



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS
SUBUNIDADES ALFA DEL RECEPTOR
POSTSINÁPTICO DE LA GLICINA EN LA
RETINA Y MÉDULA ESPINAL DE LA RATA,
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
DIABETES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ELIZABETH MORALES CALIXTO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1.Datos del alumno

Morales

Calixto

Elizabeth

55671998

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de ciencias

Biología

308006706

2.Datos del tutor

Dra.

Rocío

Salceda

Sacanelles

3.Datos del sinodal 1

Dra.

Sara Luz

Morales

Lázaro

4.Datos del sinodal 2

Dr.

Miguel Ángel

Velázquez

Flores

5.Datos del sinodal 3

Dra.

Alette

Ortega

Gómez

6.Datos del sinodal 4

Dra.

Rocío

Alcántara

Hernández

Datos del trabajo escrito

Niveles de expresión de las subunidades α del receptor postsináptico de la glicina en la retina y médula espinal de la rata, en un modelo experimental de diabetes.

54 pp.

2017

Agradecimientos.

Agradezco de forma especial a la Dra. Rocío Salceda, por el interés y la disponibilidad para la realización de esta tesis, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

Agradezco a mis sinodales:

- Dra. Sara Luz Morales Lázaro.
- Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores.
- Dra. Alette Ortega Gómez.
- Dra. Rocío Alcántara Hernández.

Por su tiempo para la revisión y comentarios sobre este trabajo.

Agradezco de forma especial al Biól. Gustavo Sánchez-Chávez, por la asistencia y asesoría técnica proporcionada durante la realización de este trabajo.

Agradezco al personal de las unidades Biología Molecular, Bioterio y Vivario del Instituto de Fisiología Celular, por su apoyo en la realización experimental del trabajo.

Índice:

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. El receptor de glicina.....	4
2. Subunidades del receptor de glicina.....	6
2.1 RGly- α 1.....	6
2.2 RGly- α 2.....	7
2.3 RGly- α 3.....	8
2.4 RGly- α 4.....	8
2.5 RGly- β	8
3. Sitio de unión de agonistas del receptor de glicina.....	8
4. Modulación del receptor de glicina.....	9
4.1.1 Etanol.....	10
4.1.2 Neuroesteroides.....	10
4.1.3 Zn ²⁺	11
4.1.4 Fosforilación del RGly.....	11
4.1.5 Prostaglandina.....	12
5. Alteraciones en la expresión y función del receptor de glicina.....	13
5.1 Síndromes del sobresalto murino.....	14
6. La médula espinal.....	14
6.1 Receptor de glicina en la médula espinal.....	17
6.2 Dolor Neuropático.....	19
7. La retina.....	20
7.1 Receptor de glicina en la retina.....	21
8. Diabetes.....	22
9. Retinopatía diabética.....	23
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO.....	24
MÉTODOS.....	25
1. Inducción de diabetes.....	25

2. Obtención de muestras electroforesis	25
3. Inmunodetección por medio de Western Blot.....	26
4. Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS.....	27
1. Niveles de expresión de las subunidades α (1-3) del RGly en la médula espinal de la rata.....	27
2. Niveles de expresión de las subunidades α (1-4) del RGly en la retina de la rata	31
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	40

ABREVIATURAS

A288: alanina 288
CCG: capa de células ganglionares
CNE: capa nuclear externa
CNI: capa nuclear interna
CPE: capa plexiforme externa
CPI: capa plexiforme interna
COOH: carboxilo terminal
DM: diabetes mellitus
DNP: dolor neuropático
ERG: electroretinograma
GABA: ácido γ -aminobutírico
H311: histidina 311
I285: isoleucina 285
I408: isoleucina 408
K389: lisina 389
M227: metionina 227
NH₂: amino terminal
RNMDA: receptor de N-metil-D-aspartato
PVDF: membrana de fluoruro de polivinilideno
RD: retinopatía diabética
RGly: receptor de glicina
S1: sobrenadante
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
STZ: estreptozotocina
TM1-TM4: segmentos transmembranales
T59: treonina 59
Y222: tirosina 222

Resumen

La retinopatía diabética y el dolor neuropático son algunas de las complicaciones, de la diabetes mellitus, dichos padecimientos pueden llevar a la ceguera y/o aumento en la sensibilidad al dolor o por el contrario a la desensibilización. La neurotransmisión inhibitoria modula la excitabilidad, por lo que alteraciones en la primera pueden llevar a cambios en la función general de las neuronas y los circuitos que establecen. El receptor de glicina media la transmisión glicinérgica inhibitoria en la médula espinal y la retina. El receptor de glicina está constituido por dos subunidades α (1-4) y tres subunidades β . Alteraciones en el funcionamiento/actividad de este receptor se conoce que llevan a diversas patologías.

En el presente trabajo, se estudió la expresión de las subunidades α (α 1-4) del receptor post sináptico de glicina, tanto en la región lumbar de la médula espinal como en la retina de la rata a tiempos cortos de inducida la diabetes (7, 20 y 45 días). En la médula espinal, el nivel de expresión de la subunidad α 1 disminuyó progresivamente durante la diabetes (7D: 25 ± 4.99 %; 20D: 24 ± 4.28 %; 40 ± 6.32 %), mientras que la subunidad α 3 aumentó significativamente (20D: 44 ± 6.21 ; 45D: 30 ± 3.9). En la retina de animales diabéticos, la subunidad α 1 presentó niveles similares a los del control, mientras que las subunidades α 2, α 3 y α 4 disminuyeron considerablemente (α 2:20D: 16 ± 4.53 %; 45D: 20 ± 3.64 %. α 3:45D: 34 ± 5.42 %. α 4:7D: 26.5 ± 2.25 %; 24.3 ± 6.3 %, 80 ± 4.57 %). En conjunto nuestros resultados sugieren que a tiempos cortos de hiperglucemia ocurren cambios en la neurotransmisión glicinérgica tanto en la médula espinal como en la retina, que pueden estar asociados con las alteraciones nociceptivas y visuales observadas en pacientes diabéticos.

Introducción

El receptor post sináptico de glicina (RGly) es un miembro de la familia de receptores de tipo cys-loop, que incluye: el receptor nicotínico de acetilcolina (RnACh), el receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃R), los receptores de GABA (ácido γ -aminobutírico) tipo A y C (GABA_AR y GABA_CR) y el receptor de Zinc (Lynch, 2004). La característica que define a los miembros de esta familia de receptores cys-loop, es la presencia de dos cisteínas altamente conservadas que forman un asa en la región amino terminal (NH₂) que contiene el sitio de unión a glicina; estos receptores están formados por cinco subunidades (Miyazawa et al., 2003) que forman un canal iónico por el que fluyen iones I⁻ > Br⁻ > Cl⁻ > bicarbonatos (Figura 1A) (Betz, 2006).

El RGly se identificó inicialmente en la médula espinal de la rata, en donde se han realizado la mayoría de los estudios (Laube B. et al., 2002); posteriormente se demostró su presencia en la retina (Haverkamp et al., 2003, 2004; Heinze et al., 2007; Sassoé-Pognetto et al., 1994) y algunas regiones del cerebro. La glicina es el ligando natural y la estriquina es el único antagonista demostrado. La estructura pentamérica del RGly se compone de dos tipos de subunidades, α y β ; se conocen 4 genes que codifican diferentes subunidades α y sólo uno para la subunidad β , que naturalmente forman receptores heterómicos, aunque la expresión de homómeros en ovocitos son funcionales (Griffon et al., 1999). En la médula espinal del adulto el RGly presenta una estequiometría de 3 β /2 α (Grudzinska et al., 2005) (Figura 1B).

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, caracterizada por el desbalance metabólico de la glucosa, que causa una elevación de los niveles de ésta en sangre. Dicha enfermedad favorece el desarrollo de complicaciones graves como la retinopatía diabética (RD) y el dolor neuropático (DNP) las cuales llevan finalmente a la ceguera y a alteraciones en la percepción al dolor, respectivamente (Harvey et al., 2004, Tesfaye et al., 2005). En pacientes y modelos animales con RD se han reportado cambios en la respuesta del electroretinograma (ERG), así como alteraciones en la sensibilidad al contraste y en la visión cromática, aunados a una

reducción en el grosor de las capas internas de la retina (Barber et al., 1998; Dasso et al., 1996; Shinoda et al., 2007; Sasaki et al., 2010). Debido a que el RGly modula la neurotransmisión excitatoria, alteraciones en su expresión pueden conducir a cambios en el proceso visual. En la médula espinal se ha reportado que los RGly $\alpha 3$ participan en la vía nociceptiva (Harvey et al., 2004; Zeilhofer 2005); por lo que nosotros decidimos estudiar si los niveles de expresión de las subunidades alfa se ven afectados a tiempos cortos de hiperglucemia.

1. El receptor de glicina.

Cada subunidad del RGly está formada por alrededor de 480 amino ácidos, presentan el dominio amino (NH_2) y carboxilo terminal (COOH) en la región extracelular y se componen de cuatro segmentos transmembranales de tipo α hélice (TM1-TM4) (Miyazawa et al., 2003) (Figura 1C). El dominio TM1 inicia en el residuo Y222 y termina en el M246. En la región amino terminal del segmento TM1, se localiza el sitio de unión del ligando (glicina) y los residuos de cisteína que forman el asa cys-cys que lo caracterizan (Leite et al., 2002, Lynch, 2004). El dominio TM2 comprende del residuo R252 al V280; los segmentos TM2 de cada subunidad interactúan entre sí y constituyen el poro del canal. (Miyazawa et al., 2003). El dominio TM3 inicia en el residuo I285 y termina en el H311. El dominio TM4 comprende del residuo K385 al V418 (Miyazawa et al., 2003). Los segmentos TM1, TM3 y TM4 rodean al segmento TM2 y proporcionan una barrera entre el poro hidrofílico y la membrana hidrofóbica. El asa intracelular que conecta a los segmentos TM3-TM4 presenta diversos sitios de fosforilación, ubiquitinación e interacciones proteína-proteína que determinan su localización celular, desensibilización y degradación (Ruiz-Gómez et al., 1991; Vaelle et al., 1994; Büttner et al., 2001; Cascio et al., 2001).

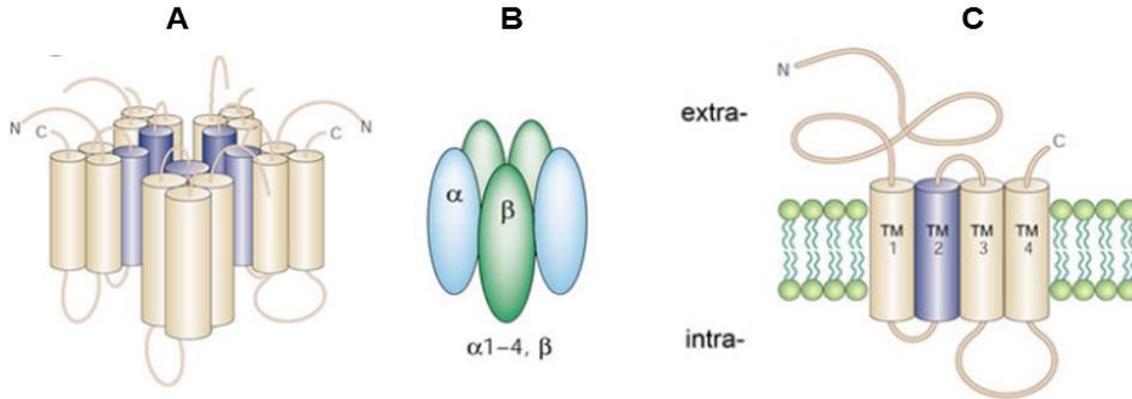


Figura 1. Diagrama del Receptor de glicina. A. Organización pentamérica del canal iónico B. Receptor heteromérico $2\alpha/3$. C. Cada subunidad está compuesta por cuatro segmentos transmembranales (TM1-TM4), con sus dominios NH_2 y COOH en la parte extracelular. (Moss y Smart, 2001).

El receptor de glicina fue aislado de la médula espinal de la rata usando cromatografía de afinidad y alta selectividad del receptor por su antagonista estriquina. Tres proteínas con pesos moleculares de 48, 58, y 93 kDa fueron detectadas (Pfeiffer et al., 1982); las primeras dos fueron identificadas como las subunidades α y β . Subsecuentes experimentos demostraron que la proteína de 93 kDa, llamada gefirina, se une a la subunidad β y tiene gran afinidad por la tubulina, importante en el anclaje a la membrana, asimismo se demostró que la gefirina no es específica para el RGly, ya que también se une al receptor de GABA (Kirsch, et al., 1991).

Se han identificado cuatro genes que codifican para distintas subunidades α (α_1 - α_4) y solo uno para la subunidad β (Matzenbac, et al., 1994). Los genes de la subunidad alfa son homólogos, con un 80-90% de identidad, mientras que la subunidad beta tiene una semejanza del 47% con las subunidades alfa (Grenningloh, et al., 1990). Las subunidades α pueden formar receptores homoméricos los cuales presentan cinco sitios de unión a glicina y heterómeros con tres sitios de unión a ésta (Velázquez-Flores, 2012), mientras que la subunidad β es incapaz de formar receptores funcionales de tipo homomérico (Bormann et al., 1994); encontrándose en la mayoría de los RGlys una estequiometría de $2\alpha/3\beta$ (Grudzinska et al., 2005).

El RGly se localiza principalmente en la médula espinal, tallo cerebral, retina y algunas regiones del cerebro (Lynch, 2004). En la médula espinal su distribución es relativamente difusa a través de la materia gris; en el tallo cerebral se localiza en los núcleos trigémino, accumbens, gracile, hipogloso, motor, reticular y coclear; en el cerebro, en regiones como el hipocampo y corteza prefrontal; en la retina de mamíferos se distribuye principalmente en la capa sináptica interna (Lynch, 2004; Pourcho 1996; Probst et al., 1986). Las funciones del sistema glicinérgico son controlar la actividad motora y el proceso de información sensorial (Maleeva et al., 2015). La función del RGly depende de su localización en el sistema nervioso y la composición de sus subunidades (Legendre et al., 2001; Lynch, 2004).

