

25  
201



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO MODULADOR DE LAS POLIAMINAS  
SOBRE RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA  
RETINA DE POLLO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :

FROYLAN CALDERON DE ANDA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANA MARIA LOPEZ COLOME



TESIS CON  
FALLA DE CUBIERTA

260017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Efecto modulador de las poliaminas sobre Receptores de tipo NMDA en la Retina de Pollo.

realizado por Froylan Calderón de Anda

con número de cuenta 9033725-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Ana María López Colomé

*Ana María López Colomé*  
*José Ignacio Leguina Aranzamendi*

Propietario

Dr. José Ignacio Leguina Aranzamendi

Propietario

Dra. Luisa Alba Lois

*Luisa Alba Lois*

Suplente

M. en IBB Gabriela Fragoso Contreras

*Gabriela Fragoso Contreras*

Suplente

M. en C. Carlos Arturo II Becerra Bracho

FACULTAD DE CIENCIAS

*Alejandro Martínez Mena*  
Consejo Departamental de Biología  
M. en C. Alejandro Martínez Mena

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

A mis padres por su constante apoyo.

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

Froylan Calderón de Anda fue becario del Programa Iniciación Temprana a la Investigación y a la Docencia, y del Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (Fundación U.N.A.M.).

Agradecimientos.

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

A los miembros del jurado Dr. José Ignacio Leguina Aranzamendi; Dra Luisa Alba Lois; M. en IBB Gabriela Fragoso Contreras y M. en C. Carlos Arturo II Becerra Bracho, por sus comentarios y sugerencias.

A mis compañeros de laboratorio por su paciencia.

## ABREVIATURAS.

ACPC = Ácido 1-amino ciclopropil carboxílico.

AMPA = Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico.

$B_{\max}$  = Unión específica máxima.

Ci = Curie, unidad de radioactividad.

CPP = 3-[( $\pm$ )-2-carboxipiperazin-4-yl] propil-1-fosfonato

DET = Dietilentriamina.

EDTA = Ácido etilen-diamino-tetra acético.

GABA = Ácido  $\gamma$ -amino butírico.

GluR = Receptores ionotrópicos de tipo AMPA/KA

HEPES = Ácido N(2-hidroxietyl)piperazin-N'-(2-etanosulfónico).

$k_{+1}$  = Constante de asociación.

$k_{-1}$  = Constante de disociación.

$K_B$  = Constante de afinidad.

$k_{\text{obs}}$  = Constante de afinidad aparente.

$k_i$  = Constante de inhibición.

KA = Kainato.

MK-801 = Dizocilpina.

mGluR = Receptor metabotrópico glutamatérgico.

mRNA = RNA mensajero.

NMDA = Ácido N-metil-D-aspártico.

ODC = Ornitina descarboxilasa

R1, R2 = Subunidades del receptor tipo NMDA

SDS = Dodecil sulfato sódico

SNC = Sistema nervioso central.

Tris = Tris (hidroxi-metil)amino metano.

## Índice.

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>3</b>
<b>I. Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>II. Introducción.</b>	
1. Metabolismo de las poliaminas.....	5
2. Efecto modulador de las poliaminas sobre proteínas membranales del sistema nervioso central.....	10
3. Los receptores a aminoácidos excitadores.....	11
4. Los receptores a NMDA: características moleculares.....	14
5. Efecto modulador de las poliaminas sobre los receptores de tipo NMDA.....	19
<b>III. Antecedentes.</b>	
1. Receptores a aminoácidos excitadores en la retina.....	23
<b>IV. Objetivo y planteamiento del problema.....</b>	<b>25</b>
<b>V. Materiales y Métodos.</b>	
1. Extracción de sinaptosomas de la retina y obtención de membranas.....	25

2. Experimentos dosis-respuesta.....	27
A. Experimentos con glicina-H <sup>3</sup> .....	28
B. Experimentos con glutamato-H <sup>3</sup> .....	28
C. Experimentos con espermina-H <sup>3</sup> .....	29
3. Experimentos de saturación.....	29
4. Experimentos de asociación.....	30
5. Análisis de resultados.....	30
6. Reactivos.....	31

## **VI. Resultados.**

1. Experimentos dosis-respuesta	
A. Experimentos con glicina-H <sup>3</sup> .....	31
B. Experimentos con glutamato-H <sup>3</sup> .....	36
C. Experimentos con espermina-H <sup>3</sup> .....	39
2. Experimentos de saturación.....	42
3. Experimentos de asociación.....	45

## **VII. Discusión y Conclusiones.....50**

## **VIII. Bibliografía.....56**

## I. RESUMEN.

Recientemente se ha propuesto que poliaminas endógenas, como la espermina y la espermidina podrían funcionar como neuromoduladores en la transmisión sináptica, puesto que estimulan o inhiben varios procesos mediados por receptores ionotrópicos, tanto aniónicos como catiónicos, en preparaciones bioquímicas y electrofisiológicas. Su interacción con los receptores de NMDA genera diferentes respuestas, lo que sugiere la presencia de más de un sitio de unión para dichas moléculas en este receptor canal. Algunos de estos efectos son la llamada "estimulación dependiente de glicina", que consiste en un aumento en la afinidad del receptor por la glicina y la "estimulación independiente de glicina", en la que a concentraciones saturantes de glicina las poliaminas incrementan la corriente entrante en condiciones normales, o la unión de bloqueadores de canal posiblemente por el aumento de la frecuencia de apertura del mismo.

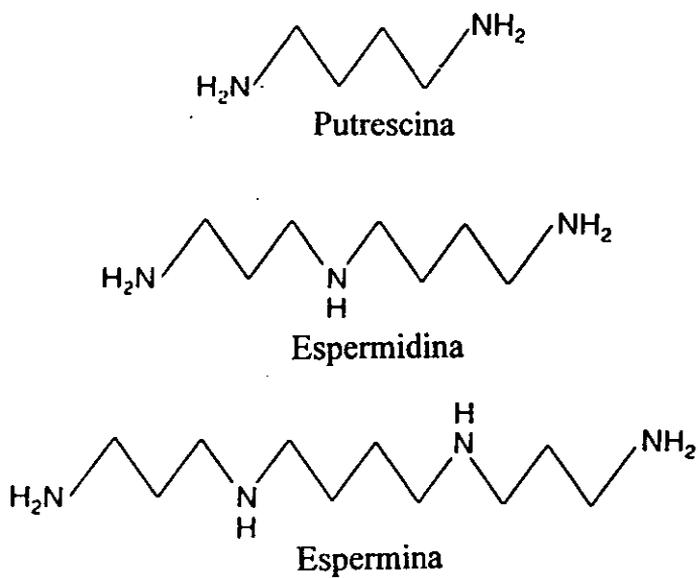
En este trabajo, empleando membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina de pollo, se encontró un efecto inhibitor de la espermina sobre la unión de glicina- $H^3$  que se correlaciona con los receptores de tipo NMDA. La espermina inhibe dicha unión en forma dependiente de la concentración y de manera no competitiva, sugiriendo así que en este tejido estos receptores presentan características de modulación distintas a las que se conocen en el sistema nervioso central (SNC).

## II. INTRODUCCIÓN.

### 1. Metabolismo de las poliaminas

Las poliaminas endógenas tales como la putrescina (diaminobutano) y sus derivados, espermidina y espermina son moléculas policatiónicas que se encuentran en todos los seres vivos. Estas policationes interactúan con moléculas cargadas negativamente como lo son algunas proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos, ya que presentan cargas positivas distribuidas a lo largo de la cadena flexible que forma el esqueleto de la molécula (Figura 1).

Se ha propuesto que estas poliaminas desempeñan múltiples funciones en el proceso de crecimiento celular y replicación (Seiler, 1981), debido a que *in vitro* estas moléculas afectan a todas las reacciones que involucran ácidos nucleicos, como la replicación, transcripción y la traducción de la información genética. Dentro de este contexto se tiene evidencia de la participación de las poliaminas en el crecimiento de tumores, por lo que está en estudio la síntesis de inhibidores específicos de la biosíntesis de éstas moléculas, favoreciendo así el cese de la proliferación celular y manteniendo a las células en la fase G1 del ciclo celular (Seiler, 1981). Por otro lado, también se ha encontrado que



**Figura 1.** Estructura química de la putrescina, espermidina y espermina.

específicamente la espermina y la espermidina posiblemente funcionan como neuromoduladores o neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC) (Seiler, 1981; Rock y McDonald, 1995).

En los mamíferos la putrescina se forma exclusivamente por la descarboxilación de la ornitina mediante la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), mientras que la espermidina se origina por la transferencia a la putrescina, con la ayuda de la enzima espermidina sintasa, de un grupo propilamina que tiene su origen en la adenosilmetionina; si la espermidina recibe otro grupo propilamina por medio de la espermina sintasa entonces se produce espermina (Figura 2). Estas reacciones son reversibles y el paso limitante en la biosíntesis de estas poliaminas es la conversión de la ornitina en putrescina por la ODC, por lo que es de esperarse que los niveles intracelulares de estas moléculas dependan de la síntesis y actividad de dicha enzima. La ODC es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal, no siendo así las dos aminopropiltransferasas (espermidina sintasa y espermina sintasa), que son enzimas que no requieren un cofactor para su catálisis. Estas dos últimas enzimas se encuentran en mayor proporción en el cerebro en comparación con otros tejidos (Raina *et al.*, 1976), apoyando así la idea de que las poliaminas en este tejido no sólo están involucradas en procesos de crecimiento y replicación celular

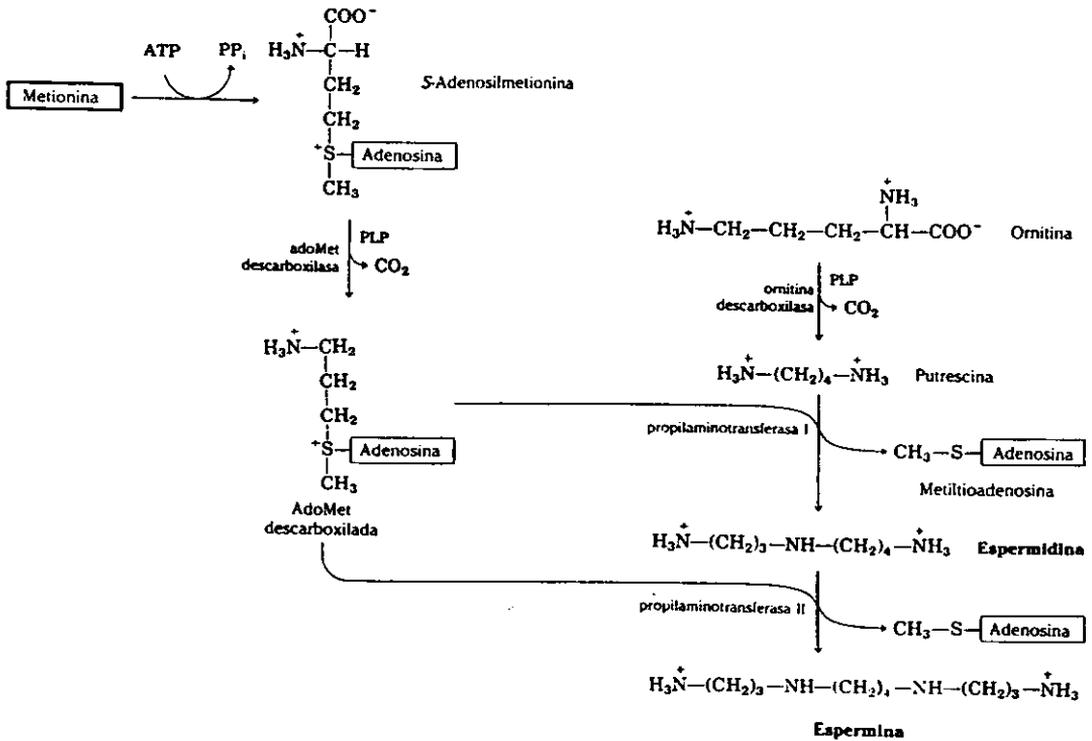


Figura 2. Ruta metabólica para la síntesis de poliaminas endógenas a partir de la ornitina en células de mamíferos.

durante el desarrollo, sino que también participan en la transmisión sináptica. Contrario a ésto, se ha reportado que la concentración de poliaminas en el cerebro es del mismo orden de magnitud que en otros tejidos, por lo que no pueden alcanzarse conclusiones acerca de la función de estos compuestos basándose únicamente en datos de distribución (Seiler, 1981). Por otra parte Harman y Shaw (1981), utilizando rebanadas de corteza cerebral de rata, demuestran la presencia de dos sistemas de captura de espermina de alta afinidad y con características similares a las observadas en los sistemas de transporte para los neurotransmisores noradrenalina y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Además Fage *et al.* (1992) demuestran que hay liberación selectiva al medio extracelular de espermina y espermidina por la activación de receptores de tipo NMDA en el cuerpo estriado de rata, por lo que la participación de estas moléculas como neuromoduladores o neurotransmisores cada vez tiene más aceptación.

