

3



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

EXPRESIÓN DE GENES PARA LOS RECEPTORES A  
GLICINA DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA  
NERVIOSO DE LA RATA.

706307

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO MILEDI**



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.

**DEDICO MI TRABAJO A:**

**DIOS**

Por su constante presencia

**CHAVO**

Por ser lo mejor que me ha dado la vida.

**MI HIJOS**

**Pita, Chavo, José y Diego**  
Con todo mi amor porque fue un trabajo de equipo.

**MI PAPÁ**

Por los valores que me imprimió con su ejemplo.

**LA MAMA**

Por ser la maravillosa mujer que con su vida emite las palabras Amor y vida interior.

**DR. RICARDO MILEDI**

Por ser el mejor científico y amigo del mundo.

**A MI AMIGA MELA**

Por todo lo que tu y yo sabemos.

**MIS HERMANOS**

Por ser cada uno como son.

**RP. JAVIER GUTIÉRREZ DIAZ ORC**

Por su invaluable apoyo.

**DR. JESÚS GARCÍA COLUNGA**

Por su confianza y trabajo.

**A MI ALMA MATER**

Por ser el origen y fin de mi esfuerzo. En especial a Chacha y Checo.

**A QUIEN PUSO PIEDRAS  
EN MI CAMINO**

Porque gracias a eso tuve la oportunidad de convertir mi doctorado en una experiencia maravillosa.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Universidad Nacional Autónoma de México: Por lo aprendido en mi experiencia de doctorado.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: Por la beca obtenida para llevar a cabo mis estudios.

Dr. Alfonso Cárovez Trejo y Mauricio Díaz Muñoz: Por su valiosa orientación como miembros del comité tutorial.

A los miembros del Jurado: Dr. Manuel Salas Alvarado, Dr. Gonzalo Mtnez. de la Escalera, Dr. Ubaldo García Hernández, Dr. León Cintra McGrone y Dr. Jaime Mas Oliva. Por su dedicación y observaciones.

A los del laboratorio: Marina, Ata, Dani, Héctor y Paco.

Dr. Juan Riesgo Escovar: Por sus comentarios al manuscrito.

Dr. Martín García Servín y Elizabeth Vázquez Gómez. Por su apoyo con los animales de experimentación.

Lic. Juan Martínez Juárez. Por su incondicionalidad.

A mis amigos: vigilantes, laboratoristas e intendentes. Gracias

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
SUMMARY	9
I. INTRODUCCIÓN	10
I.1) Los receptores a glicina	
I.2) Expresión genética de los receptores a glicina	
I.3) Qué hacen los receptores a neurotransmisores antes de la formación de la sinapsis.	
I.4) Desarrollo del sistema nervioso.	
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1) OBJETIVOS GENERALES	
IV.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
V. METODOLOGÍA	24
V.1) Métodos Biológicos	
V.2) Métodos Moleculares	
V.3) Electrofisiología	
V.4) Efecto del antagonista de los receptores a glicina en la formación del sistema nervioso de embriones completos.	
V.5) Cuantificación de proteínas.	
V.6) Métodos estadísticos.	
VI. RESULTADOS	41
VII. DISCUSIÓN	67
VIII. CONCLUSIONES	75
IX. ESTUDIOS PROPUESTOS	77
X. BIBLIOGRAFÍA	78
XI. ANEXO I	85
XII. ANEXO II	94
XIII ANEXO III	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Estructura del receptor a glicina.	11
Fig. 2 Fases iniciales del desarrollo.	17
Fig. 3 Período de neurulación.	19
Fig. 4 Encéfalo de embrión de rata E18.	25
Fig. 5 Rana <i>Xenopus laevis</i> y ovocitos.	33
Fig. 6 Expresión de RNAm de rata de diferentes edades.	44
Fig. 7 Expresión de receptores para GABA y glicina en ovocitos inyectados con RNAs aislados de distintas regiones del sistema nervioso central de rata E18.	47
Fig. 8 Relación dosis/respuesta a la glicina en tres regiones del sistema nervioso central de rata E18.	49
Fig. 9 Relación dosis/respuesta a la glicina en ovocitos inyectados con RNAm de tallo cerebral E18 y PN0.	50
Fig. 10 Relación corriente/voltaje de receptores a glicina.	52
Fig. 11 Desensibilización de receptores a glicina expresados por RNAm embrionarios.	54
Fig. 12 Potenciación de las corrientes de glicina.	56
Fig. 13 Corriente de glicina modulada por calcio.	58
Fig. 14 Inhibición de la corriente de glicina por estriquina.	60
Fig. 15 Estructura de embriones normales.	63
Fig. 16 Efecto del ácido retinoico en embriones de rata.	65
Fig. 17. Efecto de la estriquina en embriones de rata.	66
Fig. 18. Extracción de RNA.	87
Fig. 19 Comparación de la expresión de RNA de tallo recién nacido extraídas por los métodos de fenol-cloroformo y fenol-guanidino-tiocianato.	93

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. Amplificación por RT-PCR del RNAm para las subunidades del receptor a glicina durante la ontogenia.	42
TABLA II Subunidades del receptor a glicina obtenidas por transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa, en tres regiones de E18.	45
TABLA III Parámetros morfológicos y contenido de proteínas en embriones de rata durante el desarrollo.	62
TABLA IV Extracción de RNA por los métodos de fenol-cloroformo y de fenol-guanidío tiocianato.	87

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

CA	Cerebro anterior.
CM	Cerebro medio.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
E(n)	Embrión de (n) días de edad.
EC <sub>50</sub>	Concentración del agonista a la que se alcanza la mitad de la respuesta electrofisiológica máxima.
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico.
Gli	Glicina.
IGli	Corriente inducida por glicina.
m-ee	Media $\pm$ error estándar.
n	Número de muestras.
nA	Nanoamperios.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PN	Postnatal.
rGli	Receptores a glicina.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNA <sub>TOT</sub>	Ácido ribonucleico total.
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa.
TC	Tallo cerebral.
TCPO	Tallo cerebral de ratas postnatal 0.
V	Volts.



## RESUMEN

La formación del sistema nervioso es un proceso complejo de diferenciación y organización celular, que depende por una parte de la información genética y por otra parte de factores epigenéticos. Es posible que uno de estos factores sea la activación de los receptores a glicina durante el desarrollo, tema central del presente trabajo.

La presencia de genes activos que codifican para los receptores a glicina (rGli) se exploró durante la ontogenia del sistema nervioso central de la rata, identificando los transcritos que codifican para las distintas subunidades del rGli, así como los receptores formados en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*. También se estudió el efecto de la estriknina (el principal antagonista de los receptores a glicina) en embriones completos durante la neurulación en la rata.

Con los resultados obtenidos se evidenció por primera vez: 1) La presencia de transcritos que codifican para la subunidad  $\beta$  del receptor a glicina desde el día embrionario 8 (E8) y la presencia de los transcritos que codifican para las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  y  $\beta$  del receptor a glicina en las vesículas cerebrales E13. 2) Las propiedades electrofisiológicas de los receptores a glicina (rGli) formados al inyectar a ovocitos de *Xenopus leavis* RNAm de cerebro anterior, cerebro medio y tallo cerebral de rata E18. 3) La expresión diferencial de los transcritos que codifican para las subunidades  $\alpha$  en tres regiones del sistema nervioso E18 de rata. 4) Un efecto teratogénico de la estriknina en embriones completos de rata durante la neurulación.

## SUMMARY

Many complex processes of cellular differentiation and organization occur during the formation of the nervous system. These processes depend on genetic information as well as on factors that modify gene expression. One such factor might be signaling mechanisms triggered by neurotransmitters acting on their receptors during development.

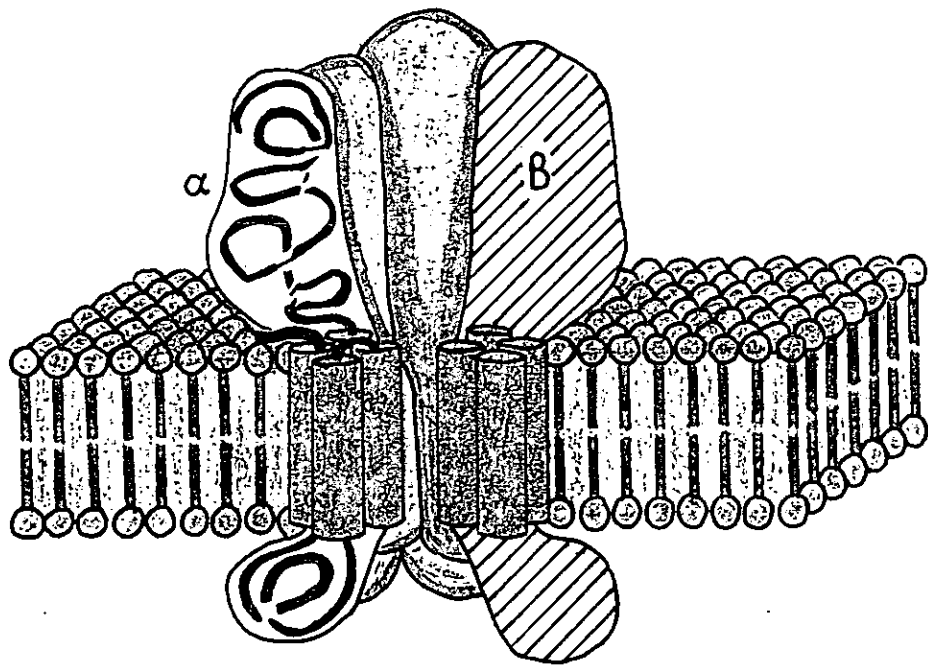
The aim of the present study was to investigate the expression of the genes that codify for Gly receptors during development. With the results it was evidenced for the first time: 1) The presence of the Gly receptor  $\beta$  subunit transcript, before the nervous system is formed. The  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  and  $\beta$  transcripts in cerebral vesicles E13, and a differential  $\alpha$  subunit transcription in three regions at E18. 2) The electrophysiological properties of Gly receptors formed in *Xenopus leavis* oocytes injected with mRNA from E18 forebrain, midbrain and brain stem. 3) A teratogenic effect of strychnine on complete rat embryos, during the period of neurulation.

## I. INTRODUCCIÓN

### **I.1 LOS RECEPTORES A GLICINA:**

Las membranas plasmáticas de las células se encuentran constituidas entre otros componentes por proteínas que pueden ser integrales o periféricas. Los receptores a neurotransmisores son proteínas integrales de las membranas celulares que pueden ser activados por voltaje o por ligando. Entre los receptores activados por ligando que forman canales iónicos, se encuentran los rGli constituidos por cinco subunidades de dos tipos:  $\alpha$  (1-4, 48 kDa) y  $\beta$  (58 kDa), con estequiometría  $\alpha_3\beta_2$  (Fig. 1) (Betz y cols. 1994).

Los rGli se localizan principalmente en neuronas de la médula espinal, retina, sistema auditivo y tallo cerebral (Kotak y cols., 1998) y forman canales iónicos que al ser activados, permiten el paso de iones cloro. Se ha reportado que la presencia de la subunidad  $\beta$  confiere al canal iónico baja conductancia, en relación con los receptores formados por  $\alpha$ 1-3. (Grenningloh y cols., 1990; Betz y cols., 1994).



**Fig. 1 Estructura del receptor a glicina.** El rGli es un pentámero de proteínas integrales de la membrana plasmática, constituidas por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (A). La subunidad  $\alpha$  está constituida por 4 segmentos transmembranales, en ellas la región amino y carboxilo terminal se orientan hacia el lado extracelular.

El aminoácido glicina (Gli) que activa a los rGli se sintetiza por dos vías. La primera a partir de su precursor (serina), en el metabolismo de los folatos y la segunda a partir del metabolismo de los carbohidratos. En ambos casos interviene el 4 metiltetrahidrofolato como aceptor de metilos (Lehninger, 1979).

El aminoácido Gli y el ácido  $\gamma$ aminobutírico (GABA) son neurotransmisores inhibitorios en todos los vertebrados adultos (Betz y cols., 1999; Bormann, 2000). Sin embargo, en células inmaduras dichos neurotransmisores desempeñan una función excitatoria (Flint y cols., 1998; Chen y cols., 1996). Este último efecto se ha asociado con una alta concentración de cloro

intracelular en las células inmaduras, por lo cual el  $\text{Cl}^-$  sale cuando se activan los rGli originando la despolarización de la membrana. Una vez despolarizada la membrana se abren canales de calcio, lo que genera un incremento intracelular de calcio, que a su vez puede participar en la modulación de la expresión genética (Ito y Cherubini, 1991; Kandler y Friauf, 1995; Obrietan y Van den Pol, 1995; Lo y cols., 1998). Con estos descubrimientos se incrementó la importancia del rGli durante el desarrollo, la cual debe ser precisada para conocer los mecanismos de su participación en la formación del sistema nervioso.

Los rGli son activados por algunos otros aminoácidos como  $\beta$ -alanina, taurina, L-alanina, L-serina y prolina (Schmeiden y cols., 1992; Hussy y cols. 1997; Akagi y Miledi, 1988; Akagi y cols. 1989), sin embargo la respuesta a estos últimos aminoácidos es menos potente. Entre las sustancias que tienen efecto antagónico en los rGli están la estricnina y el esteroide amidina RU 5135 con afinidades en el rango nM.

Los transcritos que codifican para el rGli han sido evidenciados en tejido embrionario de rata con la técnica de hibridación *in situ* y se ha sugerido que la subunidad  $\alpha_2$ , se expresa durante el desarrollo del sistema nervioso y en el tejido adulto es reemplazada por la  $\alpha_1$  (Sato y cols., 1992). En otros estudios durante el desarrollo se encontraron los transcritos para la subunidad  $\alpha_2$  en cerebro medio en E14 y  $\alpha_3$  a partir de E19. (Malosio y cols., 1991).

En tejido adulto los RNAm para la subunidad  $\alpha_1$  son abundantes en la médula espinal y en algunas áreas del cerebro, como por ejemplo en los colículos (superior e inferior). Los transcritos de la subunidad  $\alpha_2$  se

encuentran en diferentes regiones, como la corteza cerebral y el hipocampo. La subunidad  $\alpha 3$  se expresa a bajos niveles en el hipocampo, mientras que los transcritos para la subunidad  $\beta$  se encuentran ampliamente distribuidos en la médula espinal y el cerebro (Malosio y cols., 1991).

En estudios para explorar la presencia de transcritos para los rGli en médula espinal de rata neonatal y adulta, utilizando el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*, se reportó la presencia de dos tipos de mensajeros que codifican para rGli, uno más abundantes en la médula espinal de rata adulta y otro en el mismo tejido de rata neonatal. Los resultados electrofisiológicos indican que las dos fracciones inducen conductancias similares, pero diferencia en el tiempo que el canal permanece abierto. (Morales y Miledi, 1991; Morales y cols., 1994). Estudios realizados en la corteza cerebral de rata durante el desarrollo muestran que la mayor expresión de rGli fue en recién nacido (PN0) y después fue disminuyendo, mientras que la expresión de RNAm del receptor de GABA aumentaba (Carpenter y cols., 1988).

## **1.2 EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES A GLICINA:**

Los receptores a glicina se forman en las células por la expresión génica, la cual consiste en la transcripción de genes y su traducción a proteínas. La activación de los genes eucarióticos depende de una gran variedad de factores, entre los que se pueden mencionar el tipo de célula, su estado de diferenciación, la edad y señales extracelulares.

La expresión de los genes se puede controlar en diferentes etapas del proceso como: 1) La transcripción, 2) la maduración del RNA, 3) la traducción de RNA y 4) la activación o inactivación de las proteínas formadas. Los rGli activados y/o sus neurotransmisores pueden participar durante la

transcripción, activando genes tempranos que posteriormente actúan como factores de transcripción. El inicio de la transcripción en células eucarióticas requiere de la presencia de cuatro elementos básicos: a) Un promotor que incluye el sitio de inicio, b) la enzima RNA polimerasa responsable de la transcripción, c) factores de transcripción y d) un conjunto de secuencias de DNA reguladoras que pueden encontrarse a distancia del promotor y ejercen su función cuando proteínas reguladoras se unen a dichas secuencias de DNA (Alberts y cols. 1998).

El proceso de regulación de la transcripción se lleva a cabo cuando la RNA polimerasa, se une al promotor por efecto de factores de transcripción. Este complejo (RNA polimerasa-DNA) generalmente no es capaz de iniciar el paso de DNA a RNA, hasta que es activado por proteínas reguladoras. Una vez activo el complejo de inicio, la RNA polimerasa y los factores de transcripción, se liberan y da inicio el proceso.

Cuando se activan los receptores a neurotransmisores pueden inducir la expresión de genes tempranos, que una vez traducidos, vuelven a entrar al núcleo y llevan a cabo la función de factores de transcripción (Szekely y cols., 1987; Morgan y Curran, 1991). La inducción de genes tempranos por receptores a neurotransmisores, también se ha estudiado con la aplicación de agonistas y antagonistas en madres gestantes, por ejemplo en dosis de 2 a 8 mg/kg de clorhidrato de 2,5 dimetoxi-4iodoanfetamina (agonista para el receptor 5HT<sub>2C</sub>), causa una amplia expresión y localización de fos en el encéfalo. Un antagonista de 5 HT<sub>2C</sub>, la ritanserina aplicada a una dosis de 0.4 mg/kg atenúa el incremento de la expresión de fos producida por el agonista antes mencionado (Hughes y Dragunow, 1995).

### **1.3 QUE FUNCIÓN DESEMPEÑAN LOS RECEPTORES A NEUROTRANSMISORES ANTES DE LA FORMACIÓN DE LA SINAPSI?**

En las neuronas maduras la función principal de los receptores a neurotransmisores es la comunicación celular a través de la sinapsis. En células inmaduras las funciones de dichos receptores es desconocida, es posible que participen en la migración celular, en la regulación de la síntesis de macromoléculas, como factores de crecimiento, en la comunicación intercelular y en la transmisión de la información posicional durante la gastrulación (Buznikov y cols., 1996). Una característica peculiar en etapas tempranas del desarrollo es la localización de dichos receptores, tanto en el interior de la célula como en su superficie (Valinsky y Loonis, 1984).

Es sabido que la densidad, localización y composición de diferentes receptores cambia durante el desarrollo. Por ejemplo en el músculo esquelético de fetos de mamíferos, se encuentran receptores nicotínicos en toda su superficie (Diamond y Miledi, 1959). Durante el desarrollo posterior, este receptor disminuye en las regiones fuera de la placa neuromuscular (Diamond y Miledi, 1962). También hay cambios en las subunidades que forman los diferentes receptores, como el de acetilcolina que cambia la subunidad  $\gamma$  por  $\epsilon$ , en el rGli  $\alpha 2$  por  $\alpha 1$  y en los receptores a GABA  $\alpha 2/\alpha 3\beta 2\gamma 1$  cambian por  $\alpha 1\beta 2\gamma 1/\gamma 2$  (Takahashi y cols., 1992; Laurie y cols., 1992; Bouzat, y cols., 1994). La función que estos cambios desempeñan durante el desarrollo es poco conocida.

La función de los rGli durante el desarrollo temprano no ha sido estudiada, los trabajos previos de receptores a neurotransmisores han sido reportados principalmente en el sistema serotoninérgico (Wallace y Lauder, 1983), por ejemplo se ha propuesto que los sistemas serotoninérgico y colinérgico son

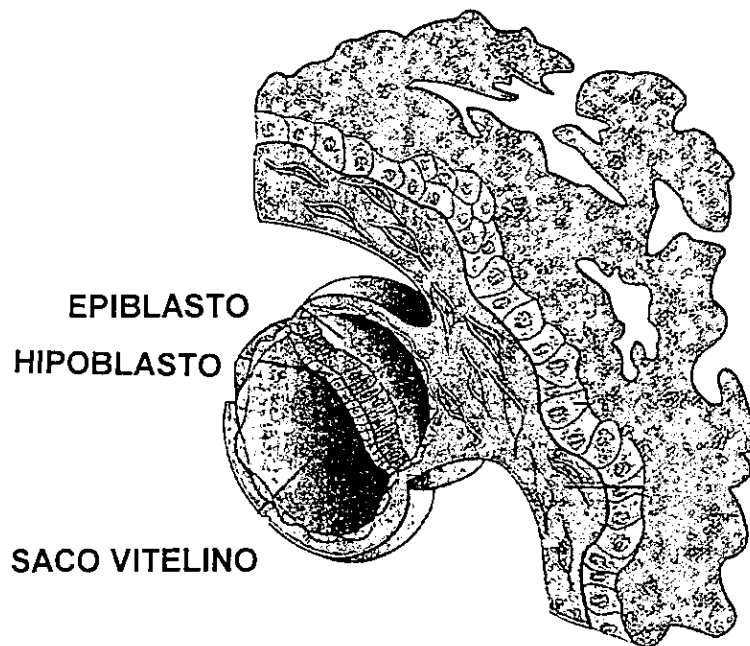


necesarios para la interacción de gametos durante la fertilización. También se han localizado sitios de unión a serotonina durante el cierre del tubo neural en ratas, ratones, pollos, *Helisoma sp* y *Xenopus leavis*, así como en moluscos (Lauder y cols., 1981; Messenger y Warner, 1989; Goldberg y Kater, 1989; Whitaker-Azmitia, 1993; Khozhai y cols., 1995, Borella y cols., 1997), lo que sugiere la participación de esta amina en la división celular, por su unión a varios subtipos de receptores (Lauder, 1990).

#### **I.4 DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO:**

De acuerdo a lo planteado en la sección anterior y lo encontrado en nuestro laboratorio acerca de la presencia de transcritos para los rGli durante el desarrollo temprano (García-Alcocer y cols., 1999), se hace necesario implementar una línea de investigación para explorar la presencia de los receptores antes de la formación de la sinapsis y la posible participación de estas moléculas en la formación del sistema nervioso, para lo cual se revisarán los aspectos básicos de dicho desarrollo.

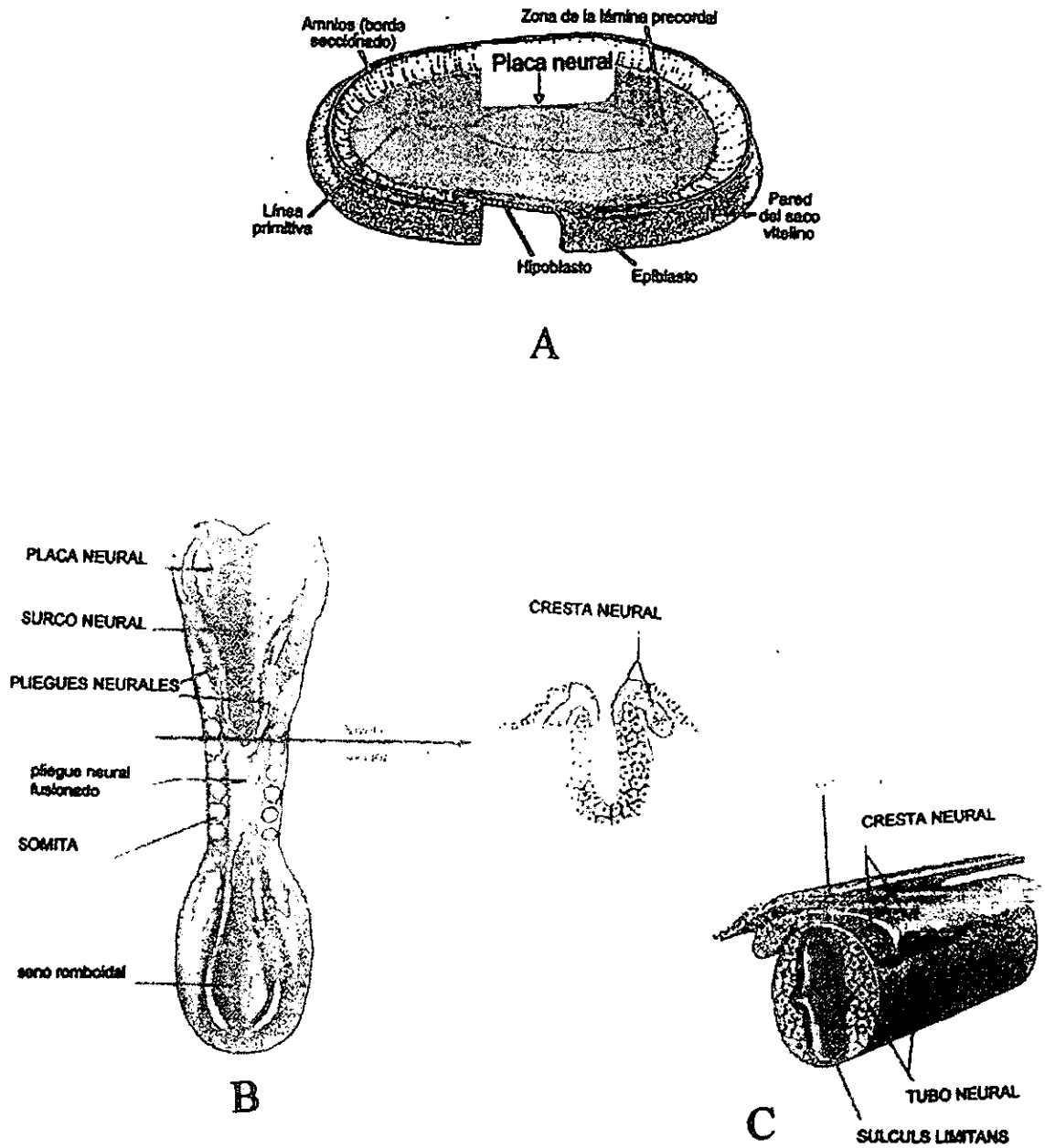
El sistema nervioso de los mamíferos inicia su formación cuando en el embrión se origina el disco bilaminar, constituido por un lado del epiblasto, que formará el ectodermo y mesodermo, y por el otro del hipoblasto, a partir del cual se desarrollará el endodermo embrionario, Fig. 2.



