



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTE DE
GLICINA EN EL EPITELIO PIGMENTADO DE LA
RETINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ROCÍO

AGUILAR

FERNÁNDEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ
2009**



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.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de Cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno Aguilar Fernández Rocío 55 14 81 53 40 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 300500774</p>
<p>2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor Dra. Ana María López Colomé</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. Rocío Salceda Sacanelles</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. María Luisa Fanjul Peña</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3 Dr. Julio Eduardo Morán Andrade</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. Bertha Molina Alvarez</p>
<p>3. Datos del trabajo escrito Título Subtítulo Número de páginas Año</p>	<p>3. Datos del trabajo escrito Caracterización del transporte de glicina en el epitelio pigmentado de la retina 54 p 2009</p>

Esta tesis se llevó a cabo en el departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé.

Este trabajo fue parcialmente financiado por los donativos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto CV80398), y por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN200209).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María López Colomé por su apoyo y guía en la elaboración de esta tesis, así como por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, a la Dra. María Luisa Fanjul Peña, al Dr. Julio Morán Andrade y a la M. en C. Berta Molina Alvarez por sus valiosos comentarios y correcciones.

Al M. en C. José Prisco Palma Nicolás por sus sugerencias y enseñanzas en el desarrollo experimental de esta tesis.

A la Q. F. B. Edith López Hernández por su excelente apoyo técnico.

A Alejandro Parrales y Ariadna Ruiz, mis compañeros de laboratorio, quienes generosamente me brindaron su amistad y compañía desde que comencé a trabajar en el Instituto.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	
La retina de los vertebrados	4
El epitelio pigmentado de la retina	8
Los receptores de glutamato	12
Efecto del glutamato sobre el EPR	16
Los transportadores de neurotransmisores	18
Los transportadores de glicina	19
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cultivo de epitelio pigmentado de la retina de rata	28
Ensayo de transporte de glicina	28
Extracción de RNA total	29
Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa	30
Electroforesis en gel de agarosa	31
RESULTADOS	
I. Caracterización bioquímica del transporte de glicina	
Curva temporal	32
Dependencia del pH	33
Dependencia de energía	33
Curva de saturación	34
Dependencia iónica	35
Caracterización farmacológica del transportador	36
II. Identificación molecular de las isoformas de los transportadores de glicina	
Expresión del mGlyT1 en el EPR	38
Expresión del mGlyT2 en el EPR	39
DISCUSIÓN	41
REFERENCIAS	45

ABREVIATURAS

AC	adenilil ciclasa
AcAIB	N-acetilaminoisobutirato
AIB	aminoisobutirato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazolepropionico
AMPc	3'5'-adenosín monofosfato cíclico
b-FGF	factor de crecimiento fibroblástico básico
CAMKII	proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina
DAG	diacilglicerol
DNP	dinitrofenol
EPR	epitelio pigmentado de la retina
ERK 1/2	quinasas de proteína reguladas por señales extracelulares 1 y 2
GABA	ácido γ -aminobutírico
GlyR	receptores de glicina sensibles a estrictina
GlyT	transportador de glicina (familia SLC6)
GMPc	guanosín 3',5-monofosfato cíclico
iGluR	receptores ionotrópicos de glutamato
IP₃	inositol-1,4,5-trifosfato
KA	ácido kaínico
KRB	Krebs Ringer bicarbonato
L-AP4	el L-2-amino-4-fosfonobutilato
L-CCG-1	(2S,1'S,2'S)-2-(carboxiciclopropi) glicina
LeuT_{Aa}	transportador de leucina de <i>Aquifex aeolicus</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	receptor de tipo NMDA
MeAIB	metilaminoisobutirato
mGluR	receptores metabotrópicos de glutamato
MK801	5-metil-10,11-dehidro-5H-diibenzo-ciclohepten-5,10-imina
PIP₂	L-3-fosfatidilmioinositol-4,5-bifosfato
PKC	proteína cinasa C

PLC	fosfolipasa C
PMA	forbol 12-miristato-13-acetato
SNC	sistema nervioso central
TM	dominios transmembranales
VRP	vitreo-retinopatía proliferativa

RESUMEN

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) es un tejido monoestratificado que se localiza entre la retina neural y los capilares sanguíneos de la coroides. Está diferenciado en un epitelio secretor, cuyas funciones son esenciales para mantener la viabilidad y función de la retina neural. En ciertas enfermedades proliferativas, asociadas con la pérdida de la visión, las células del EPR sufren cambios importantes que las llevan a migrar y desdiferenciarse. Se ha observado que el glutamato, el principal neurotransmisor en la retina neural, puede inducir estos cambios, probablemente mediante la activación de los receptores tanto de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) como metabotrópicos. Dado que la glicina es un agonista obligado del glutamato en los receptores de NMDA, la alteración de su transporte podría modular los efectos del glutamato sobre el EPR. El objetivo de este trabajo fue caracterizar bioquímica, cinética y farmacológicamente el transporte de glicina en cultivos de EPR de rata, así como identificar los transportadores específicos de glicina que se expresan en el EPR. Los resultados demuestran, por primera vez, que las células de EPR de rata expresan transportadores de glicina, cuya actividad depende de energía y es sensible a los cambios de pH en el medio. El análisis cinético de la curva de saturación reveló que existen dos componentes en el transporte: uno de alta y uno de baja afinidad. Ambos sistemas dependen del sodio extracelular, y el de alta afinidad también depende de cloro. La actividad del transportador de alta afinidad se inhibe por sarcosina, un derivado de la glicina que inhibe competitivamente a GlyT1. Por medio de la técnica de RT-PCR se identificó a GlyT1a como la isoforma del transportador que se expresa en estas células.

INTRODUCCIÓN

La Retina de los Vertebrados

La retina, localizada en el fondo del globo ocular, es el tejido nervioso especializado donde ocurren los primeros pasos del proceso visual. Su función es transducir los estímulos luminosos en señales eléctricas que serán enviadas a centros superiores de integración a través del nervio óptico (Tessier-Lavigne, 2000).

La retina, a diferencia de otros órganos sensoriales periféricos, forma parte del Sistema Nervioso Central (SNC). Durante el desarrollo, la vesícula óptica, formada a partir del diencefalo, sufre un proceso de invaginación que da lugar a una estructura denominada copa óptica. La hoja interna de la copa óptica se desarrolla en la retina neural, mientras que la hoja externa se diferencia en el epitelio pigmentado (Purves *et al.*, 1997).

La retina de los vertebrados es un tejido formado por cinco grandes grupos de neuronas: fotorreceptores, células bipolares, células ganglionares, células horizontales y células amacrinas; así como dos tipos de células gliales: glía de Müller y astrocitos (Tessier-Lavigne, 2000). Estas células se organizan en capas: la de los fotorreceptores, la nuclear externa, la plexiforme externa, la nuclear interna, la plexiforme interna y la ganglionar. Los cuerpos neuronales en la retina se localizan en tres estratos: la capa nuclear externa, la capa nuclear interna y la capa de las células ganglionares (Tessier-Lavigne, 2000; Figura I).

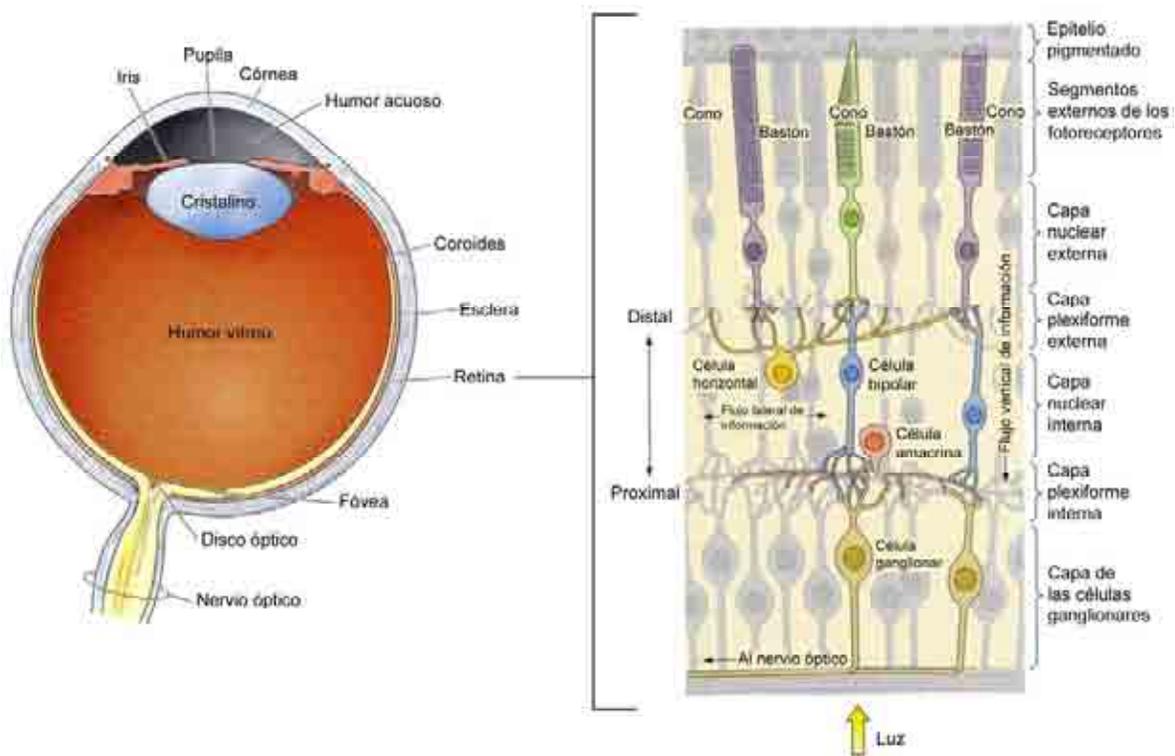


Figura I. Localización y estructura de la retina. La retina se ubica en la parte posterior del ojo y está formada por cinco grupos de neuronas que se organizan en estratos (Modificado de Purves *et al*, 1997).

Los fotorreceptores (conos y bastones) se localizan frente al epitelio pigmentado y constituyen la parte más distal del tejido. Los conos y bastones están formados por un segmento externo donde se localiza el fotorreceptor, un segmento interno donde se localiza el núcleo y la maquinaria biosintética, y una terminal sináptica. Cuando la luz incide en el fotorreceptor, se desencadena una serie de reacciones que tendrán como consecuencia cambios en la liberación de neurotransmisores de la terminal sináptica. Los fotorreceptores hacen contacto directo con las células bipolares y éstas con las ganglionares, constituyendo la vía vertical de neurotransmisión. Las células horizontales y amacrinas median los contactos laterales en las capas plexiforme externa y plexiforme interna, respectivamente. Los axones de las células ganglionares se unen para formar el nervio óptico que transmite la información visual hasta centros de integración cerebrales (Tessier-Lavigne, 2000).

El proceso visual comienza cuando la luz se enfoca en la cornea y las lentes del ojo, atraviesa el humor vítreo y llega hasta la retina. En la retina de los vertebrados, la luz atraviesa todas las capas neuronales hasta llegar a los segmentos externos de los fotorreceptores; los axones de estas neuronas no están mielinizados, lo que evita la absorción de luz y la distorsión de la imagen (Tessier-Lavigne, 2000).

La fototransducción es el resultado de una cascada de eventos bioquímicos que ocurren en los fotorreceptores como consecuencia de un estímulo luminoso. La absorción de la luz produce cambios en los flujos iónicos de la célula y por lo tanto en el potencial de membrana. Es posible separar el evento de fototransducción en tres etapas: 1) la luz que llega a la retina activa los pigmentos visuales; 2) la activación de los fotopigmentos provoca una reducción de la concentración citoplasmática de guanosín 3',5-monofosfato cíclico (GMPc); 3) la reducción de la concentración intracelular de GMPc provoca el cierre de canales iónicos, por lo que la célula se hiperpolariza (Tessier-Lavigne, 2000).

En la oscuridad, la membrana de los fotorreceptores está despolarizada. El estímulo luminoso provoca la hiperpolarización de su membrana, de modo que el nivel del neurotransmisor liberado se reduce. La despolarización de los fotorreceptores en la oscuridad se debe a la presencia de canales iónicos membranales que permiten el paso de los cationes sodio, calcio y magnesio. La probabilidad de que estos canales se abran o cierren está regulada por los niveles de GMPc. En condiciones de iluminación, la concentración de GMPc baja y los canales catiónicos regulados por GMPc se cierran, esto provoca la hiperpolarización del receptor. El fotopigmento en los discos del receptor contiene 11-*cis*-retinal acoplado a una proteína, la opsina. Los diferentes componentes proteicos del fotopigmento en los conos y bastones contribuyen críticamente a la especialización funcional de los dos tipos de receptores. El fotopigmento de los bastones es la rodopsina, cuya conformación cambia por la incidencia de un fotón, lo que induce la activación de la transducina, una proteína G que actúa como

mensajero intracelular, que a su vez activa a la fosfodiesterasa que hidroliza el GMPc. La transducina tiene actividad de GTPasa por lo que se autorregula. La disminución de GMPc provoca el cierre de canales iónicos y la hiperpolarización de la célula. Esta cascada genera la amplificación de la señal inicial. Se ha estimado que la absorción de un sólo fotón puede cerrar hasta 300 canales iónicos, equivalentes al 3% de los canales que permanecen abiertos en un bastón en la oscuridad (Purves *et al.*, 1997).

