



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DE GLICINA EN LA RETINA DE LA RATA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MIGUEL ANGEL VELAZQUEZ FLORES



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES



2005

m. 346432

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización del receptor de glicina en la retina de la rata".

realizado por : Miguel Angel Velázquez Flores

con número de cuenta 9616452-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **BIOLOGÍA**


Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director	
Propietario	Dra. Rocío Salceda Sacanelles.
Propietario	Dra. Rocío Alcántara Hernández.
Propietario	Dra. María Luisa Fanjul Peña.
Suplente	Dr. Octavio César García González.
Suplente	Biol. Marisela Aguirre Ramírez.

*José Salceda S.*  
*Rocío Alcántara H.*  
*María Luisa Fanjul Peña*  
*Octavio César García González*  
*Marisela Aguirre Ramírez*

Consejo Departamental de Biología

M. en C.  Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN  
DE BIOLOGÍA

## Agradecimientos.

Agradezco a la Dra. Rocío Salceda por su apoyo durante la realización de este trabajo, por sus consejos y , mediante su conocimiento, permitirme crecer profesionalmente.

De igual manera agradezco a los doctores:

María Luisa Fanjul Peña,  
Rocío Alcántara Hernández,  
Octavio César García González y  
al Biol. Marisela Aguirre Ramírez

,por su disponibilidad y colaboración en la realización de este trabajo de investigación.

Agradezco al Biol. Gustavo Sánchez Chávez por su apoyo técnico y por el conocimiento que en mi estancia en el laboratorio logró transmitirme.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

## Dedicatorias.

Dedico este trabajo a dos excelentes personas que fueron capaces de hacer de mi infancia el lugar más hermoso en el que un niño puede vivir y un lugar en el que ahora me puedo refugiar durante la adversidad ¡Gracias!

A mi abuelita, Josefina, por ser un ejemplo de lucha y esfuerzo.

A dos amigos inigualables, que me enseñaron la manera de adquirir una vida nueva llena de gracia, amor y bendición; que Dios los bendiga siempre: Raúl y Mimi.

A mi tío Martín Flores y a Dora que por medio de su dedicación al trabajo y a su familia son un gran ejemplo para mi vida; ¡gracias por su ayuda incondicional!

A mis primos Sergio y Fabiola por ser dos grandes amigos.

Al fabuloso tío Santo y a mi querida tía Jose, por todo el amor que me han brindado.

Ahhh!, claro que este trabalho é dedicado para ti, sim, tú, a mulher de Deus para minha vida. Te amo com todo meu coração, agora e por toda a eternidade.

A mi familia del laboratorio, con la cual convivo día a día: a los Biol. Gustavo, Luisão, Ismaelov y Cecy; a Clau, Shirley ,Naty, Itchel, Christian, Maritza y Tadeo.

## ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 La visión de los vertebrados.....	2
1.1.1. Estructura del ojo.....	2
1.1.2. Estructura de la retina.....	3
1.1.3. Desarrollo de la retina.....	4
1.1.4. Sinaptogénesis.....	7
1.1.5. Comunicación neuronal en la retina.....	7
1.1.6. Neurotransmisores en la retina.....	9
1.2. La glicina en el sistema nervioso central.....	9
1.2.1. Síntesis y metabolismo.....	11
1.3. La glicina como neurotransmisor en la retina de los vertebrados.....	12
1.3.1. Presencia de glicina.....	12
1.3.2. Liberación de glicina.....	13
1.3.3. Mecanismos de transporte de la glicina.....	14
1.3.4. El receptor de glicina.....	15
1.3.5. El sitio de unión de la glicina en el receptor de glutamato tipo NMDA.....	19
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
3. METODOLOGÍA.....	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Unión de $^3\text{H}$ -glicina a las membranas totales de la retina.....	23
4.2. Desplazamiento de la unión de $^3\text{H}$ -glicina.....	25
4.3. Efecto de los agentes reductores, DTT y MTSET, y del zinc, en la unión de $^3\text{H}$ -glicina.....	26
4.4. Unión de $^3\text{H}$ -estricnina a las membranas totales de la retina.....	27
4.5. Unión de $^3\text{H}$ -glicina a las membranas totales de la retina de la rata durante el desarrollo.....	29
5. DISCUSIÓN.....	32
6. CONCLUSIONES.....	36

## ABREVIATURAS

CCG.	Capa de las células ganglionares.
CNI.	Capa nuclear interna.
CPI.	Capa plexiforme interna.
DTT.	Ditioneitol.
EPR.	Epitelio pigmentario de la retina.
GABA.	Ácido $\gamma$ - amino butírico.
GLYT1.	Transportador de glicina de tipo 1.
GLYT2.	Transportador de glicina de tipo 2.
$K_D$ .	Constante de afinidad.
MTSET.	{2-(Trimetilamonio)-etil} metanotiosulfunato).
$n_H$ .	Coficiente de Hill.
NMDA.	N-metil-D-aspartato.
P7.	Retinas de la rata de siete días postnatales.
P15.	Retinas de la rata de quince días postnatales.
PKA.	Proteína cinasa A.
PKC.	Proteína cinasa C.
RGly.	Receptor postsináptico de glicina.
SHMT.	Serina-hidroximetil-transferasa.
SNC.	Sistema nervioso central.
THF.	Tetrahidrofolato.
TNF.	N <sup>5</sup> N <sup>10</sup> -metilén-tetrahidrofolato.
Zn <sup>2+</sup> .	Zinc.

## RESUMEN

La glicina funciona como neurotransmisor inhibitorio en la médula espinal y en otras regiones del sistema nervioso central (SNC), incluyendo la retina. Su acción es mediada por un receptor postsináptico (RGly), constituido por tres subunidades  $\alpha$  (la subunidad  $\alpha$  presenta cuatro isoformas " $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ") y dos  $\beta$  que forman un canal selectivo al  $\text{Cl}^-$  que se antagoniza por el alcaloide estriquina. En la retina de los mamíferos, la inmunolocalización de las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  se demostró en las capas plexiformes interna (CPI) y externa (CPE), sin embargo, poco se sabe acerca de las características farmacológicas del RGly en este tejido. Por lo que en este estudio, se caracterizó la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina y  $^3\text{H}$ -estriquina en las membranas totales de la retina de la rata adulta. La unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina presentó una cinética sigmoide, aunque el análisis de Hill reveló una  $K_D$  de 112 nM. La  $^3\text{H}$ -glicina se desplazó en un 100% por glicina, L-serina, D-serina y en menor grado por  $\beta$ -alanina y taurina; la estriquina desplazó esta unión en un 25 %. La unión específica de  $^3\text{H}$ -estriquina mostró un sitio de alta afinidad, con una  $K_D$  de 94.4 nM. La unión de  $^3\text{H}$ -estriquina se desplazó únicamente por la estriquina.

La utilización de los agentes reductores ditioneitol y el {2-(Trimetilamonio)-etil} metanotiosulfonato no tuvieron efecto en la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina, lo que podría sugerir que la concentración empleada (1mM) no fue suficiente para reducir los grupos thiol del RGly. La presencia de 1mM de zinc causó una reducción del 50 % en la unión específica de glicina, lo que sugiere la presencia de receptores formados por las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ .

La unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina se determinó en las membranas totales de la retina de la rata a los siete y quince días postnatales. A los siete días, la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina presentó una cinética no saturable, mientras que a los quince días postnatales la cinética fue de tipo sigmoide. El análisis de Hill demostró una  $K_D$  de 18 y 80 nM a los 7 y a los 15 días postnatales, respectivamente. Nuestros resultados indican la presencia del RGly, en la retina de la rata, con características farmacológicas semejantes a las reportadas en otras regiones del SNC. Asimismo, la presencia del RGly previa a la formación de las sinapsis, apoya la hipótesis de que la glicina puede funcionar como factor trófico en etapas tempranas del desarrollo y posteriormente como neurotransmisor.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. La visión de los vertebrados.

El proceso de recepción sensorial se inicia en los órganos de los sentidos, lo que permite a los organismos percibir el mundo que les rodea y con esto, responder a una serie de condiciones que cambian constantemente (Díaz-Cintra, 1995).

Uno de los procesos sensoriales de mayor relevancia en los organismos en general y en el hombre en particular es la visión, ya que el cerebro ha desarrollado una serie de mecanismos complejos y eficientes que le permiten analizar las imágenes presentadas por la retina y, a partir de este análisis, construir el mundo visual (Salceda, 1995).

El proceso visual se inicia cuando la luz penetra a través de la córnea y se proyecta sobre la parte posterior del ojo; donde un órgano especializado, la retina, la convierte en señales eléctricas, que a continuación son enviadas a través del nervio óptico hacia los centros superiores del cerebro donde sufren un nuevo procesamiento necesario para la percepción. A diferencia de otras estructuras sensitivas, como algunos receptores somáticos de la piel, la retina no es un órgano periférico sino que forma parte del sistema nervioso central (SNC). La retina contiene seis clases de neuronas que se encuentran unidas mediante un intrincado pero ordenado patrón de conexiones, dando como resultado una organización anatómica en láminas celulares perfectamente definidas (Dowling, 1992).

#### 1.1.1. Estructura del ojo.

El ojo de los vertebrados está formado por varios tejidos que se dividen en tres capas principales. La capa más externa o esclerótica, en la porción anterior se convierte en la córnea (Fig. 1). La capa media o úvea, está subdividida en dos regiones: la porción posterior o coroides, que es un tejido vascularizado encargado de proporcionar los nutrientes necesarios a la retina y la región anterior formada por el cuerpo ciliar y el iris, que produce el humor acuoso y regula la cantidad de luz que entra al ojo, respectivamente. La capa interna del ojo es la retina que cubre el fondo de éste; en su parte proximal está en contacto con el vitreo y en su porción distal con la coroides.

La parte interna del ojo está compuesta de dos grandes compartimientos separados por el cuerpo ciliar, los ligamentos suspensorios del cristalino y el propio cristalino. El compartimiento anterior está ocupado por el humor acuoso, el cual regula la presión intraocular por medio de la variación de su volumen, y el posterior por el humor vítreo, un gel que da consistencia al globo ocular.



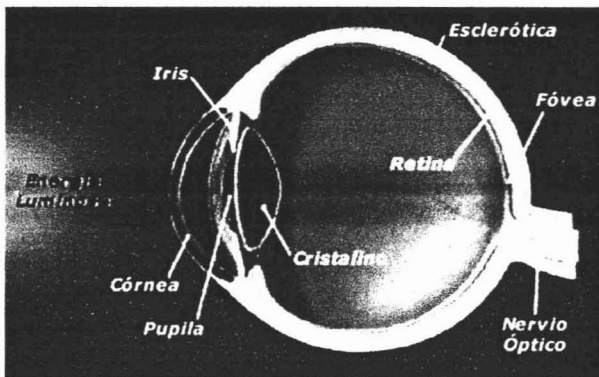


Fig.1. Estructura del ojo humano. El ojo de los vertebrados está formado por varios tejidos que se dividen en tres capas principales. La capa más externa o esclerótica, en la porción anterior se convierte en la córnea; la capa media o úvea y la retina que es la capa interna del ojo que cubre el fondo de éste (Tomado de [http://www.uam.es/personal\\_pdi/psicologia/travieso/web\\_percepcion/sistemav.htm](http://www.uam.es/personal_pdi/psicologia/travieso/web_percepcion/sistemav.htm)).

### 1.1.2. Estructura de la retina.

La retina de los vertebrados consiste de dos componentes, el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la retina neural (Fig. 2). El EPR está constituido por una monocapa de células neuroepiteliales interpuesta entre los capilares de la coroides y los fotorreceptores de la retina neural. La retina está compuesta de seis distintos tipos celulares organizados en capas. La capa nuclear externa está formada por células fotorreceptoras (conos y bastones), cuyos segmentos externos se localizan en aposición con el epitelio pigmentario de la retina; la capa nuclear interna (CNI), en la que se encuentran los somas de células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes; y la capa de células ganglionares. Interconectando estas tres capas están la capa sináptica o plexiforme externa (sinapsis entre fotorreceptores y células de la CNI) y la interna (sinapsis entre las células de la CNI y las ganglionares). La capa plexiforme interna (CPI) ha sido subdividida en cinco estratos (s1-5). El estrato externo (s1-2) comprende la sublámina *a*, en donde se llevan a cabo las conexiones sinápticas sobre las dendritas de las células ganglionares OFF (se activan si los fotorreceptores de la de su campo receptivo son activados por la luz); mientras que el estrato interno, s3-5, forma la sublámina *b* que contiene las sinapsis sobre las células ganglionares ON (se activan si los fotorreceptores del centro de su campo receptivo son activados por la luz) (Pourcho y Goebel, 1990). Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico. Las células gliales de Müller

se extienden en todo el grosor de la retina, sus pies forman la membrana limitante interna y en su región distal forman la membrana limitante externa, donde rodean a los segmentos internos de los fotorreceptores (Salceda, 1998).