**Fig. 2 Fases iniciales del desarrollo.** A partir del embrioblasto se origina el disco bilaminar, constituido por una parte, del epiblasto a partir del cual se formará la placa neural (Adaptado de Langman y Sadler, 1996).

En el día embrionario 9 (E9) de la rata se forma en el disco bilaminar, una banda de células del epiblasto conocida como línea primitiva. Dicha línea se engrosa en el extremo cefálico, para formar el nódulo primitivo de Hensen, del que migran algunas células para dar origen a la notocorda (otra línea de células subepiblastica). La notocorda induce la formación de la placa neural (Keith, 1979).

En E9.5 (decimoctavo día en los humanos), la placa se invagina en un eje central para formar un surco, cuyos extremos forman pliegues neurales a cada lado. En E10 (final de la tercera semana en los humanos), los pliegues comienzan a unirse, iniciándose la formación del tubo neural. Al fusionarse los pliegues, algunas células no se incorporan y forman las crestas neurales, Fig. 3.



**Fig. 3** Período de neurulación: A) Placa neural, B) surco neural, nótese la formación de los somitas y C) la cresta neural se origina por migración de células desde el surco neural (Modificado de Netter, 1994).

El mesodermo intraembrionario se divide para formar somitas. Los somitas y la notocorda entre otros factores inducen el cierre del tubo neural, que transitoriamente está abierto en los dos extremos (Hamburger y Hamilton, 1951; Yoshio, 1998; Kandel y cols., 1991). A medida que el tubo neural toma forma, se desarrollan 3 capas (ependimaria, palio y marginal), a partir de las cuales se forman las distintas zonas del sistema nervioso central, constituido por células gliales y neuronales (Netter, 1994).

Debido a la proliferación celular y a la migración, el neuroporo anterior inicia su cierre aproximadamente a los 10.5 días en la rata (24 días en el humano) y el posterior o caudal un día más tarde. Cuando se cierra el tubo, la actividad mitótica celular en el neuroporo anterior forma el encéfalo y en el resto del tubo se origina la médula espinal.

En la futura región encefálica aparecen 3 prominencias primarias: El prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo. Posteriormente el prosencéfalo se divide en diencefalo y telencefalo. Del mesencéfalo deriva el cerebro medio. De las estructuras del romboencéfalo se origina el tronco celular. En adelante llamaremos tallo cerebral a las estructuras derivadas del romboencéfalo (Netter, 1994) sin el cerebelo.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

De acuerdo a los antecedentes mencionados:

- 1) Hay transcritos para los receptores a glicina en embriones de rata E14.
- 2) El desarrollo del sistema nervioso es modulado por receptores a neurotransmisores.
- 3) El RNAm de corteza cerebral de rata forma receptores funcionales a glicina en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*.
- 4) La aplicación de agonistas y antagonistas para receptores a neurotransmisores, originan cambios fenotípicos durante el desarrollo temprano.

Se plantearon las siguientes hipótesis:

## **III. HIPÓTESIS:**

- 1) Los RNAm que codifican para las subunidades de los rGli están presentes en embriones de rata desde antes del inicio de la formación del sistema nervioso.
- 2) Los transcritos que codifican para los rGli en diferentes regiones del sistema nervioso embrionario, se traducen y forman rGli funcionales en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*.
- 3) La rata es un modelo animal para el estudio del efecto de sustancias químicas en la formación del sistema nervioso.
- 4) El antagonista de los receptores a glicina (estricnina) induce cambios fenotípicos en la formación del sistema nervioso.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

De acuerdo a los antecedentes mencionados:

- 1) Hay transcritos para los receptores a glicina en embriones de rata E14.
- 2) El desarrollo del sistema nervioso es modulado por receptores a neurotransmisores.
- 3) El RNAm de corteza cerebral de rata forma receptores funcionales a glicina en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*.
- 4) La aplicación de agonistas y antagonistas para receptores a neurotransmisores, originan cambios fenotípicos durante el desarrollo temprano.

Se plantearon las siguientes hipótesis:

## **III. HIPÓTESIS:**

- 1) Los RNAm que codifican para las subunidades de los rGli están presentes en embriones de rata desde antes del inicio de la formación del sistema nervioso.
- 2) Los transcritos que codifican para los rGli en diferentes regiones del sistema nervioso embrionario, se traducen y forman rGli funcionales en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*.
- 3) La rata es un modelo animal para el estudio del efecto de sustancias químicas en la formación del sistema nervioso.
- 4) El antagonista de los receptores a glicina (estricnina) induce cambios fenotípicos en la formación del sistema nervioso.

#### **IV. OBJETIVOS GENERALES:**

- 1) Explorar la presencia de transcritos que codifican para los rGli, provenientes de tejido neural en el desarrollo de la rata.
  
- 2) Caracterizar las propiedades electrofisiológicas de los rGli formados a partir de transcritos de tejido embrionario en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*.
  
- 3) Establecer un modelo animal (rata) para el estudio del efecto del antagonista de rGli (estricnina) en la formación del sistema nervioso en embriones completos.



#### **IV.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1) Identificar los RNAm que codifican para las subunidad del rGli, en embriones de rata a edades embrionarias E8, E13, E18 y PNO.
  
- 2) Estudiar la expresión de receptores funcionales en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*, inyectados con RNAm de embriones de rata E8, E13, E18 y PNO.
  
- 3) Explorar las propiedades electrofisiológicas de los rGli, formados en ovocitos de *Xenopus leavis* por la inyección de RNAm de CA, CM y TC E18. Las propiedades propuestas son: a) La afinidad del agonista (Gli) por el receptor, b) Los iones que permean por los canales. c) La desensibilización de los receptores formados, d) La afinidad de los receptores por la estricnina.
  
- 4) Comparar la expresión funcional de rGli en ovocitos, inyectados con RNAm proveniente de una misma región (tallo cerebral) y de diferentes edades (E18 y PNO).
  
- 5) Establecer un modelo animal (rata) para el estudio del efecto teratógeno de sustancias químicas en la formación temprana del sistema nervioso. Validarlo con ácido retinoico (que es un teratógeno conocido) y explorar el efecto de la estricnina en la formación del sistema nervioso de embriones de rata.
  
- 6) Comparar los rendimientos de RNA<sub>tot</sub> obtenido por los métodos de extracción: fenol cloroformo y fenol-guanidino tiocianato en el tejido neural durante la ontogenia de la rata y su expresión en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*, inyectados con RNAm de tallo cerebral de rata PNO (Anexo I).

## V. METODOLOGÍA:

### V.1 MÉTODOS BIOLÓGICOS:

Se usaron ratas Sprague Dawley nulíparas de 12 semanas de edad, mantenidas con agua y alimento *ad libitum*, períodos de luz/obscuridad de 12 hr y una temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

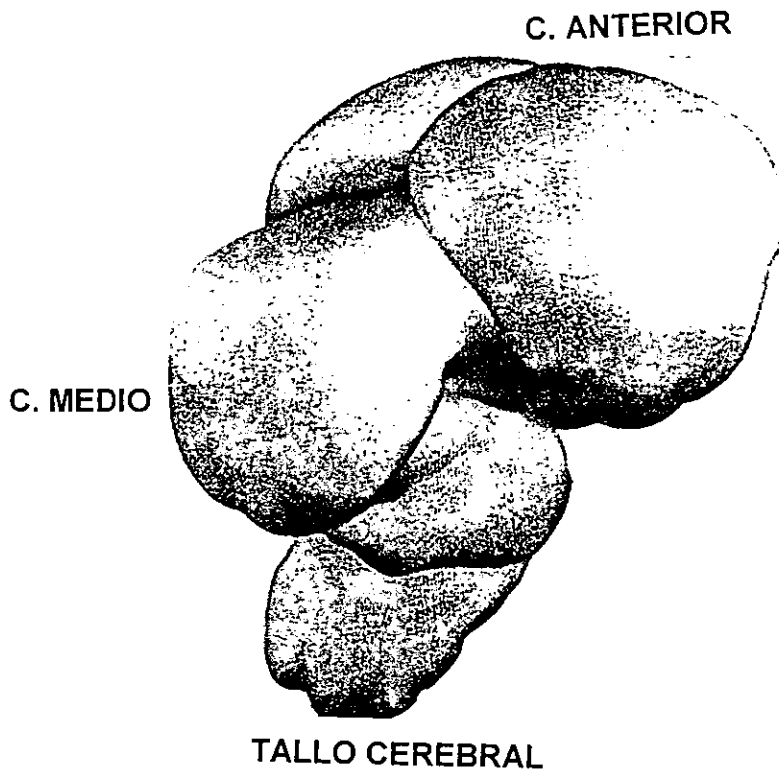
Para poder comparar los resultados con la literatura reportada. Los animales se cruzaron a razón de dos hembras por macho en dos grupos:

- 1) Para embriones E8, E11 y E13, las ratas se cruzaron por 2 hr y un día después de la aparición del tapón vaginal se denominó día uno de la gestación.
- 2) Para embriones E18, se cruzaron durante 12 hr de 7 PM a 7 AM, y se contó el día uno de la gestación a la aparición del tapón vaginal. En caso de duda en la gestación, se practicó un lavado vaginal en busca de espermatozoides al microscopio de luz.

Las ratas gestantes fueron sometidas a anestesia con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/Kg por vía intraperitoneal y se les practicó operación cesárea. Los embriones fueron disecados para la observación de sus características morfológicas y la cuantificación de proteínas totales. Los productos utilizados para estudios electrofisiológicos se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido.

La disección de embriones se llevó a cabo bajo microscopio estereoscópico de la siguiente manera: Las ratas con 8 y 11 días de gestación fueron sometidas a operación cesárea y se disecó el *conceptus*. A las ratas gestantes de 13 días, les fueron disecados los embriones y posteriormente

las vesículas cerebrales. En E15 se separó el encéfalo total. Para E18 y postnatal 0 (PN0), se procedió de la misma manera que en E13, solo que se separó el CA, el CM y el TC (Fig. 4). Las ratas adultas utilizadas tuvieron un peso entre 200 a 250 g, y se les extrajeron las regiones especificadas, que fueron congeladas en nitrógeno líquido de inmediato.



**Fig. 4. Encéfalo de embrión de rata E18.** A los embriones E18 disecados, se les separó el cerebro anterior, el cerebro medio y el tallo cerebral.

## V. 2 MÉTODOS MOLECULARES:

### V.2.1 EXTRACCIÓN DE RNA:

#### V.2.1.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL POR EL MÉTODO DE FENOL-CLOROFORMO:

El método de extracción por fenol-cloroformo (FC) se basa en la lisis celular con un detergente en solución, la separación de RNA y DNA por extracciones seriadas con cloroformo y la precipitación del RNA con NaCl.

Se colocó el vástago del homogenizador en agua libre de RNAsa (La preparación del agua es agregar 0.1% (v/v) de dietilpircarbonato (DEPEC), agitar una noche y se esterilizar durante 30 min a temperatura ambiente.

A un tubo libre de RNAsas de 50 ml se le agregaron 10 ml de medio de homogenización (Tris-HCl 200 mM pH 9.0/ NaCl50 mM/ EDTA10 mM/ SDS 0.5% (w/v)), al que se le adicionó 0.01 g de heparina y 10 ml de fenol presaturado con medio de homogenización (este último se preparó al disolver 100 g de fenol, previamente calentado a 55°C, en 11 ml de amortiguador de homogenización, justo antes de usar, se le agregó 0.11 g de 8-hidroxiquinoleina).

Se pesó 1 gr de la muestra (congelada en nitrógeno líquido, cuidando que no se descongelara), y se homogenizó 2 ó 3 min a velocidad de 3000 g, en un homogenizador Ultra-Turrax T25.

El homogenado se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 min, a 15°C. Al sobrenadante se le adicionaron 10 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente 5 min a temperatura ambiente. Este proceso se repitió hasta que la banda de interfase fue casi imperceptible. La fase acuosa, se transfirió a otro tubo y se

volvió a centrifugar.

Se eliminó el sobrenadante evitando el material blanco de la interfase, se colectó en un tubo limpio conteniendo 10 ml de fenol-cloroformo 1:1 (v/v). La muestra fue agitada por 5 min a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar como antes. Se repitió el paso anterior hasta que la interfase blanca desapareció (generalmente 2 ó 3 extracciones).

La capa acuosa superior se colectó en un tubo limpio, con 10 ml de cloroformo, fue agitado y se volvió a centrifugar. El sobrenadante fue colectado y se determinó el volumen. Se transfirió a otro tubo de 50 ml y se guardó en hielo. Se adicionaron 50  $\mu$ l de NaCl 4 M por cada ml colectado (para llevar a una concentración final de 0.2 M) y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto a 4°C. Se guardó a -20°C por 2 hr ó a -80°C por 30 min (En este paso puede dejarse precipitando indefinidamente a -20°C).

La muestra se centrifugó a 11,000 rpm por 30 min a 4°C, para coleccionar el RNA y el DNA. La mayor cantidad del sobrenadante se eliminó. Se disolvieron el RNA y el DNA en 5 ml de HEPES 20 mM, a pH 7.5 NaOH. Con la solución en hielo, lentamente se le agregaron 0.9 g de NaCl para llevar la solución a 3 M y se mantuvo a -15°C toda la noche. En este paso el RNA precipita y la mayoría del DNA se mantiene en solución.

Se centrifugó como antes y el precipitado fue lavado con 10 ml de acetato de sodio 3M, pH 6 a -4°C. Este paso se repite 3 veces y se eliminó el sobrenadante.

El paquete fue lavado 3 veces con etanol al 75% frío (-20°C). Se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min.

El precipitado se secó al vacío y fue disuelto en 400 ml de amortiguador HEPES 20 mM, ajustado a pH 7.5 con NaOH. La concentración de RNA se determinó en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  de 260 nm. Una densidad óptica de 1 a 260 nm corresponde a 40 mg/ml de RNA.

En la corteza cerebral de rata adulta se recuperó aproximadamente 1 mg del RNA. La solución de RNA se guardó a -70°C en alícuotas de 5  $\mu$ l de una solución de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Una relación de la DO 260/280, alrededor de 2 es la óptima (Sumikawa y cols. 1989).

#### **V.2.1.2 EXTRACCIÓN DE RNA POR EL MÉTODO DE FENOL-GUANIDIO TIOCIANATO:**

El tiocianato de guanidina, es uno de los más efectivos agentes caotrópicos. El protocolo de este método se basa en la lisis celular con un detergente y en la separación del RNA por diferencia en la densidad.

Método:

A 100 mg de tejido se le agregó: 1 ml de una solución de tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7, Sarcosyl al 0.5%, (p/v) (a esta solución se le conoce como D). Se adicionaron 360  $\mu$ l de una solución de  $\beta$ -mercaptoetanol 14.3 M por cada 50 ml de solución D.

Se homogenizó por 3 min a 3000 g en un homogenizador Ultra-Turrax T25 a 3000g y fueron adicionadas las siguientes soluciones, agitando manualmente cada vez: 0.1 vol de acetato de sodio 2 M pH 4, 1 volumen de fenol saturado en agua y 0.2 vol de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1

(v/v)). Se incubó en baño de hielo por 15 min (el fenol se prepara al poner partes iguales de fenol, previamente fundido a 55°C y agua con DEPC, se agitó con una barra magnética a velocidad media por una hora y se dejó reposar toda la noche, para separar las fases).

La muestra se centrifugó a 10,000 rpm 20 min, a 4°C, el sobrenadante se recuperó y se precipitó con 1 volumen de isopropanol durante 1 hora a -20°C.

La muestra se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se descartó y el paquete fue resuspendido con 0.8 ml de solución D. En los casos que no se logró la resuspensión, se incubó a 65°C hasta lograrla. A la mezcla se adicionó 1 volumen (0.8 ml) de isopropanol y se guardó a -20°C por 1 hr o toda la noche, después de lo cual se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min y el sobrenadante fue descartado.

El precipitado obtenido se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 75%. Se agitó y centrifugó durante 10 min, a 10,000 rpm, a una temperatura de 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se secó (de preferencia al vacío), las muestras fueron resuspendidas con agua libre de RNAasa (preparada al 1% en DEPC, agitada toda la noche y esterilizada) y fueron cuantificadas en espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm. La relación entre las dos lecturas fue  $\approx 2$  (Chomczynsky y Sacchi, 1987).

### **V.2.3 PURIFICACIÓN DEL RNAm:**

Se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en columnas de oligo (dT) celulosa, en donde se espera sean unidos los extremos de poli(A) que contiene el RNAm. El RNA aislado del tejido es calentado para exponer los

extremos poliadenilados de los RNAm que potencialmente se unen al oligo (dT). Los RNAr unidos inespecíficamente son lavados con alta concentración de sales (KCl 0.5 M en HEPES 5 mM), el RNAm es eluido, con HEPES 5 mM.

Se disolvió 0.2 g de polvo de oligo (dT) celulosa en agua estéril y se resuspendió hasta evitar partículas grandes (en cuyo caso fueron eliminadas). Se colocó el oligo (dT) en una columna de vidrio (Bio-Rad) con 10 ml de agua. Se adicionaron 10 ml de 0.1 N NaOH y una vez que pasó por la columna, se agregaron 10 ml de agua libre de RNAsa. La preparación del oligo (dT) fue terminada al agregar 10 ml de 0.5 M KCl/5 mM HEPES-NaOH pH 7.5.

A la muestra de RNA, se le adicionó un volumen igual de KCl 1 M. Se calentó durante 5 min a 65°C (baño maría), para obtener una concentración final de 0.5 M de KCl. La solución de RNA se aplicó lentamente a la columna. El RNA no unido se colectó y fue reaplicado por 2 veces más.

La columna se lavó con 0.5 M KCl, 5 mM HEPES-NaOH pH 7.5, hasta que la densidad óptica fue de cero (regularmente 4 ml para 1 mg de RNA). La velocidad de flujo puede incrementar, si los reactivos se llevan a 37°C.

El RNAm se eluyó con 3 ml de HEPES 5 mM-NaOH tibio (30-40°C) y se colectó en un tubo libre de RNAsas de 15 ml. El volumen de elución recomendado es para 1 mg de RNA total, si se tienen cantidades distintas se deberá ajustar el volumen, procurando que sea el mínimo para asegurar una buena recuperación.



A la solución de RNAm se agregó 50  $\mu$ l/ml de NaCl 4 M, para obtener una concentración final 0.2 M y el RNAm fue precipitado con 2.5 volúmenes de etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

El RNAm se colectó por centrifugación a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se descartó y el paquete se lavó, agregando 3 ml de etanol al 75% frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), se centrifugó por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminó el sobrenadante y se repitió 2 veces más. Las muestras obtenidas se cuantificaron en espectrofotómetro a una  $\lambda$  de 260 y 280 nm y se guardó en pequeñas alícuotas (en agua DEPC) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### V.2.4 TRANSCRIPTASA REVERSA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR):

Las bases del procedimiento están dadas primero, por la desnaturalización del RNAm por calentamiento, la cual en presencia de la transcriptasa reversa, un exceso de dNTPs y oligonucleótidos que hibridan específicamente a la secuencia blanco, se obtiene un cDNA que posteriormente se amplifica.

El RNAm (Poli (A)<sup>+</sup>) fue convertido a la primera cadena de cDNA de acuerdo al método (Titan One Tube RT-PCR system, de Roche), se usaron oligonucleótidos específicos. Para  $\alpha 1$  3'GGAAGCGGCGACATCACAA5', 5'TGGACATCCTCTCTCCGGAC3', para  $\alpha 2$  3'CAAGAGTTCAGGTTCCAGGG5' y 5'TCCCACAACTTCTCTTGATAG3', para  $\alpha 3$  3'GCACTGGAGAAGTTTACCG5' y 5'AATCTTGCTGATGAATTGAATGTC3', para  $\beta$  3'CTGTTTCATATCAAGCACTTGC5' y 5'GGGATGACAGGCTTGGCAG3'. En cada reacción se agregó 1  $\mu$ g de RNAm y el templado fue sometido a  $94^{\circ}\text{C}$

por 2 min, posteriormente a 10 ciclos de: Desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación a 50°C por 30 s y elongación a 68°C 1 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación 50°C por 30 s, elongación a 68°C 3 min y finalmente 1 ciclo de elongación durante 7 min a 68°C. Como control positivo se utilizó gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa y agua como control negativo. Los productos de las reacciones amplificadas se observaron en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio.

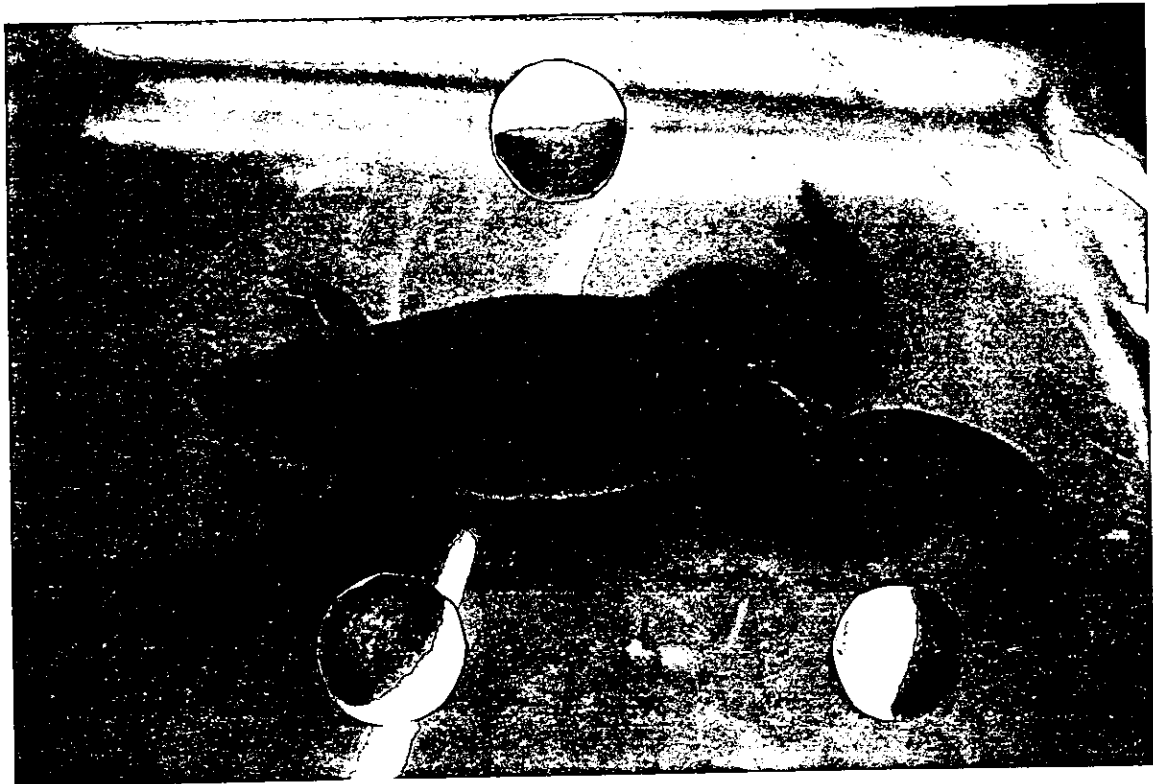
### V.3 ELECTROFISIOLOGÍA:

#### **Ranas *Xenopus leavis* como modelo para el estudio de receptores:**

Los ovocitos de *Xenopus leavis*, son una herramienta utilizada inicialmente por el Dr. Ricardo Miledi y ahora por muchos laboratorios en el mundo, para la clonación de receptores, para ello se inyectaron con RNAm que se tradujo y la proteína se incorporó a la membrana. Las corrientes inducidas en los ovocitos, constituyeron un ensayo altamente sensible y selectivo para la expresión de receptores, lo que permitió explorar sus propiedades.

