

TESINA DE GRADUACIÓN DE LA LICENCIATURA EN
BIOQUIMICA



Neurotransmisión glicinérgica en
motoneuronas.
Estudio de la expresión de receptores y de
su modulación por proteínquinasas.

Bach. Emilia Fló Rama

Tutor: Dra. Inés Pose

Laboratorio de Neurofisiología Celular, Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina – Udelar

Noviembre 2014

“Cultivemos la ciencia por sí misma, sin considerar por el momento las aplicaciones. Estas llegan siempre, a veces tardan años, a veces, siglos. Poco importa que una verdad científica sea aprovechada por nuestros hijos o por nuestros nietos. Medrada andaría la causa del progreso si Galvani, si Volta, si Faraday, si Hertz, descubridores de los hechos fundamentales de la ciencia de la electricidad, hubieran menospreciado sus hallazgos por carecer entonces de aplicación industrial.

Dejamos consignado que lo inútil, aun aceptando el punto de vista humano (con las necesarias restricciones de tiempo y lugar), no existe en la Naturaleza. Y, en último extremo, aun cuando no fuera posible poner al servicio de nuestra comodidad y provecho ciertas conquistas científicas, siempre quedaría una utilidad positiva: la noble satisfacción de nuestra curiosidad satisfecha y la fruición incomparable causada en el ánimo por el sentimiento de nuestro poder ante la dificultad.”

Reglas y consejos sobre la investigación científica,
Santiago F. Ramón y Cajal

Índice

Resumen

Introducción

El receptor de glicina	1
Expresión de GlyR.....	2
Expresión diferencial de acuerdo con el desarrollo.....	2
Propiedades y modulación	3
Inhibición glicinérgica en motoneuronas	4
PKA y C.....	5
Objetivos.....	6

Materiales y métodos

Experimentos histológicos	7
Detección de la subunidad $\alpha 1$ y β por inmunohistoquímica.....	7
Detección de la subunidad $\alpha 1$ y del ChAT por inmunofluorescencia	8
Experimentos electrofisiológicos.....	8
Preparación de cortes de tronco encefálico	8
Registro y método de estimulación	9
Análisis	10
Drogas y soluciones.....	11

Resultados

Estudio de la composición del receptor de glicina.....	12
Subunidad $\alpha 1$	12
Subunidad β	13
Efecto de la glicina en motoneuronas del NMV.....	13
Modulación de la sinapsis glicinérgica por PK	15
Modulación por 8-Br-cAMP	16
Modulación por PDA.....	17
Efecto sobre las motoneuronas del NMV	17
Efecto sobre la corriente provocada por aplicación local de glicina.....	17
Efecto sobre la corriente sináptica provocada por estimulación presináptica	18
Efecto sobre los eventos glicinérgicos espontáneos	18

Discusión

El receptor de glicina en motoneuronas del NMV	20
Efecto de la glicina en motoneuronas del NMV.....	21
Modulación por PKs.....	22

Conclusiones	25
---------------------------	----

Bibliografía	25
---------------------------	----

Resumen

La glicina es uno de los principales neurotransmisores que median la inhibición neuronal rápida. Este aminoácido regula la actividad de neuronas de circuitos motores y sensoriales ubicados fundamentalmente en el tronco encefálico y médula espinal participando de importantes funciones fisiológicas como el control del tono muscular, la respiración, el procesamiento sensorial y del dolor, entre otras.

Es bien conocido que las motoneuronas del tronco encefálico (trigémino e hipogloso) reciben entradas glicinérgicas y que la glicina es uno de los principales neurotransmisores en regular su excitabilidad. Para comprender las acciones glicinérgicas tanto en circunstancias fisiológicas como patológicas es importante el conocimiento acerca de los receptores para este neurotransmisor. En este sentido se destacan dos factores relevantes: por un lado, la existencia de diferentes subtipos de receptores glicinérgicos, los cuales presentan diferente sensibilidad a agonistas y moduladores, por otro, el hecho de que la expresión de los receptores de glicina varía significativamente durante el desarrollo.

En el presente trabajo fue de interés estudiar la composición del receptor de glicina en neuronas del núcleo motor del trigémino en ratas neonatales y evaluar una posible modulación de los mismos por fosforilación dependiente de protein quinasas A y C. Identificamos la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y β del receptor de glicina en estas motoneuronas utilizando técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia. Caracterizamos mediante técnicas electrofisiológicas la respuesta a la glicina de estas células y observamos un efecto de potenciación sobre la sinapsis glicinérgica en presencia de un activador de la PKC.

Este trabajo es el primero en realizar un estudio de la expresión del receptor de glicina en motoneuronas trigeminales utilizando ensayos inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia, y en establecer una relación entre las subunidades expresadas y su modulación por protein quinasas en este núcleo del tronco encefálico. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento general sobre los receptores glicinérgicos en el sistema nervioso central e implican un avance en la comprensión de los mecanismos que podrían modular la transmisión sináptica inhibitoria glicinérgica.

Palabras claves: Núcleo Motor del Trigémino, Inhibición, Receptor de glicina, PKA, PKC

Introducción

La glicina es uno de los principales neurotransmisores que median inhibición rápida neuronal. A través de la activación de sus receptores específicos está involucrada en la regulación de circuitos ubicados fundamentalmente en el tronco encefálico y médula espinal vinculados con el control de la actividad motora y sensorial. De esta forma participa de importantes funciones fisiológicas tales como el control del tono muscular, la respiración, el procesamiento sensorial y del dolor, entre otras. Más recientemente ha adquirido relevancia el reconocimiento de la transmisión glicinérgica en otros sectores del sistema nervioso central (SNC) y así su participación incluso en procesos de índole cognitiva o afectiva (Xu & Gong, 2010; Molander & Soderpalm, 2005).

Dos factores en relación a los receptores de glicina son de relevancia a la hora de comprender las acciones glicinérgicas en circunstancias fisiológicas. Por un lado, la existencia de diferentes subtipos de los mismos y las evidencias de que presentan diferente sensibilidad a agonistas y moduladores. Por otro, el hecho de que la expresión de diferentes subtipos varía significativamente durante el desarrollo y por ende sus propiedades funcionales con las correspondientes consecuencias en los circuitos que integran (Legendre, 2001; Lynch, 2009; Dutertre et al., 2012).

El receptor de glicina

La glicina se une a la proteína transmembrana GlyR, un canal iónico mediado por ligando que pertenece a la superfamilia de los receptores Cys loop (Cys loop - LGICs) de la que forman parte también los receptores nicotínicos de acetilcolina y los receptores de GABA tipo A y C (Lynch, 2004). Los LGICs presentan una organización conservada en la que cinco subunidades proteicas se arreglan de manera simétrica alrededor de un canal iónico central. Cada subunidad está compuesta por un dominio extracelular N-terminal al que se une el ligando (ECD) y un dominio ionotrópico transmembrana (TMD) (Sauguet et al, 2014).

En el caso del GlyR la unión de la glicina en su ECD produce la apertura del canal permitiendo el flujo del ión cloro de acuerdo con su gradiente electroquímico. Se trata generalmente de un receptor heteropentamérico conformado por dos tipos de proteínas integrales de membrana de 48 y 56 kDa, que corresponden a la subunidad α y β respectivamente (Langosch et al., 1988). Estudios moleculares han descubierto hasta el momento, cuatro isoformas de la subunidad α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$) y una β .

Los GlyR en las sinapsis glicinérgicas se encuentran en agregados denominados clusters cuya formación depende de la proteína gefirina. Se trata de una proteína citoplasmática de andamiaje que ancla los receptores en la postsinapsis. Esta unión no determina una estructura estática, sino que es relevante en el transporte intracelular de GlyR y se cree podría regular su movilidad lateral en la membrana celular (Fritschy et al, 2008).

Expresión de GlyR

Las subunidades que componen al receptor de glicina presentan gran homología entre sí pero su expresión varía en el sistema nervioso.

La mayoría de los GlyR sinápticos del SNC corresponden a receptores del tipo $\alpha 1\beta$. Se trata de una isoforma con gran importancia funcional dado que mutaciones genéticas que afectan la expresión normal de $\alpha 1$ generan patologías, como es la enfermedad del sobresalto o hiperekplexia (Shiang et al., 1993).

Los GlyR del tipo $\alpha 2\beta$ han sido localizados en sinapsis en médula espinal, tronco encefálico, mesencéfalo, bulbo olfatorio y retina, de animales adultos (Weltzien et al., 2012). Recientemente fueron descubiertos receptores de glicina homoméricos conformados por la proteína $\alpha 2$. Se trata de receptores extrasinápticos involucrados en la neurotransmisión no sináptica tónica inhibitoria (Muller et al., 2008). Los receptores glicinérgicos conformados por la isoforma $\alpha 3$ se encuentran en la lamina I y II del asta dorsal, donde participan en la inhibición de la propagación de señales nociceptivas a los centros superiores y sirven como sustrato molecular de sensibilización al dolor por el mediador inflamatorio prostaglandina E2 (Harvey et al., 2004). Además, estos receptores se han encontrado en sinapsis inhibitorias en el oído interno (Długaiczky et al., 2008). Existe poca información sobre la expresión funcional de receptores de glicina conformados por $\alpha 4$, sin embargo se encuentra colocalizada con gefirina en neuronas de retina de rata (Wässle et al., 2009).

Expresión diferencial de acuerdo con el desarrollo

Se demostró que en médula espinal y en motoneuronas del hipogloso del tronco encefálico de ratas, ocurre un recambio de las subunidades que componen el receptor de glicina asociado con el desarrollo (Watanabe et al., 1995; Singer et al., 1998). La isoforma $\alpha 2$ se expresa en altas concentraciones durante el desarrollo embrionario y disminuye en la etapa postnatal, manteniendo una baja expresión en el adulto (Racca et al., 1998). Se considera que los GlyR embrionarios y postnatales formados por esta

isoforma son homoméricos y extrasinápticos. A su vez, el ARNm que codifica para la isoforma $\alpha 1$ se expresa en pequeñas cantidades en el embrión y en los primeros días de la rata, pero aumenta a medida que avanza el desarrollo, llegando a un máximo en el día 15. La subunidad $\alpha 3$ se encuentra en bajas concentraciones en médula espinal (Anderson et al., 2009) y tronco encefálico (Manzke et al., 2010) del animal adulto. La expresión de la subunidad β tiene un comportamiento similar al de la isoforma $\alpha 1$ es baja en el embrión, y aumenta a medida que progresa el desarrollo postnatal del animal. Si bien durante el desarrollo embrionario se expresa un GlyR homomérico formado exclusivamente por subunidades del tipo α , luego del nacimiento se estipula que la estequiometría del receptor es del tipo $2\alpha:3\beta$ (Yang et al., 2012).

Propiedades y modulación

Existen numerosas evidencias de que el receptor glicinérgico puede ser modulado por diversas sustancias, entre las cuales se encuentran antagonistas del receptor 5-HT₃ y NMDA, neuroesteroides como la progesterona, cocaína, cannabinoides, anestésicos y por el glutamato, principal neurotransmisor excitador del SNC (Legendre, 2001).

Las distintas isoformas de GlyR difieren en la conductancia y cinética de las corrientes de cloro, y en la afinidad que presentan por agonistas y antagonistas. A su vez presentan distintos sitios de modulación alostérica y fosforilación. Se acepta que los tipos de subunidades que componen los receptores de GlyR así como también su estequiometría, determinan las propiedades de este canal.

Los GlyR formados por $\alpha 1$ poseen tiempos de apertura cortos y una cinética rápida de decaimiento (Singer et al., 1998), los canales formados por $\alpha 2$ tienen una cinética de decaimiento lenta mientras que los de tipo $\alpha 3$ presentan una cinética medianamente rápida (Weiss et al., 2008).