En neuronas maduras la activación del RGly facilita la entrada de iones cloruro hacia el citoplasma, provocando la hiperpolarización de la membrana postsináptica, y de este modo reduce el disparo neuronal (Lynch, 2004). En neuronas motoras en estado embrionario en donde las concentraciones intracelulares de cloruro son elevadas, la activación del RGly genera una despolarización (Kneussel et al., 2000). La despolarización inducida por glicina puede conducir a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje e incrementar las concentraciones de calcio intracelular, desencadenando cascadas de señalización relacionadas con procesos de desarrollo (Kirsch et al., 1998).

2. Subunidades del receptor de glicina.

2.1 RGly- α 1.

La subunidad RGly α 1 es la subunidad predominante en el SNC (Grenningloh et al., 1987), forma canales heteroméricos α 1/ β y es la más estudiada por su relación con mutaciones en el gen que la codifica: *Gla1* que causan distintas enfermedades. Los RGlys formados por la subunidad α 1 tienen tiempos cortos de apertura y una cinética rápida de decaimiento. Relacionada con esto Takahashi et al. (1992) demostraron que el tiempo de apertura y decaimiento de las corrientes postsinápticas inhibitorias de glicina, registradas en la médula espinal, son más

sostenidas en RGly embrionarios ($\alpha 2$) que en receptores $\alpha 1/\beta$ (adultos) (Dutertre et al., 2012). En la rata, la expresión de esta subunidad en la médula espinal es detectable a partir del día 15 embrionario, y alcanza su máxima expresión alrededor del día postnatal 15 (Lynch, 2004). La subunidad $\alpha 1$ presenta una variante α^{ins} , la cual es el resultado de un “splicing” proceso alternativo, que contiene una inserción de ocho aminoácidos en el asa intracelular entre los dominios TM3-TM4; el primer residuo de esta inserción presenta un posible sitio de fosforilación por la proteína cinasa A (PKA) (Malosio et al., 1990).

2.2 RGly- $\alpha 2$.

La subunidad $\alpha 2$, se expresa en estado embrionario y neonatal, puede formar receptores homoméricos; presenta corrientes con tiempos de apertura prolongado y una cinética lenta de decaimiento. Estos receptores parecen regular la transmisión extrasináptica, en respuesta a la liberación de glicina o taurina durante el desarrollo (Clements et al., 2002; Legendre, 2001). En ratas, en etapas postnatales ocurre un remplazo de la subunidad $\alpha 2$ por la $\alpha 1$, generando un cambio en el tiempo de apertura y decaimiento de las corrientes postsinápticas inhibitorias de glicina. Estos resultados indican que los potenciales postsinápticos de glicina son despolarizantes y sostenidos en las ratas neonatas y se vuelven hiperpolarizantes y rápidos en el adulto (Araki et al., 1988; Dutertre et al., 2012)

La subunidad $\alpha 2$ presenta dos variantes que resultan de un procesamiento alternativo, $\alpha 2A$ y $\alpha 2B$. La isoforma $\alpha 2A$ es mayormente expresada durante el desarrollo, mientras que la $\alpha 2B$ está presente en el adulto. La variante $\alpha 2B$ difiere de $\alpha 2A$ por la sustitución de los aminoácidos V58I y T59A (Kuhse, et al., 1991). Otra versión de la subunidad $\alpha 2$, es la $\alpha 2^*$, que presenta la sustitución del aminoácido G167E y le confiere insensibilidad a la esticnina (posee una IC_{50} para esticnina de 500~ veces mayor que aquella que presentan las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Kuhse, et al., 1990).

2.3 RGly- α 3.

Aunque la distribución de la subunidad α 3 es limitada, ésta se expresa en la capa plexiforme interna de la retina y en sinapsis inhibitoras de neuronas nociceptivas en las láminas I y III del asta dorsal de la médula espinal, primer sitio de integración sináptica en la vía del dolor, por lo que esta subunidad ha emergido como un blanco terapéutico para la analgesia (Dutertre et al., 2012; Zeilhofer., 2005).

En humanos se caracterizaron transcritos de la subunidad α 3, llamados α 3K y α 3L; la variante α 3K carece de un segmento de 15 aminoácidos en el asa intracelular entre los segmentos TM3-TM4 (Nikolic, et al., 1998).

2.4 RGly- α 4.

La subunidad α 4 es la menos estudiada; se obtuvo por clonación, en la retina del ratón y su expresión se demostró en la capa plexiforme interna (Matzenbach et al., 1994; Heinze et al., 2007). Posteriormente se reportó en bajos niveles en la médula espinal, ganglios periféricos y órganos genitales del embrión de pollo (Dutertre et al., 2012; Harvey et al., 2000; Wässle, et al., 2009)

2.5 RGly- β

La subunidad β se asocia a la subunidad α 1, formando el sitio de unión a la glicina y es requerida para el anclaje del RGly en la región post sináptica, por medio de su unión a la gafirina (Betz et al., 2006; Grenningloh et al., 1990; Grudzinska et al., 2005).

3. Sitio de unión de agonistas del receptor de glicina.

Tanto los receptores nativos (α 1/ β , α 3/ β) como recombinantes son activados por distintos aminoácidos que poseen diferente afinidad por el sitio de unión, con el siguiente orden de potencia: glicina > β -alanina > taurina > GABA (Lynch, 2004). La estrocnina es a la fecha el único antagonista del RGly, ésta es un alcaloide extraído de la planta *Strychos nuxvomica* que es ampliamente usado en el estudio del RGly, debido a su alta afinidad por éste (kD 50nM) (Borde et al., 1981; Velázquez-Flores y Salceda, 2011; Young et al., 1973;).

Se sabe que los agonistas y el antagonista se unen en el dominio extracelular, en la interface de las subunidades α y β (Figura 2) (Laube et al., 1997). Diversos residuos altamente conservados en ambas subunidades están involucrados en la unión del ligando, específicamente dos argininas homólogas (α^{Arg65} , β^{Arg86}) localizadas en la interface (-), establecen interacciones iónicas fuertes con el grupo α -carboxilo de la glicina, mientras que residuos ácidos localizados en la interface (+) (α^{Glu157} , β^{Glu180}) interaccionan con el grupo α -amino (Figura 3) (Betz et al., 2006; Velázquez-Flores y Salceda, 2012).

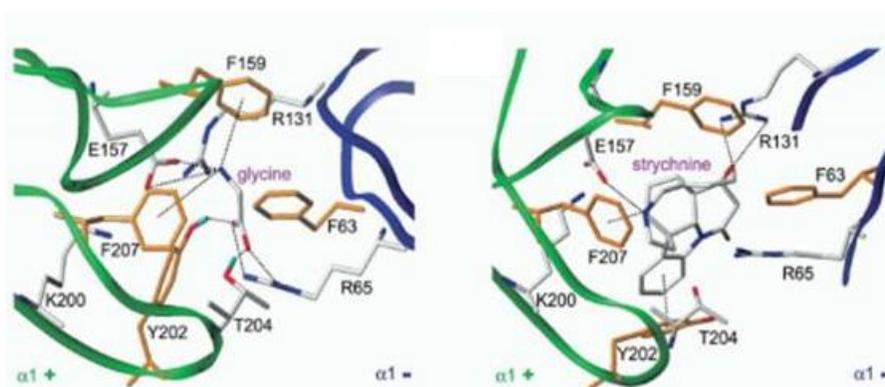


Figura 2. Modelo de unión de la glicina a la interface de las subunidades α y β adyacentes. El grupo α -carboxilo de la glicina es ligado por la carga positiva a $\alpha 1$ R65 en el sitio (-) generando puentes de hidrogeno con $\alpha 1$ T204 y $\alpha 1$ Y202 en el sitio (+) de la interface. En el sitio (+) el grupo amino es estabilizado por el grupo carboxilo y de $\alpha 1$ E157. La subunidad $\alpha 1$ es ilustrada como un fragmento (sitio + verde; sitio - azul). Los residuos claves son destacados como segmentos grises, átomos de carbono; rojos, átomos de oxígeno y azules, átomos de hidrógeno (Grudzinska et al., 2005).

4. Modulación del Receptor de Glicina.

Diversas moléculas pueden modular alostéricamente la función del receptor, tanto a nivel extracelular como intracelular (Figura 3) (Maleeva et al., 2014; Yevenes et al., 2011). La mayoría de estas moléculas no interaccionan directamente con los sitios de unión a glicina (Dutertre et al., 2012; Maleeva et al., 2014; Mukhtarov et al., 2005; Vaello et al., 1994).

4.1 Etanol.

El etanol, en bajas concentraciones (≤ 50 mM) potencia las corrientes de glicina por un incremento en la afinidad del RGly a su agonista (Aguayo et al., 1996; Crawford et al., 2007; Perkins et al., 2008). Experimentos realizados en motoneuronas del cerebro y en la médula espinal, han mostrado que el etanol incrementa la amplitud de las corrientes postsinápticas de glicina, sugiriendo que la modulación del RGly por el etanol podría estar relacionada con algunas de las alteraciones causadas por el etanol, en el control motor y ritmo respiratorio (Eggers y Berger, 2004; Gibson y Berger, 2000; Ziskind-Conhaim et al., 2003). La modulación de las corrientes de glicina ocurre por una interacción en sitios específicos de los segmentos TM2 (residuo S267), TM3 (residuo A288) y TM4 (residuo I409, Y410 y K411) (Lobo et al., 2006; McCracken et al., 2010).

4.2 Neuroesteroides.

Los efectos antagonistas de la progesterona, su precursor pregnenolona (PREG) y el sulfato de pregnenolona (PREGS) se mostraron por primera vez en las corrientes de glicina en neuronas espinales cultivadas, causando una inhibición de las corrientes glicinérgicas (Masksay et al., 2001; Wu et al., 1997). En contraste, neuroesteroides sintéticos como la minaxolona y alfaxolona, mejoran significativamente las corrientes de receptores homoméricos RGly $\alpha 1$ (Ahrens et al., 2009; Weir et al., 2004). Experimentos realizados en neuronas de la asta dorsal de la médula espinal se ha visto que concentraciones micromolares de minaxolona, prolongan el tiempo de decaimiento de las corrientes postsinápticas inhibitorias de glicina (Mitchell et al., 2007).

4.3 Zn²⁺.

En varias regiones del cerebro y médula espinal de mamíferos, el catión divalente Zn²⁺ se encuentra almacenado en vesículas simpáticas, cuando este ion es liberado durante la neurotransmisión, puede alcanzar concentraciones mayores que 100 μM, este catión puede modular diferentes receptores, incluyendo al RGly (Birinyi et al., 2001; Frederickson y Bush, 2001; Trombley et al., 2011). El Zn²⁺ modula al RGly de manera bifásica; a bajas concentraciones (<10μM) potencia las corrientes inducidas por la glicina, mientras que la inhibición de éstas ocurre con altas concentraciones (>10 μM) (Laube et al., 2000). La potenciación es debido a un incremento de la afinidad del RGly por la glicina, mientras que la inhibición ocurre por una reducción de la afinidad del receptor por su agonista (Yeneves et al., 2011).

Los sitios de unión a Zn²⁺ que son asociados con la potenciación de las corrientes de glicina son localizados, en la cara exterior de la región NH₂ del RGly α, que comprende los aminoácidos D80, E192, D194, H215 Y T151 (Laube et al., 2000; McCrackenet al., 2013). Mientras que los aminoácidos asociados con el efecto inhibitorio son H107, H109, T112 y T133 (Miller et al., 2005).

En la mayoría de las proteínas el zinc se encuentra coordinado por átomos de nitrógenos, sulfuro u oxígeno a un lado de las cadenas con residuos de histidina, cisteína, ácido aspártico y ácido glutámico. Los sitios de unión a zinc son usualmente compuestos por dos a cuatro residuos (Auld, 2011).

4.4 Fosforilación del RGly.

La fosforilación de los receptores de glicina juega un papel importante en la modulación del funcionamiento de las sinapsis glicinérgicas. El asa intracelular que conecta los segmentos TM3 y TM4, incluye sitios específicos que interaccionan con proteínas cinasas (Ruiz-Gómez et al., 1991; Vaello et al., 1994). La fosforilación de la subunidad α del RGly por la PKA se demostró en ensayos in vitro (Vaello et al., 1994). Su activación incrementa las corrientes de glicina en la médula espinal, así como en ovocitos de *Xenopus* en los que se expresaron RGlys α (Song y Huang, 1900; Tapia et al., 1997; Vaello et al., 1994), mientras que en neuronas de la

sustancia negra la activación de esta cinasa disminuye las corrientes inducidas por glicina (Inomata et al., 1993). Agopyan et al. (1993) encontraron que la actividad de la PKA disminuye la probabilidad de apertura del receptor en neuronas aisladas del hipotálamo ventromedial, mientras que en neuronas del trigémino incrementa la probabilidad de apertura del canal (Song y Huang, 1900).

Por otro lado, el grupo de Ruiz-Gómez et al. (1991) reportó que la subunidad $\alpha 1$ del RGLyse se fosforila en la serina 391 en respuesta a la activación de la PKC. En neuronas del hipocamp (SchÖnrock et al., 1995), neuronas corticales de la región sacra dorsal (Xu et al., 1996), así como neuronas aisladas de la sustancia negra (Nabekura et al., 1996), la activación de la PKC incrementa las corrientes producidas por glicina; mientras que está disminuye en neuronas de la médula espinal y en RGLys expresados en ovocitos de *Xenopus*.

En células aisladas de la retina de la salamandra, se observó que la activación de ambas PKA y PKC disminuye el tiempo de decaimiento de las corrientes de glicina (Han y Slaughter, 1998). Así mismo en la retina de rana la acción de estas cinasas redujo la unión específica de la [3 H] glicina y la [3 H] estricnina al RGLy (Salceda et al., 2005). Por otro lado, en la retina de la rata se demostró que activación de la PKA y PKC inducen la fosforilación del RGLy, lo que lleva a su internalización (Velázquez-Flores y Salceda, 2011). Respecto a esta modulación, existe controversia, por lo que se ha sugerido que este efecto puede deberse al tipo de subunidades alfa expresadas en los RGLys y/o bien a las isoformas de estas cinasas, presentes en las diferentes regiones cerebrales.