Existen diferentes métodos para el estudio de los receptores incorporados a la membrana, como el canal unitario y la fijación de voltaje de los ovocitos con 2 electrodos, ésta última es la técnica más simple. La sensibilidad de la expresión del ovocito y el sistema de registro es alta, por lo que es posible detectar la traducción de unas pocas copias de un mensaje particular. Por ejemplo, el límite de resolución con una fijación de voltaje es aproximadamente 1 nA, por lo que es posible detectar tan pocos receptores abiertos como 1000 moléculas, si el paso de corriente a través de ellas es un picoamperio o más.

El ovario de una rana femenina adulta contiene miles de ovocitos, en diferentes estadios de desarrollo, desde muy tempranos y transparentes hasta los más grandes (VI) que miden 1.5 mm de diámetro Fig. 5.



**Fig. 5** *Rana Xenopus leavis* y ovocitos. A) Rana adulta *Xenopus leavis*, B) Ovocitos en estadio de desarrollo VI, nótese el polo animal (oscuro) y el polo vegetal (paja), en el que se inyecta el RNAm.

### **V.3.1 Preparación de ovocitos de *Xenopus leavis*, para microinyección:**

Las ranas hembras *Xenopus leavis*, se obtuvieron de proveedores comerciales (Xenopus I, NASCO), se anestesiaron en hielo y fueron operadas, para extraer unos cuantos lóbulos de ovario, se disecaron individualmente los ovocitos individuales en estadio V y VI manualmente, con el uso de pinzas de disección, bajo el microscopio de disección. Estos ovocitos son mantenidos a 16°C, en solución de Barth's (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.33 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.41, HEPES 5 mM pH 7.4) conteniendo 0.1 mg/ml gentamicina. Los ovocitos disecados se cultivaron una noche.

### **V.3.2 Inyección de RNAm a ovocitos de *Xenopus*:**

Al día siguiente los ovocitos se inyectaron con 50 nl de una solución de 1 mg/ml de RNAm (centrifugado 30 seg a 10,000 rpm), a una concentración de 1 mg/ml, usando una micropipeta calibrada para inyección. Después de la inyección los ovocitos se mantuvieron a 16°C en la solución de Barth's estéril. Se registraron a partir del día 4 después de inyectados (tiempo que se ha estandarizado para el sistema, en el cual se lleva a cabo la traducción de los transcritos y la incorporación de los receptores a la membrana).

### **V.3.3 Preparación de ovocitos para el registro:**

Los ovocitos están rodeados de una capa de células foliculares, que también tienen receptores. Dos días después de inyectados, se eliminó dicha capa, por un tratamiento durante 20 min (tiempo que se ajusta para cada donador) con colagenasa tipo I, (0.5 a 1 mg disuelta en 1 ml de solución de Ringer, que tiene una composición mM de: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES a un pH de 7.0. Al finalizar el tratamiento se volvieron a incubar por 3 días (tiempo suficiente para recuperar la estabilidad de las membranas y para la

donde  $I_{[glicina]}$  es la amplitud de corriente de glicina,  $I_{max}$  es la corriente máxima generada por glicina.  $EC_{50}$  es la concentración excitatoria media de glicina y  $nH$  es el coeficiente de Hill. Las relaciones dosis-respuesta para la estriquina también se ajustaron de acuerdo a la ecuación de Hill.

$I_{EsT} = I_p * IC_{50}^{nH} / ([EsT]^{nH} + IC_{50}^{nH})$ , donde  $I_{EsT}$  es la corriente de glicina en presencia de [ ] estriquina,  $I_p$  es el pico de corriente control,  $IC_{50}$  es la concentración de estriquina a la cual se tiene la mitad de la respuesta máxima, y  $nH$  es el coeficiente de Hill (Zubay., 1998).

#### **V.4 EFECTO DEL ANTAGONISTA DE LOS RECEPTORES A GLICINA EN LA FORMACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO DE EMBRIONES COMPLETOS:**

El método se basa en la alta susceptibilidad de las células del sistema nervioso en formación a las drogas.

Las ratas gestantes identificadas por la presencia de tapón vaginal, fueron divididas en dos grupos: El primero para conocer los parámetros morfológicos y bioquímicos de los embriones durante el desarrollo y el segundo para llevar a cabo algunos experimentos que exploran los efectos de sustancias químicas en la formación del sistema nervioso.

- 1) A los embriones en diferentes períodos de la gestación se les midió: 1) la longitud cráneo-caudal, 2) la longitud craneal, 3) el número de somitas y 4) Las proteínas totales que se cuantificaron por el método de Lowry y los datos fueron confirmados con el método de Bradford.
- 2) El grupo experimental de ratas, se dividió en cuatro subgrupos:

2.A. Grupo control: Se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*.

2.B. Grupo blanco: Se les aplicó por vía oral la misma cantidad de vehículo utilizado para disolver la muestra.

2C. Grupo problema (validación del método). Se les aplicó una dosis de 18 mg/kg de peso (recomendada por Giroud y Martinet, 1956), por vía oral de palmitato de retinol a ratas adultas, a los 8 días de gestación. Posteriormente, fueron observadas durante toda la gestación, para comparar los resultados con los reportados en la literatura.

2D. Grupo problema. Se aplicó a las ratas, una dosis de 8 mg/Kg del antagonista a glicina, el día 8 de la gestación por vía oral y se presentan los datos observados el día once.

## V.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

### V.5.1 MÉTODO DE LOWRY:

El método se basa en la cuantificación del color obtenido, con la reacción de reactivo de fenol-folín para residuos tirosina de una proteína desconocida, comparada con el desarrollo de color del estándar de albúmina bovina, a partir de las cuales se hace la curva estándar.

La curva estándar se obtiene determinando el color producido por 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{l}$  de una solución 1.0 mg/ml de albúmina de suero de bovino, en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  ajustados con agua. En otros tubos por duplicado se colocó 100  $\mu\text{l}$  de agua que sirvieron de blanco.

Las muestras problema se disecaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos biológicos y fueron homogenizadas en 10 volúmenes de una

solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM a pH 7.4. Se siguió el mismo procedimiento que en la curva estándar.

A las diluciones preparadas, se les adicionó 500  $\mu$ l de una solución que contiene 0.5 ml de tartrato de sodio y potasio al 2%, 0.5 ml de sulfato de cobre al 1%. También se les adiciona 50  $\mu$ l de NaOH 0.1N a cada tubo. Las muestras fueron agitadas en vortex y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente.

Una vez incubadas, se centrifugaron durante 15 min, a 3000 g. El sobrenadante se decantó y el precipitado se disolvió en 100  $\mu$ l de agua.

A cada reacción se le adicionó 50  $\mu$ l de reactivo de Folín 1:1 en agua bidestilada, se agitaron en vortex y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, en un volumen de 400  $\mu$ l. Se obtuvieron gráficas de la concentración de albúmina vs absorbancia (Lowry, 1951).

#### **V.5.2 MÉTODO DE BRADFORD:**

El método se basa en la unión de proteínas al colorante azul de Coomassie, que se fija a residuos de aminoácidos aromáticos y básicos, especialmente arginina con un consecuente cambio de color en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. El color desarrollado por la muestra problema es comparado con una curva estándar de albúmina de suero de bovino.

Se prepararon muestras 10, 20, 30 y 40  $\mu$ g de albúmina de suero de bovino, diluidas en 1 ml de agua. De cada dilución se transfirieron 800  $\mu$ l a otro tubo,

al que se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford concentrado y se agitó en vortex.

Las reacciones fueron incubadas a temperatura ambiente por 5 min y se midió la absorbancia a una  $\lambda$  de 595 nm.

La muestra problema fue disecada de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos biológicos, se homogenizó en etanol al 80% y fue sometida al mismo procedimiento que la curva estándar.

#### **V.6 MÉTODOS ESTADÍSTICOS:**

La prueba estadística que se utilizó fue la prueba de hipótesis para la comparación de medias poblacionales. El principio de la prueba es establecer una hipótesis alternativa acerca de las diferencias de las medias poblacionales y trabajar con una hipótesis opuesta nula ( $H_0$ ), de que ambas medias son iguales para demostrar que no hay suficiente evidencia para sostener esta igualdad y por lo tanto rechazarla a favor de la alternativa con un riesgo  $\alpha$  (la probabilidad de rechazar  $H_0$ , dado que es verdad). Esta es una mecánica universalmente aceptada de demostración por contradicción.

Las partes funcionales de esta prueba estadística son: 1) El conjunto de hipótesis nula  $H_0$  ( $\mu_1 = \mu_2$ ) y alternativa  $H_a$  ( $\mu_1 \neq \mu_2$ ), 2) el estadístico de la prueba y 3) la región de rechazo asociada. Puede haber error en rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera (error tipo I y se mide por  $\alpha$ ) o bien cuando se acepta la hipótesis nula siendo falsa (error tipo II, medido por  $\beta$ ).

Como los experimentos, son muestras pequeñas se aplicó como estadístico de prueba la t de Student que tiene la siguiente fórmula:



$$t = \frac{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2) - 0}{s_p(1/n_1 + 1/n_2)^{1/2}}$$

Donde:  $(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)$  = la diferencia real entre las medias experimentales

0 = el valor la hipótesis nula, que significa que  $\mu_1 = \mu_2$

$S_p$  = desviación estándar mancomunada =  $[(n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2) / (n_1 + n_2 - 2)]^{1/2}$

$n_1$  y  $n_2$  = número de observaciones en las muestras 1 y 2

La región de rechazo se define con el valor crítico de  $t_{\alpha/2}$  para  $\alpha=0.05$  y  $v = n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad para la prueba.

La hipótesis nula se rechaza cuando el valor obtenido para  $t$  con la fórmula es mayor que el dado por la tabla, al nivel de error  $\alpha=0.05$  elegido (Mendenhall y cols., 1994).

## **VI. RESULTADOS:**

### **VI.1 PRESENCIA DE GENES ACTIVOS QUE CODIFICAN PARA LAS SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES A GLICINA DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO EN LA RATA.**

Con el propósito de conocer la presencia de transcritos que codifican para los rGli en distintas edades embrionarias, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada subunidad del receptor y la presencia del RNAm se investigó por RT-PCR.

La presencia de transcritos que codifican para las subunidad  $\beta$  del rGli se encontró en el *conceptus* E8, es decir desde antes de la formación del sistema nervioso (tabla I). En las vesículas cerebrales E13 se amplificaron los transcritos que codifican para las subunidad  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  y  $\beta$ . En el CM E18 fueron amplificados los transcritos para las subunidad  $\alpha_1$  y  $\beta$ . En el CM PNO no se encontraron los transcritos que codifican para la subunidad  $\alpha_1$ , probablemente porque se inactivan los genes. En conjunto éstos hallazgos sugieren que los transcritos para la subunidad  $\beta$  del rGli se encuentran en todos los tejidos estudiados (+ y ++) y aquellos para las subunidades  $\alpha$  son activados en E13 ( $\alpha_1$  ++ y  $\alpha_3$  +) y en E18 ( $\alpha_1$  +). Es interesante que el transcrito que codifica para la subunidad  $\alpha_2$  que había sido propuesto como característico de las estructuras embrionarias, no se detectó en los tejidos estudiados.

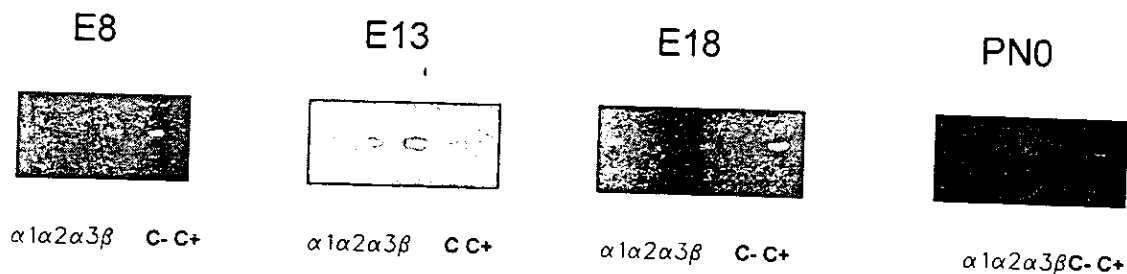
**TABLA I Amplificación por RT-PCR del RNAm para las subunidades del receptor a glicina durante la ontogenia.** Se amplificaron las subunidades  $\alpha$  1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 y  $\beta$ , utilizando gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa como control positivo. A) La subunidad  $\beta$  estuvo presente en todas las muestras estudiadas, la subunidad  $\alpha$ 1 se encontró en E13 y E18 y la subunidad  $\alpha$ 3 en E13, cabe destacar que en las muestras estudiadas no se observó  $\alpha$ 2 en ninguna de ellas (n = 3), para cada etapa embrionaria.

**A**

subunidad	E8 (CONCEPTUS)	E13 (VESÍCULAS CEREBRALES)	E18 (CEREBRO MEDIO)	PN0 (CEREBRO MEDIO)
$\alpha$ 1	ND	++	+	ND
$\alpha$ 2	ND	ND	ND	ND
$\alpha$ 3	ND	+	ND	ND
$\beta$	+	++	++	++
G3PDH	+	+++	+++	+++

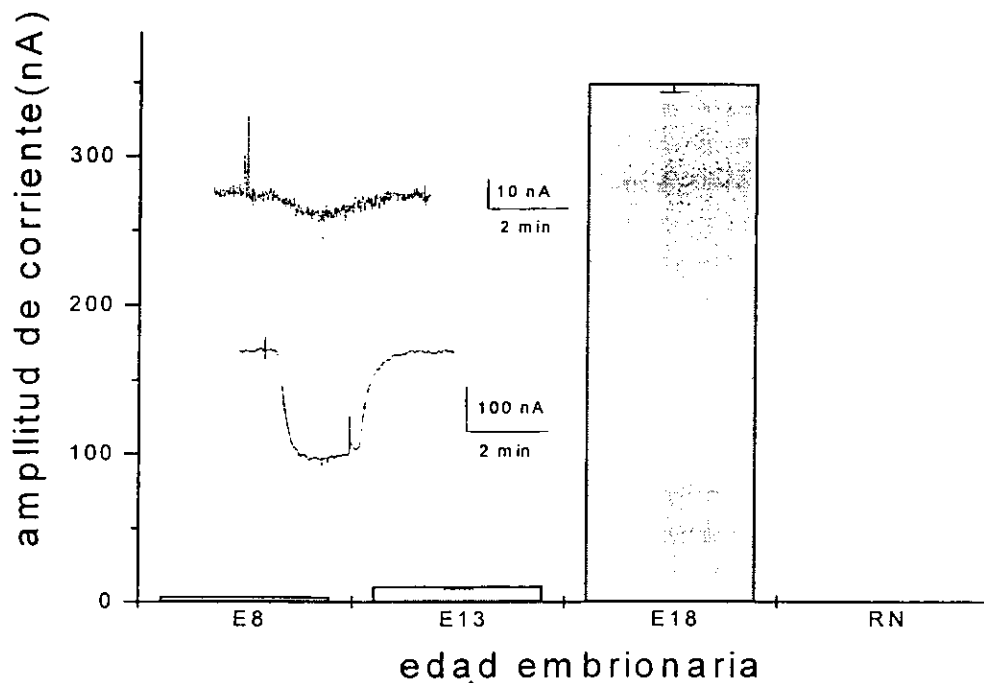
ND = No detectado.

G3PD = Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (control positivo).



Con el propósito de conocer si los transcritos que codifican para las subunidades del rGli encontrados en las distintas etapas del desarrollo, eran capaces de traducirse y formar proteínas que se incorporaran a la membrana plasmática como receptores funcionales en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*, se inyectaron los RNAm de los distintos estadios embrionarios y se midieron los niveles de expresión con la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos a un potencial de membrana fijado a  $-60$  mV.

En los ovocitos inyectados con RNAm extraído del *conceptus* E8 y superfundidos con 1mM de Gli, se evocó una corriente de  $4.2 \pm 1.76$  nA (n=5). En los inyectados con RNAm de vesículas cerebrales E13 la corriente inducida fue de  $9 \pm 3.6$  nA (n=3). Cuando se inyectó RNAm de CM E18, se encontró una corriente de  $346 \pm 28$  nA (n=43). Finalmente en ovocitos inyectados con RNAm de CMPN0 (n=3) no hubo respuestas detectables (Fig. 6).



**Fig. 6 Expresión de RNAm obtenido de rata provenientes de diferentes edades.** La altura de las barras corresponde a la amplitud de la corriente de membrana inducida por glicina (1 mM), en ovocitos inyectados con RNAm de: *conceptus* E8, vesículas cerebrales E13, cerebro medio E18 y cerebro medio PN0, n = 5, 3, 5 y 3. En esta figura y otras semejantes, el potencial de membrana fue fijado a -60 mV.

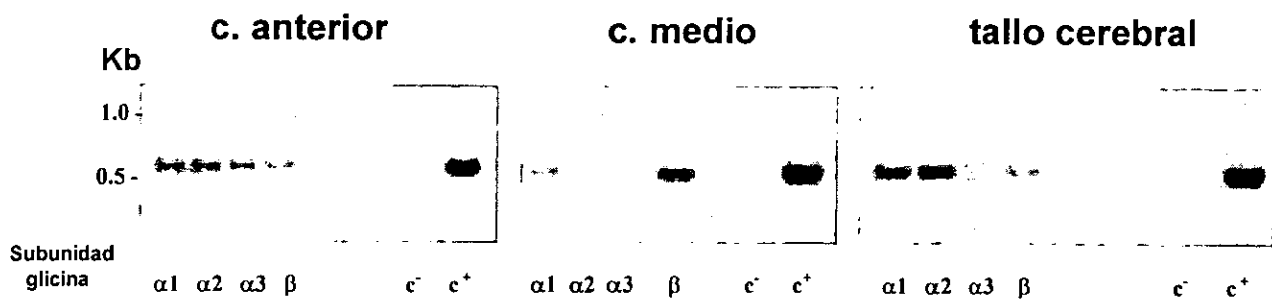
La presencia de transcritos que codifican para las subunidades del rGli en tres regiones de E18 se exploró usando los RNAm como plantados en la técnica de RT-PCR. Los RNAm's para las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta$  se amplificaron en los ovocitos inyectados con las tres muestras, mientras que  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  se encontraron sólo en RNAm de CA y TC (Tabla II). La subunidad  $\beta$  se expresa en todos los tejidos estudiados y la subunidad  $\alpha$  está diferencialmente expresada.

**TABLA II. Subunidades del receptor a glicina obtenidas por RT-PCR, en tres regiones E18.** A) Resultados de la amplificación de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\beta$  en RNAm de CA, CM y TC, E18. La subunidad  $\beta$  estuvo presente en todas las regiones y la subunidad  $\alpha$  se expresó diferencialmente. Se utilizó gliceraldehido tres fosfato como control positivo y agua como control negativo. B) Gel de agarosa de los transcritos amplificados por RT-PCR.

**A**

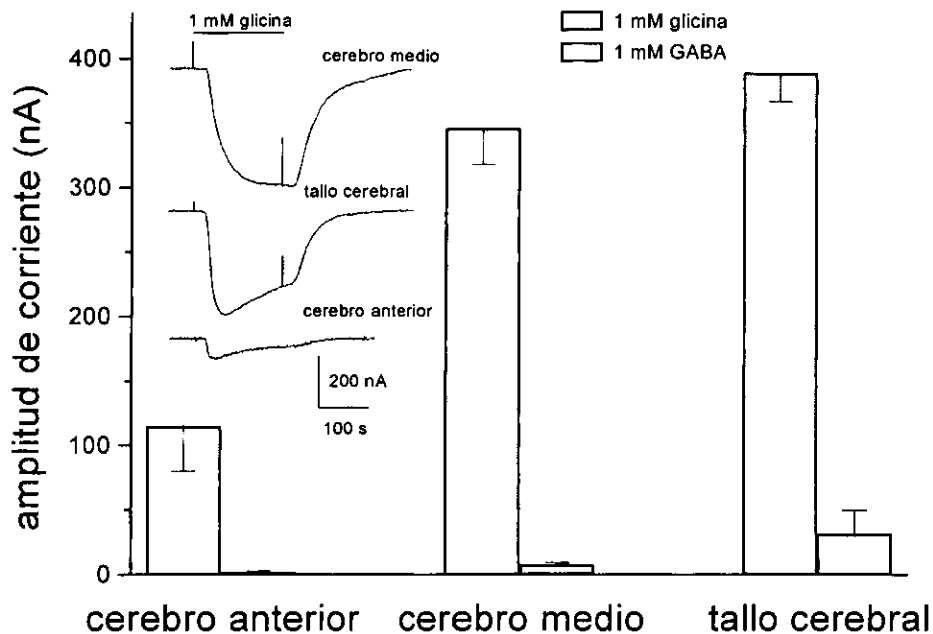
subunidad	c. anterior	c. medio	tallo cerebral
$\alpha 1$	++	+	++
$\alpha 2$	++	ND	+++
$\alpha 3$	+	ND	+
$\beta$	+	+++	+
G3PDH	+++	+++	+++

**B**



Con el propósito de explorar la concentración relativa de transcritos para los rGli presentes en tres regiones del sistema nervioso, se estudió la amplitud de corriente (nivel de expresión) en ovocitos de *Xenopus leavis*, inyectados con RNAm de CA, CM y TC E18 y superfundidos con Gli 1 mM. En paralelo se exploraron los niveles de expresión de los receptores a GABA.

Los niveles de expresión para el rGli son similares en los ovocitos inyectados con RNAm de CM y TC y mayores que los de CA. Las corrientes evocadas por GABA 1 mM fueron menores que las evocadas por Gli 1 mM en todos los casos, lo que sugiere que el número de receptores a GABA incorporados a la membrana y detectados con esta técnica fue menor que los rGli (Fig. 7).



**Fig. 7** Expresión de receptores para GABA y glicina en ovocitos inyectados con RNAs aislados de distintas regiones del sistema nervioso central de rata E18. Las columnas representan la amplitud de la corriente inducida por GABA y por Gli (ambos 1 mM) en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro anterior, cerebro medio y tallo cerebral de rata E18. En el eje de las abscisas se indica neurotransmisor aplicado y el origen de los RNAm y en las ordenadas la corriente entrante inducida por el receptor en nA. Inserto: Corrientes de Gli representativas. La deflexión corresponde a una corriente iónica entrante. Los ovocitos provienen de 5 donadores y el número de ovocitos (n) es respectivamente 26, 43 y 18 para las corrientes de Gli y 26, 10 y 36 para las de GABA.

