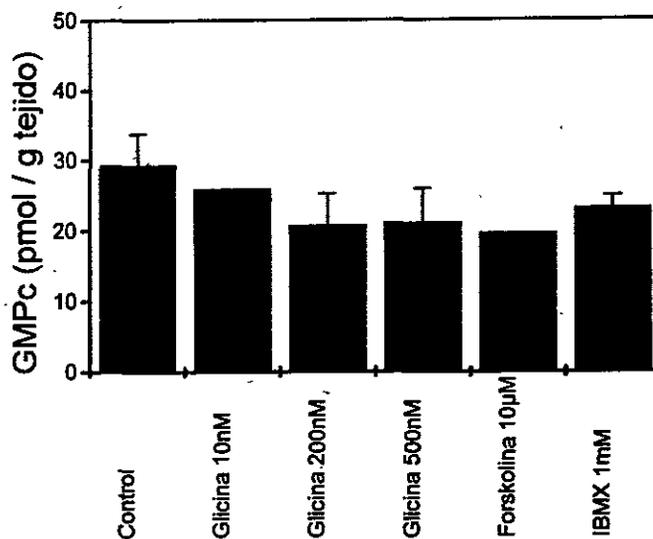
Por otro lado, los niveles de GMPc no se modificaron significativamente en ninguna de éstas condiciones con respecto al control (Fig. 16).



**Figura 14.** Efecto de activadores e inhibidores de las proteínas cinasas C y A sobre la unión específica de estricnina- $H^3$  en la retina de la rana. El tejido se incubó en la oscuridad durante 10 minutos a 25°C en presencia del ligando radiactivo y las diferentes drogas. La unión específica se determinó en presencia de estricnina 100µM. Los datos son el promedio de 3 a 7 experimentos independientes  $\pm$  error estándar.



**Figura 15.** Efecto de la glicina y diferentes drogas sobre los niveles de AMPc en la retina de la rana. El tejido se incubó en la oscuridad durante 10 minutos en presencia de distintas concentraciones de glicina, forskolina 10µM, IBMX 1mM o teofilina 1mM. Los datos son el promedio de 3 a 9 experimentos independientes  $\pm$  error estándar.



**Figura 16.** Efecto de la glicina y diferentes drogas sobre los niveles de GMPC en la retina de la rana. El tejido se incubó en la oscuridad durante 10 minutos en presencia de distintas concentraciones de glicina, forskolina 10µM o IBMX 1mM. Los datos son el promedio de 2 a 5 experimentos independientes  $\pm$  error estándar.

## DISCUSIÓN

El receptor de glicina ha sido caracterizado en las membranas totales de la corteza cerebral de la rana (Müller y Snyder, 1973) y de la retina del bovino (Borbe y col., 1981) y en membranas sinaptosomales de la retina de la rana, a través de ensayos de unión con ligandos radiactivos (glicina- $H^3$  y estriquina- $H^3$ ) (Pérez-León y Salceda, 1995). En el presente trabajo se observó un comportamiento similar de la unión de glicina- $H^3$  y estriquina- $H^3$ , pero en la retina completa de la rana.

La unión específica de glicina presentó una cinética de saturación. Las concentraciones relativamente altas de glicina requeridas para la saturación ( $2\mu M$ , Fig. 10a) indican un aumento de 10 veces los valores reportados en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda, 1995), lo cual sugiere un mayor número de sitios de unión en el tejido completo.

Contrario a lo observado en las membranas sinaptosomales, la unión de glicina- $H^3$  presentó dos sitios de alta afinidad ( $K_D$  de  $517.43nM$  y  $8.93nM$ , Fig. 10b). Ambos valores se encuentran de dos a tres órdenes de magnitud por debajo de los reportados para el transportador de glicina en las membranas sinaptosomales de las capas plexiforme externa ( $100\mu M$ ) e interna ( $46.5\mu M$ ) de la retina de la rana (Salceda, 1989). Además, uno de los componentes presenta valores semejantes a los reportados para el receptor de glicina en la fracción P1 de la retina de la rana ( $K_D$   $12nM$ ; Pérez-León y Salceda 1995); el cual se asemeja al reportado ( $\leq 60nM$ ) en las membranas sinaptosomales del cerebro de la rata (Paudice y col., 1998). La

otra constante de afinidad presenta valores semejantes a los reportados para el receptor de glicina insensible a estriquina (NMDAR,  $K_D$  217nM) en las membranas totales de la retina de pollo (Boje, 1992) y otros tejidos del SNC (Kishimoto y col. 1981; Marvizon y col., 1989). Sin embargo, a través de estudios farmacológicos, se demostró que drogas que actúan sobre el sitio de glicina insensible a estriquina dentro del receptor tipo NMDA, no fueron capaces de desplazar la unión de estriquina- $H^3$  en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda 1995); asimismo, la glicina no favoreció la unión de glutámico- $H^3$  a dichas membranas (Pérez-León y Salceda, 1998), lo que sugiere que el receptor de tipo NMDA es poco abundante o ausente en la retina de la rana.

