

150
2e1



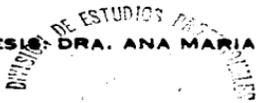
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACION DEL SITIO DE GLICINA
INSENSIBLE A ESTRICNINA EN LA RETINA**

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 :
ADRIAN RODRIGUEZ CONTRERAS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANA MARIA LOPEZ COLOME



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrin Barule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Caracterización del Sitio de Glicina Insensible a Estricnina en la Retina.
realizado por Adrián Rodríguez Contreras
con número de cuenta 9350437-3 pasante de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario
Propietario
Propietario
Suplente
Suplente

Dra. Ana María López Colomé
Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Dra. María Eugenia Gensebatt Bonaparte
Dra. María Luisa Fanjul Peña
M. en C. ~~ARGÜEZ~~ García Argüez

Ana M. López Colomé
M. Díaz Muñoz
M. Eugenia Gensebatt Bonaparte
M. Luisa Fanjul Peña
M. en C. García Argüez

Com. de Estudios Profesionales de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

A Jen, Febrero de 1997.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., y con el apoyo parcial del donativo CONACYT 400346-5-3375N.

Adrián Rodríguez Contreras fué becario del Programa Iniciación Temprana a la Investigación y a la Docencia (primera y tercera etapas), y del Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (Fundación U.N.A.M.) durante el periodo de septiembre a febrero de 1996.

Agradecimientos.

A la Dra. Ana María López Colomé, por su entusiasmo y comprensión, por sus comentarios y por su amistad.

A los miembros del jurado Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte; Dr. Mauricio Díaz Muñoz; M. en C. Aída Nelly García Argáez y Dra. María Luisa Fanjul Peña, por sus comentarios y sugerencias.

A mis compañeros de laboratorio por su invaluable paciencia.

Índice.

Resumen	3	
Abreviaturas	5	
I. Introducción.		
1. Estructura del ojo	6	
2. La retina: un modelo de estudio para la neurotransmisión.	9	
A. Estructura de la retina	9	
B. Neurotransmisión en la retina	13	
3. Neurotransmisión excitadora	14	
A. Receptores glutamatérgicos.	15	
B. Distribución de los receptores de NMDA en el SNC y en la retina	22	
C. El sitio de unión a glicina en el receptor de NMDA	26	
II. Planteamiento del problema		32
III. Materiales y métodos.		
1. Obtención de membranas sinaptosomales	33	
2. Experimentos con Glicina-H¹	34	
A. Experimentos de inhibición	34	
B. Experimentos de saturación	36	

C. Experimentos con respecto al tiempo	36
D. Efecto del pH	36
3. Estadística	37
4. Reactivos	37

IV. Resultados.

1. Análisis farmacológico de la interacción de glicina- H^3 a membranas sinaptosomales de la retina	38
2. Cinética de la unión de glicina- H^3 a receptores insensibles a estricnina en la retina	41
3. Efecto del pH sobre la unión de glicina- H^3 a membranas sinaptosomales de la retina	47
4. Efecto de ligandos que interactúan con el receptor de NMDA en la unión de glicina- H^3 a membranas sinaptosomales de la retina	47

V. Discusión

1. Farmacología	51
2. Cinética de la unión de glicina- H^3	54
3. Modificación de la unión de glicina- H^3 en membranas sinaptosomales de la retina.	56
VI. Conclusiones	62
VII. Referencias	64

Resumen.

El receptor de NMDA es una proteína oligomérica que forma un canal catiónico el cual participa en la neurotransmisión excitadora tanto en el sistema nervioso central como en la retina de los vertebrados. En el sistema nervioso central, la actividad de dicho canal puede ser modulada por varios compuestos, tanto endógenos como exógenos, y particularmente por la glicina que es coagonista del glutamato. La diversidad funcional de la neurotransmisión excitadora rápida se debe principalmente a la existencia de varias subunidades homólogas que determinan configuraciones de receptores glutamatérgicos con diversas estequiometrías. Estas diferencias estructurales constituyen la base funcional de los diversos efectos del glutamato, tanto en condiciones normales como patológicas. Por otra parte, existe evidencia de que los receptores glutamatérgicos en la retina, en particular el receptor de NMDA, participan en varios procesos análogos a los que ocurren en el sistema nervioso central (e.g., diferenciación, establecimiento de los circuitos neuronales durante el desarrollo y neurotoxicidad). El propósito de este trabajo fué la caracterización del sitio de glicina insensible a estricnina en la retina, desde un punto de vista farmacológico y cinético, para lo que se empleó la técnica de unión de radioligandos midiendo la unión de glicina- H^3 en membranas obtenidas de terminales sinápticas de las capas plexiformes externa (fracción P1) e interna (fracción P2) de retinas de pollos de 1 a 5 días de edad. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y en una solución amortiguada con Tris 4.5 mM y Hepes 5 mM (pH = 7.4), en condiciones de equilibrio. La unión específica de glicina- H^3 en los ensayos fué del 60 al 80 % de la unión total. Dicha unión es reversible, saturable ($K_D = 140.31235 \pm 0.000061$ nM, $B_{m\acute{a}x} = 2.381 \pm 0.3464$ pmol/mg de proteína en P1 y $K_D = 196.72 \pm 0.00002307$ nM, $B_{m\acute{a}x} = 12.70 \pm 2.25$ pmol/mg de proteína en P2) y

presenta un perfil farmacológico con alta afinidad por los agonistas glicina ($IC_{50} = 1.36 \mu M$ en P1, $IC_{50} = 11.01 \mu M$ en P2) y D-serina ($IC_{50} = 61.96 \mu M$ en P1, $IC_{50} = 66.23 \mu M$ en P2) . y por el agonista parcial del sitio para glicina en el receptor de NMDA ácido 1-amino-ciclopropil carboxílico ($IC_{50} = 1.00 \mu M$ en P1, $IC_{50} = 6.067 \mu M$ en P2). Sin embargo, la potencia de dos de los antagonistas más selectivos para el sitio de glicina en el receptor de NMDA, ácido 7-cloro kinurénico y ACEA-1021, es baja ($IC_{50} > 50 \mu M$ y $500 \mu M$ respectivamente). Por otra parte, la interacción con ligandos glicinérgicos (agonistas y antagonistas) que actúan sobre receptores de tipo inhibitor postsináptico, como el alcaloide estriquina, fué de muy baja afinidad ($IC_{50} = 398.11 \mu M$ en P1 y $251.19 \mu M$ en P2) lo cual puede explicarse en términos del ambiente iónico y del radioligando. La unión específica de glicina- H^3 no se modifica en presencia de agonistas y antagonistas del glutamato, sin embargo a $pH < 7.4$ disminuye, de manera concordante con estudios funcionales que demuestran que la afinidad de la glicina en el receptor de NMDA disminuye de manera paralela a la frecuencia de apertura del canal (Tang y col., 1989; Traynelis y Cull-Candy, 1990). Por otra parte, la variación de la unión específica de glicina- H^3 en el intervalo de pH de 5 a 9 concuerda con la participación de residuos de aminoácidos que son relevantes para la formación del sitio de glicina en el receptor de NMDA. Estos resultados indican que en la retina, la glicina además de funcionar como transmisor inhibitor a través de receptores sensibles a estriquina, podría funcionar como coagonista excitador en los receptores de NMDA a través de un sitio que presenta diferencias importantes con respecto al caracterizado en neuronas del sistema nervioso central.

Abreviaturas.

ACEA 1021 = 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalina-2,3-diona.

ACPC = Ácido 1-amino ciclopropil carboxílico.

ACPD = Ácido 1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico.

AMPA = Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico.

AP4 = Ácido 2-amino-4-fosfonopropiónico.

AP5 = Ácido 2-amino-5-fosfonoheptanóico.

AP7 = Ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico.

Ci = Curie, unidad de radioactividad.

7-Cl-K = Ácido 7-cloro kinurénico

DNQX = 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-di-ona.

EDTA = Ácido etilen-diamino-tetra acético.

GABA = Ácido γ -amino butírico

Gli = Glicina

Gli-H³ = Glicina tritiada

Hepes = Ácido N(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico).

k₋₁ = Constante de asociación.

k₁ = Constante de disociación.

L-glu = Ácido L-glutámico

MK-801 = Dizoscilpina.

mGluR = Receptor metabotrópico glutamatérgico.

mRNA = RNA mensajero

NMDA = Ácido N-metil-D-aspartico

SNC = Sistema nervioso central

Tris = Tris (hidroxi-metil)amino metano.

I. Introducción.

I. Estructura del ojo.

El sistema visual de los vertebrados presenta una organización anatómica muy conservada en la escala filogenética, que se ha modificado funcionalmente de acuerdo a las necesidades y medio de vida de una gran variedad de organismos. El ojo es un componente esencial de este sistema, pues actúa como fotorreceptor y permite la transducción de la señal luminosa a los centros de integración localizados en el SNC. Dichas funciones se llevan a cabo gracias a la organización anatómica de varios tejidos en tres capas principales. La capa más externa, formada por la córnea y la esclerótica, protege mecánicamente a las estructuras internas; la córnea, localizada anteriormente, se compone principalmente de fibras de colágena rodeadas por una delgada capa de epitelio en un arreglo tal que adquiere una apariencia translúcida, por lo que participa en la transmisión de la luz ayudando a enfocar los rayos que pasan a través de ésta. En la córnea existen fibras nerviosas que se distribuyen desde la periferia hacia el centro de la misma, y que se asocian con nociceptores y termocceptores sensibles al frío pero no al calor (Hole Jr., 1990). La córnea se continúa posteriormente con la esclerótica o esclera que en los humanos representa a la porción blanquecina del ojo. Esta parte se compone principalmente por tejido conectivo que sirve de soporte a los músculos extrínsecos del ojo; en la región más posterior presenta un punto de contacto con la meninge más externa (la duramadre), así como un orificio que permite la vascularización de la capa intermedia, y la salida del nervio óptico hacia los núcleos localizados en el tálamo y en el cerebro medio en el SNC. Como ya se ha mencionado, la capa intermedia es vascular, provee de nutrientes a las otras capas y

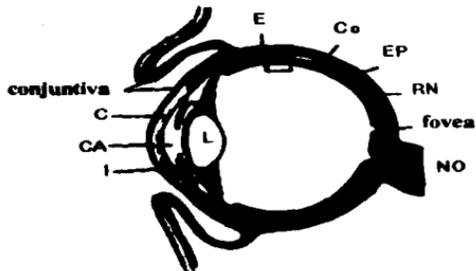


Figura 1. Esquema de una sección horizontal de un ojo de vertebrado superior. E, esclera; Co, coroides; EP, epitelio pigmentado; RN, retina neural; NO, nervio óptico; I, iris; CA, cámara anterior; L, lente; C, córnea (modificado de Farber y Adler, 1986).

2. La retina como modelo de estudio para la neurotransmisión.

La idea actual que se tiene acerca de la organización celular de la retina de los vertebrados se basa principalmente en los trabajos de Cajal (1928) y más recientemente en el trabajo de Boycott y Dowling (1969). Tanto por su accesibilidad y facilidad de manipulación, como por sus características anatómicas y funcionales se ha propuesto a la retina como un modelo experimental para estudiar procesos análogos a los que ocurren en el SNC (Farber y Adler, 1986), que como el de la neurotoxicidad generada durante eventos de estrés oxidativo, la isquemia o la hipoxia, están ampliamente relacionados con la neurotransmisión excitadora (Olney y col., 1986; Lombardi y col., 1994; Agosthino y col., 1995).

A. Estructura de la retina.

Estructural y funcionalmente se han descrito en la retina una porción no neural y una porción neural o sensorial que presentan un patrón anatómico altamente conservado en la filogenia de los vertebrados (Rodieck, 1973), y que en algunas especies presenta diferencias anatómicas y funcionales que seguramente reflejan el resultado de procesos de tipo evolutivo y adaptativo (Wikler y Finlay, 1989). La retina no neural, como ya se ha mencionado, corresponde al epitelio pigmentado, que es una capa de células hexagonales que descansa sobre la membrana de Bruch y que forma parte de lo que se ha denominado como barrera hematorretiniana, pues controla el flujo de iones y de compuestos como ciertos aminoácidos y vitaminas desde las capas más externas del ojo hacia la retina neural, en especial desde los capilares localizados en la coroides. En la porción

neural se localizan los fotorreceptores, neuronas y células gliales, que mantienen relaciones funcionales y tróficas específicas entre sí, con el epitelio pigmentado, y con neuronas localizadas en núcleos específicos del tálamo y del cerebro medio en el SNC. El origen embrionario de la retina es el tubo neural, que en etapas muy tempranas forma dos evaginaciones que corresponden a las vesículas ópticas, y que posteriormente se invaginan para formar las copas ópticas. Las células de la pared interna de estas estructuras dan origen a la porción neural y no neural de la retina mediante un proceso de diferenciación que aún no se entiende del todo. En la retina del adulto todas las células son postmitóticas, y en términos generales se pueden identificar, por su posición, forma, propiedades bioquímicas y función, 6 tipos celulares: los fotorreceptores (conos y bastones), las células horizontales, las células bipolares, las células amacrinas, las células interplexiformes y las células ganglionares. La estructura de la retina neural, como la de otras estructuras que participan en la vía visual, es de tipo laminar. En ella se pueden distinguir 5 capas, de las cuales tres son celulares y dos son sinápticas (ver figura 2). La capa nuclear externa contiene a los somas de los fotorreceptores (conos y bastones), que establecen sinápsis con interneuronas localizadas en la capa nuclear interna formando la primera capa sináptica o capa plexiforme externa. La capa nuclear interna contiene los somas de las células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes. Las células horizontales y amacrinas participan respectivamente en las interacciones laterales de la región superior e inferior de la capa nuclear interna; las células interplexiformes, como su nombre lo indica, establecen conexiones en ambas capas sinápticas. Las células bipolares transmiten la información transducida por los fotorreceptores a las células ganglionares, formando así la capa sináptica interna o capa plexiforme interna, en la que participan las células amacrinas e interplexiformes, y que tiene la particularidad de estar vascularizada en algunas especies de

vertebrados; en el caso de las aves, la retina neural es avascular. Finalmente, de la capa de las células ganglionares se proyecta el nervio óptico hacia los centros de control e integración de la información visual localizados en el cerebro medio y en el tálamo.