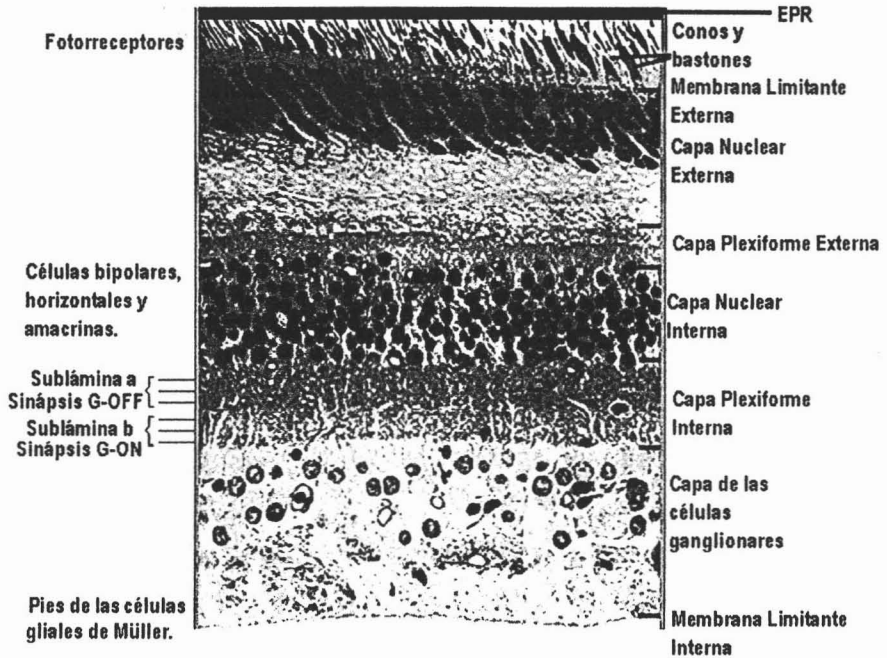


Fig. 2. Corte histológico de la retina humana en la que se muestra su estructura laminar (Modificado de <http://webvision.ed.utah.edu/imageswv/hussect.jpeg>).

### 1.1.3. Desarrollo de la retina.

El desarrollo general del ojo y de la retina es semejante en la mayoría de los vertebrados, aunque el curso temporal de los eventos de morfogénesis y neurogénesis está determinado por la duración del período de gestación. En algunas especies la retina está completamente desarrollada al momento del nacimiento, sin embargo, en otras especies, como la rata, el desarrollo concluye postnatalmente (Salceda, 1998).

En el hombre, el primordio óptico aparece alrededor de los 22 días de gestación, como evaginaciones bilaterales del neuroectodermo del cerebro anterior (Fig. 3-1). Las células de estas evaginaciones continúan proliferando hasta convertirse a los 27 días de gestación en las vesículas

ópticas primarias. Cuando estas vesículas alcanzan la superficie del ectodermo, la depresión del neuroectodermo induce la formación del primordio del cristalino (Fig. 3-2). Una depresión aparece en la superficie inferior de cada vesícula formándose la copa óptica (día 33 de gestación). Las dos capas de la copa óptica empiezan a diferenciarse en distintas direcciones; las células de la capa externa se convierten en el epitelio pigmentario de la retina (EPR), cuerpo ciliar y el iris; mientras que la capa interna da origen a la retina neural (Fig. 3-3). Durante la doceava semana aparecen los rudimentos de los fotorreceptores cuyo desarrollo continúa hasta después del nacimiento (Salceda, 1998).

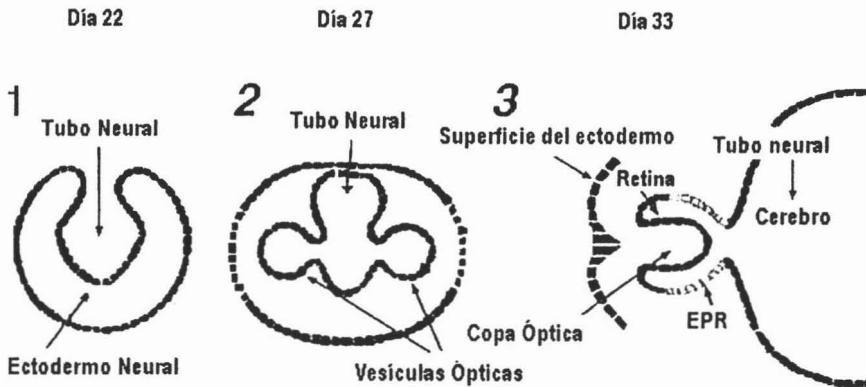


Fig.3. Desarrollo del ojo de los humanos. En el hombre, el primordio óptico aparece alrededor de los 22 días de gestación, el cual va a dar origen a las vesículas ópticas primarias. La copa óptica se forma hasta el día 33 de gestación (Modificado de <http://webvision.med.utha.edu/imagesw/dev1-3.jpeg>).

Los procesos que llevan a la formación general de la retina se han establecido pero no así los eventos moleculares que llevan a la especificidad de sus diferentes tipos celulares (Salceda, 1998). La capa interna de la copa óptica primitiva es un epitelio columnar pseudoestratificado de células ventriculares fusiformes. Antes de cada división mitótica, las células pierden sus uniones con la membrana limitante interna y se redondean. Si los productos de la división mitótica son destinados a ser ventriculares sus procesos se unen a la membrana limitante externa, de lo contrario migran radialmente (Salceda, 1998).

En todas las especies estudiadas se ha observado un patrón general de neurogénesis, en el que los distintos tipos celulares aparecen en una secuencia ordenada, aunque existen variaciones

específicas (Fig. 4) (Salceda, 1998). Los diferentes tipos celulares derivan de una población homogénea de células neuroepiteliales proliferantes. Las células ganglionares son las primeras en diferenciarse, después de su última mitosis migran hacia la membrana limitante interna y se diferencian rápidamente. Las capas celulares se separan horizontalmente debido a la diferenciación de las células ganglionares que presentan elaboradas dendritas que constituyen más tarde la capa sináptica interna (Salceda, 1998).

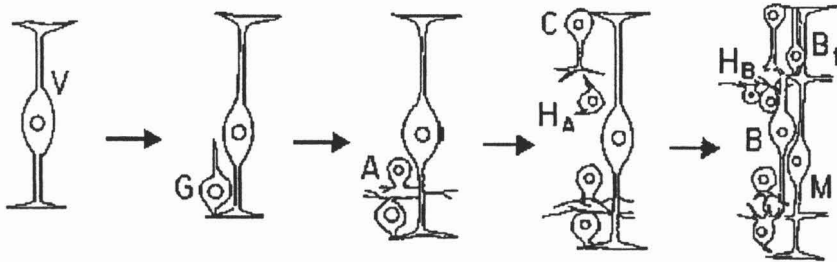


Fig. 4 Secuencia de aparición de los distintos tipos celulares de la retina. V, célula ventricular; G, célula ganglionar; A, célula amacrina; H, célula horizontal; C, fotorreceptor de tipo cono; B, fotorreceptor de tipo bastón; M, célula de Müller (Tomado de Salceda, 1998).

Las células amacrinas aparecen como células pequeñas y redondeadas en el margen proximal de la capa nuclear interna. Paralelamente, la presencia de una población de células grandes distribuidas en la capa distal de neuroblastos indica la aparición de las células horizontales, seguidas de los conos. El estado inicial del desarrollo de la capa sináptica externa se evidencia por el crecimiento de dendritas de las células horizontales que contactan con los axones de los conos. Más tarde, la aparición de las células bipolares induce un aumento en la dimensión y complejidad de la capa nuclear interna y de la sináptica interna (Salceda, 1998).

Posteriormente, los somas de las células de Müller empiezan a distinguirse en la capa nuclear interna, las cuales extienden sus procesos a través del grosor de la retina y lateralmente en las capas nuclear externa e interna. Paralelamente, los bastones empiezan a migrar hacia su destino final, siendo los últimos en alcanzar la diferenciación (Salceda, 1998).

El desarrollo del cristalino, el iris, la córnea y el resto de los elementos del globo ocular son sincrónicos a la morfología de la retina.

#### *1.1.4. Sinaptogénesis.*

En el SNC, la sinaptogénesis comienza antes de que la neurogénesis se haya completado; las neuronas migran a su posición final eludiendo a aquellas que ya han establecido sus sinapsis o que se encuentran en proceso de formación. El establecimiento de las sinapsis requiere de la aparición de componentes esenciales, tanto en las membranas presinápticas como en las postsinápticas (Jacobson, 1991).

La correlación entre la estructura y la función de las sinapsis en el desarrollo, muestra de manera general, que la función precede a la formación de estructuras sinápticas especializadas; por ejemplo, las células de Purkinje, del cerebelo, responden a diferentes neurotransmisores desde los dos primeros días postnatales, mientras que las estructuras de las sinapsis son aparentes hasta el tercer día postnatal (Jacobson, 1991).

Durante el desarrollo de la retina de la rata, la aparición de las primeras sinapsis en la CPE es alrededor del quinto día postnatal, mientras que en la CPI, es aproximadamente hasta el día once (Weldman y Kuwabara, 1968; Horsburgh y Sefton, 1987). Sin embargo, por medio de microscopía electrónica, Sassoe-Pognetto y Wassle (1997), demostraron la presencia de contactos especializados entre las neuronas de la CPI a los tres y siete días postnatales, aunque no observaron la presencia de vesículas sinápticas. La presencia de este tipo de contactos neuronales, fue descrita durante el desarrollo de la CPI de diferentes especies de mamíferos (mono: Nishimura y Rakic, 1985, 1987; gato: Maslim y Stone, 1986; rata: Horsburgh y Sefton, 1987), lo que indica que la sinaptogénesis ocurre de manera similar en las diferentes especies y que éste es un proceso gradual.

#### *1.1.5. Comunicación neuronal en la retina.*

De acuerdo con la estructura estratificada de la retina, el estímulo nervioso que se genera en las células fotorreceptoras se transmite a las células bipolares, y ganglionares, cuyos axones viajan al cerebro a través del nervio óptico (Pérez-León y Salceda, 1998). El impulso se modula dentro de la retina por la actividad de las células horizontales, amacrinas e interplexiformes (Pérez-León y Salceda, 1997).

Los fotorreceptores establecen sinapsis con las dendritas de las células bipolares y horizontales en la CPE. Las células bipolares extienden sus axones dentro de la CPI, en donde hacen contacto sináptico con las dendritas de las células ganglionares; el flujo de información trineuronal entre un

fotorreceptor, una célula bipolar y una ganglionar se conoce como la vía vertical de la retina. Las células horizontales, las amacrinas e interplexiformes median la vía horizontal de la retina. Las interneuronas retinianas realizan una integración primaria del impulso nervioso antes de ser transmitido al encéfalo (Pérez-León y Salceda, 1997).

El área de fotorreceptores que al ser excitados producen una respuesta en una neurona determinada, se conoce como el campo receptivo de ésta. Si un estímulo luminoso es lo suficientemente pequeño para ser detectado por un solo fotorreceptor, éste solamente activará a una sola célula bipolar (circuito ON). Si el estímulo abarca a otra célula fotorreceptora, la respuesta de la célula bipolar y de la ganglionar, dentro de la vía vertical del primer fotorreceptor, se reducirá hasta desaparecer (circuito OFF), mientras que la respuesta de las células de la vía vertical del segundo fotorreceptor empezará a aumentar. Debido a que la activación de un circuito coincide con la inhibición del adyacente, se dice que los circuitos retinianos son antagónicos; por lo general se encuentra un circuito ON adyacente a uno OFF. Esto significa que un estímulo luminoso dentro del campo receptivo de una neurona activa una vía de inhibición sobre los circuitos adyacentes. Las vías horizontales en la retina representan vías de inhibición, y los neurotransmisores que liberan las células horizontales amacrinas e interplexiformes son de tipo inhibitorio (Pérez-León y Salceda, 1997).

En la retina existen dos tipos de células bipolares, el primero se excita bajo la estimulación luminosa y se conoce como célula bipolar ON; el segundo tipo de célula bipolar se denomina OFF, ya que al dejar de recibir el mensaje excitatorio durante la estimulación luminosa se inhibe (Pérez-León y Salceda, 1997). Las células bipolares mantienen el signo de la sinapsis primaria: si se excitaron por la estimulación luminosa, excitan, a su vez, a la célula ganglionar con la que hacen sinapsis, de forma que las bipolares ON conectan con células ganglionares ON y las bipolares OFF con células ganglionares OFF (Pérez-León y Salceda, 1997).