Con el propósito de conocer las propiedades electrofisiológicas de los rGli presentes en ovocitos de *Xenopus leavis* inyectados con RNAm de CA, CM y TCE18, se exploró:

**VI.2.1** La afinidad con la que el agonista se une al receptor. Esta propiedad se estudió al construir curvas dosis respuesta (concentración de

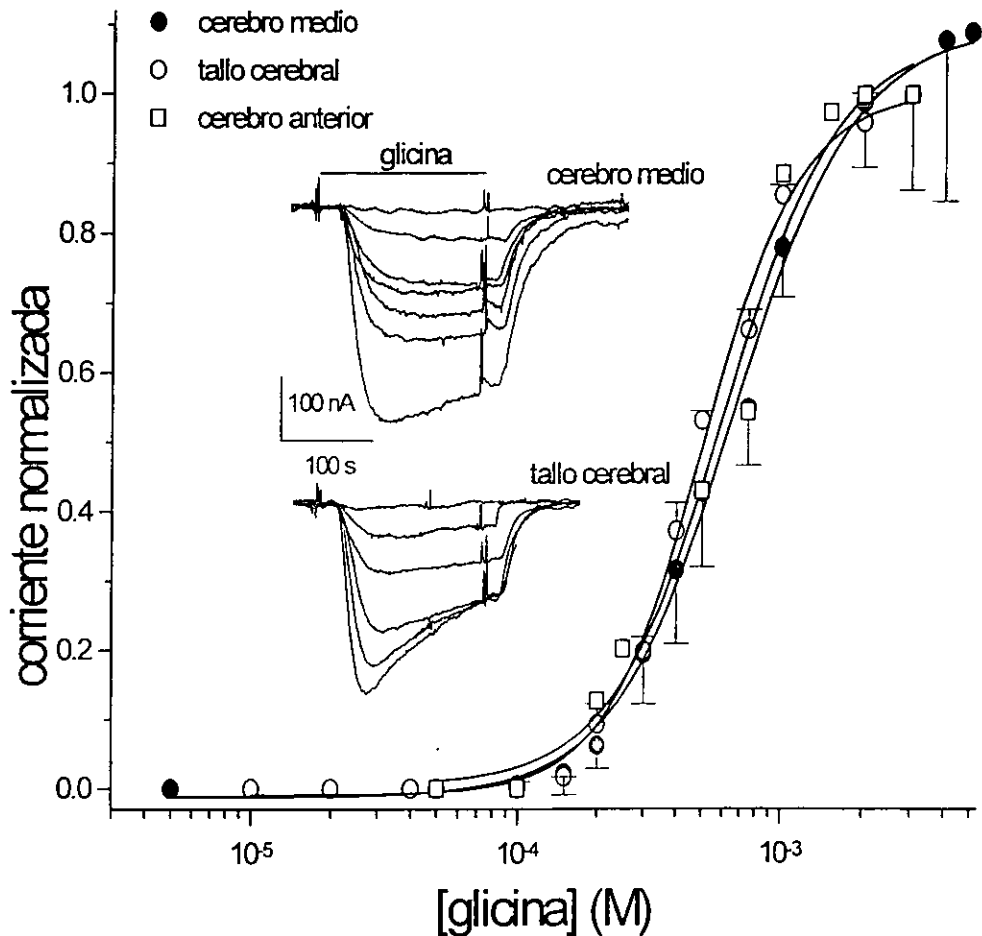


Con el propósito de conocer las propiedades electrofisiológicas de los rGli presentes en ovocitos de *Xenopus leavis* inyectados con RNAm de CA, CM y TCE18, se exploró:

**VI.2.1 La afinidad con la que el agonista se une al receptor.** Esta propiedad se estudió al construir curvas dosis respuesta (concentración de Gli vs corriente inducida), en ovocitos inyectados con RNAm de: CA, CM y TC E18. El gráfico obtenido con estas curvas se ajustó a la ecuación de Hill (Zubay, 1998) de donde se obtuvo: 1) El número de Hill que propone el número de sitios que un agonista debe ocupar en el receptor, para abrir el canal y 2) La concentración del agonista a la que se alcanza la mitad de la corriente máxima ( $EC_{50}$ ) que sugiere la afinidad del agonista por el receptor.

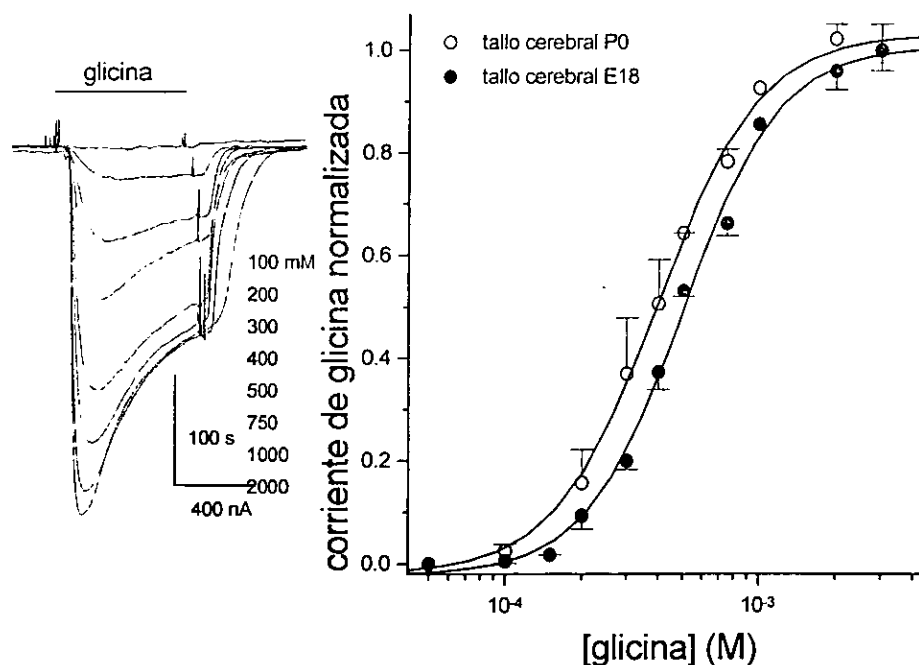
La concentración mínima a la cual se detectó corriente de glicina fue de 100  $\mu$ M de Gli (Fig. 8), incrementándose la corriente al aumentar la concentración de Gli. En estos experimentos las  $EC_{50}$  fueron:  $611 \pm 77 \mu$ M ( $n = 2$ ),  $661 \pm 28 \mu$ M ( $n = 5$ ) y  $506 \pm 18 \mu$ M ( $n = 5$ ) para ovocitos inyectados con RNAm de CA, CM y TCE18 respectivamente. La diferencia es significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la  $EC_{50}$  de ovocitos inyectados con RNAm de CM y TC. El número de Hill fue  $2.0 \pm 0.5$ ,  $1.9 \pm 0.1$  y  $2.4 \pm 0.2$  para ovocitos inyectados con RNAm de CA, CM y TC respectivamente.

Estos resultados sugieren que la afinidad por la Gli, es ligeramente mayor para los receptores de ovocitos inyectados con RNAm de TCE18, que para aquellos inyectados con RNAm de: CM y CA mientras que el número de sitios de unión es similar.



**Fig. 8 Relación dosis respuesta a la glicina en tres regiones del sistema nervioso de rata E18.** La amplitud promedio de la corriente en función de la concentración de Gli en ovocitos inyectados con RNAm provenientes de CA, CM y TC E18 ( $n = 5, 3$  donadores). Las respuestas se normalizaron a la corriente de 3 mM. Las líneas continuas son ajustes a la ecuación de Hill. Inserto: Corrientes típicas inducidas por 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75 y 1 mM de Gli en un ovocito inyectado con RNAm de TC.

Con el propósito de conocer si había cambios en la afinidad de la glicina por el receptor en una misma región pero de diferente edad, se llevaron a cabo curvas dosis respuesta, en TC (E18 y PN0) (Fig. 9). Los resultados indican una  $EC_{50}$  de  $506 \pm 18 \mu\text{M}$ , con un coeficiente de Hill de  $2.09 \pm 0.45$ , para los ovocitos inyectados con RNAm de TC E18 ( $n = 5$ ) y de  $405.4 \pm 56.42 \text{ mM}$  con un coeficiente de Hill de  $1.39 \pm 0.38$  ( $n = 3$ ) para TC PN0. Estos datos sugieren una mayor afinidad de los receptores formados con RNAm de TC PN0, que en aquellos formados con TC E18 y diferencia en los sitios de unión al receptor, de acuerdo a los resultados del coeficiente de Hill.

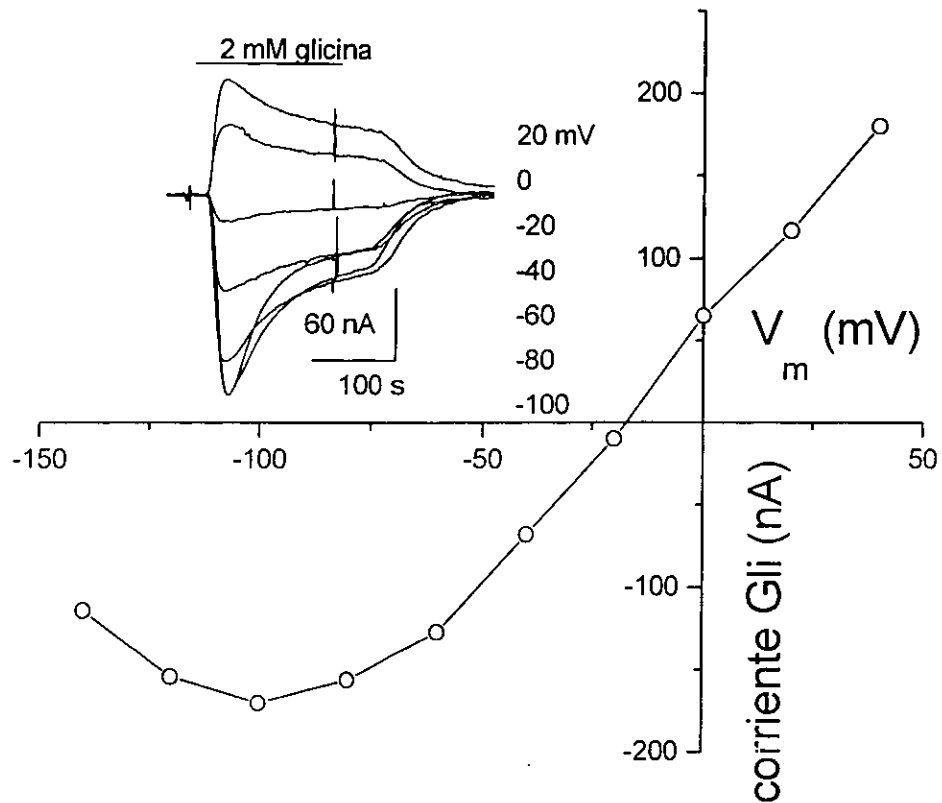


**Fig. 9** Relación dosis/respuesta a la Gli en ovocitos inyectados con RNAm de tallo cerebral E18 y PN0. La amplitud de la corriente de Gli en ovocitos inyectados con RNAm proveniente de TC E18 y PN0. Las líneas continuas se ajustaron a la ecuación de Hill. Cada punto es la m-ee de una  $n = 5$  para E18 y  $n = 3$  para PN0. Inserto: Corrientes típicas inducidas por 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1 y 2 mM de glicina.

**VI.2.2 Iones que permean por el canal.** Con el propósito de conocer si los iones que permean por los rGli formados a partir de RNAm de tejido embrionario, son los mismos que en los receptores expresados por RNAm de tejido postnatal (cloro), se construyeron curvas corriente voltaje (I-V), que consisten en medir la amplitud de la corriente inducida por el receptor con 2 mM de Gli, cuando la membrana de los ovocitos se fija a diferentes potenciales.

Los ovocitos fijados a  $-60$  mV indujeron corrientes entrantes. La corriente entrante fue disminuyendo al cambiar el potencial hasta el punto en que invirtió de dirección. Los receptores formados a partir del RNAm de CA, CM y TC presentaron un potencial de inversión cercano  $-30$  mV (Fig. 10), que corresponde al potencial de equilibrio para cloro en ovocitos de *Xenopus laevis* (Kusano y cols., 1982).

Como para otros rGli expresados en ovocitos, la amplitud de la corriente disminuye cuando el potencial de membrana es despolarizante. Las relaciones corriente-voltaje fueron casi lineales entre  $-40$  y  $40$  mV, pero presentan una clara rectificación a potenciales hiperpolarizantes



**Fig. 10 Relación corriente/voltaje de receptores a glicina.** La relación corriente/voltaje (representativa) de un ovocito inyectado con RNAm de TC. La fijación de voltaje, se llevó a cabo desde  $-140$  a  $40$  mV, con  $2$  mM Glic y substrayendo la corriente de membrana pasiva en ausencia del agonista. Inserto: Corrientes de Gli representativas ( $2$  mM), en un ovocito inyectado con RNAm proveniente de TC, expuesto a Glic cada  $10$  min manteniendo el potencial de membrana a los valores indicados.

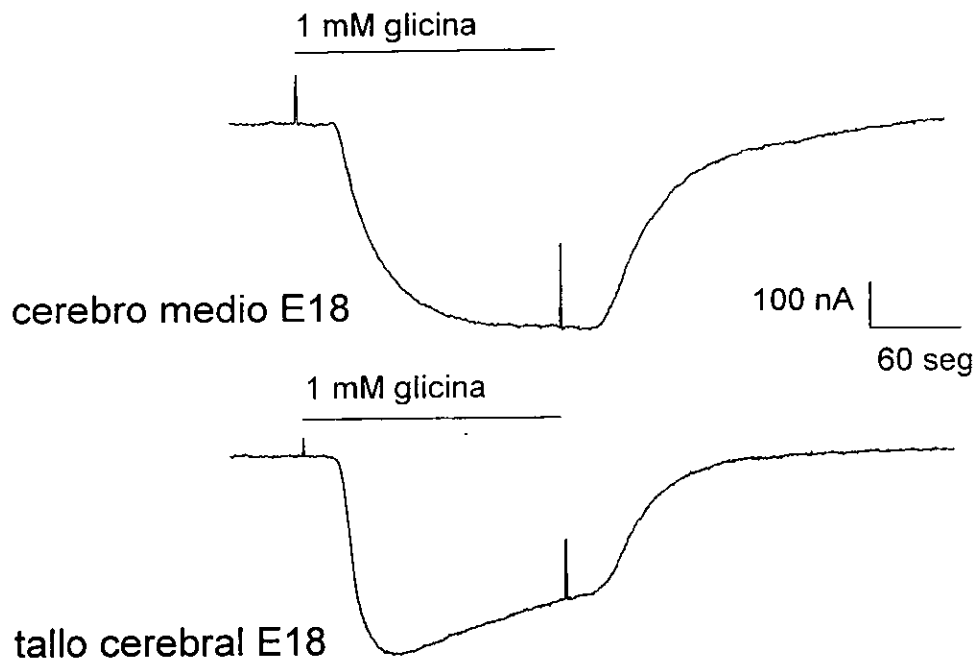
**VI.2.3 Desensibilización de los receptores formados.** La desensibilización es una propiedad intrínseca de muchos receptores a neurotransmisores, caracterizada por una disminución de la respuesta, cuando el receptor es sometido a una aplicación mantenida de neurotransmisor. Cuando un receptor se encuentra desensibilizado, el agonista se conserva unido al receptor, los iones no permean, es decir los receptores se encuentran en un estado refractario (Katz y Thesleff, 1957; Kandel y cols. 1991). Se ha sugerido que la desensibilización puede deberse a un cambio conformacional del receptor, o bien a la fosforilación del receptor por una cinasa. Como es el caso con otros receptores, la desensibilización ha sido observada en los receptores a glicina, como un fenómeno dosis dependiente, siendo más evidente a altas concentraciones, (Kuhse y cols. 1990). Esta propiedad es mayor cuando el agonista aplicado es Gli, que cuando se aplican otros agonistas como  $\beta$  alanina (Parker y cols., 1988).

Con el propósito de comparar la desensibilización de los rGli formados en ovocitos al inyectar RNAm de tres regiones E18, se seleccionaron aquellos que indujeran corrientes similares al ser superfundidos con Gli (1 mM); para CM  $319 \pm 37$  nA ( $m \pm ee$ ,  $n = 23$ ) y para TC  $444 \pm 18$  nA ( $m \pm ee$ ,  $n = 12$ ). Luego se compararon el tiempo al que se alcanza la corriente máxima y la magnitud de la corriente a los 2 minutos de aplicación de Gli.

La desensibilización de los rGli no fue observada a concentraciones menores de 300  $\mu$ M de Gli. Sin embargo, a concentraciones mayores a 500 $\mu$ M la corriente disminuyó, mientras la aplicación de Gli se mantenía (Fig. 11).

El pico de la corriente fue alcanzado a los  $107 \pm 9$  s para CM y  $35 \pm 2$  s para TC. En este pico se presenta la mayor conductancia, dos minutos después

de la aplicación del agonista, la corriente se redujo a un  $92 \pm 1\%$  y  $62 \pm 3\%$  respectivamente. La desensibilización fue menor ( $p \leq 0.05$ ), para las corrientes de Gli inducidas por ovocitos inyectados con RNAm de CM, que para aquellos inyectados con RNAm de TC.



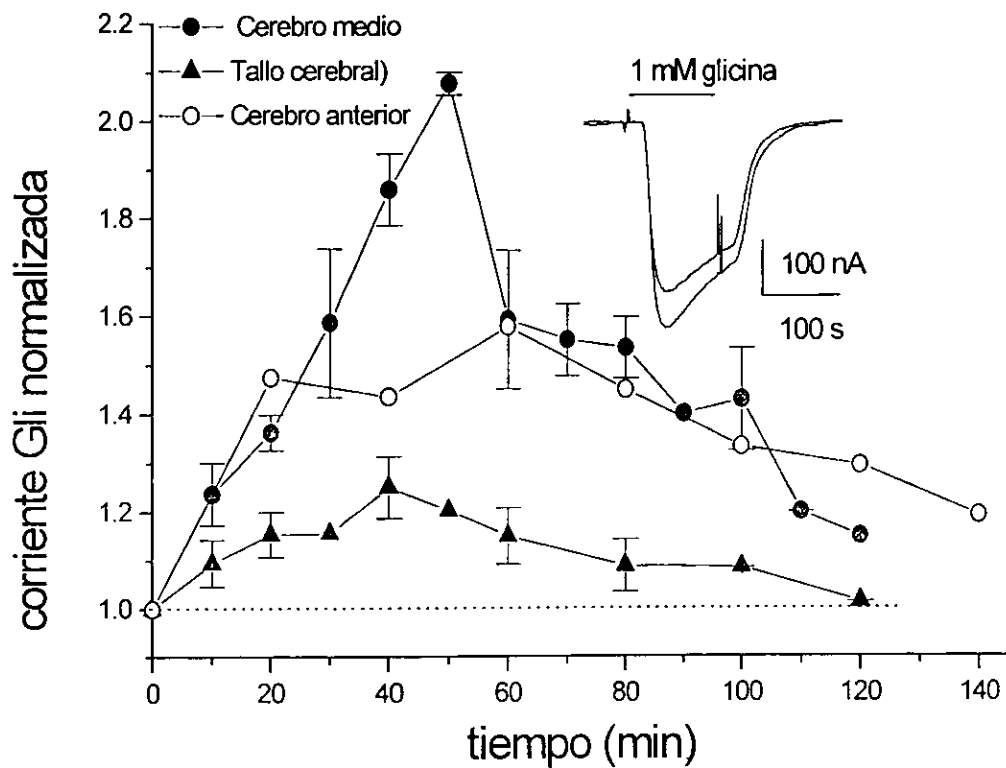
**Fig. 11 Desensibilización de receptores a glicina expresados por RNAm embrionarios.** Comparación representativa de la desensibilización del rGli, observada por la corriente inducida en ovocitos inyectados con CM y TC E18 en presencia del agonista. El tiempo al que se alcanza la mayor respuesta es más rápido en los ovocitos inyectados con TC y la corriente en presencia del agonista, disminuye más lentamente en ovocitos inyectados con CM.

#### **VI.2.4 Potenciación de las respuestas y efecto del calcio extracelular.**

Durante estos experimentos se observó además que en algunos casos, al aplicar repetidamente la Gli, la amplitud de la corriente generada aumentaba progresivamente. Con el propósito de explorar si tales observaciones correspondían con una potenciación de la corriente de Gli, se evaluó dicho efecto, midiendo la corriente inducida en los ovocitos, a una misma concentración de Gli aplicada a intervalos de 10 min y se expresó como la  $n^{\text{th}}$  amplitud de corriente en relación a la inducida por la primera dosis de Gli (Fig. 12).

La mayor potenciación se observó en ovocitos inyectados con RNAm de CM E18, en los cuales la corriente de Gli se incrementó  $2.10 \pm 0.02$  veces respecto a la corriente generada por la primera aplicación de Gli. En aquellos inyectados con RNAm de CA se incrementó 1.6 veces y en los inyectados con RNAm de TC, el aumento fue de  $1.3 \pm 0.1$  veces. En todos los casos la potenciación fue máxima después de 5 ó 6 exposiciones a Gli y subsecuentemente la corriente tendió a regresar a la amplitud control.





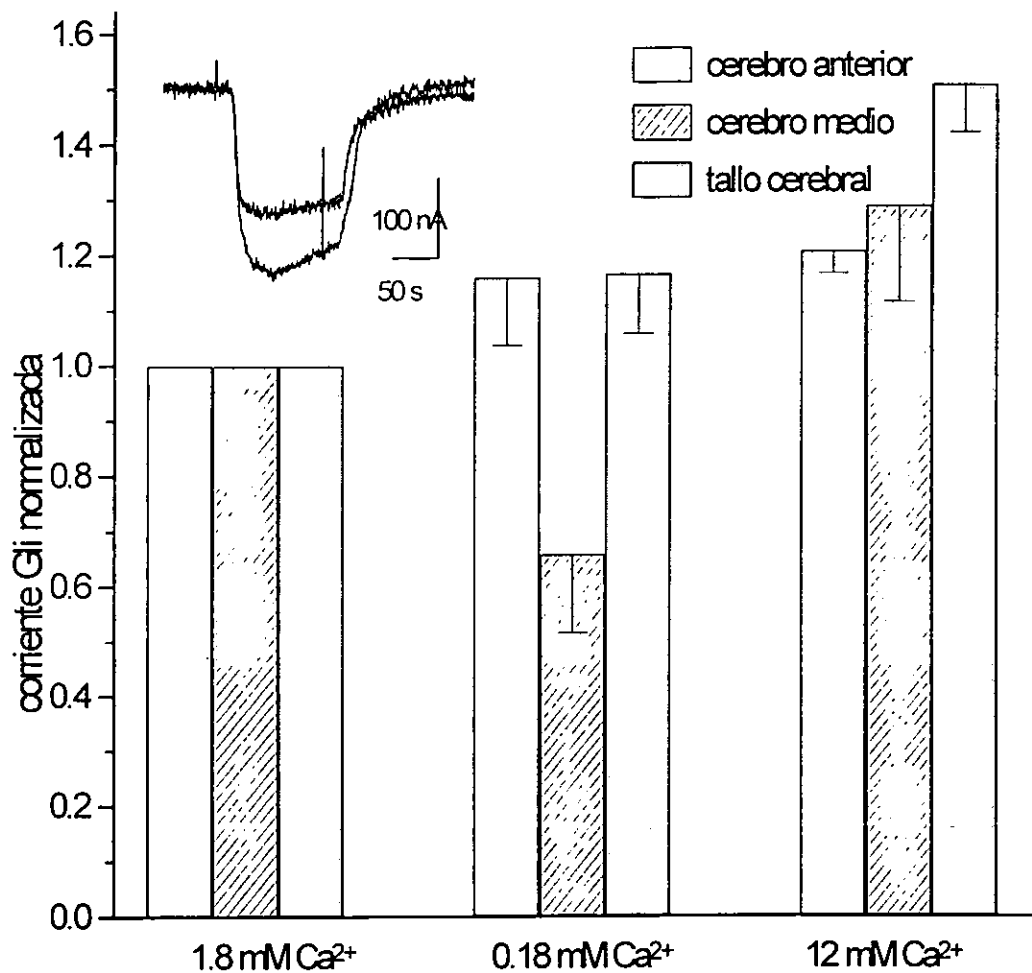
**Fig. 12 Potenciación de las corrientes de Gli.** La amplitud de la corriente de Gli como una función del tiempo en ovocitos inyectados con RNAm proveniente de muestras de CA (n = 1), CM (n = 4) o TC (n = 8). La Gli (1 mM), fue aplicada durante 2 min a intervalos de 10 min. El tiempo cero indica la primera aplicación. Inserto: Muestra de las corrientes de Gli en un ovocito inyectado con RNAm de TC de la primera y cuarta aplicación.