Otro tipo celular importante en la fisiología retiniana es la glía. En la mitad interna de las retinas vascularizadas se han identificado astrocitos, glía perivascular y microglía, y en algunas aves se han descrito células mielinizantes (Farber y Adler, 1986). Independientemente de la vasculatura retiniana, existe un tipo glial muy característico: la glía de Müller, que es de tipo radial. Las proyecciones de estas células se extienden desde la parte basal de la capa de las células ganglionares hasta el límite superior que rodea a los segmentos externos de los fotorreceptores; estas células poseen mecanismos de captura de aminoácidos y sistemas enzimáticos que como el de la glutamino sintetasa (que es esencial en el metabolismo del glutamato) y el de la anhidrasa carbónica (involucrada en el balance del pH) son relevantes para la función correcta y mantenimiento de los circuitos neurales en la retina. Aparte de su participación en las interacciones metabólicas, este tipo celular participa de manera importante en la estratificación de la retina durante el desarrollo, y muy probablemente en la formación de la barrera hematorretiniana (Tout y col., 1993).

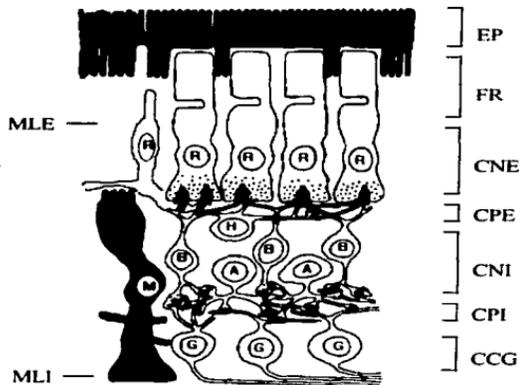


Figura 2. Organización celular en la retina. MLE, membrana limitante externa; MLI, membrana limitante interna; EP, epitelio pigmentado; FR, fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de las células ganglionares; R, célula fotorreceptora; H, célula horizontal; B, célula bipolar; A, célula amacrina; G, célula ganglionar; M, glia de Müller (modificado de Rodieck, 1973).

B. Neurotransmisión en la retina.

En la retina se ha identificado a todos los aminoácidos neuroactivos, así como las enzimas involucradas en su metabolismo. En 1986, Marc demostró que existe una organización neuroquímica precisa en la capa plexiforme interna basada en la distribución de los aminoácidos GABA, Gli y L-glu. Posteriormente, con la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas se ha comprobado que la citoarquitectura de la retina puede describirse con una base neuroquímica, de tal manera, que en la vía vertical (en la que los fotorreceptores, las células bipolares y las células ganglionares establecen sinapsis) predomina el L-glu como neurotransmisor, mientras que en las vías horizontales (en la que participan células horizontales, interplexiformes y amacrinas) predominan el GABA o la Gli (Ehinger 1977; Yazulla, 1986; Massey y Redburn, 1987; Ehinger y col., 1988; Ehinger, 1989; Marc, 1989; Marc y col., 1990; Massey, 1990; Grünert y Wässle, 1990; Kalloniatis y Marc, 1990; Davanger y col., 1991); incluso, la coexistencia de varios de los aminoácidos mencionados puede ser útil en la descripción e identificación de subtipos celulares importantes en los circuitos celulares de este órgano (Kalloniatis y Fletcher, 1993).

Estudios farmacológicos, electrofisiológicos y bioquímicos demuestran la presencia de receptores para aminoácidos excitadores en varios tipos celulares de la retina y establecen que el neurotransmisor excitador principal en ambas capas plexiformes de la retina es el L-glu (Copenhagen y Jahr, 1989; Massey, 1990; Tachibana y Okada, 1991; Barnstable, 1993). Estudios en varias especies de vertebrados indican que los fotorreceptores liberan aminoácidos excitadores que al interactuar con receptores específicos, inducen la liberación de GABA en las células

horizontales. También se sabe que las células bipolares establecen sinapsis excitadoras con las células amacrinas, que a su vez liberan GABA, acetilcolina, péptidos y otros tipos de neurotransmisores (Hofmann y Möckel, 1991; Linn y Massey, 1991; Linn y col., 1991; Duarte y col., 1993; Alfonso y col., 1994; Ferreira y col., 1994), y con la mayor parte de las células ganglionares a través de receptores con características muy similares a los que se han descrito en el SNC (Monaghan y col., 1989; López-Colomé, 1995).

3. Neurotransmisión excitadora.

El L-glu es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro, en la médula espinal y en la retina de los vertebrados (Watkins y Evans, 1981; Cotman y col., 1987; Miller y Slaughter, 1986). La demostración de la existencia de receptores para aminoácidos excitadores y de su participación en la transducción de señales de un gran número de neuronas y de células gliales ha sido importante para el estudio de la fisiología del SNC y de la retina. Por ejemplo, la entrada de calcio mediada por algunos subtipos de estos receptores facilita la estimulación de la cinasa de tipo II dependiente de calmodulina y de algunas cinasas de tirosina (Fukunaga y Soderling, 1990; Bading y Greenberg, 1991) con la consecuente modificación de la regulación transcripcional de genes como c-fos y NFGI-A durante el desarrollo y en la etapa madura del SNC (Lerea y col., 1995). En el SNC se les ha asociado con procesos de memoria y de aprendizaje ya que en preparaciones *in vitro* su actividad modifica la eficacia sináptica de las neuronas que los expresan (Bliss y Collingridge, 1993), en tanto que la actividad anormal de estas moléculas puede causar la muerte de neuronas durante procesos como la isquemia y la hipoxia (Meldrum, 1985; Rothman y Olney, 1986; Albers y col.,

1989), e incluso se ha propuesto su participación en enfermedades de tipo neurodegenerativo como el síndrome de Alzheimer (Michaelis, 1996).

A. Receptores glutamatérgicos.

La existencia de diferentes tipos de receptores para un mismo neurotransmisor es un hecho generalizado que resulta en el aumento de las posibilidades de interacción entre las células (López-Colomé, 1995), de tal manera que la clasificación de los receptores glutamatérgicos puede hacerse en términos del mecanismo de transducción con el que se asocian. Por otra parte, no solo el acoplamiento a distintos sistemas de transducción genera la diversidad de respuestas para un mismo transmisor químico, ya que tanto la expresión genética de diferentes subunidades proteicas correspondientes a los receptores y el ensamble diferencial de las mismas, como la distribución espacial y temporal de las cadenas proteicas en distintas estructuras de un tejido, o los diversos mecanismos de desensibilización, son procesos que, se ha demostrado, forman parte de una dinámica funcional *in vivo* (López-Colomé, 1995).

Así pues, existen receptores metabotrópicos (acoplados a proteínas G) y receptores ionotrópicos (canales iónicos operados por ligando), que a su vez se clasifican con base en un perfil farmacológico y se denominan de acuerdo con el agonista más potente (ver figura 3). Existen 8 receptores metabotrópicos (mGluR1-8) que se han clasificado en tres grupos con base en similitud de secuencia, farmacología y mecanismo de transducción cuando se expresan en sistemas heterólogos (Nakanishi, 1990; Schoepp y Conn, 1993). El grupo I (mGluR 1, 5) tiene como

principal agonista al ácido quisquálico, estos receptores son sensibles al ACPD, y se caracterizan por estar acoplados a la vía de transducción de los fosfoinosítidos y del diacilglicerol a través de la estimulación de la fosfolipasa C; los grupos de receptores II (mGluR2, 3) y III (mGluR 4, 6, 7 y 8) se caracterizan por estar acoplados negativamente a la adenilato ciclasa, los receptores del grupo II tienen como agonista principal a la ciclocarboxifenilglicina (L-CCPG-I) y son sensibles al ACPD, y los receptores del grupo III son insensibles al ACPD y tienen como agonista al AP4. Estos receptores son monómeros con siete dominios transmembranales que presentan diferencias importantes con otros receptores metabotrópicos (Cockroft y col., 1993).

Los receptores ionotrópicos activados por glutamato corresponden a los receptores de AMPA, Kainato y NMDA, y se diferencian entre sí por sus propiedades farmacológicas y biofísicas. Los dos primeros, se caracterizan por tener cinéticas de apertura rápidas y ser antagonizados por quinoxalinas como la CNQX y por la isotinoxima NS-102 respectivamente (Vernon, 1997). Los receptores de NMDA presentan cinéticas de apertura lentas, y son antagonizados por el AP5 entre otros compuestos. En términos generales, estos receptores están formados por varias subunidades, y existen varios subtipos que difieren tanto en la composición de subunidades, como en propiedades funcionales (Sprengel y Seeburg, 1995). Hasta el momento se han clonado 16 genes correspondientes a subunidades de receptores ionotrópicos, algunas de las cuales, pueden ser editadas postranscripcionalmente con efectos importantes en la función de los receptores.

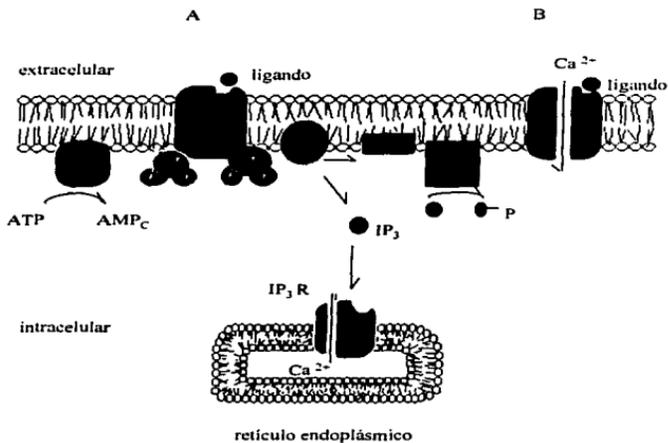


Figura 3. Tipos de receptores glutamatergicos clasificados con base en el mecanismo de transducción: A, receptores metabotrópicos; B, receptores ionotrópicos. AC, adenilato ciclasa; ATP, adenosin trifosfato; AMP_c, adenosin monofosfato cíclico; PLC, fosfolipasa C; IP₃, inositol 1, 4, 5-trifosfato; IP₃R, receptor para IP₃; DAG, diacil glicerol; PKC, proteína cinasa C; P, fosfato (modificado de Agranoff y Fisher, 1994).

El receptor glutamatérgico de tipo NMDA es un canal catiónico que en condiciones fisiológicas hiperpolarizantes está bloqueado por el ión Mg^{2+} en forma dependiente de voltaje, y que se regula por varios ligandos entre los que se encuentran el zinc, los protones, agentes redox y las poliaminas espermina y espermidina (Collingridge y Singer, 1990; Johnson y Ascher, 1987; Monaghan y col., 1989; Ransom y Stec, 1988; Young y Fagg, 1990), que junto con los denominados bloqueadores de canal, como los anestésicos disociativos ketamina, PCP y dizocilpina (MK-801), tienen sitios de unión específicos en el receptor, distintos entre sí, y cuyas características bioquímicas varían según la región del SNC de que se trate (figura 4).

Experimentos electrofisiológicos y bioquímicos han demostrado que la activación del canal requiere al menos de dos eventos secuenciales: una despolarización que permita eliminar el bloqueo del canal por el Mg^{2+} (Nowak y col., 1984), y la unión del L-glu y de la Gli a sus respectivos sitios (Johnson y Ascher, 1987; Kleckner y Dingledine, 1988; 1991). Sin embargo, los estudios encaminados a determinar la concentración extracelular de la Gli en el cerebro generen cierta controversia en establecer si el papel fisiológico de este aminoácido en el receptor de NMDA es el de un modulador alostérico o el de un coagonista (Kemp y Lesson, 1993). La participación de la Gli en la neurotransmisión excitadora pasó desapercibida por mucho tiempo, ya que dicho aminoácido es el principal neurotransmisor inhibitorio en la médula espinal y en el tallo cerebral de los mamíferos y de otros vertebrados. La distribución de receptores glicinérgicos de tipo inhibitorio postsináptico se extiende a otras regiones del sistema nervioso y a la retina; dichos receptores son proteínas pentaméricas que guardan una estrecha relación estructural con otros receptores ionotrópicos por lo que se les ha agrupado en una misma familia (Betz, 1990; Hucho., 1993). En particular, estos

receptores forman canales permeables al ion cloro, y presentan un sitio de unión para Gli que se caracteriza por su sensibilidad al alcaloide estricnina (Curtis y col., 1968). En contraste, la participación de la Gli en la neurotransmisión excitadora es, como ya se mencionó, a través de un sitio de unión localizado en el receptor de NMDA el cual es farmacológicamente insensible a la estricnina.

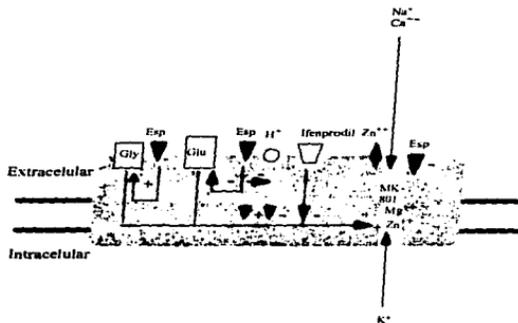


Figura 4. Esquema del receptor de NMDA en el que se indica la presencia de varios sitios moduladores que estimulan (+) o inhiben (-) la afinidad de otros sitios o la actividad del canal catiónico. Gly, glicina; Glu, ácido L-glutámico; Esp, espermina (Tomado de Kashiwagi y col., 1996).

En un principio, los receptores glutamatergicos de tipo ionotrópico se agruparon en la gran familia de canales activados por ligando (Wada y col., 1989). Existe evidencia de que tambien son estructuras pentaméricas (Ferrer-Montiel y Montal, 1996) y de que pueden ser modulados por varios compuestos endógenos y exógenos interactuando en sitios específicos localizados en la proteína funcional con la capacidad de modificar la estructura de otros sitios de unión. Se cuenta con información estructural que por una parte relaciona a estos receptores con un grupo de proteínas bacterianas (Cockroft y col., 1993; Kuryatov y col., 1994; Stern-Bach y col., 1994; Hirai y col., 1996; Kashiwagi y col., 1996), y por otra, con los canales de K^+ activados por voltaje (Wood y col., 1995). Por ejemplo, el análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de las subunidades correspondientes a receptores nicotínicos de acetilcolina y de GABA tipo A (que se agrupan en la familia mencionada), indican que se trata de péptidos con 4 dominios hidrofóbicos transmembranales, de los cuales, el segundo participa en la formación del canal iónico. Con la identificación de dominios transmembranales y de residuos glucosilables y fosforilables se ha propuesto un modelo en el que los extremos amino y carboxilo de las subunidades de estos receptores se localizan en la región extracelular. Sin embargo, el mismo tipo de análisis complementado con estudios en los que se emplean técnicas de biología molecular, indica que en las subunidades de receptores glutamatergicos de tipo ionotrópico, el segundo dominio hidrofóbico no atraviesa la membrana, lo que determina que los extremos carboxilo y amino de dichas subunidades se localizen en lados opuestos de la misma (Wood y col., 1995; Hirai y col., 1996) (ver Figura 5).