En la retina completa de la rana, uno de los problemas más importantes para determinar la unión específica de glicina a su receptor es la presencia del transportador de glicina; el cual es de alta afinidad y dependiente de  $Na^+$  y temperatura. Los resultados del presente trabajo indican que la unión específica a bajas concentraciones de glicina no dependen de la temperatura (Fig. 10a), ya que a 25°C, el análisis de Rosenthal reveló la presencia de los dos sitios de unión ( $K_D$  13.68nM y  $K_D$  813 nM, Fig. 10b y c); resultados que están de acuerdo con lo observado en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda, 1995).

La unión específica de estriquina- $H^3$  representa el 15% y 25% de la unión total a 4° y 25°C, respectivamente; dicha unión demostró ser saturable alrededor de una concentración de 600nM (Fig. 11a). Asimismo, el porcentaje de unión de estriquina

es semejante al de glicina a ambas temperaturas. Por medio del análisis de Rosenthal (Fig. 11b), se determinó que existen dos sistemas de unión de estricnina, uno de alta afinidad ( $K_{D1}$  95.24nM) y otro de baja afinidad ( $K_{D2}$  250nM); ambos con valores de  $B_{max}$  similares (63 y 81 pmol/g de tejido). El número de sitios de unión a estricnina es 10 veces mayor al reportado en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda, 1995). A 25°C se observaron nuevamente dos componentes de unión, uno de alta afinidad ( $K_D$  166.66nM) que semeja a lo observado a 4°C y otro componente de menor afinidad ( $K_D$  1 $\mu$ M). Estos resultados podrían explicarse por un cambio en la estructura tridimensional del receptor en el cual el sitio de alta afinidad por el ligando cambia a un sitio de baja afinidad. Además, el número de sitios de unión varía de tres a cuatro veces ( $B_{max}$  de 59 y 195 pmol/g de tejido).

La unión específica de glicina a 4° y 25°C es similar a la observada para estricnina a 25°C; sin embargo, a 4°C, la unión específica de estricnina es menor. El efecto de la temperatura sobre la unión de antagonistas al RGly ha sido estudiado en las membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rata, donde demostraron que la unión de estricnina aumenta con respecto a la temperatura (Ruíz-Gómez y col., 1989), la cual parece afectar la afinidad y las interacciones alostéricas con el RGly. Aunado a nuestros resultados, esto nos indica que tanto la glicina como la estricnina se unen a la misma molécula receptora pero en diferentes sitios; y que, solo uno de ellos es sensible a la temperatura.

El efecto del  $\text{Na}^+$  sobre la unión específica de glicina- $\text{H}^3$  y estriquina- $\text{H}^3$  en la retina de la rana es contrario para ambos ligandos (Fig. 12). Mientras que la unión específica de glicina- $\text{H}^3$  se ve favorecida en presencia de  $\text{Na}^+$  (Fig. 12b) la de estriquina es inhibida. Estudios anteriores han demostrado que el transporte de glicina en la retina de la rana es dependiente de  $\text{Na}^+$ , tanto en las membranas sinaptosomales (Salceda, 1989), como en el tejido completo (López-Vera, 1998). El hecho de que a  $4^\circ\text{C}$  el  $\text{Na}^+$  pero no el  $\text{Li}^+$ , incrementa la unión de glicina, sugiere que el ion se requiere o favorece la unión de glicina al transportador.

Por el contrario, la unión específica de estriquina- $\text{H}^3$  disminuye aproximadamente 80% al incubar el tejido en presencia de 118mM de NaCl (Fig. 12a). En el caso de las membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rata se observó que la unión de estriquina- $\text{H}^3$  disminuye al eliminar el  $\text{Na}^+$  (Snyder, 1975). Asimismo, se ha reportado que los aniones inhiben la unión de estriquina- $\text{H}^3$ , mientras que los cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Li}^+$ ) aumentan dicha unión, en el caso particular del cloruro de sodio, observaron un efecto bifásico, en donde a altas concentraciones (0.2M) aumentan la unión específica de estriquina- $\text{H}^3$  y menores concentraciones (0.1M) la inhiben (Marvizón, 1986).

El  $\text{Li}^+$  no fue capaz de sustituir al  $\text{Na}^+$  en su efecto sobre la unión de glicina, pero si lo hizo sobre la unión de estriquina (Fig. 12). En membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rata se ha observado que el  $\text{Li}^+$  y  $\text{K}^+$  substituyen el efecto potenciador del  $\text{Na}^+$  sobre la unión específica de estriquina- $\text{H}^3$ ; sin embargo, el aumento en la unión se observa a partir de 200mM de NaCl (Young y Snyder,

1974a), las cuales están por arriba de las utilizadas en el presente trabajo. Se ha propuesto que las altas concentraciones de sodio favorecen la unión específica de estricnina al receptor, ya que al aumentar la fuerza iónica se evidencian los sitios de unión del ligando (Marvizón, 1986). Sin embargo en nuestro trabajo, el sodio presenta un efecto contrario al reportado sobre la unión de estricnina.