4.5 Prostaglandina.

En estudios realizados tanto en receptores nativos localizados en la médula espinal como RGLy- $\alpha 3$ recombinantes expresados en la línea celular HEK293, se demostró que la activación de la PKA, en respuesta a la prostaglandina E2 (PGE2) disminuye las corrientes producidas por glicina en un 45% (ver sección Dolor Neuropático) (Harvey et al., 2004) y la fosforilación del RGLy- $\alpha 3$.

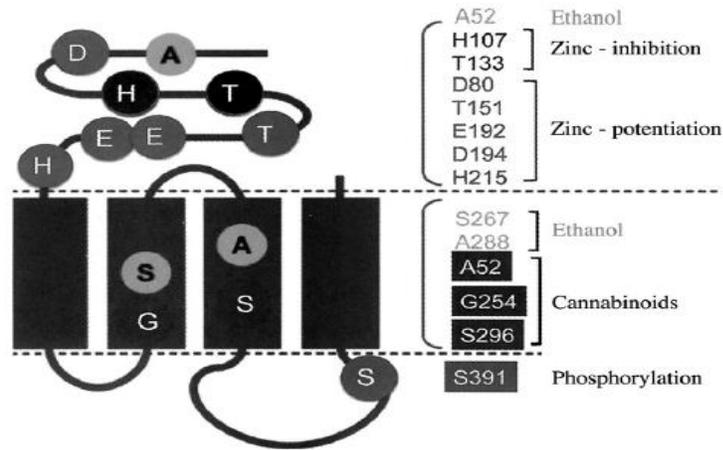


Figura 3. Modulación alostérica de una subunidad del RGly. Se muestran algunos ejemplos de los aminoácidos que participan en la interacción con los distintos moduladores alostericos del receptor. (Maleeva et al., 2014).

5. Alteraciones en la expresión y función del receptor de glicina .

Alteraciones en la expresión génica y función del RGly pueden afectar la neurotransmisión glicinérgica (Lynch, 2004). En humanos una de las enfermedades causada por mutaciones de la subunidades α_1 o β ; es la hiperplexia hereditaria o enfermedad del sobresalto, un raro trastorno neurológico caracterizado por una exagerada respuesta a estímulos inesperados (Rees et al., 2002). Las mutaciones causadas por la hiperplexia reducen la magnitud de las corrientes de glicina, incrementando el tiempo de desensibilización; ya sea por la reducción en la expresión de los RGlys, o por una disminución en la sensibilidad a la glicina (Bakker et al., 2006). Las alteraciones en la neurotransmisión glicinérgica incrementan los niveles de excitación en las motoneuronas de la médula espinal (Maleeva et al., 2014). Otra mutación relacionada con la hiperplexia es la que ocurre en el gen que codifica al transportador de glicina GlyT2 (SLC6A5), dicha mutación altera su localización subcelular, resultando en una disminución en su actividad de transportar glicina de la hendidura sináptica a la membrana presináptica (Ress et al., 1994).

Recientes estudios han implicado a la subunidad α_3 con desórdenes neurológicos como el autismo, demencia asociada al virus de la inmunodeficiencia adquirida

humana, epilepsia y esclerosis lateral amiotrófica (Betz et al., 2006; Gelman et al., 2004; Sobetzko et al., 2001).

5.1 Síndromes del sobresalto murino.

Los síntomas son muy similares a la hiperplexia en humanos; en el ratón, los síntomas se presentan alrededor del día posnatal 20, tiempo en que se da el remplazo del RGly $\alpha 2$ por RGly $\alpha 1/\beta$ (Lynch, 2004). El síndrome más caracterizado, es el del ratón espasmódico; un trastorno autosómico recesivo, en donde se han encontrado mutaciones en la subunidad $\alpha 1$ A52S, la cual genera una reducción moderada en la sensibilidad a la glicina (Ryan et al., 1994). Otra mutación que se ha reportado es la inserción de un elemento repetitivo Line-1 de 7.1 kb en el intrón 5 de la subunidad β , esto conduce a la formación de un “splicing” aberrante de la subunidad β , que tiene como resultado la acumulación de proteínas mal plegadas y como consecuencia una pérdida de la eficiencia de reclutamiento del RGly a la membrana postsináptica ((Kingsmore et al., 1994; Hartenstein et al., 1996); esto a su vez se relaciona con la reducción de las corrientes postsinápticas inhibitorias de glicina en neuronas motoras y sensoriales de la médula espinal de ratones espásticos (Graham et al., 2003; Von et al., 2003).

Una variante del síndrome espasmódico es el síndrome oscilador, la única forma letal de la enfermedad del sobresalto, éste síndrome es causado por una mutación en los segmentos transmembranales TM3-TM4 de la subunidad $\alpha 1$ del Rgly. Los ratones oscilador, después de la segunda semana postnatal desarrollan rigidez muscular y temblor, respuestas exageradas de sobresalto y posteriormente mueren (Buckwalter et al., 1994).

6. La médula espinal.

La médula espinal forma parte del Sistema Nervioso Central, se encuentra localizada dentro del conducto vertebral. De acuerdo a su localización rostro-caudal la médula espinal puede ser dividida en cuatro partes: cervical, torácica, lumbar y sacra (Figura 4A-B) (Nógradi et al., 2006). Funcionalmente se divide en dorsal y ventral que corresponden a las zonas sensoriales y motoras respectivamente

(Figura 5). En un corte transversal la médula espinal presenta una zona central llamada sustancia gris que contiene los somas de las neuronas y la zona periférica o blanca contiene principalmente los axones y células gliales. El asta dorsal contiene neuronas sensoriales que reciben información de la periferia, mientras que el asta ventral contiene los núcleos motores que inervan músculos y tejidos específicos (Purves, 2007). La forma y cantidad de sustancia gris varía a diferentes niveles de la médula espinal. Un corte transversal de la sustancia gris de la médula muestra un número de 10 láminas (Capas de células nerviosas) denominadas láminas de Rexed (Waxman, 2011).

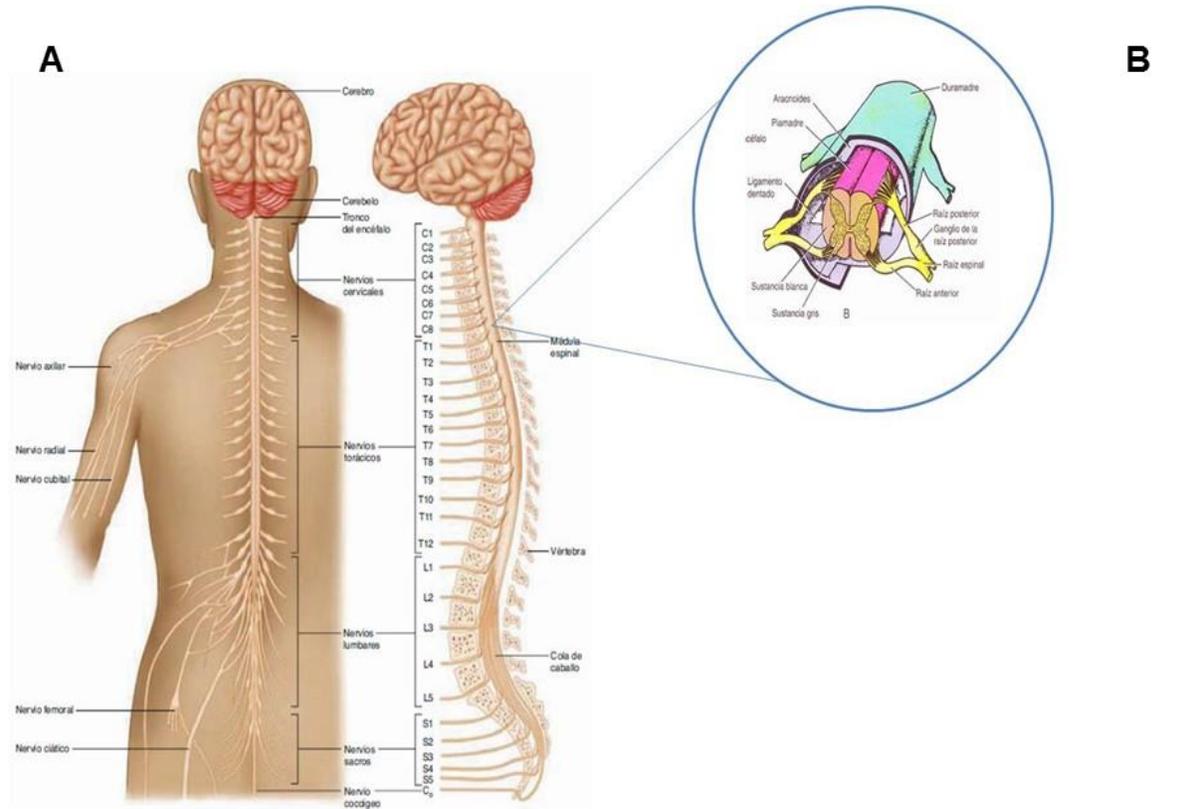


Figura 4. Médula espinal. A. A lo largo de toda la médula se encuentran 31 pares de nervios espinales unidos por las raíces anteriores o motoras y las raíces posteriores o sensitivas. Cada raíz está unida a la médula por una serie de raicillas, que se extiende en toda la longitud del segmento medular. C. nervios cervicales; T. nervios torácicos; L. nervios lumbares; S. nervios sacros. Co. Nervio coccígeo. B. Segmento de la médula espinal que muestran las cubiertas de la duramadre, aracnoides y piamadre (Modificado de Stanfield, 2011).

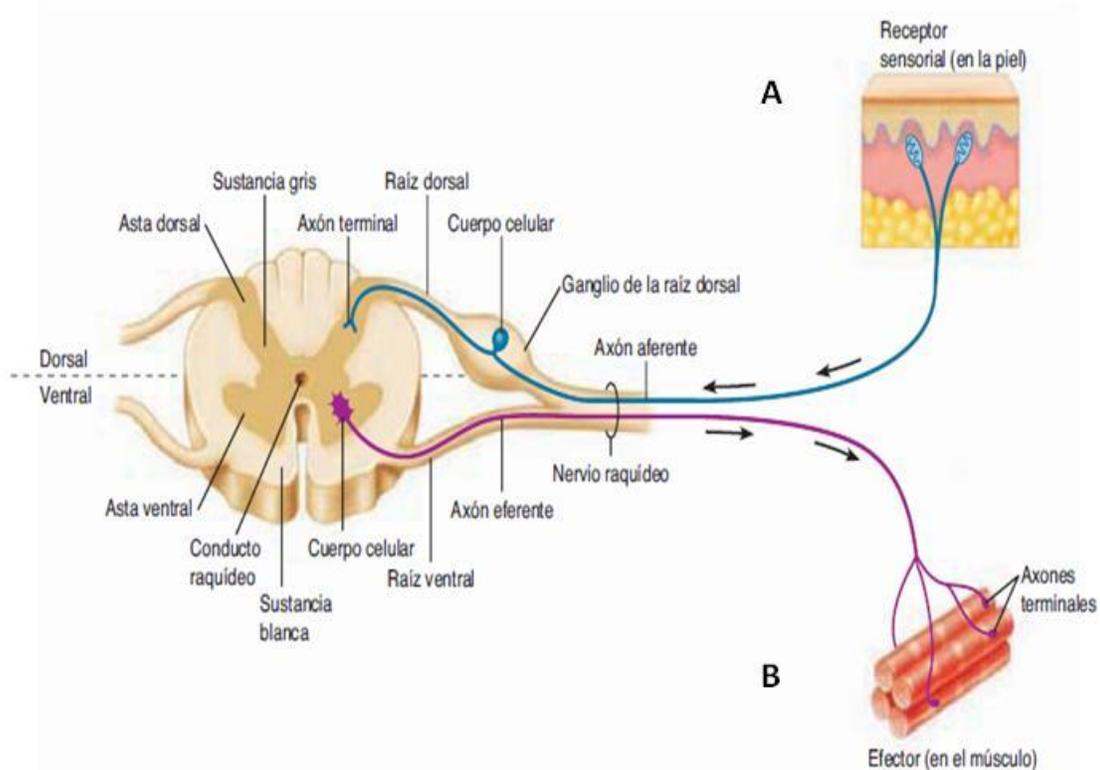


Figura 5. Sustancia gris de la médula espinal. Sección transversal de la médula espinal. A En azul vía ascendente. B en morado vía descendentes. (Tomado de Stanfield, 2011).

La sustancia blanca está constituida por vías longitudinales de axones mielínicos que forman las vías ascendentes, a través de las cuales la información sensitiva llega al encéfalo, y las vías descendentes son portadoras de las órdenes motoras (Figura 5 B) (Nógradie et al., 2006). Cuando las neuronas aferentes son activadas por un estímulo que actúa sobre un receptor sensorial, los potenciales de acción viajan a lo largo de la fibra nerviosa desde el receptor sensorial hasta el axón terminal, normalmente en la asta dorsal de la médula espinal (Figura 5 A). El axón terminal libera un neurotransmisor que transmite la señal a las neuronas de la vía ascendente que llevan la información al encéfalo de modo que tenga lugar la percepción del estímulo; estas vías se modulan por interneuronas inhibitorias.

Las señales del encéfalo viajan a lo largo de las vías descendentes hasta las neuronas eferentes situadas en el asta ventral. Por ejemplo, las vías piramidales, ambas se originan en la corteza motora primaria. Los axones de las neuronas de

estas vías terminan en el asta ventral de la médula espinal; algunas establecen sinapsis directamente con las motoneuronas, mientras que otras forman sinapsis con interneuronas. Algunas vías descendentes modulan la información sensorial; por ejemplo, el organismo tiene sistemas de alivio del dolor (analgésicos) que bloquean la percepción del dolor durante períodos de estrés. Estos sistemas bloquean la transmisión sináptica entre una neurona aferente de transmisión del dolor y las interneuronas de la médula espinal. Al bloquear la transmisión de la información del dolor al encéfalo, se evita la percepción de un estímulo doloroso.