El campo receptivo es el área de la retina controlada por las células ganglionares. Tiene forma circular y en él se pueden localizar dos regiones: un centro receptivo y el halo circundante. Se han identificado dos clases de células ganglionares con base en su respuesta ante estímulos luminosos. Las células ganglionares de centro-ON se excitan cuando la luz se dirige al centro del campo receptivo y se inhiben si se dirige hacia el anillo circundante. Por el contrario, las células ganglionares de centro-OFF se inhiben si la luz se dirige al centro y se excitan si se dirige hacia el área circundante. Ambos tipos de células ganglionares establecen vías paralelas de transmisión de la información, siendo importantes en la percepción del contraste. Las células ganglionares están interconectadas con células bipolares de tipo ON y OFF correspondientes (Tessier-Lavigne, 2000).

La vía vertical de los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las células ganglionares es excitadora, y está modulada en sentido lateral por dos tipos de interneuronas inhibitorias: las células horizontales y las células amacrinas (López-Colomé y Murbartián, 1994). En la retina, la neurotransmisión excitadora está mediada por glutamato y/o aspartato, mientras que los principales neurotransmisores inhibitorios son el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina (Copenhagen, 1991).

Las células de la glía radial de Müller poseen largas extensiones citoplasmáticas que se extienden en todos los estratos de la retina, desde la membrana limitante interna hasta los fotorreceptores; sus núcleos están localizados en la capa nuclear

interna (Schwartz, 1993). Al igual que las neuronas de la vía vertical de la retina, las células de Müller expresan receptores funcionales ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato, acoplados a la activación de vías intracelulares de señalamiento que controlan tanto la actividad de los transportadores membranales, como su expresión génica (López-Colomé *et al.*, 1993a). Adicionalmente, se ha demostrado que en condiciones fisiológicas específicas, estas células liberan glutamato y pueden contribuir al efecto excitotóxico del mismo en la retina (Szatkowski *et al.*, 1990).

El Epitelio Pigmentado de la Retina

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) es un tejido monoestratificado que se localiza entre la retina neural y los capilares sanguíneos de la coroides. A pesar de que tiene el mismo origen embrionario que la retina, está diferenciado en un epitelio secretor. Se observa como un mosaico en el que las células tienen forma poligonal. Éstas pueden variar en tamaño, con un diámetro de aproximadamente 10 a 14 μm las que se localizan en la región macular, y hasta de 60 μm aquellas situadas en la periferia (Marmor, 1998).

Las células del EPR están polarizadas, morfológica y funcionalmente, en una región apical y una basolateral. La membrana apical tiene numerosas microvellosidades que se extienden y envuelven parcialmente a los segmentos externos de los fotorreceptores. El citoplasma apical contiene microfilamentos y microtúbulos y la mayor cantidad de gránulos de melanina. La membrana basal presenta pequeñas microvellocidades que incrementan el área de absorción y secreción; en ella se localizan las integrinas responsables de la adhesión del EPR a la membrana de Bruch¹. El citoplasma en la porción media de la célula contiene el núcleo, y la maquinaria sintética, así como una fracción considerable de vesículas lisosomales (Marmor, 1998; Figura II).

¹ La membrana de Bruch es una capa de tejido conectivo que separa al EPR del endotelio de los capilares sanguíneos de la coroides (Strauss, 2005; Ehrlich *et al.*, 2008).

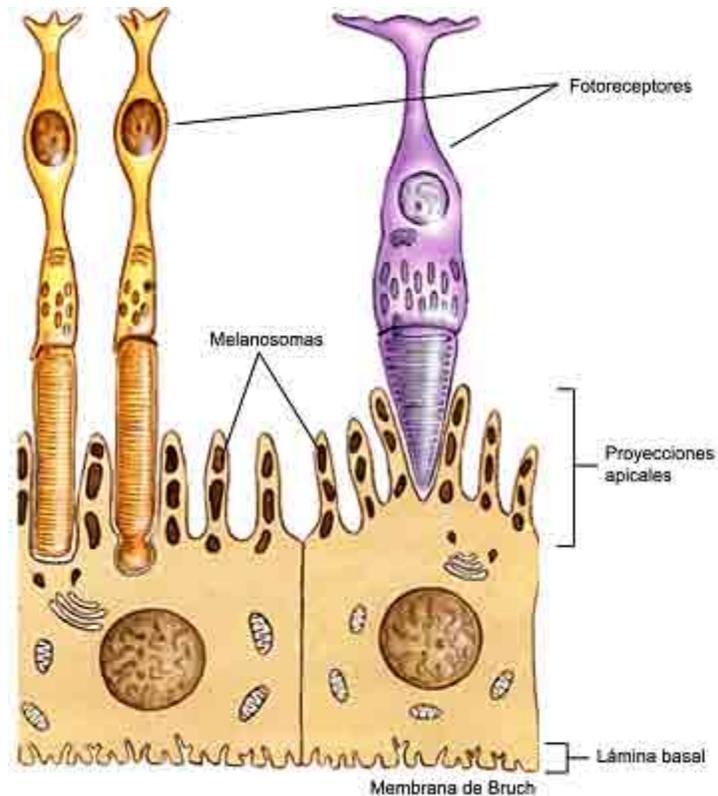


Figura II. Estructura del epitelio pigmentado de la retina. Las células del EPR están polarizadas en una región apical y una basolateral. La membrana apical tiene microvellosidades que se extienden y envuelven parcialmente a los segmentos externos de los fotorreceptores.

El EPR es esencial para mantener la viabilidad y función de la retina neural, por lo que desempeña diversas funciones que se enlistan a continuación:

1. Absorbe la luz excedente y protege a la retina neural del daño oxidativo.

En el EPR, el principal pigmento responsable de la absorción de luz es la melanina, que confiere un color oscuro al epitelio (Strauss, 2005). La melanina capta la luz no absorbida por los fotorreceptores, previniendo que se refleje desde la parte posterior del ojo y altere la calidad de la visión. Además, los gránulos de melanina o melanosomas sirven como un estabilizador de radicales libres y capturan una gran diversidad de toxinas (Marmor, 1998; Strauss, 2005).

Según Strauss (2005) los fotorreceptores y la melanina del EPR absorben el 60% de la luz que incide en el ojo, por lo que sugiere la existencia de otros pigmentos aún no descritos. La lipofuscina, un compuesto que se deposita de manera acumulativa en el epitelio pigmentado, podría tener esta función. Se piensa que se origina a partir de la ingestión de segmentos lipídicos procedentes de células que han sufrido daño oxidativo en su membrana plasmática (Marmor, 1998) y se ha reportado que con la edad, su acumulación en el EPR puede alcanzar niveles tóxicos para el tejido (Strauss, 2005).

El EPR también previene la fotooxidación de la retina mediante la producción de antioxidantes. En el epitelio se sintetizan las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, además se acumulan antioxidantes no enzimáticos como carotenoides, ascorbato y α -tocoferol (Strauss, 2005).

2. Participa en el ciclo visual.

El EPR provee a los fotorreceptores de los pigmentos necesarios para la transducción de la luz. Durante la fotorrecepción, el 11-*cis*-retinal contenido en conos y bastones se isomeriza a all-*trans*-retinol (vitamina A). Para recuperar la forma funcional del pigmento, la vitamina A se transporta al EPR, donde ocurre una reisomerización del 11-*cis*-retinal a su forma all-*trans*-retinol. Posteriormente, el retinol se transporta de nuevo a los fotoreceptores, con lo que se completa el ciclo. En la isomerización del retinol interviene la proteína RPE65, considerada un marcador bioquímico de las células de EPR (Strauss, 2005).

Adicionalmente, el EPR interviene en la recuperación del pigmento visual, debido a que transporta vitamina A desde el torrente sanguíneo y la incorpora al ciclo visual (Strauss, 2005).

3. Fagocita a los segmentos externos de los fotorreceptores.

Los segmentos externos de los fotorreceptores están expuestos a luz radiante y a un ambiente rico en oxígeno. Estos factores promueven la producción de radicales libres y la consecuente fotooxidación. Es por esto que las membranas de los fotorreceptores deben regenerarse constantemente (Marmor, 1998). El EPR fagocita y digiere los discos desechados, reciclando algunas sustancias como la vitamina A (Strauss, 2005).

4. Transporta moléculas entre la retina neural y la coroides, además de controlar el ambiente del espacio subretiniano.

El EPR, junto con la membrana de Bruch y las células de Müller, forma la barrera hematorretiniana (Cunha-Vaz, 1997; Strauss, 2005). Las uniones estrechas del epitelio pigmentado impiden el paso libre de moléculas desde la circulación hasta la retina neural (Marmor, 1998). El EPR transporta agua, iones y productos metabólicos desde el espacio subretiniano hasta los capilares de la coroides. También lleva nutrientes, como glucosa, retinol y ácidos grasos, del torrente sanguíneo a los fotorreceptores (Strauss, 2005). Para tal efecto posee una gran variedad de receptores, canales iónicos y transportadores de metabolitos, cuya distribución en la célula está polarizada (Marmor, 1998).

Como una característica distintiva, que las diferencia de otras células epiteliales, las células del EPR poseen una ATPasa de Na^+/K^+ que se localiza en la membrana apical, donde se ubican asimismo canales de K^+ , el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, el cotransportador de NaHCO_3 , el cotransportador de H-lactato, el cotransportador $\text{Na}^+/\text{anión}$, el intercambiador de Na^+/H^+ y el receptor adrenérgico de epinefrina. En la membrana basolateral se localiza un sistema de recaptura de Na^+ , canales de Cl^- y K^+ , el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, el cotransportador de NaHCO_3 y el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{lactato}$. Una de sus funciones principales es el mantenimiento del ambiente iónico (Marmor, 1998).

5. Mantiene la estructura de la retina.

El EPR secreta factores de crecimiento que son fundamentales para mantener la estructura íntegra de la retina y de la coroides (Strauss, 2005). Además contribuye a la formación y mantenimiento de la matriz interfotorreceptora, que es crítica para la adhesión retiniana (Marmor, 1998).

Los receptores de glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC. Se le relaciona con numerosas funciones, tales como el desarrollo neuronal; los procesos de aprendizaje y memoria; y la plasticidad cerebral. En el SNC existen distintas poblaciones de receptores de glutamato, lo que explica la diversidad de los efectos producidos por dicho neurotransmisor (Michaelis, 1998). En la retina modula la transmisión en la vía vertical: desde los fotorreceptores a las células horizontales y bipolares y, desde las células bipolares a las células ganglionares y amacrinas (Barnstable, 1993).

El glutamato también se ha relacionado con diversos eventos neuropatológicos, inducidos por la activación aberrante de los receptores de aminoácidos excitadores (Purves *et al.*, 1997).

Los receptores de glutamato pueden clasificarse en dos grandes grupos: ionotrópicos y metabotrópicos. Los primeros forman un canal iónico que permite el paso de cationes (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) a través de la membrana plasmática; mientras que los últimos están acoplados a proteínas G triméricas y activan vías de segundos mensajeros (Michaelis, 1998).

Receptores ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) están formados por proteínas con cuatro dominios transmembranales y un extremo amino terminal localizado en la región extracelular. Los iGluR se dividen en tres tipos conforme a su afinidad por agonistas: 1) receptores activados por α -amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazolepropionico (AMPA), 2) receptores activados por ácido kaínico (KA) y 3) receptores activados por N-metil-D-aspartato (NMDA). Los receptores de KA y AMPA forman canales iónicos que se desensibilizan rápidamente, por lo que participan en la neurotransmisión rápida. Por el contrario, los receptores de NMDA responden al glutamato con mayor lentitud, y su respuesta es prolongada (Michaelis, 1997; Figura III).

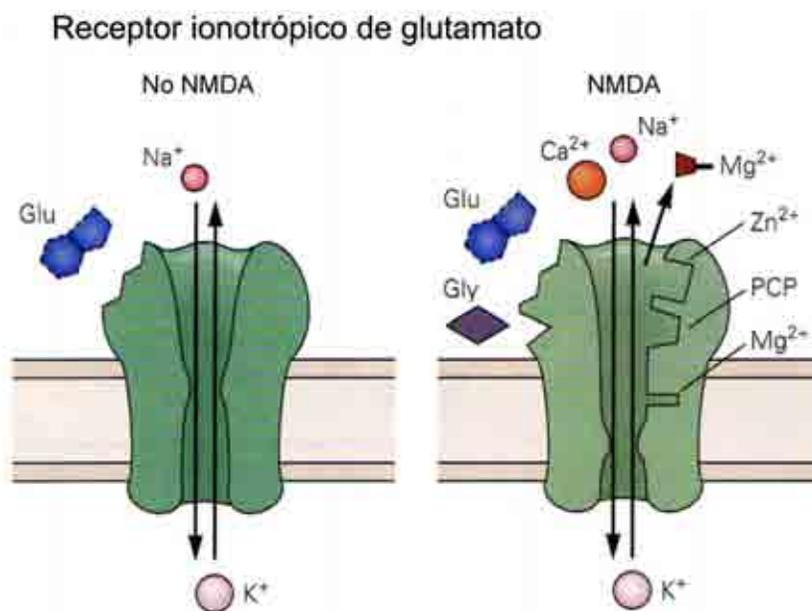


Figura III. Receptores ionotrópicos de glutamato. Los receptores de AMPA y KA forman canales permeables a Na^+ y K^+ . Los receptores de NMDA permiten el paso de los iones Ca^{2+} , K^+ y Na^+ a través de la membrana; tienen sitios de regulación para glicina, Zn^{2+} , PCP, MK801 y Mg^{2+} (Modificado de Kandel y Siegelbaum, 2000).