Existen evidencias de que en la subunidad  $\alpha 1$  del RGly recombinante de humano el  $Zn^{**}$  puede potenciar la unión de agonistas (como la taurina y glicina), sin afectar la corriente inhibitoria del mismo (Lynch y col., 1998). Asimismo,  $\alpha 1$  expresada en la línea celular embrionaria 293 de riñón de humano se observó que bajas concentraciones de  $Zn^{**}$  aumentan la probabilidad de apertura del canal del RGly, mientras que altas concentraciones la disminuyen, sin tener un efecto sobre la corriente (Laube y col., 1998). Esto mismo se observa en células ganglionares donde la corriente inducida por glicina se estimula a bajas concentraciones ( $<2\mu M$ ) de  $Zn^{**}$  y se inhibe a altas concentraciones ( $>10\mu M$ ) (Han y Wu, 1999). En la retina de la rana es probable que el  $Na^+$  se comporte como un regulador alostérico, que al unirse al receptor regule positivamente los sitios de unión del agonista (glicina) y negativamente los del antagonista (estricnina).

El hecho de que en las rebanadas de la médula espinal, la unión específica de glicina y estricnina no se haya modificado por la presencia o ausencia de  $Na^+$ , sugiere que el receptor de glicina presente en la médula espinal de la rata es diferente al receptor de la retina de la rana. Los diferentes tipos de subunidades

del receptor pueden conferirle características farmacológicas distintas; por ejemplo, la subunidad  $\alpha 2$  es menos sensible a la estriquina que las demás subunidades. Asimismo, los homoligómeros del RGly son más sensibles a picotroxina; dicha sensibilidad, se reduce hasta 500 veces en los heteroligómeros de  $\alpha/\beta$  (Legendre, 1997).

Estudios anteriores, demostraron que la glicina- $H^3$  se desplaza 12% por estriquina y la unión de estriquina- $H^3$  se desplaza por glicina en un 30%; lo cual indica que los sitios de unión para ambos ligandos son diferentes dentro del RGly (Pérez-León y Salceda, 1995). De manera semejante, en este trabajo observamos diferencias en el desplazamiento de ambos ligandos en presencia de glicina y estriquina frías (Tabla 4 y 5).

La sarcosina es una droga que se considera el inhibidor específico del transportador de glicina; sin embargo, no se tienen reportes con respecto al efecto que pueda tener sobre el receptor postsináptico de glicina. En el presente trabajo la sarcosina desplazó a la glicina- $H^3$  con la misma potencia que la propia glicina; lo cual puede explicarse por una posible competencia; ya que ambas moléculas comparten una estructura tridimensional semejante. Existe la posibilidad de que la sarcosina se una al sitio del transportador, en tal caso la afinidad de la unión de glicina al transportador sería mayor que la reportada (Salceda, 1989). Por otro lado, la sarcosina desplaza a la estriquina, únicamente a 25°C lo que, probablemente se debe a que la sarcosina se une de manera alostérica al RGly,

afectando su conformación, con lo que se favorece la exposición del sitio de unión de estricnina.

La  $\beta$ -alanina es el agonista más potente del RGly en la médula espinal (Morgan, 1985), en la retina de la rana es capaz de desplazar en un 90% la unión de glicina- $H^3$  a las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda, 1995). Las células gliales, amacrinas y ganglionares de la retina de los vertebrados acumulan  $\beta$ -alanina; la cual es liberada por estímulos luminosos, altas concentraciones de  $K^+$  y por GABA y  $\beta$ -alanina (Morgan, 1985). En el presente trabajo, la  $\beta$ -alanina resultó ser el mejor desplazador tanto de la glicina- $H^3$  como de la estricnina- $H^3$ ; es posible que la glicina y la estricnina interaccionen de manera adicional con sitios de unión correspondientes a la  $\beta$ -alanina.

En este sentido, con base en la farmacología de la unión de glicina en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda, 1995), a la respuesta farmacológica diferencial a la picotroxina en células progenitoras de oligodendrocitos (Belachew y col., 1998) y en las células Mauthner de larvas del pez cebra (Legendre, 1997), a la respuesta electrofisiológica provocada por glicina en presencia de estricnina y 5,7-dicloroquinureico en células ganglionares (Zhang y col., 1997) y a la función de la glicina y la estricnina como agonistas del receptor de acetilcolina (nAChR) expresado en ovocitos de *Xenopus* (Rothlin y col., 1999), se ha propuesto la existencia de sitios de unión para la glicina diferentes a los reportados en el RGly.