La espermina está concentrada en estructuras del SNC ricas en células nerviosas, mientras que en la materia blanca, la médula espinal y en nervios periféricos la espermidina se encuentra en mayor cantidad, al igual que la putrescina (Seiler, 1981). Seiler y Lamberty (1975) encontraron que en el desarrollo del SNC los niveles de putrescina son elevados; acorde con esto Williams-Ashman y Canellakis (1979), así como Jänne *et al.*

(1978), reportaron que el máximo de la actividad de la ODC en el cerebro corresponde con el momento en que se tiene la máxima proliferación de células nerviosas.

Las propiedades farmacológicas de la espermina y espermidina en el SNC son cualitativamente las mismas con la diferencia de que la primera actúa a concentraciones más bajas. La putrescina también produce alguno de los efectos de estas dos poliaminas pero a concentraciones elevadas.

## **2. Efecto modulador de las poliaminas sobre proteínas membranales del sistema nervioso central.**

Se tiene evidencia de que la espermina y la espermidina, así como poliaminas que funcionan como toxinas en el sistema nervioso, interactúan con componentes estructurales de la membrana plasmática como las proteínas y los fosfolípidos. Estas poliaminas estabilizan la membrana celular al interactuar con los fosfolípidos que la componen (Ballas *et al.*, 1983), posiblemente ocasionando la modulación indirecta de la actividad de proteínas membranales tales como los canales iónicos, enzimas y proteínas G. También se ha reportado que estas moléculas modulan directamente a canales catiónicos tanto dependientes de voltaje (Scott *et al.*, 1993; Johnson, 1996), como activados por ligando (Ransom y Stec, 1988; Kerry *et al.*, 1988). Asimismo existen resultados que indican que

dichas poliaminas modifican la actividad de canales aniónicos como el receptor de GABA (Scott *et al.*, 1992).

Los mecanismos por los cuales las poliaminas modulan directa o indirectamente a estas proteínas membranales no están bien estudiados, pero en general se han propuesto mecanismos que involucran, como ya se mencionó, a la membrana plasmática, así como procesos de bloqueo de canal e interacción directa con las proteínas tanto del lado extracelular como del intracelular.

### **3. Los receptores a aminoácidos excitadores.**

Los neurotransmisores pueden ser clasificados como excitadores o inhibidores dependiendo de su efecto sobre las células blanco, ya sea despolarización o hiperpolarización. Dentro de este contexto, los aminoácidos glutamato y aspartato se han propuesto como los candidatos mas idóneos para ser los transmisores excitadores por excelencia en el SNC (revisado en Somohano y López-Colomé, 1990). Estos aminoácidos interactúan en el SNC con tres tipos de receptores que deben su nombre a un análogo del aspartato, el N-metil-D-aspartato (NMDA), que se une a un tipo y no con los otros; de esta manera estos receptores, llamados ionotrópicos se han agrupado en: receptores de tipo NMDA (que en otro apartado se revisarán) y receptores de tipo NO-NMDA. Asimismo existe

un grupo de receptores metabotrópicos de glutamato. Los ionotrópicos se caracterizan por estar acoplados a un canal catiónico inespecífico, principalmente de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  (aunque ciertas combinaciones de subunidades generan canales permeables también a  $\text{Ca}^{2+}$ ), mientras que los metabotrópicos inducen a través de la activación de una proteína G, la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato y la activación o inhibición de la adenilato ciclasa. A los receptores ionotrópicos de tipo NO-NMDA también se les ha clasificado de acuerdo con el agonista más potente para cada tipo, teniendo así a los de Kainato (KA) o de AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato). La activación de los receptores AMPA/KA no depende del voltaje y genera una respuesta rápida y de corta duración (revisado en Somohano y López-Colomé, 1990; López-Colomé, 1995).

Los receptores ionotrópicos de tipo NO-NMDA agrupan a nueve subunidades proteicas (GluR). Estas subunidades poseen cuatro segmentos transmembranales, aunque el segundo no atraviesa la membrana plasmática, quedando el grupo carboxilo terminal en el lado intracelular y el amino en el extracelular. Dichas subunidades se pueden agrupar por la homología entre ellas así como por su afinidad por AMPA o KA. De la cadena GluR1 a la GluR4, además de mostrar un alto grado de similitud entre sí, muestran alta afinidad por el AMPA y baja por el KA; mientras

que las cadenas GluR5 a GluR7, presentan mucha similitud entre ellas pero no así con las de la otra serie, además de tener una afinidad moderada por el KA (revisado en López-Colomé, 1995). Es probable que estas tres últimas subunidades estén formando, junto con dos subunidades a las que se ha denominado KA1 y KA2, los receptores de tipo KA (revisado en Huettner, 1997).

Dentro de esta familia de subunidades la GluR2 determina las propiedades de permeabilidad y de conductancia del canal catiónico. Esta cadena contiene un residuo de arginina en su segundo segmento transmembranal, mientras que las otras subunidades GluR poseen una glutamina en la misma posición. Dentro de este contexto también se tiene información que indica que al menos cuatro subunidades de los receptores AMPA presentan un segmento, de 9 a 11 aminoácidos, después de la sección transmembranal 4, que determina dos distintas conformaciones denominadas “flip” y “flop”, que le confieren diferentes propiedades farmacológicas y cinéticas a las corrientes iónicas inducidas por L-Glutamato y AMPA, pero no así las que son inducidas por el KA (revisado en López-Colomé, 1995), y que se expresan de manera diferencial en el tiempo y en el espacio.

Dentro de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) se han identificado hasta la fecha ocho diferentes subunidades codificadas por

distintos genes, además de dos variantes producto del corte selectivo post-transcripcional que sufre la subunidad mGluR1. Las subunidades de la familia de mGluRs tienen siete segmentos transmembranales y un dominio extracelular amino terminal considerablemente largo. Las cadenas 1 y 5 están acopladas a la hidrólisis de fosfoinosítidos, mientras que las cadenas 2, 3, 4 y 6 lo están a la inhibición de la adenilato ciclasa. También se tiene evidencia de que estos receptores participan en la producción de óxido nítrico así como en la activación de protooncogenes y modulación de canales iónicos (revisado en López-Colomé, 1995).

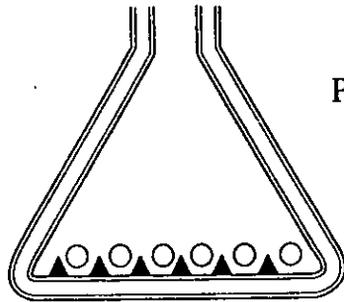
#### **4. Los receptores a NMDA: características moleculares.**

Los receptores del tipo NMDA están ampliamente distribuidos en el SNC. Estos complejos proteicos son estructuras pentaméricas formadas por dos tipos de subunidades: la NMDAR1 (R1) y la NMDAR2 (R2), que presentan cuatro dominios transmembranales en la misma posición que los receptores de tipo AMPA/KA. Es probable que también existan receptores homoméricos constituídos únicamente por subunidades R1, pero por medio de la clonación molecular se comprobó que estos receptores son de baja actividad (Monyer *et al.*, 1992; Kutsuwada *et al.*, 1992; Meguro *et al.*, 1992; Nakanishi, 1992; Ishii *et al.*, 1993).

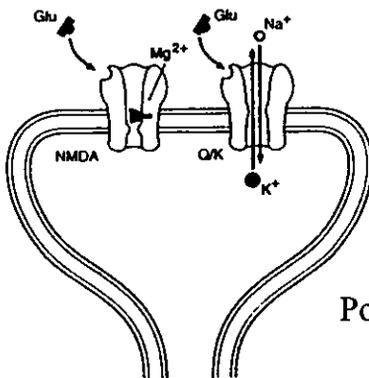
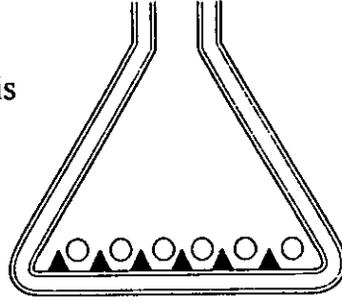
La familia R1 comprende ocho diferentes subunidades que son producto del empalme alternativo que sufre el mRNA del gen que codifica para dicha subunidad (R1a-h), mientras que las cuatro subunidades que constituyen a la familia R2 se originan a partir de cuatro genes diferentes (R2A-D). Las posibles combinaciones de ensamble entre las diferentes subunidades de las dos familias existentes, le confieren al receptor propiedades farmacológicas particulares que *in vivo* se han podido distinguir en las diferentes regiones del SNC (Monyer *et al.*, 1992), así como en diferentes etapas del desarrollo (Subramaniam *et al.*, 1994).

Los receptores de NMDA tienen sitios de unión para glutamato, que actúa como neurotransmisor; para un coagonista, que en este caso es la glicina; para bloqueadores de canal abierto y para el  $Zn^{2+}$ . Las poliaminas como la espermina y la espermidina modulan la actividad del receptor (Ransom y Stec, 1988; Ransom y Deschenes, 1990; Benveniste y Mayer, 1993; Williams *et al.*, 1994; Rock y McDonald, 1995). En estado de reposo el canal está bloqueado por  $Mg^{2+}$  y sólo cuando la membrana está suficientemente despolarizada puede haber corriente entrante tanto de  $Na^+$  como de  $Ca^{2+}$  (Figura 3). Es importante mencionar que la sustitución de una asparagina por una glutamina en el segundo dominio transmembranal de las subunidades R1 y R2 regula respectivamente

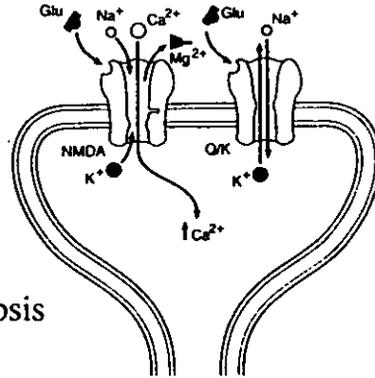
A



Presinapsis



Postsinapsis



**Figura 3.** Activación de los receptores de NMDA. (A) Cuando las neuronas están cerca de su potencial de reposo, la corriente iónica fluye principalmente a través de los receptores de tipo AMPA/KA (Q/K) debido a que los de tipo NMDA están bloqueados por un ion  $Mg^{2+}$ . (B) Cuando la célula se despolariza (por la activación de los receptores de AMPA/KA) el cambio en el potencial de membrana produce la salida del  $Mg^{2+}$  del canal, permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula cuando el receptor de NMDA ha sido activado por glutamato (Glu). La glicina incrementa la probabilidad de apertura del canal de los receptores de NMDA activados por el glutamato.

la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y el bloqueo por  $\text{Mg}^{2+}$  (revisado en López-Colomé, 1995).

Un tema actual de gran discusión es la naturaleza estructural de estos receptores, que se piensa, como ya se mencionó, forman un complejo pentamérico que está constituido en su forma nativa por subunidades R1 y R2. Wafford *et al.* (1993) propusieron que el arreglo estructural de estos receptores posiblemente esté dado por tres diferentes subunidades, una R1 y dos variantes de la R2, contrario al esquema que se tenía, en el que sólo se contemplaba una estructura heteromérica constituida por la subunidad R1 y una sola variante de las subunidades R2 para formar el pentámero.