El calcio es un ión que participa en muchas funciones celulares, entre otras la modulación de receptores. Con la intención de explorar si los receptores de la Gli estaban modulados por la concentración de iones calcio ( $Ca^{2+}$ ), se planearon experimentos en los que se modificó la concentración de  $Ca^{2+}$  extracelular.

En estos experimentos los ovocitos fueron equilibrados durante 5 min en la solución Ringer normal ( $1.8 \text{ mM Ca}^{2+}$ ), luego se superfundieron con Gli 1 mM en solución Ringer normal durante 2 min y se registró esta corriente. Una vez que regresaron a la línea basal, se lavaron durante 5 min. Posteriormente, se equilibraron un tiempo igual en soluciones con bajo  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0.18 \text{ mM Ca}^{2+}$ ) o alto  $\text{Ca}^{2+}$  ( $12 \text{ mM Ca}^{2+}$ ) y fueron expuestos a Gli 1 mM, preparada en Ringer con alto o bajo calcio, las corrientes se midieron para compararlas con las obtenidas con Gli 1 mM en solución Ringer normal.

En estos experimentos se observó que en los ovocitos inyectados con RNAm de CA y CM y expuestos a alto  $\text{Ca}^{2+}$ , las corrientes de Gli se incrementaron  $1.2 \pm 0.04$  y  $1.3 \pm 0.2$  veces, respecto a la primera respuesta inducida por Gli 1 mM y para aquellos inyectados con RNAm de TC aumentó  $1.5 \pm 0.1$  veces (Fig. 13). Por otro lado, en los ovocitos expuestos a bajo  $\text{Ca}^{2+}$ , la corriente de Gli se incrementó  $1.2 \pm 0.1$  veces para aquellos inyectados con RNAm de CA y TC, sin embargo en los inyectados con CM la corriente disminuyó a  $0.7 \pm 0.1$ .

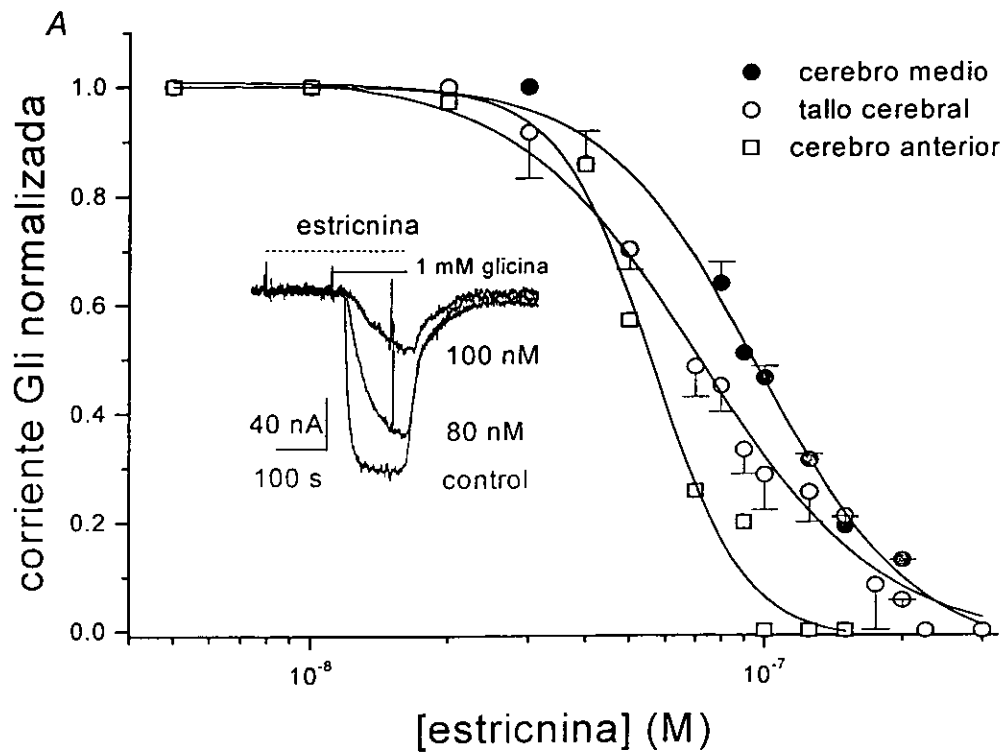
Las corrientes inducidas por Gli en ovocitos inyectados con RNAm de CM y TC, expuestos a bajo calcio ( $0.18 \text{ mM Ca}^{2+}$ ) o alto  $\text{Ca}^{2+}$  ( $12 \text{ mM Ca}^{2+}$ ) y comparadas con las corrientes inducidas por Gli, expuestos a  $1.8 \text{ mM Ca}^{2+}$  (ringer normal) son diferentes ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig. 13 Corriente de glicina modulada por calcio.** Las columnas representan la amplitud de la corriente inducida por 1 mM de Gli, en ovocitos inyectados con RNAm de CA, CM y TC equilibrado en diferentes concentraciones de calcio extracelular ( $n=3$  para cada región). La IGli se normalizó a la corriente obtenida con Gli 1 mM en Ringer normal. Inserto: Corrientes representativas inducidas por 1 mM de Gli en Ringer normal y en presencia de alto calcio (12 mM), en un ovocito inyectado con RNAm proveniente de CM.

**VI.2.5 Efecto de estriquina.** Con el propósito de conocer la afinidad de la estriquina a los rGli, formados en ovocitos inyectados con RNAm de CA, CM y TC, se construyeron curvas dosis respuesta como las descritas para explorar la afinidad por el agonista.

Los ovocitos fueron expuestos por 2 min a Gli, y después de lavar 5 minutos fueron superfundidos con Gli más estriquina. La corriente de Gli, empezó a disminuir cuando la estriquina fue 40 nM (Fig. 14). A medida que se aumentó la concentración del antagonista, la corriente de Gli disminuyó progresivamente hasta ser indetectables con aproximadamente 300 nM de estriquina. Ajustando los datos a la ecuación de Hill, la concentración media inhibitoria de estriquina ( $IC_{50}$ ), fue  $56 \pm 3$  nM para ovocitos inyectados con RNAm de CA,  $97 \pm 4$  nM para aquellos inyectados con RNAm de CM y  $72 \pm 4$  nM para los inyectados con RNAm de TC. La diferencia entre las  $IC_{50}$ 's obtenidas para los ovocitos inyectados con RNAm de CA y CM fueron significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig. 14 Inhibición de la corriente de glicina por estricnina.** (A) Corrientes normalizadas a la corriente en ausencia de estricnina. Las líneas continuas representan el ajuste a la ecuación de Hill ( $n = 3$ ), en ovocitos inyectados con RNAm de CM y TC, y  $n = 1$  en ovocitos inyectados con RNAm de CA. Los ovocitos provienen de 3 donadores. Inserto: Corrientes típicas inducidas por 1 mM de Gli e inhibidas por estricnina en ovocitos inyectados con CM.

### **VI.3 EFECTO DE LA ESTRICNINA EN EMBRIONES COMPLETOS DURANTE LA NEURULACIÓN:**

#### **VI.3.1 IDENTIFICACIÓN DE EMBRIONES EN DISTINTOS ESTADÍOS DEL DESARROLLO:**

Con el propósito de precisar en horas la edad embrionaria, se cruzaron grupos de ratas durante dos horas, las 24 horas del día. El experimento fue repetido 3 veces.

Se disecaron los embriones y en cada edad se midieron los parámetros morfológicos y se cuantificaron las proteínas totales para confirmar la edad embrionaria. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III, y son consistentes (en las edades que coinciden las dos tablas) con los reportados por Brown y Fabro, 1981. Estos resultados se utilizaron para confirmar la edad de los fetos, en los experimentos de desarrollo temprano (Fig. 15).

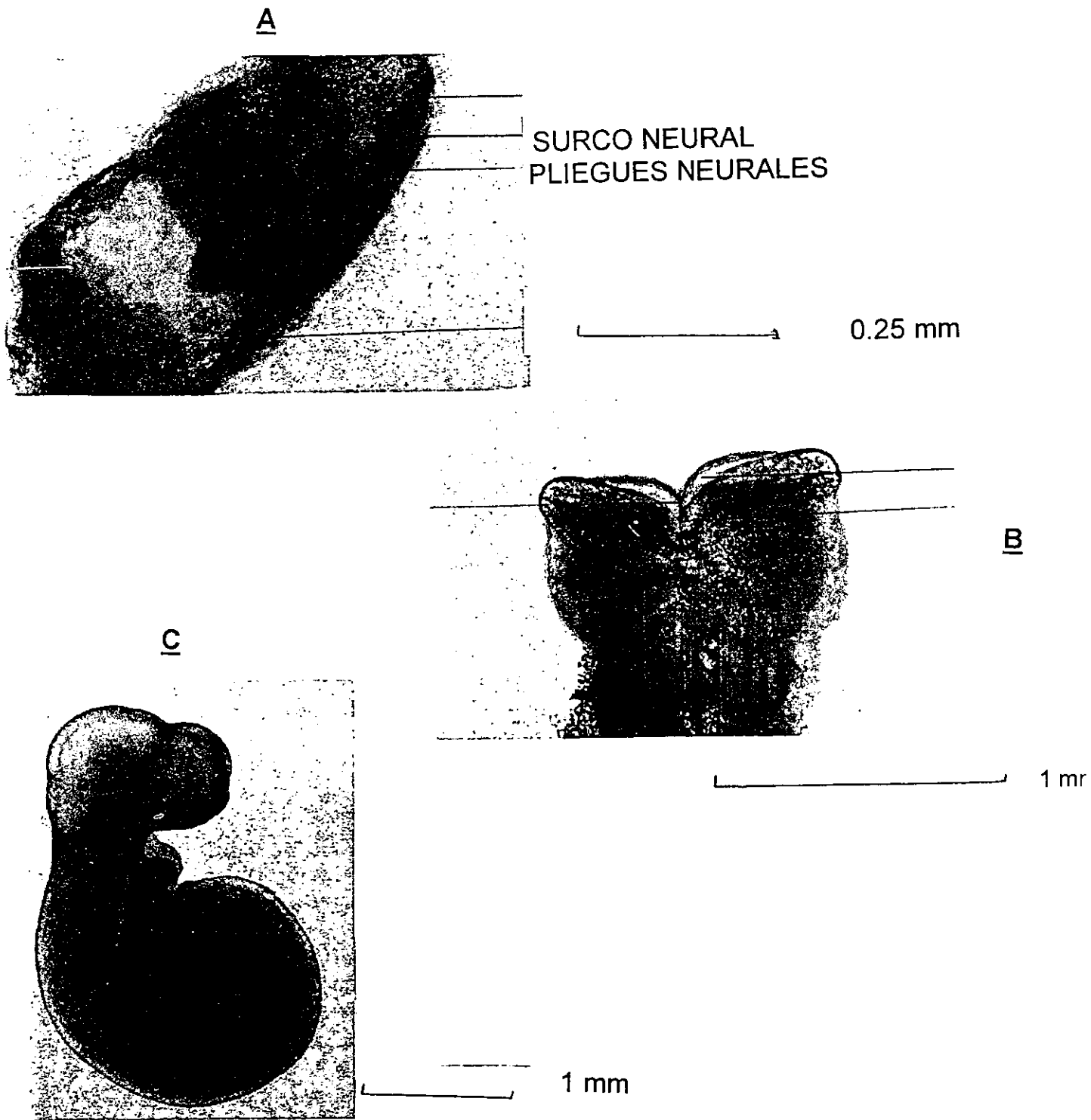
**TABLA III** Parámetros morfológicos y contenido de proteínas en embriones de rata durante el desarrollo. Los parámetros morfológicos indican un incremento lineal en relación a la edad. Nótese que los cambios en la cuantificación de proteínas es muy grande en periodos de tiempo cortos.

**TABLA III**  
**PARAMETROS MORFOLOGICOS Y BIOQUÍMICOS DE EMBRIONES**

EDAD	n	SOMITAS CEREBRALES)	LCC	LC	SV	PROTEINAS
9.5	5	0	-	-	1	5.5±1.09 µg/e
10.4	10	9.4±1.66	2	1	3	33.37±3.63 µg/e
10.8	5	16.4±1.36	3	1.5	4	83±10.9 µg/e
11.3	4	20.4±1.14	3	1.5	4	155±15.4 µg/e
15	10	29.8±1.5**	12±0.9	7.1±0.6		1.38±75.27mg/enc
RN	5		49±1.5	15.4±1.2		16.55±1.17 mg/enc

n = número de muestras  
 LCC = longitud craneo-caudal  
 LC = longitud craneal  
 SV = saco vitelino  
 µg/e = microgramos por embrión  
 mg/enc = miligramos por encéfalo  
 \*\* en la región caudal

\*Estos resultados coinciden con los reportados por Brown, 1981 durante la neurulación



**Fig. 15 Estructura de embriones normales.** A) Embrión de 9 días. B) Neuroporo anterior abierto a los 10 días. C) Embrión de 11 días de edad gestacional.



Con el objeto de iniciar experimentos para conocer el efecto de la estricnina en embriones completos, se determinó primero con precisión la edad embrionaria y luego se estableció el modelo animal en rata, de acuerdo a antecedentes estudiados durante la ontogenia por Giroud y Martinet, 1956 y en ratón por Seller y cols., 1979. El método propuesto fue validado con ácido retinoico.

El ácido retinoico se aplicó por vía oral a ratas gestantes el día E8, a la misma dosis usada por Giroud y Martinet, 1956. Los embriones fueron observados a partir del día E11 durante el resto de la gestación. Los resultados del efecto teratígeno del ácido retinoico en el presente trabajo, son consistentes con los reportados por este autor en productos al final de la gestación y se presentan los obtenidos durante la neurulación (E11) (Fig. 16).



Fig. 16 Efecto del ácido retinoico en embriones de rata. El ácido retinoico se aplicó a las ratas gestantes, a una dosis de 18 mg (recomendada por Giroud y Martinet, 1956) y se observan defectos del tubo neural  $n=5$ . Los defectos del tubo neural más frecuentes fueron: retardo en el cierre del neuroporo anterior y anencefalia.

Posteriormente, se exploró el efecto de la estriquina, para lo cual se diseñaron experimentos en los que se aplicaron dosis de 3, 5, y 8 mg/kg de peso a los 8 días de gestación y tres días más tarde se observaron los efectos en los embriones. Cabe mencionar que el número de embriones afectados tanto por la estriquina, como por el ácido retinoico, es dosis-dependiente y se presenta como aplasia principalmente del encéfalo y algunas disrafias del tubo neural, como flexión invertida Fig. 17.



**Fig. 17 Efecto de la estriknina en embriones de rata.** Embrión de rata de 11 días de edad gestacional, en el que a la madre se le aplicó estriknina a una dosis de 8 mg/kg, nótese los defectos del tubo neural causados durante este estadio n=5.

## **VII. DISCUSIÓN:**

La importante pregunta acerca de cuáles son los genes de neuroreceptores que podrían participar en el desarrollo ontogenético del sistema nervioso se debe explorar a partir de los genes que son transcritos, para poder establecer en forma definitiva que los transcritos expresen receptores funcionales. El trabajo presente se centró en el receptor de glicina que forma canales iónicos por los que permea cloro, el cual se encuentra en alta concentración en células inmaduras. Por lo tanto, fue necesario conocer primero la presencia de los transcritos del receptor a la Gli en diferentes edades y regiones, para en trabajos posteriores poder investigar la localización de los receptores y su posible participación en la formación del sistema nervioso.

### **VII.I AMPLIFICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR A GLICINA POR RT-PCR EN TEJIDO EMBRIONARIO DE RATA EN DISTINTAS EDADES.**

Los datos de este trabajo revelan dos resultados nuevos. Primero, la presencia de transcritos para la subunidad  $\beta$  desde antes de la formación del sistema nervioso. Segundo, la presencia de transcritos para las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ , y  $\beta$  se encuentran en vesículas cerebrales E13. En un estudio previo con hibridación *in situ* (Malosio, y cols. 1991) se sugiere la presencia de la subunidad  $\alpha 2$  en E14. Los resultados del presente trabajo indican que la ontogenia del rGli es obviamente más compleja que lo reportado hasta ahora. Además es interesante que los genes que codifican para las subunidad  $\alpha$  se activan durante la neurulación y que posiblemente los transcritos para dichas subunidades cambian en períodos de tiempo cortos. Todo ello sugiere nuevos estudios para precisar el inicio de la activación de cada uno de los genes que codifican para dichas subunidades, así como explorar la traducción de dichos transcritos, la ubicación de los receptores y la posible

participación de los receptores y/o sus neurotransmisores, en la proliferación y diferenciación de neuronas y glías.

La presencia de genes activos en períodos embrionarios posteriores (E18), se estudió en CM, y se amplificaron los transcritos que codifican para las subunidades del rGli  $\alpha 1$  y  $\beta$ . Posteriormente, en CM PN0, no se identificó la subunidad  $\alpha 1$ . Estos resultados sugieren que durante la ontogenia, los genes que codifican para las subunidades del rGli pueden estar activos en algunos estadios y ser inactivados en otros. Resulta interesante que en estudios con hibridación *in situ*, en las regiones derivadas del cerebro medio, que constituyen los colículos superior e inferior en el tejido adulto, los mismos genes para rGli  $\alpha 1$  y  $\beta$  se encontraron activos (Malosio y cols., 1991).

Los mismos RNAm que se usaron como templates en las reacciones de "RT-PCR", fueron inyectados a ovocitos de *Xenopus leavis* para determinar si ellos formaban receptores membranales funcionales. Los ovocitos inyectados con RNAm de los estadios E8 y E13 generaron corrientes muy pequeñas ( $4.2 \pm 1.76$  nA (n=5) y  $9 \pm 3.6$  nA (n=3)) al ser expuestos a Gli (Fig. 6). Estas corrientes podrían ser originadas por el transportador de Gli nativo del ovocito, el cual genera corrientes de  $\sim 2.5$  nA y raras veces hasta 10 nA (Miledi, 1985 sin publicar) y no por receptores codificados por el RNAm inyectado, otra posibilidad es que el RNAm de E8 y E13 exprese más transportador de glicina. Además, es posible que las subunidades  $\beta$  de E8 formen receptores a Gli homoméricos (Grenningloh y cols. 1990) o bien que haya presencia muy baja de subunidades  $\alpha$  que no alcanzaron a ser detectadas por RT-PCR y sí con electrofisiología. Para lograr conciliar los resultados obtenidos por RT-PCR y los hallazgos electrofisiológicos se pueden formular varias hipótesis. Primero, es posible que las subunidades

sean propiamente traducidas, pero no logren incorporarse a la membrana plasmática. Segundo, es posible que las subunidades formen receptores que permanezcan intracelularmente (Buznikov y cols. 1996) y sus funciones sean distintas a las conocidas en la sinapsis. Por lo anteriormente mencionado se sugiere una línea de investigación que aborde estos aspectos.

La máxima expresión del RNAm del receptor de Gli se observa en CM E18, en donde se identificaron las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta$ . En estudios con corteza cerebral se observó la mayor expresión en recién nacido (Carpenter y cols., 1988). En cerebro medio de recién nacido, no se detectaron corrientes en ovocitos al ser expuestos a la glicina, en esta región sólo se amplificó la subunidad  $\beta$  con RT-PCR. Estos resultados en conjunto indican que en caso de formarse receptores homoligómeros  $\beta$ , no son receptores membranales funcionales en el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis*. Lo anterior sugiere que si se llegara a formar un receptor homoligómero, la corriente que generaría en los ovocitos inyectados sería muy baja para ser detectada. Es decir menos de 1000 receptores que induzcan una corriente de 1 picoamperio. Otra posibilidad es que sin la presencia de la subunidad  $\alpha$  no se forman los receptores o finalmente que se forman pero permanecen en el interior de la célula.

## **VII.2 PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES A GLICINA EN TRES REGIONES DEL SISTEMA NERVIOSO EN LA RATA E 18.**

Las propiedades electrofisiológicas de los receptores a Gli fueron estudiadas con más detalle inyectando RNAm de diversas regiones (CA, CM y TC) de E18 a ovocitos de *Xenopus leavis*. La amplitud de las corrientes inducidas con Gli 1mM por los ovocitos inyectados con RNAm de CM y TC fueron similares entre sí y mayores a las generadas por los ovocitos inyectados con

RNA<sub>m</sub> de CA. Se piensa que esta diferencia es genuina y que no es solo debida a variaciones en las preparaciones del RNA<sub>m</sub>, porque los tejidos fueron disecados de los mismos fetos, los RNAs extraídos al mismo tiempo, usando las mismas soluciones y porque tres extracciones diferentes de RNA<sub>m</sub> dieron los mismos resultados.

Los niveles de expresión de receptores a GABA fueron mucho menores en todos los casos estudiados. Es interesante que los receptores a GABA en el sistema nervioso central adulto están en mayor concentración en la materia gris del cerebro, mientras que los receptores de la Gli preponderan en la materia gris de la médula y tallo cerebral. También es interesante que el agonista GABA puede activar a los rGli, por lo que parte de estas corrientes pueden ser debidas a la activación de rGli, lo que indica que los receptores a GABA se forman todavía en menor cantidad. Estos resultados son consistentes con los reportados por Carpenter y cols., 1988, quienes encontraron que la cantidad de RNA<sub>m</sub> que codifica para receptores a GABA, en la corteza cerebral embrionaria de la rata es mucho menor que la del RNA<sub>m</sub> que codifica para los rGli. También se puede sugerir que las diferentes magnitudes de la IGli expresada por los tres RNA<sub>m</sub> pueden reflejar diferencias en los genes transcritos para los rGli en estas estructuras, o bien que no se incorporaron los receptores a la membrana.

Al comparar las relaciones dosis de Gli/corriente generada por ovocitos inyectados con RNA<sub>m</sub> de las distintas regiones, se encontró una diferencia significativa entre aquellos inyectados con RNA<sub>m</sub> de CM y TC. Esto sugiere que el receptor tiene una menor constante de disociación cuando es expresado por RNA<sub>m</sub> del TC ( $EC_{50} = 506 \mu\text{M}$ ), que aquellos formados con RNA<sub>m</sub> del CM. La afinidad de la Gli por el receptor, encontrada en el

presente trabajo, es menor que la reportada para receptores en ovocitos inyectados con RNAm de corteza cerebral E18, ( $EC_{50}$  385  $\mu$ M, Carpenter y cols., 1988) y mucho menor para aquellas de neuronas aisladas de médula espinal de lamprea, ( $EC_{50}$  16  $\mu$  M, Baev y cols., 1992). La mayor afinidad a la Gli de los receptores formados con el RNAm de TC respecto a los formados por RNAm de CM, sugiere que si el rGli participa en los procesos de diferenciación celular, sus efectos podrían ser mayores en TC, que en las otras regiones por las concentraciones necesarias para activarlo.

Las curvas corriente voltaje sugieren que el ión que permea por el canal es el cloro. En ausencia de glicina, los pasos de corriente son rectangulares y varían linealmente con el potencial (Gundersen y cols. 1984). En presencia de glicina se presentó una corriente, la cual se incrementó al hacer más negativo el potencial hasta el punto que inicia una rectificación (Fig. 10). El proceso de rectificación puede atribuirse al tiempo de vida del canal, a un bloqueo en el canal o simplemente a una disminución de la conductancia.