Los diferentes sitios de unión del RGly podrían modificarse adicionalmente por la actividad misma de la célula; así, estudios electrofisiológicos realizados en la subunidad  $\alpha$  del RGly expresada en ovocitos de *Xenopus*, sugieren que éste puede ser fosforilado en respuesta a la actividad de la PKA o PKC (Vaello y col., 1994). En neuronas aisladas del área tegmental central del cerebro de la rata, se observó que la actividad de la PKA aumenta la afinidad del RGly por la glicina (Ren y col., 1998). Adicionalmente, en células del hipocampo se encontró que la actividad del RGly es modulada por la PKC (Schönrock y Bormann, 1995). Nuestros resultados de la unión específica de glicina- $H^3$  y estriquina- $H^3$  en presencia de drogas que modifican la actividad de la PKA y PKC sugieren la participación de ambas enzimas en la regulación del RGly.

Los efectos de la diferentes drogas empleadas en los ensayos de unión de glicina y estriquina, resultaron ser específicos para los niveles de AMPc, ya que no se observó ningún cambio en los niveles de GMPc. La IBMX, inhibidor de la fosfodiesterasa, logró aumentar significativamente los niveles de AMPc, no así la forskolina, activador de la adenilato ciclasa (Fig. 15); estos resultados podrían ser indicativos de que la velocidad de síntesis del AMPc ( $V_{max}$ ) es menor que la de su degradación. Sin embargo, la teofilina, un inhibidor de la fosfodiesterasa y agonista del receptor de adenosina (Stefanovich, 1979) no modificó significativamente los niveles de nucleótidos cíclicos, a pesar de disminuir considerablemente la unión específica de glicina y estriquina.

La regulación por proteína cinasas favorecería la unión de ligandos al receptor cuando éste no se encuentre fosforilado. Estudios de inmunohistoquímica demostraron la presencia del RGly en las capas PI de la retina de mamíferos y en las capas PI y PE de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda, 1998). Las PKCs que posiblemente son responsables de la fosforilación del RGly, son las del tipo  $\beta$  y  $\gamma$ , las cuales se demostró su presencia en las células bipolares y ganglionares, respectivamente, en la retina de la rana (Wood y col., 1996).

## CONCLUSIONES

En la retina completa de la rana:

- El receptor de postsináptico de glicina puede ser estudiado a través de la unión de agonistas (glicina) y antagonistas (estricnina) radiactivos; en un medio de incubación carente de sodio.
- Las características del receptor postsináptico de glicina son semejantes a las observadas en la membranas sinaptosomales.
- El receptor de glicina puede ser modulado por el ion  $\text{Na}^+$ .
- La unión específica de glicina y estricnina al receptor postsináptico de glicina es posiblemente modulada por la actividad de las proteínas cinasas A y C.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altschuler, R. A.; H., Betz; Parakkal, M. H.; K. A., Reeks and Wenthold, R. J. (1986) Identification of glycinergic synapses in the cochlear nucleus through immunocytochemical localization of post-synaptic receptor. Brain Res. 369: 316-320.
- Aprison, M. H. and E. C., Daly (1978) Biochemical aspect of transmission at inhibitory synapses: the role of glycine. Adv. Neurochem. 3: 230-295.
- Assaf, S. Y and S. H., Chung (1984) Release of endogenous Zn<sup>++</sup> from brain tissue during activity. Nature. 308: 734-36.
- Bauer, B. (1977) Factor affecting the spontaneous release of <sup>3</sup>H-glycine from rabbit retina. Acta Ophthalmol. 55: 931-34.
- Becker, C. N.; J., Hermans-Borgmeyer; Smitt, B. and H., Betz (1988) The glycine receptor deficiency of mutant mouse spastic: evidence for normal glycine receptor structure and localization. J. Neurosci. 6: 1358-64.
- Becker, C-M., V., Schmieden; Tarrani, P.; U., Strasser and Betz, H. (1992) Isoform-selective deficit of GlyR in the mouse mutant spastic. Neuron. 8: 283-9.
- Belachew, S.; B., Rogister; Rigo, M-J.; B, Malgrange; Mazy-Servais, C.; G., Xhaufflaire; Coucke, P. and G., Moone. (1998) Cultured oligodendrocyte progenitors derived from cerebral cortex express a glycine receptor which is pharmacologically distinct from the neuronal isoform. Eurp. J. Neurosc. 10: 3556-64.
- Betz, H. (1990) Homology and analogy in transmembrane channel design: Lessons from synaptic membrane proteins. Biochem. 29: 3591-99.
- Betz, H. (1991) Glycine receptor heterogenous and widespread in the mammalian brain. TINS. 14: 458-61.
- Betz, H.; J., Kuhse; Fischer, M.; V., Schmieden; Laube, B.; A., Kuryatou; Lngosch, D.; G., Meyer; Bormann, J.; N., Rundström; Matzenbach, B.; J., Krisch and Ramming, M. (1994) Structure diversity and synaptic localization of inhibitory glycine receptor. J. Physiol. (Paris) 88: 243-48.
- Bloomenthal, A. B.; E., Goldwater; Pritchett, D. B. and N. L., Harrison (1995) Biphasic modulation of the glycine-sensitive glycine receptor by Zn<sup>++</sup>. Mol. Pharmacol. 46: 1156-59.