Las respuestas electrofisiológicas provocadas por la luz en cada interneurona retiniana son diferentes, las únicas células que generan potenciales de acción dentro de la retina son las células amacrinas y ganglionares, el resto de las interneuronas despliegan su respuesta en forma de cambios graduales y sostenidos en su potencial de membrana, ya sea despolarizante o hiperpolarizante (Pérez-León, 1994).

### 1.1.6. Neurotransmisores en la retina.

La codificación de la información sensorial en la retina de los vertebrados ocurre por medio de la interacción de los diferentes tipos neuronales que la componen y que utilizan principalmente tres aminoácidos como neurotransmisores: el glutamato (neurotransmisor excitador), el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la glicina (neurotransmisores inhibitorios). El glutamato es el neurotransmisor de la vía vertical de la retina (células fotorreceptoras  $\rightarrow$  células bipolares  $\rightarrow$  células ganglionares), mientras que el GABA y la glicina son neurotransmisores de la vía horizontal de la retina (células horizontales, amacrinas e interplexiformes) (Kalloniatis y Tomisich, 1999).

Además de estos neurotransmisores, se tiene evidencia de que otras moléculas tales como: la dopamina, la serotonina, la acetilcolina y diferentes péptidos, están involucradas en la neurotransmisión química de la retina de los vertebrados (Kalloniatis y Tomisich, 1999).

Aunque otros aminoácidos como el aspartato y la taurina han sido propuestos como posibles neurotransmisores, se ha observado que funcionan principalmente como precursores de otras moléculas o como osmorreguladores (Kalloniatis y Tomisich, 1999).

### 1.2. La glicina en el sistema nervioso central.

La glicina es el principal neurotransmisor inhibitorio en la médula espinal y el tallo cerebral; regiones en las que alcanza concentraciones de 3.62 y 1.3  $\mu\text{mol} / \text{g}^{-1}$  de tejido, respectivamente (Daly, 1990). Además ejerce un efecto inhibitorio en la retina y otras regiones específicas del cerebro (Laube *et al.*, 2002). La glicina se acumula en las vesículas sinápticas por medio de un sistema de transporte que es dependiente de protones y se libera por estimulación despolarizante a través de un mecanismo dependiente de calcio. Su acción es mediada por el RGly, el cual pertenece a la superfamilia de receptores activados por un ligando. La glicina se elimina del espacio sináptico, por la actividad de un transportador específico dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Fig. 5) (Zafra *et al.*, 1997).

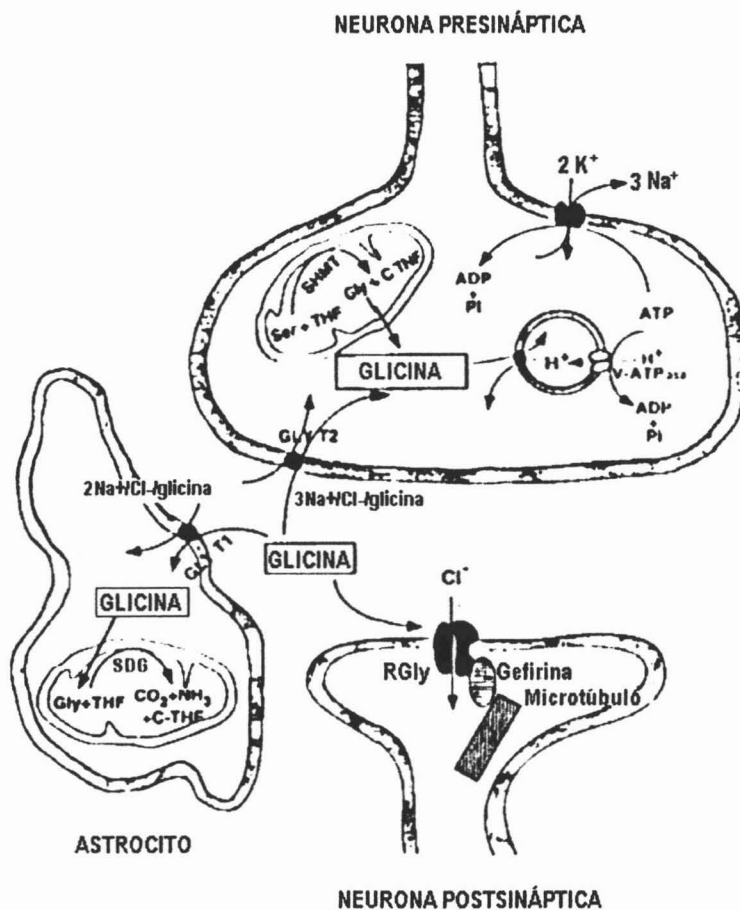


Fig. 5. Esquema de una sinápsis axodendrítica. La glicina es sintetizada en la mitocondria de las terminales presinápticas por medio de la enzima serina-hidroximetil-transferasa (SHMT); la glicina es liberada y acumulada en vesículas sinápticas por medio de un mecanismo de transporte dependiente de H<sup>+</sup> y se libera al espacio sináptico por despolarización. Los potenciales inhibitorios postsinápticos son generados por corrientes de Cl<sup>-</sup> que son producidas por la activación del receptor de glicina (RGly). La acción sináptica de la glicina es finalizada por medio un mecanismo de transporte dependiente de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> localizado en la membrana presináptica (GLYT2) y en la glia (GLYT1). Finalmente, la glicina es degradada en las mitocondrias del astrocito por medio de un sistema degradativo de glicina (SDG). Abreviaturas. THF: tetrahidrofolato; TNF: N<sup>5</sup>N<sup>10</sup>-metilén-tetrahidrofolato; Gefirina: Proteína periférica de membrana encargada del anclaje del receptor postsináptico de glicina al citoesqueleto (Modificado de Zafra *et al.*, 1997).



### 1.2.1. Síntesis y metabolismo.

En las neuronas, la glicina se sintetiza directamente a partir de la serina y del hidroxipiruvato. En el cerebro, la síntesis de glicina que se destina a la función sináptica ocurre a través de la vía de la serina (Fig. 6). La serina-hidroximetil-transferasa (SHMT) hidroliza el grupo metilo de la serina y produce glicina. Esta enzima requiere como co-factores al fosfato de piridoxal, al ácido fólico y al  $Mn^{++}$ . La concentración de la SHMT se correlaciona con los niveles elevados de glicina en las neuronas propuestas como glicinérgicas con un enriquecimiento de 20 veces sobre tejidos no neurales (Pérez-León, 1994; Daly, 1990).

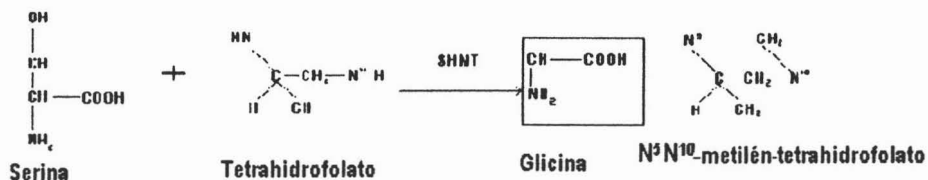


Fig.6. Esquema del metabolismo de la glicina. El mecanismo de síntesis de la glicina se lleva a cabo por la enzima SHMT. En el SNC la presencia de la SHMT es exclusivamente mitocondrial, por lo que se ha sugerido que la síntesis de glicina a partir de la serina en el SNC ocurre en la mitocondria (Modificado de Pérez-León, 1994).

En el hígado se han identificado dos isoformas de la SHMT, una citoplásmica y otra mitocondrial, mientras que en el SNC sólo se ha encontrado esta última (Daly, 1990), por lo que se ha sugerido que la síntesis de glicina a partir de la serina en el SNC ocurre en la mitocondria (Zafra *et al.*, 1997). Adicionalmente, existe un sistema de degradación de glicina, que ocurre a través de un específico sistema degradativo de glicina (SDG), inicialmente caracterizado en el hígado. Este sistema es un complejo de cuatro proteínas que, al igual que la SHMT mitocondrial, se encuentra en la membrana interna. La actividad del SDG no es dependiente de  $NAD^+$ , de  $THF^+$ , ni de fosfato de piridoxal. Durante la degradación de glicina se libera Metilén-THF, el cual forma parte de la vía de la síntesis de glicina (Daly, 1990).

### **1.3. La glicina como neurotransmisor en la retina de los vertebrados.**

#### *1.3.1. Presencia de glicina.*

Por medio de estudios autorradiográficos, Pourcho y Goebel (1990) han demostrado la localización de  $^3\text{H}$ -glicina en la retina de diferentes especies de vertebrados. Las neuronas retinianas que se proponen como glicinérgicas, con base a la acumulación de este radioactivo, se muestran en la Tabla 1.

En la retina de los vertebrados, las células amacrinas son las neuronas que presentan mayor acumulación de glicina. En algunas especies se han caracterizado diferentes subpoblaciones de éstas, no únicamente por características morfológicas y sinápticas, sino también por el contenido de glicina que presentan (Pourcho y Goebel, 1990).

En la retina del gato, las células amacrina que poseen mayor contenido de glicina son las A-8; estas células reciben sinapsis de bipolares de conos y de bastones y son biestratificadas, es decir, que se ramifica en las subláminas *a* y *b* (Pérez-León, 1994). Las células amacrinas A-3 y A-4 ramifican primariamente en la sublámina *a*, en donde la A-4 interactúa con bipolares de conos y con células ganglionares-OFF. Por medio de autorradiografía, en conjunto con la técnica de Golgi, se demostró la presencia de  $^3\text{H}$ -glicina en las tipo A-4, en menor medida las A-3 y más débilmente en las All (Pourcho y Goebel 1990). Las célula amacrinas All son el tipo celular mejor caracterizado en la retina del gato, estas células se encuentran asociadas a bastones y sufren una despolarización mucho más rápida en respuesta a la luz, en relación a otros tipos de respuestas dominadas por bastones. En la retina del humano y del mono, las células amacrinas homólogas a la All del gato, presentan mayores niveles de glicina que, lo que refleja ciertas diferencias en la función de este amino ácido en las amacrinas de bastones de diversas especies (Pourcho y Goebel, 1990).

Para la mayoría de las especies de mamíferos se ha reportado la presencia de glicina en las células bipolares, sin embargo, las células bipolares son consideradas excitadoras, pues liberan glutamato como transmisor (Pourcho y Goebel, 1990). A este respecto, Pourcho y Goebel (1990) propusieron que las células bipolares actúan a través de una célula amacrina intermedia y que la glicina funciona como un neuromodulador, potenciando la respuesta del receptor glutamatérgico de tipo N-metil- D- aspartato (NMDA).

Tabla 1. Localización de <sup>3</sup>H-glicina en la retina de vertebrados.

Especies	Acumulación de <sup>3</sup> H-glicina				
	AM	BP	CIP	CCG	CPI
<b>No mamíferos</b>					
Peces no teleósteos	+	-	+	-	-
Rana	+	-	-	+	-
Sapo ( <i>Bufo marinus</i> )	+	-	+	+	-
<i>Xenopus</i>	+	-	+	+	-
Salamandra	+	+	-	+	+
<i>Salamandra tigre</i>	+	+	-	+	-
Tortuga	+	-	-	-	-
Paloma	+	+	-	-	-
Pollo	+	-	-	-	-
<b>Mamíferos</b>					
Cobayo	+	-	-	+	-
Rata	+	-	-	+	-
Conejo	+	-	-	+	-
Gato	+	-	-	+	-
<b>Primates</b>					
Humano	+	-	-	-	-
Mono Rhesus	+	-	-	-	-
Macaco	+	-	-	-	-

Abreviaturas: AM, amacrina; BP, bipolares; CIP, células interplexiformes; CCG, capa de las células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna. Modificado de Pourcho y Goebel (1990).

### 1.3.2. Liberación de glicina.

En respuesta a un estímulo despolarizante, las neuronas liberan un neurotransmisor a través de un mecanismo dependiente de calcio. La entrada de calcio en la terminal presináptica lleva a la fusión de las vesículas que contienen el neurotransmisor con la membrana plasmática, y la liberación de su contenido al espacio sináptico (Zafra *et al.*, 1997). La liberación de glicina de las neuronas retinianas en respuesta a un estímulo despolarizante, señalaría que ésta se utiliza como neurotransmisor y, en efecto, la glicina puede ser liberada de la retina por despolarización por potasio (30-60mM) (Pérez-

León, 1994), como se observó en los sinaptosomas aislados de la retina del pollo (López-Colomé *et al.*, 1978) y de la rana (Salceda, 1989). Esta liberación inducida por potasio puede ser inhibida por la incubación del tejido en un medio libre de calcio, sin embargo, se ha observado la liberación de glicina provocada por estímulos despolarizantes en medios carentes de calcio; por lo que se sugiere la existencia de otro mecanismo de liberación que no es dependiente de  $Ca^{2+}$  (Zafra *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha confirmado la liberación de glicina estimulada por la luz en la retina de diversas especies (Marc, 1985). La liberación de glicina de las células amacrinas se demostró en la retina de la rana (Salceda, 1989).