Los GlyR son modulados por la activación de protein quinasas (PK), específicamente por PKC y PKA. La subunidad $\alpha 1$ posee una secuencia consenso de fosforilación para la PKC y estudios realizados sugieren que la isoforma $\alpha 2$ también podría ser fosforilada por esta enzima (Nishizaki & Ikeuchi 1995). La subunidad β posee sitios de fosforilación consenso tanto para PKA como para PKC.

Existen varias publicaciones acerca de los efectos de la activación de estas quinasas sobre las corrientes glicinérgicas con resultados variables según la preparación y la región estudiada. Hay evidencias de una disminución de las corrientes glicinérgicas al activar PKC (Uchiyama et al., 1994; Ye & McArdle, 1996; Lin et al., 1996; Tapia et al., 1997) así como también una potenciación de las mismas (Xu et al., 1996; Min et al., 1996; Schonrock & Bormann, 1995). Se demostró que la PKA modula la función de

GlyR, sin embargo, los resultados son también contradictorios. La PKA potencia las respuestas glicinérgicas evocadas en algunas preparaciones (Vaello et al., 1994; Song & Huang, 1990; Ren et al., 1998) mientras que las disminuye en otras (Agopyan et al., 1993, Inomata et al., 1993, Min et al., 1996).

Es posible que estos resultados a primera vista contradictorios, puedan ser explicados por la presencia de isoformas del GlyR diferentes en las distintas regiones estudiadas.

Inhibición glicinérgica en motoneuronas

Las motoneuronas son blanco de acciones glicinérgicas que resultan esenciales en la regulación de su excitabilidad y por lo tanto en el control de la salida motora. La acción principal de la glicina en las motoneuronas maduras es la inhibición mediada por la apertura de los canales de cloro del receptor causando una hiperpolarización y una disminución de la excitabilidad por un efecto de shunt.

El núcleo motor del trigémino (NVM) es un núcleo compuesto por motoneuronas que inervan los músculos que mueven la mandíbula. Estas motoneuronas intervienen en una variedad de actos motores como la masticación, succión, deglución y vocalización. A su vez están involucradas en comportamientos más complejos como el “grooming” y las reacciones de ataque. Existe una vasta literatura referente a la identificación de los circuitos neurales, las aferencias sinápticas, los neurotransmisores involucrados, las propiedades intrínsecas de las propias motoneuronas y sus modulaciones (Lushei & Goldberg, 1981; Lund & Olson, 1983; Rekling et al., 2000; para revisión reciente ver Morquette et al., 2012).

En relación a las aferencias glicinérgicas, éstas se originan en el conjunto de núcleos que rodean al NVM, incluyendo al núcleo supratrigeminal (Kolta, 1997), y en diversas porciones de la formación reticulada del tronco encefálico (Morales et al., 1999 y citas allí). A través de estudios de hibridación in situ se ha observado la presencia de ARNm que codifica para las distintas subunidades del receptor de glicina en motoneuronas del NVM y del hipogloso (Fujita et al., 1991; Sato et al., 1991, 1992). Esta técnica no es determinante de la presencia de una proteína dado que la existencia del ARNm que la codifica no implica necesariamente su expresión.

Desde el punto de vista funcional las entradas glicinérgicas en motoneuronas sirven a distintos propósitos según la edad del animal (Singer y Berger, 2000; Aguayo et al., 2004). En etapas embrionarias y postnatales tempranas las acciones son despolarizantes debido al alto contenido de cloro intracelular y se acompañan de entrada de calcio lo cual es necesario para el apropiado desarrollo sináptico y localización de receptores así como el crecimiento de neuritas (Kirsch y Betz, 1998;

Aguayo et al, 2004). En el animal maduro las acciones pasan a ser inhibitorias como se ha mencionado anteriormente. En cuanto al control motor ejercido por el NMV es interesante destacar que el patrón de movimientos de la mandíbula se modifica en las dos primeras semanas de vida postnatal de tal forma que los animales pasan de mamar a masticar. Esto seguramente implica diferencias en el control inhibitorio de los músculos de la mandíbula controlados por las motoneuronas del NMV. Es posible que este pasaje coincida con la evolución en la expresión de receptores glicinérgicos.

Las motoneuronas reciben una gran variedad de entradas sinápticas conteniendo sustancias neuroactivas que incluyen aminoácidos excitadores e inhibidores, aminas biógenas, acetilcolina, neuropéptidos y óxido nítrico. Muchos de estos neurotransmisores/neuromoduladores activan mecanismos de segundos mensajeros por lo que se puede pensar que podrían modular a los receptores postsinápticos. Son conocidas y han sido muy estudiadas las acciones de muchas de estas sustancias sobre las propiedades intrínsecas así como sobre las entradas sinápticas a motoneuronas (Rekling et al, 2000, Feldman et al 2005). Sin embargo no existen muchos estudios que hayan mostrado una modulación a nivel postsináptico de acciones glicinérgicas, es decir de los receptores por agonistas endógenos. Algunos ejemplos reportados para motoneuronas del hipogloso son las acciones depresoras de corrientes glicinérgicas por activación de receptores muscarínicos (Pagnotta et al, 2005) y la potenciación de GlyR postsinápticos por aumentos de calcio intracelular siguiendo a la activación de receptores de tipo NMDA (Mukhtarov et al, 2005).

En otros sectores del SNC existen evidencias de modulación de receptores glicinérgicos por serotonina en circuitos respiratorios (Manzke et al, 2010) y diversos ejemplos de modulación por manipulación de PKA, PKC y modificaciones del calcio intracelular (Legendre, 2001).

PK A y C

En ausencia de AMPc, la PKA es una holoenzima tetramérica inactiva compuesta por subunidades reguladoras (R) unidas a subunidades catalíticas (C). La unión de AMPc en las subunidades R permite la actividad fosfotransferasa de C, resultando en la fosforilación de residuos de serina y treonina de numerosas proteínas (Gibbs et al., 1992).

Las PKC son una familia de enzimas sensibles a lípidos que se activan cuando la fosfolipasa C es estimulada. Esta proteína es responsable de hidrolizar fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato generando diacilglicerol (DAG), que activa la PKC, e inositol trifosfato, que moviliza el calcio intracelular. Las isoformas convencionales de PKC son

farmacológicamente activadas por ésteres de forbol que anclan la PKC en su conformación activa a la membrana celular. Al igual que la PKA poseen dominios catalíticos y dominios regulatorios que mantienen la enzima en su conformación inactiva. La PKC se encuentra en el citosol de células, la unión de DAG (o esteres de forbol) y fosfolípidos aniónicos dependientes de calcio al dominio regulatorio activan la enzima anclándola a la membrana, exponiendo el dominio de unión para el sustrato y facilitando su activación (Steinberg, 2008).

Objetivos

El presente trabajo se enmarca en un plan más amplio de estudio de receptores glicinérgicos en motoneuronas del tronco encefálico y está destinado a determinar los subtipos de receptores glicinérgicos presentes en las motoneuronas de ratas neonatales y explorar la sensibilidad de la transmisión glicinérgica y la activación de esos receptores a la manipulación de PKA y PKC.

Corresponde con el primer estudio realizado en este núcleo motor donde se apunta a establecer una relación entre las subunidades que expresa el receptor y su modulación por protein quinasas.

- a) Determinar los subtipos de receptores glicinérgicos presentes en las neuronas del núcleo motor del trigémino (NVM) de rata a través de técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia. Se trata de identificar cuáles subunidades del receptor se expresan en estas neuronas.
- b) Caracterizar mediante técnicas electrofisiológicas la respuesta a la glicina de las motoneuronas del trigémino.
- c) Estudiar las acciones de diferentes moduladores de receptores glicinérgicos, específicamente activadores de las PK A y C, sobre las respuestas glicinérgicas. Esta elección se basa en las evidencias acerca de que las respuestas glicinérgicas son modulables por estas quinasas en otras regiones del SNC.

Materiales y métodos

Para los experimentos electrofisiológicos se utilizaron 42 ratas Wistar neonatas (P4-11). Dos ratas neonatales (P7 y P8) fueron utilizadas en los estudios anatómicos. Todos los ensayos fueron realizados cumpliendo con lo establecido por los protocolos

aceptados por la Comisión de ética en el uso de animales de experimentación de la Facultad de Medicina, UdeLaR (Exp n° 071140-001422-10).

Experimentos histológicos

Los ensayos histológicos tuvieron como objetivo estudiar la composición del receptor glicinérgico en motoneuronas trigeminales. Para esto se buscó inmunoreactividad para las diferentes subunidades revelando actividad peroxidasa mediante diaminobencidina (DAB) o por inmunofluorescencia. Se administró una dosis de pentobarbital intraperitoneal a ratas neonatales. Los animales se perfundieron inicialmente por vía intracardiaca con 50 ml de suero fisiológico con heparina y luego con 70 ml de una solución fijadora compuesta por: PFA 4%, ácido pícrico saturado 15% en buffer fosfato (BF) 0.1 M a pH 7.4. El tronco encefálico fue extraído y postfijado durante 24 horas en una solución conteniendo paraformaldehído 2%, ácido pícrico 7.5%, sucrosa 20% en BF 0.1M a pH 7.4. El tejido fue luego crioprotegido con BF 0.1M pH 7.4 con sucrosa (hasta 30%), congelado y cortado de forma seriada de a 30 μ m utilizando un criostato Leica CM 1900 (Leica Instruments, Nussloch, Germany). Los cortes fueron depositados en recipientes conteniendo buffer fosfato salino (PBS).

Detección de subunidades α 1 y β por inmunohistoquímica

Los cortes fueron procesados para detectar la presencia de la subunidad α 1 y β en neuronas del núcleo motor del trigémino. En primera instancia los cortes fueron incubados con H₂O₂ 1% en PBS con Triton X-100 0.3% (PBS-T) durante 60 min para bloquear la actividad peroxidasa endógena. A continuación el tejido fue incubado durante 60 min en PBS-T con normal donkey serum (NDS) 6% y albúmina de suero bovino (BSA) 2%. Los cortes fueron luego expuestos al anticuerpo monoclonal de ratón anti la subunidad α 1 del receptor glicinérgico (mAb2b de Synaptic Systems) 1:250 o al anticuerpo monoclonal de ratón anti la subunidad β (299E7 Synaptic Systems) 1:100, en PBS-T, NDS 6%, BSA 2%, 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavados con PBS-T e incubados durante 90 minutos en NDS con un anticuerpo secundario antimouse biotinilado (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, 139 USA) en una dilución 1:100. Luego de lavar con PBS-T los cortes fueron tratados con el complejo estándar ABC (Vector Standard Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 1:300. A continuación fueron procesados mediante el método de diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) que consiste en incubar los cortes en DAB 0.02% y peróxido de hidrógeno 0.03% en 50 ml de buffer

Tris 50 mM a pH 7.5, durante 8–10 minutos. Finalmente se realizó un contrateñido con Pyronina Y.

Detección de la subunidad $\alpha 1$ y de la colina-acetiltransfera (ChAT) por inmunofluorescencia

Para detectar la presencia de la subunidad $\alpha 1$ se realizó a su vez un ensayo de doble tinción en donde se combinó la inmunofluorescencia para la misma junto con el marcado de la colina-acetiltransfera con un anticuerpo goat anti ChAT 1:100 (Chemicon). Esto nos permitió identificar los somas de motoneuronas y visualizar con claridad sus prolongaciones. Se incubaron los cortes con los anticuerpos primarios durante 18 horas y se utilizaron como anticuerpos secundarios Alexa Fluor 555 Donkey anti-mouse IgG 1:1000 y Alexa Fluor 488 Donkey anti-Goat 1:500 (Molecular Probes).