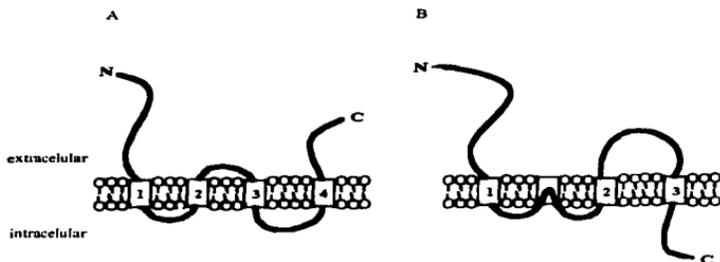


Figura 5. Distribución de dominios transmembranales en subunidades de canales operados por ligando. A, receptores no glutamatergicos; B, receptores glutamatergicos (modificado de Hirai y col., 1996).

De manera análoga al segundo dominio transmembranal en las subunidades de los receptores de la familia de receptores operados por ligando, el segundo dominio hidrofóbico en los receptores glutamatergicos participa en la formación del canal iónico (Kuner y col., 1996) y guarda

una gran similitud estructural con un dominio existente en los canales de K^+ activados por voltaje (Wood y col., 1995).

B. Distribución de los receptores de NMDA en el SNC y en la retina.

Los receptores de NMDA se distribuyen en prácticamente todo el sistema nervioso central, pero específicamente en áreas de la corteza cerebral y de los ganglios basales, así como en regiones relacionadas con los sistemas sensoriales. Estudios electrofisiológicos y con radioligandos indican que las características bioquímicas del receptor de NMDA varían en las diferentes regiones del SNC. En particular, las variaciones regionales de la unión específica de L-glu- H^3 , de CPP- H^3 y de la modulación de la unión de MK-801- H^3 por los diversos agonistas y antagonistas del L-glu han facilitado la descripción de cinco subtipos de receptores: los que tienen preferencia por los agonistas, los que tienen preferencia por los antagonistas, los receptores del tálamo medio, los receptores del cerebelo y los receptores presinápticos (Laurie y Seeburg, 1994; Wong y Thukral, 1996).

Las técnicas de biología molecular han permitido la identificación de una gran variedad de subunidades correspondientes a receptores de glutamato (Hollmann y Heinemann, 1994). Los ovocitos de *Xenopus*, las células renales HEK-293 y ciertas neuronas de mamíferos se han usado como sistemas de expresión para el estudio biofísico y farmacológico de distintas combinaciones de subunidades clonadas, y aunque se desconoce la estequiometría de las mismas en el receptor, se sabe que de las 5 subunidades identificadas para el receptor de NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D) los ensamblajes de subunidades NR1 presentan las propiedades características de los

receptores nativos, *i.e.*, unión del agonista, y del coagonista (Moriyoshi y col., 1991; Jhonson y Ascher, 1987), alta permeabilidad al calcio (Mac Dermott y col., 1986) y bloqueo por magnesio dependiente del voltaje (Nowak y col., 1984). Asimismo, se ha demostrado que la amplitud de la corriente registrada en estos ensamblajes homoméricos no corresponde a la observada en receptores nativos postsinápticos, y que los ensamblajes que incluyen al menos una de las 4 subunidades NR2 conocidas presentan un patrón más característico (Ikeda y col., 1992; Ishii y col., 1993; Kutsuwada y col., 1992; Meguro y col., 1992; Monyer y col., 1992). Recientemente, se han identificado receptores de NMDA presinápticos en neuronas noradrenérgicas del locus ceruleus, y dopaminérgicas de la sustancia negra que regulan la liberación del neurotransmisor y que presentan una farmacología de receptores homoméricos (Fink y col., 1990; Raiteri y col., 1992; Wong y col., 1996).

De manera general, el patrón de expresión de las subunidades mencionadas en el cerebro de la rata es el siguiente: la subunidad NR1 se expresa prácticamente en todas las células del sistema nervioso. Se han encontrado 8 variantes debidas al corte alternativo del mRNA que la codifica y que podrían indicar diferencias regionales importantes durante el desarrollo y en el estado maduro.

Las subunidades NR2 presentan un patrón de expresión y de localización más específico, que se superpone en ocasiones. En términos generales se sabe que la subunidad NR2A se expresa tan ampliamente como la subunidad NR1 lo cual indica la existencia de un receptor de NMDA con una composición heteromérica común en varias neuronas de diversas estructuras del SNC; la subunidad NR2B se expresa predominantemente en el cerebro anterior y se colocaliza con la

subunidad NR2A en la corteza cerebral, en el hipocampo y en el cuerpo estriado, mientras que la subunidad NR2C se encuentra en el cerebelo, en el tálamo y en el bulbo olfatorio. Con respecto a la subunidad NR2D, se ha localizado predominantemente en estructuras del diencefalo, del cerebro medio y del tallo cerebral; en estas dos últimas estructuras se colocaliza con la subunidad NR2A. En el tálamo y en el bulbo olfatorio se expresan y colocalizan las 4 subunidades NR2 (Wenzel y col., 1995).

La heterogeneidad funcional y farmacológica del receptor de NMDA depende de la composición heteromérica del mismo; las afinidades de los distintos sitios farmacológicos pueden modificarse al coexpresar cualquiera de las subunidades NR2 en receptores recombinantes que expresan la subunidad NR1 (Williams, 1993; Laurie y Seeburg, 1994). Sobre esta base, se ha postulado que los receptores que contienen las subunidades NR1-NR2A corresponden al tipo de receptores que unen preferentemente a los agonistas, los ensamblajes NR1-NR2B corresponden a los receptores con alta afinidad por los antagonistas, los heterómeros NR1-NR2C corresponden a los receptores cerebelares y los NR1-NR2D, a los receptores característicos del tálamo medio (Laurie y Seeburg, 1994). Por otra parte, se ha demostrado que la coexpresión de más de dos tipos de subunidades NR2 predomina sobre la expresión de heterómeros con tan solo un tipo de esta subunidad (Wafford y col., 1993), dificultando así la clasificación de los receptores basada en su estequiometría, la cual hasta la fecha se desconoce.

En la retina se han hecho estudios de hibridación *in situ* para localizar la expresión de los mRNA que codifican para cada una de las subunidades del receptor de NMDA así como de otros

receptores ionotrópicos glutamatérgicos (Brandstätter y col., 1994). El patrón de expresión de los mRNA de las subunidades NR1 y NR2A-C es muy parecido al observado en el SNC, con excepción del mRNA para la subunidad NR2D que no fué detectado, ya que la subunidad NR1 se expresa en prácticamente todas las capas celulares de la retina, mientras que las subunidades NR2 presentan un patrón de distribución restringido a la retina interna (células ganglionares, células amacrinas y células bipolares). Existe evidencia de que en cultivos de células de retina de pollo de embriones de 8 días enriquecidos con células amacrinas hay una baja sensibilidad al bloqueo por Mg^{2+} y que aparentemente, no hay potenciación de la actividad del canal al agregar $10 \mu M$ de Gli en condiciones saturantes de NMDA (Duarte y col., 1996). Para explicar lo anterior se ha planteado que es posible que exista cierto nivel basal de despolarización que mantenga una liberación constante del cotransmisor endógeno (Gli o su análogo) que se encuentre modulando a los receptores de NMDA (Duarte y col., 1996), aunque también existe la explicación alternativa de que los receptores de NMDA que se expresan por las células amacrinas no exhiben potenciación por la glicina debido a la composición heteromérica que presentan.

López Colomé y colaboradores (1993, 1994), demostraron que los receptores para aminoácidos excitadores del epitelio pigmentado de la retina del pollo y del humano son similares pero no idénticos a los estudiados en el SNC (Monaghan y col., 1989). La unión de L-glu- H^3 en cultivos de epitelio pigmentado de retinas de pollo es farmacológicamente sensible a los agonistas y antagonistas de los receptores de NMDA, así como al antagonista de los receptores metabotrópicos ACPD; por otra parte, la Gli incrementa considerablemente la unión del L-glu- H^3 a través de un mecanismo que es dependiente de la edad y cuyos agonistas pueden ser los

canal del que forma parte el receptor de NMDA (Johnson y Ascher, 1987), generó gran interés por tratarse de un caso de coagonismo en el que el L-Glu y la Gli (o sus análogos endógenos) interactúan en sitios distintos sobre la misma molécula, específicamente en la subunidad NR1 (Moriyoshi y col., 1991). El desarrollo de agonistas y antagonistas específicos de este sitio (ver tabla 1) ha facilitado el estudio de la función del mismo; hasta el momento se sabe que la Gli puede potenciar considerablemente la frecuencia de apertura del canal, y que también está involucrada en la desensibilización de la respuesta de activación, ya que disminuye el tiempo de inactivación. En homogenizados de membranas sinaptosomales de la corteza cerebral y del cerebelo de la rata se ha observado una complicada gama de interacciones entre distintos sitios del receptor de NMDA. En el cerebro anterior la unión del agonista principal (L-glu o NMDA) a su sitio en el receptor, modula positivamente la unión al sitio de Gli (Kessler y col., 1989), mientras que los antagonistas C5 del L-glu (como el AP5 y el CGS-19755), que corresponden a moléculas con 5 átomos de carbono en cuyos extremos se encuentran respectivamente un grupo carboxilo y uno fosfonato, inhiben parcialmente la unión de Gli-H³. Los antagonistas C7 (como el AP7 o el CPP), que tienen 7 carbonos separando al grupo carboxilo del fosfonato, pueden revertir el efecto inhibitorio de los antagonistas C5, pero no presentan actividad alguna sobre la unión de Gli-H³ (Monahan y col., 1990). En el cerebelo, ambos tipos de compuestos son eficaces (Widdowson y col., 1995). Cuando se emplea ácido 5, 7-dicloro kinurénico-H³ en membranas del cerebro anterior, la unión específica se inhibe por antagonistas C5 y C7 del glutamato con potencia similar (Baron y col., 1991).

Otra estrategia para dilucidar la función de la Gli en la neurotransmisión excitadora consiste en la aplicación de técnicas de biología molecular que permiten modificar la estructura de una

deben corresponder a sitios de naturaleza hidrofóbica localizados en la vecindad del sitio de unión para los agonistas (ver tabla 1 y figura 6).

La participación de residuos aromáticos en la formación de sitios de unión para ligandos parece ser un motivo estructural común en muchas proteínas, ya que tanto en los receptores nicotínicos para acetilcolina (Galzi y col., 1990; 1991) como en los receptores de GABA tipo A (Amin y Weiss, 1993), como en los receptores glicinérgicos de tipo inhibidor postsináptico (Schmieden y col., 1993), e incluso en algunas acetilcolinesterasas (Sussman y col., 1991), son aminoácidos aromáticos los que determinan el tipo de interacción con diversos ligandos. En el caso particular del receptor de NMDA, existen varias regiones localizadas en los dominios extracelulares de la subunidad NR1 y NR2 que presentan gran similitud con proteínas periplásmicas de origen bacteriano (Kuryatov y col., 1994). En particular, el sitio para Gli en las subunidades NR1 presenta dos dominios presentes en las proteínas QBP y LAOBP (Kuryatov y col., 1994) que forman una estructura análoga a una trampa de bisagra o a una planta carnívora, de tal manera que cuando se une el aminoácido a la conformación abierta del péptido, este se cierra modificando su estructura y muy probablemente generando un cambio conformacional que afecta la función de la proteína completa (O'Hara y col., 1993).

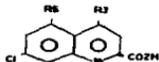
Tabla 1. Agonistas y antagonistas del sitio de glicina en el receptor de NMDA.

Agonistas: Glicina, D-serina, ACPC.

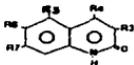


Antagonistas.

A. Derivados del kinurenato: 7Cl kinurenato, 5,7 diCl-kinurenato.



B. Derivados de las quinoxalinas: CNQX, DNQX, ACEA-1021



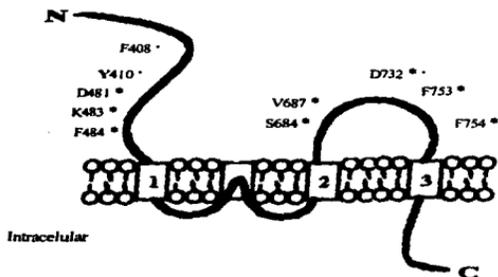


Figura 6. Esquema de la subunidad NR1 en el que se indica la localización de residuos de aminoácidos identificados como determinantes de la interacción de agonistas (*) y antagonistas (-) en el sitio de glicina en el receptor de NMDA (Kuryatov *et al.*, 1994; Hirai *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1996). La numeración se hizo con base en el estudio publicado por Moriyoshi *et al.* (1991). D, aspartato; F, fenilalanina; K, lisina; S, serina Y, tirosina.

II. Planteamiento del problema.

La aplicación de técnicas de biología molecular ha contribuido notablemente al estudio de la neurotransmisión excitadora, ya que ha complementado a los enfoques biofísico y farmacológico que han sido usados para definir la existencia de varios tipos y subtipos de receptores glutamatérgicos (Hollman y Heinemann, 1994). Se sabe que el receptor de NMDA se distribuye ampliamente en el SNC, y que la diversidad funcional que se piensa, está correlacionada con la diversidad estructural de estas proteínas de la membrana, también refleja variaciones en el perfil farmacológico de los distintos sitios de unión en el receptor. En la retina, se ha demostrado la presencia de receptores ionotrópicos activados por L-Glu, y en el caso particular del receptor de NMDA, se ha estudiado su participación en diversos procesos análogos a los que ocurren en el SNC (e.g. excitotoxicidad). Dichos estudios indican que las características farmacológicas del receptor de NMDA en la retina varían principalmente con respecto al sitio de unión para los antagonistas del coagonista glicina (Lombardi y col., 1995), y que el efecto de la Gli en la modulación de estos receptores podría ser distinto al observado en el SNC (Boje y col., 1992). Ya que los derivados del kinurenato y de las quinoxalinas han sido empleados como antagonistas eficaces para este sitio en el SNC, y que existen referencias de que los derivados del kinurenato presentan baja afinidad para inhibir la actividad del canal del receptor, es muy probable que las características farmacológicas de los sitios de Gli en el receptor de NMDA en la retina puedan explicar varios de los efectos observados en estudios funcionales, por lo que en este trabajo el objetivo principal fué la caracterización del sitio de glicina en el receptor de NMDA en la retina desde un punto de vista farmacológico y cinético.