### 1.3.3. Mecanismos de transporte de glicina.

Una de las ideas básicas en la transmisión sináptica es la terminación rápida de la actividad del neurotransmisor después de su liberación. Para la mayoría de los neurotransmisores, incluyendo a la glicina, la terminación de la actividad sináptica se lleva a cabo por un mecanismo de captura de alta afinidad que es dependiente de  $Na^+$  y que se encuentra en la terminal presináptica, así como en las células gliales circundantes (Pérez-León *et al.*, 2004). De acuerdo a este principio, la caracterización y localización del sistema de transporte de glicina se ha utilizado para definir a las vías glicinérgicas (Pérez-León y Salceda, 1997).

Dos sistemas de transporte de alta afinidad específicos para glicina han sido identificados en las terminales nerviosas y en las células gliales en diferentes regiones del SNC ( $K_m$  de 20 a 100  $\mu M$ ). El transportador de glicina de tipo 1 (GLYT1) presenta tres isoformas que son codificadas por un solo gen: GLYT1a, 1b y 1c. Los tres polipéptidos difieren únicamente en sus secuencias amino terminal; no así, en sus propiedades de transporte. Sin embargo, cada una de las isoformas presenta distintos patrones de expresión en el SNC y tejidos periféricos, sugiriendo que cada una posee funciones especializadas (Zafra *et al.*, 1997).

Por otro lado, el transportador para glicina de tipo 2 (GLYT2) es codificado por un gen y que presenta 48% de identidad amino acidica con el GLYT1. El GLYT1 y el GLYT2 pueden distinguirse farmacológicamente por la inhibición que presentan las tres isoformas del GLYT1 por el análogo de la glicina, la sarcosina (Zafra *et al.*, 1997).

La expresión de los transportadores GLYT1 y GLYT2 ocurre principalmente en las áreas caudales del cerebro, aunque ambos transportadores se encuentran expresados también en el cerebro anterior. Estos datos indican una clara asociación de ambas proteínas con la neurotransmisión

glicinérgica. Mientras el GLYT1 está expresado principalmente en astrocitos y en los procesos de la materia blanca y gris, el GLYT2 se encuentra exclusivamente en neuronas del tallo cerebral y en la médula espinal (López-Corcuera et al., 1998; Goebel, 1996). Por medio de inmunocitoquímica y ensayos de unión de estricnina (antagonista específico del RGly) se ha detectado la colocación del GLYT2 con el receptor de glicina, encontrándose los niveles más altos del GLYT2 en las astas dorsales y ventrales de la médula espinal, en el sistema auditivo y en el núcleo de los nervios craneales (Zafra et al., 1997). En la retina, la localización del GLYT1 se demostró con técnicas inmunohistoquímicas en una subpoblación de células amacrinias, mientras que no se ha podido determinar la presencia del GLYT2. Aunque poco se conoce de las características del transporte de glicina en la retina, la presencia de un transporte de alta afinidad, dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , se demostró en la retina de la rana (Pérez-León et al., 2004).

En cuanto a la estequiometría del transporte, para el transportador GLYT1 son  $2\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{glicina}$ , mientras que para el GLYT2 se necesitan  $3\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{glicina}$  (García-López, 1999).

#### 1.3.4. El receptor de glicina.

La investigación sobre la transmisión glicinérgica ha desembocado en la caracterización minuciosa del receptor postsináptico de glicina que media su acción, el cual es uno de los representantes arquetípicos del grupo de los receptores ionotrópicos (Pérez-León, 1994).

La glicina actúa a través del RGly, produciendo una corriente de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) que es antagonizada específica y reversiblemente por el alcaloide estricnina (Pérez-León y Salceda, 1995). Desde las primeras investigaciones de la transmisión sináptica en la médula espinal, un resultado consistente fue el antagonismo de la estricnina, tanto contra la acción del transmisor natural, como de la glicina aplicada iontoforéticamente (técnica basada en la aplicación de iones y moléculas ionizadas por vía transcutánea, aplicando una corriente eléctrica); por lo tanto, la glicina y la estricnina actúan como agonista y antagonista, respectivamente, sobre la misma proteína, el RGly. El antagonismo de la estricnina, es el criterio farmacológico al que se recurre con mayor frecuencia para proponer que una respuesta electrofisiológica es provocada por la glicina (Pérez-León y Salceda, 1996).

El RGly es una proteína de membrana compuesta por tres subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  que forman el canal de cloruro que es activado por la glicina. La expresión de las subunidades  $\alpha$ , que contienen los sitios de unión del agonista y antagonista, genera homo-oligómeros funcionales, mientras que la subunidad  $\beta$  requiere ser coexpresada con la subunidad  $\alpha$  para formar hetero-oligómeros de

estequiometría definida ( $\alpha_3\beta_2$ ) (Fig. 8) (Griffon et al., 1999). El RGly se ancla al citoesqueleto por medio de una proteína periférica de membrana llamada gefirina, que interactúa con las proteínas del citoesqueleto tubulina y F-actina, sin embargo, la gefirina no es una proteína de anclaje específica para el RGly, pues también está involucrada en el anclaje del receptor GABA<sub>A</sub> (Sola et al., 2004; Grünert, 2000).

Hasta ahora, se han identificado cuatro genes para la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha_1$ - $\alpha_4$ ) y uno que codifica para la subunidad  $\beta$  del RGly. La homología entre cada una de las variantes de la subunidad  $\alpha$  es alta, la subunidad  $\alpha_4$  presenta 91% y 85% de homología con respecto a la subunidad  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$ , respectivamente; mientras que la homología entre los polipéptidos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  es del 80% (Matzenbach et al., 1994). Aunque las diferentes variantes de la subunidad  $\alpha$  difieren en su secuencia aminoácida, todas presentan alta afinidad por la unión de estricnina, el desplazamiento de ésta por glicina y otros agonistas y generan corrientes de cloruro (Pérez-León, 1994). Sin embargo, las variantes  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  presentan diferencias en su sensibilidad a los diversos agonistas del RGly. Los RGly formados por la subunidad  $\alpha_1$  y expresados en ovocitos de *Xenopus*, responden a la  $\beta$ -alanina y a la taurina, con IC<sub>50</sub> de 150 y 310  $\mu$ M, respectivamente (De Saint Jan et al., 2001), mientras que los RGly formados por la subunidad  $\alpha_2$  responden a concentraciones 30 veces más elevadas. Además, pese a que ambos tipos de variantes responden en el mismo intervalo de concentraciones de glicina, las corrientes generadas son siempre tres o más veces mayores en la variante  $\alpha_2$  que en la  $\alpha_1$  (Pérez-León, 1994). En estudios realizados *in vitro*, se observó que las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$  producen canales con cinéticas rápidas, mientras que la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  produce canales con una cinética lenta (Vitanova et al., 2004).

Por otro lado, los RGly con la subunidad  $\alpha_3$  presentan una afinidad menor a la glicina y a la taurina en comparación a los RGly formados de las variantes  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (Matzenbach et al., 1994).

La subunidad  $\alpha_2$  tiene una variante ( $\alpha_2^*$ ) que difiere únicamente por un aminoácido en la posición 167, en donde hay un glutámico en lugar de glicina. La variante  $\alpha_2^*$  genera corrientes de Cl<sup>-</sup> activadas por glicina, que no pueden ser antagonizadas por estricnina a concentraciones menores de 1  $\mu$ M, cuando en el resto de las subunidades la afinidad por el alcaloide es del orden nanomolar. El ARN mensajero de la subunidad  $\alpha_2^*$  es el más abundante en la médula espinal de la rata durante los primeros días de vida, y se sugiere que ello explica la insensibilidad de los roedores a la estricnina durante los primeros diez días de vida (Pérez-León, 1994).

La localización temporal y espacial de las variantes de la subunidad  $\alpha$  es diferente; la subunidad  $\alpha 1$  se encuentra en la médula espinal y en el tallo cerebral del organismo adulto; la subunidad  $\alpha 2$ , en la médula espinal y en el cerebro de los embriones y neonatos; la subunidad  $\alpha 3$ , en la médula espinal y en el cerebro anterior en los primeros estadios postnatales, así como en el organismo adulto (Matzenbach *et al.*, 1994; Pérez-León, 1994; Kuhse *et al.*, 1990). La subunidad  $\alpha 4$ , se encuentra localizada en la médula espinal, en el ganglio de la raíz dorsal, en el ganglio simpático y en los genitales masculinos del pollo en etapa embrionaria (Harvey, 2000).

La localización de los RGly en la retina de los mamíferos ha sido estudiada por medio de tres anticuerpos monoclonales (mAbs): el mAb2b reconoce la subunidad  $\alpha 1$ , el mAb4a reconoce a las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  y, en menor medida, a la subunidad  $\beta$ ; y el mAb7a que reconoce a las diferentes isoformas de la gefirina (Wassle *et al.*, 2004).

En la retina adulta de diferentes especies de mamíferos se ha observado que existe una distribución diferencial de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  del RGly. La mayoría de las sinapsis que involucran a la subunidad  $\alpha 1$  del RGly son entre células bipolares y células amacrinas de tipo AII (la vía de los bastones), aunque se ha observado su expresión en algunos subtipos de células ganglionares. En la CNI se ha observado la expresión de la subunidad  $\alpha 2$  principalmente en las células amacrinas y en casi todas las células de la capa de las células ganglionares (CCG). Por otro lado, la subunidad  $\alpha 3$  se expresa en la CNI en la vía de los conos y en menor medida en la CCG (Grünert, 2000). Además, se piensa que las sinapsis glicinérgicas tienen una función específica en la transmisión de las señales para la adaptación a la oscuridad a través de los canales OFF de la vía de los bastones (de las células bipolares-OFF  $\rightarrow$  células amacrinas  $\rightarrow$  células ganglionares-OFF).

Además de estos resultados, en la retina de la rana y de la rata, por medio de estudios inmunohistoquímicos, se determinó la presencia de RGly formados por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en la capas plexiformes interna y externa, así como en las células gliales de Müller (Pérez-León y Salceda, 2000).

Existen diversos procesos que modifican a la actividad de una proteína, sea ésta una enzima, un transportador o un receptor de membrana (Zafra *et al.*, 1997). Estudios recientes han sugerido que diferentes receptores ionotrópicos pueden ser regulados por la incorporación de grupos fosfato en sitios específicos de la proteína. El RGly, al igual que otros miembros de la familia de canales iónicos activados por el ligando, presenta sitios específicos susceptibles a la fosforilación. La subunidad  $\alpha$

del RGly se fosforila en neuronas intactas de la médula espinal por la proteína cinasa C (PKC), como por la proteína cinasa A (PKA). La activación de la PKA, incrementa las respuestas a la glicina, mientras que la activación de la PKC las disminuye. Sin embargo, en las neuronas del hipocampo no se observa ninguna relación entre la respuesta producida por la glicina y la activación de la PKA, aunque sí por la PKC. Estas diferencias en la regulación del RGly, han sido atribuidas a la presencia de diferentes isoformas del RGly en el SNC. Por otra parte, en el RGly purificado de la médula espinal, la fosforilación mediada por la PKC en la subunidad  $\alpha 1$  del RGly ocurre en el residuo citoplásmico 391 (serina), mientras que el sitio de fosforilación de la PKA no se conoce (Zafra *et al.*, 1997).

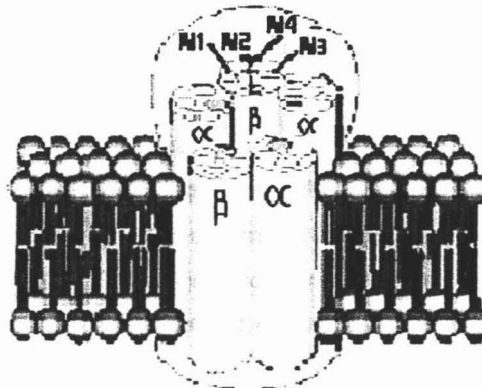


Fig.8 Receptor postsináptico de glicina (RGly). Tomado de <http://www.biophysics.org.au/pics/GlyRChanLab.gif>

Por otra parte, se ha observado que los grupos sulfhidrilo tienen una función importante en la modulación de diferentes receptores a neurotransmisores, incluyendo el RGly. Los grupos sulfhidrilo modulan la interacción que existe entre diferentes sitios de unión para la glicina en el RGly, para llevar a cabo el desplazamiento de la unión de  $^3\text{H}$ -estricnina; lo que sugiere que el funcionamiento del RGly *in vivo* es regulado por reacciones de óxido reducción, como ya se demostró para los receptores de glutamato de tipo NMDA. Además, sugiere que los cambios conformacionales que



afectan a los grupos sulfhidrido están relacionados en la activación del receptor por diferentes agonistas (Ruiz-Gómez *et al.*, 1991).