Los receptores de tipo NMDA (NMDAR), permiten el paso de cationes monovalentes y son permeables al Ca^{2+} . Son proteínas tetraméricas que usualmente se componen de dos subunidades NR1 que forman el canal iónico, y

dos subunidades NR2 que regulan su actividad. Se conocen ocho variantes postranscripcionales de la subunidad NR1 (NR1a-NR1h), codificadas por un solo gen, y cuatro subtipos de la subunidad NR2 (NR2A-NR2D), codificadas por cuatro genes distintos. Además, en algunos receptores se ha identificado la subunidad NR3. Ésta tiene dos variantes (NR3A-NR3B) que son producto de dos genes distintos. La subunidad NR3 afecta la sensibilidad del receptor al magnesio y su permeabilidad al calcio (Cull-Candy *et al.*, 2001). Además se han descrito receptores formados por NR1 y NR3 que se activan únicamente por glicina (Chatterton *et al.*, 2002).

El magnesio tiene un sitio de unión al interior del canal y su efecto es supresor, por lo que la completa activación del receptor ocurre si se elimina del medio extracelular (Michaelis, 1997; Thoreson y Witkovsky, 1999). En el exterior del canal existe un sitio que funciona como modulador positivo y es ocupado comúnmente por el Zn^{2+} (Thoreson y Witkovsky, 1999). Adicionalmente, el receptor tiene otros sitios de regulación: uno en la parte interna del canal que interactúa con los inhibidores fenilciclidina, ketamina, y 5-metil-10,11-dehidro-5H-diibenzo-ciclohepten-5,10-imina (MK801); y un sitio alostérico intracelular al que se unen poliaminas como la espermidina, aumentando la afinidad del receptor por la glicina (Thoreson y Witkovsky, 1999; Kew y Kemp, 2005; Figura III).

La activación de los receptores de NMDA requiere de la unión conjunta de L-glutamato y de su coagonista, la glicina o la D-serina (Kalbaugh *et al.*, 2009). La glicina se une a la subunidad NR1, mientras que el sitio de interacción del glutamato reside principalmente en la subunidad NR2 (Anson *et al.*, 1998; Anson *et al.*, 2000; Kuryatov *et al.*, 1994; Laube *et al.*, 1998).

Receptores metabotrópicos

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) son proteínas con siete dominios transmembranales. El sitio de unión al agonista se localiza en el extremo amino terminal, en la cara extracelular de la membrana plasmática; mientras que el extremo carboxilo se localiza en la región intracelular. Existen ocho tipos de mGluR que, con base en su secuencia de aminoácidos, propiedades farmacológicas y mecanismos de transducción de señales, se clasifican en tres grupos (I, II y III; Michaelis, 1998; Figura IV).

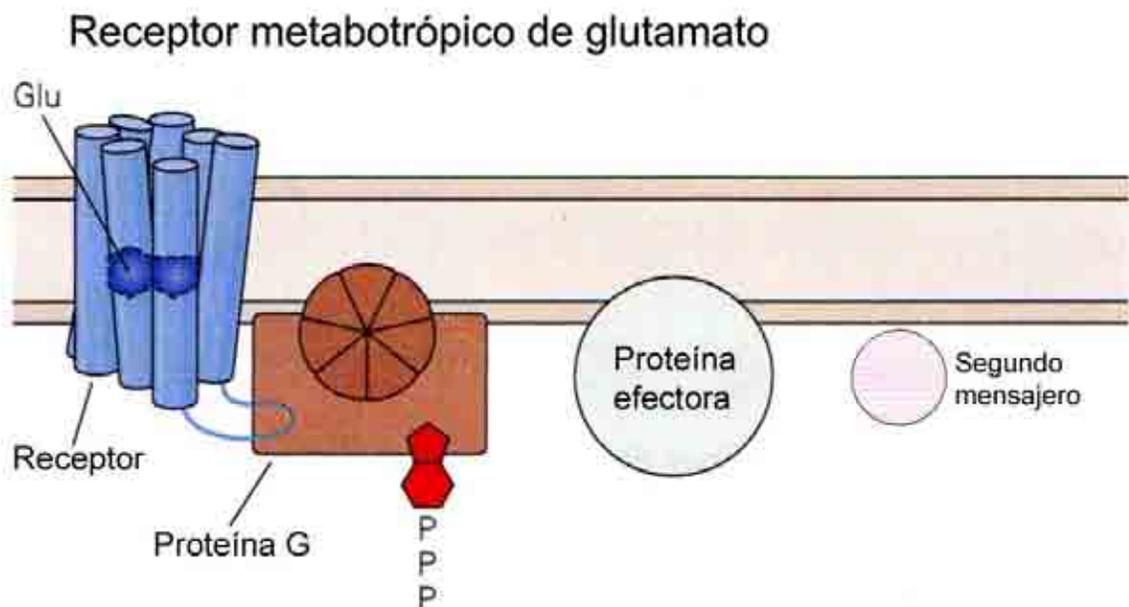


Figura IV. Receptores metabotrópicos de glutamato. Los receptores metabotrópicos de glutamato son proteínas con siete dominios transmembranales acopladas a proteínas G triméricas, al activarse desencadenan vías de segundos mensajeros (Modificado de Kandel y Siegelbaum, 2000).

El grupo I (mGluR1 y mGluR5) corresponde a receptores acoplados a la fosfolipasa C (PLC). Su principal agonista es el quisqualato, seguido del glutamato (Michaelis, 1998). La activación de este tipo de receptores provoca la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) a partir de L-3-fosfatidilmioinositol-4,5-bifosfato (PIP_2). El IP_3 incrementa los niveles de Ca^{2+}

intracelular por medio de su liberación del retículo endoplásmico; mientras que el DAG activa la proteína cinasa C (PKC); a lo que el Ca^{2+} contribuye de manera sinérgica (Purves *et al.*, 1997). Algunas isoformas del grupo I (mGluR1a, mGluR5a y mGluR5b) pueden activar a la adenilil ciclasa (AC; Michaelis, 1998).

El grupo II (mGluR2 y mGluR3) inhibe a la AC, provocando la disminución de la concentración de 3´5´-adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Uno de sus agonistas más potentes es la (2S,1'S,2'S)-2-(carboxiciclopropil) glicina (L-CCG-1; Michaelis, 1998).

El grupo III (mGluR4 y mGluR6-8) también inhibe a la AC, pero se puede identificar por su afinidad por agonistas específicos como el L-2-amino-4-fosfonobutilato (L-AP4; Michaelis, 1998 y Chaki *et al.*, 2006).

Efecto del glutamato sobre el EPR

Existen distintas poblaciones de receptores de glutamato en el EPR. Mediante ensayos farmacológicos se identificó a los receptores de tipo NMDA y receptores de glutamato metabotrópicos en células de EPR de pollo y de humano (López-Colomé *et al.*, 1993b; López-Colomé *et al.*, 1994); posteriormente en cultivos de EPR de pollo se describió la presencia de mGluR del grupo I (Fragoso y López-Colomé, 1999); en cultivos de EPR de rata se detectó la expresión proteica de diversas subunidades del receptor de AMPA y de la subunidad NR1 del receptor de NMDA, así como el grupo I de los mGluR (Pacheco-Domínguez *et al.*, 2008).

A pesar de que el EPR es un tejido mitóticamente inactivo, existen ciertas patologías en las que las células del epitelio proliferan y migran. Cuando esto ocurre, se observan cambios importantes entre los que destaca una transición epitelio-mesénquima (Lee *et al.*, 2001). Este fenómeno se relaciona con diversas enfermedades en las que generalmente se pierde la función visual. Entre ellas destaca la vitreorretinopatía proliferativa (VRP), caracterizada por la migración de

las células del EPR hacia la cavidad vítrea, la consecuente formación de membranas contráctiles y el desprendimiento de la retina neural. La VRP puede presentarse de manera espontánea o inducida, y es la causa del fracaso de un número considerable de cirugías de retina (Pastor *et al.*, 2002).

Los cambios en la proliferación del EPR se han asociado con el rompimiento de la barrera hematorretiniana y la consecuente exposición del epitelio a los componentes del suero (factores de crecimiento, citocinas y neurotransmisores; Abe *et al.*, 1996). Además existen reportes que indican que en ciertas patologías proliferativas, el EPR se expone a concentraciones elevadas de glutamato; éste puede provenir del suero o ser liberado desde las células gliales y la retina neural (Pacheco-Domínguez *et al.*, 2008). Diederer y colaboradores (2006) reportaron que los pacientes con desprendimiento retiniano presentan concentraciones elevadas de glutamato en el vítreo ($16.6 \pm 5.6 \mu\text{M}$); y Pulido y colaboradores (2007) encontraron que también ocurre en personas con retinopatía diabética. En 2008, Bertram y colaboradores midieron la concentración media de aminoácidos en el espacio subretiniano y en el vítreo de pacientes con desprendimiento de retina, y encontraron que el glutamato ($27.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$) y la glicina ($4.1 \pm 4.0 \mu\text{M}$) aumentan significativamente en el espacio subretiniano y que la concentración de glutamato ($13.4 \pm 11.9 \mu\text{M}$) también se eleva en el vítreo. Estos datos sugieren que el glutamato se libera de las retinas isquémicas.

Pacheco-Domínguez y colaboradores (2008) demostraron que la estimulación con glutamato induce la proliferación de las células del EPR, mediante la activación de los receptores de AMPA y NMDA, y en menor medida de los mGluR.

Se han estudiado diversas vías de señalamiento relacionadas con estos receptores. Uchida y colaboradores (1998) demostraron que la activación prolongada de los receptores de NMDA, induce la liberación del factor de crecimiento fibroblástico básico (b-FGF), que a su vez estimula la proliferación del EPR de rata, esto en relación directa con la concentración de glutamato en el

medio. Recientemente se ha demostrado que el glutamato, a través de los receptores de NMDA, promueve la proliferación en forma directa, por la activación de la PKC (García *et al.*, 2008; Pacheco-Domínguez *et al.*, 2008).

Los transportadores de neurotransmisores

En el SNC los transportadores de neurotransmisores juegan un papel importante en la terminación de la transmisión sináptica. Una de sus principales funciones es recapturar al neurotransmisor, promoviendo su rápida inactivación y permitiendo su reciclaje. Los transportadores evitan la difusión de los neurotransmisores y minimizan la probabilidad de que activen sinapsis adyacentes. Los transportadores de neurotransmisores dependientes de sodio son el principal medio por el cual se elimina el neurotransmisor del espacio sináptico. Al respecto, Jursky (1994) señaló que los transportadores localizados en la membrana plasmática de las células neuronales y de la glía también participan en la desintoxicación, protección y nutrición neuronal. Cabe mencionar que en ciertas condiciones fisiológicas, así como en ciertas patologías, los transportadores pueden funcionar en sentido inverso, liberando al neurotransmisor. Se ha reportado que las concentraciones elevadas de aminoácidos excitadores inducen muerte neuronal por excitotoxicidad. La entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA es un evento crítico para la muerte neuronal inducida por glutamato. Una de las principales funciones de los transportadores de glutamato es evitar que éste se eleve a niveles neurotóxicos.

Los transportadores de glicina

La glicina es un aminoácido de estructura simple que desempeña diversas funciones en el organismo. En el sistema nervioso central tiene una actividad dual. Por un lado se le ha catalogado como un neurotransmisor inhibitorio, debido a que activa a los receptores de glicina sensibles a estricnina (GlyRs). Dichos receptores se han asociado, entre otras funciones, con el procesamiento de las señales sensoriales, con la coordinación de la respuesta refleja y con la percepción de la sensación de dolor. Además, junto con el glutamato, participa en la neurotransmisión excitadora, ya que la glicina actúa como coagonista obligado de los receptores de tipo NMDA (Zafra y Giménez, 2008).

Por su importancia fisiológica, la concentración de glicina en el medio extracelular, y particularmente en la sinapsis, debe estar regulada. Existen diversos mecanismos para este fin, entre ellos la recaptura del neurotransmisor a través de transportadores membranales. Se han identificado diversos sistemas de transporte de glicina, que a grandes rasgos pueden dividirse en transportadores de alta afinidad y transportadores de baja afinidad.

Transportadores de glicina de alta afinidad

Los transportadores de glicina de alta afinidad (GlyTs) pertenecen a la familia de transportadores dependientes de Na^+ y Cl^- (familia SLC6). Ésta es una familia diversa que incluye a los transportadores de monoaminas (serotonina, norepinefrina y dopamina); de los osmolitos betaína y taurina; del aminoácido inhibitorio GABA y del metabolito creatina (Nian-Hang *et al.*, 2004). La conformación de estos transportadores se ha deducido utilizando como base la estructura cristalográfica de un transportador homólogo de origen eucarionte: LeuT_{Aa} (transportador de leucina de *Aquifex aeolicus*). Como el resto de la familia SLC6, los transportadores de glicina se han descrito como proteínas con 12 dominios transmembranales (TM) altamente conservados, y dominios terminales

amino y carboxilo ubicados en la cara citosólica de la membrana. Se caracterizan por tener un asa altamente glicosilada, ubicada en la zona extracelular, entre los dominios TM3 y TM4 (Miller *et al.*, 1997).