III. Materiales y métodos.

I. Obtención de membranas sinaptosomales.

Se obtuvieron membranas de terminales sinápticas de las capas plexiformes de las retinas de pollos de 1 a 5 días de edad adaptando los protocolos descritos por Neal y Atterwill (1974), y por Boje y colaboradores (1992). Para cada experimento se extrajeron los ojos de cuatro pollos previamente adaptados a la oscuridad por 45 minutos; se hizo un corte ecuatorial del globo ocular, y se eliminaron el humor vitreo y la región anterior del ojo. Las retinas se disecaron libres del epitelio pigmentado y se colocaron en medio Krebs (NaCl 118 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl_2 2.5 mM, SO_4Mg 1.17 mM, NaHCO_3 25 mM, glucosa 5.6 mM). Para obtener las membranas sinaptosomales se homogeneizaron las retinas en una solución de sacarosa 0.32 M/ SO_4Mg 10^{-4} M (100 ml / 5.6 g de peso) y se empleó un protocolo de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial. Los sinaptosomas de la capa plexiforme externa fueron separados en la fracción nuclear (P1) al centrifugar el homogenado total a 500 g por 10 minutos. El sobrenadante fué centrifugado a 11,000 g por 20 minutos para obtener una fracción mitocondrial (P2) enriquecida con terminales sinápticas de la capa plexiforme interna. Los precipitados se mantuvieron en hielo y de manera separada, fueron resuspendidos en 25 volúmenes de amortiguador Tris 4.5 mM/Hepes 5 mM (pH=7.4) para someterlos a un choque osmótico por 15 minutos. Las membranas de cada fracción se sedimentaron por centrifugación (20 000 g por 20 minutos) y se almacenaron por dos días a 4 °C. Posteriormente, se lavaron intensivamente para eliminar compuestos endógenos que pudieran interactuar con los receptores, primero, resuspendiéndolas en 25 volúmenes de amortiguador Tris

4.5 mM/Hepes 5 mM (pH 7.4) y centrifugando a 20 000 g por 20 minutos, y posteriormente, repitiendo el procedimiento dos veces usando amortiguador Tris 4.5 mM/Hepes 5 mM con EDTA 1 mM (pH 7.4), y dos veces más usando amortiguador Tris 4.5 mM/Hepes 5 mM (pH 7.4). Las membranas así obtenidas fueron almacenadas a -80 ° C por un lapso de dos a tres semanas previas al experimento sin alteración en la unión específica de Gli-H³.

2. Experimentos con glicina-H³.

Las membranas de P1 y P2 almacenadas a -80 °C fueron descongeladas, lavadas 4 veces con amortiguador Tris 4.5 mM/Hepes 5 mM (pH 7.4) y resuspendidas en 25 volúmenes (p/v) del mismo amortiguador. Los experimentos se hicieron a temperatura ambiente (25 °C), en condiciones de equilibrio (tiempo de reacción 2 horas) empleando Gli-H³ como radioligando, con una concentración de 50 a 100 µg de proteína en un volúmen final de 500 ó 175 µl según se indique. La unión inespecífica se definió con Gli, ACPC o D-serina 1mM con resultados similares, en P1 dicha unión fué del 40 % y en P2 fué del 80 % de la unión total, independientemente del compuesto usado.

A. Experimentos de inhibición.

En estudios previos, se ha demostrado que el sitio de Gli en el receptor de NMDA es de alta afinidad (K₁₁ entre 100 y 200 nM; Johnson y Ascher, 1987; Kemp y Leeson, 1993), por lo que la concentración de radioligando empleada es fundamental para observar una unión específica que

pueda ser caracterizada y que corresponda al intervalo de afinidad del receptor de interés. Los experimentos de inhibición se hicieron empleando una concentración constante de Gli-H³ 20 nM y una o varias concentraciones del inhibidor respectivo en un volúmen final de homogenado P1 ó P2 de 500 µl. La reacción se detuvo por filtración. El perfil farmacológico se estableció con los siguientes compuestos: Gli (10 µM), D-serina (10 µM), ACPC (10 µM), β-alanina (10 µM y 1mM), estricnina (100 µM), 7-Cl-K (10 µM), ACEA-1021 (10 µM), ácido L-glutámico (100 µM), NMDA (100 µM), MK-801 (100 µM), y DNQX (100 µM). La potencia de inhibición de la unión de Gli-H³ por varios ligandos glicinérgicos fué determinada usando distintas concentraciones de dichos compuestos:

Gli: 50 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 500 µM, 1 mM en P1 y 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 500 µM, 1 mM en P2.

D-serina: 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 500 µM Y 1 mM en P1 y P2.

ACPC: 50 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 500 µM, 1 mM y 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 500 µM, 1 mM en P2.

7-Cl-K: 1 µM, 10 µM, 35 µM y 50µM para P1 y P2.

ACEA-1021: 100 nM, 500 nM , 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 500 µM y 1mM para P1 y P2.

Estricnina: 25 nM, 50 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 500 µM, 1 mM

B. Experimentos de saturación.

Para las curvas de saturación se emplearon concentraciones crecientes de Gli-H³ (25, 50, 100, 200 nM en P1, y 150, 300 nM en P2), completando según fuera necesario, con glicina fría hasta observar la saturación (400, 800, 1600 nM en P1 y 1200, 2400 y 3000 en P2) en un volúmen final de homogenado P1 ó P2 de 175 µl. El tiempo de reacción fué de dos horas a temperatura ambiente (25 °C), la reacción se detuvo por centrifugación a 90 000 rpm en una aerofuga Beckman.

C. Experimentos con respecto al tiempo.

Para las curvas de asociación y de disociación se midió la unión de Gli-H³ 20 nM y 100 nM a los 7, 15, 30, 60 y 120 minutos en un volúmen final de homogenado P1 ó P2 de 175 µl. A los 120 minutos se añadió una concentración de glicina 1 mM y se detuvo la reacción a los 30 segundos, 1, 7, 15, 30, 60 y 120 minutos. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente (25 °C) y se detuvo por centrifugación a 90 000 rpm en una aerofuga Beckman.

D. Efecto del pH.

Se midió el efecto del pH en la unión de Gli-H³ 20 nM a membranas de P1 y P2 en un intervalo de pH de 5 a 9. Se usaron los siguientes amortiguadores: Acetato de sodio-ácido acético 140 mM (pH 5); Acetato de sodio-ácido acético 200 mM (pH 6); Tris 4.5 mM-Hepes 5 mM (pH 7.4); Hepes-

KOH 50 mM (pH 8); Tris-HCl 50 (pH 9). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente (25 °C) y se detuvo por centrifugación a 90 000 rpm en una aerofuga Beckman.

Todos los resultados, con excepción de los correspondientes al efecto del pH sobre la unión de Gli-H³ que se expresan en DPM, se expresan en pmol/mg de proteína. La cantidad de proteína fué determinada por el método descrito por Lowry y colaboradores (1951).

3. Estadística.

Las constantes correspondientes a las curvas de inhibición, saturación y con respecto al tiempo, se calcularon por un método de regresión no lineal con el programa Prism 2.0 (Graphpad Software, Inc.), aplicando la prueba t de student ($p < 0.05$).

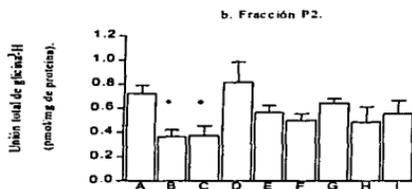
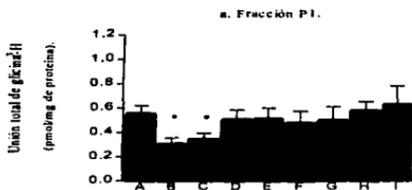
4. Reactivos.

Todos los reactivos para preparar los amortiguadores, el medio Krebs, así como la Gli y la D-serina, fueron obtenidos de Sigma. Los agonistas ACPC, y NMDA, y los antagonistas 7Cl-K, D-LAP4, D-LAP5, MK-801 y DNQX fueron obtenidos de Tocris Cookson (Bristol, Ingl.), el compuesto ACEA-1021 fué donado por ACEA Pharmaceuticals, Inc. La Gli-H³ (actividad específica de 48.8 y 51.1 Ci/mmol) fué de Dupont. Para los experimentos de inhibición se empleó un multifiltro Millipore, y filtros Whatman GF/B de microfibra de vidrio.

IV. Resultados.

1. Análisis farmacológico de la unión de glicina-H³ a membranas sinaptosomales de la retina.

Se midió la unión de Gli-H³ (20 nM) en presencia de varios compuestos relacionados con receptores glicinérgicos, a concentraciones saturantes (>1 μ M) para el sitio de Gli en el receptor de NMDA (Kemp and Lesson, 1993). Los únicos compuestos que inhibieron de manera significativa la unión de glicina-H³ fueron la Gli, la D-serina, y el ACPC, agonistas y agonista parcial, respectivamente, del sitio de Gli en el receptor de NMDA en el SNC (ver Gráfica 1). Con el objetivo de discernir entre la interacción del radioligando con receptores de NMDA y aquellos glicinérgicos postsinápticos de tipo inhibitor, se hicieron curvas de inhibición de la unión específica de Gli-H³ utilizando el antagonista de los receptores de tipo inhibitor estricnina, y los agonistas Gli, D-serina y ACPC, y antagonistas 7-Cl-K y ACEA-1021 del sitio de Gli en el receptor de NMDA. La unión específica definida con una concentración de Gli, D-serina, o ACPC de 1 mM fué del 60 % al 80 % de la unión total. Los resultados se presentan en la gráfica 2, y como puede observarse, la potencia de inhibición de los agonistas del sitio de Gli en el receptor de NMDA es mayor que la potencia de inhibición de la estricnina, la cual únicamente tiene efecto a concentraciones altas (mM), así como con respecto a los antagonistas de este sitio en el receptor de NMDA.



Gráfica 1. Efecto de diversos agonistas y antagonistas de los receptores glicinérgicos de tipo inhibitor y del sitio de glicina en el receptor de NMDA. A, control; B, glicina 10 μ M; C, ACPC 10 μ M; D, D-serina 10 μ M; E, β -alanina; F, β -alanina 1mM; G, estriocina 100 μ M; H, 7-Cl-K 10 μ M; I, ACEA-1021 10 μ M. Los resultados son el promedio \pm ES de al menos 3 experimentos c/u por triplicado. *P < 0.05, t de student.

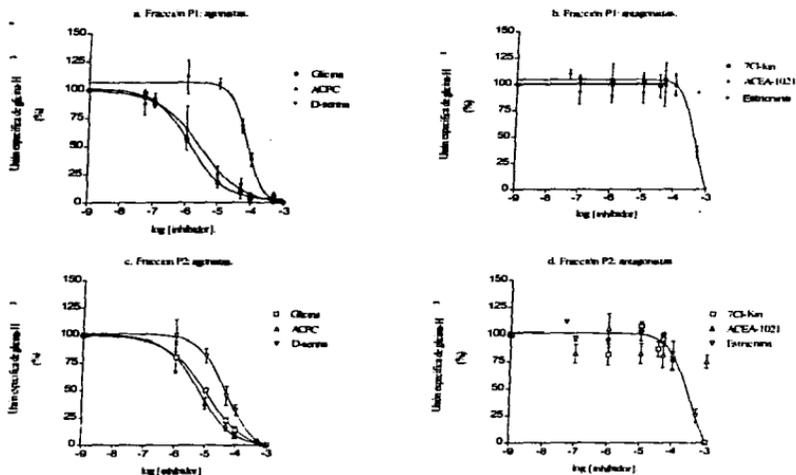
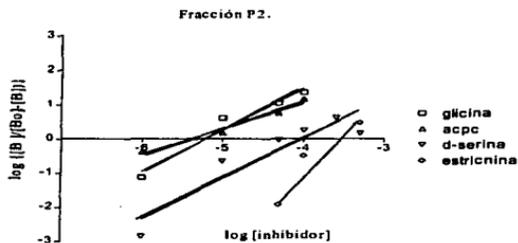
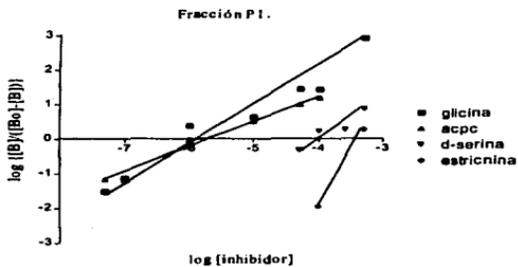


Figura 2. Especificidad de la inhibición de glicina- H^3 por varios compuestos relacionados con receptores glicinérgicos en la retina. Afinidad relativa: $Gli \approx ACPC > D-serina \gg$ estricina. La inhibición de 7-Cl-K y de ACEA-1021 no fué mayor al 20 % de la unión específica. Los resultados son el promedio \pm ES de 3 experimentos c/u por triplicado.

Para determinar las constantes de inhibición (IC_{50}) y los coeficientes de Hill (nH) a partir de los datos obtenidos en las curvas de inhibición, se emplearon las ecuaciones desarrolladas por Hill (1910) (ver gráfica 3 y tabla 2). Las constantes y coeficientes así determinados fueron comparados con un análisis por computadora (Prism 2.0) en el que se empleó un método de regresión no lineal con resultados similares (nH para Gli y D-serina = 1; nH para el ACPC < 1, y nH para la estricnina > 1), indicando que la interacción de estos compuestos es diversa, y sugiriendo la existencia de varios tipos de receptores en estas membranas.