En diferentes regiones del cerebro y de la médula espinal de mamíferos, el zinc ( $Zn^{2+}$ ) se encuentra en altas concentraciones en las vesículas sinápticas de diferentes subpoblaciones neuronales, liberándose por despolarización de la neurona presináptica y modulando las respuestas postsinápticas de diferentes receptores a neurotransmisores (Lynch, 2004). Bajas concentraciones de  $Zn^{2+}$ , menores a  $10 \mu M$ , incrementan las corrientes mediadas por la glicina, aparentemente debido a que incrementa la afinidad de ésta al RGly, mientras que altas concentraciones de  $Zn^{2+}$  (0.01- 1mM), tienen un efecto contrario (Laube *et al.*, 2002).

#### 1.3.5. El sitio de unión de la glicina en el receptor de glutamato de tipo NMDA.

El receptor glutamatérgico de tipo NMDA es el único receptor ionotrópico que es permeable a calcio y sodio. Su dependencia al voltaje es regulada por magnesio y necesita de dos co-agonistas, el glutamato y la glicina, para la activación del canal. La concentración de glicina necesaria para activar de manera normal al receptor de glutamato tipo NMDA es menor de  $0.1 \mu M$ . El sitio de unión de la glicina en el receptor de glutamato de tipo NMDA, a diferencia del RGly, es insensible a estircinina (Zafra *et al.*, 1997).

Diversas evidencias indican que la glicina funciona como neurotransmisor inhibitorio en la retina de los vertebrados. La identificación y caracterización del RGly es una evidencia indispensable para proponer a la glicina como neurotransmisor en un tejido. Estudios inmunocitoquímicos demostraron la presencia de las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  en la retina de diferentes mamíferos (Haverkamp, 2004; Haverkamp, 2003; Grünert, 2000).

La caracterización farmacológica del RGly se estudió en la retina de la rana y en membranas aisladas de las fracciones sinaptosomales de la misma (Aguirre-Ramírez, 2000; Pérez-León y Salceda, 1995). Estos estudios revelaron la presencia de sitios de unión al RGly de alta afinidad, semejante a la reportada en la médula espinal. Aunque en la retina del bovino y de la rata se reportó la presencia de sitios de unión de estircinina (Borbe *et al.*, 1981; Schaeffer y Anderson, 1980), la caracterización farmacológica del RGly no se ha estudiado.

La retina de la rata es un modelo adecuado para el estudio de las características farmacológicas del RGly y de su establecimiento dentro del desarrollo, ya que éste ocurre postnatalmente.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

### **2.1. Hipótesis.**

Las características farmacológicas del RGly en la retina de la rata, son semejantes a las reportadas en la médula espinal, y su presencia correlacionará con el desarrollo de la retina.

### **2.2. Objetivo general.**

Conocer las características farmacológicas del RGly en la retina de la rata, y su expresión durante el desarrollo de la misma.

### **2.3. Objetivos particulares.**

1. -Caracterizar la unión de glicina y de estircnina en membranas totales de la retina de la rata adulta.
2. -Caracterizar la unión de glicina en membranas totales de la retina de la rata durante el desarrollo.
3. - Estudiar el efecto de agentes reductores y el efecto del zinc sobre la unión de glicina en membranas totales de la retina de la rata adulta.

### 3. METODOLOGÍA.

#### 3.1. Animales.

Los experimentos se realizaron en ratas Long-Evans de siete y quince días postnatales, así como en el organismo adulto. Los animales se mantuvieron en el bioterio bajo condiciones de luz y oscuridad 12:12 hrs.; con alimento y agua *ad libitum*.

#### 3.2. Reactivos.

La  $^3\text{H}$ -glicina (56.4 - 60.0 Ci/mmola) y la  $^3\text{H}$ -estricnina (23 Ci/mmola) se obtuvieron de NEN Life Science Products, Inc. La estricnina, los aminoácidos y los agentes reductores: {2-(Trimetilamonio)-etil}metanotiosulfonato (MTSET) y el ditiotreitól (DTT) se obtuvieron de Sigma; el sulfato de Zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) se obtuvo de Baker. Todos los otros reactivos fueron de grado analítico.

#### 3.3. Aislamiento de membranas.

Las ratas se sacrificaron por decapitación, entre las 10 y 12 horas del día. El globo ocular se extrajo, se hemisección y se separó la región anterior. De la copa óptica se separó la retina con ayuda de unas pinzas.

Las retinas se homogenizaron en 20 volúmenes de agua (peso/volumen) con un homogenizador de vidrio; el homogenado se centrifugó a 71,000 g durante 25 minutos a 4°C, el precipitado se lavó y centrifugó a la misma velocidad, en cuatro ocasiones. El último botón se congeló a -20°C hasta que se utilizó para el ensayo de unión de ligandos radioactivos.

#### 3.4. Ensayos de unión del ligando radioactivo.

Las membranas se descongelaron, se resuspendieron en 20 volúmenes de agua y se centrifugaron a 71,000 g, durante 25 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y las membranas se resuspendieron en un amortiguador (Tris 10mM  $\text{MgSO}_4$  1.17mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2mM y KCl 4.7mM; pH 7.4). El ensayo de unión específica se llevó a cabo por una modificación del método de Young y Snyder (1973). Las membranas (30-70  $\mu\text{g}$  de proteína), se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, en presencia de diferentes concentraciones de  $^3\text{H}$ -glicina ó  $^3\text{H}$ -estricnina en un volumen final de 175  $\mu\text{l}$ . La incubación se detuvo por centrifugación en una aerofuga Beckman a 20 psi durante 4 minutos; se desechó el sobrenadante y el botón se lavó superficialmente con 100  $\mu\text{l}$  de agua fría. El botón se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de SDS al 0.1% durante 10 minutos, se transfirió a

un vial y se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo (Tritosol). La radioactividad en las membranas se determinó en un contador de centelleo líquido, Beckman S1500.

La unión específica de glicina y estricnina se determinó incubando en paralelo las membranas con los ligandos radioactivos en presencia de 1mM de glicina o de 200  $\mu$ M de estricnina respectivamente.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Se midió la absorbancia a 690 nm. en un lector de microplacas (usando un kit comercial de Bio Rad).

### 3.5 Análisis de resultados.

El análisis de Scatchard es un método de linearización de los datos obtenidos en la curva de saturación de la unión del ligando al receptor. Este es obtenido graficando en las abscisas el cociente de la unión del ligando entre la concentración libre del ligando ( $[S]_b / [S]_f$ ) y en la ordenada, la unión específica del sustrato ( $[S]_b$ ). Cuando la gráfica de Scatchard es lineal, la intercepción de la curva en las abscisas es igual a la  $B_{MAX} / K_D$ , mientras que la intercepción en las ordenadas es igual a la  $B_{MAX}$ . Sin embargo, cuando la gráfica obtenida es una curva, no se pueden obtener los valores de la  $B_{MAX}$  ni de la  $K_D$  directamente de la curva. Esto indica que existe cooperatividad en el sistema en estudio (Segel, 1975).

El cálculo de los parámetros de la constante de afinidad ( $K_D$ ) y del número de sitios unión ( $B_{MAX}$ ) de  $^3$ H-estricnina y de  $^3$ H-glicina, en las membranas totales de la retina de la rata, se realizó por medio del programa computacional GraphPad Prism 4. Los resultados obtenidos para la unión específica de  $^3$ H-glicina no se pudieron ajustar a una recta, por lo que su análisis se realizó manualmente.

El análisis de Hill, al igual que el análisis de Scatchard, es un método de linearización de los datos obtenidos de la curva de saturación, donde la gráfica del  $\log v / (V_{MAX} - v)$  contra el  $\log [S]$  da como resultado una línea recta. A partir de esta gráfica, se puede calcular directamente el valor de  $n$  (el número de sitios de unión del ligando presentes en el receptor) y la  $K_D$ . La pendiente es  $n$ . Cuando  $v = \frac{1}{2} V_{MAX}$ ,  $v / (V_{MAX} - v) = 1$  y el  $\log v / (V_{MAX} - v) = 0$ , la posición correspondiente en el eje del  $\log [S]$ , da el  $\log$  de la concentración del sustrato que se necesita para alcanzar el 50% de la  $V_{MAX}$  ( $[S]_{50}$ ) (Segel, 1968).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en este estudio, se realizó por medio del programa de cómputo GraphPad Prism4, aplicando una prueba de "t" o prueba no paramétrica.

#### 4. RESULTADOS.

##### 4.1. Unión de $^3\text{H}$ -glicina a las membranas totales de la retina.

Con el propósito de conocer cual es la temperatura óptima de la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina, se llevó a cabo la caracterización de la unión específica del radioligando a diferentes temperaturas.

La unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina se estudió en las membranas totales de la retina de la rata adulta a 4°, 25° y 37 °C. Los valores de unión óptimos fueron observados a 25°C, por lo que todos los demás experimentos se realizaron en esta condición.

La unión específica de glicina representó el  $62\pm 4.7\%$  de la unión total de  $^3\text{H}$ -glicina.

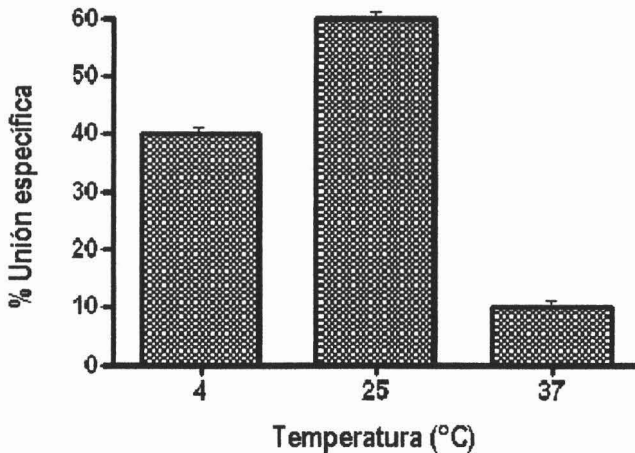
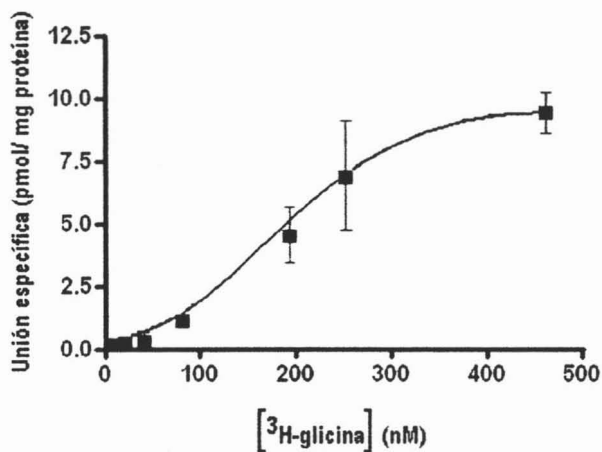


Fig. 9. Unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina a las membranas totales de la retina de la rata. Los ensayos de unión se efectuaron incubando las membranas en una solución Ringer Tris 10mM que contenía 10 nM de  $^3\text{H}$ -glicina, durante 30 minutos a las temperaturas indicadas; la unión específica se calculó incubando en presencia de 1mM de glicina como se indicó en los métodos. Los valores representan el promedio de dos experimentos llevados a cabo por triplicado.

Para determinar la cinética de unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina de la rata adulta, se incubó en presencia de varias concentraciones de  $^3\text{H}$ -glicina, en un intervalo de 10 a 460 nM. La figura 10-A muestra una curva de tipo sigmoide, la cual se satura a una

concentración de 460nM. El análisis de Scatchard mostró cooperatividad en el sistema (Segel, 1968) (Fig. 10-B). El análisis de Hill reveló un coeficiente ( $n_H$ ) de 0.83, y la existencia de un sistema de alta afinidad con una  $K_D = 112$  nM (Fig. 11).