Hasta la fecha se han identificado dos tipos de transportadores de glicina de alta afinidad: GlyT1 y GlyT2. Dichos transportadores se codifican en genes distintos y tienen cerca del 50% de homología en su secuencia de aminoácidos (Malandro y Kilbeg, 1996; Volker *et al.*, 2005; Figura V).

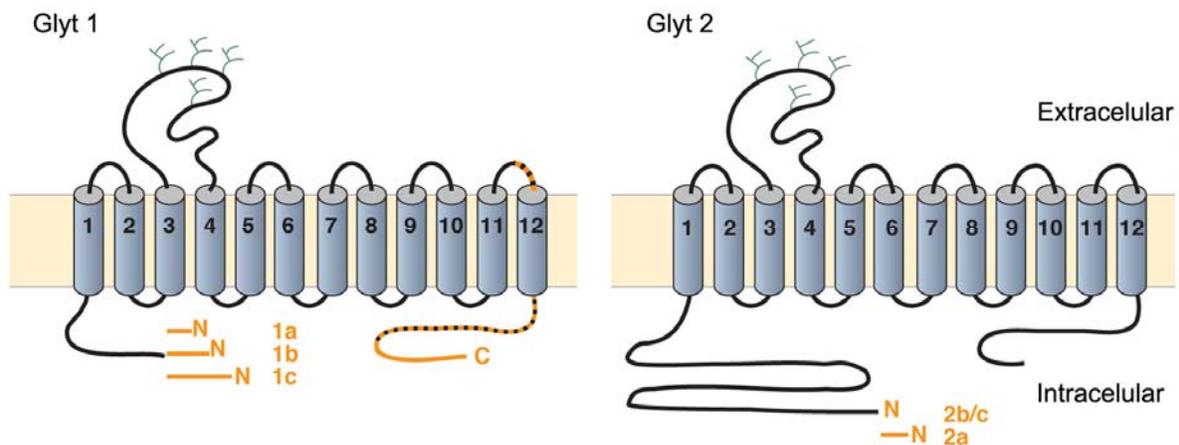


Figura V. Transportadores de glicina de alta afinidad. Los GlyTs tienen 12 dominios transmembranales altamente conservados y un asa glicosilada entre TM3 y TM4. Existen tres isoformas de GlyT1 (a-c) y tres isoformas de GlyT2 (a-c), que se diferencian en los primeros aminoácidos de la terminal amino (Modificado de Volker *et al.*, 2005).

En rata y ratón se han caracterizado dos isoformas de GlyT1: GlyT1a y GlyT1b, que resultan de diferencias en el anclaje al sitio promotor (Borowsky y Hoffman, 1998). Las proteínas de ambos transportadores son muy similares entre sí, difiriendo únicamente en los primeros aminoácidos de la región amino: GlyT1a posee 10 aminoácidos característicos (Met-Val-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Gly-Met-Leu), mientras que GlyT1b posee 15 (Met-Ala-Val-Ala-His-Gly-Pro-Val-Ala-Thr-Ser-Ser-Pro-Glu-Gln). El gene está constituido por 15 exones: el primero es específico para GlyT1a, el segundo sólo se expresa en GlyT1b y los 13 exones restantes son comunes para todas las isoformas (Liu *et al.*, 1993; Borowsky y Hoffman, 1998).

Kim y colaboradores (1994) caracterizaron el gen de GlyT1 en humano y, además de la forma homóloga de los transportadores caracterizados en rata, encontraron una tercera isoforma funcional que denominaron GlyT1c. Ésta se genera por corte y empalme alternativo. La proteína comparte los primeros 15 aminoácidos con GlyT1b, pero posee una extensión de 54 aminoácidos más. Cabe señalar que distintos autores, en su descripción del gene de GlyT1 de rata, han incluido una región homóloga al exón de GlyT1c, pero no existe evidencia de la expresión de un mensajero maduro de esta isoforma (Adams *et al.*, 1995; Borowsky y Hoffman, 1998).

Según Adams y colaboradores (1995) la expresión de las isoformas cambia durante el desarrollo. Además Borowsky y colaboradores (1993) detectaron la expresión de GlyT1a en la materia gris y tejidos periféricos de rata adulta, y la expresión del ARNm de GlyT1b únicamente en la materia blanca. Por su parte, la proteína de GlyT1c sólo se ha detectado en cerebro de humano mediante la técnica de *Northern-Blot* (Kim *et al.*, 1994).

El transportador GlyT2 se diferencia de GlyT1 por tener una extensión de 13 aminoácidos en el extremo carboxilo-terminal y una región de 160 aminoácidos distintos en la terminal amino. Se han identificado tres isoformas de GlyT2, designadas como GlyT2a, GlyT2b y GlyT2c. Estas variantes se forman por corte y empalme alternativo a partir de un gene que consta de 18 exones (gene SLC6A5; Ebihara *et al.*, 2004; Volker *et al.*, 2005). La secuencia característica de cada isoforma se localiza en la región amino terminal de la proteína; los exones 1a, 1b y 1c son específicos para las variantes GlyT2a, GlyT2b y GlyT2c, respectivamente. Las isoformas GlyT2a y GlyT2b se han caracterizado en cerebro de rata, mientras que la variante GlyT2c sólo se ha reportado en ratón. El transportador GlyT2b de rata se diferencia de GlyT2a por poseer una extensión de cinco aminoácidos en la región amino terminal (Ponce *et al.*, 1998). Por su parte, Ebihara y colaboradores (2004) reportaron que las isoformas GlyT2b y GlyT2c de ratón son distintas a las

de rata y poseen ocho aminoácidos menos que la variante GlyT1a caracterizada en ratón.

Las tres isoformas conocidas de GlyT2 tienen patrones de distribución y características cinéticas similares. En la región amino terminal se han identificado sitios potenciales de fosforilación por la proteína cinasa C, la cinasa dependiente de AMPc y la cinasa dependiente de calmodulina. Además posee más de nueve sitios consenso de fosforilación para la PKC en la región carboxilo. El asa extracelular ubicada entre los dominios transmembranales 3 y 4 es más larga que la del transportador GlyT1 y en ella existen cuatro sitios de glicosilación (Liu *et al.*, 1993).

GlyT1 es predominantemente glial, aunque se expresa en neuronas. Se le ha asociado con el control de las sinapsis glutamatérgicas, tanto por su patrón de distribución como por estudios que muestran que forma complejos de inmunoprecipitación con los receptores de NMDA; y que la inhibición farmacológica de GlyT1 incrementa la concentración extracelular de glicina, al tiempo que potencia la respuesta de los NMDAR (Cubelos *et al.*, 2005; Zafra y Giménez, 2008). En la retina se expresa en la glia Müller y en células amacrinas (Gadea *et al.*, 1999; Pow y Hendrickson, 1999). GlyT2 se ha detectado exclusivamente en células neuronales, mayoritariamente en las terminales presinápticas que contienen grandes concentraciones de glicina. Se localiza principalmente en el cerebelo, puente, tallo y médula espinal, aunque también se ha observado que los estímulos acústicos incrementan su expresión en el núcleo coclear (Liu *et al.*, 1993; Barmack *et al.*, 1999; Gadea y López-Colomé, 2001). Al respecto, Zafra y Giménez (2008) concluyen que, de manera general GlyT1 se distribuye en zonas donde pueda regular la activación de los receptores de tipo NMDA, controlando la cantidad de glicina disponible para unirse a dichos receptores. Mientras que GlyT2 está relacionado con la regulación de la actividad de los receptores de glicina sensibles a estrictina.

GlyT1 y GlyT2 también difieren en sus características estequiométricas y comportamiento farmacológico (Liu *et al.*, 1993; Supplisson y Roux, 2002).

El funcionamiento de ambos transportadores depende del gradiente de sodio que se mantiene por la ATPasa de Na⁺/K⁺. GlyT1 cotransporta dos átomos de Na⁺ y un átomo de Cl⁻ por cada molécula de glicina, mientras que GlyT2 transporta 3 átomos de Na⁺, un átomo de Cl⁻ y una molécula del neurotransmisor (Volker *et al.*, 2005). Debido a sus características estequiométricas, la capacidad de GlyT1 para funcionar en sentido inverso es mayor que la de GlyT2. El transportador puede liberar glicina desde el citoplasma bajo ciertas condiciones patológicas en las que se altera el potencial de membrana o el gradiente iónico (Supplisson y Roux, 2002).

Los transportadores de glicina se diferencian por su sensibilidad farmacológica a la sarcosina (α -metil-glicina) que actúa como un inhibidor competitivo, uniéndose con mayor afinidad a GlyT1 que a GlyT2 (Harsing *et al.*, 2003). En contraste, la amoxapina inhibe a GlyT2a, teniendo un efecto 10 veces menor sobre GlyT1 (Núñez *et al.*, 2000). Se han sintetizado inhibidores específicos de ambos transportadores: Org-24598 y CP-802079 para GlyT1 y Org-25543 para GlyT2 (Volker *et al.*, 2005).

Recientemente se han acumulado datos que indican los posibles mecanismos de regulación de estos transportadores. Respecto a su control transcripcional, se sabe que la expresión de GlyT1 está regulada por factores de transcripción de la familia HMG3, abundantes en la retina (West, 2004). También se sabe que Trb-1, un factor transcripcional específico de neuronas, se une a la región 5' del promotor de GlyT1 (Wang, 2004).

Diversos mecanismos de regulación afectan el número de transportadores maduros en la membrana plasmática. Una de las vías de señalamiento más estudiadas es la de la PKC, que regula la actividad de GlyT2 promoviendo su

internalización (Fornés *et al.*, 2008). Debido a que los receptores de tipo NMDA activan a la PKC, ésta es una vía importante que pudiera regular la actividad de los receptores de glutamato (Volker, 2005). Se ha estudiado la participación de proteínas que puedan promover el tráfico intercelular de los transportadores. Se detectó una relación entre la sintaxina 1A (proteína SNARE) y los transportadores de glicina 1 y 2, probablemente mediada por la PKC, que resulta en una reducción en el número de transportadores en la membrana plasmática (Gadea y López-Colomé, 2001). Además se reportó que la sintaxina 1A es esencial para la inserción de GlyT2 en la membrana celular (Volker, 2005). El forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), un éster de forbol que activa de manera general a la familia de las PKC, promueve la exclusión de los GlyTs de las balsas lipídicas (Fornés, 2008).

Estudios realizados en la glia de Müller de la retina, demostraron que existe una relación entre las enzimas dependientes de calcio/calmodulina y los transportadores de glicina. La inhibición específica de la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMKII) provoca que el transporte de glicina mediado por GlyT1 se inactive. Hasta la fecha no se ha esclarecido si GlyT1 posee sitios consenso de fosforilación para la CaMKII o si ésta regula al transportador de manera indirecta: ya sea por la activación de un sistema de señalamiento o por la fosforilación de proteínas del citoesqueleto implicadas en el tráfico de los transportadores de membrana (Gadea *et al.*, 2002).

Otra vía de regulación es la del ácido araquidónico, que inhibe de modo directo el transporte de glicina de alta afinidad (Volker, 2005). El ión Zn^{2+} se libera de las neuronas excitadoras junto con el glutamato; se ha observado que a bajas concentraciones inhibe a GlyT1, pero no a GlyT2. El ión metálico se une a residuos extracelulares de GlyT1, impidiendo que la proteína sufra cambios conformacionales (Volker *et al.*, 2005). Estos moduladores también se relacionan con la actividad de los NMDAR, lo que sugiere la regulación coordinada entre los transportadores y las respuestas mediadas por dichos receptores.

Por su parte, Aubrey y colaboradores (2000) reportaron que el pH tiene un efecto modulador sobre GlyT1, y que éste depende de la presencia del residuo His421 del transportador.

Geerlings y colaboradores (2001) encontraron que la concentración de Ca^{2+} intracelular modula el número de transportadores GlyT2 en la superficie de las células. Cuando se provoca un flujo constante de calcio, se favorece la remoción de GlyT2 de la membrana plasmática. Se ha propuesto que el mecanismo pudiera relacionarse con la activación de la PKC (Volker *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la PKC no actúa sobre GlyT1 de manera directa, debido a que el efecto de los ésteres de forbol no cambia si se mutan todos los sitios consenso de fosforilación por PKC en GlyT1. Así mismo, si se mutan los aminoácidos cargados en el segmento IL2 de GlyT2 se evita la internalización provocada por ésteres de forbol.

La extensión amino terminal de GlyT2 contiene nueve sitios potenciales de fosforilación por PKC, posiblemente esto es la base de los mecanismos de regulación que no actúan en las isoformas de GlyT1 (Malandro y Kilberg, 1996).

Transportadores de glicina de baja afinidad

La glicina también se recaptura por medio de otros sistemas de transporte distintos a los de la familia SLC6. Estos transportadores no son específicos para la glicina y su actividad depende de sodio.