Los preparados fueron examinados con microscopía confocal (Unidad de Microscopía Confocal de la Facultad de Medicina) y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software libre ImageJ.

Experimentos electrofisiológicos

Se utilizaron dos acercamientos experimentales para obtener respuestas mediadas por glicina y estudiar su modulación. En un grupo de experimentos se registraron corrientes producidas por la aplicación local de glicina, mientras que en otro se registraron corrientes sinápticas inhibitoras glicinérgicas provocadas por estimulación del núcleo supratrigeminal (eIPSCs).

Preparación de cortes de tronco encefálico

Los experimentos fueron realizados en ratas Wistar de entre 4 a 11 días de edad, las cuales fueron decapitadas utilizando una guillotina, su tronco encefálico fue removido y cortado en secciones transversales de 250 μm de espesor utilizando un vibrátomo (Leica VT1000S). Durante el procedimiento, el tejido se mantuvo en un baño con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) a 4 °C en el que el NaCl fue substituido por sacarosa. Se seleccionaron dos o tres rebanadas conteniendo el núcleo motor del trigémino (NMV) las cuales fueron incubadas en ACSF con NaCl durante 30 minutos a 35 °C. Finalmente se mantuvieron en ACSF a temperatura ambiente. El ACSF fue barbotado continuamente con una mezcla gaseosa de composición 95% O₂–5% CO₂.

Registro y método de estimulación

Se realizaron registros utilizando la técnica de patch-clamp en configuración de célula entera en motoneuronas trigeminales visualmente seleccionadas.

Las rebanadas fueron colocadas en una cámara de inmersión montada sobre una plataforma Gibraltar y perfundidas con ACSF oxigenado con 95% O₂–5% CO₂ a una velocidad de 1 ml/min y a temperatura ambiente (22–24 °C). Se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E600 FN (Nikon Instrument. Inc. Melville, NY, USA) equipado con óptica DIC-IR y un objetivo de inmersión en agua X40, para visualizar las neuronas dentro del NMV y guiar la ubicación del electrodo. Las imágenes fueron obtenidas a través de una cámara digital (Spot, Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI, USA) y visualizadas en el monitor de la computadora.

Los electrodos de patch fueron confeccionados a partir de vidrio para patch clamp (“patch clamp glass”, n° de catálogo 596800, A-M Systems, Inc., Carlsborg, WA, USA) con un estirador de pipetas (Modelo P-87, Sutter Instruments Co. Novato, CA, USA) y poseían resistencias de entre 5 a 8 MΩ.

Se aplicó presión positiva mientras se avanzaba hacia una neurona con la pipeta mediante un micromanipulador. La punta de la pipeta fue colocada de forma de hacer contacto con la superficie de la célula seleccionada, y la presión positiva fue liberada para obtener un sello de alta resistencia (≥ 1 GΩ). Se obtuvo acceso a la célula al aplicar una leve presión negativa. Registros de clampeo de voltaje fueron obtenidos con un amplificador Axopatch 200B (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) y digitalizados con un sistema de adquisición DigiDATA 1322A 16 bit programado con el software Axograph 4.9 software funcionando en una computadora Macintosh G4.

Las células fueron fijadas a diferentes voltajes y la resistencia en serie fue monitoreada de modo que fuera siempre menor a 20 MΩ a lo largo del experimento. Las señales fueron filtradas a 5 KHz y digitalizadas a 20 KHz.

Las propiedades de las motoneuronas fueron determinadas a partir de registros en condición de fijación de corriente. Se midió el potencial de membrana (Vm), la amplitud de la espiga y la Reobase (Rh, determinada como la mínima intensidad de corriente de 200 ms de duración que generan un potencial de acción). La Resistencia de entrada (Rin) fue medida como la pendiente de la relación voltaje-corriente obtenida por la aplicación de pulsos hiperpolarizantes. Por otra parte la Rin fue también estimada de manera directa como el máximo cambio en el Vm durante un pulso hiperpolarizante de 100pA, dividido por la magnitud de la corriente.

En condiciones de fijación de voltaje se registraron corrientes postsinápticas provocadas por la aplicación local de glicina (500 μM -1mM en ACSF) con un electrodo de patch posicionado a (10-20 μm) de la motoneurona registrada (Fig.1. A y B) a través de un Picospritzer II (General Valve, Corporation, NJ, USA). Se obtuvieron corrientes glicinérgicas a distintos comandos de voltaje, trabajando en presencia de bloqueantes gabaérgicos y glutamatergicos, y se midieron las corrientes máximas. El potencial de reversión se obtuvo a partir de la relación corriente-voltaje.

Para la estimulación extracelular de elementos presinápticos se llenó una pipeta con ACSF y se colocó dorsal al NMV en la región que corresponde con el núcleo supratrigeminal (SuV), en la Fig.1.C se muestra un esquema de la disposición de las pipetas de estimulación y registro. Pulsos pareados de 0.3 ms de duración, separados por 70 ms y de intensidad variable fueron dados cada 3 segundos utilizando un estimulador Grass S88 Stimulator y un SIU CCU. La intensidad del estímulo fue seleccionada de modo de fuera justo supraumbral para obtener una respuesta sináptica. Una vez obtenida la respuesta se procedía a bloquear posibles contribuciones gabaérgicas y glutamatergicas.

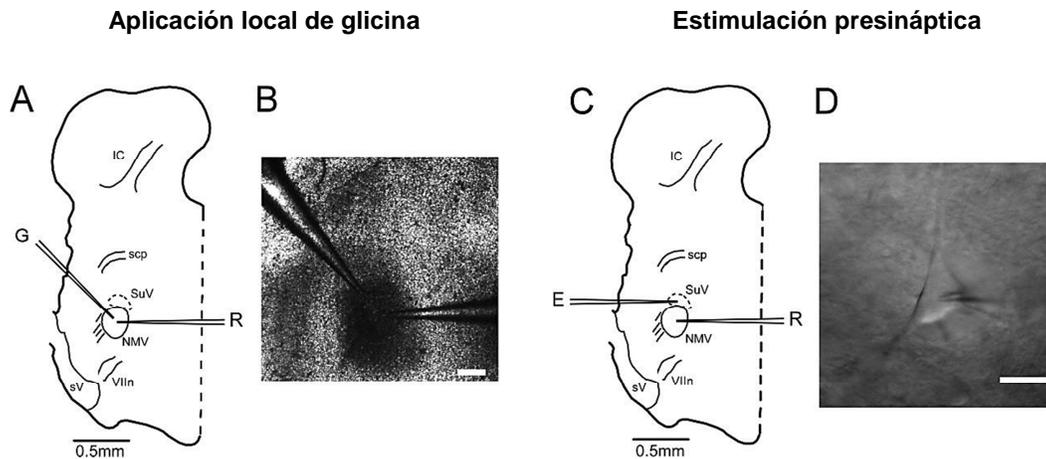


Fig. 1 Se obtuvieron registros rodajas conteniendo el SuV y el NMV. **A, C:** esquema de una sección de tronco encefálico mostrando la posición de los electrodos de registro (R) y estimulación (E), o de aplicación de glicina (G). (IC: colículo inferior; NMV: núcleo motor del trigémino; scp: pedúnculo superior cerebelar; SuV: núcleo supratrigeminal; sV: raíz espinal del nervio trigémino; VIIIn: fibras del nervio facial). **B:** Microfotografía de una sección de tronco encefálico obtenida mediante óptica DIC-IR durante un típico experimento. En el campo se observa el NMV con la pipeta de registro (derecha) y la pipeta de aplicación de glicina (izquierda) (barra de calibración: 200 μm). **D:** Se observa una motoneurona con la punta del electrodo de registro (barra de calibración: 30 μm).

Análisis

Las señales registradas fueron analizadas con el software Axograph 4.9 y Axograph X, y el análisis estadístico fue realizado con el Axograph X y en el Microsoft Office Excel. Se midió la amplitud de las corrientes inhibitorias postsinápticas provocadas (eIPSC) a partir del promedio de 35 muestras consecutivas. Se utilizó un test t de Student pareado para comparar los cambios en situación control y durante la droga. Los valores son expresados como medias \pm SE y el valor de significancia fue establecido como $p < 0.05$.

Las corrientes postsinápticas glicinérgicas espontáneas (sIPSCs) fueron detectadas y analizadas con el software Axograph X a partir de muestras de registros continuos de corriente de 30 segundos de duración. Para cada condición se utilizaron 50 muestras, se midió la amplitud y la frecuencia instantánea, calculada como $1/\text{intervalo interevento}$. Se realizaron histogramas de probabilidad acumulativa para la amplitud y frecuencia de los sIPSC y se utilizó el test Kolmogorov-Smirnov para comparar las distribuciones. El nivel de significancia se estableció para $p < 0.05$.

Drogas y soluciones

La solución utilizada para el registro y la incubación (ACSF) tenía la siguiente composición (en mM): NaCl, 124; KCl, 2.69; KH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 2; NaHCO₃, 26; glucose, 10; CaCl₂, 2; pH 7.4.

Las drogas fueron disueltas en ACSF a las concentraciones deseadas y se aplicaron en el baño cambiando la solución de perfusión control a la solución conteniendo la droga. Luego de obtenida una respuesta estable se aplicó ácido Kynurénico (3mM), o CNQX (10 μ M) y APV (50 μ M), y Bicuculina methobromide (10 μ M) para bloquear eventos sinápticos glutamatérgicos o mediados por GABA_A. Se utilizaron dos soluciones intracelulares según el experimento. Los experimentos destinados a observar los efectos de la glicina en las motoneuronas del NMV fueron realizados con un medio intracelular que se asemeja al medio intracelular propio de estas motoneuronas (en mM): Gluconato de K 148 mM, EGTA 0.2 mM, MgCl₂ 3 mM, HEPES 10 mM, NaGTP 0.3 mM, Na₂ATP 4 mM, la osmolaridad fue ajustada a 300 Osm/L. En los ensayos en los que nos propusimos modular las PKs, los electrodos fueron llenados con una solución compuesta por (en mM): KCl 34 mM, Gluconato de K 110 mM, EGTA 0.2 mM, MgCl₂ 3 mM, HEPES 10 mM, NaGTP 0.3 mM, Na₂ATP 4 mM, la osmolaridad fue ajustada a 300 Osm/L. Este medio intracelular junto con la solución extracelular, determina un potencial de equilibrio para el ión cloro calculado por la ecuación de Nernst a -27mV. En algunos experimentos se colocó Celeritrina 10 μ M en el medio intracelular utilizado para llenar la pipeta de registro.

Se utilizaron las siguientes drogas: Bicuculina methobromide obtenida de TOCRIS (Tocris Cookson Inc., Ellisville, MO, USA); la glicina, el CNQX, el APV, el ácido Kynurénico, la estriquina, la celeritrina, el Phorbol 12-13 diacetato y el 8-Br-cAMP provinieron de SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA).

Resultados

Estudio de la composición del receptor de glicina

Subunidad $\alpha 1$

La observación de los preparados estudiados con el anticuerpo para la subunidad $\alpha 1$ revelaron la presencia de esta proteína en motoneuronas trigeminales de rata neonatal (Fig.2.A). Los cortes revelados con DAB muestran la expresión de $\alpha 1$ a nivel de las prolongaciones celulares y una marca difusa citoplasmática en el soma celular.