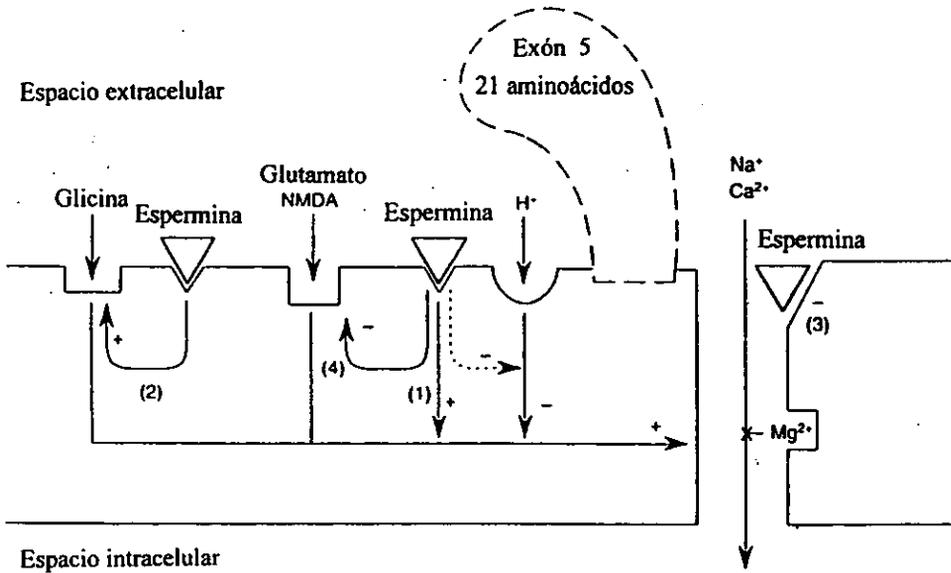
Lynch *et al.* (1994) han propuesto que la subunidad R1 (R1a) es la encargada de formar el sitio de unión para antagonistas de la glicina, y que la subunidad R1a más la R2A son necesarias para la formación de receptores con sitios de unión para antagonistas del glutamato, así como sitios para bloqueadores de canal como el MK-801 (malato de dizocilpina). Es importante tener en cuenta que estos resultados son muy particulares, ya que no se hizo un estudio más amplio con las diferentes subunidades que se han descrito. Además Moriyoshi *et al.* (1991), de acuerdo con otros grupos, demuestran la formación de un canal y de sitios de unión para agonistas del glutamato en receptores homoméricos constituidos por subunidades R1. Es probable que estas contradicciones se deban al tipo de

células que usó cada grupo para obtener las clonas, o bien, a las subunidades que se analizaron en cada estudio.

Con respecto a las poliaminas espermina y espermidina, Lynch *et al.* (1994) sugieren que para que el receptor sea sensible a estas moléculas es necesario que coexistan la subunidad R1a con alguna R2, mientras que Guylaine *et al.* (1993) demuestran que receptores homoméricos R1 adquieran sensibilidad a la espermina, por la presencia de un inserto 5', que puede perderse en algunas subunidades R1 por el empalme alternativo. Por otro lado Traynelis *et al.* (1995) además han demostrado la existencia de un sitio de inhibición con el que interactúan protones, que aparece cuando no existe el exón cinco en la subunidad R1, así como su modulación por poliaminas a través de dicha subunidad. En este contexto, se ha propuesto que se requiere de la inclusión de una variante de R1, como R1a, en receptores heteroméricos para la estimulación provocada por las poliaminas, pero la manifestación de esta estimulación está controlada por el tipo de subunidad R2 presente en el receptor (Williams *et al.*, 1994). Así se puede considerar a la subunidad R1 como un componente que le confiere al receptor sus propiedades básicas, y a la subunidad R2 como una estructura moduladora.

## 5. Efecto modulador de las poliaminas sobre los receptores de tipo NMDA.

Las poliaminas modulan la actividad de los receptores de NMDA posiblemente a través de varios sitios de unión, ya que tienen múltiples efectos sobre estos receptores (Figura 4). Algunos de estos efectos son la llamada "estimulación dependiente de glicina", que consiste en un aumento en la afinidad del receptor por la glicina (Ransom *et al.*, 1990); y la "estimulación independiente de glicina", en la que a concentraciones saturantes de glicina las poliaminas incrementan la corriente entrante en condiciones normales, o la unión de bloqueadores de canal posiblemente por el aumento de la frecuencia de apertura del mismo. Este fenómeno depende de la concentración de la poliamina, detectándose una inhibición a altas concentraciones y una estimulación a bajas concentraciones. Se piensa que este efecto podría deberse a que a altas concentraciones tanto la espermina como la espermidina pueden funcionar como bloqueadores de canal abierto (Williams *et al.*, 1989). Asimismo, Marvizón y Baudry (1994) identificaron dos sitios de unión para las poliaminas: uno estimulador de alta afinidad y otro inhibidor de baja afinidad; la activación de este último conlleva una disminución tanto de la  $B_{max}$  como de la  $K_B$  de la unión del MK-801- $H^3$ , lo que sugiere que la espermina compite con este bloqueador de canal abierto por el mismo sitio.



**Figura 4.** Efecto modulador de la espermina sobre los receptores de NMDA. (1) Estimulación independiente de glicina: se requieren concentraciones saturantes de glicina y se traduce en un incremento de la frecuencia de apertura del canal. (2) Estimulación dependiente de glicina: en presencia de concentraciones subsaturantes de glicina, se observa un incremento de la afinidad del receptor por la glicina. (3) Inhibición dependiente de voltaje: decremento en la conductancia del canal como resultado de un “apantallamiento de cargas” en la boca del poro. (4) Decremento de la afinidad del receptor por el agonista: se presenta a concentraciones subsaturantes de NMDA o glutamato.

Por otra parte Romano *et al.* (1992) basándose en el efecto de varios agonistas, antagonistas y agonistas inversos de las poliaminas, así como por modelaje estructural, propusieron un modelo de interacción de las poliaminas con los receptores de NMDA. En este modelo las poliaminas tienen una interacción múltiple: actividad de agonista las que interactúan con el receptor por medio de tres grupos amino separados 5 Å entre sí y de antagonista las que lo hacen sólo con dos grupos. Aquellas poliaminas que interactúan con tres grupos amino, uno de ellos separado 12 Å de los otros dos, tienen actividad de agonista inverso. Dentro de este contexto Kashiwagi *et al.* (1996) identificaron un residuo de aspartato en la posición D669 de la subunidad R1a que está involucrado en el reconocimiento de la espermina. Este residuo está en relación directa con la estimulación de la espermina “independiente de glicina” en receptores heteroméricos R1a/R2B, ya que su remoción ocasiona la pérdida de dicho efecto así como la reducción de la inhibición provocada por protones. Por otro lado Gallagher *et al.* (1996) demostraron que en la subunidad R2B, y no así en la R2A, se encuentra una región en el extremo amino terminal que determina un efecto estimulador de la espermina sobre la frecuencia de apertura del canal del receptor.

También se ha observado que las poliaminas tienen un efecto inhibitorio dependiente del voltaje y de la concentración a la que se

encuentra; este fenómeno se presenta en condiciones hiperpolarizantes y a altas concentraciones de poliaminas (Rock y McDonald, 1995). Esto último es fácil de entender si se considera a la membrana celular como un capacitor que en condiciones hiperpolarizantes almacena cargas negativas del lado interior, atrayendo del lado exterior a moléculas con carga positiva como las poliaminas. De esta forma, se ocasiona un bloqueo del canal del receptor en función de la concentración de las cargas positivas. Esta inhibición también puede ser producto de un “apantallamiento” de cargas en la boca del canal, y no necesariamente por un bloqueo de canal abierto (Rock y McDonald, 1992).

Un aspecto que hasta el momento ha sido poco estudiado es la modulación que las poliaminas pueden ejercer sobre el sitio de reconocimiento del neurotransmisor. En principio se podría esperar que las poliaminas modularan este sitio de manera similar a como lo hacen con el sitio del coagonista; sin embargo Williams (1994) encontró que en receptores que contenían sólo subunidades NR1a/NR2B, la espermina además de estimular la apertura del canal y de incrementar la afinidad del receptor por la glicina, disminuye la afinidad del receptor por el glutamato. Es importante mencionar que utilizando varios receptores recombinantes se demostró que no todos los efectos ya descritos se presentan en todas las combinaciones estudiadas (Williams, 1995; Johnson, 1996), en apoyo de la

existencia de varios sitios de unión para las poliaminas dentro del receptor de NMDA, ubicados en diferentes subunidades.

### **III. ANTECEDENTES.**

#### **1. Receptores a aminoácidos excitadores en la retina.**

El ojo está compuesto principalmente por tres capas: la más externa constituida por la córnea y la esclerótica; seguida del iris, el cuerpo ciliar y la coroides, que está en contacto con la última capa formada por la retina neural y el epitelio pigmentado. El sistema óptico del globo ocular consta de la cornea, la cámara anterior, el cristalino y el cuerpo vitreo.

La retina se estratifica en dos capas funcionales bien definidas: la retina externa en la que los fotorreceptores hacen contacto con las células neuronales horizontales y bipolares, y la retina interna en la cual las células bipolares establecen contacto con las células amacrinas y las ganglionares, de donde salen proyecciones al cuerpo geniculado lateral ya ubicado en el cerebro. En la retina existen dos tipos fundamentales de células gliales: los astrocitos, que no difieren mucho en sus funciones de aquellos en el SNC, y la glía de Müller, un tipo de glía radial, que participa en el mantenimiento del ambiente iónico extracelular bombeando  $K^+$ , en la estratificación durante el desarrollo y en el acoplamiento metabólico

existencia de varios sitios de unión para las poliaminas dentro del receptor de NMDA, ubicados en diferentes subunidades.

### **III. ANTECEDENTES.**

#### **1. Receptores a aminoácidos excitadores en la retina.**

El ojo está compuesto principalmente por tres capas: la más externa constituida por la córnea y la esclerótica; seguida del iris, el cuerpo ciliar y la coroides, que está en contacto con la última capa formada por la retina neural y el epitelio pigmentado. El sistema óptico del globo ocular consta de la cornea, la cámara anterior, el cristalino y el cuerpo vitreo.

La retina se estratifica en dos capas funcionales bien definidas: la retina externa en la que los fotorreceptores hacen contacto con las células neuronales horizontales y bipolares, y la retina interna en la cual las células bipolares establecen contacto con las células amacrinas y las ganglionares, de donde salen proyecciones al cuerpo geniculado lateral ya ubicado en el cerebro. En la retina existen dos tipos fundamentales de células gliales: los astrocitos, que no difieren mucho en sus funciones de aquellos en el SNC, y la glía de Müller, un tipo de glía radial, que participa en el mantenimiento del ambiente iónico extracelular bombeando  $K^+$ , en la estratificación durante el desarrollo y en el acoplamiento metabólico

durante la transmisión sináptica, al eliminar al neurotransmisor del espacio sináptico (revisado en Nicholls, 1994).

La existencia de receptores a glutamato y aspartato en la retina (López-Colomé, 1981; López-Colomé y Somohano, 1982) constituye una evidencia de la función de estos aminoácidos como transmisores excitadores en este órgano. Mediante radioligandos agonistas o antagonistas de los diferentes subtipos de receptores para glutamato se determinó la presencia de diferentes tipos de receptores a glutamato en la retina. Existen receptores sensibles a NMDA y L-Aspartato en la retina interna de bovino (citado en López-Colomé, 1986), mientras que en la retina de pollo se han caracterizado receptores que son específicos para los agonistas L-Glutamato (López-Colomé, 1986) y AMPA (López-Colomé y Somohano, 1987) así como para 3-[(±)-2-carboxipiperazin-4-yl] propil-1-fosfonato (CPP), que actúa como un antagonista competitivo específico en los receptores del tipo NMDA (López-Colomé y Somohano, 1992). Por otro lado, en la glía de Müller se caracterizó un sitio de unión de alta afinidad para glutamato que corresponde, por sus propiedades cinéticas y farmacológicas, a un receptor metabotrópico (López-Colomé *et al.*, 1991). Así mismo, se han descrito en estas células receptores ionotrópicos de glutamato de tipo NMDA y AMPA/KA, acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos (López-Colomé *et al.*, 1993).