6.1 Receptor de glicina en la médula espinal.

Existe abundante evidencia de la existencia de sinapsis glicinérgicas en las vías motora y sensorial (dolor) de la médula espinal (Taal et al., 1994). Las neuronas inhibitoras del asta dorsal de la médula usan como neurotransmisores inhibidores al GABA y a la glicina (Figura 6) (Todd et al., 1996). Se sabe que los circuitos glicinérgicos se encuentran distribuidos en el asta dorsal; (Figura 7) la subunidad $\alpha 1$ se localiza ampliamente en todas las capas celulares, mientras que la subunidad $\alpha 3$ en las capas superficiales I y III, en donde regula la vía nociceptiva. (Harvey et al., 2004; Zeilhofer, 2005) (Figura 8).

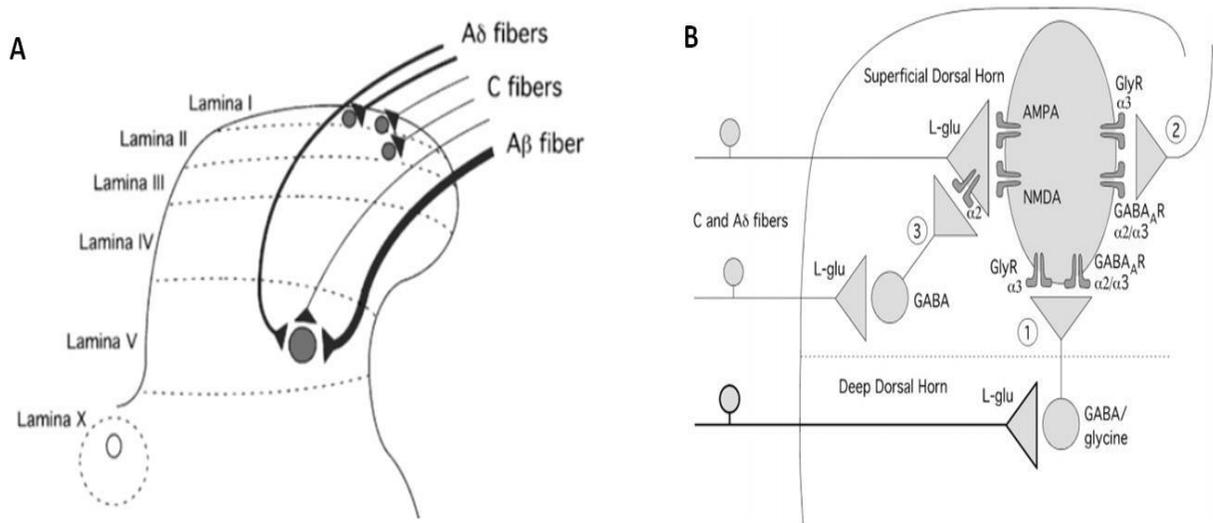


Figura 6. A. Inervación del asta dorsal de la médula espinal, por nervios aferentes primarios. B. Circuito inhibitor en el asta dorsal de la médula espinal, muchas de esas neuronas liberan GABA y glicina simultáneamente, pero la inhibición sináptica rápida parece ser mediada por la activación de receptores de glicina (Modificado de Zeilhofer, 2005; Zeilhofer et al., 2008)

El asta dorsal de la médula espinal es el primer sitio de integración sináptica en la vía del dolor, en donde la neurotransmisión inhibitoria tienen un papel importante, ya que atenúa los estímulos nociceptivos, en ausencia de un estímulo nocivo previene la actividad espontánea de las neuronas y limita la propagación espacial de los estímulos sensoriales (Todd, 2015).

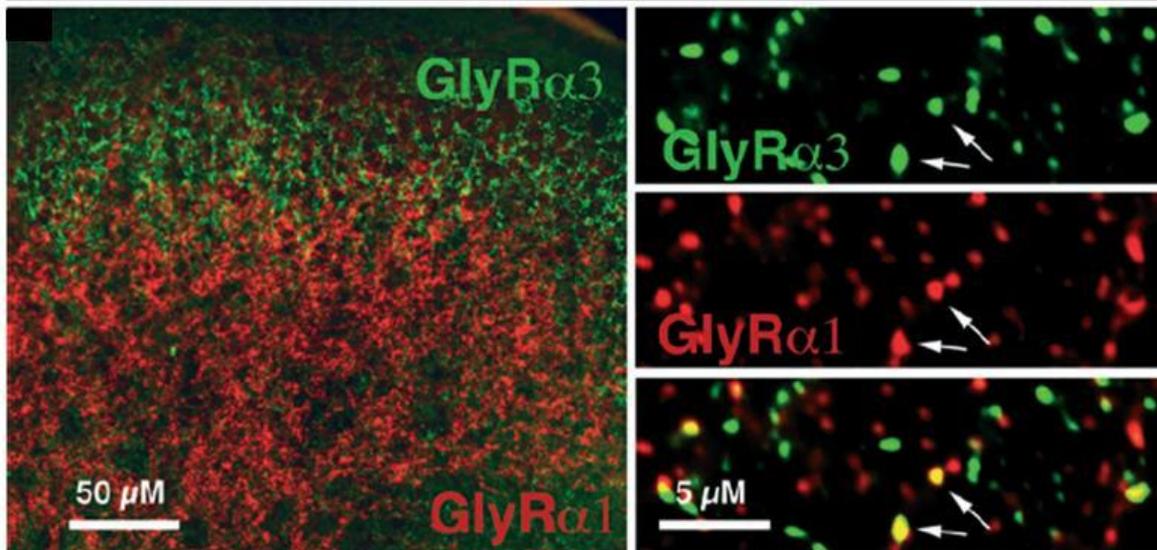


Figura 7. Expresión de las subunidades α del RGly en la médula espinal. Izquierda, micrografía de fluorescencia, tomada de una sección del asta dorsal de la médula espinal torácica. Detección de las subunidades $\alpha 1$ (rojo) y $\alpha 3$ (verde) del RGly. Derecha, imagen de superposición, muestra pocas sinapsis de RGly $\alpha 1$ que colocalizan con RGly $\alpha 3$ (puntos de color amarillo) (Tomado de Betz et al., 2006).

6.2 Dolor neuropático.

El dolor neuropático puede ocurrir por lesiones mecánicas o patologías del sistema nervioso periférico (SNP) o sistema nervioso central (SNC), como consecuencia de padecimientos como la isquemia, diabetes, infecciones nerviosas (p.ej. VIH y herpes), etc. Estos tipos de dolor son causados por una disfunción neuronal, los cuales están asociados con procesos de inflamación y daños en los nervios (Harvey LH. et al., 2009).

El daño tisular favorece la liberación de múltiples factores endógenos pro-inflamatorios tanto en el SNP como en el SNC (principalmente a nivel de la médula espinal). La liberación periférica de prostaglandina E₂ (PGE₂) conduce a la sensibilización de las fibras aferentes primarias, lo que reduce los umbrales neuronales e incrementa la respuesta nociceptiva. Este incremento de la actividad periférica contribuye a la hipersensibilidad de la médula espinal (sensibilización central) resultando en un incremento en la capacidad de respuesta a estímulos nociceptivos, llamadas hiperalgesia y alodinia, la primera se caracteriza por la respuesta aumentada de un estímulo doloroso, mientras que la segunda es un dolor generado por estímulos que generalmente no son nocivos. A nivel del SNC, la liberación de prostanoideos puede inducir la desinhibición de la médula espinal. Se ha visto que un mecanismo de desinhibición espinal ocurre a través de la activación post sináptica de los receptores de la prostaglandina E₂ (RPGE₂) de tipo EP2 que induce la activación de la PKA y la fosforilación de la serina 346 de la subunidad RGly α3, localizada en el asa intracelular que conecta los segmentos TM3 y TM4. Lo que genera una disminución en la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias de glicina (Ahmadi et al., 2002; Harvery et al., 2004; Reinold et al., 2005).

La diabetes se asocia a procesos de inflamación y dolor neuropático. En modelos animales, a tiempos cortos de inducida la diabetes, se han demostrado cambios en los niveles de liberación de glicina (fluctuaciones) en la médula espinal; esto es paralelo a una mayor sensibilidad al dolor. Estos resultados sugieren una disminución en la actividad glicinérgica (Chiu et al., 2016).

7. La retina.

La retina es un tejido que forma parte del SNC, constituye la capa más interna del ojo y su función es transducir las señales luminosas en señales eléctricas (fototransducción).

La retina está constituida por diversos tipos neuronales que se organizan en capas: capa nuclear externa (CNE), formada por los somas de los fotorreceptores (conos y bastones); capa nuclear interna (CNI), formada por los somas de células bipolares, horizontales y amacrinas; y la capa de células ganglionares (CCG), formada por los somas de las células ganglionares. La comunicación sináptica ocurre en las capas plexiforme externa (CPE) e interna (CPI) (Figura 8).

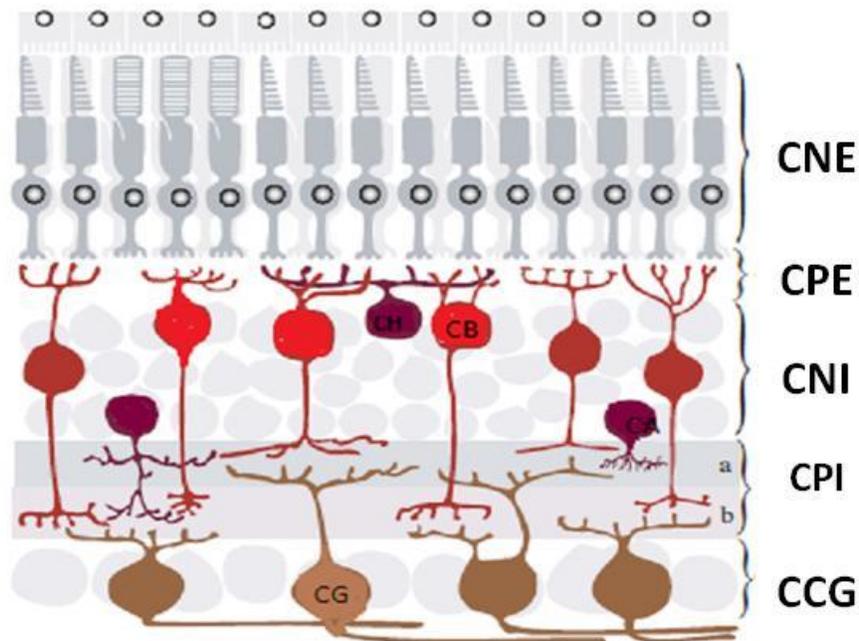


Figura 8. Estructura de la retina de los vertebrados. La retina está constituida por diversos tipos neuronales que se organizan en capas: capa nuclear externa (CNE); capa plexiforme externa CPE; capa nuclear interna (CNI); capa plexiforme interna CPI y la capa de células ganglionares (CCG). Las capas sinápticas corresponden a la capa plexiforme externa (CPE) y capa plexiforme interna CPI. CH células horizontales; CB células bipolares, CG células ganglionares (Modificado de Xu H. et al., 2004)

Existen dos vías de comunicación en la retina, la vía vertical y horizontal; en la primera los fotorreceptores establecen sinapsis en la CPE con las células bipolares, las cuales, a su vez hacen sinapsis en la CPI con las dendritas de las células amacrinas y ganglionares; por su parte los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico (Pérez León et al., 1997). En la vía horizontal, las células horizontales reciben el impulso de los fotorreceptores y lo transmiten a otro fotorreceptor adyacente y/o a una célula horizontal y/o bipolar. A nivel de la CPI, las prolongaciones de las células amacrinas se extienden y establecen contacto sináptico con otras células amacrinas, bipolares y con células ganglionares (Pérez León et al 1997; Pourcho, 1996). El glutamato es el neurotransmisor de la vía vertical de la retina, mientras GABA y glicina son neurotransmisores de la vía horizontal (Velázquez-Flores, 2011).

7.1 Receptor de glicina en la retina.

En los mamíferos, la acción de la glicina parece ser restringida a la retina interna, actuando en células ganglionares, amacrinas y bipolares (Stone y Pinto, 1992, 1993; Boos et al., 1993). En la retina, la acumulación de dicho aminoácido se concentra (50%) en las células amacrinas y en menor medida (10%) en las células bipolares denominadas de conos (Menger et al., 1998; Pourcho et al., 1985; Velázquez-Flores y Salceda 2012).

A diferencia de otras áreas del SNC, en la retina de los vertebrados se expresan todas las subunidad α (1-4) del RGly. Estudios inmunohistoquímicos demuestran que estas subunidades se distribuyen en diferentes estratos de la CPI y raramente se localizan en el mismo sitio post sináptico (Wässle et al., 2009). La subunidad $\alpha 1$ se distribuye predominantemente en células bipolares, células amacrinas de tipo II y ciertos subtipos de células ganglionares (Figura 9 A) (Lin et al., 2000). La subunidad $\alpha 2$ se distribuye ampliamente sobre la CPI y se localiza en células amacrinas y prácticamente en todas las ganglionares (Figura 9 B) (Haverkamp et al., 2004). Por su parte, la subunidad $\alpha 3$ se distribuye en toda la CPI (Figura 9 C).

Por último, la subunidad $\alpha 4$ se localiza en los estratos 3 y 4 de la CPI, de la retina del ratón (Figura 9 D) (Heinze, 2007).