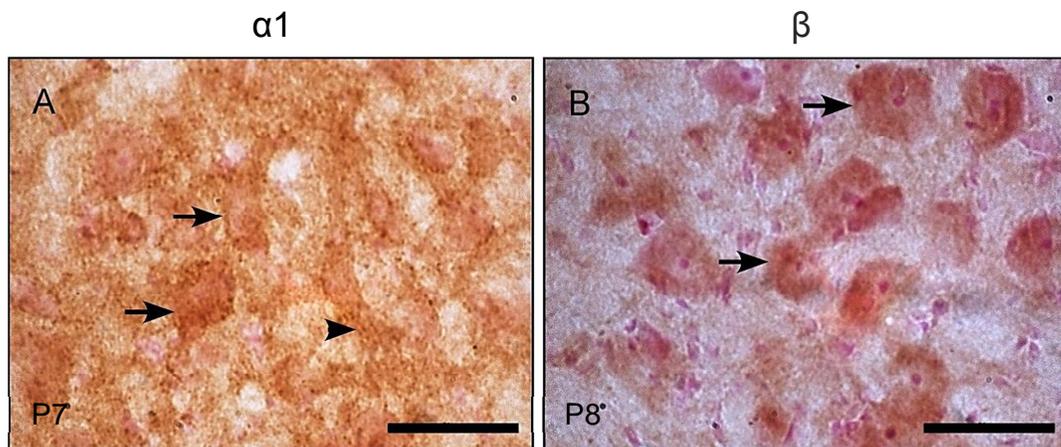


Fig. 2 Microfotografías de una sección de tronco encefálico conteniendo motoneuronas del NMV inmunoreactivas para subunidades $\alpha 1$ y β del GlyR. Los tejidos fueron procesados con la técnica de DAB y un contrateñido con Pyron Y. **A:** Motoneuronas inmunoreactivas para la subunidad $\alpha 1$, las flechas indican marcas citoplasmáticas en los somas celulares, la cabeza de flecha señala fibras inmunoreactivas (barra de calibración: 50 μm **B:** Motoneuronas inmunoreactivas para la subunidad β , las flechas indican marcas citoplasmáticas en los somas celulares. Nótese una ausencia de marca en las prolongaciones celulares. (Barra de calibración: 50 μm).

Los ensayos para detectar la subunidad $\alpha 1$ por inmunofluorescencia arrojan resultados un poco distintos (Fig.3 A y C). A diferencia de lo obtenido al revelar actividad peroxidasa con DAB no se obtuvo una marca citoplasmática en el soma de las células, se observa en cambio una clara señal en las prolongaciones celulares y en la

membrana de los somas de motoneuronas. La marca obtenida por la detección de ChAT fue la esperada, esta enzima se localiza intracelularmente y su marcado delinea las células marcando el soma y la extensión de sus prolongaciones (Fig.3 B y C).

Subunidad β

Se detectó la expresión de la subunidad β del receptor de glicina en motoneuronas trigeminales de rata neonatal (Fig.2.B). El revelado del anticuerpo con la técnica de DAB evidenció una marca en el soma de las células y escasa o ninguna señal en sus prolongaciones.

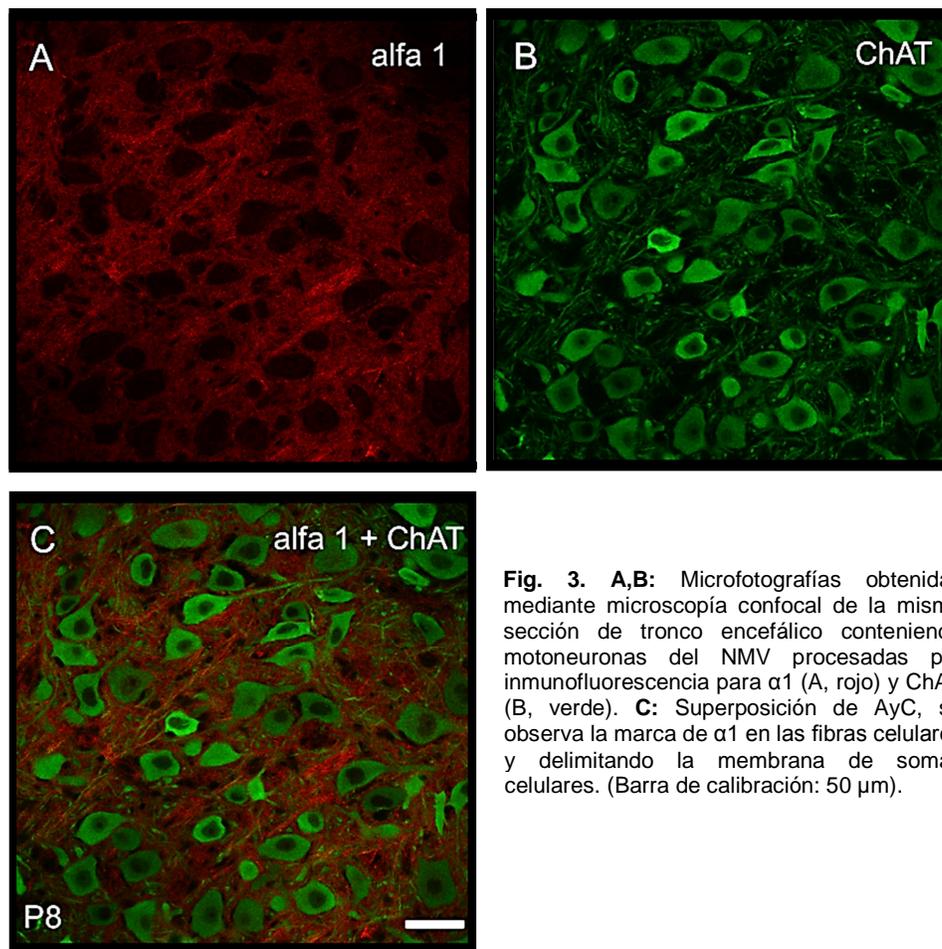


Fig. 3. A,B: Microfotografías obtenidas mediante microscopía confocal de la misma sección de tronco encefálico conteniendo motoneuronas del NMV procesadas por inmunofluorescencia para $\alpha 1$ (A, rojo) y ChAT (B, verde). **C:** Superposición de AyC, se observa la marca de $\alpha 1$ en las fibras celulares y delimitando la membrana de somas celulares. (Barra de calibración: 50 μ m).

Efecto de la glicina en motoneuronas del NMV

En preparaciones de rodajas de tronco encefálico se realizaron registros en condiciones de fijación de voltaje y de corriente en motoneuronas trigeminales. Se registraron las respuestas frente a la aplicación local de glicina (de 500 μ M a 1mM) en

22 células de 18 ratas P4-P11, de glicina en el baño (250-1mM) en 7 células de 4 ratas (P6-P8) y se comparó el efecto de este aminoácido sobre las propiedades de las motoneuronas en situación control. Al igual que en Pose et al, 2014 se utilizaron bloqueantes glutamatérgicos y gabaérgicos en el baño (CNQX 10 μ M, APV 50 μ M y Bicuculina methobromide 10 μ M) para aislar las respuestas glicinérgicas.

Las motoneuronas del trigémino registradas tenían un potencial de membrana de -63.21 \pm 1.30 mV (n=29). La aplicación de glicina en el baño extracelular produjo un aumento de la reobase y una pronunciada disminución en la Rin (control 147.25 \pm 9.81 M Ω , efecto 54.67 \pm 5.29 M Ω , n=7, p=0.053), la misma fue marginalmente significativa. En 5 de 7 células tuvo un efecto despolarizante sobre el potencial de membrana, control -66.22 \pm 0.92 mV, efecto -60.48 \pm 1.12 mV. En la figura 4.A y B se muestra un registro de una célula en situación control y en presencia de este aminoácido en el baño. En 4.C la curva IV muestra el efecto sobre la resistencia luego de aplicada la glicina para esa misma célula.

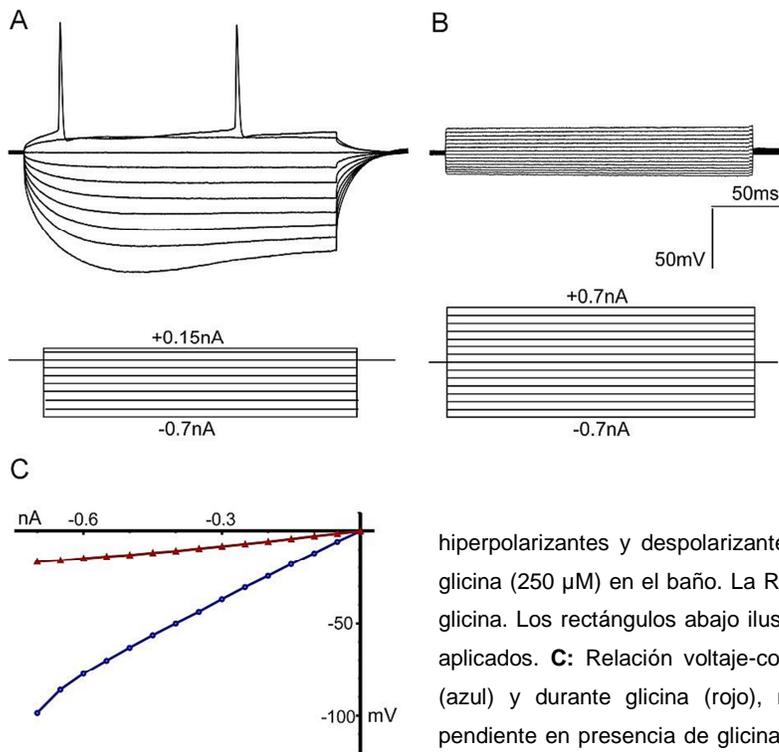


Fig. 4. Efectos inhibitorios sobre motoneuronas del NMV durante la aplicación de glicina. **A:** Respuesta de una motoneurona a una familia de pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes en situación control. **B:** Respuesta de la misma motoneurona a una familia de pulsos

hiperpolarizantes y despolarizantes durante la aplicación de glicina (250 μ M) en el baño. La Rh aumentó en presencia de glicina. Los rectángulos abajo ilustran los pulsos de corriente aplicados. **C:** Relación voltaje-corriente en situación control (azul) y durante glicina (rojo), note la disminución en la pendiente en presencia de glicina respecto al control. La Rin disminuyó de 127 a 27 M Ω .

La aplicación local de glicina provocó una disminución de la R_{in} de $74.12 \pm 14.54 \text{ M}\Omega$ a $53.43 \pm 13.75 \text{ M}\Omega$ ($n=14$, $p<0.05$) (Fig.5). En 5 de 8 células registradas la glicina tuvo un efecto despolarizante, control $-63.76 \pm 1.30 \text{ mV}$, efecto $-55.94 \pm 2.53 \text{ mV}$, y en el resto produjo una hiperpolarización del V_m . Los efectos de la glicina fueron reversibles y bloqueados por estricnina.

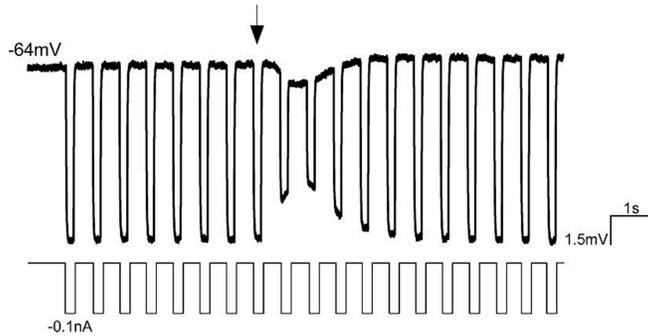


Fig 5: Registro de potencial de membrana durante la aplicación de pulsos hiperpolarizantes. La aplicación de glicina (flecha) hiperpolariza el potencial de membrana en -2.1 mV , y disminuye la resistencia de entrada de 113 a $71 \text{ M}\Omega$.