2. Cinética de la unión de glicina- H^3 en membranas sinaptosomales de la retina.

Para determinar las constantes cinéticas (K_B) y la cantidad relativa de sitios de unión ($B_{máx}$) de Gli- H^3 a membranas sinaptosomales de la retina de pollo, se midió la unión específica de concentraciones crecientes de Gli- H^3 a membranas de P1 (25, 50, 100, 200, 400, 800, y 1600 nM) y P2 (150, 300, 1200, 2400 y 3000 nM). La unión de Gli- H^3 es reversible y saturable (ver gráfica 4). Los resultados fueron analizados por regresión no lineal, y fueron congruentes con un modelo que describe una interacción del radioligando con un solo sitio, lo cual concuerda con el análisis de Scatchard (ver gráfica 4). Las K_B y $B_{máx}$ calculadas a partir de estos experimentos fueron: $K_B = 195.1 \pm 89.73$ nM y $B_{máx} = 2.381 \pm 0.3464$ pmol/mg de proteína para P1, y $K_B = 208 \pm 86.70$ nM y $B_{máx} = 12.70 \pm 2.25$ pmol/mg de proteína para P2.

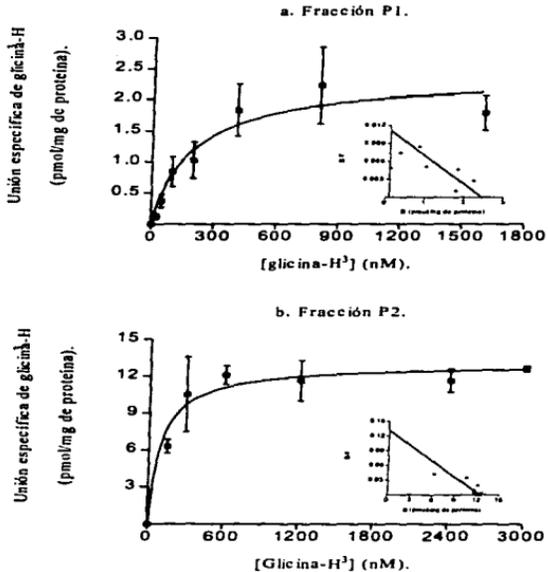


Gráfica 3. Análisis de Hill de los resultados de las curvas de inhibición presentadas en la gráfica 2.

Tabla 2. Constantes de inhibición (Ic50) y coeficientes de Hill (nH) determinados por el análisis de Hill a partir de los datos de la gráfica 2.

	Fracción P1			Fracción P2		
	<u>IC 50</u> (μ M)	<u>nH</u>	<u>IC 50 GII/IC 50*</u>	<u>IC 50</u> (μ M)	<u>nH</u>	<u>IC 50 GII/IC 50*</u>
Glicina	1.36	0.98	1.000	11.01	1.22	1.000
ACPC	1.00	0.74	1.360	6.06	0.75	1.816
D-serina	61.96	1.04	0.022	66.23	1.18	0.166
Estricnina	398.11	3.20	0.003	251.19	2.22	0.043

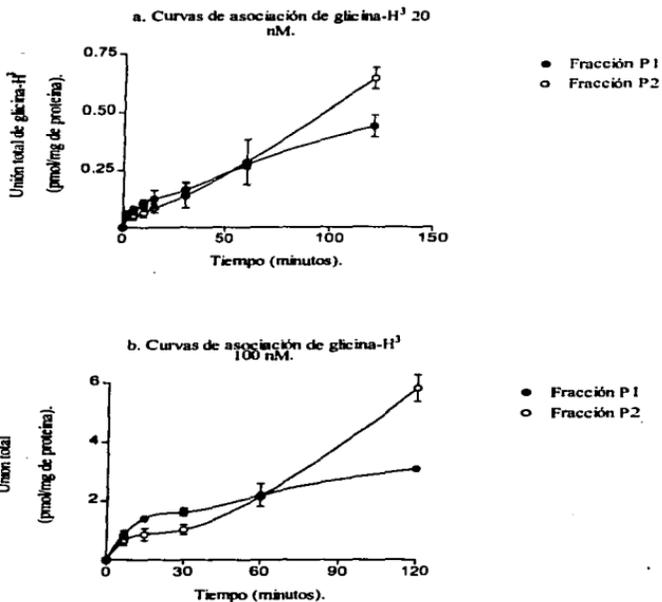
* ligando.



Gráfica 4. Curvas de saturación de la unión de glicina-H² a membranas sinaptosomales de la retina de pollo. Promedio \pm ES de tres experimentos c/u por triplicado. Las K_D y $B_{m\acute{a}x}$ correspondientes fueron calculadas por regresión no lineal con el programa Prism de Graphpad.

Un método alternativo para calcular las constantes cinéticas de disociación al equilibrio consiste en determinar las constantes de afinidad aparente o K observada (K_{obs}) descrito por Weiland y Molinoff (1981). Para tal efecto, se midió la unión de Gli-H³ 20 nM y 100 nM a distintos intervalos de tiempo (2, 5, 15, 30, 60 y 120 minutos). Los resultados de dichos experimentos se presentan en la gráfica 5; la K_{obs} en cada caso corresponde a la pendiente de la recta que resulta de graficar el logaritmo natural (ln) de la formación de complejo receptor-ligando con respecto al tiempo.

Las K_{obs} determinadas para la unión de Gli-H³ 20 nM fueron de $0.01046 \pm 0.00146 \text{ min}^{-1}$ en P1 y de $0.01139 \pm 0.00070 \text{ min}^{-1}$ en P2, mientras que para Gli-H³ 100 nM fueron de $0.01970 \pm 0.00397 \text{ min}^{-1}$ en P1 y $0.01556 \pm 0.00386 \text{ min}^{-1}$ en P2. Posteriormente se graficaron dichos valores con respecto a la concentración de radioligando de tal manera que la pendiente de la recta que resulta corresponde a la constante de asociación, que fué de $K_{+1} = 0.00008196 \pm 0.0000001023 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$ en P1, y $K_{+1} = 0.00005246 \pm 0.0000003918 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$ en P2, y la ordenada al origen corresponde a la constante de disociación, que es $K_{-1} = 0.01150 \pm 0.000006021 \text{ min}^{-1}$ en P1, y $K_{-1} = 0.01032 \pm 0.00002307 \text{ min}^{-1}$ en P2, que están relacionadas con la constante cinética de disociación al equilibrio (K_B) de la siguiente manera: $K_B = K_{-1} / K_{+1}$ (Weiland and Molinoff, 1981).



Gráfica 5. Curvas de asociación de la unión de dos concentraciones distintas de glicina- H^3 a membranas sinaptosomales de la retina de pollo. Promedio \pm ES de al menos dos experimentos c/u por triplicado. La unión inespecífica fué constante en un intervalo de 5 a 120 minutos.

Las constantes de disociación al equilibrio determinadas por este método fueron de 140.31 ± 0.00006 nM y de 196.72 ± 0.00002 nM para P1 y P2 respectivamente, de manera concordante con los valores determinados en las curvas de saturación (gráfica 4) y con estudios similares en el SNC de la rata (Baron et al., 1991; O'Shea et al., 1991; Widdowson et al., 1995).

La unión de Gli-H³ a estas membranas es reversible, en la gráfica 6 se puede observar que al agregar una concentración elevada de Gli (1mM) en condiciones de equilibrio, la disociación del radioligando puede ser descrita por una curva exponencial con pendiente negativa.

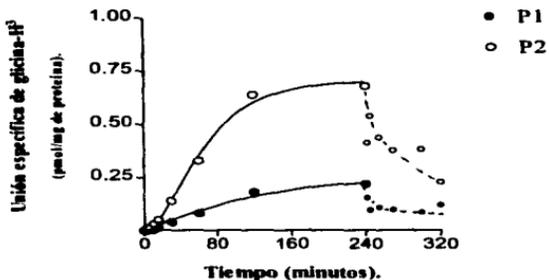
3. Efecto del pH en la unión de glicina-H³ en membranas sinaptosomales de la retina.

El receptor de NMDA puede ser sujeto de modulación por el pH (Mc Bain and Mayer, 1994); en la gráfica 7 se presentan los resultados de la medición de la unión específica de Gli-³H (20 nM) a membranas sinaptosomales de la retina de pollo resuspendidas en distintos amortiguadores, en un intervalo de pH entre 5 y 9. Como puede observarse, la unión específica es máxima a un pH de 7.4, y disminuye a pH menores y mayores de 7.4.

4. Efecto de ligandos que interactúan con el receptor de NMDA sobre la unión de glicina-H³ a membranas sinaptosomales de la retina.

Con base en estudios electrofisiológicos y con radioligandos, se ha propuesto que la unión de diversos agonistas y antagonistas del L-glu incrementa o disminuye la unión de agonistas y

antagonistas de la GII en el receptor de NMDA (Kemp and Lesson, 1993). En la Gráfica 8 se puede observar que la unión específica de Gli-H³ (20 nM) en presencia de 100 μM de varios agonistas y antagonistas del L-glu en el receptor de NMDA no se modifica de manera significativa con respecto al control.



Gráfica 6. Curvas de asociación (línea continua) y de disociación (discontinua) de la unión de glicina-H³ 20 nM a membranas sinaptosomales de la retina. Resultados de un experimento representativo por triplicado.

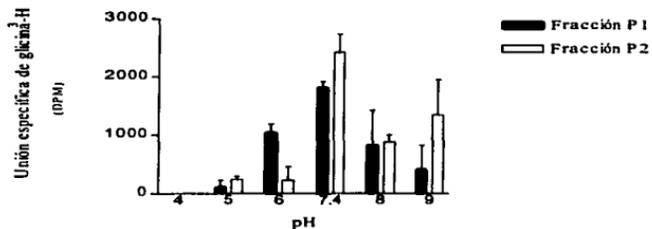


Figura 7. Efecto del pH en la unión de glicina- H^3 en membranas de la capa plexiforme externa (P1) e interna (P2) de la retina. Amortiguadores: pH 5, acetato de sodio 140 mM; pH 6, acetato de sodio 200 mM; pH 7.4, Tris 4.5 mM-Hepes 5 mM; pH 8, Hepes 50 mM; pH 9, Tris 50 mM. Las barras representan el promedio \pm ES de tres experimentos c/u por triplicado.

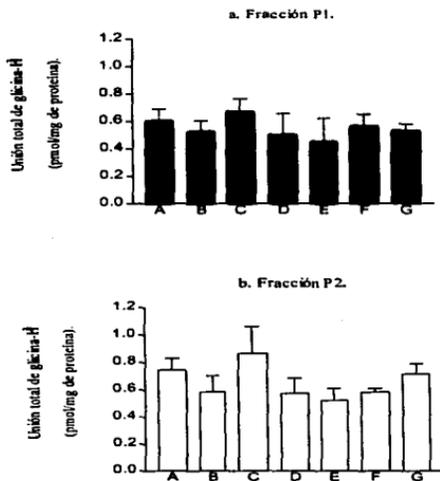


Figura 8. Efecto de agonistas y antagonistas del glutamato sobre la unión de glicina-H⁺ en la retina. A, control; B, ácido glutámico; C, NMDA; D, 2-DLAP4; E, 2-DLAP5; F, MK-801; G, DNQX. Todos los compuestos se probaron a 100 μ M. Los resultados son el promedio \pm ES de al menos tres experimentos por triplicado. $P > 0.05$, t de student.

V. Discusión.

En este trabajo se ha demostrado que la unión de Gli-H³ a membranas sinaptosomales de la retina de pollo es reversible, saturable, y que presenta una farmacología y constantes cinéticas que se correlacionan con las descritas para el sitio de Gli del receptor de NMDA en el SNC de la rata.

I. Farmacología.

La Gli-H³ es un radioligando que ha sido empleado en otras descripciones farmacológicas y cinéticas del sitio de Gli en el receptor de NMDA, y que ha sido poco efectivo para el estudio de los receptores postsinápticos de tipo inhibitor (Marvzón y col., 1986). El ACPC, un compuesto que permite discernir entre el sitio de unión para Gli en los receptores de tipo inhibitor postsinápticos y el sitio de unión para Gli en los receptores de NMDA, con el que interactúa preferentemente (Marvzón y col., 1989; Pullan y Powell, 1992), presenta una potencia de inhibición de la unión específica de Gli-H³ a membranas de P1 y de P2 que es muy parecida a la de la Gli (ver gráficas 1, 2 y tabla 2). La D-serina, que es un agonista en el sitio de Gli de los receptores de NMDA (Bristow y col., 1986; Marvzón y Skolnick, 1988) inhibe la unión de Gli-H³ en estas preparaciones con una afinidad diez veces menor con respecto al ACPC, lo cual concuerda cualitativamente con estudios similares del sitio de Gli en el receptor de NMDA en membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de la rata (Snell y col, 1988; Ransom y Deschenes, 1988; Kessler y col., 1989; Pullan y Powell, 1992). El cociente IC50 Gli/IC50 agonista

ilustra el hecho de que la afinidad de ambos compuestos (ACPC y D-serina) es mayor en la fracción P2 con respecto a la fracción P1. El antagonista de los receptores postsinápticos de tipo inhibitorio, estricnina, solo inhibe la unión de Gli-H^3 a estas membranas de la retina a altas concentraciones, con una afinidad cien veces menor ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) a la observada para la Gli y el ACPC, y diez veces menor que la de la D-serina (ver gráfica 2 y tabla 2). El cociente $\text{IC}_{50} \text{ Gli}/\text{IC}_{50} \text{ estricnina}$ demuestra que este compuesto inhibe con baja afinidad la unión de Gli-H^3 , con mayor selectividad en la fracción P2. Por otra parte, los antagonistas 7-Cl-K y ACEA-1021, dos compuestos con alta afinidad en el sitio de Gli de receptores de NMDA neuronales y recombinantes (Kessler y col., 1989; Baron y col., 1991; O'Shea y col., 1991; Pullan y Powell, 1992; Woodward y col., 1995), no inhiben la unión específica de Gli-H^3 en membranas sinaptosomales de la retina a concentraciones de hasta $50 \mu\text{M}$ (7-Cl-K) o $500 \mu\text{M}$ (ACEA-1021), lo cual indica que la unión específica de Gli-H^3 a estas membranas se lleva a cabo a través de sitios que presentan diferencias importantes con respecto a los descritos en el SNC. Por otra parte, las constantes de inhibición determinadas para los compuestos Gli y ACPC son distintas en membranas de ambas capas plexiformes de la retina, siendo de mayor afinidad en P2. Las curvas de inhibición no son sigmoideas, lo que revela un solo sitio de unión. Este resultado no concuerda con el hecho de que en la retina se han descrito sitios de unión para glicina distintos de los que forman parte del receptor de NMDA (Pérez-León y Salceda, 1995). Las diferencias, sin embargo, podrían deberse a variantes en la metodología empleada en cada caso.