Es importante mencionar que en la retina se ha demostrado que los diferentes subtipos de receptores para L-Glutamato se expresan de manera diferencial durante el desarrollo embrionario, paralelamente a cambios farmacológicos que podrían deberse a diferencias en la composición oligomérica de estos receptores (Somohano *et al.*, 1988).

#### **IV. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Los receptores de tipo NMDA están relacionados con muchas patologías del SNC y participan en procesos de desarrollo neural, aprendizaje y memoria, por lo que en estos últimos años ha sido de gran interés conocer su estructura y farmacología con la finalidad de controlar su actividad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es la caracterización bioquímica y farmacológica de los sitios de interacción de poliaminas en los receptores de NMDA de la retina, para el mejor entendimiento de la neurotransmisión excitadora y su modulación en este tejido.

#### **V. MATERIALES Y MÉTODOS.**

##### **1. Extracción de sinaptosomas de la retina y obtención de membranas.**

Se extrajeron las retinas, libres de epitelio pigmentado, de pollos de 1 a 3 días de nacidos que previamente habían sido decapitados. Las retinas

Es importante mencionar que en la retina se ha demostrado que los diferentes subtipos de receptores para L-Glutamato se expresan de manera diferencial durante el desarrollo embrionario, paralelamente a cambios farmacológicos que podrían deberse a diferencias en la composición oligomérica de estos receptores (Somohano *et al.*, 1988).

#### **IV. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Los receptores de tipo NMDA están relacionados con muchas patologías del SNC y participan en procesos de desarrollo neural, aprendizaje y memoria, por lo que en estos últimos años ha sido de gran interés conocer su estructura y farmacología con la finalidad de controlar su actividad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es la caracterización bioquímica y farmacológica de los sitios de interacción de poliaminas en los receptores de NMDA de la retina, para el mejor entendimiento de la neurotransmisión excitadora y su modulación en este tejido.

#### **V. MATERIALES Y MÉTODOS.**

##### **1. Extracción de sinaptosomas de la retina y obtención de membranas.**

Se extrajeron las retinas, libres de epitelio pigmentado, de pollos de 1 a 3 días de nacidos que previamente habían sido decapitados. Las retinas

Es importante mencionar que en la retina se ha demostrado que los diferentes subtipos de receptores para L-Glutamato se expresan de manera diferencial durante el desarrollo embrionario, paralelamente a cambios farmacológicos que podrían deberse a diferencias en la composición oligomérica de estos receptores (Somohano *et al.*, 1988).

#### **IV. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Los receptores de tipo NMDA están relacionados con muchas patologías del SNC y participan en procesos de desarrollo neural, aprendizaje y memoria, por lo que en estos últimos años ha sido de gran interés conocer su estructura y farmacología con la finalidad de controlar su actividad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es la caracterización bioquímica y farmacológica de los sitios de interacción de poliaminas en los receptores de NMDA de la retina, para el mejor entendimiento de la neurotransmisión excitadora y su modulación en este tejido.

#### **V. MATERIALES Y MÉTODOS.**

##### **1. Extracción de sinaptosomas de la retina y obtención de membranas.**

Se extrajeron las retinas, libres de epitelio pigmentado, de pollos de 1 a 3 días de nacidos que previamente habían sido decapitados. Las retinas

se pusieron en medio Krebs (NaCl 118 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.17 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, glucosa 5.6 mM) sobre hielo, y posteriormente el tejido se homogeneizó en una solución de sacarosa 0.32 M y  $\text{MgSO}_4$   $10^{-3}$  M (5.6 g. de tejido/100 ml.) a baja velocidad. El homogenado se centrifugó (2,800 rpm, 10 minutos), obteniendo de esta manera los sinaptosomas de la capa plexiforme externa ( $P_1$ ) en el precipitado. El sobrenadante se centrifugó a 9,800 rpm, 20 minutos, para sedimentar los sinaptosomas de la capa plexiforme interna ( $P_2$ ). Tanto la fracción  $P_1$  como la  $P_2$  se resuspendieron en veinticinco volúmenes (con respecto al peso original del tejido) de amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM a un pH de 7.4, se homogeneizaron a alta velocidad y se incubaron 15 minutos en hielo. De esta manera se sometieron los sinaptosomas a un choque osmótico que permitió obtener las membranas de interés. Ambos homogenados se centrifugaron (28,000 rpm, 20 minutos) y se almacenaron los precipitados a  $-5^\circ\text{C}$  de 1 a 2 días.

Para eliminar cualquier compuesto endógeno que pudiera alterar los resultados, dichas membranas se descongelaron, se lavaron cinco veces resuspendidas en veinticinco volúmenes (peso/volumen) y se sedimentaron a 28,000 rpm, 20 minutos, utilizando amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM a pH de 7.4 una vez, seguido de amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5

mM/EDTA 1 mM a un pH de 7.4 dos veces, y por último amortiguador HEPES 5mM/Tris 4.5 mM a un pH de 7.4 dos veces más. Las membranas ya lavadas se mantuvieron a -70 °C de dos a tres semanas. El día del experimento las membranas se lavaron cuatro veces como ya se describió, usando amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM a un pH de 7.4.

## **2. Experimentos dosis-respuesta.**

Estos experimentos se hicieron a temperatura ambiente (25 °C) y con un tiempo de reacción de 2 horas, utilizando como radioligandos glicina- $H^3$ , espermina- $H^3$  y glutamato- $H^3$  a una concentración constante de entre 20 y 25 nM, y una o varias concentraciones del inhibidor respectivo en un volumen final de 0.175 ml de homogenado (70-190  $\mu$ g de proteína) o bien de 0.5 ml de homogenado (300-400  $\mu$ g de proteína). En el primer caso, la reacción se detuvo por centrifugación en una aerofuga Beckman (90,000 rpm, 2 minutos) y en el segundo, por filtración en filtros GF/B (Whatman). El precipitado de los tubos se disolvió en SDS (dodecil sulfato sódico) al 2 %. Los filtros GF/B (Whatman) se trataron durante una hora con polietilenimina al 0.3 % para evitar unión inespecífica, y se lavaron dos veces con amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM a un pH de 7.4 antes de usarse. Tanto los filtros como los tubos se colocaron en viales con

líquido de centelleo para poder cuantificar la radiactividad. Se utilizó el método de Lowry (1951) para cuantificar la concentración de proteínas.

#### **A. Experimentos con glicina- $H^3$ .**

Estos experimentos se hicieron fijando la concentración del radioligando (20 nM) y variando la concentración de glicina, espermina o estriknina con la finalidad de definir la potencia de inhibición de la unión de glicina- $H^3$  por dichos compuestos. Para el caso de la espermina se usaron concentraciones desde 1  $\mu$ M hasta 1 mM; en estos experimentos no se definió la unión inespecífica debido a que la espermina es un modulador que no compite por el sitio de la glicina. Para el caso de la glicina se estudió un intervalo de concentración de 100 nM a 1 mM en presencia de 100  $\mu$ M de espermina; en este caso la unión inespecífica se definió con 1mM de glicina. En los experimentos con estriknina se emplearon concentraciones desde 50 nM a 1 mM, definiéndose la unión inespecífica con 1 mM de estriknina.

#### **B. Experimentos con glutamato- $H^3$ .**

Estos experimentos también se hicieron fijando la concentración del radioligando (25 nM) y usando como inhibidores a la espermina y el glutamato. En el primer caso se utilizaron concentraciones desde 1  $\mu$ M

hasta 1 mM y no se definió la unión inespecífica, ya que la espermina no compite por el sitio del glutamato. En el segundo caso, se emplearon concentraciones desde 50 nM hasta 1 mM y se definió la unión inespecífica con 1 mM de glutamato.

### **C. Experimentos con espermina- $H^3$ .**

Se utilizó una concentración de espermina- $H^3$  de 20 nM, variando la de espermina de 25  $\mu$ M hasta 1 mM. La unión inespecífica se definió con 1 mM de espermina. Con este radioligando también se hicieron experimentos en los que se empleó como competidores a diferentes compuestos como: dietilentriamina (DET) (1 mM), MK-801 (200  $\mu$ M), glicina (1 mM), glutamato (1 mM) y NMDA (1 mM).

### **3. Experimentos de saturación.**

Los experimentos de saturación se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C); se incubó durante dos horas y la reacción se detuvo por centrifugación en una aerofuga Beckman (90,000 rpm, 2 minutos). En estos ensayos se emplearon diferentes concentraciones de glicina- $H^3$  y se añadió glicina no marcada para alcanzar las concentraciones más elevadas, en un volumen final de homogenado de  $P_1$  ó  $P_2$  de 0.175 ml. La unión inespecífica se definió con 1 mM del ligando no marcado. Los

experimentos se hicieron en presencia y ausencia de 100  $\mu\text{M}$  de espermina, para determinar el tipo de modulación que ejerce la poliamina sobre el sitio de la glicina.

#### **4. Experimentos de asociación.**

Para los experimentos de asociación se midió la unión de glicina- $\text{H}^3$  con respecto al tiempo a concentraciones de 20, 60 y 100 nM, en un volumen final de homogenado de  $\text{P}_1$  ó  $\text{P}_2$  de 0.175 ml. Después de 2 horas a temperatura ambiente (25 °C), la reacción se paró por centrifugación en una aerofuga Beckman (90,000 rpm, 2 minutos) a los 2, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 y 203 minutos. Estos experimentos se realizaron en presencia y ausencia de espermina 50  $\mu\text{M}$ . La unión inespecífica se determinó con 1 mM de glicina no marcada.

#### **5. Análisis de resultados.**

Los resultados se analizaron con la ayuda del programa Prism 2.0<sup>®</sup> (Graphpad Software, Inc.) utilizando un método de regresión no lineal, aplicando la prueba *t* de Student ( $p < 0.05$ ).

## 6. Reactivos.

La glicina- $H^3$  (42-51.1 Ci/mmol) y el glutamato- $H^3$  (41.1-57.4 Ci/mmol) se adquirieron de DuPont NEN Research Products, y la espermina- $H^3$  (60.0 Ci/mmol) de American Radiolabeled Chemicals Inc. Los agonistas y antagonistas empleados fueron de Sigma (glicina, glutamato, espermina, estricnina, DET y NMDA), de RBI (MK-801) y de Tocris-Cookson (NMDA). Todos los demás reactivos fueron de Sigma.

## VI. RESULTADOS.

### 1.- Experimentos dosis-respuesta.

#### A. Experimentos con glicina- $H^3$ .

Para investigar el efecto modulador de la espermina sobre los receptores de NMDA de las capas plexiformes de la retina, a través del sitio de la glicina que forma parte de este canal receptor, se midió la unión de la glicina- $H^3$  en presencia de diferentes concentraciones de espermina (Gráfica 1). Se observó que la espermina inhibe la unión del radioligando con una  $IC_{50}$  de 46  $\mu M$  en  $P_1$  y de 36  $\mu M$  en  $P_2$ , y un coeficiente de Hill de 2.03 en  $P_1$  y de 2.04 en  $P_2$ . En estos experimentos la máxima inhibición producida por la espermina fue de 90% de la unión total, a una concentración de 1 mM. Cuando se utilizó a la glicina como inhibidor de la unión del radioligando en presencia de 100  $\mu M$  de espermina (Gráfica 2),

## 6. Reactivos.

La glicina- $H^3$  (42-51.1 Ci/mmol) y el glutamato- $H^3$  (41.1-57.4 Ci/mmol) se adquirieron de DuPont NEN Research Products, y la espermina- $H^3$  (60.0 Ci/mmol) de American Radiolabeled Chemicals Inc. Los agonistas y antagonistas empleados fueron de Sigma (glicina, glutamato, espermina, estricnina, DET y NMDA), de RBI (MK-801) y de Tocris-Cookson (NMDA). Todos los demás reactivos fueron de Sigma.