A)



B)

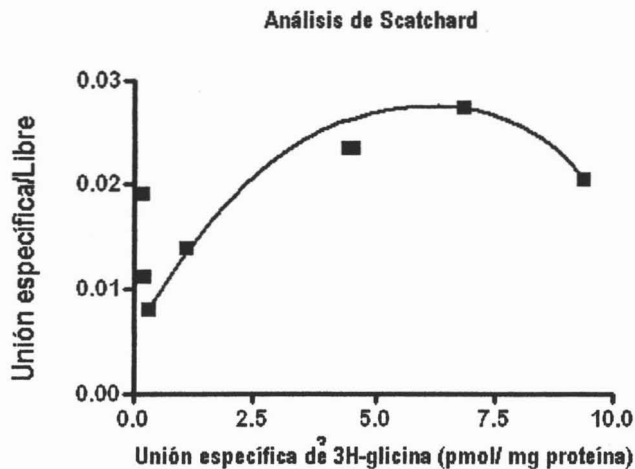


Fig.10. La unión específica de <sup>3</sup>H-glicina a las membranas totales de la retina de la rata adulta. A) Las membranas se incubaron durante 30 minutos a 25°C, en presencia de diferentes concentraciones de <sup>3</sup>H-glicina. La unión específica se determinó en presencia de 1mM de glicina como se indicó en los métodos. B)

Análisis de Scatchard. Los datos se tomaron de la figura 10-A. Los valores son la media de tres a cinco experimentos  $\pm$  el error estándar.

Gráfica de Hill

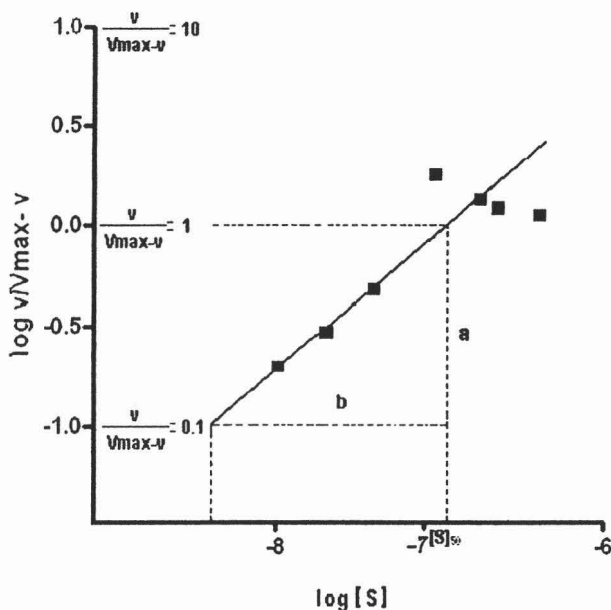


Fig.11. Análisis de Hill de la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en la retina de la rata adulta. El coeficiente de Hill ( $n_H$ ) es igual a la pendiente de la recta, la cual se obtiene entre los valores de  $v/V_{MAX}=0.1$  y  $v/V_{MAX}=1.0$ . La  $K_D$  se obtiene por la intersección de a en el eje de las x (Segel, 1975). Los valores se tomaron de la figura 10-A.

#### 4.2. Desplazamiento de la unión de $^3\text{H}$ -glicina.

Con base al perfil farmacológico del RGly de la médula espinal (Young y Snyder, 1973), estudiamos el desplazamiento de la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina (40 nM) por los amino ácidos  $\beta$ -alanina, L-serina, D-serina, taurina y glicina, a una concentración de 1mM y por 200  $\mu\text{M}$  de estricnina.

La unión de  $^3\text{H}$ -glicina fue igualmente desplazada por glicina, L-serina, D-serina y  $\beta$ -alanina, y en menor grado por la taurina; la estricnina desplazó la unión de  $^3\text{H}$ -glicina en un 25% (Tabla II).

Tabla II.- Desplazamiento de la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina de la rata adulta.

Desplazadores		Porcentaje de Desplazamiento
Glicina	1mM	100 $\pm$ 7.5
$\beta$ -alanina	1mM	78 $\pm$ 12.5
L-serina	1mM	105 $\pm$ 0.49
D-serina	1mM	100 $\pm$ 3.0
Taurina	1mM	68 $\pm$ 7.0
Estricnina	200 $\mu$ M	25 $\pm$ 10.0

Las membranas totales se incubaron en presencia de 40 nM de  $^3\text{H}$ -glicina. Los datos son el promedio  $\pm$  error estándar al menos de tres experimentos.

#### 4.3. Efecto de los agentes reductores, DTT y MTSET, y del zinc, en la unión de $^3\text{H}$ -glicina.

Con el objeto de conocer si el RGly en la retina está regulado por las condiciones de óxido-reducción, se estudió el efecto de agentes reductores en la unión específica de glicina a las membranas totales de la retina de la rata adulta. La presencia de los agentes reductores DTT y MTSET no afectó la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina (Fig. 12).

Por otra parte, diferentes estudios muestran que el zinc es un modulador del RGly. En este estudio, el zinc a concentraciones de 1mM causó una disminución del 50% de la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina del organismo adulto (Fig. 12).



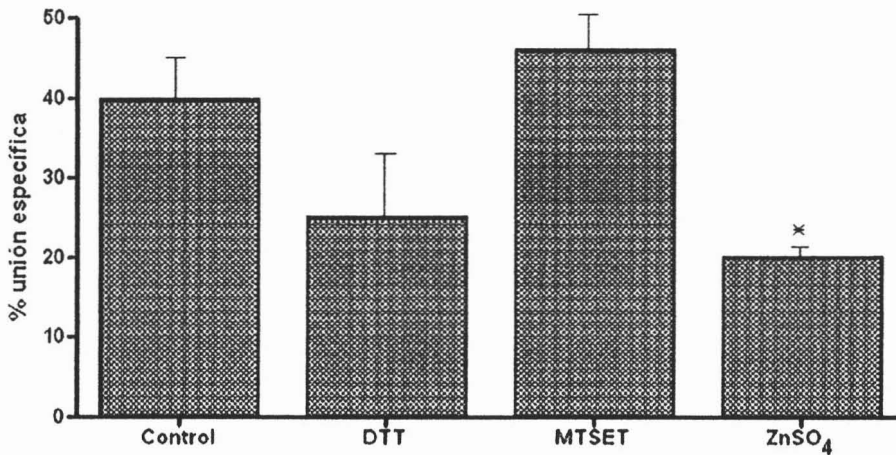


Fig. 12. Las membranas totales de la retina se preincubaron durante 30 minutos en ausencia (control) o la presencia de 1mM de DTT, MTSET ó Zinc, posteriormente la unión específica de <sup>3</sup>H-glicina (40 nM) se determinó como se describió en los métodos. Los datos son el promedio de 3 ó 4 experimentos ± el error estándar. \*( $p < .05$ ; *t student vs control*).

#### 4.4. Unión de <sup>3</sup>H-estricnina a las membranas totales de la retina.

La unión de <sup>3</sup>H-estricnina se estudió en condiciones semejantes a las establecidas para la unión de <sup>3</sup>H-glicina. En estas condiciones la unión específica de <sup>3</sup>H-estricnina representó el  $27 \pm 2.85$  % de la unión total de <sup>3</sup>H-estricnina. La cinética de la unión específica de <sup>3</sup>H-estricnina a concentraciones de 40- 460 nM reveló un sistema saturable. El análisis de Scatchard mostró la existencia de un sitio de unión con una  $K_D = 94.4$  nM y una  $B_{Max} = 3.93$  pmolas/mg de proteína (Fig. 13). El análisis de Hill reveló un  $n_H = 0.5$  y una  $K_D = 71$  nM (Fig. 14) (Segel 1968).

La glicina y los agonistas  $\beta$ -alanina, L-serina, D-serina y taurina, a concentraciones de 1mM no desplazaron la unión de <sup>3</sup>H-estricnina.

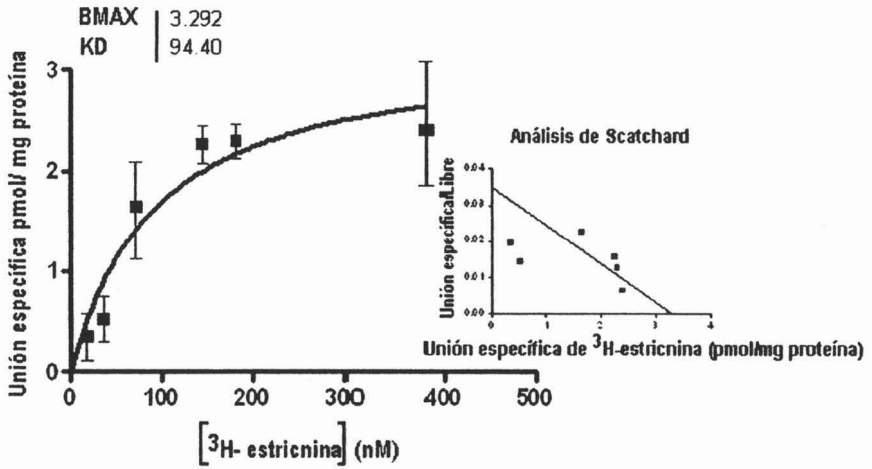


Fig.13. Cinética de unión de  $^3\text{H}$ -estricina en las membranas totales de la retina de la rata adulta. La cinética de unión de  $^3\text{H}$ -estricina resultó ser un proceso saturable y de alta afinidad. El análisis de Scatchard indicó una  $K_D$  de 94.4 nM y una  $B_{\text{MAX}}$  de 3.292. Los valores son el promedio de 4 a 7 experimentos  $\pm$  el error estándar.

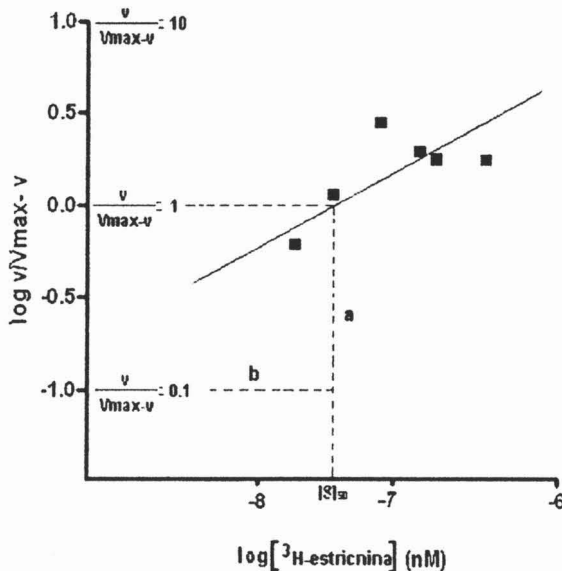


Fig.14. El análisis de Hill en las membranas totales de la retina de la rata mostró un coeficiente de 0.5 y una  $K_D$  de 71 nM.

#### 4.5. Unión de $^3\text{H}$ -glicina a las membranas totales de la retina de la rata durante el desarrollo.

Con el propósito de determinar el establecimiento de las conexiones glicinérgicas en la retina durante el desarrollo, se determinó la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina de la rata de siete y quince días postnatales.

La unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas de la retina de la rata de 7 días de edad (P7) representó el  $50 \pm 6.8 \%$  de la unión total de  $^3\text{H}$ -glicina. La unión de  $^3\text{H}$ -glicina se estudió a concentraciones de 40 a 1000 nM del radioligando. Bajo estas condiciones no se demostró saturación del sistema (Fig. 15). El análisis de Hill indicó un coeficiente de 0.6 y una  $K_D = 18 \text{ nM}$  (Fig. 16).

La estricnina desplazó la unión de 40 nM de  $^3\text{H}$ -glicina en un  $26 \pm 6 \%$  ( $3.145 \pm 0.69 \text{ pmol/mg}$  proteína, control;  $0.89 \pm 0.35 \text{ pmol/mg}$  proteína, en presencia de  $200 \mu\text{M}$  de estricnina).

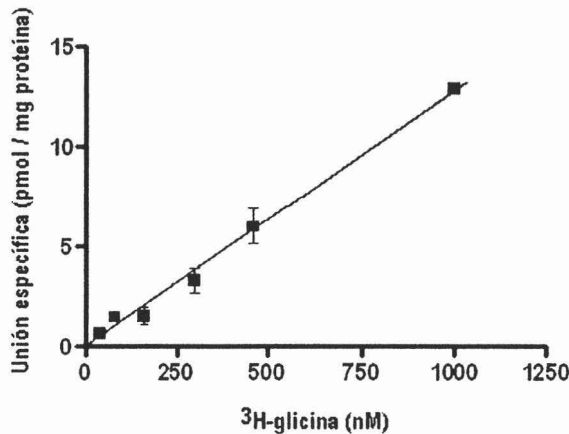


Fig.15. Cinética de la unión de  $^3\text{H}$ -glicina a las membranas totales de la retina de la rata P7. La unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina de la rata P7 no se saturó a las concentraciones empleadas. Los valores son el promedio de 3 a 4 experimentos por duplicado  $\pm$  el error estándar.