Para evaluar la interacción de la Gli-H^3 en estas membranas, se calcularon los coeficientes de Hill ($n\text{H}$) para cada una de las curvas de inhibición que se presentan en la gráfica

2 (ver gráfica 3 y tabla 1). Los coeficientes de Hill determinados para los compuestos Gli y D-serina no son distintos de uno ($nH=1$), lo cual indica que se requiere de una molécula de Gli o en su caso, de D-serina para inhibir la unión de una molécula de Gli-H³ a estas membranas, y por lo tanto, que de existir más de un sitio de unión (tipo o subtipo de receptor) para Gli-H³ en estas membranas, su afinidad por estos compuestos es muy parecida. Con respecto a las curvas de inhibición con estricnina, los coeficientes de Hill fueron mayores de uno ($nH > 1$), lo cual ha sido interpretado como que se requiere más de una molécula de estricnina para inhibir la unión de una molécula de Gli-H³ a estas membranas, y que no excluye la existencia de uno o varios sitios de unión para Gli-H³ con baja afinidad por la estricnina. Cabe mencionar que existen estudios en los que se han observado coeficientes de Hill mayores de 1 cuando se inhibe la unión de estricnina-H³ a membranas de la médula espinal de la rata (Marvizón y col., 1986). Se ha demostrado que esto se debe a diferencias en los sitios de unión de los agonistas y antagonistas, ya que los residuos de aminoácidos relacionados con la unión de la Gli al sitio del agonista en los receptores inhibidores, son diferentes pero complementarios, a los que interactúan con el antagonista estricnina por lo que este compuesto se une con alta afinidad al sitio del antagonista y con baja afinidad al sitio de Gli (Marvizón y col., 1986; Galvez-Ruano y col., 1995). Por otra parte, Marvizón y colaboradores (1986) han demostrado que la composición iónica del medio de ensayo en preparaciones similares de la médula espinal de la rata, modifica la interacción de la Gli y de otros agentes farmacológicos con los receptores de tipo inhibidor postsináptico siendo ésta mayor conforme la fuerza iónica se incrementa. Así pues, los resultados del presente trabajo no excluyen la presencia de receptores de tipo inhibidor, que en estas condiciones experimentales (radioligando y ambiente iónico) presentan baja afinidad por la estricnina.

Con respecto al análisis de las curvas de inhibición con ACPC, el coeficiente de Hill tiene un valor menor a uno ($nH < 1$), lo que podría deberse a una interacción con una relación de uno a uno para desplazar a una molécula de Gli-H³ de varios sitios que podrían corresponder a subtipos de un mismo receptor con afinidad muy parecida. La selectividad del ACPC y la interpretación de los coeficientes de Hill calculados con base en las curvas de inhibición para los compuestos usados, sugieren la existencia de entidades moleculares distintas con baja afinidad por la estricnina, que corresponden a los sitios de unión para Gli en el receptor de NMDA, y muy probablemente a los receptores postsinápticos de tipo inhibitor, ya que existe evidencia de que varias interneuronas y neuronas de segundo y tercer orden en la retina expresan estos receptores (Grünert y Wässle, 1993; Brandstätter y col., 1994).

2. Cinética de la unión de glicina-H³.

Además de la especificidad farmacológica, la unión de Gli-H³ a estas membranas es saturable y la constante de disociación al equilibrio es similar a la determinada en membranas del SNC (100 a 200 nM); (ver gráfica 4; Baron y col., 1991; O'Shea y col., 1991; Widdowson y col., 1995). El análisis de regresión no lineal de las curvas de saturación presentadas en la gráfica 4 indica que la ecuación que mejor describe la interacción de la Gli-H³ a estas membranas es la que corresponde a un solo sitio, sin descartar la posibilidad de la existencia de varios sitios con afinidad similar. Esta segunda posibilidad parece ser la más indicada ya que las curvas de unión de Gli-H³ con respecto al tiempo (gráfica 5) presentan varias pendientes, indicando la presencia de varios sitios

de unión a estas membranas, o posiblemente de distintos estados conformacionales de un mismo receptor, con constantes de disociación diferentes (Weiland y Molinoff, 1981).

Para examinar la posibilidad de que dichas curvas correspondieran a distintos estados de activación de un mismo receptor (cooperatividad positiva), se midió de manera directa la disociación de Gli-H^3 de estas membranas. Como se puede observar en la gráfica 6, la disociación de la unión de Gli-H^3 observada cuando se añade una concentración elevada (1mM) de Gli en condiciones de equilibrio (línea punteada) es parcial y puede ser descrita por una curva exponencial con pendiente negativa, apoyando la interpretación de que la curva de asociación (línea continua) representa la unión de Gli-H^3 a más de un sitio con afinidades muy parecidas en estas membranas, y explica por que el análisis de Scatchard de las curvas de saturación no revela más que un sitio de unión. Con base en lo anterior, también se puede explicar el por qué la K_B determinada a partir de las Kobs es similar a la calculada en los experimentos de saturación, ya que si la Gli-H^3 se une de manera específica a sitios distintos con afinidades que en el equilibrio son muy parecidas, las respectivas Kobs serán muy parecidas. Por lo tanto, estos resultados indican la posibilidad de que existan sitios de unión distintos en estas membranas con un perfil farmacológico que se correlaciona con el sitio de Gli en el receptor de NMDA.

Las constantes cinéticas de asociación y de disociación determinadas en los experimentos de unión de Gli-H^3 con respecto al tiempo son distintas de los valores obtenidos para los receptores postsinápticos de tipo inhibitor en la médula espinal empleando el mismo radioligando, en los que la $K_{-1} = 0.36 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y la $K_1 = 1.38 \text{ min}^{-1}$ (Young and Snyder, 1973), que en comparación con

las constantes determinadas en este estudio, son muy grandes ($K_{-1} = 8.196 \times 10^{-5} \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en P1 y $5.246 \times 10^{-5} \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en P2; $K_1 = 1.150 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en P1 y $1.032 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en P2).

3. Modificación de la unión de glicina- H^3 en membranas sinaptosomales de la retina.

En la gráfica 7 se puede observar que la unión específica de Gli- H^3 varía dependiendo del pH, como sucede en la interacción de muchos neurotransmisores con sus receptores. En el caso del receptor de NMDA se ha demostrado que la disminución del pH, genera una disminución en la frecuencia de apertura del canal a través de un sitio específico, distinto al de la Gli, y cuya presencia depende de la edición alternativa del mRNA de la subunidad NR1 (Traynelis y Cull-Candy, 1990; Traynelis y Heinemann, 1995; Kashiwagi y col., 1996). La variación de la unión específica de Gli- H^3 observada en el intervalo de pH de 5 a 7.4, concuerda con estudios funcionales que demuestran que la afinidad de la glicina en el receptor de NMDA disminuye paralelamente a la frecuencia de apertura del canal conforme el pH disminuye (Traynelis y Cull-Candy, 1990; Tang y col., 1989). Por otra parte, la disminución tan notable de la unión específica a pH menores de 6, corrobora la importancia de residuos de aminoácidos que como el ácido aspártico ($\text{pK} = 4.4$) participan en la formación del sitio de unión para Gli en el receptor de NMDA (Kuryatov y col., 1994; Williams y col., 1996); de manera similar, la disminución de dicha unión a $\text{pH} > 7.4$ indica que otros residuos (cisteínas, $\text{pK} = 8.5$; lisinas, y tirosinas $\text{pK} = 10$) podrían ser importantes en la estabilidad de dicho sitio.

Los resultados de los experimentos de unión de Gli- H^3 en presencia de agonistas y antagonistas del sitio del L-glu en el receptor de NMDA en membranas de las capas plexiformes de

la retina demuestran que no se modifica significativamente (ver gráfica 8), lo cual apoya la idea de que los receptores de NMDA en la retina son diferentes de los que se expresan en el SNC. Por otra parte, se ha demostrado una interacción positiva entre el sitio de Gli y el sitio de unión para los anestésicos disociativos que actúan como bloqueadores de canal abierto en el receptor de NMDA. La unión de la Gli a su sitio, en presencia de concentraciones saturantes de L-glu, potencia considerablemente la unión de MK-801-H³ y de TCP-H³ en membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de la rata (Kessler y col., 1989; Ransom y Stec, 1988), pero lo hace de manera muy modesta en membranas sinaptosomales de la retina de embriones de pollos de 8 días de edad (Boje y col., 1992); dicho efecto no es recíproco cuando se mide la unión de Gli-H³ en presencia de 100 µM de MK-801 (ver gráfica 8). Otro compuesto relacionado con los receptores ionotrópicos glutamatergicos, la DNQX, antagonista competitivo de los receptores de AMPA, que interactúa con el sitio de Gli en el receptor de NMDA con una afinidad diez veces menor que la de la Gli (Pullan y Powell, 1992), no inhibe la unión específica de Gli-H³ a estas membranas, lo cual se correlaciona con la baja afinidad de los antagonistas de este sitio en la retina, ya que al igual que el compuesto ACEA-1021 (una quinoxalina) presenta una estructura basada en dos anillos aromáticos.

Respecto al perfil farmacológico de la unión de Gli-H³ a membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina, y las diferencias que presenta, particularmente al efecto de los antagonistas derivados del kinurenato y de las quinoxalinas, se deben considerar varios aspectos.

La posibilidad de que alguna alteración estructural del receptor causada por el tratamiento de las membranas haya afectado la interacción de ligandos como los antagonistas del sitio de Gli en el

receptor de NMDA es poco probable. Dicho efecto se correlaciona con la estructura de los ligandos, ya que tanto el 7-Cl-K como la quinoxalina ACEA-1021 tienen una estructura basada en anillos aromáticos, muy diferente de la estructura de los agonistas Gli, D-serina y ACPC, que son moléculas polares. Por otra parte, las constantes cinéticas determinadas en este trabajo coinciden con otros estudios, lo cual indica que a pesar de que este sitio en la retina presenta diferencias farmacológicas con los sitios descritos en el SNC, su afinidad por la Gli es muy parecida.

La información discutida hasta este momento es importante desde varios puntos de vista. El epitelio pigmentado tiene el mismo origen embriológico que la retina neural (Mund y Rodríguez, 1979) por lo que sería coherente pensar que todas las células de la retina expresan receptores de NMDA con características muy parecidas, relacionadas con el estado de desarrollo y con el contexto fisiológico. Las mismas observaciones descritas por López-Colomé y Frago (1995) se correlacionan con procesos análogos a los que ocurren en el SNC, pues existe evidencia de que los receptores de NMDA son menos sensibles a la potenciación por Gli con respecto a la edad (Kleckner y col., 1991) posiblemente a causa de un cambio en la composición heteromérica de los mismos (Sheng y col., 1994). En consecuencia, diferencias en la composición heteromérica y/o en la edición alternativa de alguna de las subunidades del receptor de NMDA en la retina, deben tener alguna relación con la modulación de la actividad del mismo.

La expresión de la subunidad NR2C se ha correlacionado con una farmacología característica, en la que la que el receptor de NMDA presenta una baja afinidad por los antagonistas del sitio para la Gli (Widdowson y col., 1995), y por los anestésicos disociativos como el MK-801 y

el TCP (Monyer y col., 1992). El bloqueo por Mg^{2+} en receptores NR1-NR2C expresados en sistemas heterólogos es muy débil en comparación con los receptores NR1-NR2A (Monyer y col., 1992). En el cerebelo y en ciertas neuronas del hipocampo restringidas a la capa granular, se ha correlacionado la presencia de altos niveles de expresión de la subunidad NR2C con las características farmacológicas de los receptores de NMDA en estos tejidos (Buller y col., 1994). Se sabe que las células granulares del cerebelo expresan dos tipos de receptores, uno de alta afinidad por el CPP- H^3 , y otro con baja afinidad por los agonistas, y particularmente por los antagonistas del L-glu. Las subunidades que más se expresan en esta estructura del sistema nervioso son la NR1, la NR2A y la NR2C; estudios de expresión en sistemas heterólogos indican que los heterómeros que expresan las subunidades NR1a/NR2A presentan una afinidad por el CPP 100 veces mayor que aquellos que expresan las subunidades NR1a/NR2C lo cual podría explicar la existencia de dos subtipos de receptores con las características descritas en esta estructura (Sekiguchi y col., 1990; Laurie y Seeburg, 1994). Se ha descrito que los receptores cerebelares presentan una baja afinidad por los anestésicos disociativos como el MK-801, y que además podrían ser insensibles a la potenciación por el coagonista Gli, aunque se piensa que la contaminación por Gli es un factor muy importante a considerar antes de interpretar cualquier resultado (Sekiguchi y col., 1990), sin embargo, parece que la expresión de la subunidad NR2C realmente modifica algunas propiedades bioquímicas de los receptores de NMDA en comparación con los receptores caracterizados en la corteza cerebral de la rata y con aquellos que presentan la subunidad NR2A pero no la NR2C.

En la retina de la rata se ha descrito la expresión de los mRNA que codifican para las subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR2C (Wafford y col., 1993), con una distribución que indica la

presencia de receptores heteroméricos en la retina interna, y muy posiblemente, de receptores homoméricos en la retina externa. La cantidad y la distribución de los mRNA en cualquier tejido no corresponde necesariamente a la ubicación de las proteínas funcionales, por lo que se debe tener cuidado al interpretar los resultados de dichos experimentos. Sin embargo, los resultados del presente trabajo demuestran que existen sitios de unión para Gli insensibles a estricnina en ambas capas plexiformes de la retina, y que presentan una farmacología similar a la descrita para los sitios que forman parte del receptor de NMDA en el SNC. La posibilidad de que existan varios de estos sitios no demuestra que existan diferentes ensamblajes del receptor de NMDA en la retina, pero puede convertirse en una hipótesis que sea sometida a experimentación. De ser así, es muy probable que las características farmacológicas de la unión de Gli-H³ descritas en este estudio correspondan al sitio de unión en el receptor de NMDA, y con base en la evidencia considerada en esta discusión, que la composición heteromérica de dichos receptores corresponda a una coexpresión de subunidades NR1 en uno o varios subtipos de receptor junto con la subunidad NR2C.