Tal es el caso del sistema A, un transportador de aminoácidos neutros de la familia SLC38 (Javitt *et al.*, 2005). El sistema A transporta aminoácidos con cadena lateral corta, como alanina, glicina, serina, prolina, cisteína y glutamina; además de los aminoácidos sintéticos aminoisobutirato (AIB), N-acetilaminoisobutirato (AcAIB) y metilaminoisobutirato (MeAIB). Su actividad depende de sodio en una relación estequiométrica 1:1 ($\text{Na}^+:\text{aa}$) y es muy sensible a cambios de pH.

También existe el sistema ASC, que transporta aminoácidos de cadena lateral corta, pero no aminoácidos N-metilados. Los sustratos de este transportador son los aminoácidos alanina, serina, glicina, treonina y cisteína. Se han identificado tres isoformas en hombre y ratón (O'Brein *et al.*, 2005).

HIPÓTESIS

En ciertas patologías oculares de tipo proliferativo relacionadas con la alteración de la barrera hematorretiniana, el EPR se expone a concentraciones elevadas de glutamato (Pacheco-Domínguez *et al.*, 2008). Entre los padecimientos que llevan a la pérdida de la visión, la vitreorretinopatía proliferativa es la causa del fracaso de un alto porcentaje de las cirugías para corregir el desprendimiento de retina. Este padecimiento se caracteriza por la desdiferenciación, proliferación y migración de las células del EPR (Pastor *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha demostrado que el glutamato, mediante la activación de los receptores de NMDA, induce la proliferación de las células del EPR (Pacheco-Domínguez *et al.*, 2008).

Dado que la glicina actúa como coagonista obligado del glutamato en los receptores de tipo NMDA, el EPR requiere sistemas de transporte que regulen la concentración extracelular del coagonista y en consecuencia, los efectos del glutamato sobre el epitelio pigmentado de la retina.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es caracterizar bioquímica, cinética y farmacológicamente el transporte de glicina en cultivos de EPR de rata.

Los objetivos particulares, derivados del anterior, son los siguientes:

- 1) Demostrar que el EPR expresa transportadores de glicina de alta afinidad.
- 2) Identificar los transportadores de glicina presentes en el modelo de estudio, mediante la caracterización bioquímica y farmacológica del transporte de glicina en células de EPR de rata en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de EPR de rata

Para obtener cultivos primarios de EPR se utilizaron ratas *Long-Evans* de 6 a 8 días de edad. En condiciones de esterilidad, los globos oculares se extrajeron e incubaron durante 30 minutos con dispasa al 2% en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; Gibco BRL) suplementado con penicilina 0.0125%, estreptomicina 0.0125% y neomicina 0.025%. Posteriormente, se extrajo el EPR y se incubó durante 5 minutos en tripsina al 0.1%. Una vez que las células se disociaron, se les colocó en medio Opti-MEM (Gibco BRL) con suero fetal bovino al 4%. En una campana de flujo laminar, se sembraron las células a una densidad aproximada de 30,000 células/cm² en placas de cultivo de 6 ó 12 pozos. El primer pasaje se realizó después de 5 ó 6 días de incubación a 37°C y 5% de CO₂, con los cultivos en estado de confluencia. Posteriormente, se retiró el medio y las células se desprendieron de las placas mediante una digestión con tripsina-EDTA al 0.1% durante 2 minutos. Las células se suspendieron en medio Opti-MEM con suero fetal bovino y se sembraron en las condiciones antes descritas. Todos los ensayos se realizaron en el primer pasaje celular.

Ensayo de transporte de glicina

Los ensayos de transporte se hicieron en cultivos confluentes de EPR de rata, en medio Krebs Ringer bicarbonato (KRB) que contenía: NaCl 118 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, C₆H₁₂O₆ 5.6 mM y MgSO₄ 1.4 mM. Para determinar la dependencia iónica del transporte, el NaCl se sustituyó por una cantidad isosmótica de gluconato de potasio o cloruro de colina. Antes de cada ensayo, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron tres veces con KRB a 37°C, dejándolas preincubar 5 minutos con el medio y a la temperatura mencionados. Posteriormente, las células se incubaron a 37°C en KRB que

contenía [³H]-Gly/Gly 1:25000 (56 Ci/mmol), durante los tiempos indicados. Al finalizar cada ensayo, las células se lavaron tres veces con medio KRB a 4°C. La monocapa celular se desprendió con 1 mL de HCl 1 N y se colocó en viales. Para facilitar la hidrólisis del tejido, los viales se colocaron en una parrilla hasta que las muestras hirvieron. Se agregó 1 mL de NaOH 1 N para neutralizar el ácido y se añadieron 5 mL de tritosol a cada vial. La cantidad de glicina capturada se calculó a partir de la radioactividad medida en un contador de centelleo líquido (Beckman; LS-6000). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se hicieron al menos tres repeticiones de cada ensayo. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el programa GraphPad Prism 4. Se determinó la cantidad de proteína mediante el Método de Bradford (1976).

Extracción de ARN

A partir de cultivos confluentes de EPR de rata, se obtuvo ARN total por medio del Método de Trizol, según el protocolo de Gibco. Las células en cultivo se desprendieron de las placas con 1 mL de trizol por cada 200 mg de tejido, y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se homogenizaron con un vortex y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregó cloroformo a cada muestra, en una relación 1: 5 (cloroformo: trizol), se agitaron las muestras y se colocaron a temperatura ambiente hasta que las fases de la mezcla se separaron. Las muestras se centrifugaron a 8,000 rpm durante 8 minutos a 4°C. Posteriormente se recuperó la fase acuosa. Se agregaron 500 µL de isopropanol frío a cada tubo y tras una agitación suave, se esperó a que el ARN precipitara (15 minutos aproximadamente). Las muestras se centrifugaron a 8,000 rpm durante 8 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y cada muestra se lavó con 1 mL de etanol frío al 75%. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se quitó la mayor cantidad de etanol posible y el ARN extraído se resuspendió en 20 µL de TE (Tris-Cl 10mM, EDTA 1 mM), pH= 8. La integridad del ARN se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

La síntesis de ADNc se llevó a cabo con oligonucleótidos poliT de 12 a 18 bases (Invitrogen Corporation). En cada reacción se incubaron 2 μ g de ARN total con los oligonucleótidos a 70°C durante 2 minutos. La retrotranscripción se efectuó a 42°C durante una hora, utilizando una mezcla de reacción que contenía: 100 unidades de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen Corporation), 0.5 mM de cada dNTP y la solución amortiguadora recomendada por el fabricante (Tris-HCl 50 mM a pH= 8.3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM y DTT).

Para identificar las isoformas de los GlyTs presentes en el modelo de estudio, se hicieron reacciones en cadena de la polimerasa en un Termociclador Eppendorf (MJ Research, Waltham). Se diseñaron oligonucleótidos específicos en el programa Amplify 3X, a partir de las secuencias reportadas para GlyT1 (GenBank, No. Acceso: M95413.1) y GlyT2 (GenBank, No. Acceso: L21672 y AY547309). Los oligonucleótidos para β -actina fueron descritos anteriormente (Lee-Rivera *et al.*, 2003; Tabla 1) y se usaron como controles positivos. La mezcla de reacción contenía: 2 μ L de ADNc, 2.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen Corporation), 0.5 μ M de cada oligonucleótido, 0.5 mM de cada dNTP, 1.66 mM de MgCl₂ y la solución amortiguadora recomendada por el fabricante (Tris-HCl 20 mM, pH= 8.4 y KCl 50 mM). Las muestras se incubaron a 94°C para una desnaturalización inicial del ADN e inmediatamente después se sometieron a 22 ciclos de amplificación con el protocolo siguiente: 94°C por 30 segundos (desnaturalización); 55°C por 30 segundos (alineación) y 72°C durante 45 segundos (polimerización). Al finalizar la reacción las muestras se mantuvieron a 4°C.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones en cadena de la polimerasa

Oligo	Secuencia (5' → 3')	Producto esperado
GlyT-1a (F)	ATGGTAGGAAAAGGTGCCAAAGGGATGTTG	399 pb
GlyT-1b (F)	ATGGCCGCGGCTCATGGACCTGTGGCCCC	414 pb
GlyT-1c (F)	CCACCCTTTTCTGGAGCCACTCCCTCTACT	495 pb
GlyT-1 (R)	GTAGTAGAAGGCGATGCAGATGACC	
GlyT-2a (F)	ATGGATTGCAGTGCTCCCAAGGAA	824 pb
GlyT-2b (F)	ATGAATAAACCAACCAACATC	800 pb
GlyT-2 (R)	CCACAGCCCTGCAGAGCTGGG	
β-actina (F)	CAAACATGATATGGGTCATCTTCTC (Lee-Rivera <i>et al.</i> , 2003)	328 pb
β-actina (R)	GCTCGTCGTCGACAACGGCT (Lee-Rivera <i>et al.</i> , 2003)	

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se cargaron en geles de agarosa al 1% elaborados con TBE, pH= 8.3 (Tris 10.8 g, ácido bórico 5.5 g, EDTA 0.744 g/litro). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara con una intensidad de 50 a 70 V. Se utilizó marcador de bajo peso molecular (*Low DNA Mass Ladder*; Invitrogen Corporation) para calcular el tamaño de los productos amplificados y se comparó con el peso molecular esperado, preestablecido cuando se diseñaron los oligonucleótidos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL y se digitalizaron en un transiluminador UV (Vilber Lourmat) con cámara digital de 7.1 mega pixeles (Canon; PowerShot G6).

RESULTADOS

Caracterización Bioquímica del Transporte de Glicina

1. Curva temporal

Para obtener la curva temporal se midió el transporte de glicina desde los cinco a los 70 minutos. En todos los casos se utilizó una concentración final de 1 mM de glicina ($^3\text{H-Gly/Gly}$ 1:25000). Se observó que el transporte es saturable en el tiempo, alcanzando su máximo a los 50 minutos y describiendo un comportamiento lineal a los 10 minutos. Por lo tanto, el tiempo de incubación de los ensayos de transporte subsecuentes fue de 10 minutos (Figura 1).

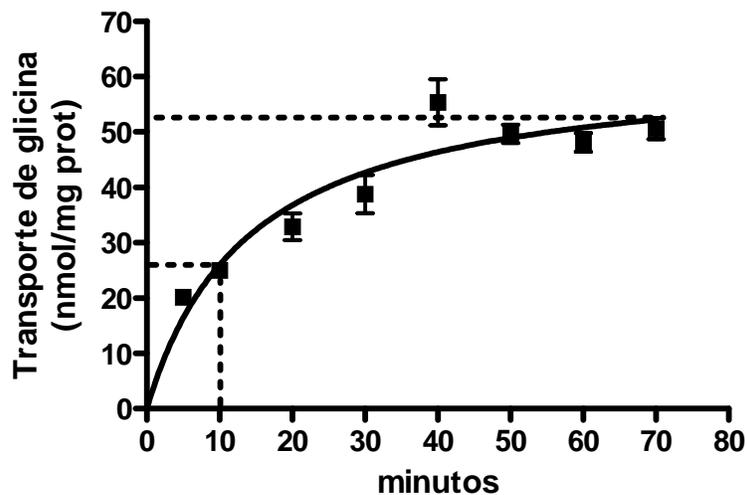


Fig 1. Curva temporal del transporte de glicina. Las células se incubaron con Gly 1 mM durante los tiempos indicados.

2. Dependencia del pH

El pH del medio puede inducir cambios conformacionales en los transportadores membranales y por lo tanto modificar su actividad. Para determinar si el transporte de glicina depende del pH, se utilizó medio Krebs ajustado a diferentes valores (de pH= 5 a 9). Las células se incubaron con glicina 1 mM ($^3\text{H-Gly/Gly}$ 1:25000) durante 10 minutos. Se encontró que el transporte de glicina es sensible a los cambios de pH, el máximo transporte ocurre en condiciones fisiológicas (pH= 7.4), siendo estable en un intervalo de 6 a 8 (Figura 2).

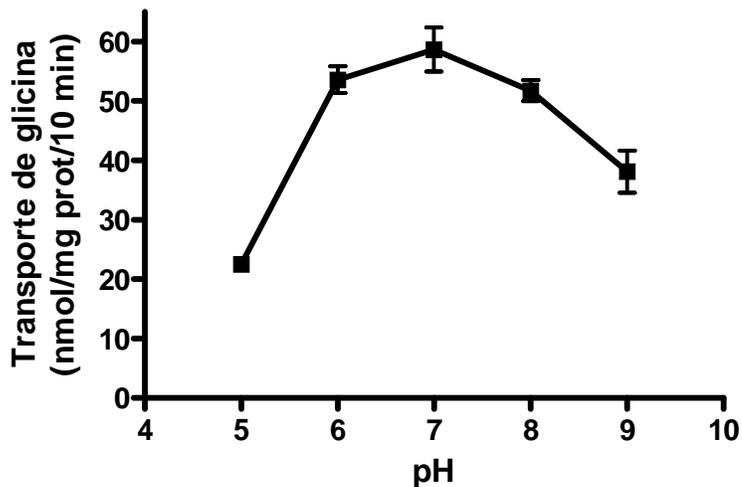


Fig 2. Efecto del pH sobre el transporte de glicina. Las células se incubaron con Gly 1mM durante 10 minutos.