Boje, K. M.; P., Skolnick; Raber, J.; R. T.; Fletcher and Chader, G. (1992) Strichnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. Neurochem. Int. 20(4):473-86.

Borbe, H.; W. E., Müller and Wöllert, U. (1981) Specific strichnine binding associated with GlyR in bovine retina. Brain Res. 250:131-39.

Bormann, J. (1990) Patch-clamp studies of glycine-gated chloride channels. In Ottersen, O. P. and J., Storm-Mathisen. Glycine neurotransmission. John Wiley and Sons. Great Britain. pp. 111-38.

Brown, K. T. (1968) The electroretinogram: It's components and their origins. Vis. Res. 8: 633-77.

Cully, D. F.; D. K., Van der Ploeg; Shaeffer, J. M. and J. P. Arena (1994) Cloning of an aversive glutamate-gate chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. Nature. 371(6499): 707-11.

Curtis, D. R.; L., Hösl; Johnston, G. A. R. and I. H., Johnston. (1968) The hyperpolarization of spinal interneurons by glycine and related amino acids. Exp. Brain Res. 5(3): 235-58.

Farber, D. (1995) Transducción visual: proteínas implicadas y su importancia en la función retiniana. En Meza, G. Neurobiología de los Sistemas Sensoriales. Coordinación de la Investigación Científica, UNAM. México, D. F. pp. 25-41.

Farber, D. and R., Adler. (1986) The Retina: a model for cell biology studies. Part I. Academic Press. INC London. 363 pp.

Fricke, U. (1975) Triyosol: anew scintillation cocktail based on Triton x-100. Analyt. Biochem. 63: 555-58.

Froehner, S. C. (1993) Anchoring glycine receptors. Nature. 366 (6457): 719.

Futterman, S. and J. S. Andrews. (1964) J. Biol. Chem. 239, 81-84.

Gasic, G. P. and M., Holman (1992) Molecular neurobiology of glutamate receptors. Annu. Rev. Physiol. 54: 507-36.

Graham, D. 1983. F., Pfeiffer and Betz, H. Photoaffinity labeling of the glycine receptor of rat spinal cord. Eur. J. Biochem. 131: 519-25.

Graham, D.; F., Pfeiffer and Betz, H. (1981) UV light-induced cross-linking of strychnine to the GlyR of rat spinal cord membranes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 120: 1330-35.

- Greferath, U.; J. H., Brandstätter; Wässle, H.; H., Kirsh; Kuhse, J. and U., Grünert. (1994) Differential expression glycine receptor subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Visual Neurosc. 11: 721-9.
- Grenningloh, G.; A., Rienitz; Schmitt, B.; H., Betz; Methfessel, B.; M., Zensen; Beyreuther, K. and E. D., Gundelfinger. (1987) The strychnine binding subunit of the GlyR shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. Nature. 328: 215-20.
- Grenningloh, G.; I., Pribilla; Prior, P.; G., Malthaup; Beyreuther, K.; O., Taleb and Betz, H. (1990b) Cloning and expression of the 58 kDa  $\beta$  subunit of the inhibitory GlyR. Neuron. 4: 963-70.
- Han, Y. and S. M., Wu (1999) Modulation of glycine receptors in retinal ganglion cells by zinc. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(6): 3234-8.
- Hobbar, R. and G., Wald. (1952) J. Gen. Physiol. 36: 269-315.
- Hubel, D. H. (1986) Eye, brain, and vision. Scientific American Library. USA. 240pp.
- Kandel, E.; J. M., Schwartz and Jessel, T. M. (1991) Principles of Neural Science. Appleton Lange. New York, USA. pp. 400-17.
- Kirsch, J.; I., Wolters; Triller, A. and H., Betz (1993b) Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. Nature. 366: 745-8.
- Kirsh, J.; D., Langosch; Prior, P.; U. Z., Littauer; Schmitt, B. and H., Betz. (1991) The 93 kDa glycine receptor associated-protein binds to tubulin. J. Biol. Chem. 266: 22242-5.
- Kishimoto, H.; J. R., Simon 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 sodium-independent system. J. Neurochem. 37(4): 1015-24.
- Kuhse, J.; B., Laube; Magalei, D. and H., Betz (1993a) Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. Neuron. 11, 1049-56.
- Kushe, J.; V., Schmieden and Betz, H. (1990a) Identification and functional expression of a novel ligand binding subunit of the inhibitory glycine receptor. J. Biol. Chem. 265 (22): 314-22, 320.

Kushe, J.; V., Schmieden and Betz, H. (1990b) A single aminoacid exchange alters the pharmacology of neonatal rat glycine receptor subunit. Neuron. 5: 867-73.