En experimentos de fijación de voltaje, se registraron corrientes glicinérgicas a diferentes valores de potencial de membrana aplicando glicina yuxtacelular, las corrientes se midieron en el punto máximo de amplitud para cada valor de voltaje, y se construyó el gráfico IV que permitió obtener el valor de potencial para el cual se invierten las corrientes glicinérgicas. Se obtuvo un valor para el potencial de reversión de estas corrientes de $-62,67 \pm 2.32 \text{ mV}$ ($n=13$) (Fig.6.A y B).

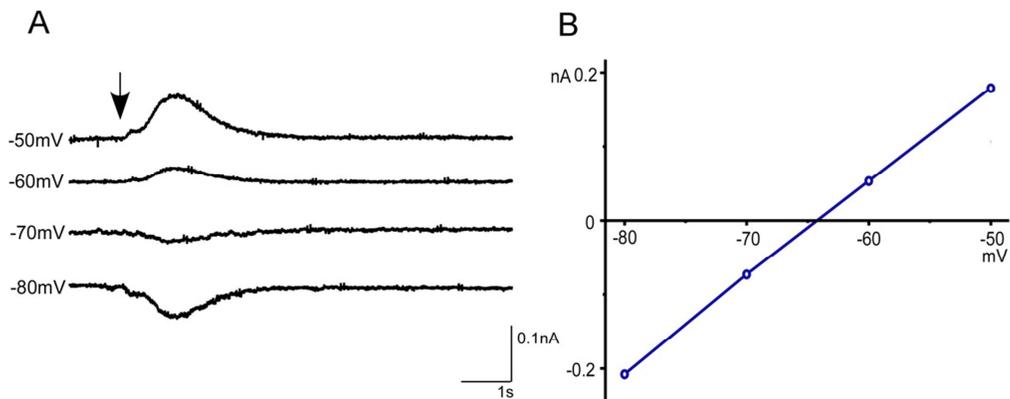


Fig. 6.A: Respuesta de una motoneurona a la aplicación de glicina registrada a diferentes comandos de voltaje. La flecha indica el instante en el que se aplicó glicina ($500 \mu\text{M}$). **B:** Relación corriente-voltaje, el potencial de reversión de esta corriente fue de -64.39 mV .

Modulación de la sinapsis glicinérgica por PK

Se registraron células de ratas neonatales (P4-P10) en condiciones de fijación de voltaje. Utilizando un medio intracelular con una concentración alta de cloro de modo que el potencial de equilibrio para este ión (E_{Cl^-}) de acuerdo con la ecuación de Nernst (EN) sea -27 mV, se procedió a explorar el efecto de la glicina en las motoneuronas del NMV frente a la aplicación de drogas que modulan la PKA y la PKC. Este medio permitió evocar corrientes de glicina de entrada de un tamaño considerable (-50 a -600 pA) y visualizar mejor la modulación de la misma trabajando a un potencial de membrana cercano al que presentan normalmente estas motoneuronas.

Fue posible obtener el valor de reversión para la corriente evocada por la aplicación local de glicina a partir de la extrapolación de la relación lineal corriente-voltaje (Fig.7. A y B), tal que la misma fue -23.13 ± 3.08 mV ($n=6$).

Realizamos experimentos de estimulación local mediante aplicación de glicina en 17 células de 14 ratas neonatas (P4-P10), a su vez en rebanadas que contenían el NMV y el SuV, se aplicaron estímulos extracelulares en el SuV para provocar una respuesta sináptica mediada por glicina (eIPSC) en 6 células de 6 ratas neonatas P5-P8.}. El SuV contiene interneuronas premotoras excitatorias e inhibitorias (Nakamura et al, 2008) por lo que obtuvimos respuestas mediadas por glicina trabajando en presencia de Bicuculina y Kynurénico, o Bicuculina y CNQX y APV, en el baño durante todo el experimento.

En aquellos experimentos en que se identificó la presencia de corrientes postsinápticas glicinérgicas espontáneas (sIPSC) se procedió a evaluar los efectos de las drogas sobre las mismas.

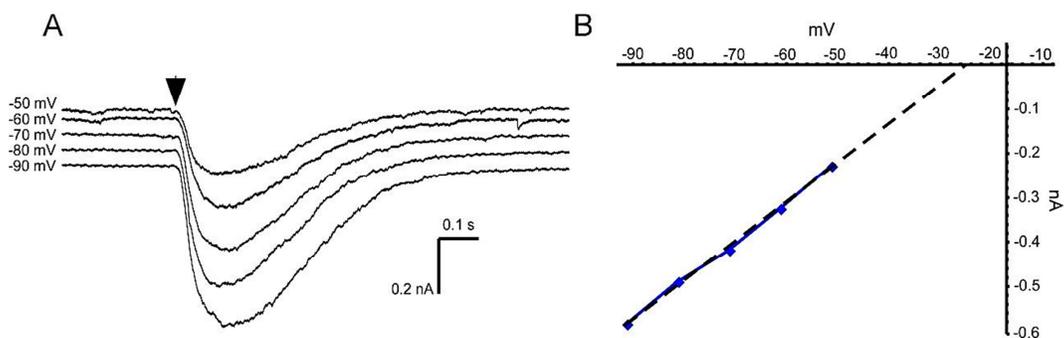


Fig. 7. Registros en condición de fijación de voltaje utilizando un medio intracelular con 40mM de ión cloro. **A:** Respuesta de una motoneurona a la aplicación de glicina registrada a diferentes comandos de voltaje. La flecha indica el instante en el que se aplicó glicina (500 μM). **B:** Relación corriente-voltaje, el ajuste lineal da un potencial de reversión de esta corriente a -25.05 mV.

Modulación por 8-Br-cAMP

Se utilizó como modulador de la PKA el activador 8-Br-cAMP en una concentración de 1 mM en el baño. Frente a la aplicación de esta droga se registró un aumento en la resistencia de entrada, control $107.67 \pm 31.43 \text{ M}\Omega$, efecto $127.77 \pm 32.13 \text{ M}\Omega$ (n=3), una tendencia a aumentar la excitabilidad celular y a disminuir el potencial de membrana. En relación al efecto del 8-Br-cAMP sobre la corriente producida por aplicación local de glicina fijando el voltaje a -70 mV, existió una gran variabilidad en las cuatro células en las que se administró esta droga (tabla 1).

I (pA) Control	I (pA) 8-Br-cAMP	Efecto porcentual
314,19	259	17.5% Disminución
437,1	592,5	35.5% Aumento
130,46	100,42	23% Disminución
125,44	163,49	30.3% Aumento

Tabla 1. Valores de amplitud de corrientes provocadas por aplicación de glicina en motoneuronas del NMV en situación control y en presencia de 8-Br-cAMP, el comando de voltaje fue -70 mV.

Modulación por PDA

El PDA, activador de la PKC, fue suministrado en el baño en una concentración de 3 μM durante 20 minutos, y tuvo notorios efectos sobre la neurotransmisión glicinérgica.

Efecto sobre las motoneuronas del NMV

En 4 de 6 células registradas de 5 ratas neonatales, en condiciones de fijación de corriente, se observó un aumento del potencial de membrana, control $-62.25 \pm 3.25 \text{ mV}$, efecto $-65.47 \pm 3.22 \text{ mV}$ ($p < 0.05$) acompañado de una disminución discreta de la resistencia de entrada, control $85.57 \pm 16.57 \text{ M}\Omega$, efecto $82.52 \pm 19.14 \text{ M}\Omega$.

Efecto sobre la corriente provocada por aplicación local de glicina

El efecto del PDA en la corriente provocada por la aplicación local de glicina fue examinada en registros en condiciones de fijación de voltaje a -70 mV. En esta situación la glicina produjo una corriente de entrada de entre -40 y -600 pA de amplitud, según la célula. El efecto de PDA sobre la amplitud de esta corriente fue dependiente de la célula. En un 25% de las neuronas (3 de 12) ocurrió un aumento promedio de un $52\% \pm 19\%$ ($p = 0.103$) y en las demás no se registraron cambios claros. En la Fig.8 se

muestran dos gráficos normalizados de corrientes provocadas por aplicación local de glicina en presencia de PDA para dos células que responden de forma distinta a la droga: en A el PDA aumenta la corriente producida por la aplicación yuxtacelular de glicina y vuelve a valores control luego del lavado, en B el PDA no produce efecto o en todo caso se observa una disminución no significativa de la corriente. Al final del experimento se observa el bloqueo completo de la misma por aplicación de estricnina.

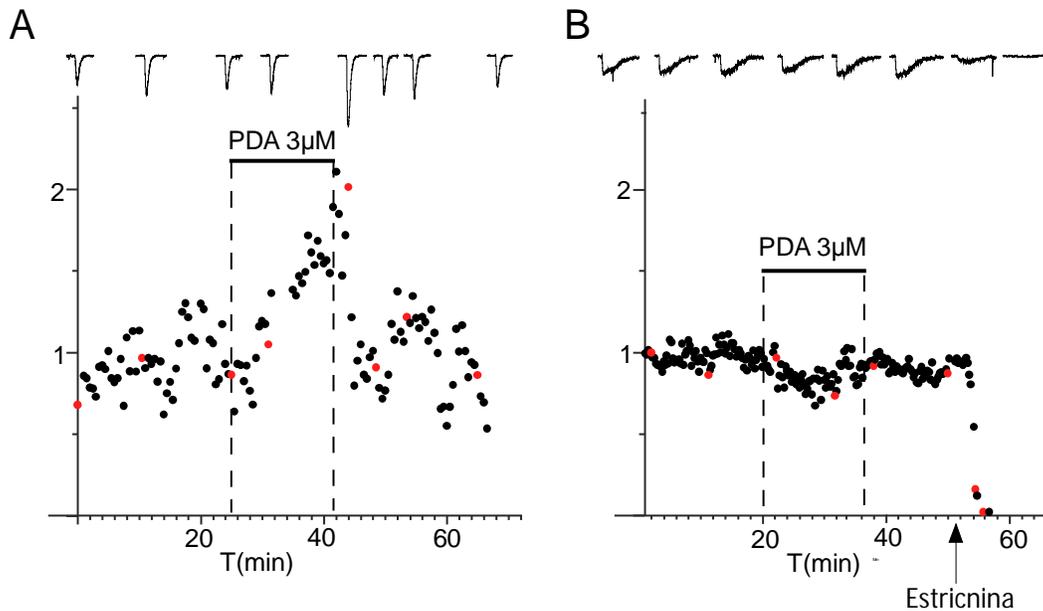


Fig. 8: Gráficos de la amplitud de la corriente provocadas por la aplicación de glicina en función del tiempo normalizada (relativo a la amplitud control) para dos experimentos en los que se administró PDA (3 μM) en el baño. Arriba se observan registros de corriente correspondientes a los puntos en rojo del gráfico. **A:** La aplicación de glicina (1mM) se realizó a intervalos de 30s, se observa como en presencia de la droga la corriente aumenta a valores cercanos al doble de los del control. El efecto desaparece luego del lavado. **B:** La aplicación de glicina (1mM) se realizó a intervalos de 15s, se observa una leve disminución no significativa en presencia de PDA. La flecha indica la administración de estricnina (1 μM), se observa como rápidamente bloquea el efecto de la glicina.

Efecto sobre la corriente sináptica provocada por estimulación presináptica

La estimulación del SuV por pulsos pareados, generó corrientes de entrada de entre -10 y -180 pA de amplitud que fueron bloqueables completamente por estricnina. Las mismas correspondían con corrientes sinápticas inhibitorias monosinápticas.

En presencia de PDA se registró un aumento en la amplitud de los eIPSC en todas las células registradas (control -16.69 ± 2.11 pA, efecto -41.74 ± 4.68 pA, $n=6$, $p < 0.05$) (Fig.9.B). El efecto se acompañó de una disminución no significativa de un $15.0 \pm 5.6\%$ de la potenciación por pulsos pareados (Fig.9.A).