3. Dependencia de energía

Para determinar si el transporte de glicina en el modelo de estudio depende de energía, las células se preincubaron durante 12 horas con diferentes inhibidores metabólicos. Después de este periodo, se cambió el medio Krebs y se agregó glicina 25 μM ($^3\text{H-Gly/Gly}$ 1:25000) durante 10 minutos. Mediante una prueba t de Student se encontró que el transporte se inhibió significativamente por la inclusión simultánea de cianuro de potasio y ouabaína, condición en la que se observó una

disminución del 26% (control: 5.82 nmol/mg proteína/10 min \pm 0.21; KCN/ouabaína: 4.26 nmol/mg proteína/10 min \pm 0.35; Figura 4).

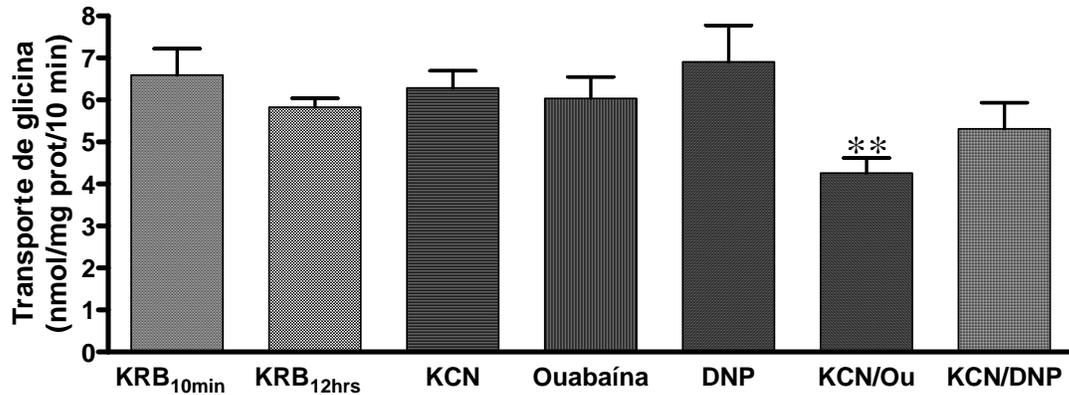


Fig 4. Efecto de inhibidores metabólicos sobre el transporte de glicina. Las células se preincubaron durante 12 horas en medio KRB que contenía KCN, Ouabaína y/o DNP (dinitrofenol) a una concentración 200 μ M. El ensayo de transporte se efectuó en presencia de Gly 25 μ M. Existen diferencias significativas respecto al control (KRB_{12hrs}) en ** $P \leq 0.001$, aplicando una prueba t de Student.

4. Curva de saturación

Para obtener la curva de saturación del transporte de glicina, las células en confluencia se incubaron con concentraciones crecientes de glicina, de 0.01 mM a 2 mM (3 H-Gly/Gly 1: 25000), durante 10 minutos. Los valores se analizaron mediante la ecuación $Y = B_{max1} * X / (K_{d1} + X) + B_{max2} * X / (K_{d2} + X)$, con lo que se obtuvieron las constantes de dos sistemas de transporte independientes: $Km_1 = 54.48 \mu$ M, $V_{max} = 399.9$ nmol/mg prot y $Km_2 = 2.58$ mM, $V_{max} = 1564$ nmol/mg prot. Los datos se transformaron con la ecuación de Eadie-Hofstee, en el programa GraphPad Prism 4 (Figura 5). Las características cinéticas del sistema de alta afinidad son similares a las que reportan Okamoto y colaboradores (2009) para el transportador GlyT1 de la línea celular de epitelio endotelial de retina de rata (TR-iBRB2).

Debido a que la curva de saturación develó dos sistemas de transporte los ensayos subsecuentes se hicieron empleando dos concentraciones distintas de

glicina: 25 μ M y 1 mM, que corresponden al transporte de alta y baja afinidad, respectivamente.

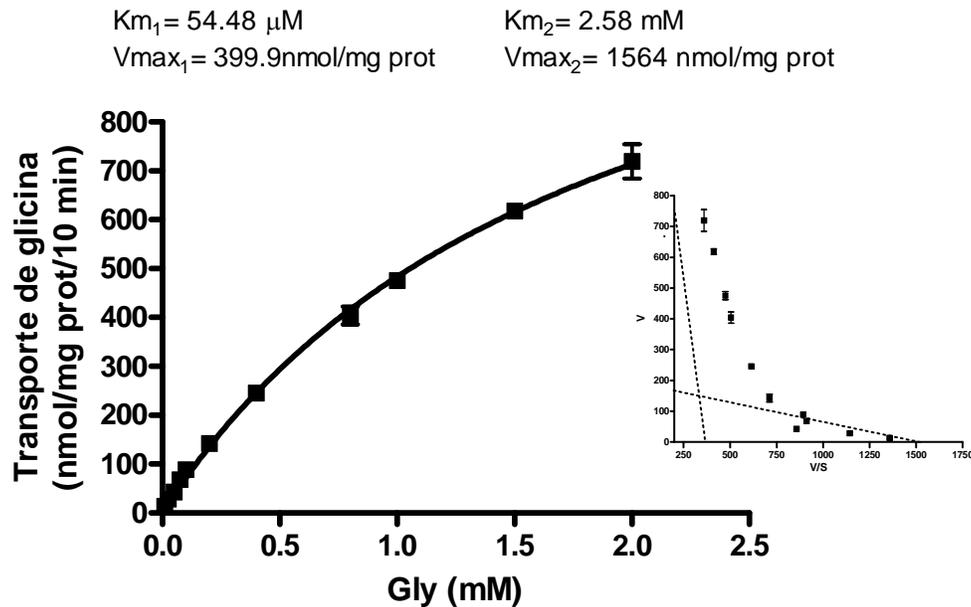


Fig 5. Curva de saturación del transporte de glicina. Las células se incubaron en medio KRB en presencia de glicina a diferentes concentraciones, en un intervalo de 0.01 a 2 mM. Las constantes K_m y V_{max} se obtuvieron por medio de la ecuación $Y = \frac{B_{\text{max}1} * X}{(K_{d1} + X)} + \frac{B_{\text{max}2} * X}{(K_{d2} + X)}$, los datos se transformaron con la ecuación de Eadie-Hofstee.

5. Dependencia iónica

Para identificar a los sistemas de transporte presentes en el modelo de estudio, se realizó un ensayo de dependencia iónica. Los datos demuestran que el sistema de transporte de alta afinidad es dependiente de los iones Na^+ y Cl^- . El promedio de transporte del control fue de $2.54 \text{ nmol/mg proteína/10 min} \pm 0.15$, mientras que en el medio sin sodio el transporte bajó 54 % ($1.16 \text{ nmol/mg proteína/10 min} \pm 0.07$), y en el medio sin cloro 44 % ($1.41 \text{ nmol/mg proteína/10 min} \pm 0.02$). De acuerdo a una prueba t de Student, las diferencias son significativas (Figura 5a). Ésta es una característica de la familia SLC6, que incluye a los transportadores de glicina de alta afinidad GlyT1 y GlyT2, así como transportadores específicos de

otros compuestos como las monoaminas serotonina, norepinefrina y dopamina; y los aminoácidos GABA y prolina (Niang-Hang et al., 2004).

El sistema de baja afinidad depende únicamente del ion sodio. En el ensayo se encontró que en las condiciones del control el transporte promedio es de 33.02 nmol/mg proteína/10 min \pm 2.77, mientras que en el medio sin cloro no se observaron cambios significativos (31.08 nmol/mg proteína/10 min \pm 1.80), sin embargo en el medio sin sodio el transporte disminuyó un 34%, mostrando un promedio de 21.73 nmol/mg proteína/10 min \pm 1.10 (Figura 6b). Se conocen dos transportadores de glicina de baja afinidad cuya actividad depende del sodio extracelular: el sistema A y el sistema ASC (Javitt *et al.*, 2005; O`Brein *et al.*, 2005).

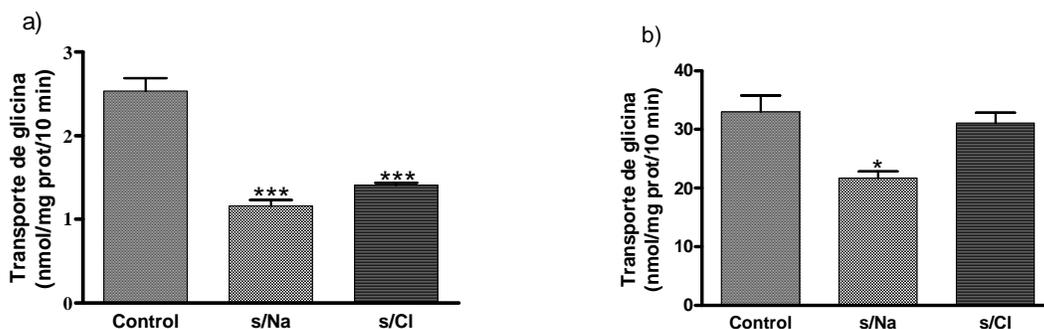


Fig 6. Dependencia iónica del transporte de glicina. Las células se incubaron con a) Gly 25 μ M y con b) Gly 1 mM en medio KRB al que se le reemplazó el NaCl 118 mM por una cantidad isosmótica de cloruro de colina o gluconato de sodio. Existen diferencias significativas respecto al control en * $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.0001$, aplicando una prueba t de Student.

6. Caracterización farmacológica del transportador

El ensayo de dependencia iónica sugiere que el transporte de alta afinidad está mediado por un transportador de aminoácidos de la familia dependiente de sodio y cloro. La sarcosina es un derivado de la glicina que inhibe específicamente al transportador GlyT1 (Harsing *et al.*, 2003). En la figura 7a se observa que el

sistema de transporte de alta afinidad disminuye en un 37% cuando se agrega el inhibidor al medio (control: 13.04 nmol/mg proteína/10 min \pm 0.58; sarcosina: 8.19 nmol/mg proteína/10 min \pm 0.50). Dicha disminución es estadísticamente significativa, de acuerdo a la prueba t de Student.

En el sistema de transporte de baja afinidad no se presentan cambios significativos entre el medio con sarcosina y el medio control (control: 109.00 nmol/mg proteína/10 min \pm 4.16; sarcosina: 103.60 nmol/mg proteína/10 min \pm 3.56; Figura 7b).

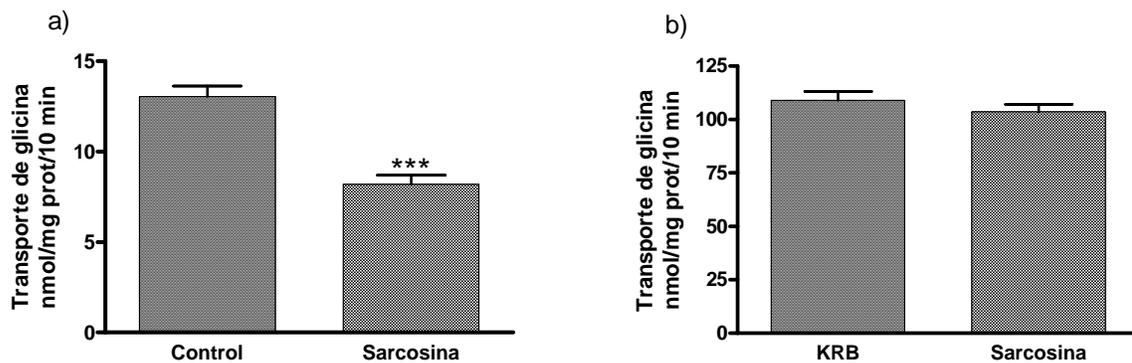


Fig 7. Efecto de la sarcosina sobre el transporte de glicina. Las células se incubaron con sarcosina 100 μ M durante 15 minutos, inmediatamente después se agregó a) Gly 25 μ M y b) Gly 1 mM. Existen diferencias significativas respecto al control en *** $P \leq 0.0001$, aplicando una prueba t de Student.

El transporte de baja afinidad podría ser el resultado de la expresión de transportadores de aminoácidos no específicos. Por este motivo, se probó la especificidad del transporte incubando a las células con distintos aminoácidos y derivados sintéticos. El transporte de alta afinidad no mostró cambios significativos, mientras que el transporte de baja afinidad disminuyó 25% cuando se agregó alanina al medio (control: 39.95 \pm 3.028 nmol/mg prot/10 min; alanina: 29.92 \pm 2.929 nmol/mg prot/10 min), pero no cuando se agregó serina (36.28 \pm 5.033 nmol/mg prot/10 min). La serina es uno de los sustratos del sistema de transporte ASC, pero no del sistema A. La alanina, por ser un sustrato del sistema A podría inhibir el transporte de glicina mediante competencia (Figura 8).