Langosch, D.; W., Hoch and Betz, H. (1992) The 93 kDa protein and tubulin associated with the inhibitory GlyR are phosphorylated by an endogenous protein kinase. FEBS Lett. 298:113-7.

Langosch, D.; L., Thomas and Betz, H. (1988) Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. Proc. Natl. acad. Sci. USA. 85: 7394-98.

Laube, B.; J., Kushe; Rudström, N.; J., Kirsh; Schmieden, V. and H., Betz (1995) Modulation of the inhibitory glycine receptor by zinc ions. J. Physiol. 483: 613-19.

Laube, B.; J., Kushe and Betz, H. (1998) Zinc modulatory at the inhibitory glycine receptor. J. of Physiol. 483(3): 613-9.

Leeson, P. D. and L. L., Iversen (1994) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. Science. 258: 597-603.

Legebdre, P. (1997) Pharmacological evidences for two types of postsynaptic glycinergic receptors on the Mauthner cell of 52-h-old zebrafish larvae. The American Physiological Society. 2400-15.

Logan, W. J. and S. H., Snyder. (1972) High affinity uptake system for glycine, glutamic acid and aspartic acid in synaptosomes of the rat central nervous tissues. Brain Res. 92: 413-31.

López-Colomé, A. M.; R., Tapia; Salceda, R. and H., Pasantes-Morales. (1978a) K<sup>+</sup> stimulated release of labeled  $\gamma$ -aminobutyrate, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous systems. Neurosci. 31: 1069-74.

López-Colomé, A. M.; Salceda, R. and H., Pasantes-Morales. (1978b) Potassium-stimulated release of GABA, glycine, and taurine from the chick retina. Neurochem. Res. 3: 431-41.

López-Vera, E. (1997) Caracterización del sistema de captación de glicina en la retina. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F. 47pp.

Lowry, O. H.; N. J., Roserbrough; Far, A. L. and R., Randed. (1951) Protein measurement with the folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-75.

Lynch, J. W.; P., Jacques; Pierce, K. D. and P. R., Schofield. (1998) Zinc potentiation of the glycine receptor chloride channel is mediated by allosteric pathways. J. Neurochem. 71(5):2159-68.

Lynch, J. W.; S., Rajendra; Barry, P. H. and P. R., Schofield (1995) Mutations affecting de glycine receptor agonist transduction mechanism into an allosteric potentiator. Biol. Chem. 270: 13799.

Malosio, M. L.; G., Grenningloh; Kushe, J.; V., Schmieden; Schmitt, B.; P., Prior and Betz, H. (1991a) Alternative splicing generates two variants of the  $\alpha 1$  subunit of the inhibitory glycine receptor. J. Biol. Chem. 266: 2048-53.

Marc, R. E. (1985) The role of glycine in retinal circuitry. In Morgan, W. W. Retinal transmitters and modulators: models of the brain. Vol.I. CRC Press. USA. pp. 119-58.

Maricq, A. V.; A. S., Peterson; Brake, A. J.; R. M., Myers and Julius, D. (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gate ion-channel. Science. 254(5030): 432-7.

Martin, J. A. (1989) Development as guide to the regional anatomy of the brain. In Kandel, E. R. (Eds). Principles of Neuronal Science. 2th. Edition. Elsevier Oxford. pp. 244-58.

Marvzón, J. C.; J., Vázquez; García-Calvo, M.; F., Mayor Jr; A., Ruiz-Gómez, F., Valdivieso and J., Benavides. (1986) The glycine receptor: pharmacological studies and mathematical modelling of the allosteric interaction between glycine and strychnine-binding sites. Mol. Pharmacol. 30: 590-7.

Matzenbach, B.; V., Maulet; Sefton, L.; B., Courtier; Avner, P.; J. L., Guénet and Betz, H. (1994). Structural analysis of mouse glycine receptor  $\alpha$ -subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant,  $\alpha 4$ . J. Biol. Chem. 269: 2607-12.

Meyer, G.; J., Kirsch; Betz, H. and D., Langosh (1995) Identification of a gephyrine binding motif on the glycine receptor  $\beta$ -subunit. Neuron. 15: 563-72.

Morgan, W. W. (1985) Retinal transmitters and modulators: models of the brain. Vol.I. CRC Press. USA. 165pp.

Müller, W. E. and S. H., Snyder (1978) Glycine high affinity uptake and strychnine binding associated with glycine receptors in the frog CNS. Brain Res. 76:297-308.

Mulhardt, C.; M., Fischer; Gass, P.; Somon-Chazottes; J. L., Guenet; Kuhse Jbetz., H. and C-M., Becker. (1994) The spastic mouse: aberrant splicing of

glycine receptor  $\beta$  subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element Neuron. 13: 1003-15.

Nakanishi, S. (1992) The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. J. Med. Chem. 37: 4053-67.