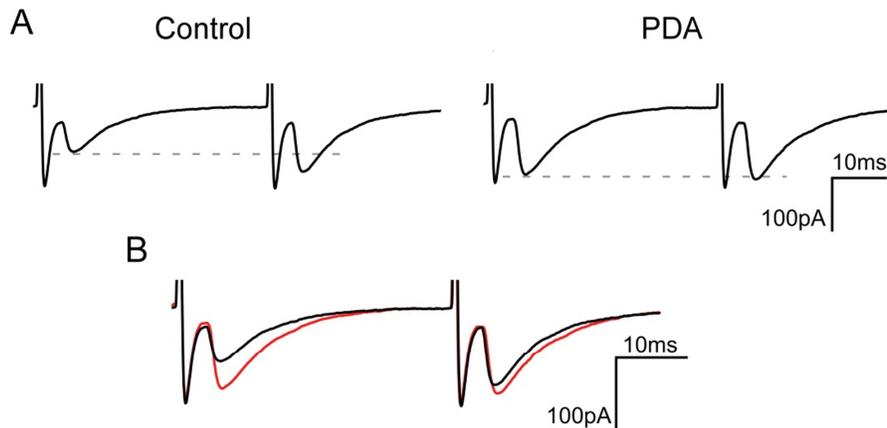


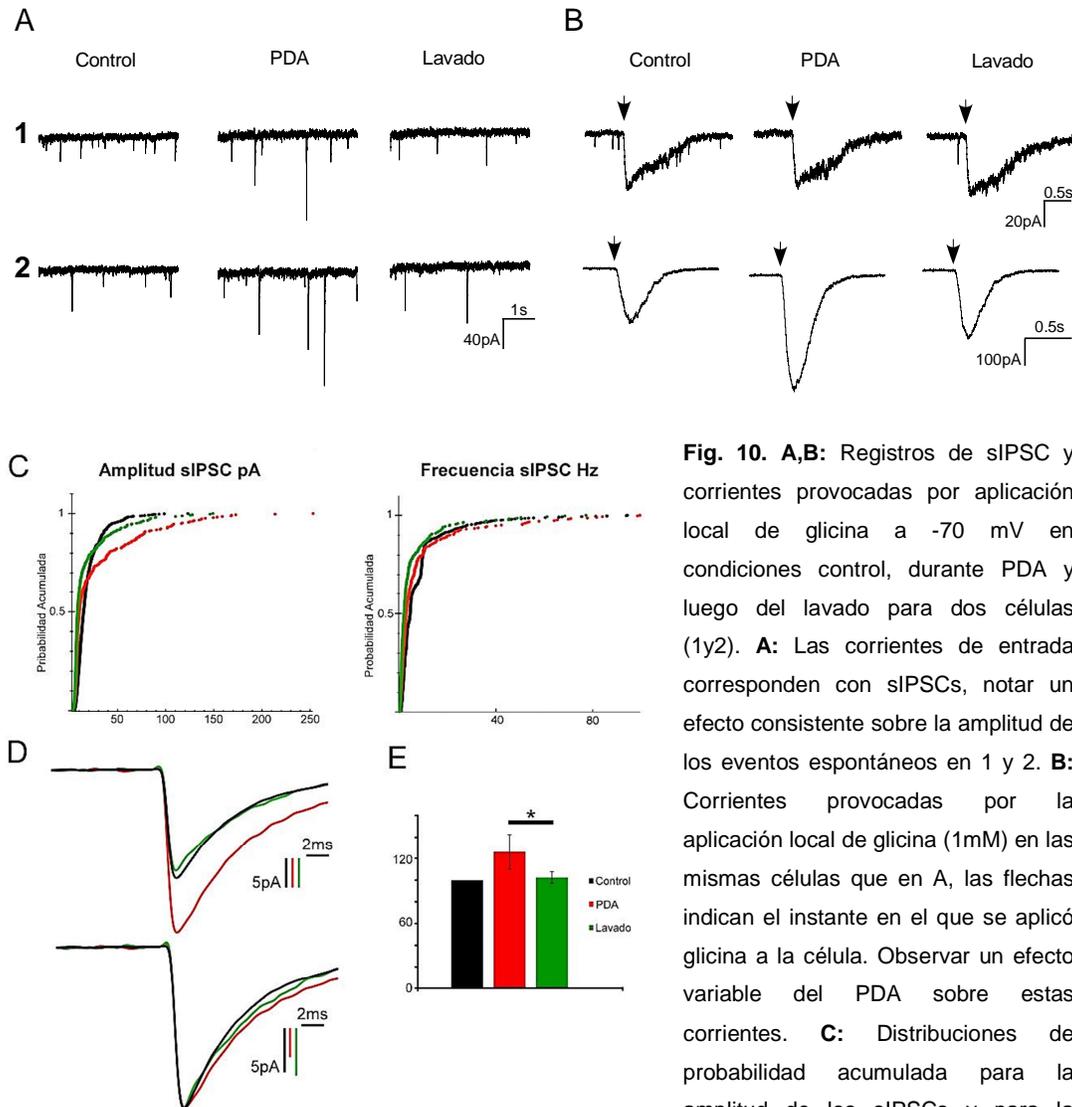
Fig. 9.A: Registros de corrientes postsinápticas glicinérgicas provocadas (eIPSC) por la estimulación extracelular de elementos presinápticos en el SuV, el voltaje se mantuvo a -70 mV. Cada registro corresponde a un promedio de 35 barridos individuales en situación control y durante PDA. Nótese un aumento de la corriente en presencia de PDA, y una disminución de la potenciación indicado por la línea punteada en gris. **B:** Los registros en A fueron superpuestos, se observa un aumento de la corriente en presencia de PDA (rojo) en comparación con la situación control (negro).

Efecto sobre los eventos glicinérgicos espontáneos

En las sinapsis químicas se considera que los neurotransmisores se liberan de las terminales sinápticas en paquetes discretos o cuantos, que corresponden con el contenido de una vesícula de neurotransmisor. La liberación de estos cuantos puede ocurrir de manera espontánea en células neuronales. Las corrientes inhibitorias postsinápticas espontáneas (sIPSCs) son el resultado de la actividad espontánea en una neurona presináptica producto de un potencial de acción o por la liberación espontánea y aleatoria de vesículas de neurotransmisor, los llamados mini IPSCs (mIPSCs).

En cuanto a los sIPSCs, en 7 de 10 células registradas, se observó un aumento significativo en su amplitud luego de la aplicación de PDA (control -17.40 ± 1.76 pA, efecto -21.69 ± 2.00 pA, $p < 0.01$), en la Fig 10.A.C y D se muestra un ejemplo. En relación a la frecuencia instantánea, hubo una tendencia al aumento, pero este cambio fue variable y no significativo. No se observaron cambios en el tiempo de ascenso de los sIPSCs durante PDA, mientras que sí hubo cambios en la constante de tiempo de relajación (control 8.47 ± 1.09 ms, efecto 9.93 ± 1.37 ms, $p < 0.05$) (Fig.10.D). Este cambio

en la cinética se observó en 8 de 10 células y no se correlacionó significativamente con los cambios en la amplitud de los sIPSCs.



Amplitud sIPSC pA

Frecuencia sIPSC Hz

Probabilidad Acumulada

Probabilidad Acumulada

2ms

5pA

2ms

5pA

Control

PDA

Lavado

*

Llamativamente el efecto sobre los sIPSCs se registró independientemente de cual fuera el efecto del PDA sobre las corrientes inducidas por la aplicación local de glicina. En la Fig. 10 se muestran registros de corriente para dos células (1 y 2) en situación

control y en presencia de PDA. Se observa como a pesar de producirse un aumento en la amplitud de los sIPSCs en ambas células (A), las corrientes provocadas de glicina son afectadas en forma diferente por el PDA (B).

Discusión

En el presente trabajo nos propusimos estudiar la composición de los receptores de glicina en motoneuronas del NMV, la respuesta de estas neuronas a este aminoácido y evaluar una posible modulación por parte de PKs sobre la neurotransmisión. Se trata del primer estudio de la expresión del receptor de glicina en el NMV utilizando técnicas inmunohistoquímicas. A su vez hasta el momento no existen estudios electrofisiológicos donde se evalúe el efecto de las PKs sobre la neurotransmisión mediada por glicina en este núcleo motor.

Los resultados presentados corresponden con resultados preliminares que apuntan a establecer una relación entre la expresión de ciertas subunidades y su modulación diferencial por PKs.

El receptor de glicina en motoneuronas del NMV

Los ensayos histológicos dirigidos a evidenciar la composición del receptor de glicina indican que el GlyR en ratas de P7 ya expresan la subunidad $\alpha 1$. Esto fue observado utilizando el revelado de actividad peroxidasa por DAB y mediante inmunofluorescencia. La señal en el citoplasma del soma celular observado en los tejidos revelados con DAB no se reprodujo en los ensayos de inmunofluorescencia. La diferencia obtenida en las dos situaciones experimentales puede deberse a que el ensayo de actividad peroxidasa es una técnica que amplifica enormemente la señal, por lo que una baja expresión de $\alpha 1$ en el citoplasma de las motoneuronas podría no ser detectada mediante inmunofluorescencia.

La presencia de esta proteína transmembrana en el citoplasma de los somas de las motoneuronas, puede corresponder con que el receptor es en parte traducido en el soma celular (Dumoulin et al., 2009) y es incorporado posteriormente en la membrana de distintas regiones de la motoneurona. Sería interesante realizar un ensayo de colocalización de $\alpha 1$ con gefirina para apoyar esta hipótesis ya que el tráfico vesicular del GlyR es dependiente de gefirina en cuanto los clusters de este receptor se encuentran asociados a esta proteína de andamiaje durante su trayectoria intracelular (Hanus et al., 2004, Maas et al., 2006). Esperaríamos encontrar que la gefirina no sólo se expresa en la membrana celular de estas motoneuronas sino que también se

localiza intracelularmente, presentando una distribución que colocaliza con la expresión de $\alpha 1$.

En ensayos inmunohistoquímicos realizados en rata de P21 deja de observarse esta marca citoplasmática (Fig 11), puede que a P7 nos encontremos en un proceso muy activo de recambio de subunidades por lo que existiría un aumento en la traducción de $\alpha 1$ a nivel del soma.

Los experimentos inmunohistoquímicos para la subunidad β requirieron una alta concentración de anticuerpo primario y largos tiempos de revelado con DAB. La ausencia de marca para esta proteína en las prolongaciones celulares fue sorprendente ya que se acepta que los receptores funcionales poseen la subunidad β y al menos un tipo de subunidad α . La presencia de la subunidad $\alpha 1$ en las prolongaciones celulares de ratas neonatales en ausencia de marca para la β podría suponer falta de receptores funcionales. Sin embargo, es posible que la falta de marca para la subunidad β se deba al anticuerpo utilizado. Una concentración baja de receptores en las prolongaciones de este grupo etario podría no ser suficiente para ser detectado por nuestro anticuerpo. Actualmente nos proponemos estudiar la expresión de esta proteína con un nuevo anticuerpo.