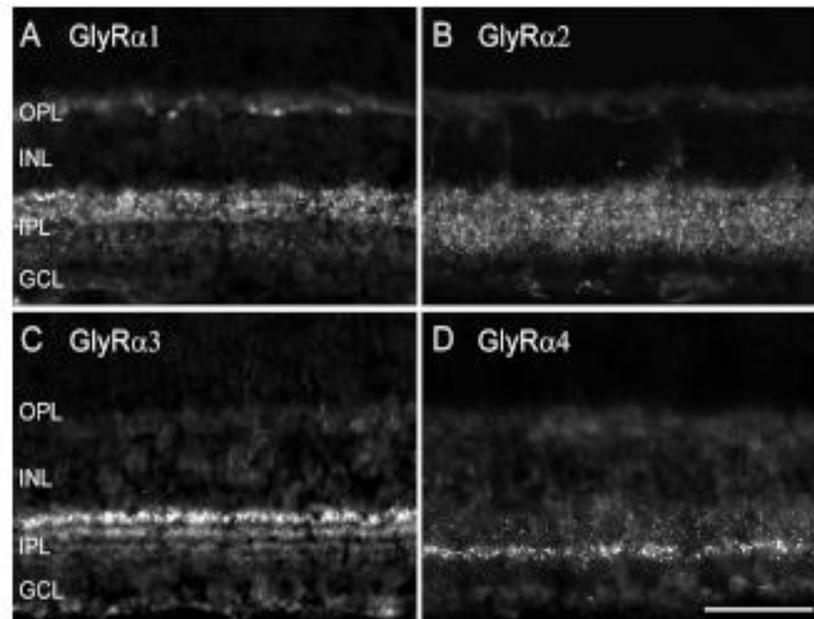


Figura 9. Diversidad de las subunidades del RGly en la retina de ratón. A. La subunidad RGly- $\alpha 1$ es más prominente en el exterior de la CPI. B. La subunidad RGly- $\alpha 2$ es igualmente distribuida alrededor de la CPI. C. La subunidad RGly- $\alpha 3$ se expresa en cuatro estratos de la CPI. D. La subunidad RGly $\alpha 4$ se encuentra en pequeñas bandas en el borde de los estratos 3 y 4 de la CPI. Barra de escala 50 μm . OPL, capa plexiforme externa; INL, capa nuclear interne; IPL, capa nuclear interna. (Tomado de Heinze et al., 2007).

8. Diabetes.

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por mantener elevados niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). Existen dos tipos de DM, la diabetes tipo 1 (insulinodependiente), causada por una deficiencia parcial o absoluta en la secreción de insulina por el páncreas, y la diabetes tipo 2 (no insulinodependiente), que se caracteriza por una resistencia a la insulina, es decir, los tejidos no responden adecuadamente a dicha hormona (Belle et al., 2011; Schuit et al., 2001). En ambos casos, la hiperglucemia conlleva a una variedad de complicaciones, las más características son la nefropatía, neuropatía y retinopatía

(OMS 2015). En estas enfermedades, la principal alteración es vascular y una variedad de efectos se han sugerido como los causantes de las mismas, entre están alteraciones metabólicas, activación de la PKC, activación de poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), acumulación de productos de glicación avanzada (AGEs) (Lancet, 2010) así como una sobre producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Browlee, 2001, Cheung et al., 2010).

9. Retinopatía Diabética.

La retinopatía diabética (RD) es considerada como una enfermedad neurodegenerativa y es una de las principales causas que conduce a la pérdida de la visión y ceguera, en adultos de entre 20 y 64 años que padecen DM (Cuncha-Vaz et al., 2014). Clínicamente, la RD se clasifica en dos tipos: RD proliferativa la cual se caracteriza por la neovascularización y proliferación de tejido fibroso; y la RD no proliferativa: presenta hemorragias, microaneurismas y exudados duros (Kern, 2014).

Adicional al daño vascular, se han demostrado alteraciones en la sensibilidad al contraste y en la visión cromática, así como anomalías en los potenciales oscilatorios (PO) y en las ondas A y B del electroretinograma (ERG) (Dasso et al., 1996; Shinoda et al., 2007; Sasaki et al., 2010). De igual manera, se ha observado una reducción en el espesor de las capas internas de la retina del ratón y de la rata después de varios meses de inducida la diabetes (Barber et al., 1998; Sasaki et al., 2010). Resultados similares se observaron en la retina de pacientes después de cinco años de diagnosticada la enfermedad (Kowluru et al., 2007).

Hipótesis:

La diabetes lleva a alteraciones en la función nerviosa (dolor neuropático, retinopatía) que pueden estar relacionadas con la transmisión inhibitoria; entonces, alteraciones en la expresión del RGly se deben presentar en condiciones de hiperglucemia.

Objetivo

Identificar los niveles de expresión de las subunidades α del RGly en la retina y médula espinal de la rata normal y diabética.

Métodos:

1. Inducción de diabetes.

Se utilizaron ratas de la cepa Long Evans de 180 a 200g. Para la inducción de diabetes tipo 1, se suministró una sola dosis de estreptozotocina (STZ; 98 mg/kg en solución amortiguadora de citratos: ácido cítrico 90mM, NaCl 10mM, pH 4.8). A los animales control se les administró el mismo buffer.

La determinación de la glucosa en sangre se realizó con las tiras reactivas Accu-chek de Roche. Los animales se consideraron diabéticos si los valores de glucosa en sangre superaban los 250mg/dL. Los animales se mantuvieron en condiciones de alimento y agua ad libitum. Estos se sacrificaron a 7, 20 y 45 días de inducida la diabetes, paralelamente con ratas de la misma edad. Los ojos se enuclearon y se aisló la retina; paralelamente se disectó la región lumbar de la médula espinal y ambos tejidos se mantuvieron a 4°C.

2. Obtención de las muestras para electroforesis de proteínas.

Las retinas aisladas se homogenizaron en 100 µL de Buffer Lisis (EGTA 2mM, NaCl 316 mM, Na₂MoO₄ 20mM, NaF 50mM, Tris-HCL 20mM, EDTA 100mM, Tritón X-100 2%, SDS 10 %, H₂O, Leupeptina (Sigma L-2884), Aprotinina (Sigma A-II53), Na₃VO₄ 100mM, PSMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100mM, p.H 7.5). Posteriormente el homogenado se incubó una hora a 4 °C en agitación a 1200 rpm, se centrifugó a 17 000 g durante 30 min, y el sobrenadante se almacenó a -80 °C.

La médula espinal se homogenizó al 9% en sacarosa (0.3M-Tris 10mM, pH 7.4), posteriormente se centrifugó a 2800 g durante 10 min. a 4 °C, se recuperó el sobrenadante (S1); el pellet se resuspendió con el mismo volumen de sacarosa y centrifugó de igual manera. Los sobrenadantes se centrifugaron a 10,000 g durante 20 min. El pellet (fracción sinaptosomal cruda) se resuspendió en Buffer Lisis y se trató como se indicó anteriormente.

3. Inmunodetección por medio de Western Blot.

La expresión de las subunidades α (1-4) del RGly, se determinó mediante la técnica de Western Blot. Las proteínas se separaron en un gel SDS/PAGE 10% y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana se bloqueó con 1% (p/V) de albúmina y leche deslipidada al 5% en TBS-Tween (Trizma 20 mM, NaCl 136 mM, Tween-20 0.1% pH 7.6) durante 3 horas; posteriormente se incubó toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios: anti-conejo anti-RGly α 1 (1:2500, ab 146 003-Synaptic Systems), anti-RGly α 2 (1:1000, ab 97628 abcam); anti RGly α 3 (1:1000 ab 118924, abcam), anti-RGly α 4 (1:1000, ab biorbyt), y como control de carga anti ratón, anti- α Actina (1:500, Chemicon, Temecula, CA).

Para la inmunodetección de las señales se realizó la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano anti-conejo α 1 (1:25 000), α 2 (1:25 000) α 3 (1:20 000), α 4 (1:15 000) y anti-ratón (1:6000) durante una hora. Las bandas de proteína se visualizaron por quimioluminiscencia, utilizando un kit de Hyperfilm ECL (GE Healthacare Ltd.), las que se digitalizaron con el programa DigicDoc Rt Alfa (Alpha INNOTECH). Las densidades ópticas relativas se determinaron con el programa Alpha Ease FC Stand Alone.

La proteína total se determinó mediante el método de Lowry (1951), con el Kit comercial DC Protein Assay (Bio-Rad), y albúmina de suero bovino como estándar, utilizando un lector de microplacas a 690 nm.

4. Análisis estadístico.

El análisis de las densitometrías, se realizó con el programa Graph Pad Prism 6, la significancia fue obtenida por medio de una prueba estadística ANOVA, seguida de la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Resultados

1. Niveles de expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 3$ del RGly en la médula espinal de la rata.

En la médula espinal de la rata no diabética, identificamos la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 3$, los experimentos de western blot detectaron una banda con un peso molecular de 48 ± 0.11 kDa para ambas subunidades y se observó una mayor expresión (2.6 veces) de la subunidad $\alpha 1$ (Figura 10). En ratas diabéticas los niveles de expresión de la subunidad $\alpha 1$ disminuyeron progresivamente desde los 7 días de inducida la diabetes (7D: 25 ± 4.99 %; 20D: 24 ± 4.28 %), observándose a los 45 días de diabetes una disminución del 40 ± 6.32 % (Figura 11). Por el contrario, la expresión de la subunidad $\alpha 3$ aumentó significativamente (44-30%) a los 20 y 45 días de diabetes (Figura 12).

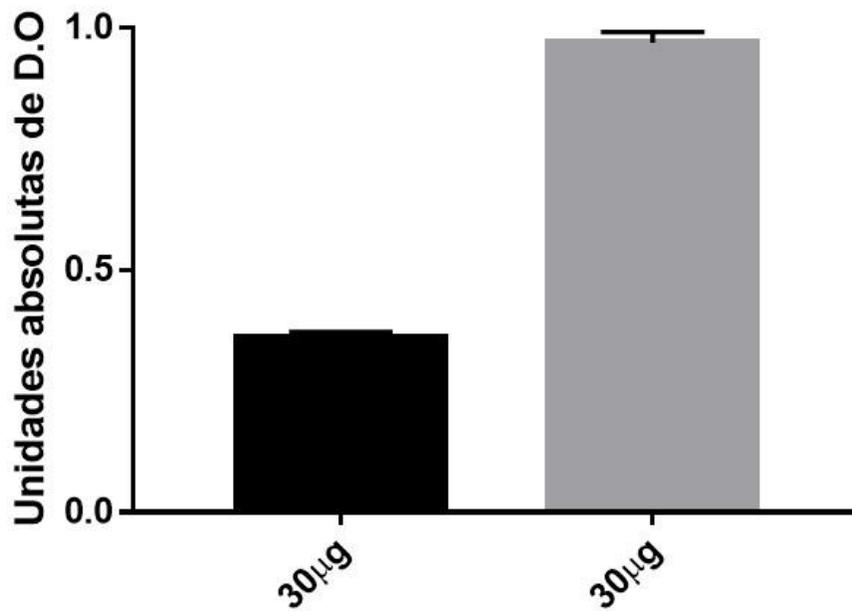


Figura 10. Expresión proteica del RGly $\alpha 1$ y $\alpha 3$ (PM: 48 kDa) en la médula espinal de la rata. Control de carga actina (PM: 43k \pm 0.086 KDa). Utilizando la misma concentración de proteína (30 μg). Los experimentos representan la media \pm SEM de tres experimentos

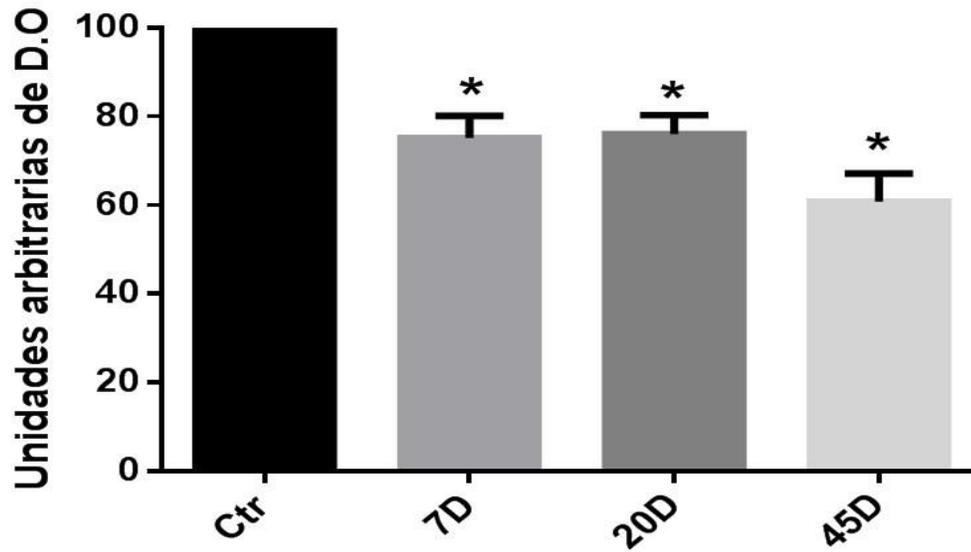


Figura 11. Expresión proteica del Rgly α 1 (PM: 48 kDa) en la médula espinal de la rata. Control de carga (PM:43k \pm 0.086 kDa). Condiciones: control (Ctrl), 7(7D), 20(20D), y 45(45D) días de hiperglucemia. * P<0.05 vs Ctrl. Los experimentos representan la media \pm SEM de tres experimentos

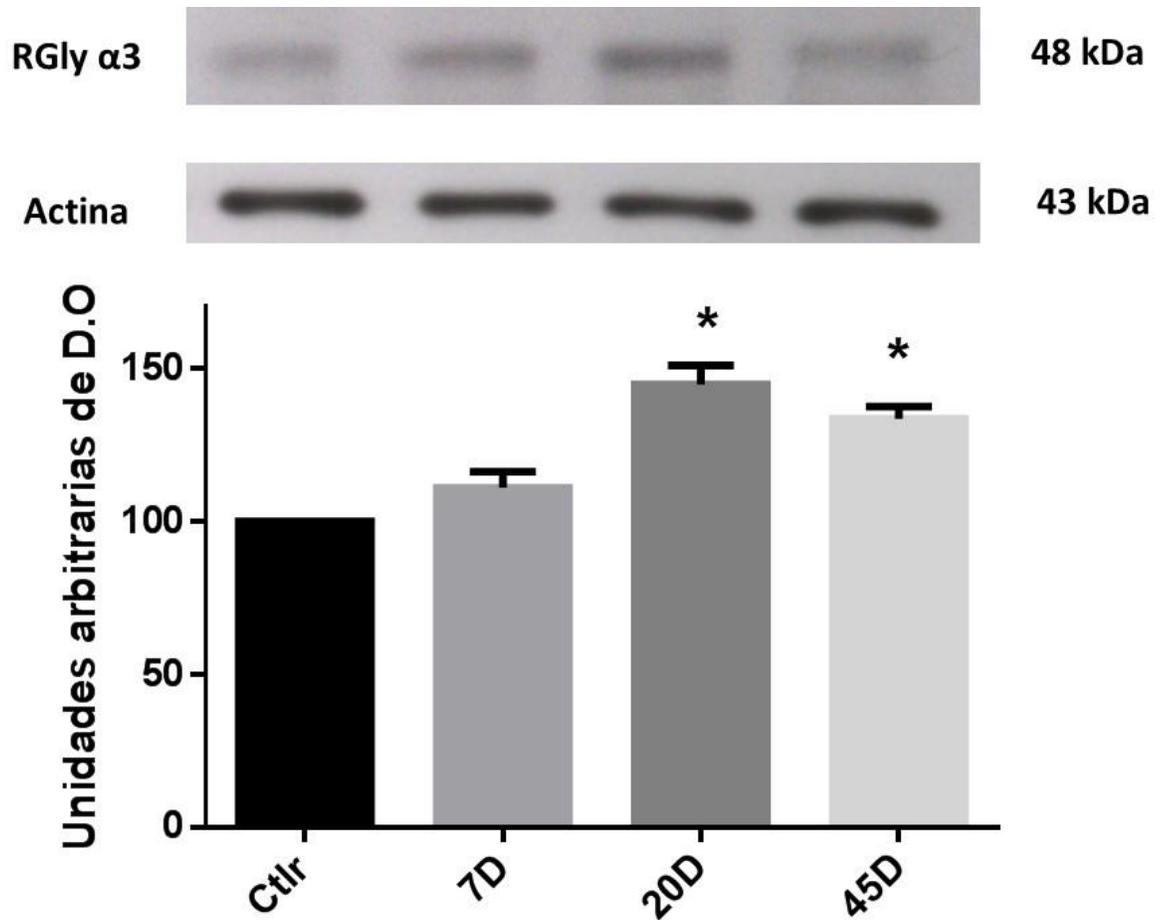


Figura 12. Expresión proteica del RGly α 3 (PM: 48 kDa) en la médula espinal de la rata. Control de carga (PM:43k \pm 0.086 KDa). Condiciones: control (Ctrl), 7(7D), 20(20D), y 45(45D) días de hiperglucemia. * P<0.05 vs Ctrl. Los experimentos representan la media \pm SEM de tres experimentos

2. Niveles de expresión de las subunidades α ($\alpha1$ - $\alpha4$) del RGly en la retina de la rata.

En la retina de la rata no hiperglucémica, los experimentos de western blot revelaron una banda de $48\text{kDa} \pm 0.18\text{ kDa}$, la cual corresponde a la subunidad $\alpha1$ del RGly. Los niveles de expresión de esta subunidad fueron semejantes en las retinas de ratas normales y diabéticas (Figura13).

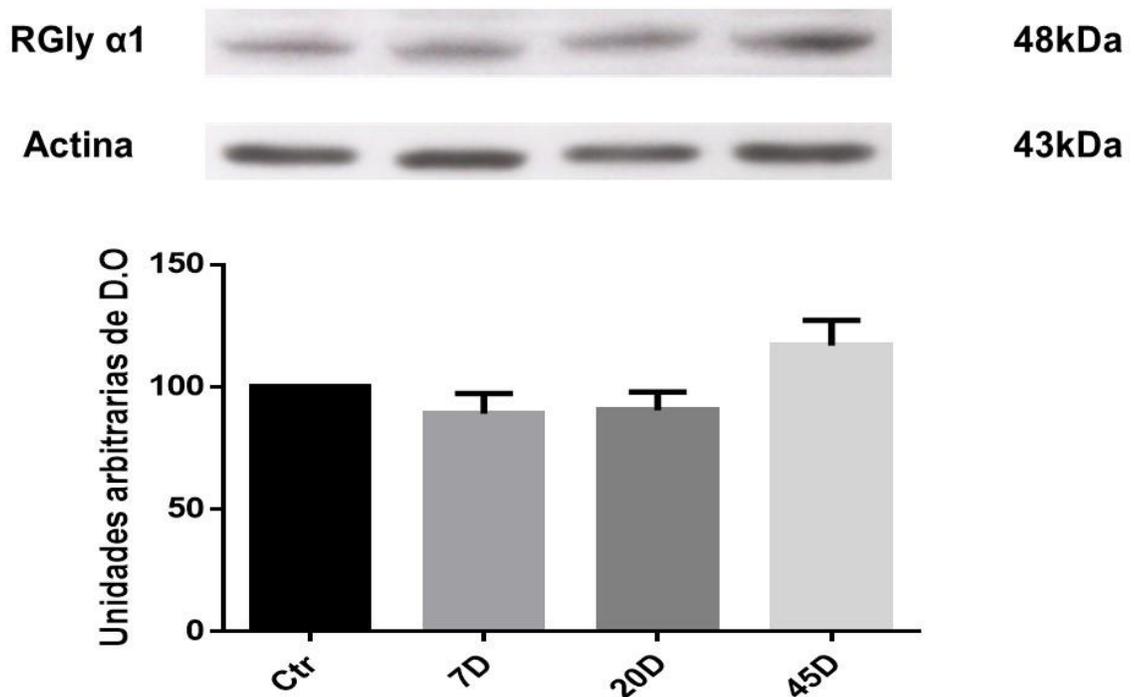


Figura 13. Expresión proteica del RGly $\alpha1$ (PM: 48 kDa) en la retina de la rata. Control de carga (PM: $43\text{k} \pm 0.086\text{ KDa}$). Condiciones: control (Ctrl), 7(7D), 20(20D), y 45(45D) días de hiperglucemia. * $P < 0.05$ vs Ctrl. Los experimentos representan la media \pm SEM de tres experimentos

El anticuerpo dirigido contra la subunidad $\alpha2$ reveló en la retina de ratas normales, una banda de $51 \pm 0.57\text{ kDa}$, como lo reportan los fabricantes. Los niveles de expresión de esta subunidad presentaron una disminución, estadísticamente significativa (15-20%) 20 y 45 días de inducida la diabetes (Figura 14).

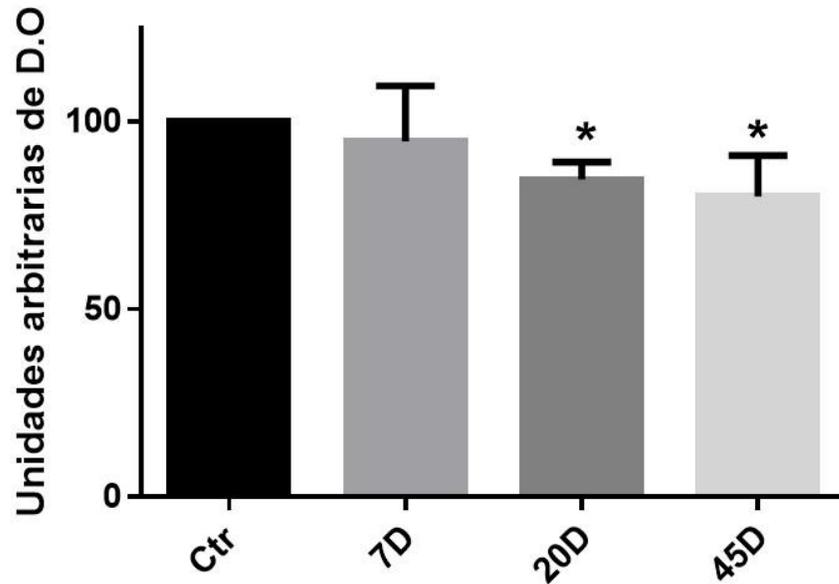
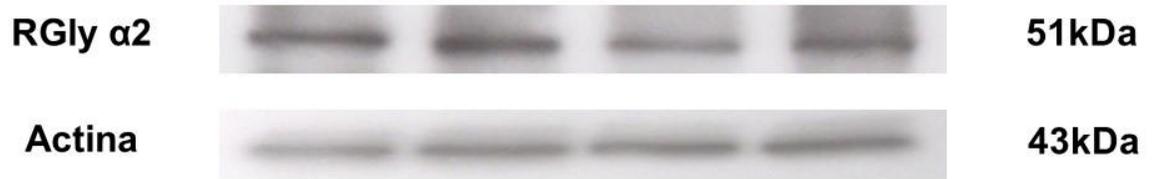


Figura 14. Expresión proteica del Rgly α 2 (PM: 51 kDa) en la retina de la rata. Control de carga (PM:43k \pm 0.86KDa). Condiciones: control (Ctrl), 7(7D), 20(20D), y 45(45D) días de hiperglucemia. * P<0.05 vs Ctrl. Los experimentos representan la media \pm SEM de tres experimentos

Para la subunidad α 3, se obtuvo una banda con un peso molecular de 48 \pm 0.27 kDa. La expresión de la subunidad α 3 en las retinas de animales de 7 y 20 días de diabetes fue similar a la del grupo control; sin embargo, se observó una disminución del 34 \pm 5.42% en la de aquellas de 45 días de diabetes (Figura 15).

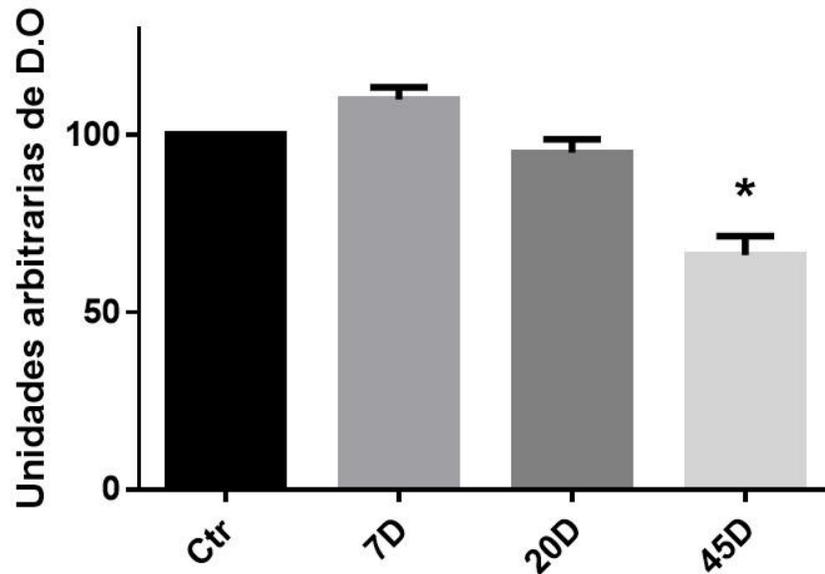
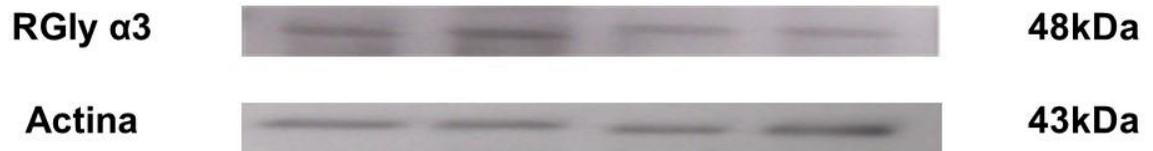


Figura 15. Expresión proteica del RGly α 3 (PM: 48 kDa) en la retina de la rata. Control de carga (PM:43k \pm 0.86KDa). Condiciones: control (Ctrl), 7(7D), 20(20D), y 45(45D) días de hiperglucemia. * $P < 0.05$ vs Ctrl. Los experimentos representan la media \pm SEM de tres experimentos

La expresión de la subunidad α 4 sólo se ha demostrado en la retina del ratón. Para demostrar la presencia de esta subunidad en la retina de la rata, se realizó un experimento en paralelo utilizando la retina del ratón. El anticuerpo contra la subunidad α 4 reconoció, en ambos tejidos una banda con un peso molecular de 49 ± 0.22 kDa (Figura 16). Los niveles de expresión de esta subunidad fueron semejantes en la retina de la rata y el ratón. Resultó la disminución en la expresión de α 4 desde los primeros 7 días de inducida la diabetes, observándose a los 45 días de diabetes una disminución del 80 ± 4.56 % (Figura 17).

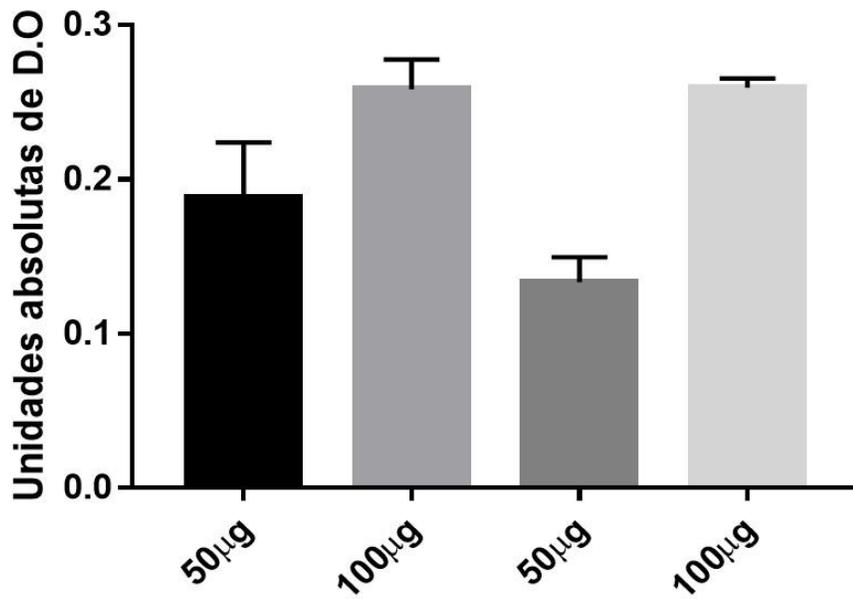
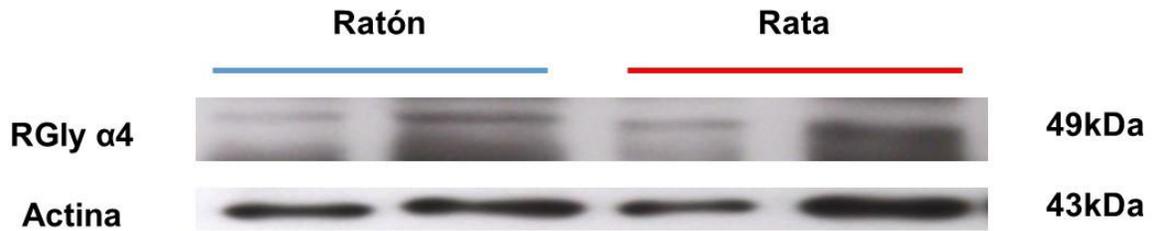


Figura 16. Expresión proteica del RGly $\alpha 4$ (PM: 49kDa) en la retina de ratón y rata. Control de carga (PM:43k \pm 0.86kDa). Utilizando dos concentraciones de proteína (50-100 μ g). * P<0.05. Los experimentos representan la media \pm SEM de tres experimentos.

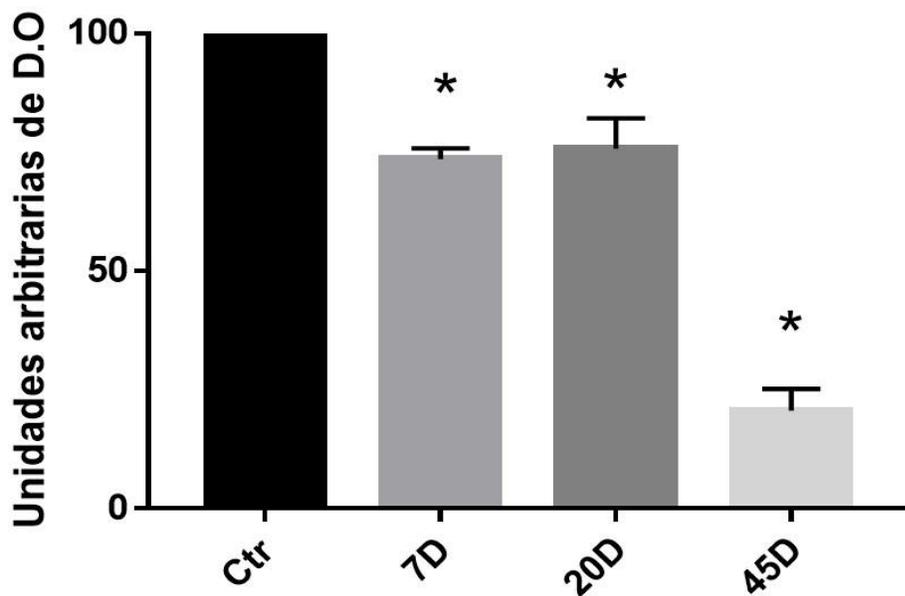
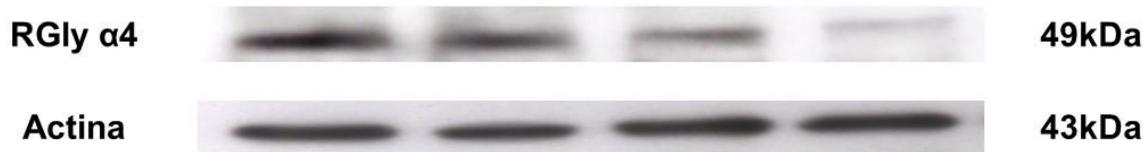


Figura 17. Expresión proteica del RGly α 4 (PM: 49kDa) en la retina de la rata. Control de carga (PM:43k \pm 0.86KDa). Condiciones: control (Ctrl), 7(7D), 20(20D), y 45(45D) días de hiperglucemia. * P<0.05 vs Ctrl. Los experimentos representan la media \pm SEM de tres experimentos

En la tabla 1 se resumen los resultados mostrados anteriormente, en donde se muestran los cambios globales en los niveles de expresión proteica de las subunidades α del RGly en la médula espinal y la retina de ratas con hiperglucemia.

Tabla 1. Cambios en los niveles de expresión proteica del RGly. Fecha roja: disminución en el % de expresión de las subunidades α comparada con el control. Fecha azul: aumento en el % de expresión de las subunidades α comparada con el control. n.s: no significativo.

RGly	Médula				Retina			
	Ctl	7D	20D	45D	Ctl	7D	20D	45D
$\alpha 1$		↓25%	↓ 24%	↓ 40%		n.s	n.s	n.s
$\alpha 2$							↓ 16%	↓ 20%
$\alpha 3$		n.s	↑ 44%	↑ 30%		n.s	n.s	↓ 34%
$\alpha 4$						↓26.5%	↓24.3%	↓ 80%

Discusión

La diabetes es un padecimiento crónico que lleva a una variedad de alteraciones en el organismo. El tejido nervioso es blanco de las alteraciones de la diabetes, desencadenando padecimientos como la retinopatía y el dolor neuropático (DNP), que llevan finalmente a la ceguera y aumento en la sensibilidad al dolor, respectivamente (Harvey et al., 2004, Tesfaye et al., 2005). La neurotransmisión glicinérgica inhibitoria modula la excitabilidad de las neuronas y como consecuencia los circuitos que establecen; por lo que alteraciones en la transmisión inhibitoria pueden llevar a un aumento en la excitabilidad. El receptor de glicina, junto con el del GABA, es parte fundamental de la transmisión inhibitoria en la médula espinal y la retina. Alteraciones en la función de estos tejidos (Shinoda et al., 2007; Sasaki et al, 2010; Chiu et al (2016) se demostraron en ratas, a tiempos relativamente cortos de inducida la diabetes. Por ello, para conocer la posible participación de la transmisión glicinérgica en dichas alteraciones, estudiamos la expresión de las subunidades α del RGly en la retina y en la médula espinal de ratas diabéticas.

El RGly presenta su mayor expresión en la médula espinal, en animales adultos se expresan las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 3$, que forman receptores de tipo $\alpha 1/\beta$ y $\alpha 3/\beta$. La subunidad $\alpha 1$ está ampliamente distribuida en todas las capas celulares, mientras la subunidad $\alpha 3$ se localiza en las capas superficiales I y III. De acuerdo con estos estudios, nuestros datos mostraron una mayor expresión de $\alpha 1$ (2.6 veces) que de $\alpha 3$ en la médula espinal de ratas normales. En la médula espinal de ratas diabéticas observamos una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 1$. Esta disminución, sugiere una significativa disminución en la transmisión inhibitoria; lo que podría llevar a una sobre excitación. En este sentido el grupo de Chiu et al. (2016) encontró que los niveles de glicina incrementan a tiempos cortos (día 1-7) de inducida la diabetes y que posteriormente decrecen (día 21-28). Esta excesiva liberación de glicina durante periodos iniciales de la diabetes sugiere un aumento en la actividad inhibitoria, sin embargo, también podría incrementar la activación de los receptores de glutamato, N-metil-D-aspartato (RNMDA) causando una sobreexcitación; asimismo, el decremento de las concentraciones de glicina durante los siguientes

periodos favorecería la pérdida de la inhibición (Schmeichel et al., 2003) y como consecuencia una sobre excitación. Por el contrario, observamos que la expresión de la subunidad $\alpha 3$ aumentó. Este resultado podría sugerir una adaptación del sistema para mantener niveles de inhibición normales. Esta idea podría relacionarse con el hecho de que las células de la lámina del asta dorsal, de animales diabéticos no presentan cambios en la amplitud de los potenciales sinápticos inhibitorios (mIPSC) (Chiu et al., 2016).

Por otra parte, en la retina de murinos se demostró la expresión de todas las subunidades del RGly, los estudios inmunohistoquímicos indican que las distintas subunidades se expresan en diferentes sinapsis sugiriendo que participan en diferentes circuitos neuronales. (Herize et al., 2007).

De acuerdo con estos resultados, demostramos la expresión de las cuatro subunidades α del RGly en la retina de ratas normales (Velázquez-Flores et al. resultados no publicados). La subunidad $\alpha 4$ es la menos conocida de todas las subunidades y este estudio es el primero en reportar la expresión de la subunidad $\alpha 4$ en la retina de la rata. Aunque la identificación de esta subunidad, presentó dificultades en el sentido de que el anticuerpo disponible comercialmente detecta varias bandas, lo que indica que es relativamente inespecífico, el anticuerpo reconoce una banda que corresponde al peso molecular reportado para la $\alpha 4$ (49kDa), misma que identificamos tanto en la retina de la rata como en la del ratón. De manera interesante los niveles de expresión de la subunidad $\alpha 4$ fueron similares en la retina de la rata y el ratón (Figura 16).

En la retina de ratas diabéticas, la expresión de $\alpha 1$ no presentó cambios respecto al grupo control. Este resultado podría indicar que la vía de los bastones no se afecta en etapas tempranas de la diabetes. El grupo Wässle et al (2009) demostró que la mayoría de las sinapsis que involucran a esta subunidad corresponden a las células bipolares y células amacrinas de tipo II, las cuales se encuentran relacionadas con la vía de los bastones.

Por el contrario, la expresión de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, y $\alpha 4$, presentó una significativa disminución. La subunidad $\alpha 2$, se expresa en las células amacrinas y casi todas las células ganglionares (Haverkamp et al., 2004); mientras que las células bipolares de tipo cono, y algunas células amacrinas expresan la subunidad $\alpha 3$ (Haverkamp et al., 2003). La disminución en la expresión de estas subunidades en la retina de ratas diabéticas sugiere una alteración en la transmisión retiniana, particularmente en la vía de los conos. Estos resultados podrían relacionarse con la alteración en la visión de color observada en pacientes diabéticos (Shinoda et al., 2007; Sasaki et al, 2010). Asimismo, los niveles de expresión de la $\alpha 4$ disminuyeron progresivamente desde el día 7 de iniciada la diabetes, y prácticamente se perdió a los 45 días de diabetes. Aunque poco se conoce de la función de la subunidad $\alpha 4$, la disminución de su expresión sugiere alteración en las sinapsis de las células amacrinas colinérgicas y los circuitos en los que participan.

En conjunto, los cambios en la expresión de estas subunidades pueden ser el resultado de la alteración o muerte de un tipo celular específico (Barber, et al., 1998), lo que puede desencadenar en alteraciones en la función general de la retina, que a largo plazo sean la causa de la pérdida de la visión.

Conclusión

En conjunto nuestros resultados sugieren que a tiempos cortos de hiperglucemia ocurren cambios en la neurotransmisión glicinérgica en la retina y médula espinal. La pérdida de la inhibición glicinérgica representa una grave alteración en la homeostasis en los distintos circuitos neuronales, por lo que la identificación de los mecanismos que llevan a estas alteraciones es fundamental para proponer alternativas terapéuticas.

Bibliografía

Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, y Zeilhofer HU. PGE2 selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat. Neurosci.* 2002; 5:34–40.

Ahrens J, Leuwer M, Demir R, Krampfl K, de la Roche J, Foadi N. Positive allosteric modulatory effects of a aulemic acid at strychnine-sensitive glycine alpha1-and beta-receptors. *Naunyn Schmiedeergs Arch Pharmacol.* 2009; 379: 371-378.

Araki T, Yamano M, Murakami T, Wanaka A, Betz H, Tohyama M. Localization of glycine receptors in the rat central nervous system: an immunocytochemical analysis using monoclonal antibody. *Neuroscience* 1988; 25: 613–624.

Andermann F and Andermann E. Startle disorders of man: hyperekplexia, jumping and startle epilepsy. *Brain Dev* 1988; 10(4): 213–22.

Auld DS. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals.* 2001; 4: 271–313.

Bakker, M.J, Van Dijk, J.G., Van den Maagdenberg, A.M., Tijssen, M.A. Startle syndromes. *Lancet Neurol* 2006; 5: 513–524.

Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J. Clin. Invest.* 1998; 102:783– 791.

Belle TL, Coppieters KT and Herrath MG. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiol Reviews.* 2011; 91(1): 79-118.

Betz H, Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem.* 2006; 97(6):1600-1610.

Borbe HO, Müller WE, Wollert U. Specific [3H] strychnine binding associated with glycine receptors in bovine retina. *Brain Res.* 1981; 205(1): 13-1-9.

Bormann J, Rundström N, Betz H, and Langosch D. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J.*1994; 13:1493.

Birinyi A, Parker D, Antal M and Shupliakov O. “Zinc co-localizes with GABA and glycine in synapses in the lamprey spinal cord,”*J. Comp. Neurol.* 2001; 433: 208-221.

Browlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2000; 414 (6865): 813-820.

Buckwalter, M.S., Cook, S.A., Davisson, M.T., White, W.F., Camper, S.A. A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (*Glr1*) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Hum. Mol. Genet.* 1994; 3, 2025–2030.

Büttner C, Sadtler S, Leyendecker A, Laube B, Griffon N, Betz H, Schmalzing G. Ubiquitination precedes internalization and proteolytic cleavage of plasma membrane-bound glycine receptors. *J Biol Chem.* 2001 276(46):42978-85.

Cascio M, Shenkel S, Grodzicki RL, Sigworth FJ, Fox RO. Functional reconstitution and characterization of recombinant human alpha 1- glycine receptors. *J Biol. Chem.* 2001; 276(24):20981-20988.

Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010; 376:124–136.

Chiu YU, Lian WT, Liu CK, Wu CH, Lin CR. Reduction of spinal glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 2016; 11:88-93.

Cucha-Vaz J, Ribeiro L, Loco C. Phenotypes and biomarkers of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research.* 214; 90-111.

Clements JD. Glycine receptor maturation: no experience required. *J Physiol.* 2002; 542:665.

Davalieva K, Efremov G D. Influence of salts and PCR inhibitors on the amplification capacity of the three thermostable DNA polymerases. *Macedonian J. Chem. Chem. Eng.* 2010; 29(1): 57-62.

Dozzo AA, Bonvin ER, Morel Y, Golay A, Assal JP, Leuenberger PM. Risk factors associated with contrast sensitivity loss in diabetic patients. *Graefes Arch Clin. Exp. Ophthalmol.* 1996; 234:300–5.

Dutertre S, Becker CM, Betz H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem.* 2012; 287(48):40216-40223.

Graham BA, Schofield PR, Sah P, and Callister RJ. Altered inhibitory synaptic transmission in superficial dorsal horn neurones in spastic and oscillator mice. *J Physiol.* 2003; 551: 905–916.

Gelman BB, Soukup VM, Schuenke KW, Keherly MJ, Holzer C, Richey FJ and Lahart CJ. Acquired neuronal chaperonopathies in HIV-associated dementia. *J Neuroimmunol.* 2004; 157(1.2):111-119.

Griffon N, Buttner C, Nicke A, Kuhse J, Schmalzing G, Betz H. Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *EMBO J.* 1999; 18: 4711–4721.

Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, and Betz H. Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron.* 1990; 4: 963–970.

Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron.* 2005; 45(5): 727–739.

Hardy KJ, Lipton J, Scase MO, Foster DH, Scarpello JH. Detection of colour vision abnormalities in uncomplicated type 1 diabetic patients with angiographically normal retinas. *Br J Ophthalmol.* 1992; 76: 461–4.

Hardy KJ, Scarpello JH, Foster DH, Moreland JD. Effect of diabetes associated increases in lens optical density on colour discrimination in insulin dependent diabetes. *Br J Ophthalmol.* 1994; 78: 754-6.

Hartenstein B, Schenkel J, Kuhse J, Besenbeck B, Kling C, Becker CM, Betz H, and Weiher H. Low level expression of glycine receptor beta subunit transgene is sufficient for phenotype correction in spastic mice. *EMBO J.* 1996; 15: 1275–1282.

Haverkamp S, Müller, Zeilhofer HU, Harvey RJ Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha2 subunit. *J Comp Neurol.* 2004; 477(4):399–411.

Haverkamp S, Müller U; Zeilhofer HU, Harvey RJ, Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha3 subunit. *J Comp Neurol.* 2003; 465(4):524-539.

Harvey RJ, Schmieden V, Von Holst A, Laube B, Rohrer H, Betz H. Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci.* 2000; 12 (3): 994-1001.

Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science.* 2004; 304:884–887.

Harvey LH, Carley A, Müller U, Harvey RJ, Dickenson AH. A selective role for α 3 subunit glycine receptors in inflammatory pain. *Front Mol Neurosci.* 2009; 2:2-14.

Heinze L, Harvey RJ Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit. *J Comp Neurol.* 2007; 500(4):693–707.

Inomata H, Nebekura J, Akaike N. Suppression nigra neurons by intracellular cyclic AMP. *Brain Res.* 1993; 615:347-50.

Ivanova E, Müller F. Retinal bipolar cell types differ in their inventory of ion channels. *Vis Neurosci.* 2006; 23(2):143–54.

Kern, T. S. Interrelationships between the retinal neuroglia and vasculature in diabetes. *Diabetes and Metabolism Journal.* 2014; 163-170.

Kingsmore SF, Giros B, Suh D, Bieniarz M, Caron MG, and Seldin MF. Glycine receptor beta-subunit gene mutation in spastic mouse associated with LINE-1 element insertion. *Nat Genet.* 1994; 7:136–14.

Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H. The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J. Biol. Chem.* 1991; 266(33), 22242–22245.

Kirsch J and Betz H. Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature.* 1998; 392: 717–720.

Kneussel M and Betz H. Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol.* 2000; 525: 1–9.

Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. Review. *Exp Diabetes Res.* 2007; 43603.

Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V. and Betz H. Alternative splicing generates two isoforms of the $\alpha 2$ subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett.* 1991; 283: 73-77.

Kuhse J, Schmieden V, and Betz H. A single amino acid Exchange alters the pharmacology of neonatal rat glycine receptor subunit. *Neuron.* 1990; 5(6): 867-873.

Lambert JJ, Harney SC, Belelli D, and Peters JA. Neurosteroid modulation of recombinant and synaptic GABAA receptors. *Int Rev Neurobiol.* 2001; 46: 177–205.

Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron.* 1997 18 (3):493-503.

Leite JF and Cascio M. Probing the topology of the glycine receptor by chemical modification coupled to mass spectrometry. *Biochemistry.* 2002; 41: 6140–6148.

Legendre P. The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(5-6):760-93.

Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Exp Eye Res.* 2002; 74: 615–25.

Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev.* 2004; 84(4):1051-1095.

Lynch JW. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology.* 2009; 56(1): 303-309.

Majumdar S, Haverkamp S, Ivanova E and Wässle H. Glycine receptors of A-type ganglion cells of the mouse retina. *Vis Neurosci.* 2007; 24(4):471–87.

Maleeva GV, Brezhestovskii PD. Molecular Physiology of Glycine Receptor in Vertebrate Nervous Systems. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2014; 100(3):274-300.

Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, and Betz H. Alternative splicing generates two variants of the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem.* 1991; 266: 2048–2053.

Mangin JM, Guayon A, Eugene D, Paupardin-Tritsch D, Legendre P. Functional glycine receptor maturation in the absence of glycinergic input in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *J Physiol*. 2002; 542:685-97.

Matzanbach B, Maulet Y, Sefton L, Avener P, Guenet JL, and Betz H. Structural analysis of mouse glycine receptor alpha subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant. *J. Biol. Chem*. 1994; 269:2607-2612.

Mascia MP, Machu TK, and Harris RA, Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anaesthetics. *Br. J. Pharmacol*. 1996; 1179(7):1331–1336.

Masksay G, Biró T. Dual cooperative allosteric modulation of binding to inotropic glycine receptors. *Neuropharmacology*. 2002 43(7):1083-98.

Maksay G, Laube B, Betz H. Subunit-specific modulation of glycine receptors by neurosteroids. *Neuropharmacology*. 2001; 3: 369-376.

Menger N, Pow DV, Wässle, H. Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *J Comp Neurol*. 1998; 401: 34-46.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*. 2003; 423 (6943): 949-55.

Miller PS, Harvey RJ, Smart TG. Differential agonist sensitivity of glycine receptor alpha2 subunit splice variants. *BR J Pharmacol*. 2004; 143:19-26.

Moss S.J. Smart T.G. Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2(4):240–250.

Mukhtarov M, Ragozzino D, y Bregestovski P. Dual Ca²⁺ modulation of glycinergic synaptic currents in rodent hypoglossal motoneurons. *J. Physiol*. 2005; 569(3):817–831.

Nebekura J, Omura T, Horimoto N, Ogawa T, Akaike N. Alpha 1 adrenoceptor activation potentiates taurine response mediated by protein kinase C in substantia nigra neurons. *J Neurophysiol*. 1996; 76:2455-60

Nògradi A, Vrbová G. Transplantation of Neural Tissue into Spinal Cord. *Anatomy and Physiology of Spinal Cord*. Second Edition, 2006, pp 1-23.

Nikolic Z, Laube B, Weber RG, Lichter P, Kioschis P, Poustka A, Mulhardt C, and Becker CM. The human glycine receptor subunit $\alpha 3$ Glra3 gene structure,

chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts. J Biol Chem. 1998; 273: 19708–19714.

OMS. Temas de salud-Diabetes. [en línea www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/index.html] visitada en Agosto 2016.

Peréz León JA, Salceda R. La neurotransmission glicinérgica en la retina de los vertebrados. BEB. 1997; 16(4):140-146.

Pfeiffer F, Graham D, Betz H. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. J Biol Chem. 1982; 257(16):9389–93.

Pourcho RG. Neurotransmitter in the retina. Curr Eyes Res. 1996; 15(7): 797-803.

Probst A, Cortes R, and Palacios JM. The distribution of glycine receptors in the human brain. A light microscopic autoradiographic study using [3H] strychnine. Neuroscience.1986; 17(1): 11–35.

Purves Dale. Neurociencia. edición, EDITORIAL MÉDICA panamericana, 2007,pp.

Rees M.I, Lewis T.M, Kwok J.B, Mortier, GR, Govaert P, Snell RG, Schofield PR, Owen MJ. Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB).Hum. Mol. Genet. 2002; 11: 853–860.

Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, Layh B, Heindl C, Hamza M, Pahl A, Brune K, Narumiya S, Müller U, and Zeilhofer HU. Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. J. Clin. Invest. 2005; 115 (3): 673–679.

Ruiz-Gomèz A, Vaello ML, Valdivieso F, Mayor F. Phosphorylation of the 48-kDa subunit of the glycine receptor by protein kinase C. J Biol. Chem. 1991; 266(1):559-566.

Ryan SG, Buckwalter MS, Lynch JW, Handford CA, Segura L, Shiang R, Wasmuth JJ, Camper SA, Schofield P, and O'Connell P. A missense mutation in the gene encoding the α 1 subunit of the inhibitory glycine receptor in the spasmodic mouse. Nat Genet. 1994; 7: 131–135.

- Salceda**, R. Diferenciación de la retina de los vertebrados: mecanismos celulares y moleculares. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 1889; 48: 115 -124.
- Salceda** R, Aguirre-Ramírez M. Characterization of strychnine-sensitive glycine receptor in the intact frog retina: modulation by protein kinases. *Neurochem Res.* 2005; 30:411-6.
- Sasaki** M, Ozawa Y, Kurihara T, Kubota S, Yuki K, Noda K, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K. Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia.* 2010; 53(5):971-979.
- Sato** Y, Son JH, and Meizel S. The mouse sperm glycine receptor/ chloride channel: cellular localization and involvement in the acrosome reaction initiated by glycine. *J Androl.* 200; 21: 99–106.
- Sassoe-Pognetto** M. Wässle H. Grunert U. Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the alpha 1 subunit of the glycine receptor. *J Neurosci.* 1994;14(8):5131–46.
- Schmeichel** AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative Injury and Apoptosis of Dorsal Root Ganglion Neurons in Chronic Experimental Diabetic Neuropathy. *Diabetes* 2003, 52(1):165-171.
- Schuit** FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG. Glucose sensing in pancreatic β -cell and model for the study of the other glucose-regulated cell in gut, pancreas, and hypothalamus, *Diabetes* 2001; 50 (1): 1-11.
- Shinoda** K, Rejdak R, Schuettauf F, Blatsios G, Völker M, Tanimoto N, Olcay T, Gekeler F, Lehaci C, Naskar R, Zagorski Z, Zrenner E. Early electroretinographic features of streptozotocin-induced diabetic retinopathy. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007; 35(9):847-54
- Sobetzko** D, Sander T y Becker C. M. Genetic variation of the human glycine receptor subunit genes GLRA3 and GLRB and susceptibility to idiopathic generalized epilepsies. *Am. J. Med. Genet.* 2001; 105(6):534-538
- SchÖnrock** B, Bormann J. Modulation of hippocampal glycine receptor channels by protein kinase C. *Neuroreport.* 1995; 6:301-4.

Song YM, Huang LY. Modulation of glycine receptor chloride channels by cAMP-dependent protein kinase in spinal trigeminal neurons. *Nature*. 1990; 348:242-5

Stanfield Cindy L. Principios de fisiología humana, 4ª edición, PERSON EDUCACIÓN, S.S., 2011, pp.224-228.

Tall W and Holstege JC. GABA and glycine frequently colocalize in terminal on cat spinal motoneurons. *J. Neuroreport*. 1994; 5(17): 2225-2228.

Tesfaye S, Kempler P. Painful diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 2005; 48(5): 805–807.

Tool AJ, Watt C, Spike RC and Sieghart W. Colocalization of GABA, glycine and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J. Neurosci*. 1996; 16(3): 974-982.

Vaello ML, Ruiz-Gómez A, Lerma J, and Mayor F, Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*. 1994; 269(3): 2002–2008.

Von Wegerer J, Becker K, Glockenhammer D, Becker CM, Zeilhofer HU, y Swandulla D. Spinal inhibitory synaptic transmission in the glycine receptor mouse mutant spastic. *Neurosci*, 2003; *Lett* 345: 45–48.

Velázquez-Flores MA, Salceda R. El receptor postsináptico de glicina media de forma transitoria y sostenida la inhibición glicinérgica en la retina de los vertebrados. *Rev Neurol*. 2012; 55:38-46.

Wang XL, Zhang HM, Chen SR, Pan HL. Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy, *J. Physiol*. 2007; 579:849–861.

Wässle, H., Heinze, L., Ivanova, E., Majumdar, S., Weiss, J., Harvey, R. J., and Haverkamp, S. Glycinergic transmission in the mammalian retina. *Front. Mol. Neurosci*. 2009; 9:2- 6.

Waxman SG. *Neuroanatomía Clínica*. 26 va edició, Mc Graw Hill LANGE, 2011, pp. 43-50.

Weaver CD, Partridge JG, Yao TL, Moates JM, Magnuson MA, and Verdoorn TA. Activation of glycine and glutamate receptors increases intracellular calcium in cells derived from the endocrine pancreas. *Mol Pharmacol*. 1998; 54: 639–646.

Weltzien, F., Puller, C., O'Sullivan, G. A., Paarmann, I., and Betz, H. Distribution of the glycine receptor β subunit in the mouse CNS as revealed by a novel monoclonal antibody. *J. Comp. Neurol.* 2012; 520 (17): 3962-81.

Wu FS, Chen SC, and Tsai JJ. Competitive inhibition of the glycine-induced current by pregnenolone sulfate in cultured chick spinal cord neurons. *Brain Res.* 1997; 750: 318–320.

Wu FS, Gibbs TT, and Farb DH. Inverse modulation of γ -aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol.* 1990; 37: 597–602.

Xin Wang, Ling Tao, Chun X.Hai. Redox-regulating role of insulin: The essence of insulin effect. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2012; 349(2): 111-127.

Xu H, Tian N. Pathway-specific maturation, visual deprivation, and development of retinal pathway. *Neuroscientist* 2004; 10(4); 337-346.

Xu TL, Nebekura J, Akaike N. Protein Kinase C-mediated enhancement of glycine response in rat sacral dorsal commissural neurones by serotonin. *J Physiol.* 1996; 496:491-501.

Yevenes GE, Zeilhofer HU. Allosteric modulation of glycine receptors. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(2):224-236.

Young AB, Snyder SH. Steychine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973 70(10):2832-6.

Zeilhofer HU. The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(18):2027-2035.

Zeilhofer HU, Zeilhofer UB. Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. *Neurosci Lett.* 2008; 437(3):170-174.

Zeilhofer HU. Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain contributions of inflammation and microglia. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(2):182-87.