Noda, M.; H., Takahashi; Tanabe, T.; M., Toyosato; Furutani, Y.; T., Hirose; Takashima, H.; S., Inayama; Miyata, T. and S., Numa (1982) Primary structure of a-subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. Nature. 299(5886):793-7.

Okamura-Ikeda, K.; K., Fujiwara and Motokawa, Y. (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding chicken T-protein of the glycine cleavage system and expression of a functional protein in *E. coli*. J. Biol. Chem. 267 (18): 284-18, 290.

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

Paudice, P.; A., Gemignani and Raiteri, M. (1998) Evidence for functional native NMDA receptors activated by glycine or D-serine alone in the absence of glutamatergic coagonist. Euro. J. of Neurosc. 10:2934-44.

Pérez-León, J. (1994) caracterización de la unión de glicina-3H y estricnina-3H a las membranas sinaptosomales de la retina de la rana. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UNAM. México, D. F. 123pp.

Pérez-León, J. (1999) La Neurotransmisión glicinérgica en la retina de la rana: un estudio inmunohistoquímico y autorradiográfico. Tesis de Doctorado en Investigación Biomédica Basica. UNAM. México, D. F. 37pp.

Pérez-León, J. and R., Salceda.(1995) Different specific binding sites of [<sup>3</sup>H]Glycine and [<sup>3</sup>H]Strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina. Neurochem. Res. 20(8): 915-22.

Pérez-León, J. and R., Salceda.(1998) Inmunohistochemical localization of the glycine receptor in synaptic layers and glial cells of the retina. Prim. Sensory Neuron. 0(0): 1-11.

Pérez-León, J. y R., Salceda. (1996) El receptor post-sináptico de glicina. Ciencia. 47: 177-89.

Pfeiffer, F.; D., Graham and H., Betz. (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. J. Biol Chem. 257: 9389-93.

Pourch, R. G. and D. J., Goebel. (1990) Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in the retina. In Ottersen, O. P. and J., Storm-Mathisen. Glycine neurotransmission. John Wiley and Sons. Great Britain. pp. 355-90.

Pribilla, I.; T., Takagi; Langosch, D.; J., Bormann and Betz, H. (1992) The atypical M2 segment of the  $\beta$  subunit confers picrotoxin resistance to inhibitory glycine receptor channels. EMBO J. 11: 4305-11.

Prince, R. J. and M. A., Simmonds. (1992) Steroid modulation of the strychnine-sensitive GlyR. Neuropharmacol. 31: 201-5.

Rajendra, S.; J. W., Lynch; Pierce, D. K. and P. R., Schofield (1995a) Startle disease mutation reduce the agonist sensitivity of the human inhibitory glycine receptor. J. Biol. Chem. 29(18):739-48, 742.

Ren, J.; J., Hong Ye and McArdle, J. J. (1998) cAMP-dependent protein kinase modulation of glycine-activated chloride current in neurons freshly isolated from rat ventral tegmental area. Brain Res. 811: 71-8.

Rothlin, C. V.; E., Katz; Verbitsky, M. and A. B.; Elgoyhen (1999) The alpha9 nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A gamma-aminobutyric acid, and type 3 serotonin receptor. Mol. Pharmacol. 55(2): 248-54.

Ruíz-Gómez, A.; C., Fernández-Shaw; Morato, E.; J. C., Marvizón; Velázquez, J.; F., Valdivieso and Mayor Jr, F. (1991b) Sulfhydryl groups modulate the allosteric interaction between glycine binding sites at the inhibitory GlyR. J. Neurochem. 56: 1690-7.

Ruíz-Gómez, A.; M. L., Vaello; Valdivieso, F. and F., Mayor Jr. (1991a) Phosphorilation of the 48 kDa subunit of the GlyR by protein kinase-C. J. Biol. Chem. 226: 559-66.

Ruíz-Gómez, A.; M., García Calvo; Vázquez, J.; J. C., Marvizón; Valdivieso, F. and F., Mayor Jr. (1989) Thermodynamics of agonist and antagonist interaction with the strychnine glycine receptor. J. Neurochem. 52: 1775-80.

Salceda, R. (1983) Glicina. En Pasantes.Morales, H. y H., Aréchiga. Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. Coordinación de la Investigación Científica, UNAM. México, D. F. pp. 71-82.

Salceda, R. (1989) Uptake and K<sup>+</sup>-stimulated release of <sup>14</sup>C-glycine from frog retinal synaptosomal fractions. Neurochem. Res. 14: 49-54.

Salceda, R. (1991) Ontogenia del Sistema Visual. En M., Salas. Ontogenia neural: aspectos comparativos y mecanismos de regulación de la ontogenia neural. Coordinación de la Investigación Científica, UNAM. México, D. F. pp. 281-296.

Salceda, R. (1998) Diferenciación de la Retina de los Vertebrados: Mecanismos celulares y moleculares. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 48: 115-24.