El proceso de desensibilización fue menor en ovocitos inyectados con RNAm de CM. El tiempo al que se alcanza el máximo de corriente, fue menor para ovocitos inyectados con RNAm de TC, que para aquellos inyectados con RNAm de CA o CM. Estas divergencias pueden estar relacionadas con la distinta afinidad de la Gli por el receptor y la cinética de los receptores activados. La diferencia en la desensibilización de los rGli descritos aquí, podrían hacer que las corrientes sinápticas de los rGli en las neuronas del tallo cerebral, sean más rápidas que las neuronas del CM. Estas diferencias pueden ser importantes en la transmisión de señales en las diferentes regiones del sistema nervioso central, y probablemente también en procesos morfogénicos en los que pudiera estar involucrado el receptor.



Las relaciones corriente-voltaje de todos los rGli expresados, indicaron que el cloro es el principal ión que permea por el canal del receptor. En células inmaduras esto es importante por la relación que existe con la movilidad de calcio intracelular, que puede modular el canal (Bregestovski, 2000).

Un hallazgo interesante fue la potenciación de las corriente generadas por la Gli en ovocitos inyectados con RNAm de las tres muestras. Esta propiedad fue observada por Platt y cols., 1998 en neuronas del colículo superior del adulto. Con los resultados de este trabajo se sugiere que esta propiedad se conserva en el CM. Los mecanismos de la potenciación, aún deben ser bien determinados, pero es posible que involucren a la proteína cinasa C, como ocurre para la potenciación de las corrientes de Gli en ovocitos que expresan subunidad  $\alpha$  (Mascia y cols., 1998), o bien la incorporación de receptores que en una primera aplicación estuvieran en la membrana, pero como vesículas. Otra posibilidad es que pudieran activarse receptores ya incorporados a la membrana, que en una primera aplicación no respondieron al agonista.

Los experimentos con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular (Fig. 19), sugieren que el receptor está modulado por  $\text{Ca}^{+2}$ . Es posible que el incremento en la amplitud de corriente de Gli se deba a la unión del  $\text{Ca}^{+2}$  en la región extracelular N-terminal de las subunidades del rGli  $\alpha 1$  (Bregestovski, 2000). También se han descrito sitios de unión para cationes divalentes como el  $\text{Zn}^{+2}$  en la misma región extracelular (Laube y cols., 2000).

Aún cuando no se hizo una caracterización farmacológica detallada de los rGli expresados por los distintos RNAm, se sabe que la mayoría de los rGli

son bloqueados por estriquina. La  $IC_{50}$  obtenida de los receptores informa acerca de la afinidad del antagonista por el receptor. Esta afinidad puede estar relacionada con el nivel de expresión o la densidad de receptores (Taleb y Betz, 1994) como también se observa en los resultados de este trabajo. Lo anterior puede explicarse porque a una mayor densidad de receptores, se tiene mayor número de sitios de unión al antagonista y con ello una mayor disminución de la intensidad de corriente en presencia de estriquina.

### **VII.3 EFECTO DE ESTRICNINA EN LA FORMACIÓN TEMPRANA DEL SISTEMA NERVIOSO.**

El efecto de la estriquina (antagonista de rGli) sobre el desarrollo del sistema nervioso en productos completos, se estudió con la metodología propuesta por Seller y Adinolfi, 1981, para ratones "curly tail". Con base en esta propuesta, se implementó en rata la metodología para conocer el efecto del antagonista a glicina en embriones completos durante la neurulación.

La concordancia de los efectos del ácido retinoico al ser aplicado a madres gestantes, con datos reportados previamente, permitieron validar el efecto en períodos tempranos del desarrollo (neurulación). Esta metodología presenta la ventaja de la aplicación del antagonista a la madre gestante, por lo que el efecto del fármaco, en los embriones se lleva a cabo una vez metabolizado (acercándose así más a la exposición de los humanos a diferentes agentes).

Los resultados muestran que el efecto de la estriquina es mayor al aumentar la dosis y nos sugiere que si la estriquina se une a rGli durante el desarrollo

temprano, estos desempeñan una función en la formación del sistema nervioso.

Es posible los rGli pueden participar en la diferenciación neuronal a través de una modulación de las concentraciones de calcio intracelular (Lo y cols., 1998). Dicha participación pudiera también relacionarse con otros receptores como el receptor GABA  $\rho$ 1, el cual es también activado por la Gli (Calvo y Miledi, 1995). La activación de los receptores GABA<sub>A</sub> o por Gli, durante el desarrollo, despolarizan a las neuronas corticales jóvenes (Obrietan y Van den Pol, 1995). También, el desarrollo de la estructura neural y funcional ha sido ligado con la inhibición glicinérgica en el núcleo olivar superior (Aporte y cols., 1996; Sanes y Hafidi, 1996).

Las diferencias en la magnitud de las corrientes de Gli expresadas por RNAm en ovocitos, el grado de desensibilización de los receptores, su potenciación, la modulación de los rGli por iones calcio y los efectos de estriquina probablemente reflejan una distinta mezcla de las subunidades que forman a los receptores en los diferentes estadios y regiones del sistema nervioso. La diversidad de las subunidades que constituyen a los rGli, dan información acerca de los genes que transcriben los RNAm activados en distintos estadios del desarrollo.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Los transcritos que codifican para la subunidad  $\beta$  de los rGli, están presentes desde antes que se inicie la formación del sistema nervioso.
2. Los transcritos que codifican para la subunidad  $\alpha$ , se amplificaron a partir de E13.
3. La edad gestacional a la que se encontraron RNAm con mayor expresión de rGli es E18 para CM y TC.
4. En E18 los niveles de expresión de los rGli son menores para cerebro anterior que para cerebro medio y tallo cerebral.
5. Los rGli expresados para los distintos RNAm tienen todas las características principales de los rGli, como la permeabilidad a cloro. La afinidad a Gli es mayor en los receptores provenientes del RNAm del tallo cerebral, que en cerebro medio o cerebro anterior E18.
6. Las respuestas a Gli aumentan cuando se repite la aplicación, este efecto es más evidente en los receptores derivados de RNAm procedente del cerebro medio.
7. La afinidad del receptor por estriquina es mayor en cerebro anterior que en tallo cerebral.

8. La rata es un modelo animal para el estudio del efecto de sustancias químicas sobre la formación del sistema nervioso durante la neurulación.
9. La estricnina causa un efecto teratógeno dosis-dependiente.
10. En la extracción de  $\text{RNA}_{\text{tot}}$  por los métodos de fenol-guanidío tiocianato y fenol-cloroformo, se obtuvieron los mismos rendimientos, sin embargo la expresión funcional fue mayor para aquellas muestras extraídas por fenol-cloroformo.

## **IX. ESTUDIOS PROPUESTOS**

- 1) Explorar detalladamente el inicio de la expresión de genes para receptores a neurotransmisores durante el desarrollo en diferentes modelos animales, para posteriormente conocer la función que desempeñan en la formación del sistema nervioso.
- 2) Explorar con hibridación *in situ* la presencia de mensajeros para receptores a neurotransmisores en las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso.
- 3) Localizar con inmunocitoquímica la presencia de receptores intracelulares durante el desarrollo temprano del sistema nervioso.
- 4) Explorar las posibles funciones durante el desarrollo del sistema nervioso de los receptores a neurotransmisores intracelulares.
- 5) Determinar los efectos de agonistas y antagonistas de los receptores a neurotransmisores en la formación del sistema nervioso.
- 6) Explorar la presencia de transportadores a neurotransmisores en embriones durante etapas tempranas del desarrollo.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Akagi, H. y Miledi, R. (1988). Heterogeneity of glycine receptors and their messenger RNAs in rat brain and spinal cord. *Science*, **242**, 270-273.

Akagi, H., Patton, D. E. y Miledi, R. (1989). Discrimination of heterogenous RNAs encoding strychnine-sensitive glycine receptors in *Xenopus* oocytes by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 8103-8107.

Alberts B., Dennis G., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc. USA, 3a. Ed., **9**, 401-448.

Aporte, J. E., Kotak, V. C. y Sanes, D. H. (1996). Decreased synaptic inhibition leads to dendritic hypertrophy prior to the onset of hearing. *Auditory Neuroscience*, **2**, 235-240.

Baev, K. V., Rusin, K. I. y Safronov, B. V. (1992). Primary receptor for inhibitory transmitters in Lamprey spinal cord neurons. *Neuroscience*, **46**, 931-941.

Betz, H., Kuhse, J., Fischer, M., Schmieden, V., Laube, B., Kuryatov, A., Langosch, D., Meyer, G., Bormann, J., Rundstrom, N., Matzebach, B., Kirsch, J. y Ramming, M. (1994). Structure, diversity and synaptic localization of inhibitory glycine receptors. *Journal of Physiology*, **88**, 243-248.

Betz, H., Kuhse, J., Schmieden, V., Laube, B., Kirsch, J. y Harvey, R. J. (1999). Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **868**, 668-676.

Borella, A., Bindra, M. y Whitaker-Azmitia, P. M. (1997). Role of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in development of the neonatal rat brain preliminary behavioral studies. *Neuropharmacology*, **36**, 445-450.

Bormann, I. (2000). The "ABC" of GABA receptors. *Trends Pharmacology Science*, **21**, 16-19.

Bouzat, C., Bren, N. y Sine, S. M. (1994). Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors. *Neuron*, **13**, 1395-1402.

- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **7**, 248-54.
- Bregestovski, P. (2000). *Synaptic transmission 100 years after L. Luciani*, C.E.S.I., Italy, 21-24.
- Brown, N. A. y Fabro, S. (1981). Quantitation of rat embryonic developmental In Vitro. A morphological scoring system. *Teratology*, **24**, 65-78.
- Buznikov, G. A., Shmukler, Y. B. y Lauder, J. M. (1996). From oocyte to neuron: Do neurotransmitters function in the same way throughout development. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **16**, 537-559.
- Calvo, D. y Miledi, R. (1995). Activation of GABA  $\rho$ 1 receptors by glycine and  $\beta$ -alanine. *Neuroreport*, **6**, 1118-1120.
- Carpenter, M. V., Parker, I. y Miledi, R. (1988). Expression of GABA and glycine receptors by messenger RNAs from the developing rat cerebral cortex. *Proc. R. Soc. Lond.*, **234**, 159-170.
- Chen, G., Trombley, P. Q. y Van Den Pol, AN. (1996). Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurons. *Journal of Physiology*, **494**, 451-464.
- Chomczynsky, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of ADN isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
- Diamond, J. y Miledi, R. (1959). The sensitivity of fetal and newborn rat muscle to acetylcholine. *Journal of Physiology*, **149**, 50.
- Diamond, J. y Miledi, R. (1962). A study of fetal and newborn rat muscle fibres. *Journal of Physiology*, **162**, 393-408.
- Flint, A. C., Liu, X. y Kriegstein, A. R. (1998). Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron*, **20**, 43-53.
- García-Alcocer, G., Martínez Torres, A., García-Colunga, J. y Miledi, R. (1999). Glycine receptors during early development of the rat brain. *Soc. Neuroscience*, **2**, 710.16.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



- Giroud, A. y Martinet, M. (1956). Tératogenese par hautes doses de vitamine A en fonction des stades du développement. *Arch. D 'anatomie Micr.* **45**, 77-98.
- Goldberg, J. I. y Katter, S. B. (1989). Expression and function of the neurotransmitter serotonin during development of the *Helisoma* nervous system *Dev. Biol.*, **131**, 483-495.
- Grenningloh, G., Pribilla, I., Prior, P., Multhaupt, G., Beyreuther, K., Taleb, O. y Betz, H. (1990). Cloning and expression of the 58 kd  $\beta$  subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron*, **4**, 963-970.
- Gundersen B.C., Miledi R. and Parker I. (1984). Properties of human brain glycine receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Proc. R. Soc. Lond B.* **221**, 235-244.
- Hamburger, V. y Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, **88**, 49-92.
- Hughes, P. I. y Dragunow, M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews*, **47**, 133-178.
- Hussy, N., Deleuze, Ch., Pantalón, A., Desarménien, M. y Moss, F. (1997). Agonist actino of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: posible role in osmoregulation. *Journal of Physiology*, **502**, 609-621.
- Ito, S. y Cherubini, E. (1991). Strychnine-sensitive glycine responses of neonatal rat hippocampal neurons. *Journal of Physiology*, **440**, 67-83.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. y Jessel, T. M. (1991). *Principles of Neural Science*, 3ª Ed., Elsevier, N. York, USA. **57**, 887.
- Kandler, K. y Friauf, E., (1995). Development of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in the auditory brainstem of perinatal rats. *Journal of Neuroscience*, **15**, 6890-6904.
- Katz, B. y Thesleff, S. (1957). A study of the "desensitization" produced by acetylcholine at the motor end-plate. *Journal of Physiology*, **138**, 63-80.

- Keith, L., (1979). *Embriología Clínica*, 2ª. Ed., Interamericana, México, **34**, 98-120.
- Khozhai, L. I., Puchlov, V. F. y Otellin, V. A. (1995). The effect of a serotonin deficiency on mammalian embryonic development. *Ontogenez*, **26**, 350-355.
- Kotak, C., Korada, S., Schwartz, L. R. y Sanes, D. H. (1998). Developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission the central auditory system. *Journal of Neuroscience*, **18**, 4646-4655.
- Kuhse, J., Schmieden, V. y Betz, H. (1990). A single aminoacid exchange alters the Pharmacology of neonatal rat glycine receptor subunit. *Neuron*, **5**, 867-873.
- Kusano, K., Miledi, R. y Stimakre, J. (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus oocyte* membrane. *Journal of Physiology*, **328**, 143-170.
- Langman, T. W. Sadlet (1996). *Embriología Médica*, 7ª. Ed., Panamericana, México, **4, 5**, 39-91.
- Laube, B., Kuhse, J. y Betz, H. (2000). Zn<sup>2+</sup> modulation of Glycine receptor *Journal of Physiology*, **522**, 215-230.
- Lauder, J. M., Wallace, J. A. y Krebs, H. (1981). Roles for serotonin in neuroembryogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **133**, 477-506.
- Lauder, J. M. (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat, serotonin as a developmental signal. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **600**, 297-314.
- Laurie, D. J., Wisden, W. y Seeburg, P. H. (1992). The distribution of thirteen GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. Embryonic and postnatal development. *Journal of Neuroscience*, **12**, 4151-4172.
- Lehninger, A. (1975). *Biochemistry*, Worth Publicers Inc., USA, 2ª. Ed., **25**, 709.
- Lo, Y. J., Rao, S. C. y Sanes, D. H. (1998). Modulation of calcium by inhibitory systems in the developing auditory midbrain. *Neuroscience*, **83**, 1075-1084.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis, F. y Randal, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin-Fenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

- Malosio, M. L., Marqueze-Pouey, B., Kuhse, J. y Betz, H. (1991). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *The EMBO Journal*, **10**, 2401-2409.
- Mascia, M. P., Machu, T. K. y Harris, R. A. (1998). Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anesthetics. *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 1331-1336.
- Mendenhall, W., Wackerly, D. y Scheaffer, R. (1994). Estadística Matemática con aplicaciones, Grupo Editorial Iberoamérica, 2ª. Ed., 399-440.
- Messenger, N. J. y Warner, A. E. (1989). The appearance of neural and glial cell markers during early development of the nervous system in the amphibian embryo. *Development*, **107**, 43-54.
- Miledi, R. y Woodward, R. M., (1989). Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology*, **416**, 621.
- Morales, A. y Miledi, R. (1991). Properties of rat spinal cord glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. Proc.*, **434**, 25.
- Morales, A., Nguyen Q. y Miledi, R. (1994). Electrophysiological properties of newborn and adult rat spinal cord glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 3097-3101.
- Morgan, J. I. y Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**, 421-451.
- Netter, F.H. (1994), *Sistema Nervioso, Anatomía y Fisiología*, 1ª Ed., Salvat, España, 135-141.
- Obrietan, K. y Van den Pol, A. (1995). GABA neurotransmission in the hypothalamus: Developmental reversal from Ca<sup>2+</sup> elevating to depressing. *Journal of Neuroscience*, **15**, 5065-5077.
- Parker, I., Sumikawa, K. y Miledi, R. (1988). Responses to GABA, glycine and  $\beta$ -alanine induced in *Xenopus* oocytes by messenger RNA from chick and rat brain. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **233**, 200-216.
- Platt, B., Bate, J. R., Von Linstow Roloff, E. y Withington, D. J. (1998).

- Glycine induces a novel form of long-term potentiation in the superficial layers of the superior colliculus. *Brit. J. Pharmacol.*, **125**, 293-300
- Sanes, D. H. y Hafidi, A. (1996). Glycinergic transmission regulates dendrite size in organotypic culture. *J. Neurobiol.*, **31**, 503-511.
- Sato, K., Kiyama, H. y Tohyama, M. (1992). Regional distribution of cells expressing glycine receptor  $\alpha 2$  subunit mRNA in the rat brain. *Brain Res.*, **590**, 95-108.
- Seller, M. J. y Adinolfi, M. (1981). The curly-tail mouse: An experimental model for human neural tube defects. *Life Sciences*, **29**, 1607-1615.
- Schmeiden, V., Kuhse, J. y Betz, H. (1992). Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor  $\alpha$  subunits: identification of aminoacid residues involved in taurine activation. *The EMBO Journal*, **11**, 2025-2032.
- Sumikawa, K., Parker, I., y Miledi, R. (1989). Expression of neurotransmitter receptors and voltage-activated channels from brain mRNA in *Xenopus* oocytes. *Methods in Neuroscience*, **2**, 30-44.
- Szekely, A. M. y Barbaccia, M. L. (1987). Activation of specific glutamate receptor subtypes increases C-fos proto-oncogene expression in primary cultures of neonatal rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*, **26**, 1779-1782.
- Takahashi, T., Momiyama, A., Hirai, K., Hishinuma, F. y Akagi, H. (1992). Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron*, **9**, 1155-1161.
- Taleb, O. y Betz, H. (1994). Expression of the human glycine receptor  $\alpha 1$  subunit in *Xenopus* oocytes: Apparent affinities of agonists increase at high receptor density. *The EMBO Journal*, **13**, 1318-1324.
- Valinsky, J. E. y Loonis, C. (1984). The cholinergic system of the primitive streak chick embryo. *Cell Differ.*, **14**, 287-294.
- Wallace, J. A. y Lauder, J. M. (1983). Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.*, **10**, 459-479.

Whitaker-Azmitia P. M. (1993). The role of serotonin and serotonin receptors in development of the mammalian nervous system. En: *Receptors in the Developing Nervous system*. Chapman & Hall, London 1<sup>a</sup> Ed. 3, 43-50.

Yoshio, Sakai. (1989). Neurulation in the mouse: Manner and timing of neural tube closure. *The Anatomical Record.*, 223, 194-203.

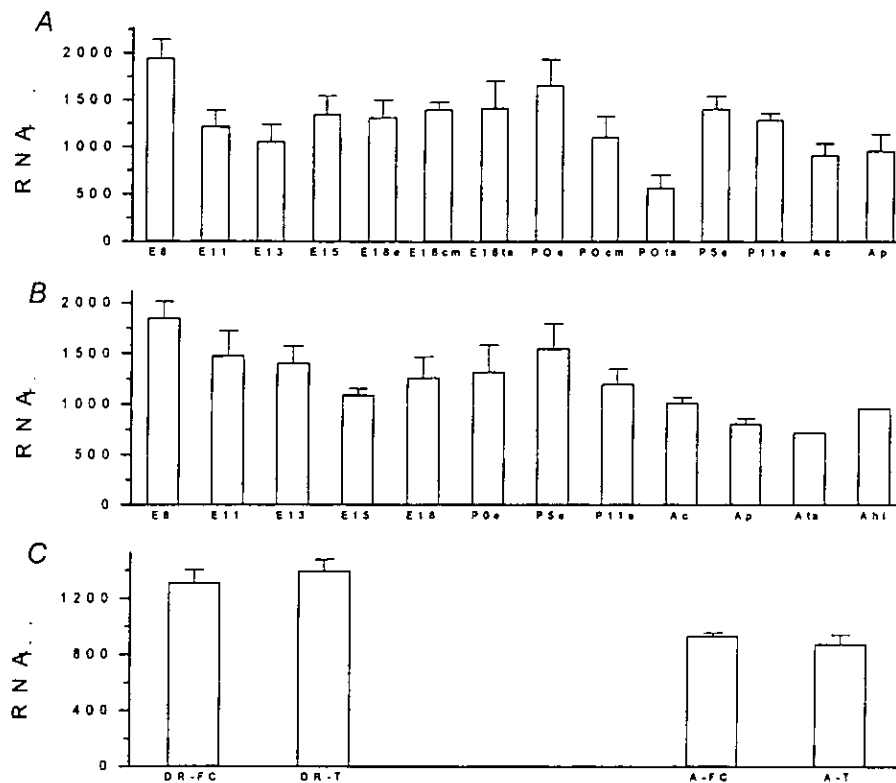
Zubay, G. (1998). *Biochemistry*, W.B.C., USA, 4a. Ed. 9, 220.-221.

## ANEXO I

### **COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE AISLAMIENTO DE RNA, OBTENIDOS CON LOS MÉTODOS DE FENOL-CLOROFORMO Y FENOLGUANIDIO TIOCIANATO.**

Para comparar la pureza, el rendimiento y la expresión funcional de las muestras extraídas durante la ontogenia, la extracción de RNA se llevó a cabo por 2 métodos fenol-cloroformo (FC) y fenol-guanidido tiocianato (T).

En la Fig. 18 se presenta el rendimiento de  $RNA_{tot}$  por los métodos de FC (A) y T (B) durante la ontogenia. En el eje de las abscisas se grafican las diferentes edades y en las ordenadas, el  $RNA_{tot}$  en microgramos por gramo de muestra húmeda ( $\mu g/gmh$ ). El rendimiento de  $RNA_{tot}$  por el método de FC desde E8 hasta adulto, fue de  $1,255 \pm 176 \mu g/gmh$  (media más el error estándar (m-ee),  $n = 42$  preparaciones). La m-ee de los tejidos en desarrollo fue  $1,394 \pm 83.7 \mu g/gmh$ , diferente del adulto  $875 \pm 67.86 \mu g/gmh$  ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig. 18 Extracción de RNA por los métodos de fenol-cloroformo y fenol-guanidinio-tiocianato.** Las barras indican la concentración de RNA<sub>tot</sub> en μg/gmh, los valores obtenidos corresponden a los métodos de fenol-cloroformo (m-ee, n = 3)(A) y de fenol-guanidinio tiocianato (m-ee, n = 2 y n = 1 en las últimas 2 columnas)(B). Las dos columnas de la izquierda agrupan los rendimientos de los tejidos en desarrollo que abarca del día E8 a PN11, los valores que se presentan son las medias obtenidas con los métodos mencionados en A y B (C). Las columnas de la derecha representan el RNA de las muestras de diferentes regiones de tejido adulto. DR desarrollo rápido (E8 a P11). A adulto, FC fenol-cloroformo, T fenol-guanidinio tiocianato, P postnatal.

La media del RNA<sub>m</sub> (Tabla II) extraídas con el método de fenol-cloroformo (n = 42) es de  $4.3 \pm 0.38\%$  del RNA<sub>tot</sub>. Al comparar el promedio del RNA<sub>m</sub> de las muestras provenientes de tejidos en desarrollo y las de adulto no se encontró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

El RNA<sub>tot</sub> extraído con el método de fenol-guanidinio tiocianato (n = 22), fue en promedio  $1,220 \pm 163$  μg/gmh. Para los tejidos en desarrollo  $1,309 \pm 96$



$\mu\text{g/gmh}$  y los de adulto  $934 \pm 21.4 \mu\text{g/gmh}$ , (diferente con una  $p = 0.05$ ). El porcentaje de RNAm respecto al  $\text{RNA}_{\text{tot}}$  (tabla II), es  $4.2 \pm 0.5 \mu\text{g}$ , no hay diferencia entre las muestras provenientes de tejidos en desarrollo y las de adulto ( $p \leq 0.05$ ).

La edad con mayor cantidad de  $\text{RNA}_{\text{tot}}$ , extraída con los dos métodos fue E8, una posible explicación sería que hay una mayor velocidad de desarrollo en este estadio. Al comparar el rendimiento de  $\text{RNA}_{\text{tot}}$  y RNAm extraído por los dos métodos, no hay diferencia ( $p \leq 0.05$ ).

**TABLA IV Extracción y purificación de RNA por los métodos de fenol-cloroformo y fenol-guanidío tiocianato. Cantidad de RNA<sub>tot</sub> obtenidos con los métodos de fenol-cloroformo (A) y fenol-guanidío tiocianato (B) durante la ontogenia. A la derecha se muestra el peso promedio de la estructura.**

**A**

EDAD	MEDIA (µg/g)	ERROR ESTÁNDAR	% ARNm/ARNt	PESO DE MUESTRA (g)
E 8	1942.3	200.3	2.3	0.052
E 11	1217.3	173.3	6.5	0.083
E 13	1054	186.9	2.8	0.022
E 15	1343.3	202.8	3.2	0.063
E 18ca	1312.7	188.7	5.6	0.085
E 18cm	1398.3	80.9	4.5	0.031
E 18ta	1416	289	4.2	0.033
PNOe	1656.7	277.9	5.2	0.23
PNOcm	1109	224	5.8	0.062
PNO ta	566.5	136.5	3.3	0.041
PN5	1404	135.1	5.5	0.42
PN11	1288	68.7	4.4	0.66
CA	912.7	123.3	5.4	0.99
PUL	955.5	179.5	1.9	

## MÉTODO FENOL-GUANIDIO TIOCIANATO

*B*

EDAD	MEDIA (µg/g)	ERROR ESTÁNDAR	% ARNm/ARNt	PESO MUESTRA (g)
E 8	1848.5	164.5	2.5	0.052
E11	1477	248	4.5	0.083
E13	1404.5	170.5	2.4	0.022
E15	1087.5	67.5	3.6	0.063
E18	1262	208	5.3	0.085
PN0	1319.5	266.5	8.7	0.23
PN5	1549	251	3.6	0.42
PN11	1200	150	4.8	0.66
CA	1014	56	5.7	0.99
PUL	806.5	56.5	3.1	1
TALLO	720	0	3.1	--
HIPO	960	0	3.3	--

E18ca = Cerebro anterior E18 postnatal O	P0ta = Tallo
E18cm = Cerebro medio E18 adulta	Ac = Corteza de rata
E18ta = Tallo cerebral E18 adulta	Ap = Pulmón de rata
PNOe = Encéfalo postnatal O rata adulta	Ahi = Hipotálamo de
PN0cm = Cerebro medio postnatal O	

Para explorar la presencia de genes activos que codifican para rGli, su traducción, la incorporación de proteínas a la membrana y su expresión funcional, se utilizó el sistema de ovocitos de *Xenopus leavis* (Miledi y Woodward, 1989). En este sistema se aplica una solución de Gli (1 mM) por perfusión a ovocitos inyectados con RNAm y se miden las corrientes generadas.

Para comparar los niveles de expresión de los RNA extraídos por los dos métodos, los ovocitos se inyectaron con RNAm de tallo cerebral de rata

recién nacida (TCPNO), cuyo RNA<sub>tot</sub> se extrajo por los métodos de FC y T (Fig. 19). Los resultados indican mayor nivel de expresión, en aquellos ovocitos que fueron inyectados con RNA extraído con FC ( $p \leq 0.05$ ). Estos resultados son consistentes con los obtenidos para tejido adulto por Sumikawa y cols., 1989.

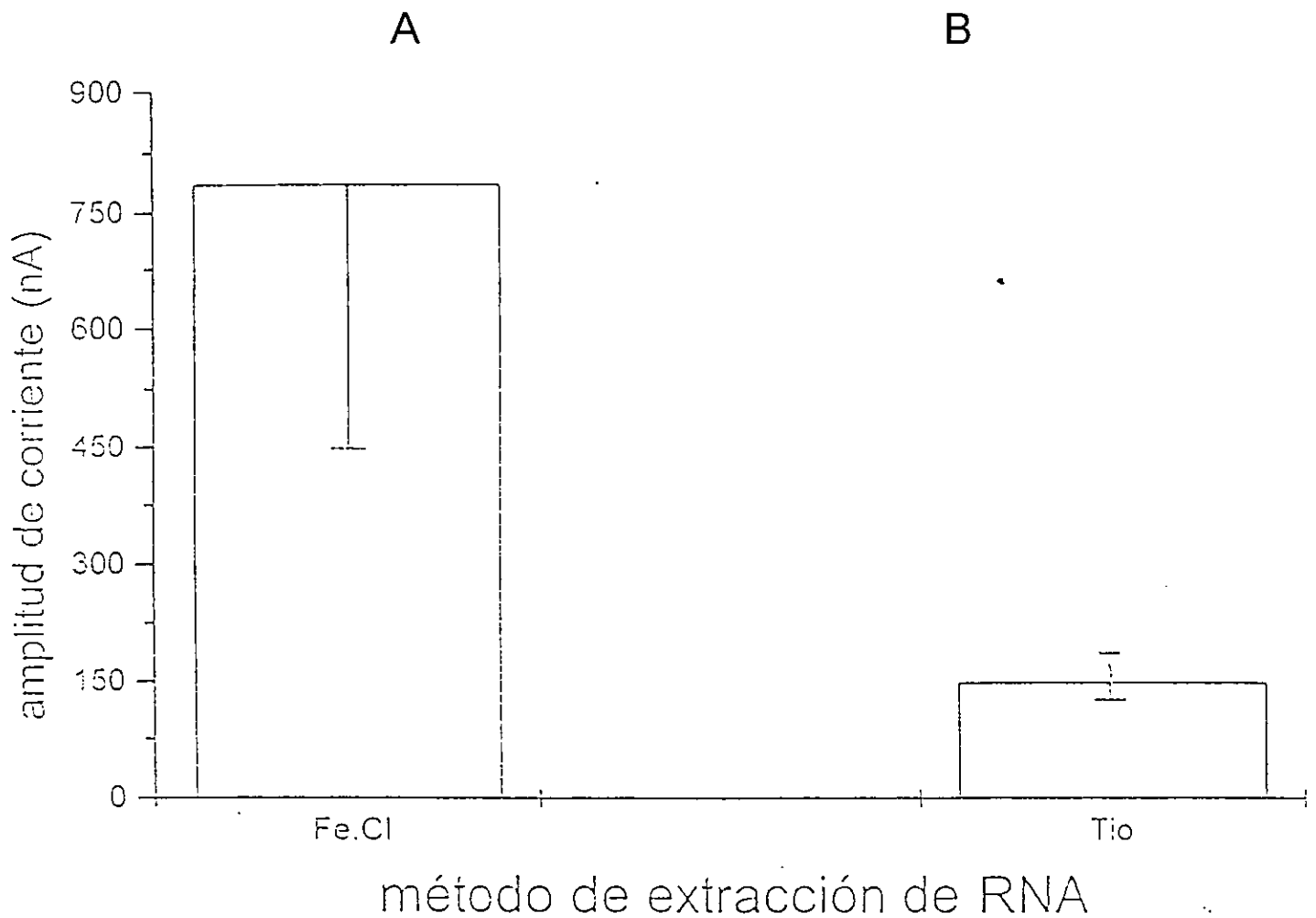
## DISCUSIÓN

Se podría esperar que el rendimiento de RNA<sub>tot</sub> fuese mayor en las muestras extraídas con T, que en las extraídas con fenol-cloroformo, debido a una menor manipulación, sin embargo no hubo diferencia entre los dos grupos ( $p \leq 0.05$ ), lo cual sugiere, que el RNA<sub>tot</sub> obtenido en los diferentes pasos de la extracción con FC, es similar a la del método con T.

Los porcentajes de RNAm obtenidos corresponden con los reportados para rata adulta (Sumikawa y cols., 1989), estos resultados indican que aún con una mayor cantidad de RNA<sub>tot</sub>, como es el caso de E8 y PN0, los porcentajes de mensajero varían del 2 al 7%. Dichos resultados sugieren que las diferencias en los rendimientos del RNA<sub>tot</sub>, de las muestras obtenidas no modifican el rendimiento de RNAm.

Con base en los resultados de este trabajo, se sugiere que la cantidad de RNA<sub>tot</sub> depende más del tipo de tejido, que del método de extracción y la proporción de RNAm es independiente del método de extracción del RNA<sub>tot</sub> y del estadio del desarrollo. El rendimiento de RNAm es menor al reportado por Carpenter y cols. 1988 ( $6.15 \pm 0.89$  n=17), probablemente debido a que las muestras analizadas incluyen además otros periodos del desarrollo más temprano.

Para la expresión funcional de los receptores formados a partir de los transcritos, se usó el sistema de ovocitos de *Xenopus laevis* (Miledi y Woodward, 1989), a los que se inyectó el RNAm, para llevar a cabo su traducción. La incorporación de las proteínas a la membrana y luego el registro electrofisiológico de la actividad de los receptores expresados. Para comparar los dos métodos de extracción de RNA<sub>tot</sub> se utilizó TC PN0. Los ovocitos indujeron corrientes iónicas al ser superfundidos con 1mM de Gli, dichas corrientes son claramente debidas a la activación de rGli, porque los ovocitos no inyectados y expuestos al agonista, no liberan corrientes apreciables. La expresión es mayor ( $p \leq 0.05$ ) para aquellas muestras en las que el RNA<sub>tot</sub> se extrajo por FC, quizá debido a que en más pasos durante la extracción, se obtiene una muestra con mayor pureza que se ve reflejada en el nivel de expresión.



**Fig. 19 Comparación de la expresión de RNA de tallo cerebral recién nacido, extraídas por los métodos de fenol-cloroformo o de fenol-guanidido tiocianato.** Las columnas representan la media  $\pm$  ee de la amplitud de la corriente al aplicar en el medio de perfusión 1 mM de Gli a ovocitos inyectados con RNAm de tallo cerebral recién nacido, extraído por el método de fenol-cloroformo (A, n = 3) o fenol-guanidido tiocianato (B n = 7). El potencial de membrana de los ovocitos se fijó a  $-60$  mV.

## **ANEXO II**

### LISTA DE REACTIVOS UTILIZADOS

REACTIVO	PROVEEDOR	No. Catálogo
Acetato de sodio	Baker	4009-04
Ácido acético	Baker	9507-02
Agarosa	Gibco BRL	15510 027
Albúmina bovina	Bio-Rad	5000002
Anestésal	Pfizer	
Azul de Coomassie	Bio-Rad	5000002
Bicarbonato de sodio	Sigma	S 8875
Bromuro de etidio	Sigma	E8751
Citrato de sodio	Gibco BRL	15584 014
Cloroformo	Merck	5004615854
Cloruro de calcio	Sigma	22350-6
Cloruro de potasio	Sigma	P 9333
Cloruro de sodio	Sigma	S 7653
Colagenasa tipo I	Sigma	C 0130
Dietilpirocarbonato (DEPC)	Sigma	D 5758
EDTA	Gibco BRL	15576 028
Etol absoluto	Merk	6002415853
Fenol	Gibco BRL	155509 029
Gentamicina	Gibco BRL	15750 078
Glicina	Bio-Rad	161-0718
Heparina	Sigma	H 5393
Hepes	Gibco BRL	11344 033
8-Hidroxiquinoleína	Sigma	H 6878
Hidróxido de sodio	Sigma	S 8045
Isoamílico alcohol	Baker	9038 02



Isopropanol	Baker	9084 03
$\beta$ -mercaptoetanol	Gibco BRL	21985 023
Nitrato de calcio	Sigma	C 4955
Oligo dT	Gibco BRL	15940-018
Sarcosyl	Sigma	C 5125
Sulfato de cobre	Sigma	C 1297
Sulfato de magnesio	Sigma	M 1880
SDS	Gibco BRL	15525017
Tartrato de sodio y potasio	Sigma	4797
Tiocianato de guanidina	Fluka	50990
Titan One Tube RT-PCR system	Roche	1855476
Tris-HCl	Gibco BRL	155506-017

## **ANEXO III**

# Characteristics of glycine receptors expressed by embryonic rat brain mRNAs

Guadalupe García-Alcocer\*<sup>†</sup>, Jesús García-Colunga\*, Atáulfo Martínez-Torres<sup>‡</sup>, and Ricardo Mileedi\*<sup>†§</sup>

\*Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Juriquilla, Querétaro 76001, México; <sup>†</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology, Department of Neurobiology and Behavior, University of California, Irvine, CA 92697-4550; and <sup>‡</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro 76010, México

Contributed by Ricardo Mileedi, December 7, 2000

A study was made of glycine (Gly) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes injected with rat mRNAs isolated from the encephalon, midbrain, and brainstem of 18-day-old rat embryos. In oocytes injected with encephalon, midbrain, or brainstem mRNAs, the Gly-current amplitudes (membrane current elicited by Gly; 1 mM Gly) were respectively  $115 \pm 35$ ,  $346 \pm 28$ , and  $389 \pm 22$  nA, whereas the GABA-currents (1 mM GABA) were all  $\leq 40$  nA. Moreover, the Gly-currents desensitized faster in oocytes injected with encephalon or brainstem mRNAs. The EC<sub>50</sub> for Gly was  $611 \pm 77$   $\mu$ M for encephalon,  $661 \pm 28$   $\mu$ M for midbrain, and  $506 \pm 18$   $\mu$ M for brainstem mRNA-injected oocytes, and the corresponding Hill coefficients were all  $\approx 2$ . Strychnine inhibited all of the Gly-currents, with an IC<sub>50</sub> of  $56 \pm 3$  nM for encephalon,  $97 \pm 4$  nM for midbrain, and  $72 \pm 4$  nM for brainstem mRNAs. During repetitive Gly applications, the Gly-currents were potentiated by 1.6-fold for encephalon, 2.1-fold for midbrain, and 1.3-fold for brainstem RNA-injected oocytes. Raising the extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration significantly increased the Gly-currents in oocytes injected with midbrain and brainstem mRNAs. Reverse transcription-PCR studies showed differences in the Gly receptor (GlyR)  $\alpha$ -subunits expressed, whereas the  $\beta$ -subunit was present in all three types of mRNA. These results indicate differential expression of GlyR mRNAs in the brain areas examined, and these mRNAs lead to the expression of GlyRs that have different properties. The modulation of GlyRs by Ca<sup>2+</sup> could play important functions during brain development.

In all vertebrates the main neurotransmitters responsible for fast inhibitory synaptic transmission are the amino acids glycine (Gly) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), which act on their specific receptors (1, 2). Molecular cloning indicates that both Gly receptors (GlyR) and GABA receptors (GABAR) have a pentameric subunit structure, arranged around a chloride-selective ion channel. The GlyR is composed of two types of glycosylated integral membrane proteins ( $\alpha 1$ – $\alpha 4$  and  $\beta$ ) and an associated peripheral membrane protein (1). On the other hand, the GABAR are made up of combinations of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\pi$ -, or  $\rho$ -subunits (3).

The density, location, and subunit composition of some neurotransmitter receptors change during development. For example, mammalian fetal skeletal muscle fibers have acetylcholine receptors along their entire surface and the receptors disappear from the nonjunctional areas during development (4), and their subunit composition is also changed (5). Similarly, the amount of GlyR gene translation, assessed by the injection of developing rat cerebral cortex mRNA into *Xenopus* oocytes, decreases with age, whereas that of GABARs increases (6). Moreover, the type and location of mRNAs coding for GlyR changes ontogenetically (7), and the subunit composition is also changed, because the  $\alpha 2$ -subunit seen by *in situ* hybridization in embryonic day 14 (E14) midbrain is not found after E19 (8). Additionally, during development, the  $\alpha 2$ -subunit is replaced by the  $\alpha 1$ -subunit in GlyRs; and the GABA receptor  $\alpha 2/\alpha 3\alpha 5\beta$  changes into  $\alpha 1\alpha 4\beta 2\delta$  (9, 10). All these changes are likely to be important for the development of the nervous system.

It was of interest to see whether the different Gly/GABA receptor mRNA ratios found in the developing rat cerebral cortex (6) also occur in other regions of the central nervous system. As a start, we have focused on the encephalon, midbrain, and brainstem of 18-day-old rat embryos. Some of the results have already been presented in preliminary form.<sup>†</sup>

## Methods

**Embryonic Tissues.** Sprague–Dawley rats were mated overnight and, if the female was found to have a vaginal plug, the following day was called E1. Animals were housed under controlled conditions of temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humidity (40–60%), and light (12-h light/12-h dark cycle), and provided with food and water ad libitum. To obtain brain tissues, rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg i.p.), fetuses were removed by abdominal surgery, and the encephalon (whole brain, minus midbrain and brainstem), midbrain, and brainstem were dissected out, placed immediately in liquid nitrogen, and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until processed. Each brain dissection took less than 5 min. Brain regions were identified according to a rat development atlas (11).

**Isolation of Poly(A<sup>+</sup>) RNA.** Total RNAs were isolated by the phenol/chloroform method, essentially as described (12). The absorbance ratio,  $A_{260}/A_{280}$ , was  $\approx 2$  when the RNA was dissolved in 20 mM Hepes, pH 7.5. Poly(A)<sup>+</sup> RNA was then isolated by oligo(dT) chromatography and dissolved in water to a concentration of 2 mg/ml. Three different mRNA preparations were obtained for each region and they gave essentially the same results.

**Oocyte Injection and Recording.** The methods used were as previously described (13). Segments of ovary were surgically removed from *Xenopus laevis* frogs (*Xenopus* I, Ann Arbor, MI), and stages V–VI follicle-enclosed oocytes were isolated and maintained at  $16$ – $18^\circ\text{C}$  in Barth's solution [88 mM NaCl/1 mM KCl/0.33 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/0.41 mM CaCl<sub>2</sub>/0.82 mM MgSO<sub>4</sub>/2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>/5 mM Hepes–NaOH (pH 7.4)/0.1 mg/ml gentamicin sulfate]. The next day, each oocyte was injected with 100 ng of mRNA, and 2 days later the oocytes were treated with collagenase (Sigma type I; 0.5–1 mg/ml) to remove the follicular and other enveloping cells (14). Three to five days after injection, ionic currents were recorded at room temperature ( $20$ – $24^\circ\text{C}$ ) by using a two-microelectrode (3 M KCl) voltage clamp, with the membrane potential usually held at  $-60$  mV. Oocytes were stabilized in a recording chamber (volume  $\approx 0.1$  ml) and continuously perfused (5–7 ml/min) with normal frog Ringer's

Abbreviations: GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; GlyR, Gly receptor; GABAR, GABA receptor; En, embryonic day *n*; RT-PCR, reverse transcription-PCR.

<sup>†</sup>To whom reprint requests should be sent at the  $\ddagger$  address. E-mail: rmiledi@uci.edu.

<sup>‡</sup>García-Alcocer, G., Martínez-Torres, A., García-Colunga, J., & Mileedi, R. (1999) *Soc. Neurosci. Abstr.* 25, 710–716.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

solution [115 mM NaCl/2 mM KCl/1.8 mM CaCl<sub>2</sub>/5 mM Hepes-NaOH (pH 7.0)]. Membrane currents were recorded on a digital oscilloscope (Nicolet 310) and stored on disks for subsequent computer analyses with a program written by Rico Miledi. Values stated are given as the mean  $\pm$  SEM. Gly was diluted daily in Ringer's solution, from a 1 M stock kept at 4°C, and applied via the perfusion system.

Gly dose-response relationships were fitted to the Hill equation:

$$I_{[\text{glycine}]} = I_{\text{max}}[\text{glycine}]^{n^H}/([\text{glycine}]^{n^H} + EC_{50}^{n^H}),$$

where  $I_{[\text{glycine}]}$  is the dose-dependent Gly-current amplitude,  $I_{\text{max}}$  is the maximal current elicited by Gly,  $EC_{50}$  is the half-excitatory concentration of Gly, and  $n^H$  is the Hill coefficient. The inhibitory strychnine dose-response relationships were fitted to the Hill equation:

$$I_{\text{strychnine}} = I_p \cdot IC_{50}^{n^H}/([\text{strychnine}]^{n^H} + IC_{50}^{n^H}),$$

where  $I_{\text{strychnine}}$  is the Gly-current in the presence of strychnine,  $I_p$  is the control peak current, and  $IC_{50}$  is the half-inhibitory concentration of strychnine (15).

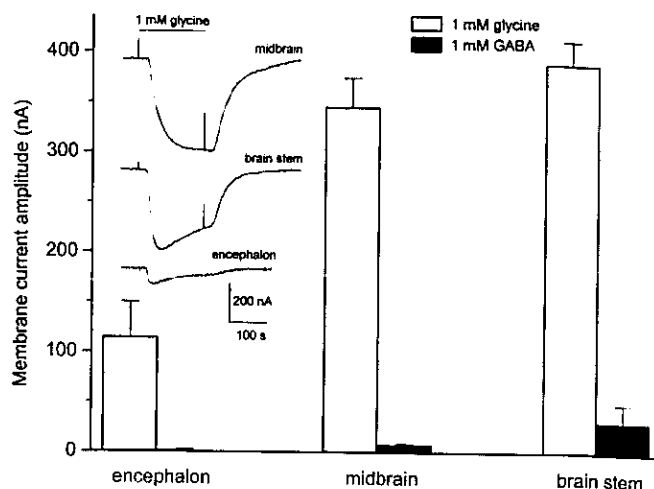
**Reverse Transcription-PCR (RT-PCR).** Poly(A)<sup>+</sup> RNA was converted to first-strand cDNA (Titan One Tube RT-PCR system, Roche Molecular Biochemicals) by using specific GlyR-subunit primers. We used 1  $\mu$ g of mRNA and the template was denatured at 94°C for 2 min, 10 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 50°C for 30 s, and elongation at 68°C 1 min; followed by 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing 50°C for 30 s, and elongation at 68°C 3 min; and finally, 1 elongation of 7 min at 68°C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase served as a positive control, and water served as a negative control. The amplified reactions were visualized in ethidium bromide-stained 1.5% agarose gels.

## Results

**Expression of Gly and GABA Receptors by Embryonic Brain mRNAs.** In control (noninjected) oocytes, the superfusion of 1 mM Gly consistently evoked only small membrane currents (1–10 nA), caused by the activation of a native electrogenic Gly transporter (R.M., unpublished data), and 1 mM GABA usually did not evoke detectable membrane currents. In contrast, the application of Gly or GABA to oocytes injected with mRNA derived from encephalon, midbrain, or brainstem elicited substantial inward membrane currents (Fig. 1). The level of GlyR expression, as judged by the amplitude of the membrane currents evoked, varied according to the origin of the mRNA injected (Fig. 1 and Table 1). The level of GABA expression by the three types of E-18 rat embryo mRNA followed a similar pattern but the currents were considerably smaller (Fig. 1). The ratios of Gly-current to GABA-current were 57.5 for encephalon, 43.3 for midbrain, and 12.2 for brainstem. For the rest of this article we focus on the Gly responses.

**Gly Dose-Response Relationships.** Gly-currents were first detectable with about 100  $\mu$ M Gly, increased steeply in size as the Gly dose was raised, and reached a maximum with about 3 mM Gly (Fig. 2). The  $EC_{50}$ , derived from fitting the data to the Hill equation (15) and the corresponding Hill coefficients, are summarized in Table 1. The difference between midbrain and brainstem is significant ( $P < 0.05$ ), indicating that the affinity for Gly is slightly higher for brainstem GlyRs, whereas the cooperative properties are very similar.

At low doses of Gly, the membrane current increased approximately as the 2.5th power of the Gly concentration in oocytes injected with midbrain mRNAs, and the 2.9th power in oocytes



**Fig. 1.** Expression of Gly and GABA receptors by embryonic mRNAs. The columns represent the amplitude of membrane currents elicited by Gly or GABA (both 1 mM) in oocytes injected with mRNA from 18-day-old rat embryo encephalon, midbrain, or brainstem. (Inset) Representative Gly-currents. For this and subsequent figures, the downward deflections correspond to inward currents, the membrane potential was held at  $-60$  mV (unless otherwise indicated), and Gly was applied as indicated by a continuous line and by brief depolarizing pulses. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. The number of oocytes studied (from five donors) were 26, 43, and 18 (Gly-currents), and 26, 10, and 36 (GABA-currents) for encephalon, midbrain, and brainstem mRNAs, respectively.

injected with brainstem mRNA. These values are not significantly different between themselves and are similar to those for GlyRs expressed by fetal human brain and rat spinal cord mRNAs (7, 16), all of which suggests that at least three molecules of Gly must bind to a GlyR to gate the ion channel with a high degree of cooperativity.

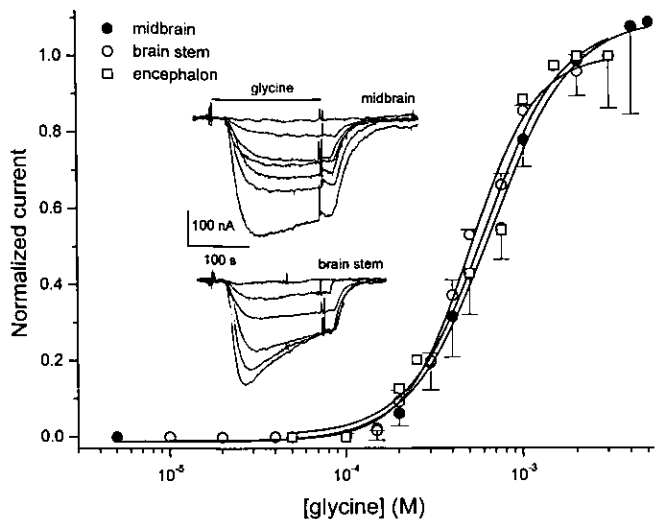
**Current-Voltage Relationships.** The voltage dependence of Gly-currents was investigated by holding the membrane potential at different levels and applying 2 mM Gly every 10 min. As with other GlyRs expressed in oocytes (17), the Gly-current amplitude decreased as the membrane potential was depolarized (Fig. 3), and in all cases the Gly-current reversal potential was close to the Cl<sup>-</sup> equilibrium potential ( $-30$  mV; ref. 18), similar to GlyRs expressed by bovine retina and rat spinal cord mRNAs (19, 20). The current-voltage relationships were nearly linear from  $-50$  to  $+50$  mV, but displayed a clear outward rectification at hyperpolarizing potentials attributable to a decrease in the channel open-time (16, 20). These results indicate that Cl<sup>-</sup> is the main anion flowing through the channels gated by the receptors expressed by the three mRNAs.

**Desensitization of Gly-Currents.** With low concentrations of Gly (100–300  $\mu$ M), the currents elicited were relatively well main-

**Table 1.** GlyR characteristics

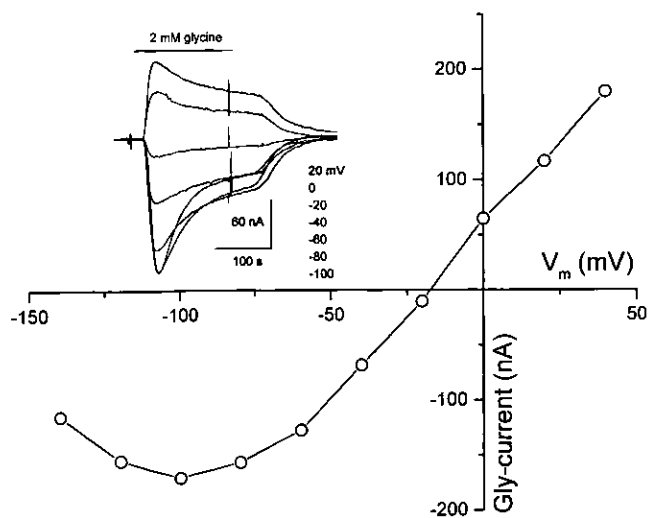
Brain area	Expression, nA	$EC_{50}$ , $\mu$ M	Hill coefficient	$IC_{50}$ , nM
Encephalon	115 $\pm$ 35	611 $\pm$ 77	2.0 $\pm$ 0.5	56 $\pm$ 3
Midbrain	346 $\pm$ 28	661 $\pm$ 28	1.9 $\pm$ 0.1	97 $\pm$ 4
Brain stem	389 $\pm$ 22	506 $\pm$ 18	2.4 $\pm$ 0.2	72 $\pm$ 4

For level of expression, the numbers represent Gly-current amplitudes (mean  $\pm$  SEM), evoked by 1 mM glycine in oocytes injected with encephalon, midbrain, and brain stem mRNAs ( $n = 26, 43,$  and  $18,$  respectively). The  $EC_{50}$  and  $IC_{50}$  values were derived from the Hill equation.

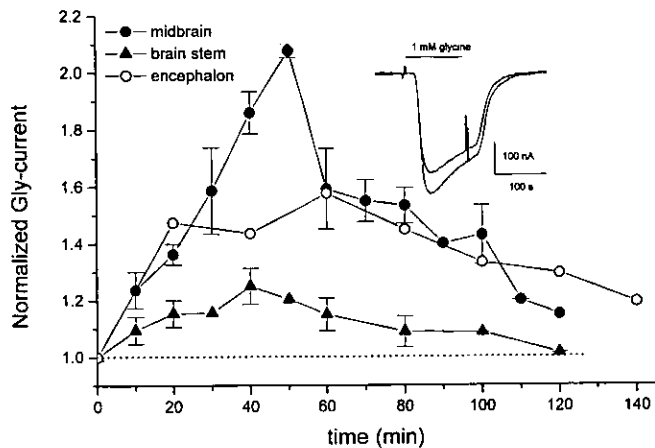


**Fig. 2.** Gly dose-response relationships. Current amplitude as a function of Gly concentration, from oocytes injected with encephalon, midbrain, or brainstem mRNAs. Responses were normalized to the current at 3 mM. Continuous lines represent least-squares fits to the Hill equation. Each point shows the mean  $\pm$  SEM for five oocytes from three different donors in midbrain and brainstem, and two donors for encephalon. (Inset) Typical currents elicited by 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, and 1.0 (midbrain), and by 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.75 mM Gly (brainstem).

tained (Figs. 1 and 2). However, with higher concentrations, the Gly-currents reached a peak and then declined in the continuous presence of Gly (Figs. 1 and 2). This decay was mainly caused by receptor desensitization and it became progressively faster as the Gly concentration was increased (Fig. 2, Inset). The desensitization was significantly less for Gly-currents evoked by oocytes injected with midbrain mRNA than for those injected with encephalon or brainstem mRNAs. To assess this difference, we measured the onset and the decay of the Gly-currents in oocytes injected with midbrain or brainstem mRNAs, which generated maximal currents of approximately the same amplitude. In that



**Fig. 3.** Gly-current-voltage relationship. Current-to-voltage relationship from one oocyte injected with brainstem mRNA obtained by applying brief voltage steps, from  $-140$  to  $40$  mV, in the absence and presence of  $2$  mM Gly and subtracting the passive membrane currents in the absence of Gly. (Inset) Representative Gly-currents in another oocyte. Gly ( $2$  mM) was applied every  $10$  min at the indicated membrane potentials.



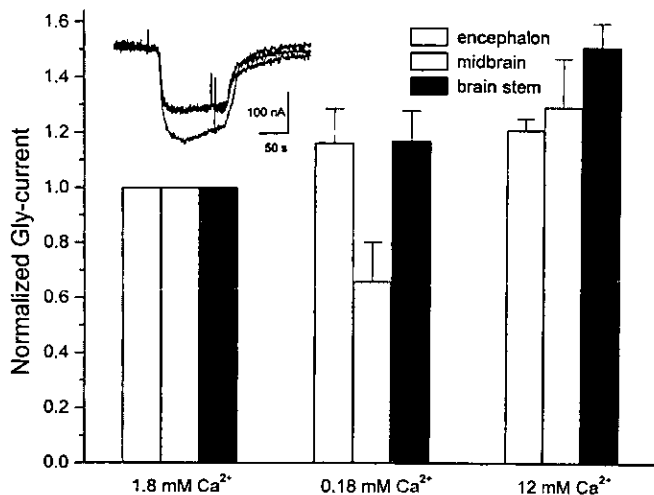
**Fig. 4.** Potentiation of Gly-currents. Amplitudes of repetitive Gly-currents in oocytes injected with encephalon ( $n = 2$ ), midbrain ( $n = 4$ ), or brainstem ( $n = 8$ ) mRNAs. Gly ( $1$  mM) was applied for  $2$  min at about  $10$  min intervals. Time  $0$  indicates the first application; potentiation was greater for midbrain than for encephalon or brainstem. (Inset) Examples of the first and fourth Gly-currents from an oocyte injected with brainstem mRNA.

set of experiments the Gly-currents, evoked by  $1$  mM Gly, were  $319 \pm 37$  nA ( $n = 23$ ) for oocytes injected with midbrain mRNA, and  $444 \pm 18$  nA ( $n = 12$ ) for oocytes injected with brainstem mRNA. The time to peak was  $107 \pm 9$  s in the former case, and  $35 \pm 2$  s in the latter;  $2$  min after applying Gly the currents decayed to  $92\% \pm 1\%$  in midbrain- and  $62\% \pm 3\%$  in brainstem-mRNA injected oocytes. The Gly-currents were thus significantly slower in both onset and desensitization in the oocytes injected with midbrain mRNA. Furthermore, the onset and the decay of the currents became faster as the Gly concentration was increased (Fig. 2), and also with membrane hyperpolarization (data not shown).

**Potentiation of Gly-Currents.** Interestingly, we consistently found that when  $1$  mM Gly was applied repeatedly (at  $10$ -min intervals), the Gly-current amplitude increased progressively. This potentiation was evaluated as the  $n$ th current amplitude compared with that elicited by the first application of Gly (Fig. 4). The greatest potentiation was found in oocytes injected with midbrain mRNA ( $2.1 \pm 0.0$  times), intermediate for encephalon mRNA ( $1.6$ ), and smallest for brainstem ( $1.3 \pm 0.1$ ) mRNA. In all cases, the potentiation was maximal after five to six Gly exposures, and during subsequent applications the current amplitude began to decrease toward the control levels (Fig. 4).

**Gly-Current Modulation by Calcium.** In view of the Gly-current potentiation, it was of interest to examine the effects of extracellular calcium on the Gly-current. For this purpose, the oocytes were exposed to Gly while being superfused with normal Ringer's solution or with solutions containing low ( $0.18$  mM) or high ( $12$  mM) concentrations of  $Ca^{2+}$ . In oocytes injected with encephalon, midbrain, or brainstem mRNA, and exposed to high  $Ca^{2+}$ , the Gly-currents increased, respectively, to  $1.2 \pm 0.0$ ,  $1.3 \pm 0.2$ , and  $1.5 \pm 0.1$  times their amplitude in normal Ringer's solution (Fig. 5). These values were significantly different for midbrain and brainstem ( $P < 0.05$ ) compared with those in low  $Ca^{2+}$ , and the increase of the Gly-current in high  $Ca^{2+}$  was different for brainstem compared with normal  $Ca^{2+}$ .

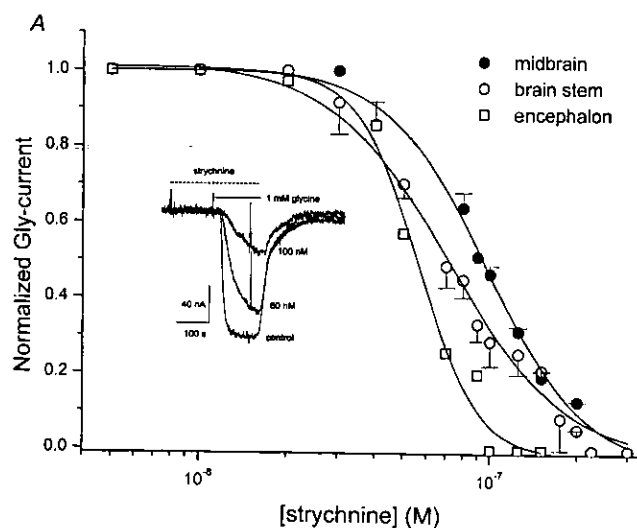
**Effects of Strychnine on GlyRs.** To examine the effect of the specific GlyR antagonist, strychnine, dose-response relationships were obtained by applying Gly ( $1$  mM) and various concentrations of strychnine to oocytes injected with the three different mRNAs



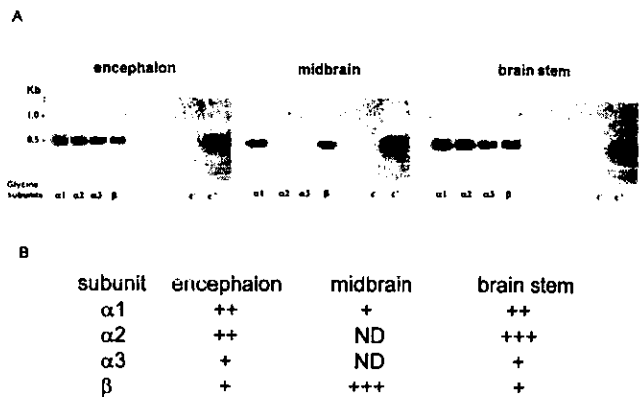
**Fig. 5.** Gly current modulation by calcium. The columns represent the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) of Gly-currents elicited by 1 mM Gly in the presence of different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. (Inset) Currents elicited by 1 mM Gly in normal Ringer's solution, and in the presence of high  $\text{Ca}^{2+}$  (12 mM) in an oocyte injected with midbrain mRNA.

(Fig. 6). Oocytes were preincubated with strychnine for 2 min and then exposed to Gly plus strychnine. A decrease in Gly-current was first detected with about 40 nM strychnine, and as the strychnine concentration was increased, the Gly-currents decreased until they became undetectable with about 300 nM strychnine. The  $\text{IC}_{50}$  for strychnine obtained by fitting the data to the Hill equation was  $56 \pm 3$  nM for encephalon mRNA,  $97 \pm 4$  nM for midbrain mRNA, and  $72 \pm 4$  nM for brainstem mRNA. The  $\text{IC}_{50}$  values for encephalon and midbrain were significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Distribution of GlyR Subunits.** To complement the electrophysiological studies, we used mRNAs from encephalon, midbrain, and



**Fig. 6.** Inhibition of Gly-currents by strychnine. Gly-current amplitudes normalized to the current in the absence of strychnine. Continuous lines represent least squares fits to the Hill equation. Each point shows the mean  $\pm$  SEM for three oocytes injected with mRNAs from midbrain and brainstem, and from one oocyte injected with mRNA from encephalon. The oocytes were from three different donors. (Inset) Typical currents elicited by 1 mM Gly and inhibited by strychnine in an oocyte injected with midbrain mRNA.



**Fig. 7.** Distribution of GlyR-subunit transcripts. (A) The lanes show the GlyR subunits present in encephalon, midbrain, and brainstem mRNAs amplified by RT-PCR. Subunits:  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\alpha 3$ -, and  $\beta$ - as well as negative (c, water) and positive (c<sup>+</sup>, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) controls. (B) Semi-quantitative signals in 1.5% agarose gel; the signals were designated weak, +; moderate, ++; and intense, +++. ND, not detected. Note that the  $\alpha 1$ - and  $\beta$ -subunits were amplified from all mRNAs, and that the  $\alpha 2$ - and  $\alpha 3$ -subunits were present in encephalon and brainstem but not in the midbrain.

brainstem as templates for RT-PCR assays, using primers specific for GlyR subunits. In the three mRNA samples, the subunits were differentially expressed. The  $\alpha 1$ - and  $\beta$ -transcripts were present in all of the mRNAs, whereas the  $\alpha 2$ - and  $\alpha 3$ -GlyR transcripts were not detected in the midbrain but were present in the encephalon and brainstem mRNAs (Fig. 7).

## Discussion

Gly-currents evoked in the mRNA-injected oocytes are clearly caused by activation of GlyRs, because noninjected oocytes exposed to Gly do not elicit appreciable membrane currents. The maximal amplitudes of Gly-currents generated by oocytes injected with midbrain and brainstem mRNAs were similar, and both were much larger than the currents elicited by oocytes injected with encephalon mRNA. We believe that this difference is genuine and is not merely caused by variations in mRNA preparation, because the three tissue samples were obtained from the same fetuses and the RNAs were extracted at the same time by using the same stock solutions. Moreover, similar results were obtained with three sets of mRNAs and each set was always injected into oocytes from the same donor. Therefore, the different magnitudes of Gly-currents expressed by the mRNAs probably reflect real developmental differences in the amounts of GlyR transcripts in these structures. The ratio between Gly and GABA receptors is consistent with that observed for cerebral cortex mRNA (6). Another interesting difference concerns the slightly lower dissociation constant of brainstem GlyRs ( $\text{EC}_{50} = 506 \mu\text{M}$ ), compared with encephalon and midbrain GlyRs (611 and 661  $\mu\text{M}$ ). This  $\text{EC}_{50}$  is higher than for oocytes injected with cerebral cortex mRNA (385  $\mu\text{M}$ ; ref. 6), and much higher than for lamprey spinal cord neurons (16  $\mu\text{M}$ ; ref. 21). These differences may be caused by variations in the GlyR subunits and the associated proteins that make up the particular receptor complexes.

The process of desensitization, which is an intrinsic property of the majority of ionotropic neurotransmitter receptors, is reflected on the macroscopic current by a decline in amplitude during a maintained application of the agonist. This desensitization was slower in the oocytes injected with midbrain mRNA. Moreover, the rate of Gly-current onset was also slower in oocytes injected with midbrain mRNA. These divergences may be related to differences in receptor affinity for Gly and in the time that the channels remain open. The difference in the rate

of GlyR desensitization described here would predict that inhibitory synaptic currents would be faster for encephalon and brainstem than for midbrain neurons. These differences may play an important role in the transmission of signals in those central nervous system regions.

Another finding of particular interest is that the Gly-currents generated by the receptors expressed by the three types of mRNAs increased in amplitude during repeated Gly applications. The mechanism of this potentiation still remains to be determined, but, for example, it could involve protein kinase C, as occurs for the potentiation of Gly-currents in oocytes expressing the  $\alpha$ -subunits (22). The increase of the Gly-current may be relevant to the long-term potentiation induced by Gly observed in a midbrain nucleus, the superior colliculus (23). The mechanism of the increase in Gly-current amplitude caused by high  $\text{Ca}^{2+}$  may be the presence of a diffusible  $\text{Ca}^{2+}$ -binding cytoplasmic factor that modulates the GlyR channel gating, or the binding to a site similar to that for zinc in the extracellular N-terminal region of the human GlyR  $\alpha 1$ -subunit (24, 25).

The differences in the  $\text{IC}_{50}$  of strychnine for GlyRs expressed by the three mRNAs could be related to the expression level or the density of receptors (26), because midbrain and brainstem had similar  $\text{IC}_{50}$  values and levels of expression when compared with encephalon mRNA-injected oocytes.

The roles played by GlyRs in cell-cell communication in the developing brain are still unknown. However, GlyRs may participate in neuronal differentiation by modulating intracellular

calcium dynamics (27), and endogenous Gly could activate other receptors such as the GABA  $\rho 1$  (28). During development, the activation of GABA $\Lambda$  receptors by their specific agonist (GABA) or by Gly depolarizes young cortical neurons and leads to rises in intracellular free calcium concentration via voltage-gated calcium channels (29). Moreover, the development of neuronal structure and function has also been linked to glycinergic inhibition in the lateral superior olive (30, 31). It is clear that more studies are necessary to clarify these issues.

In summary, the differences in the magnitude of Gly-currents expressed, the degree of desensitization, the modulation of GlyRs by  $\text{Ca}^{2+}$ , and the effects of strychnine are probably a reflection of a distinct subunit composition of the receptors in the different areas. The diversity of GlyR subunits present in these regions reflects the GlyR genes transcribed in the brain areas at this stage of development. It is notable that mRNA encoding the GlyR  $\alpha 1$ -subunit was present in the three embryonic areas studied here; other studies propose that the  $\alpha 2$ -subunit is a fetal form, whereas the  $\alpha 1$ -subunit is an adult form (9).

We are very grateful to M. Sc. Marina González-Herrera for help with the RNA extraction, Elizabeth Vázquez Gómez for the care of animals, and Dr. Nick Spitzer and Dr. Fabrizio Eusebi for helpful discussion of the manuscript. This work was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (G25775N), and from the National Science Foundation (Neural and Glial Mechanisms, Grant 9982856).

1. Betz, H., Kuhse, J., Schmieden, V., Laube, B., Kirsch, J. & Harvey, R. J. (1999) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **868**, 667–676.
2. Bormann, I. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 16–19.
3. Mehta, A. K. & Ticku, M. K. (1999) *Brain Res. Rev.* **29**, 196–217.
4. Diamond, J. & Miledi, R. (1962) *J. Physiol. (London)* **162**, 393–408.
5. Lukas, R. J., Changeux, J.-P., Le Novère, N., Albuquerque, E. X., Balfour, D. J. K., Kerg, D. K., Bertrand, D., Chiappinelli, V. A., Clarke, P. B., Collins, A. C., et al. (1999) *Pharmacol. Rev.* **51**, 397–401.
6. Carpenter, M. K., Parker, I. & Miledi, R. (1988) *Proc. R. Soc. London Ser. B* **234**, 159–170.
7. Akagi, H. & Miledi, R. (1988) *Science* **242**, 270–273.
8. Malosio, M. L., Marquize-Pouey, B., Kuhse, J. & Betz, H. (1991) *EMBO J.* **10**, 2401–2409.
9. Takahashi, T., Momiyama, A., Hirai, K., Hishinuma, F. & Akagi, H. (1992) *Neuron* **9**, 1155–1161.
10. Laurie, D. J., Wisden, W. & Seeburg, P. H. (1992) *J. Neurosci.* **12**, 4151–4172.
11. Altman, J. & Bayer, S. A. (1995) in *Atlas of Prenatal Rat Brain Development* (CRC, Boca Raton, FL), pp. 389–445.
12. Sumikawa, K., Parker, I. & Miledi, R. (1989) *Methods Neurosci.* **1**, 30–44.
13. Miledi, R. (1982) *Proc. R. Soc. London Ser. B* **215**, 491–497.
14. Miledi, R. & Woodward, R. M. (1989) *J. Physiol. (London)* **416**, 601–621.
15. Zubay, G. (1998) in *Biochemistry* (WCB McGraw-Hill, Dubuque, IA) 4th Ed., pp. 220–221.
16. Gundersen, C. B., Miledi, R. & Parker, I. (1984) *Proc. R. Soc. London Ser. B* **221**, 235–244.
17. Gundersen, C. B., Miledi, R. & Parker, I. (1986) *J. Physiol. (London)* **377**, 40.
18. Kusano, K., Miledi, R. & Stinnakre, J. (1982) *J. Physiol. (London)* **328**, 143–170.
19. Parker, I., Sumikawa, K. & Miledi, R. (1985) *Proc. R. Soc. London Ser. B* **225**, 99–106.
20. Morales, A., Nguyen, Q. & Miledi, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3097–3101.
21. Baev, K., Rusin, K. & Safronov, V. (1992) *Neuroscience* **46**, 931–941.
22. Mascia, M. P., Wick, M. J., Martinez, L. D. & Harris, A. (1998) *Br. J. Pharmacol.* **125**, 263–270.
23. Platt, B., Bate, J. R., Von Linstow Roloff, E. & Withington, D. J. (1998) *Br. J. Pharmacol.* **125**, 293–300.
24. Bregestovski, P. (2000) in *Synaptic Transmission 100 Years After L. Luciani*, (Casa Editrice Scientifica Internazionale, Italy), pp. 21–24.
25. Laube, B., Kuhse, J. & Betz, H. (2000) *J. Physiol. (London)* **522**, 215–230.
26. Taleb, O. & Betz, H. (1994) *EMBO J.* **13**, 1318–1324.
27. Lo, Y., Rao, S. C. & Sanes, D. H. (1998) *Neuroscience* **83**, 1075–1084.
28. Calvo, D. & Miledi, R. (1995) *NeuroReport* **6**, 1118–1120.
29. Obrietan, K. & Van den Pol, A. (1995) *J. Neurosci.* **15**, 5065–5077.
30. Aporte, J. E., Kotak, V. C. & Sanes, D. H. (1996) *Auditory Neurosci.* **2**, 235–240.
31. Sanes, D. H. & Hafidi, A. (1996) *J. Neurobiol.* **31**, 503–511.