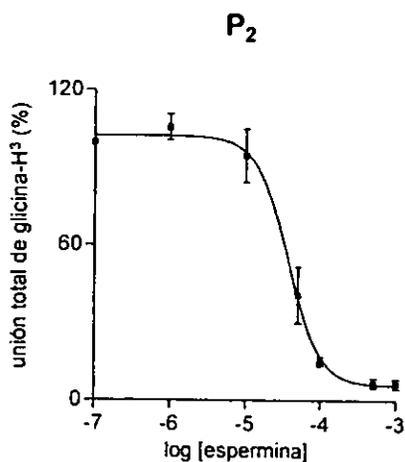
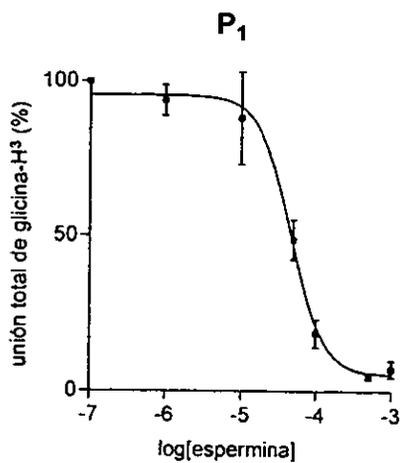
## VI. RESULTADOS.

### 1.- Experimentos dosis-respuesta.

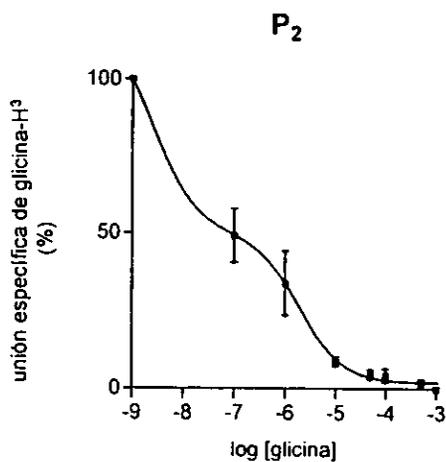
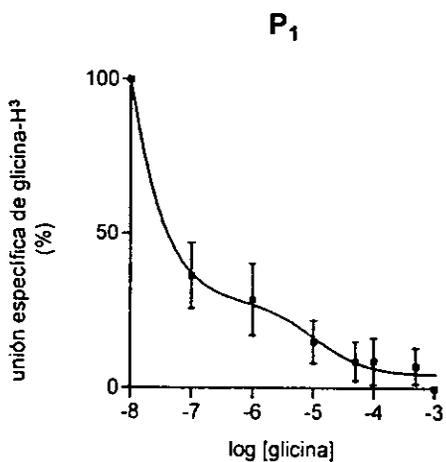
#### A. Experimentos con glicina- $H^3$ .

Para investigar el efecto modulador de la espermina sobre los receptores de NMDA de las capas plexiformes de la retina, a través del sitio de la glicina que forma parte de este canal receptor, se midió la unión de la glicina- $H^3$  en presencia de diferentes concentraciones de espermina (Gráfica 1). Se observó que la espermina inhibe la unión del radioligando con una  $IC_{50}$  de 46  $\mu M$  en  $P_1$  y de 36  $\mu M$  en  $P_2$ , y un coeficiente de Hill de 2.03 en  $P_1$  y de 2.04 en  $P_2$ . En estos experimentos la máxima inhibición producida por la espermina fue de 90% de la unión total, a una concentración de 1 mM. Cuando se utilizó a la glicina como inhibidor de la unión del radioligando en presencia de 100  $\mu M$  de espermina (Gráfica 2),

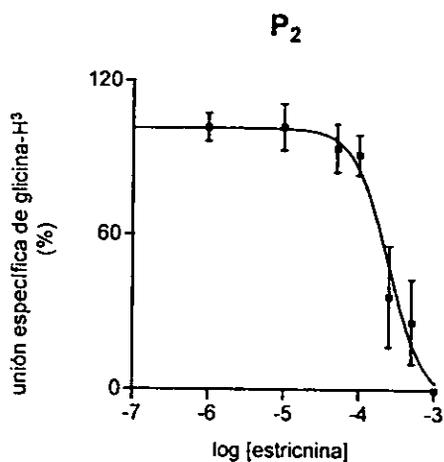
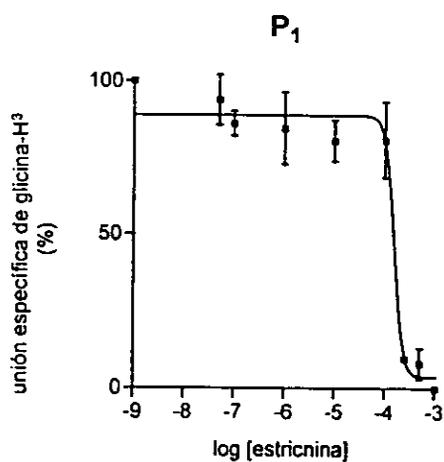
se obtuvieron curvas bifásicas de inhibición tanto en P<sub>1</sub> como en P<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub>=3.7 nM y 10 μM en P<sub>1</sub>; IC<sub>50</sub>=2.5 nM y 1.9 μM en P<sub>2</sub>), evidencia de que la glicina, en presencia de espermina, interactúa por lo menos con dos sitios en los receptores de tipo NMDA. Este resultado contradice lo observado cuando sólo se utiliza a la glicina no marcada como competidor, en donde lo que se obtiene es una curva monofásica (López-Colomé *et al*, 1995). La unión específica de la glicina-H<sup>3</sup> en esta preparación fue de entre 60% y 80% de la unión total, aproximadamente, e insensible a la estricnina con una IC<sub>50</sub>=155.5 μM en P<sub>1</sub> y 247.2 μM en P<sub>2</sub> y un coeficiente de Hill de 5.14 en P<sub>1</sub> y de 1.90 en P<sub>2</sub> (Gráfica 3).



**Gráfica 1.** Curvas dosis-respuesta de la unión de glicina-H<sup>3</sup> en presencia de varias concentraciones de espermina. Los experimentos se realizaron empleando membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina. Promedio  $\pm$  ES de tres experimentos, c/u por triplicado.



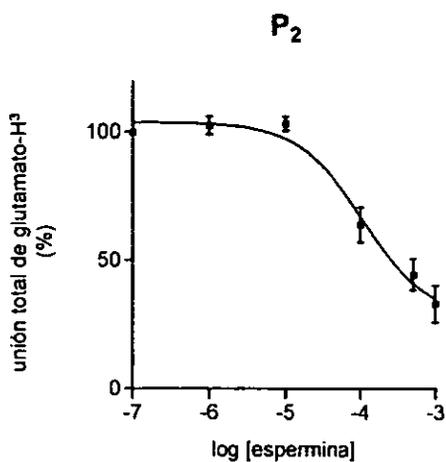
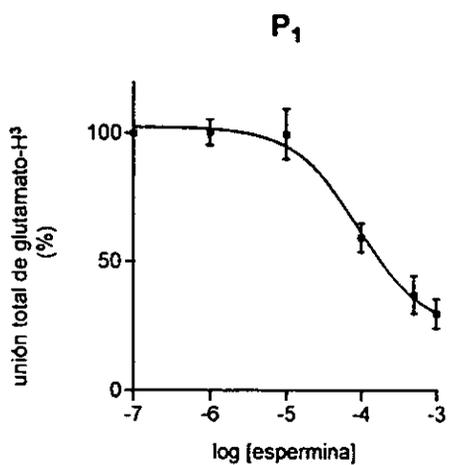
**Gráfica 2.** Curvas dosis-respuesta de la unión de glicina-H<sup>3</sup> en presencia de espermina (100  $\mu$ M) y varias concentraciones de glicina. Los experimentos se realizaron empleando membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina. Promedio  $\pm$  ES de tres a cuatro experimentos, c/u por triplicado.



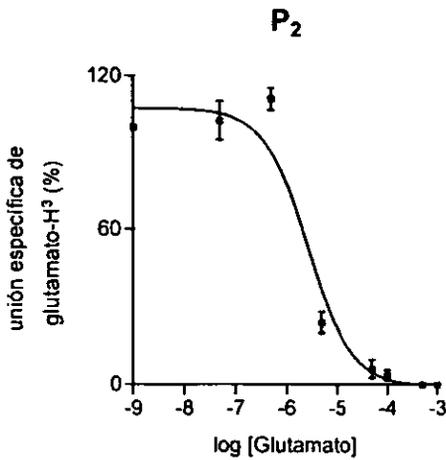
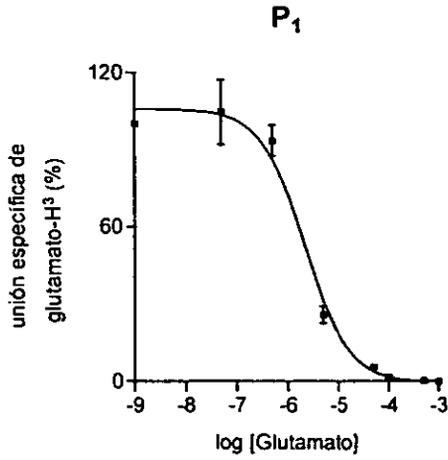
**Gráfica 3.** Curvas dosis-respuesta de la unión de glicina-H<sup>3</sup> en presencia de varias concentraciones de estriquina. Los experimentos se realizaron empleando membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina. Promedio  $\pm$  ES de cuatro experimentos, c/u por triplicado.

## B. Experimentos con glutamato- $H^3$ .

Para estudiar el efecto de la espermina sobre la unión de glutamato a sus receptores, se cuantificó la unión total de glutamato- $H^3$  a las membranas, en presencia de diferentes concentraciones de espermina (Gráfica 4). Los resultados demuestran que la poliamina tiene un efecto inhibitorio sobre el sitio de glutamato (coeficiente de Hill de 1.52 en  $P_1$  y de 1.54 en  $P_2$ ); en ambas capas plexiformes, concentraciones similares de espermina inhiben 50% la unión del radioligando ( $IC_{50}=92 \mu M$  en  $P_1$  y  $106 \mu M$  en  $P_2$ ). Se observó una inhibición máxima de la unión del glutamato- $H^3$  por espermina, de 60% de la unión total, a una concentración de 1 mM. Cuando se utilizaron diferentes concentraciones de glutamato no marcado como inhibidor de la unión del radioligando empleado (Gráfica 5), se calculó una  $IC_{50}=2.1 \mu M$  para  $P_1$  y de  $2.6 \mu M$  para  $P_2$  (coeficiente de Hill de 1.47 en  $P_1$  y de 5.22 en  $P_2$ ). La unión específica del glutamato- $H^3$  en esta preparación fue aproximadamente de 60% de la unión total.



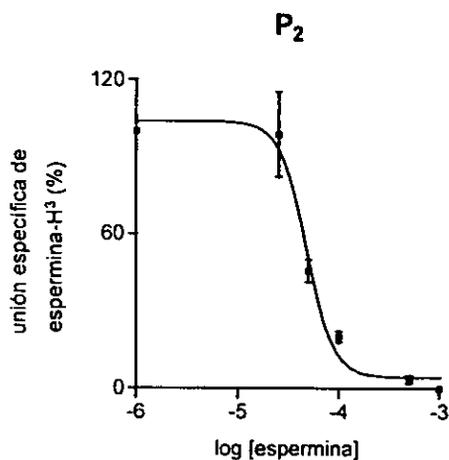
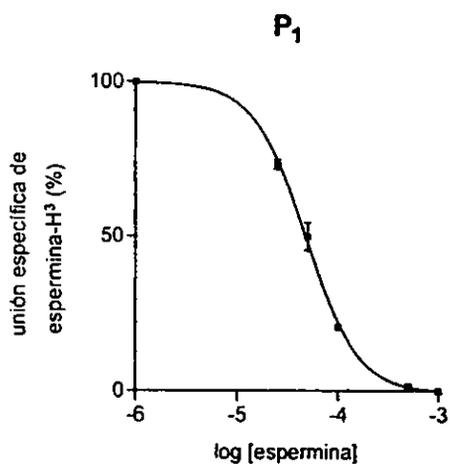
**Gráfica 4.** Curvas dosis-respuesta de la unión de glutamato-H<sup>3</sup> en presencia de varias concentraciones de espermina. Los experimentos se realizaron empleando membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina. Promedio  $\pm$  ES de tres experimentos, c/u por triplicado.



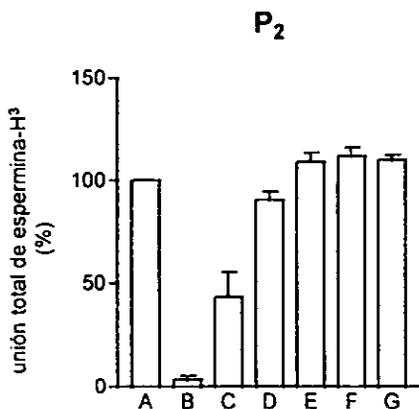
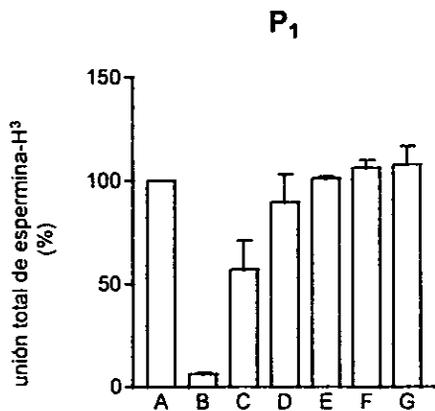
**Gráfica 5.** Curvas dosis-respuesta de la unión de glutamato-H<sup>3</sup> en presencia de varias concentraciones de glutamato. Los experimentos se realizaron empleando membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina. Promedio  $\pm$  ES de tres experimentos, c/u por triplicado.

### **C. Experimentos con espermina- $H^3$ .**

Se investigó la existencia de sitios específicos para espermina en membranas de la retina ( $P_1$  y  $P_2$ ), mediante la unión de espermina- $H^3$  en presencia de diferentes concentraciones de espermina no marcada (Gráfica 6); tanto en  $P_1$  como en  $P_2$  se calculó una  $IC_{50}=47 \mu M$  (coeficiente de Hill de 1.66 en  $P_1$  y de 3.23 en  $P_2$ ). La unión específica de la espermina en esta preparación fue de 90% de la unión total. En ambas capas plexiformes, la DET inhibió aproximadamente 40% la unión total del radioligando, mientras que, el glutamato, la glicina, el NMDA y el MK-801 no tuvieron efecto (Gráfica 7).



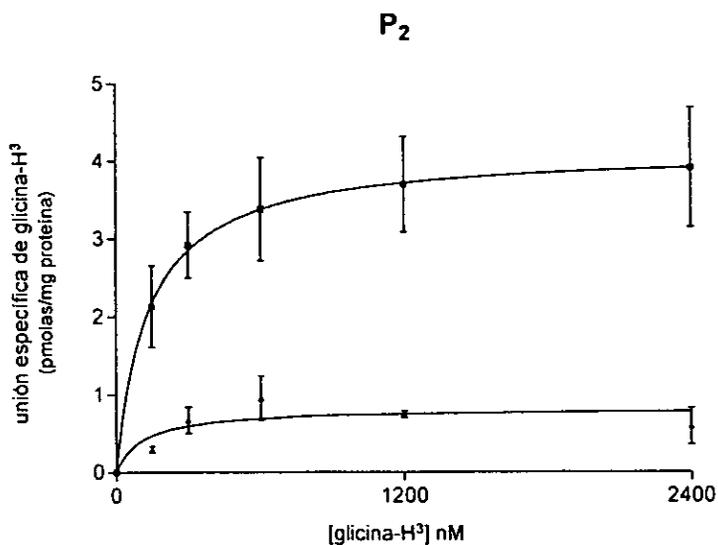
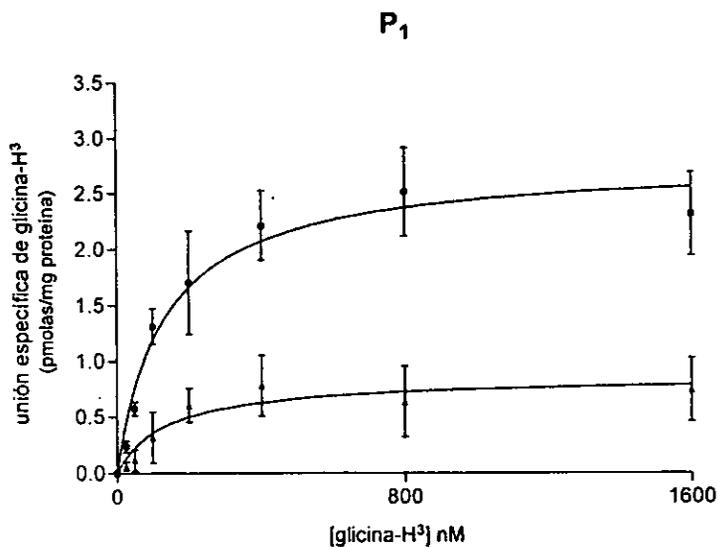
**Gráfica 6.** Curvas dosis-respuesta de la unión de espermina-H<sup>3</sup> en presencia de varias concentraciones de espermina. Los experimentos se realizaron empleando membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina. Promedio  $\pm$  ES de dos experimentos, c/u por triplicado.



**Gráfica 7.** Efecto de agonistas y antagonistas del receptor de tipo NMDA sobre la unión de espermina-H<sup>3</sup> en la retina. A, control; B, espermina 1 mM; C, dietilentriamina 1 mM; D, MK-801 200  $\mu$ M; E, glicina 1 mM; F, glutamato 1 mM; NMDA 1 mM. Promedio  $\pm$  ES de dos experimentos, *c/u* por triplicado.  $P > 0.05$ , *t* de student.

## 2.- Experimentos de saturación.

Para determinar el mecanismo de la inhibición de la unión de glicina- $H^3$  por espermina, se realizaron experimentos de saturación encaminados a dilucidar si la inhibición es de tipo competitivo, acompetitivo o no competitivo (Gráfica 8). Los resultados indican, que la concentración de receptores en la fracción  $P_2$  es mayor que la de la fracción  $P_1$  ( $B_{max}=2.76\pm 0.25$  pmolas/mg de proteína en  $P_1$  y  $4.13\pm 0.45$  pmolas/mg de proteína en  $P_2$ ). Por otra parte la unión de la glicina- $H^3$  se inhibe por espermina, en ambas capas plexiformes, de manera no competitiva, ya que disminuye el valor de la  $B_{max}$  ( $B_{max}=0.84\pm 0.16$  pmolas/mg de proteína en  $P_1$  y  $0.81\pm 0.16$  pmolas/mg de proteína en  $P_2$ ), sin alterar los valores de la  $K_D$ , que en las dos fracciones fue de 100-150 nM (Tabla 1).



**Gráfica 8.** Curvas de saturación de la unión específica de glicina- H<sup>3</sup> a membranas sinápticas de la retina de pollo, en ausencia (■) y presencia de 100 μM de espermina (▲). Promedio ± ES de dos a cuatro experimentos, c/u por triplicado. La K<sub>B</sub> y B<sub>max</sub> se calcularon por regresión no lineal con la ayuda del programa Graphpad.

TABLA 1

**Efecto de la espermina sobre los parámetros cinéticos de la unión de glicina- $H^3$  a membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina.**

Los valores que se muestran representan la media  $\pm$  el error estándar de 2-5 experimentos de saturación (20-2400 nM de glicina- $H^3$ ), cada uno por triplicado.

<sup>a</sup>Significativamente diferente del control,  $p < 0.05$ , prueba  $t$  de Student

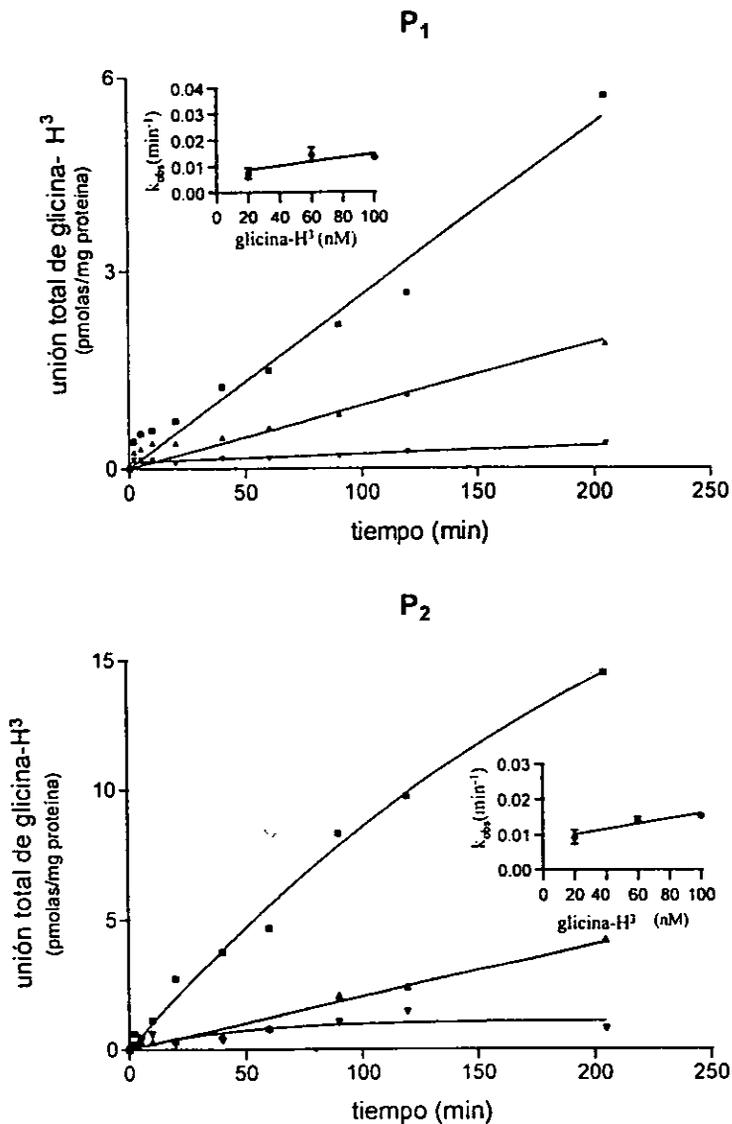
	P <sub>1</sub>	
	Control	Espermina (100 $\mu$ M)
B <sub>max</sub> (pmol/mg proteína)	2.76 $\pm$ 0.25	0.84 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
K <sub>B</sub> (nM)	139.12 $\pm$ 17.92	144.85 $\pm$ 15.95

	P <sub>2</sub>	
	Control	Espermina (100 $\mu$ M)
B <sub>max</sub> (pmol/mg proteína)	4.13 $\pm$ 0.45	0.81 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
K <sub>B</sub> (nM)	133.73 $\pm$ 11.67	108.56 $\pm$ 12.24

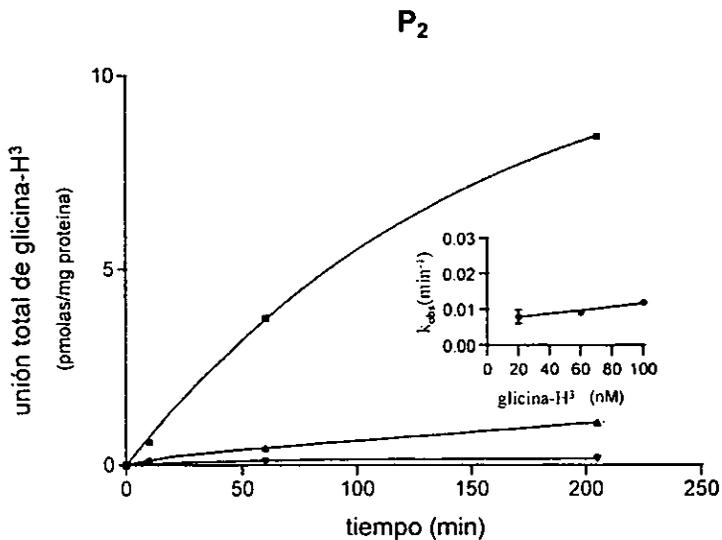
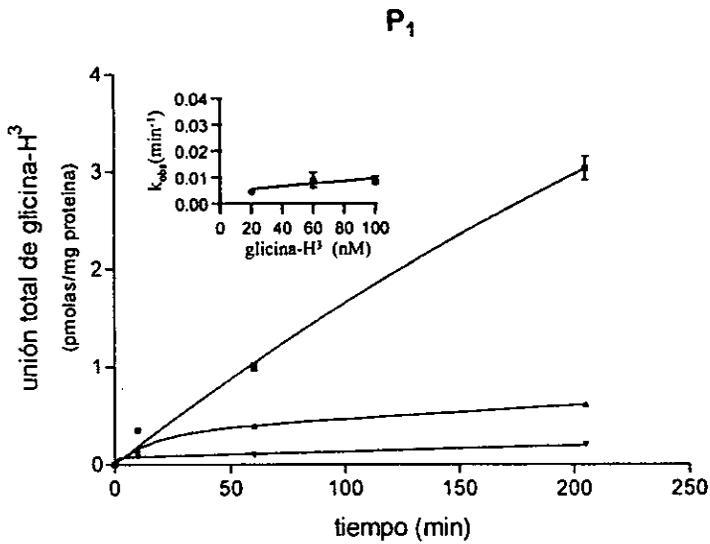
### 3.-Experimentos de asociación.

Se midió la unión de glicina- $H^3$  con la finalidad de calcular las constantes de asociación ( $k_{+1}$ ) y disociación ( $k_{-1}$ ) en ausencia y en presencia de una concentración constante de espermina (50  $\mu M$ ). Para ello se calculó la constante de afinidad aparente o,  $k$  observada ( $k_{obs}$ ), de los experimentos que se llevaron a cabo con 20, 60 y 100 nM de glicina- $H^3$  (Gráfica 9 y Gráfica 10). La  $k_{obs}$  en cada caso corresponde a la pendiente de la recta que resulta de graficar el logaritmo natural ( $\ln$ ) de la formación del complejo receptor-ligando con respecto al tiempo.

Las  $k_{obs}$  (Tabla 2) que se obtuvieron del análisis mencionado se graficaron con respecto a la concentración del radioligando empleado, para de esta manera obtener la  $k_{+1}$  y la  $k_{-1}$  (Tabla 3), que corresponden a la pendiente y a la ordenada al origen de la recta resultante, respectivamente.



**Gráfica 9.** Experimentos representativos de asociación a membranas sinaptosomales de retina de pollo, empleando 20 nM (▼), 60 nM (▲) y 100 nM (■) de glicina- H<sup>3</sup>. En los recuadros se aprecian las gráficas de la  $k_{obs}$  versus la concentración de glicina- H<sup>3</sup>.



**Gráfica 10.** Experimentos representativos de asociación a membranas sinaptosomales de retina de pollo, empleando 20 nM (▼), 60 nM (▲) y 100 nM (■) de glicina- H<sup>3</sup> en presencia de 50 μM de espermina. En los recuadros se aprecian las gráficas de la  $k_{obs}$  versus la concentración de glicina- H<sup>3</sup>.

TABLA 2

**Constantes de afinidad aparente ( $k_{obs}$ ) de la unión de glicina- $H^3$  a membranas sinaptosomales de las capas plexiformes de la retina.**

Los valores que se muestran representan la media  $\pm$  el error estándar de 2-3 experimentos, cada uno por triplicado.

$P_1$		
	Control	Espermina (50 $\mu$ M)
Concentración de glicina- $H^3$	$k_{obs}$ ( $\times 10^{-3}$ min $^{-1}$ )	
20 nM	7.51 $\pm$ 2.00	4.54 $\pm$ 0.46
60 nM	14.45 $\pm$ 2.60	8.95 $\pm$ 2.80
100 nM	13.45 $\pm$ 0.52	8.81 $\pm$ 1.49

$P_2$		
	Control	Espermina (50 $\mu$ M)
Concentración de glicina- $H^3$	$k_{obs}$ ( $\times 10^{-3}$ min $^{-1}$ )	
20 nM	9.30 $\pm$ 1.98	7.93 $\pm$ 1.96
60 nM	14.19 $\pm$ 0.99	9.13 $\pm$ 0.81
100 nM	15.31 $\pm$ 0.13	11.80 $\pm$ 0.03

TABLÀ 3

**Constantes de asociación ( $k_{+1}$ ) y disociación ( $k_{-1}$ ) calculadas a partir de los experimentos de asociación.**

La  $k_{+1}$  y la  $k_{-1}$  de los exerimentos de asociación se derivaron del análisis por regresión lineal de los valores de  $k_{obs}$ , determinados en presencia de 20, 60, y 100 nM de glicina- $H^3$ , *versus* la concentración de glicina- $H^3$ . En ambos casos la espermina no cambia los valores de  $k_{+1}$  y  $k_{-1}$  ( $p < 0.05$ , prueba *t* de Student)

	P <sub>1</sub>	
	Control	Espermina (50 µM)
$k_{+1} (\times 10^{-5} \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1})$	7.42±3.82	4.89±3.88
$k_{-1} (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$	7.35±2.60	4.61±2.80
$K_B = k_{-1}/k_{+1} \text{ (nM)}$	98.96	94.17

	P <sub>2</sub>	
	Control	Espermina (50 µM)
$k_{+1} (\times 10^{-5} \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1})$	7.50±2.50	4.72±2.54
$k_{-1} (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$	8.61±1.68	6.81±1.62
$K_B = k_{-1}/k_{+1} \text{ (nM)}$	114.80	144.10

## VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

López-Colomé *et al.* (1995) demostraron previamente, empleando glicina- $H^3$  como radioligando, que en las capas plexiformes de la retina de pollo existen receptores inhibidores de glicina de baja afinidad, sensibles a estricnina, así como receptores de glicina, con alta afinidad por este aminoácido y por un agonista del sitio de glicina en los receptores de tipo NMDA (ácido 1-aminociclopropano carboxílico ó ACPC), que forman parte del complejo proteico que conforma al receptor de tipo NMDA. Dichos resultados indican que en esta preparación se trabajó principalmente con receptores de tipo NMDA.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran un efecto de las poliaminas sobre los receptores de tipo NMDA, hasta ahora no descrito en otras regiones del SNC. Claramente las poliaminas inhiben la unión de la glicina- $H^3$  de manera dependiente de la concentración (Gráfica 1) y por un mecanismo no competitivo (Gráfica 8), ya que los experimentos de saturación, en presencia de espermina, muestran sólo una disminución de la  $B_{max}$  y no así de la  $K_B$ , en ambas capas plexiformes. Con respecto a la unión de glutamato- $H^3$ , la espermina también inhibe la unión de este radioligando de manera dependiente de la concentración (Gráfica 4), aunque en este caso no se tiene conocimiento del mecanismo por el cual se genera la inhibición ni los receptores glutamatérgicos involucrados, ya que

no se han realizado los estudios cinéticos y farmacológicos correspondientes. Al respecto, cabe mencionar que Williams (1994) encontró que la espermina disminuye la afinidad por el glutamato en los receptores del tipo NMDA que contenían subunidades NR1a/NR2B, por lo que no sería difícil pensar que el efecto que nosotros observamos sobre la unión de glutamato- $H^3$  en la preparación empleada en este trabajo, fuera sobre receptores de dicho tipo. Además, existen datos que indican que la inhibición ocasionada por las poliaminas sobre otros receptores glutamatérgicos, es a nivel de bloqueo de canal y no sobre el sitio de reconocimiento del neurotransmisor (Scott *et al.*, 1993).

Al calcular las constantes de asociación ( $k_{+1}$ ) y de disociación ( $k_{-1}$ ) de la unión de glicina- $H^3$  (Figuras 9 y 10) se encontró que la espermina no afecta dichas constantes cinéticas (Tabla 3). En estos experimentos de asociación la espermina disminuyó la unión de la glicina- $H^3$  con respecto al tiempo. Estos resultados, aunados a la disminución de la  $B_{max}$  que se observa en los experimentos de saturación, podrían interpretarse si la espermina, en función de su concentración, inactivara una fracción de los receptores en la preparación, manteniendo al resto funcionando de manera correcta. Esta hipótesis se podría fundamentar en el hecho de que a altas concentraciones la espermina inhibe la unión inespecífica de la glicina- $H^3$  por un cambio en el ambiente iónico en los experimentos o por alteración,

de manera inespecífica, del ambiente lipídico de la preparación (Ballas *et al.*, 1983). Si este fuera el caso la espermina estaría actuando sobre la unión de la glicina- $H^3$  por vías indirectas y no sobre el receptor de NMDA o la membrana lipídica que lo rodea, por lo que se hicieron los experimentos correspondientes utilizando espermina- $H^3$  para determinar si existía unión específica de este polication, ya sea al receptor o sobre la membrana lipídica. Los resultados indican que existe unión específica de espermina- $H^3$  con un perfil farmacológico que la define (Gráficas 6 y 7), por lo que se puede concluir que la espermina modula la unión de glicina- $H^3$  a través de una vía específica, esto es, que esta modulación tiene relevancia fisiológica. Para determinar si la poliamina se une directamente al receptor de NMDA será necesario, en experimentos posteriores, tratar la preparación de membranas sinaptosomales con algún detergente que desestabilice la fase lipídica de la membrana para ver si la unión de espermina y su efecto sobre la unión de glicina- $H^3$  persisten.

En resumen, se puede concluir que a altas concentraciones la espermina desestabiliza de manera inespecífica la unión de la glicina- $H^3$ , al grado de alterar la unión inespecífica de este radioligando. Este efecto no se observa con el glutamato- $H^3$ , quizá porque su unión al receptor involucra más cargas, y por ende es más estable. De igual forma a bajas concentraciones, la espermina modula la unión de la glicina- $H^3$  y el

glutamato- $H^3$  vía receptores de tipo NMDA, considerando no sólo el complejo proteico sino también la membrana lipídica que lo rodea.

La regresión no lineal que se calculó en los experimentos de asociación realizados con 20 nM del radioligando, en presencia y ausencia de espermina, demuestra que, por lo menos en la fracción  $P_1$ , la unión de la glicina- $H^3$  se ajusta mejor a un modelo de unión a dos sitios (Gráficas 9 y 10). Contrario a esto, se tiene que los experimentos de saturación y la regresión no lineal, así como los experimentos de asociación que se hicieron con 60 y 100 nM de glicina- $H^3$  en presencia y ausencia de espermina sólo indican la existencia de un sitio para glicina en estas preparaciones.

De las observaciones anteriores podría pensarse que en los receptores de tipo NMDA, a altas concentraciones de glicina, se presenta un fenómeno de cooperatividad negativa entre los sitios de unión a este aminoácido. Esto es, que a mayor concentración del cotransmisor los sitios de menor afinidad por la glicina ejercen un efecto inhibitor sobre los de mayor afinidad. Es importante mencionar que el tiempo de incubación de los experimentos puede ser una limitante que, al menos en los experimentos de saturación, no permitió observar más de un sitio de unión, ya que en los experimentos de asociación el tiempo máximo de incubación fué de más de tres horas mientras que en los de saturación la reacción se

detuvo a las dos horas, evitando posiblemente, que las bajas concentraciones del radioligando llegaran a alcanzar el equilibrio con más de un sitio. El esclarecimiento de este efecto es uno de los principales objetivos de trabajo actualmente en el laboratorio.

Otro aspecto interesante de este estudio se observa en las curvas dosis-respuesta con glicina- $H^3$ . Empleando a la glicina no marcada como competidor en presencia de 100  $\mu M$  de espermina se obtiene una curva bifásica que no se observa en su ausencia (López-Colomé *et al.*, 1995). Esto podría explicarse proponiendo la existencia de varias poblaciones de sitios de glicina con afinidad similar por la glicina, pero diferentes en cuanto a su modulación por poliaminas. Por otra parte, como el coeficiente de Hill para la unión de espermina- $H^3$  es mayor de 1, cabe la posibilidad de que la modulación ejercida por esta poliamina se de a través de su interacción con mas de un sitio de unión, con diferentes constantes de inhibición ( $k_i$ ) sobre la unión de glicina- $H^3$ .