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

Sassoè-Pognetto, M.; J., Kirsch; Grünert, U.; U., Greferath; Frittsch, J. M.; H., Möhler; Betz, H. and H., Wässle. (1995) Co-localization of gephyrin and GABA<sub>A</sub> receptor subunits in the retina. J. Comp. Neurol. 357: 1-14.

Schmieden, V.; G., Grenningloh; Schofield, P. R. and H., Betz. (1989) Functional expression in *Xenopus* oocytes of the strychnine binding of glycine receptor. EMBO J. 8: 695-700.

Schmieden, V.; J., Kushe and Betz, H. (1993) Mutation of glycine receptor subunit creates  $\beta$ -alanine receptor responsive to GABA. Science. 262(5131): 256-8.

Schmitt, B.; P., Knaos; Becker, C. M. and H., Betz (1987) The Mr 93.000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein. Biochemistry. 26: 805-11.

Schofield, P. R.; M. G., Darlison; N., Fujita; Burt, D. R.; F.A., Stephenson; Rodríguez, H.; L. M., Rhee; Ramachandran, J.; V., Reale; Glencorse, T. A.; P.H., Seeburg and Barnard, E. A. (1987) Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor super family. Nature. 328: 221-27.

Schofield, P. R.; J. W., Lynch; Rajendra, S.; K. D., Pierce; Handford, C. A. and P. H., Barry (1996) Molecular and genetic insights into ligand binding and signal transduction at the inhibitory glycine receptor. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol LXI. Cold Spring Harbor Press. 333-42.

Schönrock, B. and J., Bormann; (1995) Modulation of hippocampal glycine receptor channels by protein kinase C. Neuro. Report. 6: 301-4.

Smiley, J. F. and S., Yazulla. (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. 229: 375-388.

Snyder, J. (1975) Brain J. Pharmacol. 473-84.

ESTRADA DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Song, Y. and L-Y. M., Huang (1990) Modulation of glycine receptor channels by protein kinase C. Neuro Report. 6: 301-4.

Sothimer, H.; C-M, Becker, Pritchett, D. B.; P. R., Schofield; Grenningloh, G.; H., Kettenmann; Betz, H. and P. H., Seeburg (1989) Functional chloride channels by mammalian cell expression of rat glycine receptor subunit. Neuron. 2(5): 1491-7.

Stefanovich, V. (1979) Influence of theophylline on concentrations of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate of rat brain. Neurochem. Res. 4(5): 587-94.

Tokutomi, M.; M., Kaneda and N., Akaike. (1989) What confers specificity on glycine for its receptor site? Br. J. Pharmacol. 97: 360-3.

Triller, A. F.; F., Pfeiffer; Betz, H. and H., Korn. (1985) Distribution of glycine receptors at central synapses: An immunoelectron microscopy study. J. Cell Biol. 101: 683-88.

Uchiyama, M.; K., Hirai; Hishinuma, F.; H., Akagi. (1994) Down-regulation of glycine receptor channels by protein kinase C in *Xenopus* oocytes injected with synthetic RNA. Mol. Brain. Res. 24: 295-300.

Vaello, M. L.; A., Ruiz-Gómez; Lerma, J. and F. Jr., Mayor (1994) Modulation of the inhibitory glycine receptor by phosphorylation by protein kinase C and c-AMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 269: 2002-8.

Werman, R. (1966) Criteria for identification of Central Neuro System Transmitter. Comp. Biochem. Physiol. 18: 745-66.

Werman, R.; R. A., Davidoff and Aprison, M. H. (1968) Inhibitory action of glycine on spinal neurons in the cat. J. Neurophysiol. 31(1): 81-95.

White, W. F. and A. H., Heller (1982) Glycine receptor alteration in the mutant mouse spastic. Nature. 298: 655-7.

Wood, J. P. M.; R. J., McCord and Osborne, N. N. (1996) Retinal Protein Kinase C. Neurochem. Int. 30(2): 119-36.

Wu, F-S; T. T., Gibbs and Farb, D. H. (1990) Inverse modulation of GABA- and glycine induced currents by progesterone. Mol. Pharmacol. 37: 597-602.

Wu, S. M. and B. R., Maple. (1998) Amino acid neurotransmitters in the retina: a functional overview. Vision Research. 38(10): 1371-84.

Yazulla, S. and K. M., Studholme. (1991) Glycinergic IP cells make synaptic contact with AC in goldfish retina. J. Comp. Neurol. 310:1-10.

Young, A. B. and S. H., Snyder. (1974a) Strychnine binding in rat spinal cord membranes associates with the synaptic glycine receptor: cooperativity of glycine interactions. Mol. Pharmacol. 10: 790-809.

Zafra, F.; C., Aragón and Giménez, C. (1997) Molecular biology of glycinergic neurotransmission. Mol. Neurobiol. 14(3): 117-42.

Zhang, J.; C. S., Jung and Slaughter, M. M. (1997) Serial inhibitory synapses in retina. Vis. Neurosc. 14(3): 553-63.