Se sabe que tanto el sitio de unión para el coagonista (Gli) como el correspondiente para el agonista (L-glu ó NMDA) se localizan en la subunidad NR1 (Moriyoshi y col., 1991). Experimentos en sistemas de expresión heterólogos indican que la expresión de receptores homoméricos de cada una de las variantes postranscripcionales de la subunidad NR1 no difieren en su afinidad por la Gli (Sugihara y col., 1992); de manera similar, la unión de ácido 5, 7 dicloro-kinurénico-H³ presenta la misma afinidad por receptores formados por cada una de dichas variantes (Anegawa y col., 1994; Grimwood y col., 1995). A diferencia de los receptores nativos del cerebelo, cuando la subunidad NR1 se coexpresa con alguna de las cuatro subunidades NR2 en sistemas heterólogos, la afinidad de

la Gli por estos receptores se modifica, siendo mayor en aquellos receptores con la composición NR1-NR2C (Wafford y col., 1993), sin embargo la afinidad por el ácido 5, 7-dicloro-kinurénico- H^3 no cambia (Aneqawa y col., 1994; Laurie y Seeburg, 1994). Interesantemente, la constante de inhibición de la unión del ácido 5, 7-dicloro-kinurénico- H^3 por la Gli es considerablemente pequeña (de alta afinidad) en aquellos receptores compuestos por las subunidades NR1-NR2C en comparación con cualquier otra combinación de subunidades (Laurie y Seeburg, 1994).

En el presente estudio, el perfil farmacológico del sitio de glicina en el receptor de NMDA es de baja afinidad por los antagonistas, por lo que una hipótesis plausible para explicar las diferencias observadas en la inhibición de la unión de Gli- H^3 por estos compuestos a membranas de la retina en comparación con estudios en el SNC, es que tanto la modificación postranscripcional de subunidades NR1, en la que se encuentra tanto el sitio de Gli como el del L-glu, como su asociación diferencial con las subunidades NR2, determinan dicho perfil farmacológico.

VI. Conclusiones.

1.- Los resultados de este trabajo demuestran la presencia de sitios de unión para Gli-H^3 en membranas sinaptosomales de la retina. Estos sitios presentan una farmacología y constantes cinéticas similares a las descritas para el sitio de Gli en el receptor de NMDA en el SNC.

2.- La unión específica de Gli-H^3 a estas membranas es reversible y saturable; y se concentra en la capa plexiforme interna ($B_{\text{máx}} = 2.381 \pm 0.3464$ pmol/mg de proteína en P1 y $B_{\text{máx}} = 12.70 \pm 2.25$ en P2). Las constantes de disociación al equilibrio (K_B), calculadas a partir de las curvas de saturación (195.1 ± 89.73 nM para P1, y $K_B = 208.0 \pm 86.70$ nM para P2) concuerdan con las constantes determinadas en condiciones en que no se ha alcanzado el equilibrio (K_B de 140.31235 ± 0.000061 y 196.72 ± 0.00002307 nM para P1 y P2 respectivamente).

3.- La potencia de varios agonistas y antagonistas de los receptores de Gli para inhibir la unión específica de Gli-H^3 a estas membranas es la siguiente: $\text{Gli} = \text{ACPC} > \text{D-serina} \gg \text{estricnina} \gg \gg 7\text{-Cl-K}$ y ACEA-1021 . Dicha unión se modifica por el pH pero no por otros ligandos de otros sitios en el receptor de NMDA.

4.- Las constantes de disociación al equilibrio, las constantes de inhibición, los coeficientes de Hill y los resultados de las cinéticas de asociación y disociación de la Gli-H^3 en estas membranas, sugieren la existencia de diversos sitios de unión, entre los que se incluyen los receptores de glicina postsinápticos de tipo inhibitorio, y muy probablemente diversos subtipos de receptores de NMDA que podrían corresponder a receptores heteroméricos con estequiometrías distintas, pero afinidad similar.

5.- Estos resultados indican que las diferencias observadas principalmente en el patrón farmacológico de estos sitios con respecto al SNC, podrían servir como base para estudiar la participación de la glicina en la neurotransmisión excitadora en la retina.

Tabla resumen.

	Fracción P1		Fracción P2	
K_{-1}	0.01150 min ⁻¹		0.01032 min ⁻¹	
K_{-1}	0.00008196 nM ⁻¹ min ⁻¹		0.00005246 nM ⁻¹ min ⁻¹	
K_B	140.31 nM		196.72 nM	
Bmáx	2.38 pmol/mg de proteína		12.70 pmol/mg de proteína	
	<u>IC₅₀</u>	<u>nH</u>	<u>IC₅₀</u>	<u>nH</u>
	(μ M)		(μ M)	
Glicina	1.36	1	11.01	1
ACPC	1.00	<1	6.06	<1
D-serina	61.96	1	66.23	1
Estricnina	398.11	>1	251.19	>1
7-cloro kinurenato	>50.00	---	>50.00	---
ACEA-1021	>500.00	---	>500.00	---

VII. Referencias.

1. Agosthino, P., Duarte, C. B., Carvalho, A. P., and Oliveira, C. R. (1995). Modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor activity by oxidative stress conditions in chick retinal cells. Neurosci. Lett. , 198, 193-196.
2. Agranoff, B. N. and Fisher, S. K. (1994). Phosphoinositides. In: Basic Neurochemistry. G. J., Siegel, B. W., Agranoff, R. W., Albers and P. B. Molinoff (eds) Raven Press: New York, p 423.
3. Albers, G. W., Goldberg, M. P., and Choi, D. W. (1989). N-methyl-D-aspartate antagonists: ready for clinical trial in brain ischemia?. Ann. Neurol. , 25, 398.
4. Alfonso M., Duran R., Duarte C. B., Ferreira I. L., and Carvalho, A. P. (1994). Domoic acid induced release of [³H]GABA in cultured chick retina cells. Neurochem. Int., 24, 267-274.
5. Amin, J. and Weiss, D. S. (1993). GABA_A receptor needs two homologous domains of the β -subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. Nature , 366, 656-659.
6. Anegawa, N. J., Lynch, D. R., and Pritchett, D. L. (1994). Characterization of [³H]-dichloro kynurenic acid binding in cloned NMDA receptors expressed in transfected cells. Neurosci. Abst. , 469.
7. Áriens, J. E., Beld, A. J., Rodrigues de Miranda, J. F. and Simonis, A. M. (1979). The pharmacoreceptor effector concept: a basis for understanding the transmission of information in biological systems. In R. D. O'Brien (Ed.), The receptors, a comprehensive treatise (pp 33-92). New York: Plenum Press.
8. Bading and Greenberg, (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. Science, 253(5022), 912-914.

9. Barnstable, C. J. (1993). Glutamate and GABA in retinal circuitry. Curr. Opin. Neurobiol. , 3 , 520-525.
10. Baron, B. M., Siegel, B. W., Slone, A. L., Harrison, B. L., Palfreyman, M. G. and Hurt, S. D. (1991). [³H]5,7-dichlorokynurenic acid, a novel radioligand labels NMDA receptor-associated glycine binding sites. Eur. J. Pharmacol. , 206, 149-154.
11. Betz, H. (1990). Homology and analogy in transmembrane channel design: lessons from synaptic membrane proteins. Biochemistry, 29 , 3591-3599.
12. Bliss, T. V. P. and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature, 361(6407), 31-39.
13. Bojc, K. M., Skolnick, P., Raber, J., Fletcher, R. T. and Chader, G. (1992). Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. Neurochem. Int. 20(4), 473-486.
14. Boycott, B.B. and Dowling, J. E. (1969). Organization of the primate retina: light microscopy. Phil. Trans. Roy. Soc. , B225, 109-184.
15. Brandstätter, J. H., Hartveit, E., Sassoè-Pogneto, M. and Wässle, H. (1994). Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. Eur. J. Neurosci. , 6 , 1100-1112.
16. Bristow D. R., Bowery N. G. and Woodruff G. N. (1986). Light microscopic autoradiographic localization of ³H-glycine and ³H-Strychnine binding sites in rat brain. Eur. J. Pharmacol. 126: 303-307.

17. Buller, A., Larson, H. C., Schneider, B. E., Beaton, J. A., Morrisett, R. A. and Monaghan, D. T. (1994). The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. J. Neurosci., 14(9), 5471-5484.
18. Cajal, Santiago Ramón. (1928). "Degeneration and regeneration of the nervous system" (R.M. May, trans). Hafner: New York, 1959.
19. Cockroft, V. B., Oriells, M. O., Thomas, P. and Lunt, G. G. (1993). Homologies and disparities of glutamate receptors: a critical analysis. Neurochem. Int., 23 (6), 583-594.
20. Collingridge, G. L. and Singer, W. (1990). Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. T. Pharmacol. Sci., 11, 290-296.
21. Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989). Release of endogenous excitatory aminoacids from turtle photoreceptors. Nature, 341, 536-539.
22. Cotman, C. W., Monaghan, D. T., Ottersen, O. P. and Strom-Mathisen, J. (1987). Anatomical organization of excitatory aminoacid receptors and their pathways. Trends Neurosci., 10(7), 273-280.
23. Curtis, D. R., Hosli, L. and Johnston, G. A. R. (1968). A pharmacological study of the depression of spinal neurons by glycine and related amino acids. Exp. Brain Res., 6, 1-18.
24. Davanger, S., Ottersen, O. P. and Storm-Matheson, J. (1991). Glutamate, GABA and glycine in the human retina: an immunocytochemical investigation. J. Comp. Neurol., 311, 483-494.
25. Duarte, C. B., Ferreira, I. L., Santos, P. F., Oliveira, C. R. and Carvalho, A. P. (1993). Glutamate increases the $[Ca^{2+}]_i$ but stimulates Ca^{2+} independent release of $[^3H]GABA$ in cultured chick retina cells. Brain Res., 611, 130-138.

28. Duarte, C. B., Santos, P. F. and Carvalho, A. P. (1996). $[Ca^{2+}]_i$ regulation by glutamate receptor agonists in cultured chick retina cells. Vis. Res., **36**(8), 1091-1102.
29. Ehinger, B. (1977). Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. Exp. Eye Res., **25**, 221-234.
30. Ehinger, B., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. and Dowling, J. E. (1988). Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 8321-8325.
31. Ehinger, B. (1989). Glutamate as a retinal neurotransmitter. In R. Weiler and N. N. Osborne (eds.) Neurobiology of the inner retina (pp. 1-14). Berlin: Springer Verlag.
32. Farber, D. and Adler, R. (1986). Issues and questions in cell biology of the retina. In R. Adler and D. Farber (eds.), The retina, a model for cell biology studies. USA: Academic Press, Inc.
33. Ferreira, I. L., Duarte, C. B., Santos, P. F., Carvalho, C. M. and Carvalho, A. P. (1994). Release of $[^3H]$ GABA evoked by glutamate receptor agonists in cultured chick retina cells. Brain Res., **664**, 252-256.
34. Ferrer-Montiel, A. V. and Montal, M. (1996). Pentameric subunit stoichiometry of a neuronal glutamate receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 9359-9363.
35. Fink, K., Bonisch, H., Gothert, M. (1990). Presynaptic NMDA receptors stimulate noradrenaline release in the cerebral cortex. Eur. J. Pharmacol., **185**(1), 115-117.
36. Fukunaga and Soderling. 1990. Regulation of Ca^{2+} / Calmodulin dependent protein kinase II by brain gangliosides. J. Neurochem., **54**(1), 103-109.

37. Galvez-Ruano, E., Lipkowitz, K. B. and Aprison, M. H. (1995). On identifying a second molecular antagonistic mechanism operative at the glycine receptor. J. Neurosci. Res. , 41, 775-781.
38. Galzi, J. L., Revah, F., Black, D., Goeldner, M., Hirth, C. and Changeux, J. P. (1990). Identification of a novel amino acid alpha tyrosine 93 within the cholinergic ligand binding sites of the acetylcholine receptor photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligand binding site. J. Biol. Chem. , 265, 10430-10437.
39. Galzi, J.L., Bertrand, D., Devillers-Tihiéry, A., Revah, F., Bertrand, S. and Changeux, J. P. (1991). Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. FEBS Lett. , 294 , 198-202.
40. Grimwood, S., LeBourdelles, B. and Whiting, P. J. (1995). Recombinant human NMDA homomeric NR1 receptors expressed in mammalian cells. J. Neurochem., 64(2), 525-530.
41. Grünert, U. and Wässle, H. (1990). GABA-like immunoreactivity in the macaque monkey retina: a light and electron microscopy study. J. Comp. Neurol., 292, 509-524.
42. Grünert, U. and Wässle, H. (1993). Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina. J. Comp. Neurol. , 335(4), 523-537.
43. Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. J. Physiol. (London) , 40, iv-vii.
44. Hirai, H., Kirsch, J., Laube, B., Betz H. and Kuhse, J. (1996). The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 93, 6031-6036.

45. Hofmann, H. D. and Möckel, V. (1991). Release of γ -amino[3 H]butyric acid from cultured amacrine-like neurons mediated by different excitatory aminoacid receptors. J. Neurochem. , 56, 923-932.
46. Hole, J. W. Jr. (1990). Human Anatomy and physiology. W. C. Brown: Dubuque, Iowa, pp: 449-464.
47. Hollmann, M. & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. Annu. Rev. Neurosci. , 17, 31-108.
48. Hucho F. (Editor). (1993). New comprehensive biochemistry, Vol 24:Neurotransmitter Receptors, Elsevier, Amsterdam.
49. Ikeda, K., Nagasawa, M., Mori, H., Araki, K., Sakimura, K., Watanabe, M., Inoue, Y. and Mishina, M. (1992). Cloning and expression of the $\epsilon 4$ subunit of the NMDA receptor channel. FEBS Lett. , 313(1), 34-38.
50. Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M. et al. (1993). Molecular characterization of the family of the N-Methyl-D-Aspartate receptor subunits. J. Biol. Chem. , 268, 2836-2843.
51. Johnson, J.W. and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature, 325, 529-531.
52. Kalloniatis, M. and Marc, R. E.. (1990). Interplexiform cells in the goldfish retina. J. Comp. Neurol. 297, 340-358.
53. Kalloniatis, M. and Fletcher, E. L.. (1993). Immunocytochemical localization of the amino acid neurotransmitters in the chicken retina. J. Comp. Neurol., 336, 174-193.