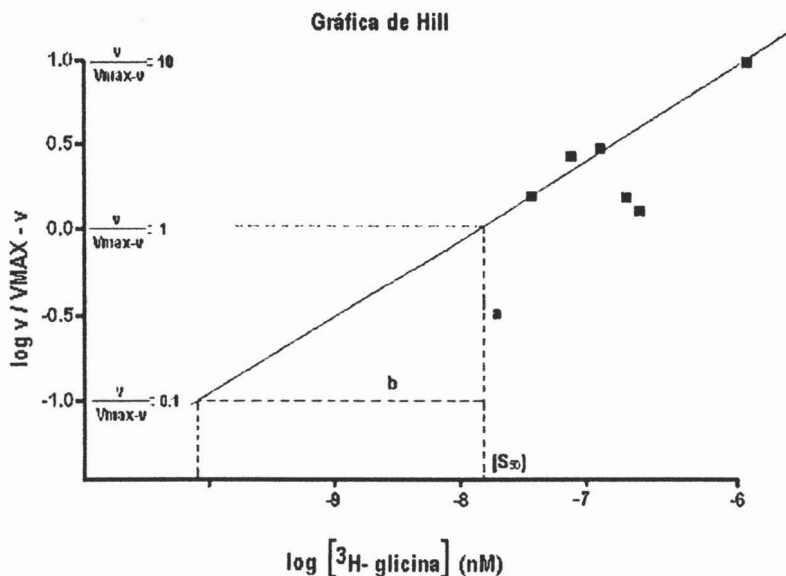


Fig.16. En las membranas totales de la retina de la rata P7 el análisis de Hill indicó un coeficiente de 0.6 y una  $K_D$  de 18 nM. Los datos se tomaron de la figura 15.

En las membranas de la retina de rata de 15 días postnatales (P15), la unión específica de glicina representó el  $40 \pm 4.4\%$  de la unión total de  $^3H$ -glicina. La cinética de la unión de  $^3H$ -glicina se estudió en un intervalo de concentraciones de 80 a 1000 nM. La unión específica de  $^3H$ -glicina presentó una cinética de tipo sigmoide (Fig. 17), y el análisis de Hill reveló un coeficiente de 1.1 y una  $K_D = 80$  nM (Fig. 18).

La unión específica de 80 nM de  $^3H$ -glicina se desplazó en un  $36 \pm 9\%$  por 200  $\mu$ M de estircina.

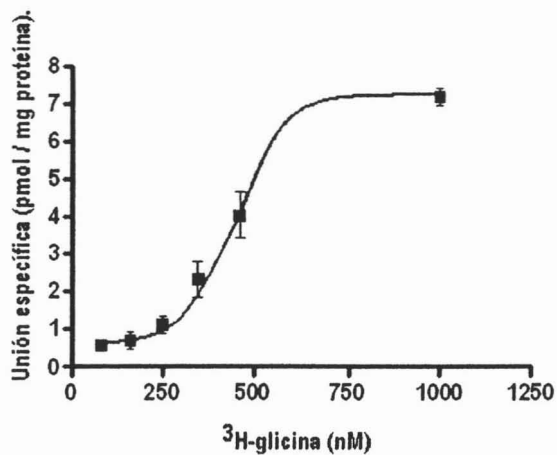


Fig.17. Cinética de la unión de <sup>3</sup>H-glicina a las membranas totales de la retina de la rata P15. Los valores son el promedio de 3 a 5 experimentos por duplicado  $\pm$  el error estándar.

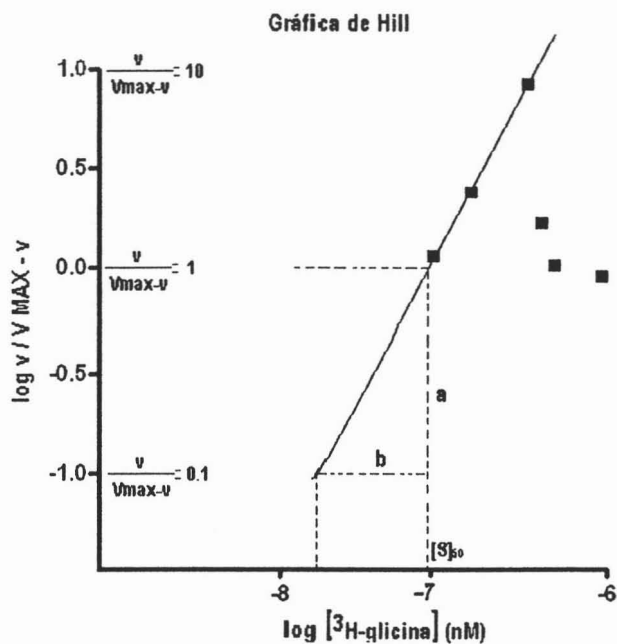


Fig.18. El análisis de Hill en las membranas totales de la retina de la rata P15 reveló un coeficiente de 1.1 y una  $K_D$  de 80 nM. Los datos se tomaron de la figura 17.

## 5. DISCUSIÓN.

Uno de los criterios que se toman en cuenta para poder determinar que una molécula funciona como neurotransmisor, es la presencia de un receptor postsináptico que medie su acción (Werman y Aprison, 1968). En la retina de diferentes vertebrados, estudios inmunocitoquímicos demostraron la presencia del RGly; el mismo tipo de estudios corroboró la presencia de las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\alpha 3$  del RGly en la retina de los mamíferos (Jusuf et al., 2005; Haverkamp, 2004; Haverkamp, 2003; Grünert, 2000). Con el objeto de profundizar en el estudio de la transmisión glicinérgica en la retina, se realizaron estudios preliminares acerca de la caracterización de la unión específica de los radioligandos  $^3\text{H}$ -glicina y  $^3\text{H}$ -estricnina al RGly en la retina de la rata.

La unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina de la rata representó el 60 % de la unión total. Este valor es semejante al que se reportó en otras regiones del SNC, aunque es relativamente bajo comparado con el de las membranas totales y sinaptosomales de la retina de la rana (90%) (Pérez-León, 1994), lo que sugiere que la densidad de receptores en la retina de la rata podría ser menor.

La unión de  $^3\text{H}$ -glicina a las membranas totales de la retina de la rata adulta presentó de manera general las mismas características farmacológicas reportadas para el RGly en la médula espinal y otras regiones del SNC; así, la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina se desplazó por la glicina, la L-serina, la D-serina, la  $\beta$ -alanina, y en menor medida por la taurina. El desplazamiento de la unión de glicina por la D-serina es contradictorio. La D-serina actúa como agonista del sitio de la glicina en el receptor de tipo NMDA en diversos tejidos nerviosos (Katsuki et al., 2004) y no en el RGly. Estos resultados podrían sugerir que al menos una proporción de la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina ocurre en el receptor de glutamato de tipo NMDA, o bien que el RGly en la retina de la rata presenta características farmacológicas diferentes.

La unión de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina de la rata adulta reveló una cinética de unión de tipo sigmoide. En un trabajo anterior, realizado en el laboratorio (Pérez-León, 1994), la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana presentó una cinética de tipo sigmoide, efecto que se logró abatir después de varios pasos de congelación y lavado. En las membranas totales de la retina de la rata, a pesar de que el tejido se congeló y se lavó en repetidas ocasiones, no se pudo eliminar dicho efecto, indicando que el RGly presenta un comportamiento de tipo sigmoide. El análisis de Scatchard mostró una gráfica característica de un

sistema en el que existen al menos dos sitios de unión para el ligando que son cooperativos (Segel, 1975). Este comportamiento implica que la unión al receptor de una segunda molécula de glicina depende de la unión de la primera, lo que quiere decir que la glicina actúa como un activador (Beato et al., 2004). El análisis de Scatchard no pudo determinarse en el programa computacional Graph Pad Prism 4, por lo que los resultados se procesaron manualmente. Una posibilidad de calcular las  $K_D$  es a través de la gráfica de Hill, adicional a la identificación del número de sitios de unión del ligando al receptor (Segel, 1968). El análisis de Hill reveló una  $K_D$  de 112 nM, valor semejante al reportado en otros sistemas glicinérgicos, en donde la  $K_D$  se reportó entre 8 y 800 nM (Kishimoto et al., 1981; Marvizon et al., 1989; Boje et al., 1992; Pérez-León y Salceda, 1995; Aguirre-Ramírez, 2000).

Adicionalmente, la unión específica de  $^3\text{H}$ -estricnina representó el  $27 \pm 2.85\%$  de la unión total. Este valor es menor a la unión específica que se reportó en las membranas sinaptosomales de la retina del bovino (47%) y de la rana (90%) (Borbe et al., 1980; Pérez-León y Salceda, 1995). La unión específica de  $^3\text{H}$ -estricnina se desplazó únicamente por estricnina. Cabe mencionar, que en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana, la única molécula capaz de desplazar significativamente la unión de  $^3\text{H}$ -estricnina, fue su análogo estructural, la  $2\text{NH}_2$ -estricnina (Pérez-León y Salceda, 1995). Estos resultados podrían sugerir nuevamente un número menor de receptores en la retina de la rata.

La cinética de unión de  $^3\text{H}$ -estricnina resultó ser un proceso saturable y de alta afinidad. El análisis de Scatchard y el análisis de Hill indicaron la presencia de un sitio con una  $K_D = 94.4$  nM y 71 nM, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo a lo que se reportó en la médula espinal y en otras regiones del SNC (Young y Snyder, 1973; Schaeffer y Anderson, 1980; Borbe et al., 1981; Pérez-León y Salceda, 1995; Aguirre-Ramírez, 2000). Asimismo, el número de sitios de unión ( $B_{\text{MAX}}$ ) es similar al observado en los sinaptosomas de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda, 1995) aunque es 10 veces menor al valor reportado en la médula espinal (Young y Snyder, 1973).

Algunos estudios han demostrado que la formación de uniones disulfuro, en el dominio amino terminal del RGly, que posee dos cisteínas altamente conservadas, Cys-198-Cys-209, es importante para la unión de sus ligandos. La sustitución de estas cisteínas por serina, causó la inhibición de la unión de estricnina y de la corriente producida por los agonistas del RGly (Rajendra et al., 1995). Adicionalmente, en las membranas totales de la médula espinal de la rata, se reportó que la utilización de agentes químicos capaces de reducir los grupos S-S, tales como el DTT y el glutatión,

así como el agente alquilante N- etilmaleimida (NEM), causaron una disminución de la unión de  $^3\text{H}$ -estricnina al RGly; efecto que no se observó cuando las membranas se preincubaron con los agonistas del RGly (glicina y  $\beta$ -alanina) (Ruiz-Gómez *et al.*, 1991). En nuestro estudio la incubación de las membranas totales de la retina de la rata con los agentes reductores DTT y MTSET, no tuvieron ningún efecto en la unión de  $^3\text{H}$ -glicina. Esto podría deberse a que la concentración empleada (1mM), no fue suficiente para reducir los grupos thiol de los RGly, ya que en las membranas totales de la médula espinal de la rata la concentración que se utilizó fue de 5 mM (Ruiz-Gómez *et al.*, 1991),

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que bajas concentraciones de zinc, menores de 10  $\mu\text{M}$ , potencian las corrientes producidas por glicina, aparentemente por el incremento en la afinidad de ésta por su receptor; por el contrario, altas concentraciones de zinc (0.01-1 mM), inhiben la corriente producida por glicina. Este patrón de acción del zinc ha sido observado en receptores nativos, así como en RGly recombinantes de las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 1\beta$  (Laube *et al.*, 1995). Asimismo, Simon (1993) demostró una inhibición total de la corriente producida por glicina en RGly nativos, mientras que la corriente producida por glicina en RGly formados por la subunidad  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , expresados en la línea celular HEK-239 se inhibió en un  $55\pm 5\%$  (De Saint *et al.*, 2001), lo que sugiere que las distintas isoformas pudieran tener diferente sensibilidad al zinc. De acuerdo a estos resultados en la retina de la rata la inhibición del 50% en la unión de glicina a su receptor causada por  $\text{Zn}^{2+}$ , pudiera sugerir la presencia de receptores formados por las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ .

El RGly media la neurotransmisión glicinérgica, por lo que estudiamos la presencia del RGly durante el desarrollo de la retina de la rata. La retina de la rata se desarrolla postnatalmente, por lo que resulta un modelo adecuado para este estudio.

La unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina de la rata de P7 y P15 representó el 50 y 40 %, respectivamente. Aunque la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina de la rata P7 no se saturó a las concentraciones empleadas el análisis de Hill reveló una  $K_D$  similar a la reportada para el RGly en otras regiones del SNC incluyendo la retina de la rana ( $K_D$  de 8-800 nM) (Kishimoto *et al.*, 1981; Marvizon *et al.*, 1989; Boje *et al.*, 1992; Pérez-León y Salceda, 1995; Aguirre-Ramírez, 2000). Estos resultados podrían sugerir la presencia de un gran número de sitios de unión del ligando.

La cinética de unión de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas de la retina de la rata P15 presentó, características cinéticas semejantes a las observadas en el adulto. Estos resultados indican la



presencia del RGly en etapas tempranas del desarrollo de la retina, previas a la formación de sinapsis. En la rata, durante las dos primeras semanas postnatales, la capa plexiforme interna de la retina aumenta continuamente en grosor, aunque las primeras sinapsis aparecen a los 11 días postnatales y la mayoría de éstas se forman entre los 12 y 14 (Fletcher y Kalloniatis, 1997). La retina se desarrolla completamente y es morfológicamente comparable a la del adulto alrededor de los 30 días. De acuerdo a estos resultados Fletcher y Kalloniatis (1997) demostraron con estudios inmonucitoquímicos la presencia de glicina en la retina de la rata durante las dos primeras semanas postnatales. Estos autores sugieren que la glicina actúa como factor trófico en los primeros días postnatales y posteriormente como neurotransmisor.

Nuestros resultados indican la presencia del RGly, en la retina de la rata, con características farmacológicas semejantes a las reportadas en otras regiones del SNC. Asimismo, la presencia del RGly previa a la formación de las sinapsis, apoya la hipótesis de que la glicina puede funcionar como factor trófico en etapas tempranas del desarrollo y posteriormente como neurotransmisor.

## 6. CONCLUSIONES

1. La temperatura óptima de la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en las membranas totales de la retina de la rata fue a  $25^\circ\text{C}$ .
2. La cinética de tipo sigmoide que se encontró para la unión específica de  $^3\text{H}$ -glicina en la retina de la rata adulta y de quince días postnatales, indica la presencia de un sistema de unión del radioligando de tipo cooperativo.
3. Nuestros resultados indican la presencia del RGly, en la retina de la rata, con características farmacológicas semejantes a las reportadas en otras regiones del SNC.
4. Los agentes reductores DTT y MTSET no tuvieron efecto en la unión de  $^3\text{H}$ -glicina en la retina adulta.
5. El RGly en la retina de la rata, al igual que en la médula espinal, es modulado por  $\text{Zn}^{2+}$ .
6. En la retina, se demostró la presencia del RGly previa a la formación de las sinapsis.

## REFERENCIAS.

- Aguirre-Ramírez, M. Caracterización del receptor postsináptico de glicina en la retina de la rana: Posible modulación por proteínas cinasas. Tesis de Licenciatura, UNAM., 1994.
- Aprison, M. H. The Discovery of the Neurotransmitter Role of Glycine. En: Ottersen, O.P. y J. Storm-Mathisen (Eds.), Glycine neurotransmission, John Wiley & Sons, New York. pp: 1-24, 1990.
- Aprison, M.H. y Werman, R. A combined neurochemical and neurophysiological approach to identification of central nervous system transmitters. *Neurosci Res.* 1 (0):143-74, 1968.
- Beato, M., Groot-Kormelink, P.J., Colquhoun, D., Sivilotti, L.G. The activation mechanism of alpha1 homomeric glycine receptors. *J Neurosci.* 24(4):895-906, 2004.
- Bednar, B., Cunningham, M.E., Kiss, L., Cheng G., McCauley J.,A., Liverton N. J. y Koblan K. S. Kinetic characterization of novel NR2B antagonists using fluorescence detection of calcium flux. *J Neurosci Methods.* 30; 137(2):247-55, 2004.
- Borbe, O. H., Muller E. W. y Wollert, U. Specific [<sup>3</sup>H]Strychnine Binding Associated with Glycine Receptors in Bovine Retina. *Brain Res.* 205: 131-139, 1981.
- Brandstatter J. H., y Wassle H. P.K. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* 38 1385–1397, 1997.
- Daly, E.C. The biochemistry of glycinergic neurons. En: Ottersen, O.P. y J. Storm-Mathisen (Eds.) Glycine neurotransmission, John Wiley & Sons, New York, pp: 25-66, 1990.
- De Saint Jan, D., David-Watine, B., Korn, H. and Bregestovski, P. Activation of human  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  homomeric glycine receptors by taurine and GABA. *J of Physiology.* 535.3: 741–755, 2001.
- Díaz-Cintra, S. Los receptores sensoriales. En: UNAM (Eds.) Neurobiología de los sistemas sensoriales, pp: 3-22, 1995.
- Dowling, J. E. *Neurons and Networks. An introduction to neuroscience.* Harvard University Press, Cambridge England, pp. 407, 1992.
- Fletcher, E.L. y Kalloniatis, M. Localisation of Amino Acid Neurotransmitters During Postnatal Development of the Rat Retina. *The J of Comp Neurol.* 380:449–471, 1997.
- García-López, M. Transportadores axolemales para la captación de neurotransmisores. *Rev Neurol.* 29: 1056-63, 1999.
- Goebel, D. J. Quantitative gene expression of two types of glycine transporter in the rat central nervous system. *Mol Brain Res.* 40: 139-142, 1996.

Griffon, N., Buttner, C., Nicke, A., Khuse, J., Schmalzing, G. y Betz, H. Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *The EMBO J.* 18(17): 4711-4721, 1999.

Grünert, U. Distribution of GABA and Glycine Receptors on Bipolar and Ganglion Cells in the Mammalian Retina. *Microscopy Research and Technique.* 50:130-140, 2000.

Harris, A.R., Lobo, A. I. y James, R. Cross-linking of glycine receptor transmembrane segments two and three alters coupling of ligand binding with channel opening. *J Neurochem.* 90: 962-969, 2004.

Harvey, R.J., Schmieden, V., Von Holst, A., Laube, B., Rohrer, H., y Betz, H. Glycine receptors containing the  $\alpha 4$  subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci.* 12: 994-1001, 2000.

Horsburgh, G. M. y Sefton, A. J. Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat. *J Comp Neurol.* 263: 553-566, 1987.

Jacobson, M. Developmental neurobiology. New York: Plenum Press.1991.

Jusuf, P.R., Haverkamp, S. y Grünert, U. Localization of Glycine Receptor Alpha Subunits on Bipolar and Amacrine Cells in Primate Retina. *J of Comp Neurol.* 488:113-128, 2005.

Kalloniatis, M. y Tomisich, G. Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* 18(6):811-66, 1999.

Kandel, E. Schwartz, J., Jessel, T. Principios de neurociencia. Mc Graw-Hill Interamericana España, 2001.

Katsuki, H., Nonaka, M., Shirakawa, H., Kume, T., Akaike, A. Endogenous D-serine is involved in induction of neuronal death by N-methyl-D-aspartate and simulated ischemia in rat cerebrocortical slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 311(2):836-44, 2004.

Kuhse, J., Schmieden, V., Betz, H. Identification and functional expression of a novel ligand binding subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem.* Dec 25; 265(36):22317-20, 1990.

Kishimoto, H., Simon, J. R., y Aprison, M. H. Determination of the equilibrium dissociation constants and number of glycine binding sites in several areas of the rat central nervous system, using a Na<sup>+</sup> independent system. *J. Neurochem.* 37: 1015-1024, 1981.

Laube, B., Manse, G., Schemm, R., Betz, H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci.* 23(11):519-27, 2002.

Laube, B., Kuhse, J., Rundstrom, N., Kirsch, J., Schmieden, V., Betz, H. Modulation by zinc ions of native rat and recombinant human inhibitory glycine receptors. *J Physiol.* 15; 483 (Pt 3):613-9, 1995.

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

López-Corcuera, B., Martínez-Maza, R., Núñez, E., Roux, M., Supplisson, S., y Aragon, C. Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters. *J Neurochem.* 71: 2211-2219, 1998.

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

Maslim, J. y Stone, J. Synaptogenesis in the retina of the cat. *Brain Res.* 373: 35-48, 1986.

Matzenbach, B., Maulet, Y., Sefton, L., Courtier, B., Avner, P., Guénet, J. L. y Betz, H. Structural Analysis of Mouse Glycine Receptor  $\alpha$  subunit Genes. *The J of Biol Chem.* 269 (4): 2607-2612, 1994.

Nishimura, Y. y Rakic, P. Development of the Rhesus monkey retina. I. Emergence of the inner plexiform layer and its synapses. *J Comp Neurol.* 241: 420-434, 1985.

Nishimura, Y. y Rakic, P. Development of the Rhesus monkey retina. II. A three-dimensional analysis of the sequences of synaptic combinations in the inner plexiform layer. *J Comp Neurol.* 262: 290-313, 1987.

Pérez-León, J. A., Lopez-Vera, E. y Salceda, R. Pharmacological properties of glycine transport in the frog retina. *Neurochem Res.* 29(1):313-8, 2004.

Pérez-León, J. A. y Salceda, R. Immunohistochemical localization of the glycine receptor in synaptic layers and glial cells of the retina. *Sensory Neuron.* 3 (2): 71-81, 2000.

Pérez-León, J. A. y Salceda, R. La Neurotransmisión glicinérgica en la retina de los vertebrados. *BEB.* 16 (4): 140-146, 1997.

Pérez-León y Salceda, R. El receptor post-sináptico de glicina. *Ciencia.* 47: 177-189, 1996.

Pérez-León, J. A. y Salceda, R. Different specific binding sites of [3H] glycine and [3H] strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina. *Neurochem Res.* 20 (8):915-22, 1995.

Pérez-León, J. A. Caracterización de la unión de 3H-glicina y 3H-estricnina a las membranas sinaptosomales de la retina de la rana. Tesis de Maestría en investigación Biomédica básica, UNAM., 1994.

Pourcho, G y Goebel, J. Autoradiographic and Immunocytochemical Studies of Glycine-containing Neurons in the Retina. En: Ottersen, O.P. y J. Storm-Mathisen (Eds.) Glycine neurotransmission, John Wiley & Sons, New York, pp: 25-66, 1990.

Rajendra, S., Vandenberg, R.J., Pierce, K.D., Cunningham, A.M., French, P.W., Barry, P.H., Schofield, P.R. The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element. *EMBO J.* 14(13):2987-98, 1995.

Ruiz-Gómez, A., Fernández-Shaw, C., Morato, E., Marvizón, J. G., Vázquez, J., Valdivieso, F. y Mayor, F. Sulfhydryl Groups Modulate the Allosteric Interaction Between Glycine Binding Sites at the Inhibitory Glycine Receptor. *J Neurochem.* 56(5):1690-7, 1991.

Sassoe-Pognetto, M. y Wassle, H. Synaptogenesis in the Rat Retina: Subcellular Localization of Glycine Receptors, GABA<sub>A</sub> Receptors, and the Anchoring Protein Gephyrin. *The J of Comp Neurol.* 381: 158-174, 1997.

Salceda, R. Diferenciación de la Retina de los Vertebrados: Mecanismos Celulares y Moleculares. *Rev Soc Mex Hist Net* 48: 115-124, 1998.

Salceda, R. Transducción visual: proteínas implicadas y su importancia en la función retiniana. En: UNAM (Eds.) Neurobiología de los sistemas sensoriales, pp: 65-80, 1995.

Salceda, R. 45Ca uptake by retinas pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30 (10):2114-7, 1989.

Segel, H., I. ENZYME KINETICS Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. En: A WILEY-INTERSCIENCE PUBLICATION, John Wiley & Sons, New York, 1968.

Segel, H., I. ENZYME KINETICS Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. En: A WILEY-INTERSCIENCE PUBLICATION, John Wiley & Sons, New York, 1975.

Schaeffer, M. J. y Anderson, M. S. Identification of Strychnine Binding Sites in the Rat Retina. *J of Neurochem.* 36 (4) 1597-1600.

Sola, M., Bavro, V., Timmins, J., Franz, T., Blum, S., Schoehn, G., Ruigrok R., Paarmann, I., Saiyed, T., O'Sullivan G., Schmitt, B., Betz, H. y Weissenhorn, W. Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *The EMBO J.* 23: 2510-2519, 2004.

Vitanova, L., Haverkamp, S., y Wassle, H. Immunocytochemical localization of glycine and glycine receptors in the retina of the frog *Rana ridibunda*. *Cell Tissue Res.* 317: 227-235, 2004.

Wassle, H. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci.* 5(10):747-57, 2004.

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

Young, A.B., Snyder, S.H. Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A;* 70(10):2832-6, 1973.

Zafra, F., Aragón, C. y Gómez, C. Molecular Biology of Glycinergic Neurotransmission. *Mol Neurobiol.* 14: 117-141, 1997.