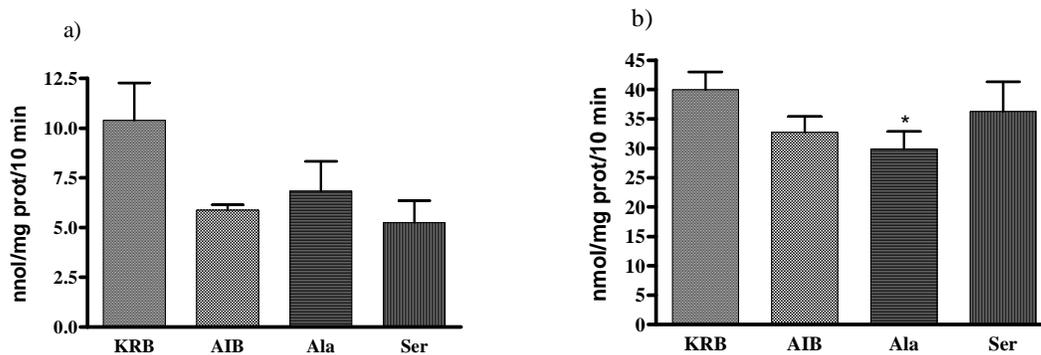


Fig 8. Especificidad del transporte de glicina. Las células se preincubaron durante 15 minutos en presencia de los aminoácidos AIB, Ala o Ser a una concentración 5 mM. Inmediatamente después se realizó el ensayo, incubando a las células con a) glicina 25 μ M o b) Gly 1 mM. Existen diferencias significativas respecto al control en * $P \leq 0.01$, aplicando una prueba t de Student.

Identificación molecular de las isoformas de los transportadores de glicina de alta afinidad

1. Expresión del mGlyT1 en el EPR

La inhibición con sarcosina indica que el transporte de alta afinidad está mediado por GlyT1. Existen tres isoformas de dicho transportador (GlyT1a, GlyT1b y GlyT1c). Éstas no presentan diferencias significativas en cuanto a sus características cinéticas y no se conocen compuestos específicos que permitan identificarlas mediante inhibición farmacológica. Sin embargo, se sabe que todas difieren en sus extremos amino terminal y las secuencias de los mensajeros están reportadas. Se diseñaron oligos específicos para cada isoforma del transportador GlyT1. Por medio de un ensayo de RT-PCR se amplificó la región amino de la variante GlyT1a, pero no de GlyT1b, ni de GlyT1c. También se usaron oligonucleótidos específicos para actina, como un control positivo del ensayo de PCR. El peso molecular de los productos de PCR corresponde al esperado, según

el diseño de los oligonucleótidos. El peso molecular esperado para GlyT1a fue de 399 pb y para la actina de 328 pb (Figura 9).

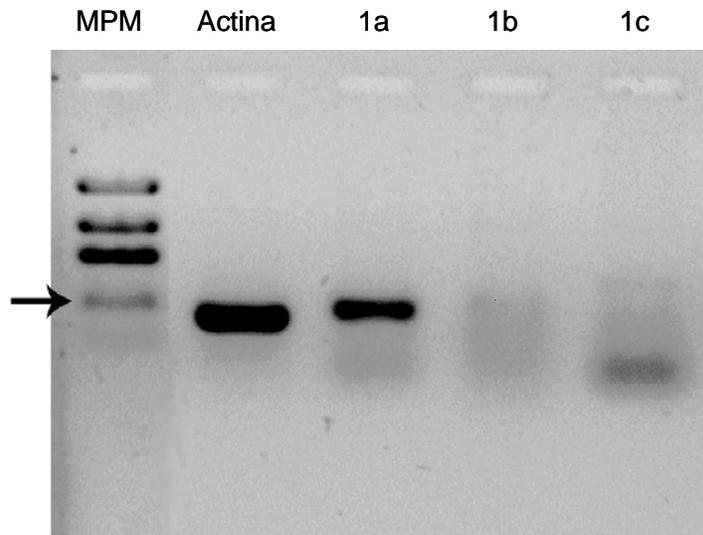


Figura 9. Amplificación de las isoformas de GlyT1 mediante RT-PCR. Se detectó la expresión de la isoforma GlyT1a en cultivos confluentes de EPR de rata, mediante la amplificación de su región amino terminal. Las flecha (→) indica un peso molecular de 400 pb.

2. Expresión del mGlyT2 en el EPR

Se sabe que el gen de GlyT2 de rata expresa dos isoformas del transportador: GlyT2a y GlyT2b. Para determinar si las células de EPR expresan alguna de las variantes, se diseñaron oligos específicos para la región amino terminal de los transportadores. Las reacciones de RT-PCR revelaron que las células de EPR no expresan a ninguna de las isoformas de GlyT2. Con el fin de determinar si las condiciones de amplificación eran correctas, se utilizó tallo cerebral de rata como control positivo, con lo que se elimina la posibilidad de tener un falso negativo (Figura 10).

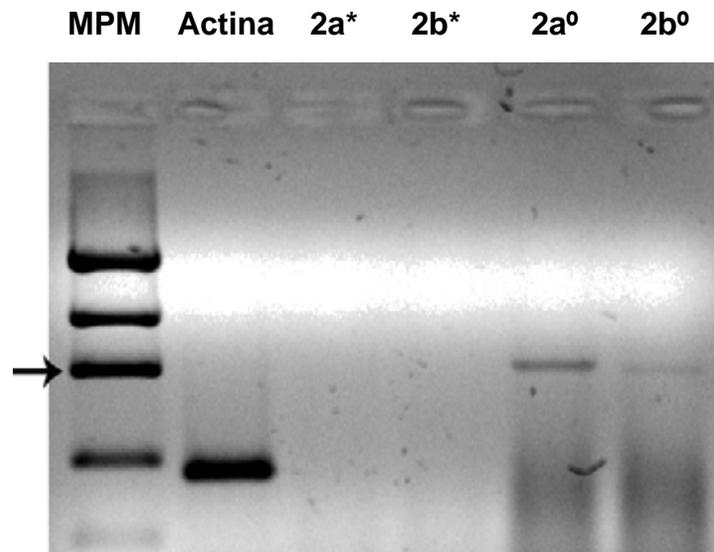


Figura 10. Amplificación de las isoformas de GlyT2 mediante RT-PCR. No se detectó ninguna de las isoformas de GlyT2 en las células de EPR (*). Se amplificaron los transportadores GlyT2a y GlyT2b en tallo cerebral (⁰), con el fin de eliminar falsos negativos. Las flecha (→) indica un peso molecular de 800 pb.

DISCUSIÓN

El epitelio pigmentado de la retina es una monocapa celular cuya función principal es mantener la viabilidad y funcionamiento de la retina neural (Strauss, 2005). El EPR está diferenciado en un epitelio secretor que es mitóticamente inactivo. Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas, sufre una transdiferenciación epitelio-mesénquima, que resulta en la proliferación y migración de sus células (Lee *et al.*, 2001). Diversos trabajos han sugerido que uno de los factores que induce estos cambios es el aumento en la concentración de glutamato por la ruptura de la barrera hematorretiniana (Abe *et al.*, 1996). Además, ciertos estímulos como la falta de oxígeno, pueden inducir a la retina a liberar el glutamato contenido en sus neuronas (Osborne *et al.*, 1999).

El EPR expresa receptores de glutamato, particularmente receptores ionotrópicos de AMPA y de NMDA, y en menor medida receptores metabotrópicos del grupo I (mGluR1). Se ha observado que el glutamato induce la proliferación del tejido mediante la activación aberrante de los receptores de tipo NMDA (Pacheco-Domínguez *et al.*, 2008). La activación de dichos receptores requiere de la unión conjunta de glutamato y de su coagonista, la glicina (Paoletti y Neyton, 2007). Por lo que se ha propuesto que, en ciertas retinopatías de tipo proliferativo, el coagonista también juega un papel importante en el desarrollo de la excitotoxicidad (Hama, 2006). Debido a la importancia fisiológica de la glicina, el EPR debe de expresar sistemas de transporte que regulen la concentración extracelular del coagonista y en consecuencia, los efectos del glutamato sobre el epitelio.

Es por eso que el presente trabajo tuvo como objetivo principal caracterizar bioquímica, cinética y farmacológicamente el transporte de glicina en cultivos de EPR de rata.

Se demostró la presencia de dos sistemas de transporte de glicina. Uno de alta afinidad, que corresponde al transportador de glicina tipo 1, específicamente a la isoforma GlyT1a, y un componente de baja afinidad cuyas características farmacológicas corresponden con el sistema ASC. Nos centramos en la identificación del transportador de alta afinidad, debido a que éstos transportadores son los principales responsables de regular la cantidad extracelular de neurotransmisores en el SNC (Pow, 2001).

El transporte de glicina en los cultivos de EPR depende de energía metabólica y es sensible a los cambios de pH. El transporte disminuyó significativamente por la inclusión simultánea de los inhibidores metabólicos cianuro de potasio y ouabaína. Probablemente, este efecto tenga que ver con la modificación en la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ . Mientras que los cambios de pH, deben de modificar la conformación tridimensional de la proteína, y en consecuencia su actividad.

El análisis cinético de la curva de saturación reveló que el sistema de alta afinidad tiene una K_m de $54.48 \mu\text{M}$ y una V_{max} de $399.9 \text{ nmol/mg prot.}$ Dichas constantes son similares a las reportadas por Guastella y colaboradores (1992) para la isoforma GlyT1a en la línea celular C6 de glioma de rata ($K_m= 44.70 \mu\text{M}$), y más aún a las reportadas por Okamoto y colaboradores (2009) para la isoforma GlyT1 de la línea celular TR-iBRB2 utilizada como un modelo de barrera hematorretiniana interna ($55.40 \mu\text{M}$).

Además, el componente de alta afinidad requiere de la presencia extracelular de los iones sodio y cloro, lo que corresponde a las características de la familia de transportadores de glicina de alta afinidad. Debido a que GlyT1 cotransporta los iones sodio y cloro junto con la glicina, este tipo de transportadores podría contribuir a mantener el gradiente iónico característico del EPR.

El transporte de alta afinidad se inhibió en presencia de sarcosina, un derivado de la glicina que inhibe de manera específica a GlyT1. Este resultado es congruente

con lo encontrado en la amplificación con la técnica de RT-PCR. Con lo que se concluyó que las células de EPR expresan al transportador GlyT1 y no a GlyT2.

Por su parte, el transportador de baja afinidad corresponde con el sistema ASC. La actividad de dicho transportador depende de sodio extracelular y se inhibe con el aminoácido neutro alanina (O'Brein *et al.*, 2005). Existen pocos estudios sobre la función de los transportadores de neurotransmisores de baja afinidad en el SNC, pero se ha propuesto que, además de tener funciones metabólicas, podrían colaborar con los transportadores de alta afinidad en la recaptura del neurotransmisor poco tiempo después de su liberación, cuando las concentraciones son elevadas (Gadea, 2002).

Zafra y colaboradores (1995) sugirieron que en la retina, el único tipo celular que presenta transportadores de glicina son las células amacrinas; por su parte Gadea y colaboradores (1999) describieron un transportador de glicina de alta afinidad en la glía de Müller. En el presente trabajo se demostró que el epitelio pigmentado de la retina también expresa transportadores de neurotransmisores de alta afinidad, particularmente la isoforma a del transportador de glicina tipo 1 (GlyT1a).

Todos los ensayos se hicieron en cultivos de EPR de rata. Éste resulta un buen modelo pues permite manipular las condiciones del medio de manera eficiente. Adicionalmente, el pasaje de las células permite descartar otros tipos celulares que coexisten con las células de EPR en los cultivos primarios. Es importante aclarar que las células mantuvieron características esenciales del EPR *in vivo* como la expresión del marcador RPE65.

Tanto el glutamato, como la glicina, son neurotransmisores esenciales en la retina (Pow, 2001). La glicina, junto con GABA, regula la inhibición lateral, mientras que el glutamato participa en la neurotransmisión de la vía excitadora, desde los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las amacrinas (Copenhagen, 1991; López-Colomé y Murbartián, 1994). Debido a la íntima relación del EPR con

los fotorreceptores, el glutamato liberado de la vía excitadora podría por difusión, entrar en contacto con el epitelio pigmentado y podría activar a los receptores presentes en el tejido. Por lo anterior, la expresión de transportadores de glicina también es importante en condiciones fisiológicas.

En el sistema nervioso central, la presencia de GlyT1 se relaciona con áreas donde predomina la expresión de receptores de NMDA y la transmisión excitadora. Estudios hechos en células gliales han demostrado que GlyT1 juega un papel importante en mantener la concentración local de glicina por debajo de los niveles de saturación para los receptores de NMDA, de manera que el incremento en la concentración extracelular del aminoácido es capaz de potenciar la actividad de estos receptores (Supplisson y Bergman, 1997; Bergeron *et al.*, 1998).

En el presente trabajo se caracterizó el transporte de glicina en el epitelio pigmentado de la retina en condiciones fisiológicas. Estos resultados nos permitirán el análisis de las vías de señalamiento intracelular que regulan la actividad y expresión de los transportadores de glicina de alta afinidad, así como determinar si la elevación del glutamato extracelular altera las vías de señalamiento intracelular que controlan el transporte de glicina en condiciones patológicas. Este análisis, a sumar, es indispensable para investigar la posible intervención de la glicina en la inducción de la proliferación del EPR a través de la activación de los receptores de NMDA.