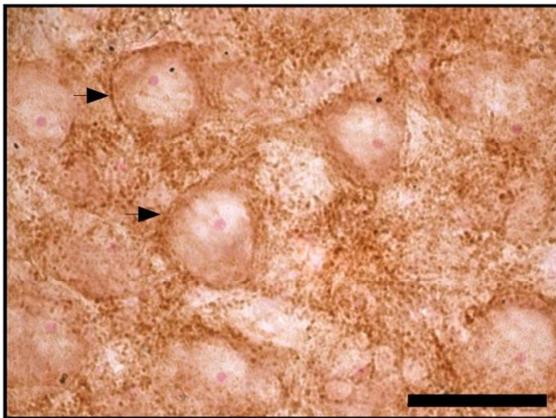


Fig. 11. Microfotografía de una sección de tronco encefálico de rata P21 conteniendo motoneuronas del NMV inmunoreactivas para la subunidad $\alpha 1$ del GlyR. El tejido fue procesado con la técnica de DAB y un contrateñido con Pyronina Y. Las flechas indican una marca delimitando los somas celulares. Notar ausencia de marca en el citoplasma de los cuerpos neuronales (barra de calibración: 50 μm).

Efecto de la glicina en motoneuronas del NMV

En relación a los experimentos dirigidos a caracterizar la respuesta de las motoneuronas del nervio trigémino frente a la aplicación de glicina, los resultados fueron consistentes con los de la literatura, tuvo efectos inhibidores. La glicina produjo una importante disminución de la resistencia de entrada en las motoneuronas debido a

la apertura de canales de cloro dependientes de este aminoácido que son sensibles a la estricnina.

El efecto de la glicina sobre el potencial de membrana depende del potencial de reversión para el ión cloro, es decir de las concentraciones intra y extracelulares de este ión. La aplicación local de glicina en nuestra preparación en general despolariza las motoneuronas. Es sabido que durante los primeros días del desarrollo postnatal los transportadores de cloro, que determinan la concentración intracelular para el ión cloro, aún no se expresan como en el animal adulto. En consecuencia, las motoneuronas neonatales presentan una concentración intracelular de cloro mayor que las maduras y un E_{Cl^-} más despolarizado que el potencial de membrana, por lo que la acción de la glicina provoca la salida de cloro despolarizando la célula. Si bien nuestro acercamiento experimental tiene como intención fijar la concentración interna de cloro utilizando un medio intracelular cuya composición corresponde al que presentan las motoneuronas adultas, el potencial de reversión obtenido distó del calculado por la EN y corresponde con valores cercanos al potencial de membrana de reposo de estas motoneuronas. Es posible que no estemos fijando la concentración de cloro en toda la célula por lo que la acción de la glicina va a depender de la zona estimulada y del potencial de membrana que presenta la neurona registrada. Es relevante mencionar que si bien la aplicación local de glicina produjo una despolarización, no generó un aumento en la excitabilidad celular en nuestros experimentos. La apertura de los canales de cloro disminuyen la R_{in} de la célula aumentando la R_h de la motoneuronas, lo que se traduce en una disminución de la excitabilidad celular, es decir una inhibición.

Modulación por PKs

Los resultados experimentales producto de la aplicación de PDA sobre las motoneuronas del NMV fueron complejos. Observamos una modulación positiva de los sIPSCs que no se reproduce cuando aplicamos glicina yuxtacelular. Más específicamente el activador de la PKC produjo efectos poco consistentes de célula en célula cuando la glicina fue aplicada de manera local. Este acercamiento experimental es claro que no corresponde con una situación fisiológica real pero nos permitía evaluar el efecto del PDA solamente sobre la célula postsináptica. Los resultados obtenidos sugieren una modulación del receptor pero la misma no fue consistente. Es posible que la glicina aplicada de esta manera se una en ocasiones, a receptores tanto sinápticos como extrasinápticos y que los mismos respondan de manera diferencial al PDA. Cada vez se conoce más la importancia de la neurotransmisión no sináptica mediada por receptores extrasinápticos, involucrada

en la modulación tónica y lenta de la actividad neuronal (Muller et al., 2008). Se postula que la composición de los receptores extrasinápticos difiere de la composición que poseen los receptores sinápticos por lo que también son distintas sus propiedades y modulación. En particular, se considera que los GlyR extrasinápticos son receptores homoméricos formados por la subunidad $\alpha 2$ ya que poseen una cinética lenta compatible con una adaptación para la liberación no sináptica de glicina (Mangin et al., 2003). La fosforilación de esta proteína por acción de la PKC ha sido sugerida por lo que podría explicar la variabilidad en nuestros resultados.

Se acepta en general que el aumento de la amplitud de mIPSCs sin cambios en su frecuencia está asociado con un efecto sobre los receptores y no con un aumento en la cantidad de neurotransmisor liberado. Este aumento correspondería con una mayor sensibilidad de los receptores al neurotransmisor o un aumento en la cantidad de receptores presentes en la sinapsis. A su vez en sinapsis glicinérgicas el cierre de los receptores es el factor que determina la constante de relajación de los mIPSCs y no su desensibilización o la re-unión de la glicina al receptor (Singer et al, 1999), así como tampoco es influenciada por la recaptación de este neurotransmisor (Singer et al., 1998). Nuestros experimentos no fueron realizados en TTX por lo que no podemos afirmar que los eventos de corriente espontánea registrados correspondan en su totalidad con mIPSCs. Por lo tanto, el aumento de la amplitud de los sIPSCs podría ser explicado por una mayor sensibilidad de los GlyR frente al neurotransmisor liberado espontáneamente por la neurona presináptica, un aumento en el número de GlyR en la sinapsis o un aumento de la cantidad de glicina liberada en cada evento espontáneo. Dado que el efecto del PDA sobre la amplitud se acompaña de un aumento en la constante de relajación consideramos que existió un claro efecto postináptico a nivel de los receptores de glicina. Respecto a los cambios en la amplitud de los sIPSCs, no podemos descartar que el efecto observado se deba en parte o en su totalidad a una modulación positiva presináptica. Existen evidencias de que la PKC actúa sobre la liberación de neurotransmisor en otras sinapsis (Vaughan et al., 1998).

A su vez, el aumento de la corriente de los eIPSCs obtenido en presencia de PDA en experimentos de estimulación del NuV es consistente con una modulación positiva de la sinapsis glicinérgicas. En estas condiciones observamos además una disminución de la potenciación al efectuar pulsos pareados. La misma no fue significativa pero una tendencia a disminuir la facilitación durante PDA sugiere un efecto sobre la neurona presináptica.

El conjunto de los datos nos lleva a postular que nos encontramos frente a una modulación a ambos niveles. Los GlyR podrían ser más sensibles a la glicina y/o permanecerían un mayor tiempo abiertos en presencia de este aminoácido cuando son expuestos a PDA. Es posible también que la activación de la PKC tenga consecuencias en el reclutamiento de receptores en la sinapsis glicinérgica. Se propone que la gefirina abunda en la sinapsis proveyendo un exceso de sitios de unión para acomodar más receptores en fenómenos de plasticidad (Choquet et al., 2013). A su vez, esta droga favorecería la liberación de glicina desde la neurona presináptica. Actualmente nos proponemos realizar experimentos de estimulación presináptica en presencia de PDA en el baño y simultáneamente utilizar un bloqueante de la PKC en el medio intracelular. De este modo los efectos observados sobre las eIPSCs corresponderían solamente con un efecto a nivel presináptico. Los primeros datos obtenidos utilizando el inhibidor de la PKC celeritrina indican una persistencia del efecto positivo sobre estas corrientes.

La activación de PKA por 8-Br-cAMP no produjo resultados consistentes sobre las corrientes provocadas por glicina aplicada de manera local. Sin embargo, existen antecedentes de experimentos de estimulación presináptica realizados en el laboratorio, en los que esta droga produce una disminución consistente pero no significativa de los eIPSC, control 69.30 ± 28.59 pA, efecto 45.25 ± 21.41 pA ($n=4$, $p=0.081$). Este fenómeno se correspondería con el mismo observado frente a la aplicación de PDA. Una fuerte variabilidad del efecto de la droga sobre las corrientes generadas por la aplicación yuxtacelular del neurotransmisor, en contraposición con un efecto consistente sobre los eIPSC. Interesantemente no se encuentran descritos sitios consenso de fosforilación para PKA en la subunidad $\alpha 2$ por lo que este efecto no podría ser explicado por una modulación a nivel de los receptores extrasinápticos. Será necesario profundizar con nuevos experimentos para dar cuenta de estos resultados.

Finalmente es importante mencionar por cuáles mecanismos fisiológicos podrían ser activadas estas PKs para que desarrollen su efecto sobre las sinapsis glicinérgicas. En este sentido se destaca que los núcleos motores reciben múltiples aferencias conteniendo una amplia variedad de neurotransmisores y neuromoduladores, algunos de los cuales podrían activar estas quinasas (Rekling et al, 2000). Un posible candidato para la PKC es el receptor de serotonina 5-HT₂ sobre el cual existen evidencias de que su activación modula positivamente receptores glicinérgicos (Xu et al., 1996). La unión de la serotonina a este receptor activa la fosfolipasa C

aumentando los niveles de diacilglicerol que es un importante activador endógeno de la PKC (Hoyer et al., 1994). En cuanto a la PKA, la entrada de Ca^{2+} mediada por receptores NMDA puede provocar la producción de AMPc por vía de la adenilato ciclasa sensible al complejo Ca^{2+} /Calmodulina (Chetkovich et al., 1991).

Conclusiones

Los receptores de glicina en motoneuronas del NMV en ratas neonatales (P7) expresan las subunidades $\alpha 1$ y β . La presencia de la subunidad $\alpha 1$ en las prolongaciones celulares de ratas neonatales en ausencia de marca para β podría suponer falta de receptores funcionales. La presencia de $\alpha 1$ en ratas neonatales era esperado de acuerdo con la literatura que apoya una maduración del receptor ocurriendo un recambio de la subunidad $\alpha 2$ por la $\alpha 1$. Sería interesante estudiar la expresión de $\alpha 2$ y observar si los receptores extrasinápticos están compuestos por esta subunidad, ya que ha sido reportada como responsable de la neurotransmisión tónica no sináptica.

La neurotransmisión glicinérgica en el NVM es sensible a la activación de PKC. Las características de los efectos sobre los sIPSC en las células registradas indican una modulación postsináptica positiva de los receptores de glicina a pesar de que este efecto no se reproduce con facilidad al aplicar glicina localmente. Estos resultados pueden deberse a la activación y modulación diferencial de receptores sinápticos y extrasinápticos. A su vez, la acción del PDA sobre los eIPSC sugiere un efecto sobre la liberación de neurotransmisor.

En conjunto los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que las sinapsis glicinérgicas son moduladas positivamente por la PKC y en esto participan seguramente fenómenos pre y postsinápticos. Actualmente nos proponemos desarrollar experimentos que permitan aislar estas contribuciones y así poder estudiar el efecto de la activación de la PKC específicamente sobre la célula postsináptica.

Estos resultados forman parte de un estudio más grande que pretende evidenciar una relación entre los tipos de receptores expresados en las motoneuronas del NMV y su modulación por PKs. Los datos que componen esta tesina fueron presentados en la XV Jornada de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, en Setiembre del presente año,

y corresponden con el primer estudio de la composición del receptor de glicina en motoneuronas trigeminales utilizando técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia; acompañada de un estudio electrofisiológico que apunta a evaluar el efecto de PKs sobre las corrientes mediadas por glicina. Hasta el momento no existen publicaciones de un estudio similar por lo que esperamos que el desarrollo de este trabajo culmine en un manuscrito que contribuya al conocimiento general de los receptores de glicina en el sistema nervioso central, y en la comprensión de los mecanismos que modulan la transmisión sináptica inhibitoria mediada por este aminoácido.

Bibliografía

- **Agopyan, N., Tokutomi, N. y Akaike N. (1993)** Protein kinase A-mediated phosphorylation reduces only the fast desensitizing glycine current in acutely dissociated ventromedial hypothalamic neurons. *Neuroscience* 56: 605–615
- **Aguayo, L.G, Zundert, B., Tapia, J.C., Carrasco, M. & Alvarez, F.J. (2004)** Changes on the Properties of Glycine Receptors during Neuronal Development. *Brain Research. Brain Research Reviews* 47, no. 1–3 (December): 33–45.
- **Anderson, W., Graham, B., Beveridge, N., Tooney, P., Brichta, A. y Callister R. (2009)**. Different forms of glycine- and GABAA-receptor mediated inhibitory synaptic transmission in mouse superficial and deep dorsal horn neurons. *Mol Pain* 5: 65
- **Chetkovich, D.M., Gray, R., Johnston, D., Sweatt, J.D. (1991)**. N-Methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca²⁺ channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 6467–6471.
- **Choquet, D & Triller, A. (2013)**. The Dynamic Synapse. *Neuron* 80, no. 3.691–703.
- **Dumoulin, A., Triller, A., y Kneussel, M. (2009)** Cellular Transport and Membrane Dynamics of the Glycine Receptor. *Front Mol Neurosci.* 2: 28.
- **Dutertre, S., Becker, CM. & Betz, H. (2012)** Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem.* Nov 23;287(48):40216-23.
- **Dlugaiczek, J., Singer, W., Schick, B., Iro, H., Becker, K., Becker, C. M., Zimmermann, U., Rohbock, K., & Knipper, M. (2008)** Expression of glycine receptors and gephyrin in the rat cochlea. *Histochem. Cell Biol.* 129, 513–523
- **Fritschy, JM., Harvey, RJ., & Schwarz, G. (2008)** “Gephyrin: Where Do We Stand, Where Do We Go?” *Trends in Neurosciences* 31, no. 5: 257–64.
- **Fujita, M., Sato, K., Sato, M., Inoue, T., Kozuka, T., y Tohyama, M. (1991)** Regional distribution of the cells expressing glycine receptor B subunit mRNA in the rat brain, *Brain Research*, Volume 560, Issues 1–2, 27 September, Pages 23-37, ISSN 0006-8993, 10.1016/0006-8993(91)91210-R.
- **Gibbs, C.S., Knighton, D.R., Sowadski, J.M., Taylor, S.S., Zoller, M.J. (1992)** Systematic mutational analysis of cAMP-dependent protein kinase identifies unregulated catalytic subunits and defines regions important for the recognition of the regulatory subunit. *J. Biol. Chem.* 267, 4806–4814.
- **Hanus, C., Vannier, C., Triller, A. (2004)** Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *J Neurosci.* Feb 4; 24(5):1119-28.

- Harvey, R. J., Depner, U. B., Wässle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schütz, B., Abo-Salem, O. M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D. P., Betz, H., Zeilhofer, H. U. y Müller, U. (2004) GlyR α 3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884–887
- Hoyer, D., Clarke DE., Fozard, JR., Martin, GR., Mylecharane, EJ., Saxena, PR., & Humphrey, PP. (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994 Jun;46(2):157-203.
- Inomata, H., Nabekura, J. y Akaike, N. (1993) Suppression of taurine response in acutely dissociated substantia nigra neurons by intracellular cyclic AMP. *Brain Res.* 615: 347–350
- Kirsch, J. & Betz, H. (1998) Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature.* 16;392(6677) :717-20.
- Langosch, D., Thomas, L. y Betz, H. (1988) Conserved quaternary structure of ligand gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7394 –7398.
- Legendre, P. (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 760–793.
- Lin, Q., Peng, Y. B. y Willis, W. D. (1996) Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and GABA is reduced during central sensitization. *J. Neurophysiol.* 76: 1005–1014.
- Lynch, J. W. (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol. Rev.* 84, 1051–1095.
- Lynch, JW. (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology.*56(1):303–309
- Maas, C., Tagnaouti, N., Loeblich, S., Behrend, B., Lappe-Siefke, C., y Kneussel, M. (2006) Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J. Cell Biol.* 172, 441–451
- Mangin, J. M., Baloul, M., Prado De Carvalho, L., Rogister, B., Rigo, J. M., and Legendre, P. (2003). Kinetic properties of the α 2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *J. Physiol.* 553, 369–386.
- Manzke T, Niebert M, Koch UR, Caley A, Vogelgesang S, Hulsmann S et al. (2010). Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor α 3 controls breathing in mice. *J Clin Invest* 120: 4118–4128.
- Min B. I., Kim C. J., Rhee J. S. & Akaike N. (1996) Modulation of glycine-induced chloride current in acutely dissociated rat periaqueductal gray neurons by μ -opioid agonist DAGO. *Brain Res.* 734: 72–78
- Molander, A & Söderpalm, B. (2005) Glycine receptors regulate dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res.* 29:17–26
- Morales, FR., Sampogna, S., Yamuy, J. & Chase, MH. (1999) c-fos expression in brainstem premotor interneurons during cholinergically induced active sleep in the cat. *J Neurosci.*19: 9508-18..
- Morquette, P., Lavoie, R., Fhima, MD., Lamoureux, X., Verdier, D. & Kolta, A. (2012) Generation of the masticatory central pattern and its modulation by sensory feedback, *Progress in Neurobiology*, Volume 96, Issue 3, March, Pages 340-355, ISSN 0301-0082.
- Mukhtarov, M., Ragozzino, D. & Bregestovski, P. (2005) Dual Ca^{2+} modulation of glycinergic synaptic currents in rodent hypoglossal motoneurons. *J Physiol.* 569(Pt 3):817-31
- Muller, E., Le-Corronec H. & Legendre, P. (2008) Extrasynaptic and postsynaptic receptors in glycinergic and GABAergic neurotransmission: a division of labor? *Front Mol Neurosci* 1:3.
- Nakamura, S., Inoue, T., Nakajima, K., Moritani, M., Nakayama, K., Tokita, K., Yoshida, A., Maki, K. (2008) Synaptic transmission from the supratrigeminal region to jaw-closing and jaw-opening motoneurons in developing rats. *J. Neurophysiol.* 100, 1885–1896
- Nishizaki, T. & Ikeuchi, Y. (1995) Activation of endogenous protein kinase C enhances currents through α 1 and α 2 glycine receptor channels. *Brain Res.* 687: 214 – 216

- **Pagnotta, SE., Lape, R., Quitadamo, C., & Nistri A. (2005)** Pre- and postsynaptic modulation of glycinergic and gabaergic transmission by muscarinic receptors on rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Neuroscience*.130(3):783-95.
- **Pose, I., Silveira, V., Damián, A., Higgin, R. & Morales, F.R. (2014)** Modulation of glycinergic synaptic transmission in the trigeminal and hypoglossal motor nuclei by the nitric oxide–cyclicGMP signaling pathway, *Neuroscience*, Volume 267, 16, Pages 177-186, ISSN 0306-4522
- **Racca, C., Gardiol, A. & Triller, A. (1998)** Cell-specific dendritic localization of glycine receptor a subunit messenger RNAs. *Neuroscience*. 84: 997–1012
- **Rekling, JC., Funk, GD., Bayliss, DA., Dong, XW. & Feldman, JL. (2000)** Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiological Reviews*. 80(2):767–852
- **Ren, J., Ye, J. H. & McArdle J. J. (1998)** cAMP-dependent protein kinase modulation of glycine-activated chloride current in neurons freshly isolated from rat ventral tegmental area. *Brain Res*. 811: 71–78
- **Sato, K., Kiyama, H. & Tohyama, M. (1992)** Regional distribution of cells expressing glycine receptor $\alpha 2$ subunit mRNA in the rat brain. *Brain Research*. 590(1-2):95–108
- **Sato, K., Zhang, J. H., Saika, T., Sato, M., Tada, K., y Tohyama, M. (1991)** Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: an analysis using in situ hybridization.
- **Sauguet, L., Azadeh, S., & Delarue, M. (2014)** Crystallographic Studies of Pharmacological Sites in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*
- **Schonrock, B. & Bormann, J. (1995)** Modulation of hippocampal glycine receptor channels by protein kinase C. *Neuroreport* 6: 301–304
- **Shiang, R., Ryan, S. G., Zhu, Y. Z., Hahn, A. F., O’Connell, P. & Wasmuth, J. J. (1993)** Mutations in the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder hyperekplexia. *Nat. Genet*. 5, 351–358
- **Singer, J. H. & Berger, A. J. (1999)** Contribution of Single-Channel Properties to the Time Course and Amplitude Variance of Quantal Glycine Currents Recorded in Rat Motoneurons *J Neurophysiol* 81: 1608–1616.
- **Singer, J. H. & Berger, A. J. (2000)** Development of Inhibitory Synaptic Transmission to Motoneurons. *Brain Research Bulletin* 53, no. 5 (November 15) 553–60.
- **Singer, J. H., Talley, E. M., Bayliss, D. A. & Berger, A. J. (1998)** Development of glycinergic synaptic transmission to rat brainstem motoneurons. *J. Neurophysiol*. 80, 2608–2620.
- **Song, Y. M. & Huang, L. Y. (1990)** Modulation of glycine receptor chloride channels by cAMP-dependent protein kinase in spinal trigeminal neurons. *Nature* 348: 242–245
- **Steinberg, SF. (2008)** Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiological Reviews* 88, no. 4 (October 15, 2008): 1341–78.
- **Tapia, J. C., Espinoza, F. & Aguayo, L. G. (1997)** Differential intracellular regulation of cortical GABA(A) and spinal glycine receptors in cultured neurons. *Brain Res*. 769: 203–210
- **Uchiyama, M., Hirai, K., Hishinuma, F. & Akagi, H. (1994)** Down-regulation of glycine receptor channels by protein kinase C in *Xenopus* oocytes injected with synthetic RNA. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 24: 295–300
- **Vaello, M. L., Ruiz-Gomez, A., Lerma, J. & Mayor F. Jr (1994)** Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*. 269: 2002–2008.
- **Vaughan, P., Walker, J., & Peers, C. (1998)** The Regulation of Neurotransmitter Secretion by Protein Kinase C.” *Molecular Neurobiology* 18, no. 2 125–55. doi:10.1007/BF02914269.
- **Watanabe, E. & Akagi, H. (1995)** Distribution patterns of mRNAs encoding glycine receptor channels in the developing rat spinal cord, *Neuro- science Research* 23 377–382.

- **Wässle, H., Heinze, L., Ivanova, E., Majumdar, S., Weiss, J., Harvey, R. J., & Haverkamp, S. (2009)** Glycinergic transmission in the mammalian retina. *Front. Mol. Neurosci.* 2, 6
- **Weiss, J., O'Sullivan, G. A., Heinze, L., Chen, H. X., Betz, H., & Wässle, H. (2008)** Glycinergic input of small-field amacrine cells in the retinas of wild-type and glycine receptor-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 40–55
- **Weltzien, F., Puller, C., O'Sullivan, G. A., Paarmann, I., & Betz, H. (2012)** Distribution of the glycine receptor α subunit in the mouse CNS as revealed by a novel monoclonal antibody. *J. Comp. Neurol.* 520, 3962–3981
- **Xu, T.L & Gong, N. (2010)** Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: diversity, function and regulation. *Prog. Neurobiol.* 91:349–361
- **Xu, T. L., Nabekura, J. & Akaike, N. (1996)** Protein kinase C mediated enhancement of glycine response in rat sacral dorsal commissural neurones by serotonin. *J. Physiol.* 496 491–501
- **Yang, Z., Taran, E., Webb, T. I., & Lynch, J. W. (2012)** Stoichiometry and subunit arrangement of α 1 glycine receptors as determined by atomic force microscopy. *Biochemistry* 51, 5229 –5231.
- **Ye, J. H. & McArdle, J. J. (1996)** 2,3-Butanedione monoxime modifies the glycine-gated chloride current of acutely isolated urine hypothalamic neurons. *Brain Res.* 735: 20–29