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian un efecto diferente de la espermina sobre los receptores de NMDA en la retina, comparado con el efecto sobre los mismos en el SNC. Tales diferencias pueden atribuirse a la composición heteromérica que los receptores de NMDA. En este sentido, Brandstätter *et al.* (1994), utilizando la técnica de hibridación *in situ*, demostraron que en la retina de rata adulta se sintetiza

el mRNA que codifica para cuatro subunidades del receptor de tipo NMDA (NR1, NR2A, NR2B y NR2C). Asimismo Monyer *et al.* (1992) encontraron que en el cerebro de rata existe una síntesis diferencial del mRNA que codifica para las diferentes subunidades del receptor para NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C), lo que determina que estos receptores difieran en su composición dependiendo de la región del cerebro en la que se expresen. Por tal motivo es de esperarse que el efecto de la espermina sobre estos receptores dependa de la composición heteromérica de los mismos (Williams, 1995; Johnson, 1996). No obstante, cabe mencionar que el efecto descrito en este trabajo no se observó en las diferentes combinaciones de subunidades empleadas en las clonas que Williams (1995) utilizó en sus estudios. Estas observaciones podrían deberse a diferencias en la composición de aminoácidos de alguna subunidad del receptor, o bien, a que la composición heteromérica de los mismos receptores es distinta en este tejido. A este respecto es importante mencionar que el mRNA de la subunidad NR2C sólo se ha identificado en el cerebelo y en la retina en el estado adulto, por lo que es probable que en estas dos estructuras del SNC los receptores de NMDA sean similares.

Puede concluirse de este estudio que, en la retina de pollo, el efecto de la espermina sobre el sitio de glicina de los receptores de NMDA, es distinto de los efectos descritos en otras regiones del SNC. Esto sugiere

que la modulación de la actividad de los receptores de tipo NMDA reviste características diferenciales en el tejido nervioso, posiblemente en relación con las funciones especializadas que se atribuyen a las distintas áreas del SNC.

### VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Ballas, S. K., N. Mohandas, L. J. Marton, and S. B. Shoheit. Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 1942-1946 (1983).
- Benveniste, M., and M. L. Mayer. Multiple effects of spermine on *N*-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J. Physiol.* **464**: 131-163 (1993).
- Brandstätter, J. H., E. Hartveit, M. Sassoè-Pognetto, and H. Wässle. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur. J. Neurosci.* **6**: 1100-1112 (1994).
- Fage, D., C. Voltz, B. Scatton, and C. Carter. Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by *N*-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. *J. Neurochem.* **58**: 2170-2175 (1992).
- Gallagher, M. J., H. Huang, D. B. Pritchett, and D. R. Lynch. Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **271**: 9603-9611 (1996).

que la modulación de la actividad de los receptores de tipo NMDA reviste características diferenciales en el tejido nervioso, posiblemente en relación con las funciones especializadas que se atribuyen a las distintas áreas del SNC.

### VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Ballas, S. K., N. Mohandas, L. J. Marton, and S. B. Shoheit. Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 1942-1946 (1983).
- Benveniste, M., and M. L. Mayer. Multiple effects of spermine on *N*-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J. Physiol.* **464**: 131-163 (1993).
- Brandstätter, J. H., E. Hartveit, M. Sassoè-Pognetto, and H. Wässle. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur. J. Neurosci.* **6**: 1100-1112 (1994).
- Fage, D., C. Voltz, B. Scatton, and C. Carter. Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by *N*-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. *J. Neurochem.* **58**: 2170-2175 (1992).
- Gallagher, M. J., H. Huang, D. B. Pritchett, and D. R. Lynch. Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **271**: 9603-9611 (1996).

- Guylaine, M. D., M. V. L. Bennett, and S. Zukin. Splice variants of the *N*-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 6731-6735 (1993).
- Harman, R. J. and G. G. Shaw. High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* **36**: 1609-1615 (1981)
- Huettner, J. E. (1997). Functional Properties of Kainate Receptors. En: Monaghan, D. T. y Wenthold, R. J. (Ed.). The Ionotropic Glutamate Receptors (pp.265-283). New Jersey. Humana Press.
- Ishii, T., K. Moriyoshi, H. Sugihara, K. Sakurada, H. Kadotani, M. Yokoi, C. Akasawa, R. Shigemoto, N. Mizuno, M. Masu, and S. Nakanishi. Molecular characterization of the family of the *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* **268**: 2836-2843 (1993).
- Jäne, J., H. Pösö and A. Raina. Polyamines in rapid growth and cancer *Biochim. Biophys. Acta* **473**: 241-293 (1978).
- Johnson, T. D. Modulation of channel function by polyamines. *TiPS* **17**: 22-27 (1996).
- Kashiwagi, K., J. Fukuchi, J. Chao, K. Igarashi, and K. Williams. An aspartate residue in the extracellular loop of the *N*-methyl-D-aspartate

receptor controls sensitivity to spermine and protons. *Mol. Pharmacol.* **49**: 1131-1141 (1996).

- Kerry, C. J., R. L. Ramsey, M. S. P. Sansom and P. N. R. Usherwood. Single channel studies of non-competitive antagonism of a quisqualate-sensitive glutamate receptor by argitoxin<sub>636</sub> -- a fraction isolated from orb-weaver spider venom. *Brain Res.* **459**, 312-327 (1988).
- Kutsuwada, T., N. Kashiwabuchi, H. Mori, K. Sakimura, E. Kushiya, K. Araki, H. Meguro, H. Masaki, T. Kumanishi, M. Arakawa, and M. Mishina. Molecular diversity of NMDA receptor channel. *Nature* **358**: 36-41 (1992).
- López-Colomé, A. M., F. Calderón, and A. Rodríguez. Modulatory effects of polyamines on strychnine-insensitive glycine receptors in chick retina. *Soc. Neurosci. Abstr.*, Vol. 21, Part 1, p.145.20, 1995.
- López-Colomé, A. M., M. Romo-de-Vivar. Excitatory amino acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina. *Glia* **4**: 431-439 (1991).
- López-Colomé, A. M., A. Ortega, and M. Romo-de-Vivar. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Müller glia. *Glia* **9**:127-135 (1993).

- López-Colomé, A. M. (1995). La transmisión excitadora en la retina: receptores involucrados y sus mecanismos bioquímicos. En: Meza-Ruiz G. (Ed.). Neurobiología de los sistemas sensoriales (pp. 43-63). México, D. F. Coordinación de la Investigación Científica.
- López-Colomé, A. M. High affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. *Neurochem. Res.* 6: 1019-1033 (1981).
- López-Colomé, A. M. and F. Somohano. Characterization of L-<sup>3</sup>H-aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. *Vision Res.* 22: 1495-1501 (1982).
- López-Colomé, A. M. (1986). Amino acids as excitatory transmitters in the retina. En Roberts P. J., Storm-Mathisen J., Bradford H. F. (Eds). Excitatory Amino Acids. (pp 143-157) London. Macmillan Press.
- López-Colomé, A. M. and F. Somohano. Characterization of quisqualate type L-glutamate receptors in the retina. *Brain Res.* 414: 99-108 (1987).
- López-Colomé, A. M. and F. Somohano. N-methyl-D-aspartate receptors in the retina: 3-[(±)-2-carboxypiperazin-4-yl]-propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies. *Neuropharmacology* 31: 577-584 (1992).
- Lowry, O. H., W. H. Rosebrough, A. L. Farr, and R. S. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Lynch, D. R., N. J. Anegawa, T. Verdoorn, and D. B. Pritchett. N-methyl-D-aspartate receptors: different subunit requirements for binding of glutamate antagonists, glycine antagonists, and channel-blocking agents. *Mol. Pharmacol.* **45**: 540-545 (1994).
- Marvizón, J. C. and M. Baudry. [<sup>3</sup>H]dizocilpine association kinetics distinguish stimulatory and inhibitory polyamine sites of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurochem.* **63**: 963-971 (1994).
- Meguro, H., H. Mori, K. Araki, E. Kushiya, T. Kutsuwada, M. Yamazaki, T. Kumanishi, M. Arakawa, K. Sakimura, and M. Mishina. Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* **357**: 70-74 (1992).
- Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann, and P. H. Seeburg. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256**: 1217-1221 (1992).
- Moriyoshi, K., M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno and S. Nakanishi. Molecular cloning and characterization of the NMDA receptor. *Nature* **354**: 31-37 (1991).
- Nakanishi, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* **258**: 597-603 (1992).

- Nicholls, D. G. (1994). Proteins, Transmitters and Synapses (pp5-6). Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Raina, A., L. R. Pajula and T. Eloranta. A rapid assay method for spermidine and spermine synthase. Distribution of polyamine synthesizing enzymes and methionine adenosyltransferase in rat tissues FEBS Lett. **67**: 252-256 (1976).
- Ransom, R. W. and N. L. Stec. Cooperative modulation of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to the *N*-methyl-D-aspartate receptor- ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. J. Neurochem. **51**: 830-836 (1988).
- Ransom, R. W., and N. L. Deschenes. Polyamines regulate glycine interaction with the *N*-methyl-D-aspartate receptor. Synapse **5**: 294-298 (1990).
- Rock, D. M., and R. L. MacDonald. Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. **35**:463-482 (1995).
- Rock, D. M., and R. L. MacDonald. Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of *N*-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. Mol Pharmacol. **42**: 157-164 (1992).

- Romano, C., K. Williams, S. DePriest, R. Seshadri, R. G. Marshall, M. Israel, and P. B. Molinoff. Effects of mono-, di-, and triamines on the N-methyl-D-aspartate receptor complex: a model of polyamine recognition site. *Mol. Pharmacol.* **41**: 785-792 (1992).
- Scott, R. H., K. G. Sutton, and A. C. Dolphin. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *TINS* **16**: 153-160 (1993).
- Scott, R. H., M. I. Sweeney, E. M. Kobrinsky, H. A. Pearson, G. H. Timms, I. A. Pullar, S. Wedley, A. C. Dolphin. Actions of arginine polyamine on voltage and ligand-activated whole cell currents recorded from cultured neurones. *Br. J. Pharmacol.* **106**: 199-207 (1992).
- Seiler, N. Polyamines metabolism and function in brain. *Neurochem. Int.* **3**:95-110 (1981).
- Seiler, N. and U. Lamberty. Interrelations between polyamines and nucleic acids: changes of polyamines and nucleic acid concentrations in developing rat brain. *J. Neurochem.* **24**: 5-13 (1975).
- Somohano, F. y A. M. López-Colomé Aminoácidos excitadores y plasticidad neuronal. *Ciencia* **41**: 111-122 (1990).
- Somohano, F., P. J. Roberts, and A. M. López-Colomé. Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors. *Dev. Brain Res.* **42**, 59-67 (1988).

- Subramaniam, S., and P. McGonigle. Regional profile of developmental changes in the sensitivity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor to polyamines. *J. Neurochem.* **62**, 1408-1415 (1994).
- Traynelis, S. F., M. Hartley, and S. F. Heinemann. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268**: 873-876 (1995).
- Wafford, K. A., C. J. Bain, B. L. Bourdelles, P. J. Whiting, and J. A. Kemp. Preferential co-assembly of recombinant NMDA receptors composed of three different subunits. *Neuroreport* **4**: 1347-1349 (1993).
- Williams-Ashman, H. G. and Z. Canellakis. Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspective in Biology and Medicine* **22**: 421-453 (1979).
- Williams, K., A. M. Zappia, D. B. Pritchett, Y. M. Shen, and P. B. Molinoff. Sensitivity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol. Pharmacol.* **45**: 803-809 (1994).
- Williams, K., C. Romano and P. B. Molinoff. Effects of polyamines on the binding of [<sup>3</sup>H]MK-801 to the *N*-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol. Pharmacol.* **36**, 575-81 (1989).

- Williams, K. Mechanisms influencing stimulatory effects of spermine at recombinant *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* **46**, 161-168 (1994)
- Williams, K. Pharmacological properties of recombinant *N*-methyl-D aspartate (NMDA) receptors containing the  $\epsilon 4$  (NR2D) subunit. *Neurosci. Lett.* **184**: 181-184 (1995).