REFERENCIAS

- Abe, T., K. Durlu y M. Tamai. 1996. The properties of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy compared with cultured retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research* 63: 201-210.
- Adams, R. H., K. Sato, S. Shimada, M. Tohyama, A. W. Puschel y H. Betz. 1995. Gene structure and glial expression of the glycine transporter GlyT1 in embryonic and adult rodents. *Journal of Neuroscience* 15: 2524-2532.
- Anson, L. C, P. E. Chen, D. J. Wyllie, D. Colquhoun y R. Schoepfer. 1998. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 18: 581-589.
- Anson, L. C., R. Schoepfer, D. Colquhoun y D. J. Wyllie. 2000. Single-channel analysis of an NMDA receptor possessing a mutation in the region of the glutamate binding site. *Journal of Physiology* 527: 225-237.
- Aubrey, K. R., A. D. Mitrovic y R. J. Vandenberg. 2000. Molecular basis for proton regulation of glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *Molecular Pharmacology* 58: 129-135.
- Barmack, N. H., H. Guo, H. J. Kim, H. Qian y Z. Qian. 1999. Neuronally modulated transcription of a glycine transporter in rat dorsal cochlear nucleus of the medial trapezoid body. *Journal of Comparative Neurology* 415: 175-188.
- Barnsatable, C. J. 1993. Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Current Opinion in Neurobiology* 3: 530-525.

- Bertram, K. M., D. V. Bula, J. S. Pulido, S. A. Shippy, S. Gautam, M. J. Lu, R. M. Hatfield, J. H. Kim, M. T. Quirk y J. G. Arroyo. 2008. Amino-acid levels in subretinal and vitreous fluid of patients with retinal detachment. *Eye* 22: 582-589.
- Borowsky, B. y B. Hoffman. 1998. Analysis of a gene encoding two glycine transporter variants reveals alternative promoter usage and a novel gene structure. *The Journal of Biology Chemistry* 273: 29077-29085.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* 72: 248-254.
- Chaki, S., R. Yoshikawa y S. Okuyama. 2006. Group II metabotropic glutamate receptor-mediated regulation of dopamine release from slices of rat nucleus accumbens. *Neurosciences Letters* 404: 182-186.
- Chatterton, J. E., M. Awobuluyi, L. S. Premkumar, H. Takahashi, M. Talantova, Y. Shin, J. Cui, S. Tu, K. A. Sevarino, N. Nakanishi, G. Tong, S. A. Lipton y D. Zhang. 2002. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415: 793-798.
- Copenhagen, D. R. 1991. Synaptic transmission in the retina. *Current Opinion in Neurobiology* 1: 258-262.
- Cubelos, B., G. Cecilio y F. Zafra. 2005. Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cerebral Cortex* 15: 448-459.
- Cull-Candy, S., S. Brickley y M. Farrant. 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 327-335.

Cunha-Vaz, J. G. 1997. The blood-ocular barriers: past, present, and future. *Documenta Ophthalmologica* 93: 149-157.

Diederer, R. M. H., E. C. La Heij, N. E. P. Deutz, A. Kijlstra, A. G. H. Kessels, H. M. H. van Eijk, A. T. A. Liem, S. Dieudonné y F. Hendrikse. 2006. Increased glutamate levels in the vitreous of patients with retinal detachment. *Experimental Eye Research* 83: 45-50.

Ebihara, S., T. Yamamoto, O. Kunihiko e Y. Yanagawa. 2004. Gene structure and alternative splicing of the mouse glycine transporter type-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317: 857-864.

Ehrlich, R., A. Harris, N. S. Kheradiya, D. M. Winston, T. A. Ciulla y B. Wirotko. 2008. Age-related macular degeneration and the aging eye. *Clinical Interventions in Ageing* 3: 473-482.

Fornés, A., E. Núñez, P. Alonso-Torres, C. Aragón y B. López-Corcuera. 2008. Trafficking properties and activity regulation of the neuronal glycine transporter GlyT2 by protein kinase C. *Biochemical Journal* 412: 495-506.

Fragoso, G. y A. M. López-Colomé. 1999. Excitatory amino acid-induced inositol phosphate formation in cultured retinal pigment epithelium. *Visual Neuroscience* 16: 263-269.

Gadea, A., E. López y A. M. López-Colomé. 1999. Characterization of glycine transport in cultured Müller glial cells from the retina. *Glia* 26: 273-279.

Gadea, A. y A. M. López-Colomé. 2001. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA III. Glycine transporters. *Journal of Neuroscience Research* 64: 218-222.

- Gadea, A., E. López, A. Hernández-Cruz y A. M. López-Colomé. 2002. Role of Ca²⁺ and calmodulin-dependent enzymes in the regulation of glycine transport in Müller glia. *Journal of Neurochemistry* 80: 634-645.
- García, S., E. López y A. M. López-Colomé. 2008. Glutamate accelerates RPE cell proliferation through ERK 1/2 activation via distinct receptor-specific mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry* 104: 377-390.
- Geerlings, A., E. Núñez, B. López-Corcuera y C. Aragón. 2001. Calcium- and syntaxin 1-mediated trafficking of the neuronal glycine transporter GLYT2. *The Journal Of Biological Chemistry* 276: 17584–17590.
- Guastella, J., N. Brecha, C. Weigmann, H. A. Lester y N. Davidson. 1992. Cloning, expresión and localization of a rat brain high affinity glycine transporter. *Proc Natl Academy of Science* 89: 7189-7193.
- Hama, Y., H. Katsuki, Y. Tochikawa, C. Suminaka, T. Kume y A. Akaike. 2006. Contribution of endogenous glycine site NMDA agonists to excitotoxic retinal damage in vivo. *Neuroscience Research* 56: 279-285.
- Harsing, L. G Jr, I. Gacsalyi, G. Szabo, E. Schmidt, N. Sziray, C. Sebban, B. Tesolin-Decros, P. Matyus, A. Egyed, M. Spedding y G. Levay. 2003. The glycine transporter-1 inhibitors NFPS and Org 24461: a pharmacological study. *Pharmacological and Biochemical Behavior* 74: 811-825.
- Javitt, D. C., L. Duncan, A. Balla y H. Sershen. 2005. Inhibition of system A-mediated glycine transport in cortical synaptosomes by therapeutic concentrations of clozapine: implications for mechanisms of action. *Molecular Psychiatry* 10: 275-287.

Jursky, F., T. Shigehiko, T. Akiko, S. Mandiyan, H. Nelson y N. Nelson. 1994. Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *Journal of Experimental Biology* 196: 2283–295.

Kalbaugh, T. L., J. Zhang y J. S. Diamond. 2009. Coagonist release modulates NMDA receptor subtype contributions at synaptic inputs to retinal ganglion cells. *Neuroscience* 29: 1469–1479.

Kandel, E. R. y S. A. Siegelbaum. 2000. Synaptic integration. En: Kandel, E. R., J. H. Schwartz y T. M. Jessell (eds). *Principles of neural science*. McGraw-Hill, Nueva York, pp. 507-522.

Kew, J. N. y J. A. Kemp. 2005. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 179: 4-29.

Kim, K. M., S. F. Kingsmore, H. Han, T. L. Yang-Feng, N. Godinot, M. F. Seldin, M. G. Caron y B. Giros. 1994. Cloning of the human glycine transporter type 1: Molecular and pharmacological characterization of novel isoform variants and chromosomal localization of the gene in the human and mouse genomes. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 45: 608-617.

Kuryatov, A., B. Laube, H. Betz y J. Kuhse. 1994. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12: 1291-1300.

Laube, B., J. Kuhse y H. Betz. 1998. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 18: 2954-2961.

- Lee, S. C., O. W. Kwon, G. J. Seong, S. H. Kim, J. E. Ahn y E. D. P. Kay. 2001. Epitheliomesenchymal transdifferentiation of cultured RPE cells. *Ophthalmic Research* 33: 80-86.
- Liu, Q. R., B. López-Corcuera, S. Mandiyan, H. Nelson y N. Nelson. 1993. Cloning and expresión of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *The American Society for biochemistry and molecular biology* 268: 22802-22808.
- López-Colomé, A. M., A. Ortega y M. Romo-de-Vivar. 1993a. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Müller glia. *Glia* 9: 127-135.
- López-Colomé, A. M., R. Salceda y G. Fragoso. 1993b. Specific interaction of glutamate with membranes from cultured retinal pigment epithelium. *Journal of Neuroscience Research* 34: 454-461.
- López-Colomé, A. M., G. Fragoso, C. E. Wright y J. A. Sturman. 1994. Excitatory amino acid receptors in membranes from human retinal pigment epithelium. *Current Eye Research* 13: 553-560.
- López-Colomé, A. M. y J. Murbartián. 1994. El glutamato en la retina de los vertebrados: de los receptores membranales a la regulación génica. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 45: 101-112.
- Malandro, M. S. y M. S. Kilberg. 1996. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annual Reviews* 65: 305-36.
- Marmor, F. M. 1998. Structure, function, and disease of the retinal pigmented epithelium. En: Marmor, F. M. y T. Wolfensberger (eds). *The Retinal Pigmented Epithelium*. Oxford Press, New York, pp. 3-9.

- Michaelis, E. K. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology* 54: 369-415.
- Miller, J. W., D. T. Kleven, B. A. Domin y R. T. Fremeau, Jr. 1997. Cloned sodium- (and chloride-) dependent high-affinity transporters for GABA, glycine, proline, betamine, taurine, and creatine. En: Reith, M. E. A. (ed). Neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. Human Press, Nueva Jersey, pp. 101-140.
- Niang-Hang, C., M. E. A. Reith y M. W. Quick. 2004. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride- dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch* 447: 519-531.
- Núñez, E., B. López-Corcuera, J. Vázquez, C. Giménez, C. Aragón. 2000. Differential effects of the tricyclic antidepressant amoxapine on glycine uptake mediated by the recombinant GlyT1 and GlyT2 transporters. *British Journal Pharmacology* 129: 200-206.
- O'Brein, K., R. F. Miller y M. T. Bowser. 2005. D-serine uptake by isolated retinas is consistent with ASCT-mediated transport. *Neuroscience Letters* 385: 58-63.
- Pacheco-Domínguez, R. L., J. P. Palma-Nicolas, E. López y A. M. López-Colomé. 2008. The activation of MEK-ERK 1/2 by glutamate receptor-stimulation is involved in the regulation of RPE proliferation and morphologic transformation. *Experimental Eye Research* 86: 207-219.
- Paoletti, P. y J. Neyton. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* 7: 39-47.

- Pastor, J. C., E. R. de la Rúa y F. Martín. 2002. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog. Retin. Eye Research* 21: 127-144.
- Ponce, J., I. Poyatos, C. Aragón, C. Giménez y F. Zafra. 1998. Characterization of the 5' region of the rat brain glycine transporter GLYT2 gene: identification of a novel isoform. *Neuroscience Letters* 242: 25-28.
- Pow, D. V. y A. E. Hendrickson. 1999. Distribution of the glycine transporter GlyT-1 in mammalian and nonmammalian retinae. *Visual Neuroscience* 16: 231-239.
- Pow, D. V. 2001. Amino acids and their transporters in the retina. *Neurochemistry International* 38: 463-484.
- Pulido, J. E., J. S. Pulido, J. C. Erie, J. Arroyo, K. Bertram, M. J. Lu y S. A. Shippy. 2007. A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease. *Experimental Diabetes Research* 2007: 1-7.
- Purves, D., G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, L. C. Katz, A. S. LaMantia y J. O. McNamara (eds). 1997. Neuroscience. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Schwartz, E. A. 1993. L-glutamate conditionally modulates the K⁺ current of Müller glial cells. *Neuron* 10: 1141-1149.
- Strauss, O. 2005. The retinal pigmented epithelium in visual function. *Physiological Reviews* 85: 845- 881.
- Supplisson, S. y M. J. Roux. 2002. Why glycine transporters have different stoichiometries. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 529: 93-101.

- Szatkwoski, M., B. Barbour y D. Attwell. 1990. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348: 443-446.
- Tessier-Lavigne, M. 2000. Visual processing by the retina. En: Kandel, E. R., J. H. Schwartz y T. M. Jessell (eds). Principles of neural science. McGraw-Hill, Nueva York, pp. 507-522.
- Thoreson, W. B. y P. Witkovsky. 1999. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 18: 765-810.
- Uchida, N., Y. Kiuchi, K. Miyamoto, J. Uchida, T. Tobe, M. Tomita, S. Shioda, Y. Nakai, R. Koide y K. Oguchi. 1998. Glutamate-stimulated proliferation of rat retinal pigment epithelial cells. *European Journal of Pharmacology* 343: 265-273.
- Uhl, G. y P. Johnson. 1994. Neurotransmitter transporters: three important gene families for neuronal function. *Journal of Experimental Biology* 196: 229-236.
- Volker, E., W. Arnsen, H. Betz y J. Gomeza. 2005. Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends in Biochemical Sciences* 30: 325-333.
- Wang, T. F., C. N. Ding, G. S. Wang, S. C. Luo, Y. L. Lin, Y. Ruan, R. Hevner, J. L. Rubenstein y Y. P. Hsueh. 2004. Identification of Tbr-1/CASK complex target genes in neurons. *Journal Neurochemistry* 91: 1483-1492.
- West, K. L., M. A. Castellini, M. K. Duncan y M. Bustin. 2004. Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Molecular and Cellular Biology* 24: 3747-3756.

Zafra, F., C. Aragon, L. Olivares, N. C. Danbolt, C. Gimenez y J. Storm-Mathisen. 1995. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *Journal of Neuroscience* 15: 3952-3969.

Zafra, F. y C. Jiménez. 2008. Glycine transporters and synaptic function. *IUBMB Life* 60: 810-817.