54. Kashiwagi, K., Fukuchi, J., Chao, J., Igarashi, K. and Williams, K. (1996). An aspartate residue in the extracellular loop of the N-Methyl-D-aspartate receptor controls sensitivity to spermine and protons. Mol. Pharmacol., 49, 1131-1141.
55. Kemp, J. A. and Leeson, P. D. (1993). The glycine site of the NMDA receptor, five years on. J. Pharmacol. Sci., 14, 20-25.
56. Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G. and Baudry, M. (1989). A glycine site associated with N-Methyl-D-Aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. J. Neurochem., 52(4), 1319-1328.
57. Kleckner, N.W. and Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Science, 241, 835-837.
58. Kleckner, N.W., and Dingledine, R. (1991). Regulation of hippocampal NMDA receptors by magnesium and glycine during development. Mol. Brain Res., 11, 151-159.
59. Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H. and Sakmann, B. (1996). Structure of the M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. Neuron, 17, 343-352.
60. Kuryatov, A. B., Laube, H., Betz, H. and Kuhse, J. (1994). Mutational analysis of glycine binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. Neuron, 12, 1291-1300.
61. Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. and Mishina, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. Nature, 358, 36-41.

62. Lauric, D. J. and Seeburg, P. H. (1994). Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. Eur. J. Pharmacol., **268**, 334-345.
63. Lerea, L. S., Carlson, N. G., McNamara, J. O. (1995). N-methyl-D-aspartate receptors activate transcription of c-fos and NGFI-A by distinct phospholipase A2-requiring intracellular signaling pathways. Mol. Pharmacol. , **47**(6), 1119-25
64. Linn, D. M. and Massey, S. C. (1991). Acetylcholine release from the rabbit retina mediated by NMDA receptors. J. Neurosci., **11**, 123-133.
65. Linn, D. M., Blazynski, C., Redburn, D. A. and Massey, S. C. (1991). Acetylcholine release from the rabbit retina mediated by kainate receptors. J. Neurosci., **11** , 111-122.
66. Lombardi, G., Moroni, F. and Moroni, F. (1994). Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. Eur. J. Pharmacol., **271**, 489-495.
67. López-Colomé, A. M., Salceda, R. and Frago, G. (1993). Specific interaction of glutamate with membranes from cultured retinal pigment epithelium. J. Neurosci. Res. , **34**, 454-461.
68. López-Colomé, A. M., Frago, G., Wright, C. E. and Sturman, J. A. (1994). Excitatory amino acid receptors in membranes from cultured human retinal pigment epithelium. Curr. Eye Res. , **13**, 553-560.
69. López-Colomé, A.M. and Frago, G. (1995). Glycine stimulation of glutamate binding to chick retinal pigment epithelium. Neurochem. Res., **20**(8), 887-894.
70. López-Colomé, A. M. (1995). Transmisión excitadora en la retina: receptores involucrados y sus mecanismos bioquímicos, en Neurobiología de los sistemas sensoriales, G., Meza Ruiz (Coordinadora Editorial) México: Universidad Nacional Autónoma de México.

71. Lowry, O. H., Rosebrough, W. H., Farr, A. L. and Randall, R. S. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
72. Mc Bain, C. J. and Mayer, M. L. (1994). N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. Physiol. Rev., 74, 723-760.
73. Mac Dermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J. and Baker, J. L. (1986). Agonist- and voltage-gated calcium entry in cultured mouse spinal cord neurons under voltage clamp. J. Neurosci. 7, 3230-3244.
74. Marc, R. E. (1986). Neurochemical stratification in the inner plexiform layer of the vertebrate retina. Vision Res., 26, 223-238.
75. Marc, R. E. (1989). The role of glycine in the mammalian retina. In N. N. Osborne and G. J. Chader (eds.) Progress in Retinal Research, 8, (pp. 67-107). Oxford: Pergamon Press.
76. Marc, R. E., Liu, W. L., Kalloniatis, M., Raiguél, S. F. and Haesendonck, E. (1990). Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina. J. Neurosci. , 10, 4006-4034.
77. Marvizón, J. C. G. , Vázquez, J., García Calvo, M., Mayor Jr, F., Ruíz Gómez, A., Valdivieso, F. and Benavides, J. (1986). The glycine receptor: pharmacological studies and mathematical modelling of the allosteric interaction between the glycine-and strychnine-binding sites. Mol. Pharmacol. , 30, 590-597.
78. Marvizón, J.C. G. and Skolnick, P. (1988). ³Hglycine binding is modulated by Mg²⁺ and other ligands of the NMDA receptor cation channel complex. Eur. J. Pharmacol. , 151, 157-158.

79. Marvizón, J. C. G., Lewin, A. H. and Skolnick, P. (1989). 1-Aminocyclopropane carboxylic acid: a potent and selective ligand for the glycine modulatory site of the N-Methyl-D-aspartate receptor complex. J. Neurochem. , 52(3), 992-994.
80. Massey, S. C. and Redburn, P. A. (1987). Transmitter circuits in the vertebrate retina. Prog. Neurobiol. , 28, 55-96.
81. Massey, S. C. (1990). Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. In N. N. Osborne and G. J. Chader (eds.) Progress in retinal Research, 9 (pp399-425) Oxford: Pergamon Press.
82. Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K. and Mishina, M. (1992). Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. Nature, 357, 70-74.
83. Meldrum, B. (1985). Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. Clin. Sci. , 68, 113.
84. Michaelis, E. K. (1996). Glutamate Neurotransmission: Characteristics of NMDA receptors in the mammalian. Brain Neural Notes. Promega Neurosciences, 2(2), 3-7.
85. Miller, R. F. and Slaughter, M. M. (1986). Excitatory amino acid receptors of the retina: diversity of subtypes and conductance mechanisms. T. Neurosci. 9, 211-218.
86. Monaghan, D. T., Bridges, R. J. and Cotman, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. , 29, 365-402.

87. Monahan, J. B., Biesterfeldt, J. P., Hood, W. F., Compton, R. P., Cordi, A. A., Vazquez, M. I., Lanthorn, T. H. and Wood P. L. (1990). Differential modulation of the associated glycine recognition site by competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. Mol. Pharmacol. , 37:780-784.
88. Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, N., Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. Science, 256, 1217-1221.
89. Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. Nature, 354, 31-37.
90. Moroni, F., Alesiani, M., Facci, L., Fadda, E., Skaper, S. D., Galli, A., Lombardi, G., Mori, F., Ciuffi, M., Natalini, B. and Pellicciari, R. (1992). Thiokynurenates prevent excitotoxic neuronal death *in vitro* and *in vivo* by acting as glycine antagonists and as inhibitors of lipid peroxidation. Eur. J. Pharmacol., 218, 145-151.
91. Mund, M. L. and Rodríguez, M. M. (1979). Embryology of the human retinal pigment epithelium. In K. M. Zinn and M. F. Marmor (Eds.) The retinal pigment epithelium (pp 45-52). London: Harvard University Press.
92. Nakanishi, S. (1990). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. Science, 258, 597-603.
93. Neal, M. J. and Atterwill, C. K. (1974). Isolation of photoreceptor and conventional nerve terminals by subcellular fractionation of rabbit retina. Nature, 251, 331-333.
94. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher P., Herbet, A. and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. Nature , 307, 462-465.

95. Olney, J. W., Price, M. T., Fuller, T. A., Labruyere, J., Carpenter, M. and Mahan, K. (1986). The anti-excitotoxic effects of certain anesthetics. Neurosci. Lett., **68**, 29.
96. O'Shea, R. D., Manallack, D. T., Conway, E. L., Mercer, L. D. and Beart, P. M. (1991). Evidence for heterogenous glycine domains but conserved multiple states of the excitatory amino acid recognition site of the NMDA receptor: regional binding studies with [3 H]glycine and [3 H]L-glutamate. Exp. Brain Res., **86**, 652-662.
97. Pérez-León, J. and Salceda, R. (1995). Different specific binding sites of [3 H]glycine and [3 H]strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina. Neurochem. Res., **20**(8), 915-922.
98. Pittaluga A., Garrone, B. and Raiteri, M. (1992). Presynaptic glycine-dependent NMDA receptors mediate enhancement of the release of [3 H]NA from noradrenergic terminals of rat hippocampus. Pharmacol. Res., **25** (1), 113-4
99. Pullan, L. M. and Powell, R. J. (1992). Comparison of binding at strychnine-sensitive (inhibitory glycine receptor) and strychnine-insensitive (N-methyl-D-aspartate receptor) glycine binding sites. Neurosci. Lett., **148**, 199-201.
100. Ransom, R. W. and Stec, N. L. (1988). Cooperative modulation of [3 H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. Journal of Neurochemistry, **51**(3), 830-836.
101. Rodieck R. W. (1973). The vertebrate retina, principles of structure and function. W. H. Freeman and Company: San Francisco.
102. Rothman, S. M. and Olney, J. W. (1986). Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. Ann. Neurol., **19**, 105.

103. Sekiguchi, M., Okamoto, K. and Sakai, Y. (1990). Glycine-insensitive NMDA-sensitive receptor expressed in *Xenopus* oocytes by guinea pig cerebellar mRNA. J. Neurosci. **10**(7), 2148-2155.
104. Schmieden, V., Kuhse, J. and Betz, H. (1993). Mutation of glycine receptor subunit creates β -alanine receptor responsive to GABA. Science, **262**, 256-258.
105. Schoepp, D. D. and Conn, P. J. (1993). Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. T. Pharmacol. Sci., **14**, 13-20.
106. Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N. and Jan, L.Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. Nature , **368**, 144-147.
107. Snell, L. D., Morter, R. S. and Johnson, K. M. (1988). Structural requirements for activation of the glycine receptor that modulates the N-methyl-D-aspartate operated ion channel. Eur. J. Pharmacol., **156**(1), 105-110.
108. Sprengel R and Seeburg PH. 1995. Iontropic glutamate receptors. En: North RA (Editor): Ligand and voltage-gated ion channels. CRC Press, Inc, USA, pp:213-263.
109. Stern-Bach Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P. O., O'Hara, P. J. and Heinemann, S. F. (1994). Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid binding proteins. Neuron, **13**, 1345-1357.
110. Sugihara H., Moriyoshi, K., Ishii, T., Masu, M. and Nakanishi, S. (1992). Structure and properties of 7 isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. Biochem. Biophys. Res. Commun. **185**, 826-832.

111. Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. and Silman, I. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science, 253, 872-879.
112. Tachibana, M. and Okada, T. (1991). Release of endogenous excitatory aminoacids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina. J. Neurosci., 11, 2199-2208.
113. Tang, C. M., Dichter, M. and Morad, M. (1989). Mechanism of NMDA channel modulation by H^+ at near physiological pH. Soc. Neurosci. Abstr., 15, 326.
114. Traynelis, S. F. and Cull-Candy, S. G. (1990). Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. Nature, 345, 347-350.
115. Traynelis, S. F., Hartley, M. and Heinemann, S. (1995). Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. Science, 268, 873-876.
116. Tout, S., Chan-Ling, T., Hollander, H. and Stone, J. (1993). The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. Neurosci., 55(1), 291-301.
117. Vernon, T. A. (1997). The functional diversity of native and recombinant AMPA receptors. In: D. T., Monaghan and R. J. Wenthold (Eds.). The ionotropic glutamate receptors (pp:285-311) New Jersey: Humana Press, Totown.
118. Wada, K., Dechesne, C. J., Shimasaki, S., King, R. G., Kusano, K., Buonanno, A., Hampson, D. R., Banner, C., Wenthold, R. J. and Nakatani, Y. (1989). Sequence and expression of a frog brain complementary DNA encoding a kainate binding protein. Nature, 342, 684-689.

119. Wafford K. A., Bain C. J., Le Bourdelles B., Whiting P. J. and Kemp J. A. (1993). Preferential co-assembly of recombinant NMDA receptors composed of three different subunits. Neurorep. , **4**, 1347-1349.
120. Watkins J. C. and Evans R. H. (1981). Excitatory amino acid transmitters. Ann. Rev. Pharmacol. , **21**, 165-204.
121. Wenzel, A., Scheurer, L., Künzi, R., Fritschy, J. M., Mohler, H. and Benke, D. (1995). Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain.
122. Weiland, G. A. and Molinof, P. B. (1981). Quantitative analysis of drug-receptor interactions. I. Determination of kinetic and equilibrium properties. Life Sci. , **29**, 313-330.
123. Widdowson, P. S., Trainor, A. and Lock, E. A. (1995). NMDA receptors in rat cerebellum and forebrain: subtle differences in pharmacology and modulation. J. Neurochem. , **64**(2), 651-661.
124. Wikler, K. C. and Finlay, B. L. (1989). Developmental heterochrony and the evolution of species differences in retinal specializations, en: Development of the vertebrate retina. Finlay B. L. and D. R. Sengelaub. Plenum Press, New York.
125. Williams, K. (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. Mol. Pharmacol. , **44**, 451- .
126. Williams, K. Chao, J., Kashiwagi, K., Masuko, T. and Igarashi, K. (1996). Activation of N-Methyl-D-aspartate receptors by glycine: Role of an aspartate residue in the M3-M4 loop of the NR1 subunit. Mol. Pharmacol. , **50**, 701-708.

127. Wood, M. W., VanDongen, H. M. A. and VanDongen, A. M. J. (1995). Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4882-4886.
128. Woodward, R. M., Huettner, J. E., Guastella, J., Keana, J. F. W. and Weber, E. (1995). *In vitro* pharmacology of ACEA-1021 and ACEA-1031: Systemically active quinoxalinediones with high affinity and selectivity for N-Methyl-D-aspartate receptor glycine sites. Mol. Pharmacol., 47, 568-581.
129. Wong, J.K.T. and Thukral, V. (1996). Presynaptic NMDA receptors display physiological characteristics of homomeric complexes of NR1 subunits that contain exon 5 insert in the N-terminal domain. J. Neurochem., 66(2), 865-868.
130. Yazulla, S. (1986). GABAergic mechanisms in the retina. In N. N. Osborne and G. J. Chader (eds.): *Progress in Retinal Research*, Vol. 5. New York: Pergamon Press, pp. 1-51.
131. Young, A. B. and Fagg, G. E. (1990). Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. T. Pharmacol. Sci., 11, 126-133.
132. Young and Snyder. (1973). Strychnine binding associated glycine receptors of the central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2832-2836.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA