



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LIBERACIÓN DE ESPERMINA - [<sup>3</sup>H] EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MÜLLER Y NEURONAS DE LA RETINA DE POLLO.

# T E S I S

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



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. ANA MARIA LÓPEZ COLOMÉ



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

206570



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Liberación de espermina-H<sup>3</sup> en cultivos primarios de células de Müller y neuronas de la retina de pollo.

realizado por Gabriela Rodríguez Rodríguez

con número de cuenta 8606191-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Ana María López Colomé

Propietario

Dra. Lourdes Massieu Trigo

Propietario

Q. Silvestre Alavez Espidio

Suplente

Dr. Julio Eduardo R. Morán Andrade

Suplente

Dr. Octavio Quesada García

FACULTAD DE CIENCIAS

U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*Edna María Suárez Díaz*

Coordinadora de la licenciatura  
Dra. Edna María Suárez Díaz

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M., y con el apoyo parcial del donativo de CONACYT 400346-5-31812N.

Gabriela Rodríguez Rodríguez fué becaria del Programa de Becas de Licenciatura en Proyectos de Investigación (Fundación U.N.A.M.).

A mis padres, Benito Rodríguez y Altagracia Rodríguez por su confianza, comprensión y  
cariño de siempre

A Clarita, por que la considero más que una segunda madre

A mis hermanas

A mis enanos y enanas (todos mis pequeños sobrinos y los pequeños que ahora son aves  
con grandes alas)

A Fernando por su amistad y cariño durante toda la carrera, así como por su necesidad  
durante tantos años. Por su amor y comprensión ahora como pareja

A mis grandes amigos de toda la vida.....

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Ana María López Colomé por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio así como por su paciencia y apoyo en la realización del mismo.

A los miembros del jurado, Dra. Lourdes Massieu Trigo, Q. Silvestre Alavez Espidio, Dr. Julio Eduardo R. Morán Andrade, y Dr. Octavio Quesada García por sus comentarios y sugerencias.

A mis compañeros del laboratorio, Ana, Irene y Violeta, así como a Israel y Vietminh, por su ayuda y amistad, y muy especialmente a Edithe por su apoyo incondicional y a Froy que tanto me ayudo.

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>ii</b>
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS</b>	<b>1</b>
1.1 MORFOLOGÍA	2
1.2 PRINCIPALES TIPOS CELULARES	3
1.2.1 NEURONAS	3
1.2.2 FOTORRECEPTORES	4
1.2.3 CÉLULAS GLIALES	5
<b>2. FISIOLOGÍA DE LA RETINA</b>	<b>7</b>
<b>3. AMINOÁCIDOS EXCITADORES</b>	<b>9</b>
3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS EXCITADORES	9
<b>4. RECEPTOR DE NMDA</b>	<b>13</b>
<b>5. POLIAMINAS</b>	<b>16</b>
<b>II ANTECEDENTES</b>	<b>19</b>
1. LAS POLIAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO	19
2. LIBERACIÓN DE LAS POLIAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO	19
<b>III OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>IV METODOLOGÍA</b>	<b>23</b>
1. EXTRACCIÓN DE LA RETINA DE POLLO	23
2. CULTIVOS PRIMARIOS DE LA GLÍA DE MÜLLER Y NEURONAS DE LA RETINA DE POLLO	23

3.	<b>SISTEMA DE SUPERFUSIÓN CONTÍNUA</b>	24
3.1	SUPERFUSIÓN DE LA RETINA DE POLLO	24
3.2	SUPERFUSIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE LA RETINA DE POLLO	25
4.	<b>ANÁLISIS DE DATOS</b>	26
V	<b>RESULTADOS</b>	29
1.	<b>LIBERACIÓN DE ESPERMINA-<math>{}^3\text{H}</math> DE LA RETINA DE POLLO</b>	29
1.1	EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO SOBRE LA LIBERACIÓN DE $\text{spm-}{}^3\text{H}$	29
1.2	EFFECTO DE LA DESPOLARIZACIÓN SOBRE LA LIBERACIÓN DE $\text{spm-}{}^3\text{H}$	29
1.3	EFFECTO DE LA OUABAINA SOBRE LA LIBERACIÓN DE $\text{spm-}{}^3\text{H}$	34
2.	<b>LIBERACIÓN DE ESPERMINA-<math>{}^3\text{H}</math> EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MÜLLER Y NEURONAS DE LA RETINA</b>	34
2.1	EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO SOBRE LA LIBERACIÓN DE $\text{spm-}{}^3\text{H}$	34
2.2	EFFECTO DE LA DESPOLARIZACIÓN SOBRE LA LIBERACIÓN DE $\text{spm-}{}^3\text{H}$	39
2.3	EFFECTO DE LA OUABAINA SOBRE LA LIBERACIÓN DE $\text{spm-}{}^3\text{H}$	43
VI	<b>DISCUSIÓN</b>	51
1.	<b>PARTICIPACIÓN DEL <math>\text{Ca}^{2+}</math> EN LA LIBERACIÓN DE <math>\text{spm-}{}^3\text{H}</math></b>	53
2.	<b>PARTICIPACIÓN DEL <math>\text{Na}^+</math> EN LA LIBERACIÓN DE <math>\text{spm-}{}^3\text{H}</math></b>	53
VII	<b>CONCLUSIÓN</b>	58
VIII	<b>APÉNDICE</b>	59
VIX	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	62

## RESUMEN

La retina de los vertebrados, por sus características anatómicas y funcionales, se ha considerado como un buen modelo para estudiar los procesos análogos que se presentan en el sistema nervioso central (Adler y Farber, 1986). Por otra parte el interés en el estudio de las PA se debe, además de su participación en procesos de crecimiento, diferenciación celular, reparación del tejido nervioso y procesos neurodegenerativos, a su probable papel como sustancias neuromoduladoras o neurotransmisoras (Carter, 1994). La liberación de PA ha sido reportada en algunas áreas del cerebro, específicamente en el estriado de rata (Harman y Shaw, 1981; Fage et al., 1992; Fage et al., 1993; Nicolas et al., 1994), así como la presencia de dos sistemas de transporte de alta afinidad en la corteza cerebral de rata (Harman y Shaw, 1981). Asimismo, experimentos de biología molecular, electrofisiología y bioquímica indican que la *spm* y la *spd* modulan la actividad neuroexcitadora del glutamato, a través de su interacción con receptores de tipo NMDA (Mayer et al., 1992; Rock y Macdonald, 1995; Carter, 1994). A diferencia de los anterior en el presente trabajo se demostró que la liberación de *spm*-[<sup>3</sup>H] de la retina no depende de la activación del receptor de NMDA. La *spm*-[<sup>3</sup>H] se libera por despolarización con alto potasio, tanto de la retina completa como de los dos tipos celulares que la componen (células de Müller y neuronas "en cultivo"), en forma independiente de sodio. Por otra parte, en la retina completa y en cultivo de neuronas, la liberación por despolarización es independiente de calcio, mientras que en las células de Müller en cultivo, parece estar regulada por el calcio intracelular, el cual inhibe la liberación, posiblemente por su acción sobre proteínas intercambiadoras, o a través de un mecanismo de segundos mensajeros. La liberación provocada por ouabaina, también es dependiente de calcio, debido a que el efecto que produce se revierte por la presencia de los quelantes de calcio (EGTA y BAPTA AM), lo que sugiere que este catión podría ejercer una modulación negativa en el proceso, a través de alguna vía de segundos mensajeros. Con base en los resultados, se propone que el mecanismo de liberación de *spm* en los sistemas explorados, es a través de la actividad inversa del transportador de las PA, actividad reportada para otros transmisores (Raiteri et al., 1979; Westerink et al., 1989; Nicholls y Attwell., 1990; Szatkowski et al., 1990; Attwell D. et al., 1993; Paulo et al., 1996). Estos resultados apoyan los trabajos en retina, en los que se reporta diferencias farmacológicas en el receptor de NMDA (Lombardi et al., 1994; Rodríguez-Contreras; 1998; López-Colomé y Somohano, 1992; Boje et al., 1992), con respecto a lo descrito en otras áreas del SN (Collingridge y Singer, 1990; Johnson y Ascher, 1987; Ransom y Stec, 1988; Young y Fage, 1990; Ascher y Nowak, 1987).

## ABREVIATURAS

AAE	Aminoácidos excitadores
AC	Adenilil ciclasa
ACPD	(±)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxilato
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP4	Ácido 2-amino-4-fosfonobutírico
Asp	Ácido aspártico
BAPTA AM	Ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi) etan-N, N, N', N'-tetra-acético
CCG-I	Carboxiciclopropilglicina-I
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CPM	Cuentas por minuto
CPP	3-[(±)-2-carboxipiperazin-4-yl] propil-1-fosfonato
DAG	Diacilglicerol
DCG-IV	2-(2-3-dicarboxiciclopropil)glicina-IV
DHPG	(RS)-3,5-dihidroxifenilglicina
DIV	Días in vitro
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(β-amino-etil eter) N, N'-tetra-acético
EPR	Epitelio pigmentado de la retina
ERC	Factor de liberación (en inglés: efflux rate constant)
FBS	Suero fetal bovino
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
IBO	Ácido iboténico
IP3	Inositol trifosfato
KA	Ácido kaínico
L-SOP	L-ortofosfato de serina
MCPG	α-metil-4-carboxifenilglicina
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] ciclohepteno-5,10-imina
NMDA	N-metil-D-aspartato

ODC	Ornitina descarboxilasa
PA	Poliamina
PLC	Fosfolipasa C
PIP2	Fosfatidil inositol bifosfato
QA	Ácido quiscuálico
RKB	Ringer Krebs Bicarbonato
SNC	Sistema nervioso central
spm	Espermina
spd	Espermidina
TTX	Tetrodotoxina

# I INTRODUCCIÓN

## 1. LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

La retina de los vertebrados, por sus características anatómicas y funcionales, se ha considerado como un buen modelo para estudiar los procesos análogos que se presentan en el sistema nervioso central (SNC). Anatómicamente se ubica en la parte posterior del ojo, en contacto con el epitelio pigmentado de la retina (EPR) (figura 1).

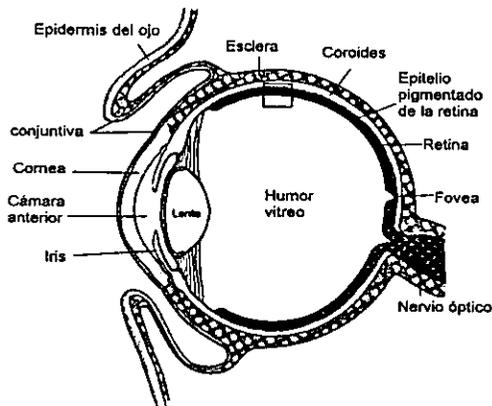


Figura 1. Corte sagital del ojo de los vertebrados superiores. El recuadro muestra la organización de las diferentes capas de la retina, la cual se muestra en la figura 2 (Adler y Farber, 1986).

En ella se distinguen por su posición, formas, propiedades bioquímicas y funciones, 6 tipos de células neuronales: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares, ganglionares, horizontales, amacrinas e interplexiformes (Adler y Farber, 1986), además de dos tipos de células gliales, las células de Müller y los astrocitos. Las células de Müller son una forma especializada de los astrocitos tipo 1, y constituyen el elemento glial más abundante en la retina de los vertebrados (Bussow, 1980).

## 1.1 MORFOLOGÍA

La retina es una estructura estratificada bien definida, formada por 3 capas celulares, la capa nuclear externa donde se encuentran los somas de los fotorreceptores, la capa nuclear interna compuesta por los cuerpos celulares de las interneuronas como son las células horizontales, bipolares y amacrinas y la tercera capa, formada por las células ganglionares cuyos axones forman el nervio óptico.

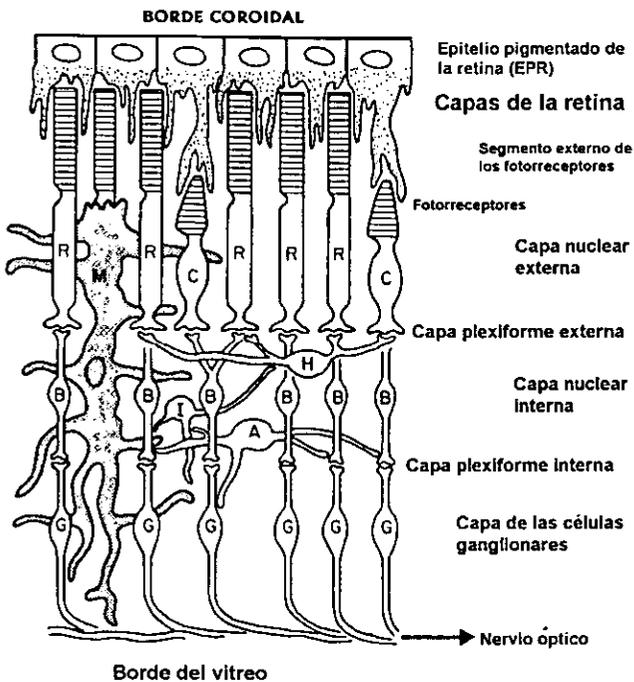


Figura 2. Retina de los vertebrados. Diagrama en el que se representa las diferentes capas que la constituyen así como sus relaciones sinápticas. Los principales tipos celulares son: R, bastones; C, conos; H, células horizontales; B, células bipolares; A, células amacrinas; I, células interplexiformes; G, células ganglionares; M, células de Müller (Adler y Farber, 1986).

Entre estas 3 capas existen 2 capas plexiformes, en las que hacen sinapsis los diferentes tipos neuronales: 1) la capa plexiforme externa en la que las terminales de los fotorreceptores forman sinapsis con las terminales nerviosas de las células horizontales y bipolares, además de las sinapsis entre células horizontales y entre células horizontales y bipolares, y 2) la capa plexiforme interna, formada por las uniones sinápticas de las células bipolares con las amacrinas y ganglionares simultáneamente. Asimismo, en este estrato, establecen sinapsis las células amacrinas entre ellas, así como contacto con células bipolares y ganglionares. Las células bipolares transmiten la información visual de la capa plexiforme externa a la capa plexiforme interna, en la que establecen sinapsis con las células ganglionares; los axones de las células ganglionares corren sobre la superficie interna de la retina para converger en un punto y formar el nervio óptico, sitio donde no existen células neurosensoriales, por lo que representan un punto ciego del campo visual (Dowling, 1970) (figura 2).

## **1.2 PRINCIPALES TIPOS CELULARES**

### **1.2.1 LAS NEURONAS**

Las neuronas tienen la capacidad de establecer contactos específicos, conocidos como sinapsis, con otras células nerviosas; además tienen la habilidad de conducir impulsos eléctricos sin disminuir su intensidad. Morfológicamente se distinguen tres estructuras principales, el cuerpo o soma celular, que presenta extensiones citoplasmáticas, con las que forma el axón y las dendritas. Los axones generalmente son largos, y en algunos casos se recubren de una capa de mielina, conducen los potenciales de acción desde el soma hasta su extremo distal, el cual puede dividirse en numerosas ramas que distribuyen las señales de manera simultánea. Las dendritas son normalmente más gruesas, cortas y ramificadas y no poseen cubierta de mielina (Darnel, et al. 1986). Proporcionan la mayor área superficial para la recepción de señales procedentes de otras células. El potencial de reposo de la membrana de la mayor parte de neuronas es de  $-70\text{mV}$ , negativo en el interior de la célula con respecto a su exterior (Kuffler y Nichols, 1977).

## 1.2.2 LOS FOTORRECEPTORES

Los fotorreceptores, tanto conos como bastones, tienen 2 regiones principales: el segmento externo, que contiene los pigmentos que absorben la luz de diferentes longitudes de onda, y el segmento interno, en el que se localizan los organelos subcelulares de toda célula eucarionte, además de la terminal sináptica, que se conecta con las células horizontales y bipolares (figura 3).

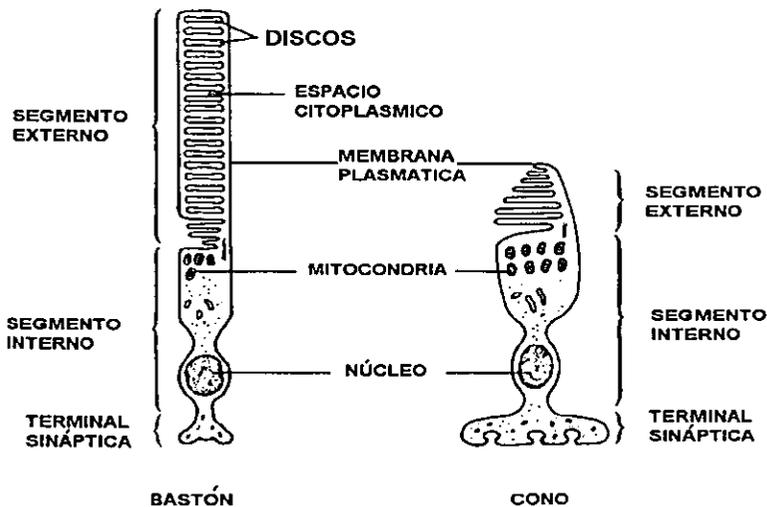


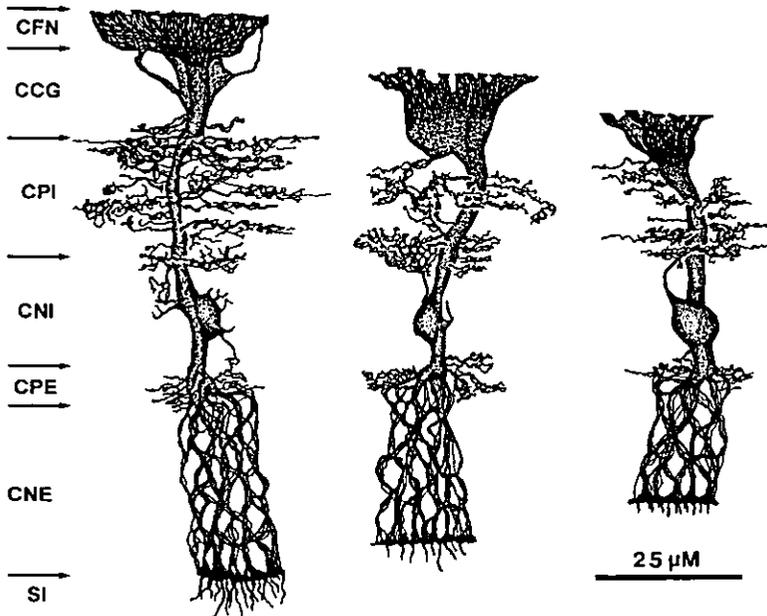
Figura 3. Principales tipos de fotorreceptores (conos y bastones) y sus principales estructuras celulares (Kandel, 2000).

El segmento externo de conos y bastones contiene rodopsina que absorbe la luz a 500nm. Los bastones son los responsables de la percepción de la luz-oscuridad, mientras que los conos son las células responsables de la visión a color; existen varios tipos de conos, que contienen pigmentos que absorben luz de diferentes longitudes de onda: 420nm (en el azul), 538nm (en el verde) y 575nm (en el rojo) (Nathans, 1987).

### 1.2.3 CÉLULAS GLIALES

La glía se clasifica, de acuerdo con su origen ontogenético, en microglia, de origen mesodérmico y macroglia, de origen ectodérmico. Las células de microglia son pequeñas, bipolares o multipolares y se localizan en la materia gris; son móviles y desempeñan una función fagocítica. La macroglia incluye a los astrocitos y los oligodendrocitos. Morfológicamente, los oligodendrocitos tienen pequeños cuerpos celulares que presentan pocos procesos con pequeños alargamientos nodulares; su núcleo es pequeño y su cromatina está comprimida. Estas células se encuentran en la materia blanca y en la materia gris, y son las responsables de la formación de la vaina de mielina alrededor de los axones de las neuronas. Esta vaina aísla eléctricamente a los axones, lo que favorece la conducción de las señales eléctricas. Por otra parte los astrocitos, son las células gliales más abundantes, sus cuerpos celulares son irregulares y presentan largos procesos. Algunos astrocitos presentan pies terminales que hacen contacto con neuronas y vasos sanguíneos, lo cual ha llevado a pensar que también nutren a las neuronas. El potencial de reposo de los astrocitos está determinado por su alta permeabilidad al  $K^+$ , por lo que capturan y amortiguan el exceso de  $K^+$  liberado por la actividad neuronal, protegiendo así a las neuronas de la despolarización que resultaría de la acumulación de  $K^+$  en el espacio extracelular (Kandel et al., 2000). En el SNC existen dos subpoblaciones de astrocitos: astrocitos tipo 1 y tipo 2, los cuales se han identificado citoquímicamente con el empleo de anticuerpos como el monoclonal contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del citoesqueleto cuya distribución está restringida a las células astrogliales, el anticuerpo A2B5 que es específico para ciertos gangliósidos, así como con el anticuerpo monoclonal Ran-2 que se une a antígenos localizados en la superficie celular. Los astrocitos tipo 1 son GFAP positivos, negativos al anticuerpo A2B5, y positivos a Ran-2, mientras que los astrocitos tipo 2 son GFAP positivos, positivos al anticuerpo A2B5, y negativos al anticuerpo Ran-2. (Bignami y Dahl. , 1973). La glía radial deriva de los astrocitos tipo 1; presenta una forma alargada con filamentos sobre los cuales las neuronas en desarrollo migran hacia su destino final (Nicholls et al., 1992). Durante las etapas finales del desarrollo del sistema nervioso (SN), la glía radial sufre una "transformación astrocítica", y únicamente se conservan 3 tipos de glía radial en el SN adulto; las células ependimales, las células de Bergmann en el cerebelo y las células de Müller en la retina.

En la retina de vertebrados se han identificado dos tipos de glía: Las células de Müller y los astrocitos. Los astrocitos son células pequeñas que se encuentran en la capa interna de la retina, cerca del disco óptico, y rodeando a los capilares sanguíneos, por lo que sólo se encuentran en retinas vascularizadas como la de los primates, entre otros. En el caso de las aves, cuya retina no está vascularizada, el único tipo glial son las células de Müller (Rasmussen, 1974). Las células de Müller constituyen el elemento glial más abundante de la retina y están presentes en todas las especies de vertebrados (figura 4). Tienen forma radial y se extienden desde la capa de los fotorreceptores hasta la capa de las células ganglionares, asumiendo muchas de las funciones presentes en astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales de otras partes del SNC (Newman y Reichenbach, 1996).



**Figura 4.** Dibujo en cámara lúcida de las células de Müller y su ubicación en las diferentes capas de la retina. CFN, capa de fibras nerviosas; CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa; SI, segmento interno del fotorreceptor. (Robinson y Drcher, 1990).

La función de las células de Müller no se conoce con precisión, pero se ha demostrado que establecen un recambio metabólico con las neuronas, mantienen la homeostasis iónica, y su presencia es fundamental para la estratificación de la retina durante el desarrollo embrionario. Numerosas prolongaciones de las células de Müller se extienden lateralmente al nivel de las capas plexiformes y están en íntima asociación con las sinapsis. Son células bipolares y su núcleo está al nivel de la capa nuclear interna. En ambas capas plexiformes, las prolongaciones de las células de Müller envuelven las sinapsis de la vía vertical de la retina, por lo que se ha propuesto que pudieran modular la actividad neuronal a este nivel (Robinson y Dreher, 1990). Las células de Müller presentan numerosos canales sensibles al voltaje y receptores a neurotransmisores, a través de los cuales reconocen una variedad de señales neuronales, así como cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Modulan la actividad neuronal a través de la regulación de la concentración extracelular de sustancias neuroactivas, incluyendo al  $\text{K}^+$ , que es bombeado por la glía de Müller de regiones de alta concentración (en las capas plexiformes), hacia el humor vitreo o vasos sanguíneos en retinas vascularizadas. El glutamato (Glu) y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), se eliminan del espacio sináptico por sistemas de transporte de alta afinidad en la célula, mientras que la concentración de  $\text{H}^+$  se regula a través del co-transporte  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$  y la anhidrasa carbónica de la célula. Las dos vías de comunicación entre las células de Müller y las neuronas de la retina indican que las células de Müller desempeñan un papel activo en la función de la retina (Newman y Reichenbach, 1996). El potencial de membrana de estas células está determinado por la concentración externa de  $\text{K}^+$ , y es cercano a  $-80\text{mV}$  (dependiendo de la especie). Otra de las características importantes de estas células es que, al igual que otros tipos de células gliales, poseen canales, tanto de  $\text{Ca}^{2+}$  como de  $\text{K}^+$  sensibles al voltaje, los que podrían intervenir en la regulación de la concentración extracelular de este último en la retina (Newman, 1985).

## 2. FISIOLOGÍA DE LA RETINA

El proceso visual comienza con la transducción de una señal luminosa en una señal química. En la membrana del segmento externo de los fotorreceptores existen canales de sodio tónicamente activados por GMPc en la oscuridad; los iones sodio entran al segmento externo de los fotorreceptores debido al gradiente electroquímico de sodio

generado por la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en el segmento interno. La estimulación luminosa excita a la rodopsina, y ésta activa a la transducina (miembro de la familia de las proteínas G), la que a su vez estimula una fosfodiesterasa que hidroliza al GMPc; al bajar la concentración de GMPc, los canales de sodio activados por éste se cierran, y la membrana de los fotorreceptores se hiperpolariza, constituyendo el primer paso en el proceso visual (Schnapf y Baylor, 1987). La vía vertical de los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las células ganglionares es excitadora, y está modulada, en sentido lateral, por dos tipos de interneuronas inhibitorias: en la capa plexiforme externa las células horizontales y en la capa plexiforme interna, las células amacrinas. Las células horizontales modulan la información que llega a la retina, mientras que las amacrinas lo hacen con la que sale de la misma hacia centros superiores de integración. (Miller y Slaughter, 1986). Mediante técnicas electrofisiológicas, se demostró que existen dos tipos de células bipolares: unas que se hiperpolarizan y otras que se despolarizan en respuesta a la estimulación por luz. Las células bipolares que se despolarizan están conectadas a células ganglionares ON, mientras que las células bipolares que se hiperpolarizan activan células ganglionares OFF. Las células ganglionares ON-OFF reciben información de ambos tipos de células bipolares (Kuffler, 1953), por lo tanto, a partir de las células bipolares, la vía visual se dicotomiza en ON y OFF, ya que una población de estas células, responde al neurotransmisor con una hiperpolarización de la membrana (ON) y la otra población lo hace con una despolarización (OFF). Ambos efectos son producidos por el mismo neurotransmisor, y la diferencia en la respuesta se debe a la presencia de diferentes receptores a glutamato en las células postsinápticas. Estos receptores pueden distinguirse farmacológicamente, ya que los de las bipolares ON responden al 2-amino-4-fosfonobutirato (AP4) (Miller y Slaughter, 1986); existe evidencia de que actúa sobre el receptor, cerrando los canales iónicos por incremento en la velocidad de hidrólisis del GMPc, vía proteínas G (Nawy y Jahr, 1990). Las bipolares OFF se caracterizan por la presencia de receptores tipo AMPA/KA (Miller y Slaughter, 1986; Massey, 1990). En las células bipolares OFF de la retina de salamandra, se encontró un inusual receptor de tipo AMPA/KA, que es permeable al calcio (Gilbertson, 1991). Por otra parte, en ovocitos de *Xenopus* se realizó la expresión de las subunidades GluR1 y GluR3, con las que se han producido receptores de tipo AMPA/KA que son permeables al calcio (Hollmann et al., 1991). Existen algunos resultados que sugieren que las células bipolares ON de la retina de anfibio, poseen ambos receptores para aminoácidos excitadores, L-AP4 y AMPA/KA,

aunque el significado funcional del receptor AMPA/KA en estas células bipolares ON no se ha aclarado (Maple y Werblin, 1991; Thoreson y Miller, 1991).

### **3. AMINOÁCIDOS EXCITADORES**

Los aminoácidos excitadores (AAE) L-glutamato (Glu) y L-aspartato (Asp), son los neurotransmisores excitadores más abundantes en el SNC de los vertebrados (revisión: Michaelis, 1998). Se ha demostrado que el Glu juega un papel importante en el desarrollo neuronal y en la plasticidad sináptica (Collingridge y Singer, 1990), en el aprendizaje y en la memoria (Bliss y Collingridge, 1993), así como en procesos de toxicidad y enfermedades degenerativas del sistema nervioso (Choi, 1988). La diversidad funcional del Glu se debe a los diferentes tipos de receptores específicos con los que interactúa, los cuales activan diferentes vías intracelulares de segundos mensajeros. Sus acciones se realizan por medio de por lo menos 5 clases de receptores, de los cuales el de NMDA (N-metil-D-aspartato) es el mejor caracterizado (Wroblewski y Danysz, 1989). En el SNC, los ácidos Glu y Asp interactúan con dos tipos generales de receptores distinguibles entre sí, tanto bioquímica como electrofisiológicamente, los cuales se clasifican en ionotrópicos y metabotrópicos (Michaelis, 1998).

#### **3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES A GLUTAMATO**

Los AAE intervienen no sólo en la transmisión sináptica normal de las vías excitadoras, sino también en la modificación de las conexiones sinápticas durante el desarrollo (Wroblewski y Danysz, 1989). El nombre de los receptores derivó de la capacidad de un análogo del ácido aspártico, el N-metil-D-aspartato (NMDA), de interactuar con un solo tipo de receptor por lo cual se distinguen como los receptores de tipo NMDA y los de tipo no-NMDA. Con base en su mecanismo de acción, los receptores de AAE se dividen en dos grandes grupos: los ionotrópicos, que son proteínas heteroméricas en las que el ligando controla la apertura de un canal iónico, y los metabotrópicos, acoplados a efectores intracelulares y cascadas de segundos

mensajeros por medio de una proteína G, que une GTP (Gasic y Hollmann, 1992) (Tabla 1). Los receptores ionotrópicos comprenden tres tipos definidos por sus agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA), y Kainato (KA). La activación de los receptores induce la apertura de canales iónicos para el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ; éstos presentan características de apertura de canal, permeabilidad iónica, conductancia y farmacología diferentes, que los distinguen entre sí. (Cotman e Iversen, 1987).

El receptor de NMDA tiene 5 sitios farmacológicamente distintos, en donde actúan diferentes compuestos que modifican su actividad (Monaghan et al., 1989). Los sitios son los siguientes: a) sitio de reconocimiento para el glu; b) sitio alostérico positivo para la glicina (Gly); c) fuera del canal del receptor; un sitio modulador negativo (o de acción inhibitoria) para el  $\text{Zn}^{2+}$  (no depende de voltaje); d) sitio de unión en el canal para el  $\text{Mg}^{2+}$  (dependiente de voltaje); e) sitio dentro del canal para antagonistas alostéricos (anestésicos disociativos, MK-801) y f) sitio de regulación al cual se unen las poliaminas (Williams et al., 1991) (figura 5). Los receptores de NMDA son permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y al  $\text{Na}^+$ , por lo que su activación produce un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En condiciones fisiológicas, el canal del receptor está bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$ , en forma dependiente del voltaje; este bloqueo se elimina por despolarización de la membrana. La glicina actúa como un coagonista, que aumenta los efectos de los agonistas del NMDA; aumenta la frecuencia de apertura del canal, pero no la amplitud de la corriente, y disminuye el período de desensibilización (Ascher y Nowak, 1987).

**Tabla 1. Clasificación de los subtipos de receptores a glutamato encontrados en el SNC de mamíferos (Michaelis, 1998).**

Tipo de receptores	IONOTRÓPICOS			METABOTRÓPICOS	
Subtipo de receptor	NMDA	AMPA	KA	QA	L-AP4
Agonistas selectivos	NMDA	AMPA	KA	1S3R-ACPD	L-AP4
Principal función	Activa canales de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup>	Activa canales de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup>		Activan la PLC Inhiben la AC Activa la AC	
Moduladores alostéricos	Glicina, D-serina, spm	Benzotiazidas	Concanavalina A		
Antagonistas competitivos	2-AP5, 2-AP7, CPP, CGP39653, CGS19755	CNQX, NBQX, DNQX	GAMS, $\gamma$ -D-Glutamilglicina	Análogos de la fenilglicina (3HPG, 4CPG, 4C3HPG, MCPG)	
Antagonistas de los sitios moduladores	5,7-diCl-Kyn, HA-966, CNQX	2,3-Benzodiazepinas (GYKI 52466, GYKI 53655)			
Bloqueador de canal (inhibidor)	PCP, MK-801, ketamina	JST, barbitúricos			
Abreviaturas en la parte correspondiente.					

Estos receptores están involucrados en los potenciales postsinápticos excitadores (Gasic y Hollmann, 1992). Los receptores de AMPA son selectivos para cationes monovalentes, y se diferencian de los receptores a KA en que se desensibilizan rápidamente, a diferencia de los de KA que lo hacen de manera más lenta (Barnard y Henley, 1990). A pesar del uso de KA marcado radioactivamente, es difícil diferenciar los receptores de KA de los de AMPA, por lo que se ha sugerido que el efecto neurofisiológico del KA podría estar mediado por el receptor de AMPA. Existe evidencia de que el KA marcado se une a sitios de alta y baja afinidad en membranas de cerebro de rata, y requiere de concentraciones micromolares para inducir una respuesta excitadora; a estas concentraciones, el KA también interactúa con el sitio de unión a AMPA- $^3\text{H}$  (Young y Fagg, 1990). Los antagonistas CNQX y DNQX (quinoxalinas) que inhiben al receptor de KA, son los inhibidores más potentes del receptor de AMPA (Watkins et al., 1990).

El L-AP4 mimetiza la acción del transmisor endógeno que se libera de los fotorreceptores a las células bipolares ON de la retina, y por tanto inhibe la neurotransmisión en la vía ON. Se ha sugerido que el neurotransmisor cierra canales iónicos postsinápticos en estas células, sin embargo, también se ha propuesto una localización presináptica de los receptores a L-AP4 (Young y Fagg, 1990).

Los receptores metabotrópicos están acoplados a una proteína G (que une GTP) y activan cascadas de segundos mensajeros: estimulan la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), o modifican la concentración de AMPc mediante la activación o inhibición de la adenilato ciclasa, enzima responsable de su síntesis (Schoepp y Conn, 1993). Estos receptores integran una familia con una secuencia de aminoácidos muy similar: todos poseen siete segmentos transmembranales, el extremo NH<sub>2</sub>-terminal es extracelular y la región COOH-terminal es intracelular, ambas, regiones ricas en residuos de aminoácidos hidrofílicos. Pueden identificarse por medio del uso de agonistas y antagonistas selectivos. De acuerdo con su homología de secuencia y el sistema de segundos mensajeros al cual se acoplan, se han formado tres grupos (Schoepp y Conn, 1993).

- I) mGluR1 $\alpha$ , mGluR1 $\beta$  y mGluR5. Al interactuar con su ligando, estimula a la fosfolipasa C, lo que se traduce en un aumento en el recambio de fosfoinosítidos y la liberación de Ca<sup>2+</sup> de compartimentos intracelulares. El mGluR1 $\alpha$  además, produce una elevación del AMPc por estimular a la adenilato ciclasa. Teniendo como principales agonistas: QA > L-Glu > IBO > L-CCG-I > 1S,3R-ACPD.
- II) mGluR2 y mGluR3. Su activación inhibe la estimulación de la adenilato ciclasa producida en estos receptores por forskolina. El perfil farmacológico de la potencia de los agonistas es: DCG-IV  $\geq$  L-CCG-I > L-Glu  $\geq$  DHPG  $\geq$  (1S,3R)-ACPD > IBO > QA.
- III) mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Estos receptores están acoplados a la inhibición de la adenilato ciclasa, por lo que su activación disminuye los niveles intracelulares de AMPc. Se considera que éstos corresponden a receptores presinápticos cuya función es regular la liberación del neurotransmisor endógeno. El orden de potencia de los agonistas es: L-AP4  $\geq$  L-Glu  $\geq$  L-CCG-I  $\geq$  L-SOP. El mGluR6 es más sensible a la L-SOP que al L-Glu y su presencia se restringe, hasta ahora, exclusivamente a la capa interna de la retina.

#### 4. RECEPTOR DE NMDA

Se ha sugerido que el receptor de NMDA tiene una estructura tetramérica (Christian et al., 1998); asimismo, se describe como un canal catiónico, que en condiciones hiperpolarizantes está bloqueado por el ion Mg<sup>2+</sup>, y su actividad se regula por varios ligandos, entre los que se encuentra el glutamato, que es el neurotransmisor; la glicina, que actúa como coagonista; el zinc, que ocupa un sitio modulador negativo y actúa como bloqueador no competitivo en forma independiente del voltaje, a diferencia del Mg<sup>2+</sup>; y las poliaminas, espermina y espermidina que, junto con los denominados bloqueadores de canal (MK-801), tienen sitios de unión específicos en el receptor cuyas características bioquímicas varían en las diferentes regiones del SNC (Collingridge y Singer, 1990; Johnson y Ascher, 1987; Ransom y Stec, 1988; Young y Fagg, 1990; Ascher y Nowak, 1987) (Figura 5).

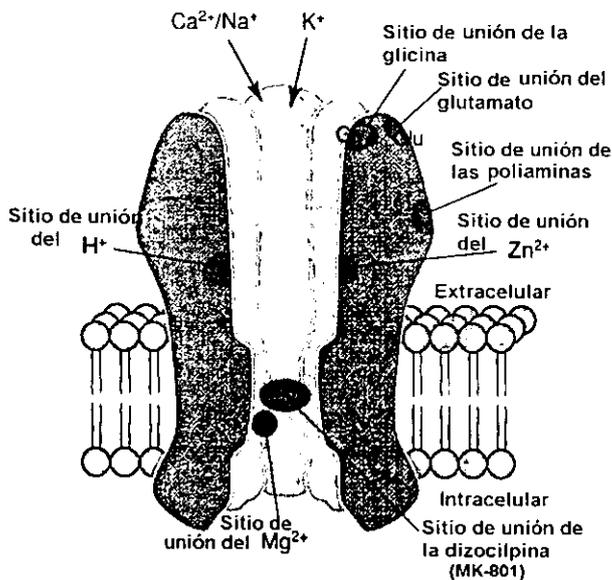


Figura 5. Esquema del receptor de NMDA, mostrando los sitios de interacción para el glutamato, glicina, poliaminas, H<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, MK-801 y Mg<sup>2+</sup> (Corsi et al., 1996).

Los receptores de NMDA se distribuyen en prácticamente todo el SNC, pero específicamente en áreas de la corteza cerebral, de los ganglios basales y de aquellas relacionadas con los sistemas sensoriales. Estudios electrofisiológicos y con radioligandos indican que las características bioquímicas del receptor de NMDA varían en las diferentes regiones del SNC. Por métodos autorradiográficos han sido localizados en áreas como el telencéfalo y CA3 del hipocampo, por lo cual se ha sugerido que juega un papel importante en la conducta, el aprendizaje y la memoria. (Cotman et al., 1987; Bliss y Collingridge, 1993). Así también, estudios de electrofisiología y bioquímica han demostrado que la activación del canal requiere de al menos dos eventos secuenciales: una despolarización que permita eliminar el bloqueo del canal por el Mg<sup>2+</sup> (Nowak et al., 1984), y la unión del ácido glutámico (agonista principal) y la glicina a sus respectivos sitios (Johnson y Ascher, 1987; Kleckner y Dingledine, 1988). La activación del canal

ocasiona que la probabilidad de apertura del mismo sea mayor y, en consecuencia, que la conductancia a los iones  $K^+$ ,  $Na^+$  y en especial  $Ca^{2+}$ , se incremente (MacDermott et al., 1986; Mayer y Westbrook, 1987; Ascher y Nowak, 1988). Se ha demostrado que la entrada de calcio inicia procesos celulares que modulan el desarrollo y la actividad neuronal, entre otros muchos procesos fisiológicos.

Por otra parte, tanto las variaciones regionales de la unión de glutamato- $[^3H]$ , de CPP- $[^3H]$  (3-[( $\pm$ )-2-carboxipiperazin-4-yl] propil-1-fosfonato), como de la modulación de la unión de MK-801- $[^3H]$  por los diversos agonistas y antagonistas del ácido glutámico, ha facilitado la descripción de cuatro subtipos de receptores; los que tienen preferencia por los agonistas, los que tienen preferencia por los antagonistas, los de tipo talámico medio y los receptores de tipo cerebelar (Laurie y Seeburg, 1994). Con la ayuda de técnicas de biología molecular, se ha identificado una variedad de subunidades correspondientes a receptores de glutamato (Hollmann y Heinemann, 1994). Los ovocitos de *Xenopus*, las células renales H-293, y ciertas neuronas, han sido usadas como sistemas de expresión para el estudio biofísico y farmacológico de distintas combinaciones de las subunidades clonadas. Aunque se desconoce la estequiometría de las mismas en el receptor, se sabe que de las 5 subunidades identificadas para el receptor de NMDA (NR1, NR2A-D) los ensambles de subunidades NR1 presentan las propiedades características correspondientes a la unión del agonista y del coagonista (Moriyoshi et al., 1991; Jhonson y Ascher, 1987): alta permeabilidad al calcio (MacDermott et al., 1986) y bloqueo por magnesio dependiente del voltaje (Nowak et al., 1984). Así mismo, se ha demostrado que la corriente registrada de los ensambles que incluyen al menos una de las cuatro subunidades NR2, presenta un patrón muy característico (Ikeda et al., 1992; Ishii et al., 1993; Kutsuwada et al., 1992; Meguro et al., 1992; Monyer et al., 1992). En términos generales, se sabe que la subunidad NR2A se expresa tan ampliamente como la subunidad NR1; además, las propiedades de modulación, entre las que se incluye el bloqueo por  $Mg^{2+}$ , la sensibilidad a la glicina y la cinética de apertura del canal, residen en la subunidad NR2A, lo que indica que muy probablemente el receptor en su forma nativa es heteromérico (Wisden y Seeburg, 1993). Por tanto, las afinidades de los distintos sitios farmacológicos pueden ser modificadas al cambiar la subunidad NR2 (A-D) en receptores recombinantes (Williams et al., 1994 y Williams, 1995). De esta manera, los receptores que contienen las subunidades NR1-NR2A corresponden al tipo de receptor que prefiere a los agonistas, los ensambles NR1-NR2B, a receptores de alta afinidad por los

antagonistas, los heterómeros NR1-NR2C, a receptores del cerebelo y el NR1-NR2D, a receptores característicos del tálamo medio (Laurie y Seeburg, 1994).

## 5. POLIAMINAS

La espermina (spm) y la espermidina (spd) son derivados de la putrescina (que es una poliamina endógena), cuya molécula policatiónica se encuentra en todos los seres vivos, en los que interactúan con moléculas cargadas negativamente, como proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos. Estas poliaminas (PA) 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 como los canales iónicos, enzimas y proteínas G, ya que 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 ligandos (Ransom y Stec, 1988). Los mecanismos de modulación, directa o indirecta de las proteínas membranales por las poliaminas no están bien estudiados, pero en general se proponen mecanismos que involucran a la membrana plasmática, así como procesos de bloqueo de canal e interacción directa con las proteínas. También se ha propuesto que las poliaminas desempeñan varias funciones en el proceso de crecimiento celular y replicación; además, se ha visto que participan en el crecimiento de tumores, por lo cual se estudia la síntesis de inhibidores específicos de la biosíntesis de estas moléculas, favoreciendo el cese de la proliferación celular y manteniendo a las células en la fase G1 del ciclo celular (Seiler, 1981). Sumado a esto, se ha encontrado una posible función de la espermina y espermidina como neuromoduladores o neurotransmisores en el SNC (Seiler, 1981; Rock y Macdonald, 1995); se ha demostrado también, que hay liberación selectiva al medio extracelular de espermina y espermidina, contribuyendo a la activación de receptores de tipo NMDA en el cuerpo estriado de rata (Fage et al., 1992).

En los mamíferos, la putrescina se forma por la descarboxilación de la ornitina mediante la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) (figura 6). La espermidina se origina por la transferencia a la putrescina, mediante la enzima espermidina sintasa, de un grupo propilamino que tiene su origen en la adenosilmetionina; si la espermidina recibe otro grupo propilamino por medio de la espermina sintasa, se transforma en espermina. Estas

reacciones son reversibles, siendo la limitante en la biosíntesis de estas poliaminas, la conversión de la ornitina en putrescina por la ODC, por lo que los niveles intracelulares de estas moléculas dependen de la síntesis y actividad de dicha enzima. La enzima ODC depende del fosfato de piridoxal (coenzima), a diferencia de la espermidina sintasa y espermina sintasa, enzimas que no requieren un cofactor para su catálisis.

Las sintasas de espermina y espermidina, se encuentran en mayor proporción en el cerebro en comparación con otros tejidos (Raina et al., 1976), lo cual apoyaría la idea de la participación de las poliaminas en la transmisión sináptica, sin embargo, Seiler (1981) reportó que la concentración de las poliaminas en el cerebro es del mismo orden de magnitud que en otros tejidos, por lo cual no se puede llegar a conclusiones acerca de la función de estos compuestos basándose únicamente en datos de distribución. La espermina se concentra en estructuras del SNC ricas en células nerviosas, mientras que en la materia blanca, la médula espinal y 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, mientras que Williams-Ashman y Canellakis (1979) reportaron que el máximo de la actividad de la ODC en el cerebro, coincide con el momento de máxima proliferación de las células nerviosas.

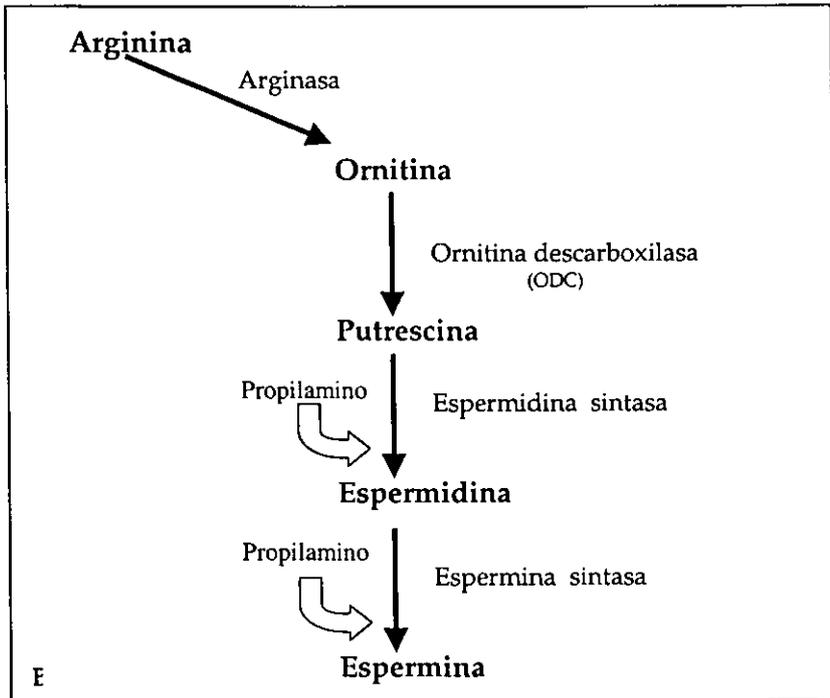
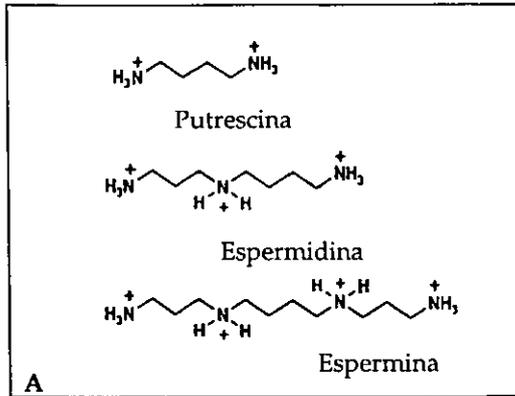


Figura 6.

A) Estructura química de la putrescina, espermidina y espermina.

B) Ruta metabólica de para la síntesis de poliaminas endógenas en las células de mamíferos.

## **II ANTECEDENTES**

### **1. LAS POLIAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO**

Hay un gran número de procesos fisiológicos, particularmente en el SNC, en los que están involucradas las PA endógenas (Forsythe, 1995). Las PA juegan un papel importante en la maduración del cerebro, particularmente en la proliferación celular durante la neurogénesis. De acuerdo con esto, la actividad de la ODC y los niveles de los productos de la putrescina, son muy altos en estadios tempranos del desarrollo del cerebro y decrecen dramáticamente durante la vida neonatal. Sin embargo, en el cerebro adulto, se mantienen concentraciones relativamente altas de spm y spd (productos de la putrescina) (Heby, 1981; Shaw y Paterman., 1973; Sparapani et al., 1996). Asimismo, estos compuestos también participan en procesos de reparación del tejido nervioso (Agnati et al., 1985) o bien, juegan un papel directo en procesos neurodegenerativos (Virgili et al., 1992). Las altas concentraciones de PA en el tejido nervioso (Shaw, 1979), su distribución en el SNC, así como su participación en diferentes procesos fisiológicos han llevado a proponer a las PA como neuromoduladores. Los niveles de putrescina, espermina y espermidina, junto con la actividad de la ornitina descarboxilasa, aumentan en tejidos excitables por la activación de canales de  $Ca^{2+}$  controlados por ligando o dependientes de voltaje (Koenig et al., 1983, 1989; Iqbal y Koenig, 1985). Tanto la spm como la spd actúan como moduladores de receptores a glutamato de tipo NMDA y AMPA/KA (Williams et al., 1991). La inhibición de la síntesis de las PA con un inhibidor irreversible de la ODC, la difluorometilornitina, suprime el flujo de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje y ligados a receptores, efecto que se elimina al suministrar putrescina (Koenig et al., 1983; Iqbal y Koenig, 1985; Koenig et al., 1989; Iqbal et al., 1991).

### **2. LIBERACIÓN DE LAS POLIAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO.**

Otra evidencia que apoya la participación de las PA en la neurotransmisión, es la presencia de dos sistemas de captura de alta afinidad (Harman y Shaw, 1981), que presentan características similares a las observadas en los sistemas de captura de los neurotransmisores noradrenalina y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Por otra parte, se ha demostrado la presencia de sitios específicos de unión de espermina- $[^3H]$  y espermidina-

[<sup>3</sup>H] en el cerebro de rata (Yoneda et al., 1991; Gilal y Gilal, 1991). Uno de los criterios importantes para establecer la función específica de un compuesto como neuromodulador o neurotransmisor, es que la sustancia se libere por estimulación, y pueda ser identificada en el fluido extracelular colectado de la región activada (Phillis 1970; Krnjevic 1974); con respecto a dicho criterio, se demostró que hay liberación selectiva al medio extracelular de spm y spd por la activación de receptores de NMDA (Fage et al., 1992; Fage et al., 1993), así como por la actividad reversa del transportador de PA (Fage et al., 1992, fage et al., 1993; Harman y Shaw, 1981). Se ha demostrado, asimismo, que las PA actúan sobre el receptor de NMDA produciendo varios efectos: aumento de la afinidad del receptor por su coagonista (glicina) (Ransom y Deschenes, 1990; Sacaan y Johnson, 1989), así como un incremento en la apertura del canal a concentraciones saturantes de glicina, provocando un aumento en la corriente entrante y en la unión de bloqueadores de canal abierto (MK-801) (Benveniste y Mayer, 1993; Ransom y Stec, 1988; Williams et al., 1994). Las PA también tienen un efecto inhibitor sobre el receptor de NMDA, específicamente sobre el canal, que depende de la concentración de las PA y del voltaje; tal efecto se presenta cuando hay altas concentraciones de PA en condiciones hiperpolarizantes (Romano et al., 1991). Asimismo se ha propuesto un modelo de interacción múltiple de las PA con el receptor de NMDA, basándose en el efecto de varios agonistas, antagonistas y agonistas inversos, así como por análisis estructural. El receptor de NMDA induce la liberación de PA en situaciones como la isquemia cerebral, donde el metabolismo de las PA está marcadamente afectado (Paschen et al., 1988; Koenig et al., 1990), pudiendo también jugar un papel en la neurotoxicidad relacionada con la isquemia (Gotti et al., 1990; McCulloch et al., 1991).

En la retina, se demostró que la unión de la glicina-[<sup>3</sup>H] al sitio de reconocimiento del receptor de NMDA se inhibe por la spm, contrario a lo reportado en el SNC. Aparentemente, la inhibición no es por competencia por el sitio de la glicina, debido a que la espermina disminuye los valores de la  $B_{max}$  y no altera los de la  $K_d$  que se obtienen para la unión de glicina-[<sup>3</sup>H] en las capas plexiformes de la retina (Calderon y López-Colomé, 1998).

En suma, la liberación de PA se induce selectivamente por la activación del receptor de NMDA *in vivo* y estas PA pueden alcanzar concentraciones a las que

potencian el efecto mediado por el receptor de NMDA y también pueden influir en la concentración de otros cationes, particularmente el calcio. Las PA probablemente están jugando un papel importante en muchos de los efectos atribuidos a la activación del receptor de NMDA (incluyendo la LTP), al manejo de la eficiencia y plasticidad sináptica y a la neurotoxicidad en situaciones extremas (Fage et al., 1992).

### III OBJETIVOS

Las poliaminas han sido postuladas como neuromoduladores o neurotransmisores, en el sistema nervioso, ya que se ha visto regulan el flujo de cationes en tejidos excitables, además de interactuar con el receptor de NMDA, en el que producen varios efectos, como el aumento de la afinidad del receptor por su coagonista e incremento de la frecuencia en la apertura del canal, entre otros. Así también se ha descrito la presencia de sistemas de captura de espermina en rebanadas de corteza cerebral así como su liberación por la activación del receptor de NMDA en el estriado. Por lo anterior y debido a que la retina de los vertebrados se ha considerado un buen modelo para estudiar los procesos análogos que se presentan en el SNC el objetivo de este trabajo es caracterizar la liberación de las poliaminas en la retina de pollo, asimismo se pretende determinar el tipo celular responsable de la liberación para analizar los posibles mecanismos que contribuyen al fenómeno, así como tratar de aclarar el papel de las poliaminas como posibles neuromoduladores en el sistema nervioso.

## **IV METODOLOGÍA**

### **1. EXTRACCIÓN DE LA RETINA DE POLLO**

Las retinas se obtuvieron de pollos de 3 a 5 días de edad, adaptados a condiciones de oscuridad durante 30 minutos antes de la disección. Fueron sacrificados por decapitación. Se extrajeron las retinas libres de epitelio pigmentado (EPR) y se colocaron en medio Ringer Krebs Bicarbonato (RKB: ver apéndice) frío; posteriormente, 2 retinas partidas a la mitad se colocaron en un vial con 1ml de RKB durante 5 minutos en baño María a 37°C para posteriormente incubarlas con la espermina-[<sup>3</sup>H] y llevar a cabo el ensayo de superfusión.

### **2. CULTIVOS PRIMARIOS DE GLÍA DE MÜLLER Y DE NEURONAS DE LA RETINA DE POLLO**

Para la obtención de retinas se utilizaron embriones de 7 días de desarrollo, las cuales se extrajeron libres de epitelio pigmentado. Se lavaron 2 veces en una solución de Hank's-BBS a una temperatura de 37°C, incubando 10 minutos con tripsina 0.25% en solución de Hank's a 37°C en el caso de células de Müller, y 0.5% durante 35 minutos para neuronas; la reacción enzimática se detuvo con L-MEM. Las células son disociadas de manera mecánica en 1ml de L-MEM, con una pipeta Pasteur y filtrando a través de una malla de nylon de 50µM de poro. Las células se suspendieron en H-MEM, sin suero fetal bovino (FBS) para el cultivo de células de Müller, y OPTI-MEM I con 3% de FBS para el de neuronas. Se cuantificó el número de células con un contador Coulter modelo ZB1 (Coulter Electronics, Inc.) y la suspensión celular se diluyó a  $1 \times 10^6$  células/ml. Se sembró en multipozos de 6 de 35 mm de diámetro a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por pozo en un volumen de 2.5ml de H-MEM con 10% de FBS en el caso de las células de Müller y con OPTI-MEM I con 3% de FBS en el cultivo de neuronas. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 13 ó 14 días in vitro (DIV) tiempo al cual las células de Müller alcanzaron la confluencia, y durante 4 ó 5 DIV para neuronas. El medio se cambió cada tercer día (H-MEM con 10% y OPTI-MEM I al 3% de FBS, respectivamente).

La pureza de los cultivos de glía se comprobó mediante reacción positiva al anticuerpo policlonal contra la GFAP (proteína ácida fibrilar glial), que también es un marcador de astrocitos. Debido a que la retina de las aves es avascular y no contiene astrocitos (Rasmussen, 1974), la marca corresponde a la glía de Müller (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991).

### 3. SISTEMA DE SUPERFUSIÓN CONTINUA

#### 3.1 *Superfusión de la retina de pollo*

Se utilizó un sistema provisto de una bomba peristáltica de 4 canales, con 4 mangueras de 1.5 mm de diámetro cada una conectada a una cámara de vidrio de 300  $\mu$ l de capacidad, con una aguja de salida de 3 mm. La velocidad de superfusión fue de 0.5 ml/min. y el superfusado se colectó en viales para la cuantificación posterior de la radiactividad.

Antes de la superfusión, la retina se incubó en 1ml de RKB a 37°C con 1  $\mu$ Ci de spm-[<sup>3</sup>H] de actividad específica 40.0 Ci/mmol durante 1 hora. El RKB a 37°C con pH de 7.4, oxigenado durante 15 minutos con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, se incluyó en el sistema de superfusión. Concluida la incubación se lavó el tejido con RKB frío, para quitar el exceso de marca radioactiva, y se colocó la mitad de una retina en cada una de las 4 cámaras del sistema de superfusión continua. El perfusado de los primeros 5 minutos se desechó, colectándose fracciones cada 6 minutos. A los 30 minutos de iniciada la recolección de las muestras, el medio de superfusión de dos de las 4 cámaras se cambió por otro conteniendo el fármaco a probar en la liberación durante 24 minutos (KCl [50 mM]) o 36 minutos (NMDA, L-Glu, KA, ouabaina [1mM] y digitoxina 200 $\mu$ M); las otras dos cámaras se utilizaron como control. Posteriormente el medio se cambio de nuevo por RKB por un período de 24 minutos cuando se despolarizó con alto potasio, o de 54 minutos cuando se estimuló la liberación con alguno de los fármacos mencionados.

Al término de la superfusión el tejido de cada cámara se digirió con 1ml de HCl 1N, se neutralizó con 1 ml de NaOH 1N, y se midió la radiactividad después de la adición de 5ml de líquido de centelleo (tritosol).

### 3.2 *Superfusión de los cultivos primarios de la retina de pollo*

La superfusión continua de los cultivos se llevó a cabo mediante el uso de 2 bombas peristálticas, de 4 canales, una para la inyección del medio, y la otra para la remoción del superfusado, que se colectó en la forma descrita en el inciso 3.1, a una velocidad de superfusión de 1.5 ml/min. para evitar la acumulación de medio sobre el tejido (evitando de esa forma la recaptura del radioligando).

Los cultivos de células de Müller se utilizaron entre los 13 y 14 DIV (cultivo en confluencia: fotografía 1), y los de neuronas entre 4 a 5 DIV (fotografía 2), tiempo establecido en que ya no se dividen y el desarrollo de la glía es casi nulo. En ambos casos el cultivo se realizó en 4 pozos de una placa con 6 pozos. Antes del experimento, se eliminó el medio de cultivo lavando 3 veces con RKB a 37°C y dejando en cada pozo 1.5ml de RKB, al que se agregó 0.5  $\mu$ Ci de spm- $^3$ H] (actividad específica de 40.0 Ci/mmol) por pozo. Se incubó por 1 hora a 37°C. Al término de la incubación se lavó cada pozo 3 veces con 1.5ml de medio y la superfusión se llevó a cabo de la misma manera que en la retina. Después de los primeros 20 minutos, 2 pozos se emplearon como control y 2 para estimular, realizando el segundo cambio de medio a los 16 (KCl) ó 32 minutos (otros), según las condiciones del experimento. Acabada la corrida se raspó el tejido de cada pozo con 1ml de HCl 1N y después de digerir el tejido se neutralizó con 1ml de NaOH 1N, se adicionaron 5ml de tritosol a todos los viales de la corrida (incluyendo el del tejido) y se midió la radiactividad.

Para los ensayos en medio sin sodio se utilizó medio TRIS-KREBS 25mM para toda la superfusión, tanto en el control como en la condición experimental. La TTX (bloqueador de canales de Na<sup>+</sup> sensibles a voltaje), se mantuvo durante todo el ensayo en las 4 cámaras. Los antagonistas utilizados como el MK-801, CNQX, MCPG y treo-3-hidroxiaspartato se incluyeron en el sistema 5 minutos antes de comenzar la superfusión y permanecieron durante toda la corrida. Así mismo los ensayos sin calcio se realizaron

en medio RKB sin calcio y dependiendo de las condiciones del mismo, se incluyó BAPTA AM  $10\mu\text{M}$  durante la incubación con el radioactivo y se superfundió con RKB sin calcio. Para los ensayos con BAPTA AM ( $10\mu\text{M}$ ) y EGTA ( $500\mu\text{M}$ ) juntos, los fármacos se incluyeron en RKB sin calcio durante la incubación con el radioactivo, y se superfundió con RKB sin calcio más EGTA. Esto en ambos sistemas estudiados, retina completa y cultivos de neuronas y células de Müller de la retina.

\* En el apéndice se encuentra la composición completa de los diferentes medios fisiológicos utilizados en el presente trabajo.

#### 4. ANÁLISIS DE DATOS

Al obtener las cuentas por minuto (CPM) que registra el contador de radiactividad se calculó el factor de liberación (ERC) de la  $\text{spm-}[^3\text{H}]$ , con la siguiente formula:

$$\text{ERC} = \text{liberación por unidad de tiempo} / \text{total de radioactividad incorporada por el tejido}$$

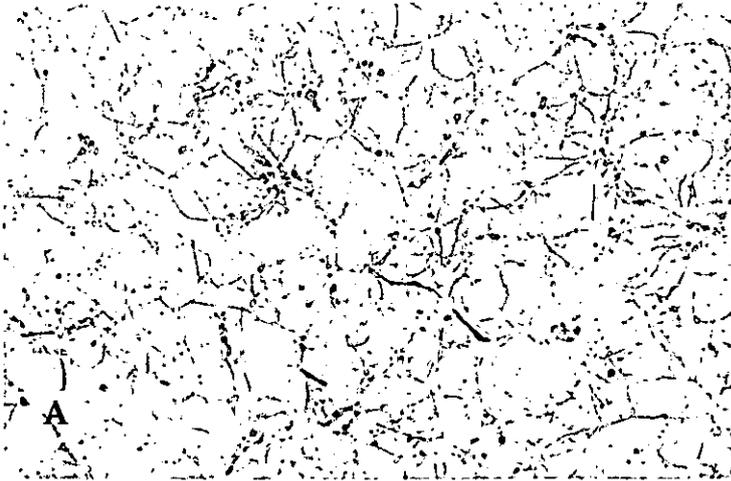
Con los datos obtenidos se gráfico el ERC vs tiempo de liberación para lo cual se utilizó el programa de “graphPad prism” con el que se obtuvo, en dichas gráficas, el error estándar para cada punto. Asimismo, con los valores de ERC se llevó acabo la construcción de las tablas y gráficas comparativas de porcentajes de liberación, entre la retina completa y los cultivos derivados de la misma. Para ello se tomó encuesta los valores anterior y posterior al estímulo, dándole la asignación al primero del 100% a partir del cual se calculó el segundo que corresponde al valor obtenido en la primera fracción en la que se incluyó el fármaco.

Así mismo se realizó la prueba estadística de t de Student con un nivel de significancia de 0.05, principalmente en la tabla comparativa y gráficas de barras, mientras que en las otras solo en uno o dos puntos.

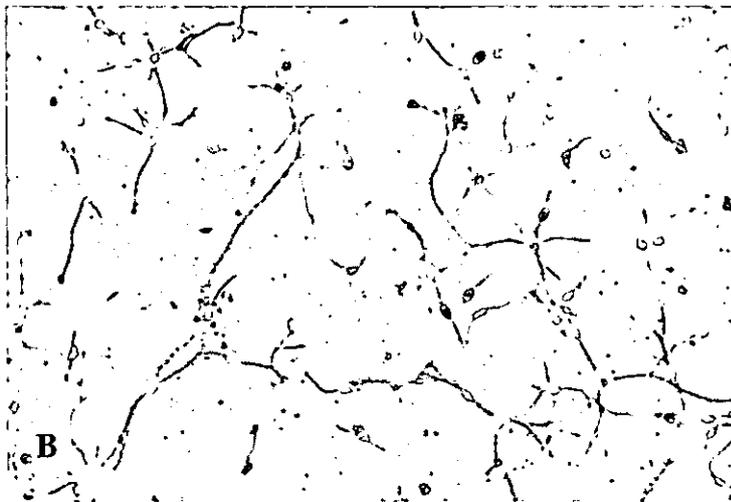


Fotografía 1.      A) Cultivo primario de células de Müller de retina de pollo de 12 DIV. Aumento de 10X.  
                         B) Cultivo primario de células de Müller de retina de pollo de 12 DIV. Aumento de 20X





Fotografía 2    A) Cultivo primario de neuronas de retina de pollo de 4 DIV.  
                    Aumento 10X  
                    B) Cultivo primario de neuronas de retina de pollo de 4 DIV.  
                    Aumento 20X



## V RESULTADOS

### 1 LIBERACIÓN DE ESPERMINA-[<sup>3</sup>H] EN LA RETINA COMPLETA DE POLLO.

#### 1.1 Efecto de la activación de los receptores de glutamato sobre la liberación de spm- [<sup>3</sup>H].

Los resultados obtenidos en los experimentos de liberación de espermina-[<sup>3</sup>H] en retina de pollo se presentan en la tabla 2. Estos datos demuestran que el glutamato [1mM] no tuvo efecto sobre la liberación de spm, ya que el porcentaje de liberación fue del  $104 \pm 15\%$  prácticamente igual que el control que es del 100 %. Por este motivo se probó un inhibidor de la captura de glutamato, Treo-3-hidroxiaspartato [200 $\mu$ M], en el medio de superfusión y se estimuló con L-Glu [1mM], pero tampoco se encontró una diferencia significativa con respecto al control. Al probar otros agonistas específicos de los receptores a glutamato de tipo ionotrópico sobre la liberación de spm-[<sup>3</sup>H], tales como el KA [1mM] y el NMDA [1mM], tampoco se obtuvo diferencia significativa ( $105 \pm 7\%$  y  $98 \pm 6\%$ , respectivamente) en la liberación. Para descartar una posible inhibición cruzada en la activación del receptor de NMDA por glutamato, en el circuito retinal, se utilizó un antagonista de los receptores de glutamato de tipo AMPA/KA, la CNQX (6-ciano-7-nitriquinolina-2,3-diona; [100 $\mu$ M]), en el medio de superfusión; asimismo, se utilizó la MCPG ((RS)- $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina; [200 $\mu$ M]), antagonista de los receptores a glutamato de tipo metabotrópico, obteniendo en ambos casos valores similares al control, por lo que ni el NMDA ni el L-Glu, estimulan la liberación de spm en la retina.

#### 1.2 Efecto de la despolarización sobre la liberación de spm-[<sup>3</sup>H].

Se despolarizó con KCl [50mM] con el objeto de inducir la liberación de spm-[<sup>3</sup>H] por despolarización, obteniendo como resultado un aumento del  $67 \pm 9\%$  sobre la liberación del preestímulo que corresponde al control y se considera como el 100% (gráfica 1). Esta liberación fue independiente de  $Ca^{2+}$ , lo que se comprobó al realizar

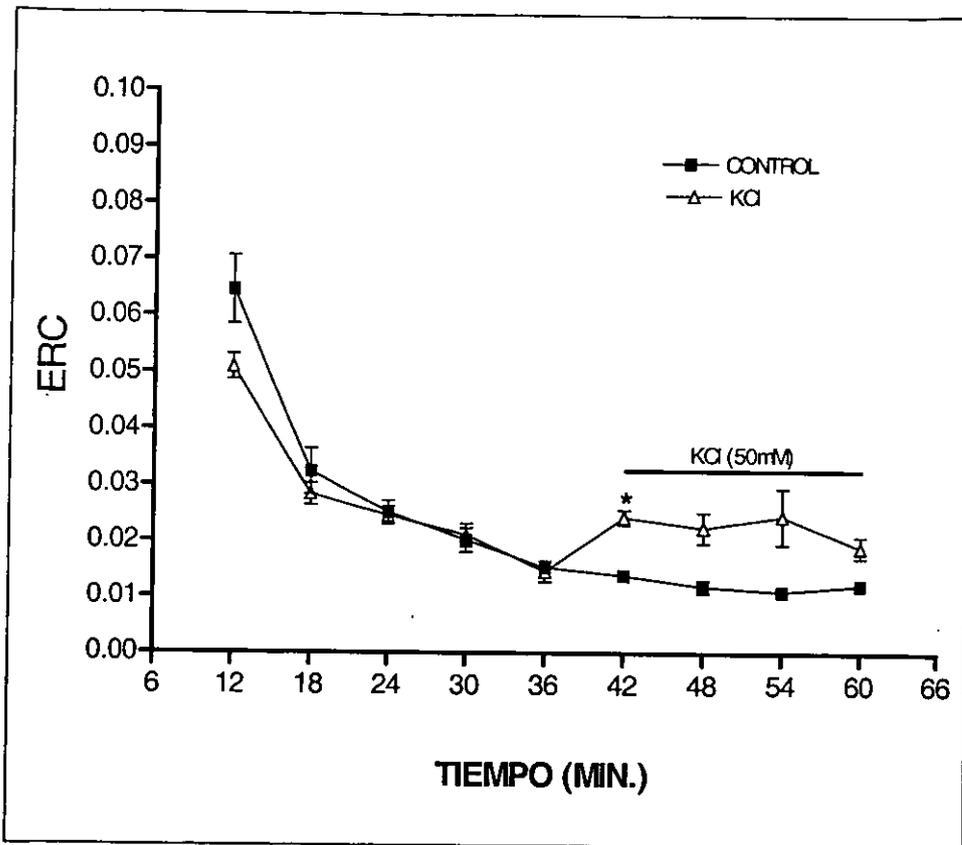
ensayos de liberación estimulando, con alto potasio en diferentes condiciones, en ausencia de calcio. Se superfundió con medio sin calcio en presencia de EGTA [500 $\mu$ M] (quelante de calcio extracelular) obteniendo un aumento en la liberación de  $66 \pm 17\%$  sobre el control (100%).

**Tabla 2. Efecto comparativo de los agonistas y antagonistas de los receptores a glutamato de tipo ionotrópico, sobre la liberación de spm-[ $^3$ H].**

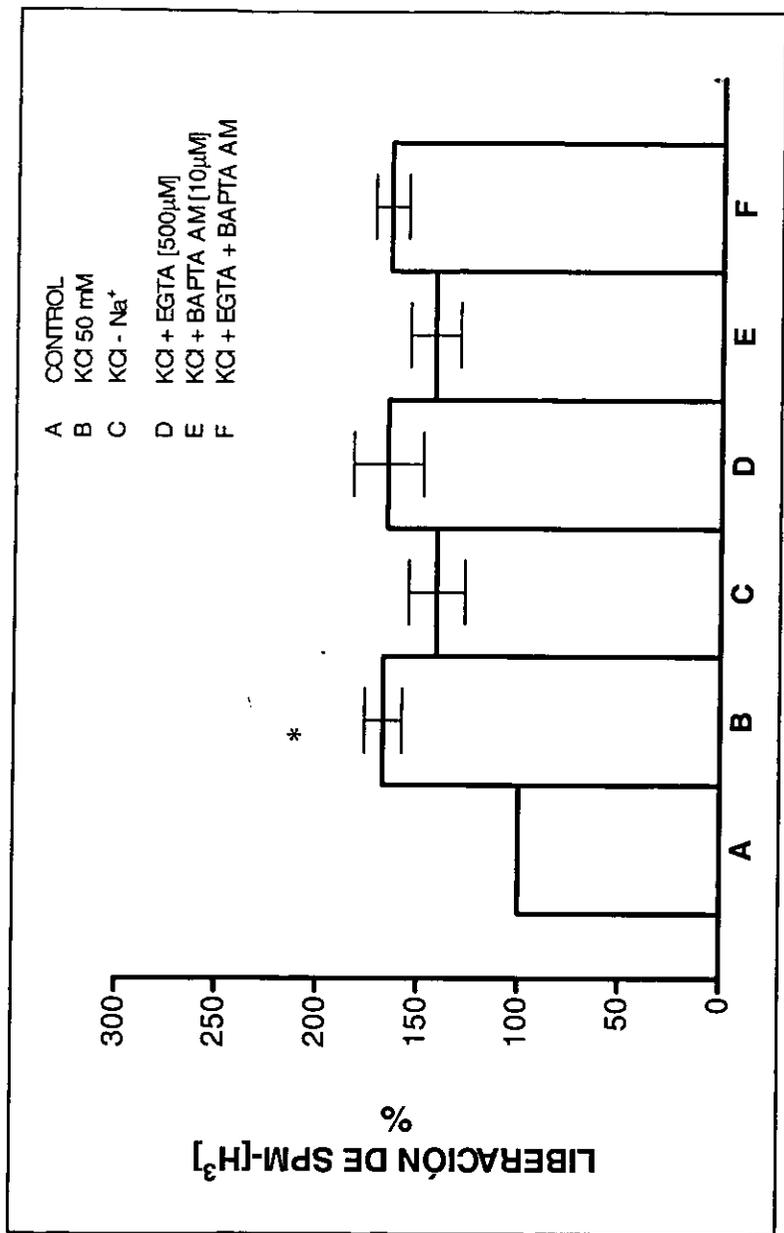
AGONISTAS Y ANTAGONISTAS	RETINA COMPLETA (%)	CULTIVO DE MÜLLER (%)	CULTIVO DE NEURONAS (%)
CONTROL (PRE-ESTÍMULO)	100	100	100
L-Glu [1mM]	104 $\pm$ 15	93 $\pm$ 6	98 $\pm$ 4
L-Glu [5mM] + treo-3-hidroxiaspartato [200 $\mu$ M]	94 $\pm$ 4	nd	nd
KA [1mM]	105 $\pm$ 7	105 $\pm$ 9	102 $\pm$ 16
NMDA 1[mM]	98 $\pm$ 6	98 $\pm$ 3	92 $\pm$ 11
NMDA [1mM] + MCPG [200 $\mu$ M]	92 $\pm$ 1	nd	nd
L-Glu [1mM] + CNQX [100 $\mu$ M]	83 $\pm$ 3	nd	nd
L-Glu [1mM] + MCPG [200 $\mu$ M]	100 $\pm$ 0	nd	nd

Los porcentajes son la media  $\pm$  E.S.M. de una n de 4 a 6 experimentos. P < 0.05, t de Student.

La segunda variante consistió en incubar el tejido en medio ausente de calcio en presencia de BAPTA AM [10 $\mu$ M] (quelante de calcio intracelular), superfundiendo con RKB sin calcio, obteniéndose un aumento del  $43 \pm 2\%$  sobre el control; por último, el ensayo se llevó a cabo en ausencia de calcio incubando con BAPTA AM y EGTA, superfundiendo con medio sin calcio y con EGTA; en estas condiciones el estímulo de la liberación por alto K<sup>+</sup> se mantuvo en  $65 \pm 8\%$  sobre el control. En ninguna de las condiciones probadas se encontró diferencia significativa con respecto al aumento de la liberación de spm-[ $^3$ H] por alto potasio (gráfica 2).



Gráfica 1. Curva de liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$  en retina completa (pollo de 3 días de nacido), estimulando con alto potasio. Los valores de ERC son la media  $\pm$  E.S.M. ( $n=4$ ).  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa.



Gráfica 2. Porcentaje de liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$  de la retina completa (pollo de 3 días de nacido), estimulando con KCl 50mM bajo diferentes condiciones. En los ensayos correspondientes, se incubó con BAPTA AM 60 min antes de la superfusión en medio sin calcio y en presencia de EGTA (según las condiciones). El control corresponde al valor del preestímulo (100%). Los valores son la media  $\pm$  E.S.M. (n= 4).  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa con respecto al control. De la C-F se realizó la estadística con respecto a B.

La liberación inducida por alto potasio es independiente de sodio, dado que el alto  $K^+$  estimuló la liberación de  $spm-[^3H]$  en medio sin  $Na^+$  ( $41 \pm 14\%$  sobre el preestímulo). Asimismo, la adición de TTX [ $1\mu M$ ] (tetrodotoxina; bloqueador de canal de sodio) en el medio de superfusión y la estimulación con alto potasio, no presentó diferencia significativa, ya que el porcentaje de liberación fue de  $39 \pm 4\%$  sobre el control. Con el fin de probar el efecto de un aumento en la concentración intracelular de  $Na^+$  sobre la liberación estimulada de espermina, se añadió al medio de superfusión el ionóforo de sodio nigericina [ $5\mu M$ ] y el activador de canales de sodio sensibles al voltaje veratrina, [ $67$  y  $100\mu M$ ] (por separado), y en ningún caso se modificó la liberación basal (Tabla 3).

**Tabla 3. Efecto del  $Na^+$  sobre la liberación de la  $spm-[^3H]$  por despolarización. Comparación de los porcentajes de liberación entre los 3 sistemas estudiados**

CONDICIONES EXPERIMENTALES	RETINA COMPLETA (%)	CULTIVO DE MULLER (%)	CULTIVO DE NEURONAS (%)
CONTROL	100	100	100
KCl 50mM	$167 \pm 9^*$	$160 \pm 24^*$	$165 \pm 6^*$
KCl + TTX ( $1\mu M$ )	$139 \pm 4$	d	nd
KCl - $Na^+$	$141 \pm 14$	$128 \pm 17$	$115 \pm 13^{**}$
NIGERICINA ( $5\mu M$ )	$100 \pm 3^{**}$	$87 \pm 9^{**}$	$90 \pm 5^{**}$
VERATRINA ( $200\mu M$ )	$87 \pm 4^{**}$	$88 \pm 8^{**}$	$97 \pm 14^{**}$

Los porcentajes son la media  $\pm$  E. S. M. (n = 4-6). En Müller se utilizó KCl 100mM.  $P < 0.05$  t de Student,

(\*) diferencia significativa con respecto al control y (\*\*) diferencias significativas con respecto a KCl 50mM.

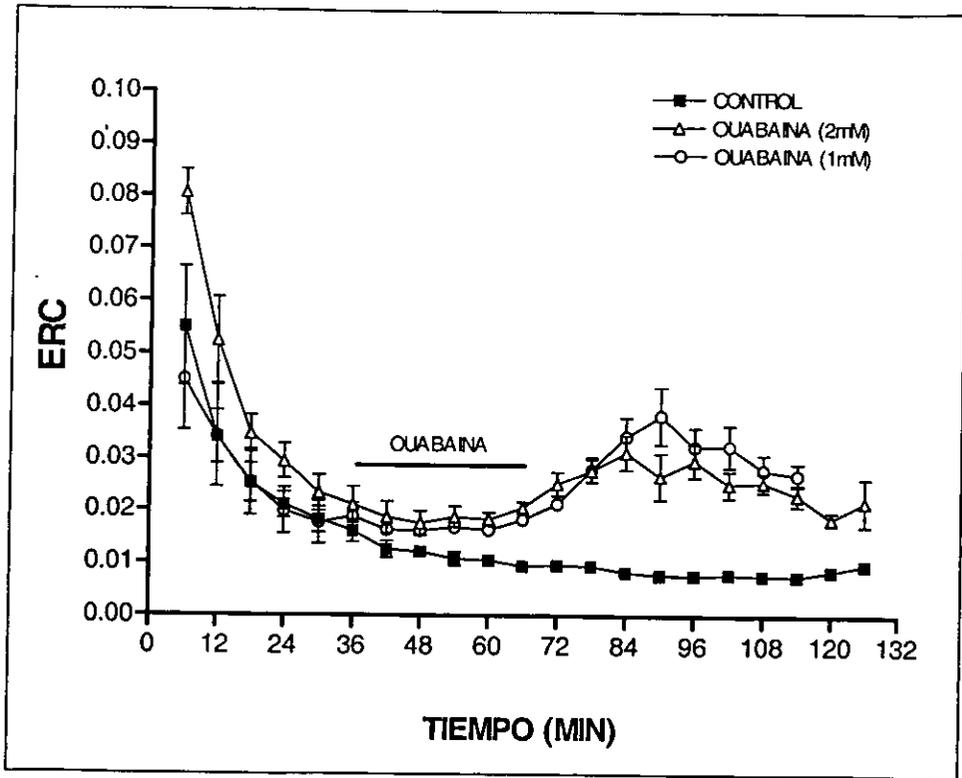
### 1.3 *Efecto de la ouabaina sobre la liberación de spm-[<sup>3</sup>H].*

La inhibición de la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> por ouabaina [1mM] o digitoxina [100-150μM] aumenta la liberación de spm-[<sup>3</sup>H] después de 25 minutos de superfusión con el fármaco (gráficas 3 y 4). Al realizar los mismos ensayos en medio sin calcio y utilizando ambos quelantes de calcio, el efecto sobre la liberación estimulada por ouabaina se revirtió de manera evidente, y no así el efecto de la digitoxina (gráficas 5 y 6).

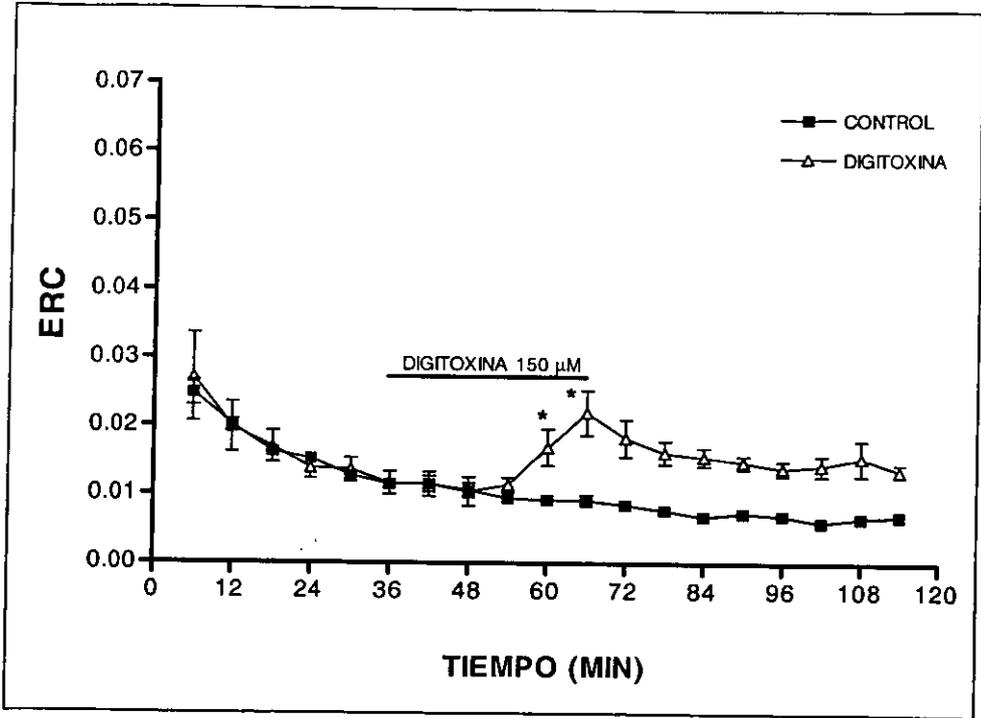
## **2 LIBERACIÓN DE ESPERMINA-[<sup>3</sup>H] EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MÜLLER Y NEURONAS DE LA RETINA DE POLLO.**

### 2.1 *Efecto de la activación de los receptores de glutamato sobre la liberación de spm-[<sup>3</sup>H].*

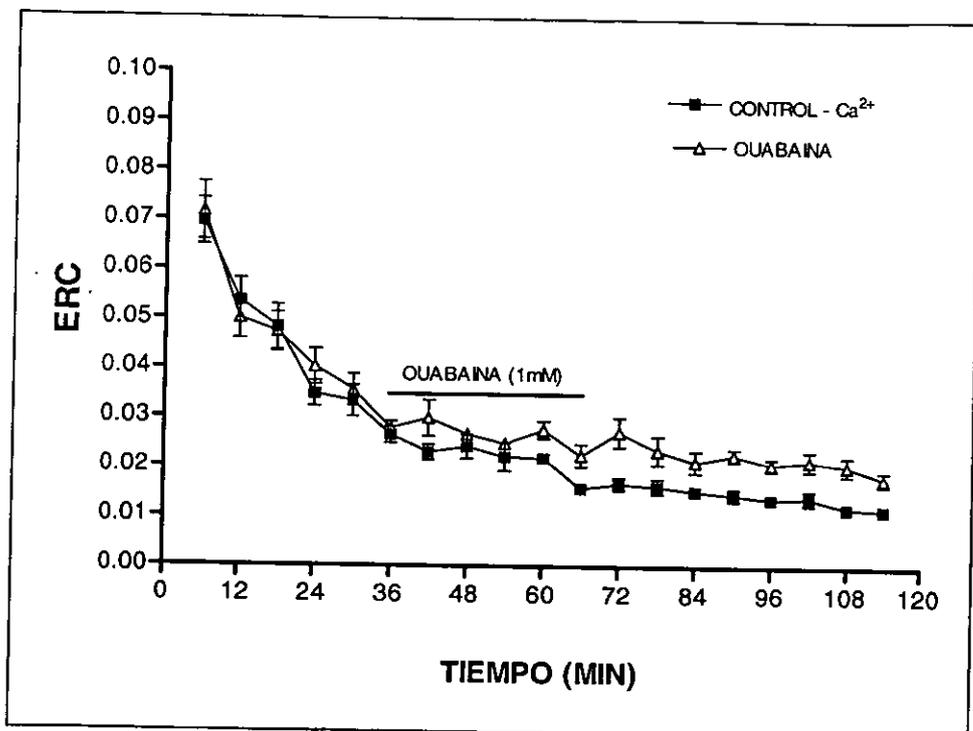
Con base en los resultados obtenidos en la liberación de espermina-[<sup>3</sup>H] en retina de pollo, se realizaron los experimentos de superfusión en cultivos, con el fin de determinar el tipo celular (glía o neurona), responsable de la liberación de spm-[<sup>3</sup>H] observada en la retina completa. Se investigó el efecto de los agonistas de los receptores para AAE sobre la liberación de espermina, para lo cual se empleó el L-Glu [1mM], y los agonistas selectivos para los 2 tipos de receptores ionotrópicos: el NMDA [1mM] y el KA [1mM]. La tabla 2 muestra los datos obtenidos en la liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en cultivo, tanto de células de Müller, como de neuronas de la retina. Se observa que el L-Glu, el NMDA y el KA, no modifican la liberación de espermina-[<sup>3</sup>H] en ninguno de los dos tipos celulares en cultivo con respecto al control y a los resultados obtenidos en la retina completa.



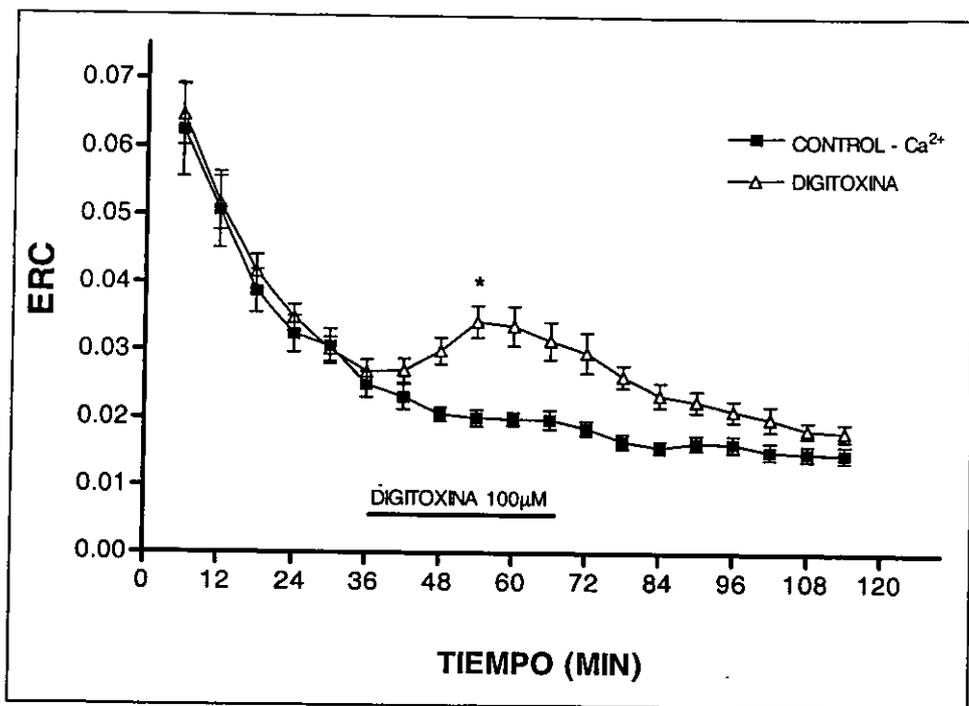
Gráfica 3. Curva de liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$  en retina completa (pollo de 3 días de nacido), estimulando con ouabaina a dos concentraciones. La línea indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media  $\pm$  E.S.M. (n=4).



Gráfica 4. Curva de liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en retina completa (pollo de 3 días de nacido), estimulando con digitoxina. La línea continua indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media ± E.S.M. (n = 4). P < 0.05, t de Student, (\*) diferencia significativa.



Gráfica 5. Curva de liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en retina completa (pollo de 3 días de nacido), estimulando con ouabaina en medio sin calcio, con EGTA [500µM], durante toda la superfusión. El tejido fue incubado con BAPTA AM [10µM] 60 min antes de la superfusión (control y estimulado). La línea indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media ± E.S.M. (n=4).



Gráfica 6. Curva de liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en retina completa (pollo de 3 días de nacido), estimulando con digitoxina en medio sin calcio, con EGTA [500 µM], durante toda la superfusión. El tejido fue incubado con BAPTA AM [10µM] 60 min antes de la superfusión (control y estimulado). La línea indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media ± E.S.M. (n= 6). P< 0.05, t de Student. (\*) diferencia significativa.

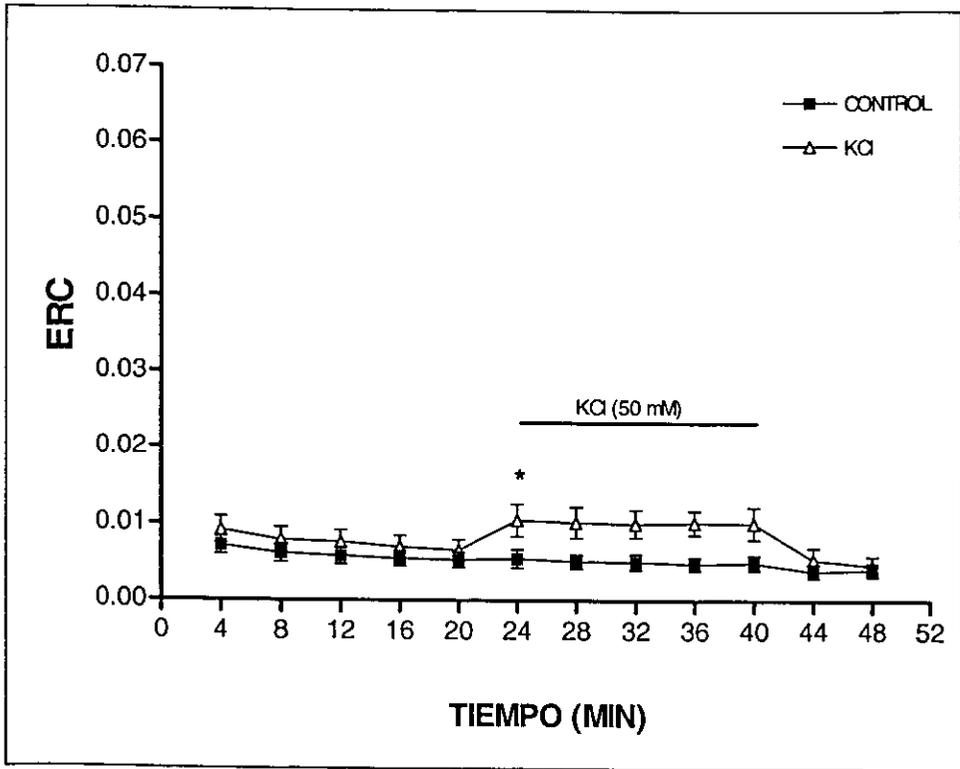
## 2.2 Efecto de la despolarización sobre la liberación de $\text{spm-}^3\text{H}$ .

La despolarización inespecífica con alto potasio (50mM en neuronas y 100mM en células de Müller), aumenta entre 65 y 60% la liberación sobre el control (gráficas 7 y 8). Sin embargo, la nigericina [10 $\mu\text{M}$ ] y la veratrina [200 $\mu\text{M}$ ], no generaron diferencias significativas en la liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$  con respecto al control (preestímulo 100%) (tabla 3).

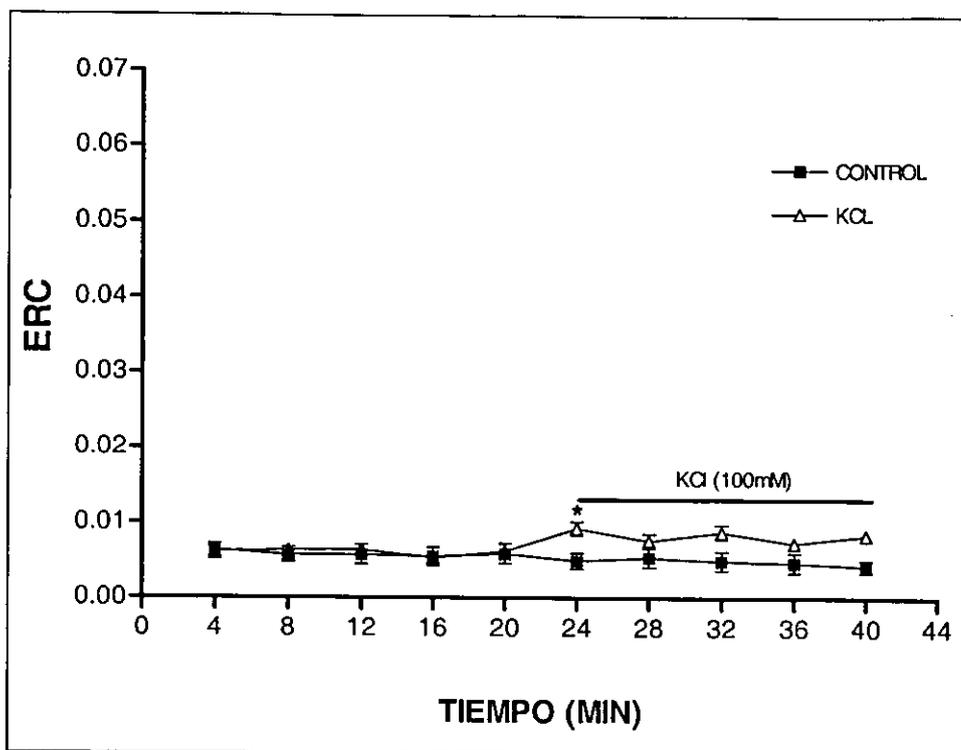
Se exploró la liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$ , en cultivos de células de Müller y neuronas de la retina, mediante la despolarización con alto potasio (100 y 50mM, respectivamente) en diferentes condiciones:

a) En ausencia de sodio, la liberación por despolarización con alto  $\text{K}^+$  aumentó 28% en el caso de las células de Müller en cultivo, y 15% en las neuronas en cultivo, con respecto al control. Estos resultados indican que la liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$ , en los cultivos de células de Müller y neuronas de la retina, inducida por despolarización es parcialmente dependiente de sodio (gráfica 9).

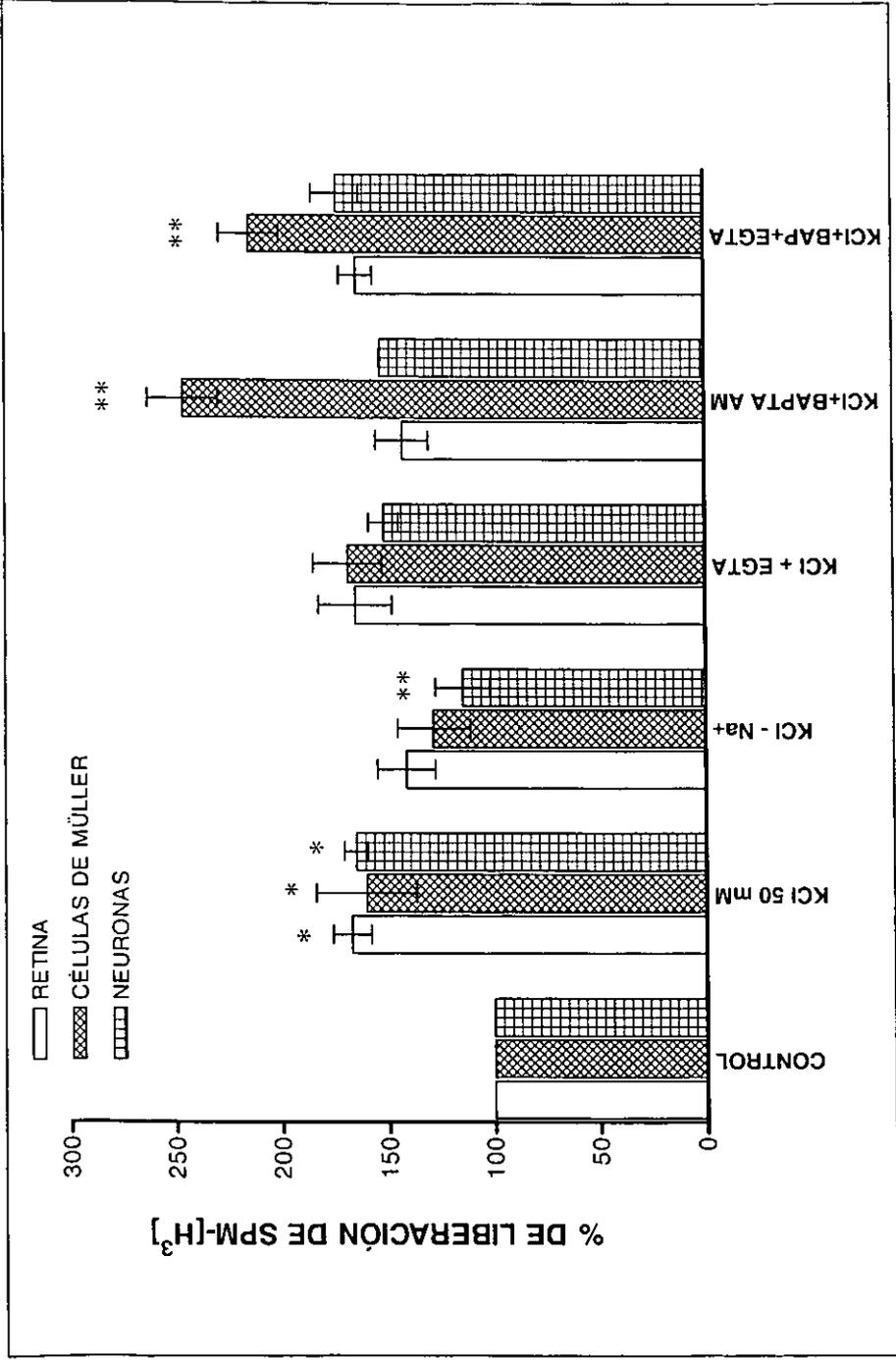
b) En ausencia de calcio externo y EGTA [500 $\mu\text{M}$ ], el porcentaje de liberación fue de 69% en Müller y 51% en neuronas, sobre el control. En ausencia de calcio extracelular e incubando los cultivos con BAPTA AM [10 $\mu\text{M}$ ], los porcentajes de liberación fueron de  $146 \pm 16\%$  y  $54 \pm 0.15\%$  sobre el control en cultivos de células de Müller y neuronas, respectivamente. La liberación de espermina en presencia de ambos quelantes de calcio, no presentó diferencias significativas respecto al aumento obtenido con KCl en medio completo ( $165 \pm 6\%$ ) en las neuronas en cultivo, mientras que en las células de Müller, se observó un aumento de  $146 \pm 16\%$  sobre el control (gráfica 9). Por lo tanto, la liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$  inducida por altas concentraciones de KCl, es dependiente de calcio en las células de Müller.



Gráfica 7. Curva de liberación de  $sp\text{-}[^3\text{H}]$  en cultivo primario de neuronas de la retina de pollo, estimulando con alto potasio. La línea indica el tiempo de estímulo. Los valores de ERC son la media  $\pm$  E.S.M. ( $n = 6$ ).  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa.



Gráfica 8. Curva de liberación de  $sp\text{-}^3\text{H}$  en cultivo primario de células de Müller de retina de pollo, estimulando con alto potasio. Los valores de ERC son la media  $\pm$  E.S.M. (n=4).  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa.

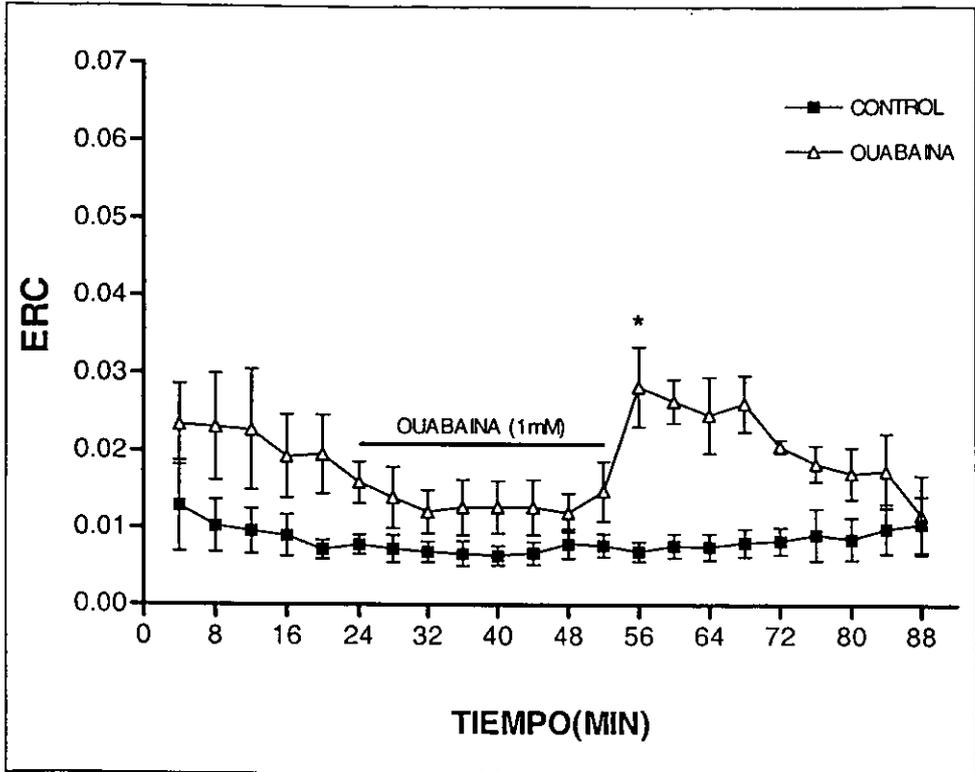


Gráfica 9. Porcentaje de liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en retina completa y cultivos primarios de células de Müller y neuronas de la retina de pollo. Se estimuló con alto potasio 50mM (100mM en cultivo de células de Müller), bajo diferentes condiciones. En los ensayos correspondientes, se incubó con BAPTA AM [10µM] 60min. antes de la superfusión. El control corresponde al valor del preestímulo (100%). Los valores son la media ± E.S.M. (n= 4 a 6). P< 0.05, t de Student, (\*) diferencia significativa con respecto al control, (\*\*) diferencia significativa con respecto a KCl 50mM (ó 100mM).

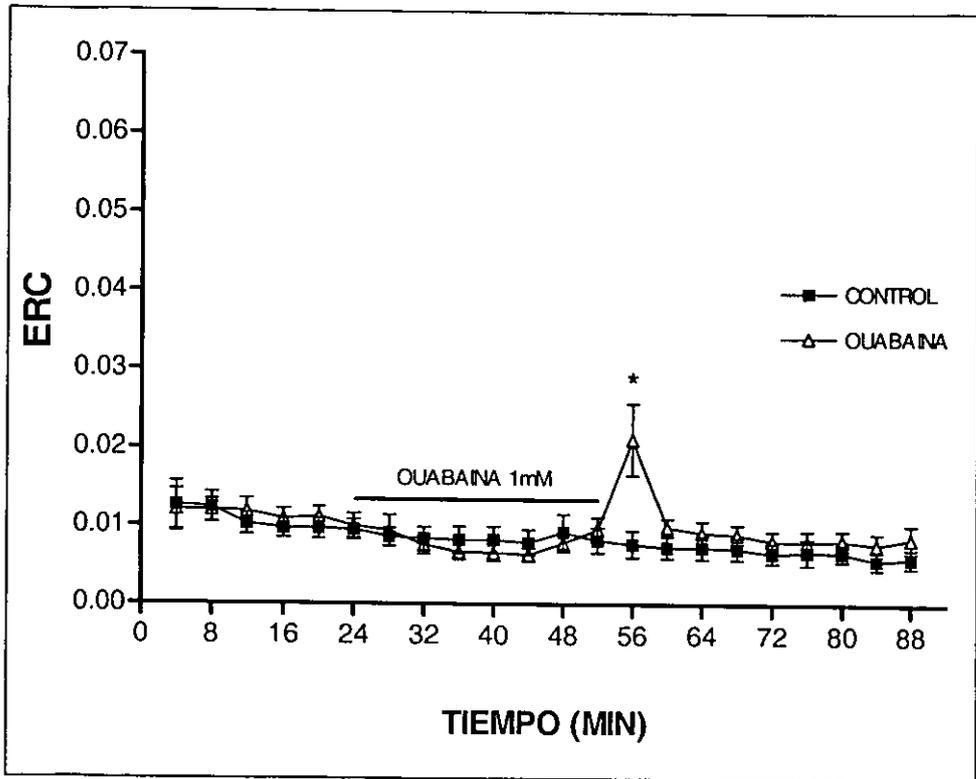
### 2.3 Efecto de la ouabaina sobre la liberación de $\text{spm-}^3\text{H}$ .

Se estudio el efecto de la ouabaina y la digitoxina, inhibidores de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , sobre la liberación de espermina- $^3\text{H}$ ] de la retina completa, así como de células de Müller y neuronas en cultivo primario. Tanto en la retina como en ambos tipos de cultivo, la ouabaina [1mM] indujo la liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$ . En la retina completa (gráfica 3) , se observó un máximo de liberación, 15min después del retiro de la droga del medio de superfusión, recuperándose el nivel basal 30min después. En los cultivos de neuronas se obtuvo un resultado similar (gráfica 10); sin embargo, en los cultivos de glía de Müller, se observó una clara diferencia, ya que se presenta un pico de liberación de corta duración a los 4 minutos después del retiro del fármaco del medio (gráfica 11). Estos resultados sugieren, como se discutirá en la sección correspondiente, mecanismos diferentes en ambos tipos celulares. El efecto de la digitoxina [150 $\mu\text{M}$ ] apoya esta hipótesis, ya que en las neuronas induce liberación de  $\text{spm}$  con un curso temporal semejante al de la ouabaina en la retina (gráfica 12), pero carece de efecto en las células de Müller (gráfica 13).

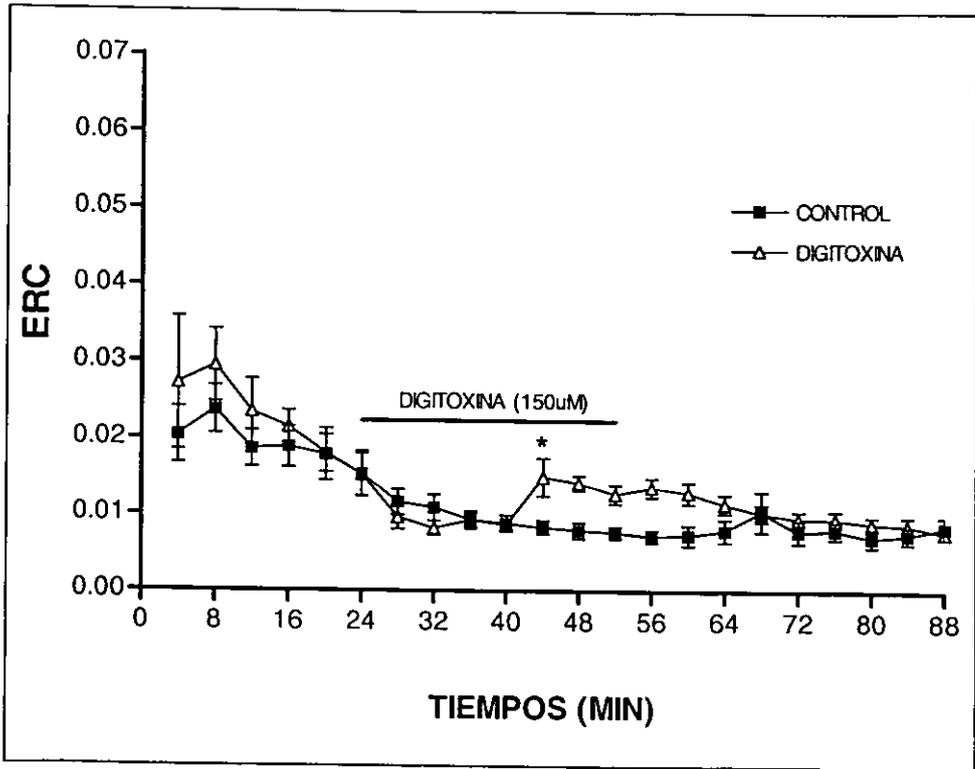
La liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$ ] inducida por ouabaina depende de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la retina completa, así como en las neuronas y en las células de Müller de la retina en cultivo (gráficas 5, 14 y 15). Tanto la adición del quelante extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA como del quelante intracelular BAPTA AM, individualmente o en conjunto, inhiben el efecto de la ouabaina sobre la liberación de  $\text{spm}$ . La liberación inducida por digitoxina no se inhibió por la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el caso de la retina completa (gráfica 6) pero, como se observa en la gráfica 16, el efecto del fármaco sí depende de calcio en las neuronas en cultivo.



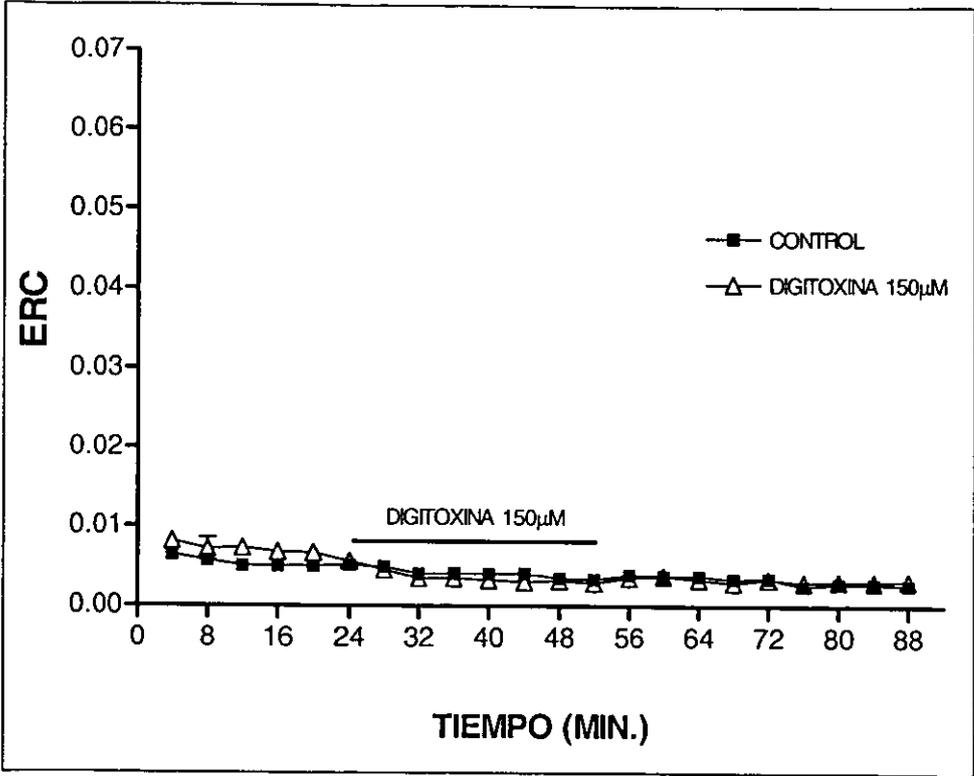
Gráfica 10. Curva de liberación de  $spn\text{-}[^3H]$  en cultivo primario de neuronas de la retina de pollo, estimulando con ouabaina. La línea indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media  $\pm$  E.S.M. ( $n = 4$ ).  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa Econ respecto al preestímulo.



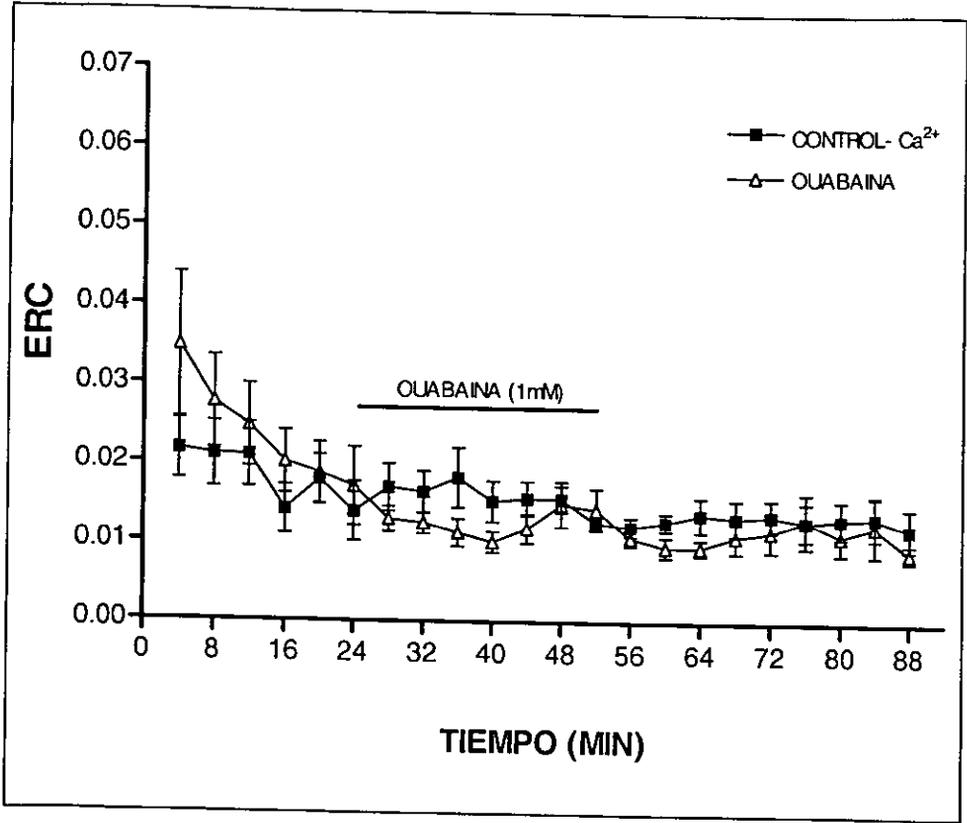
Gráfica 11. Curva de liberación de  $sp\text{-}m\text{-}[^3\text{H}]$  en cultivo primario de células de Müller de la retina de pollo, estimulando con ouabaina. Los valores de ERC son la media  $\pm$  E.S.M. (n = 8).  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa.



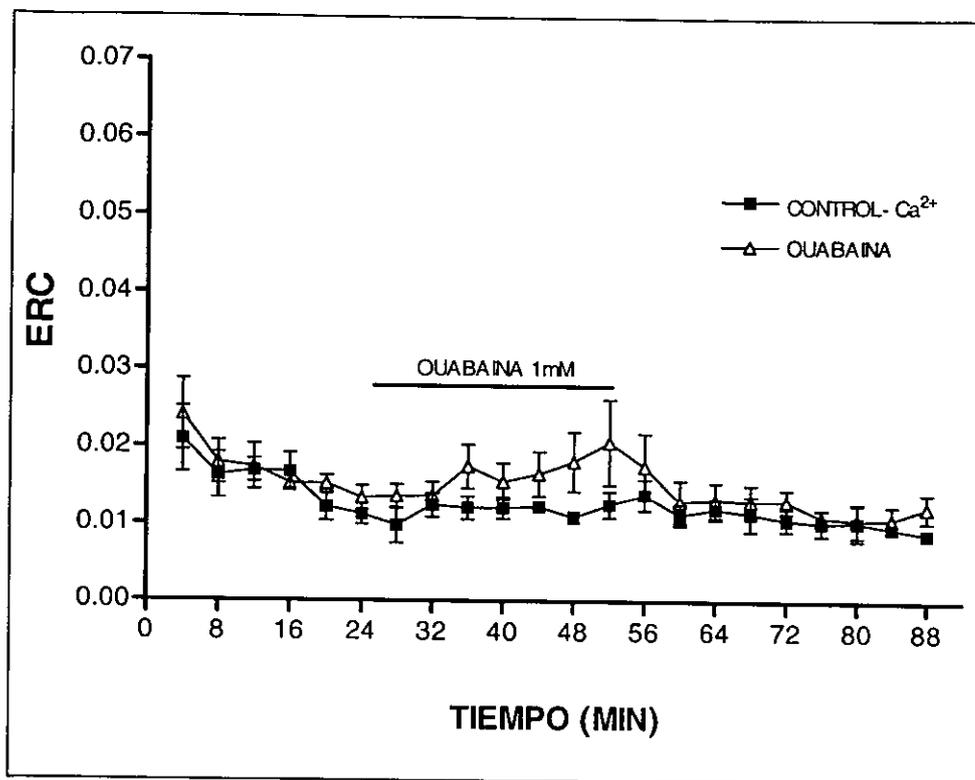
Gráfica 12. Curva de liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en cultivo primario de neuronas de la retina de pollo, estimulando con digitoxina. La línea indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media  $\pm$  E.S.M. (n = 6). P < 0.05, t de Student, (\*) diferencia significativa.



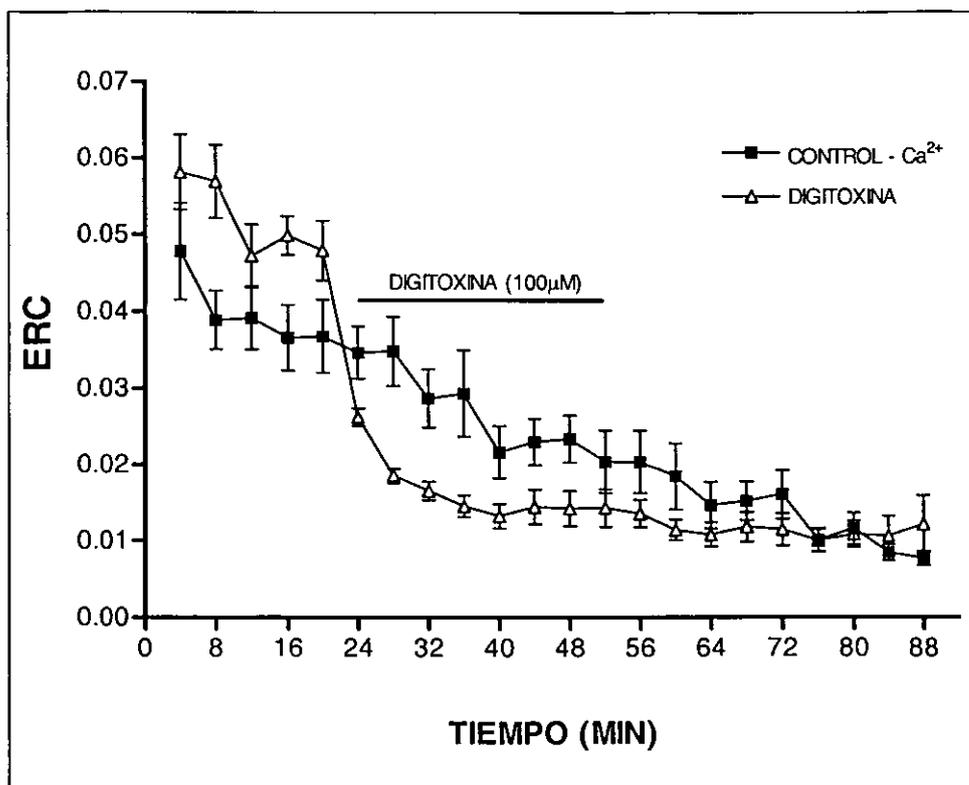
Gráfica 13. Curva de liberación de  $\text{spm-}^3\text{H}$  en cultivo primario de células de Müller de retina de pollo, estimulando con digitoxina. La línea indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media  $\pm$  E.S.M. ( $n = 6$ ).



Gráfica 14. Curva de liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en cultivo primario de neuronas de la retina de pollo, estimulando con ouabaina en medio sin calcio con EGTA [500μM], durante toda la superfusión. El tejido fue incubado con BAPTA AM [10 μM] 60min antes de la superfusión (control y estimulado). La línea indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media ± E.S.M. (n= 6).



Gráfica 15. Curva de liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en cultivo primario de células de Müller de la retina de pollo, estimulando con ouabaina en medio sin calcio con EGTA [500µM], durante toda la superfusión (control y estimulado). El tejido fue incubado con BAPTA AM [10µM] 60min. antes de la superfusión. La línea indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media ± E.S.M. (n = 4).



Gráfica 16. Curva de liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en cultivo primario de neuronas de la retina de pollo, estimulando con digitoxina en medio sin calcio con EGTA [500µM], durante toda la superfusión. El tejido fué incubado con BAPTA AM [10 µM] 60min antes de la superfusión (control y estimulado). La línea indica el tiempo de adición del fármaco. Los valores de ERC son la media ± E.S.M. (n=6).

## VI DISCUSIÓN

El interés en el estudio de las poliaminas (PA) se debe, principalmente, a su participación en procesos de crecimiento y diferenciación celular (Tabor y Tabor, 1984), reparación del tejido nervioso (Agnati et al., 1985), y procesos neurodegenerativos (Virgili et al., 1992), pero también, a su probable papel como sustancias neuromoduladoras o neurotransmisoras (Carter, 1994). Un importante criterio para atribuir el papel de neurotransmisor a un compuesto, es su liberación al espacio extracelular por la estimulación de tejidos excitables, además de la presencia de sistemas de captura específicos de alta afinidad para la remoción del compuesto del espacio sináptico. Se ha reportado la liberación de poliaminas en el cerebro de rata (Harman y Shaw, 1981), y más específicamente en el estriado de rata (Fage et al., 1992; Fage et al., 1993; Nicolas et al., 1994), además de la presencia de dos sistemas de transporte de alta afinidad en la corteza cerebral de rata (Harman y Shaw, 1981). Sumado a lo anterior, existen experimentos de biología molecular, electrofisiología y bioquímica que indican que la espermina y la espermidina modulan la actividad neuroexcitadora del Glu, a través de su interacción con receptores de tipo NMDA (Mayer et al., 1992; Rock y MacDonald, 1995; Carter, 1994).

El aporte más importante de este estudio es el haber demostrado que la liberación de  $\text{spm-}[^3\text{H}]$  de la retina de pollo no es consecuencia de la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato. Se ha demostrado que las PA afectan diversos aspectos de la actividad de los receptores de Glu del tipo NMDA (ver introducción), así como su liberación por la estimulación de dichos receptores en el estriado de la rata (Fage et al., 1992), lo que ha sugerido que las PA podrían participar en la modulación de la neurotransmisión mediada por AAE. En este trabajo, se estimuló a las 3 preparaciones estudiadas (retina completa, neuronas y glía de la retina en cultivo), con L-Glu, KA y NMDA, agonistas específicos de los subtipos de receptores ionotrópicos, y ninguno de ellos indujo la liberación de spm. Dada la posibilidad de que la falta de efecto del L-Glu fuera debida a su rápida recaptura, se hicieron experimentos incluyendo un bloqueador de la misma (Treo-3-hidroxiaspartato), sin obtener, tampoco, en estas condiciones, liberación de spm por glutamato.

Con el objeto de excluir la interacción cruzada entre subtipos de receptores activados por Glu como causa de la ausencia de efecto de este último, se hicieron experimentos en presencia de bloqueadores de los receptores de KA (CNQX) y de los receptores metabotrópicos (MCPG). Tampoco en estas condiciones el Glu estimuló la liberación de spm.

La participación del receptor de NMDA en la liberación de PA ha sido confirmada por otros autores (Fage et al., 1992; Nicolas et al., 1994), mediante el bloqueo de la liberación de las PA por la aplicación del bloqueador de canal MK-801, del antagonista competitivo CGP-37849 y del antagonista del sitio de la glicina L-689,560, los cuales revierten el efecto del glu sobre la liberación. En ambos trabajos se observó un aumento en la liberación de las PA por concentraciones despolarizantes de potasio en el medio externo, de menor magnitud que la liberación provocada por la activación del receptor de NMDA. Los resultados aquí obtenidos, por despolarización con alta concentración extracelular de potasio (50mM), demuestran un aumento de 65% sobre el valor preestímulo, lo que confirma que sí hay liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en la retina de pollo, pero no está mediada por el receptor de NMDA. Por tanto, la espermina se libera de la retina por un mecanismo diferente al reportado en el estriado de rata (Fage et al., 1992; Nicolas et al., 1994).

Se exploró la posibilidad de que la liberación de espermina estimulada por alto K<sup>+</sup> pudiera darse a través de la actividad inversa del transportador de PA, ya que se demostró que este proceso, en la retina, no se relaciona con la activación de los receptores para AAE, como sucede en diversas regiones del SNC. A este respecto, se sabe que concentraciones elevadas de KCl en el medio extracelular, cambian la fuerza impulsora de los sistemas de transporte (Nicholls y Attwell, 1990; Ranteri et al., 1979; Shaw, 1994); en estas condiciones, la liberación se produce por la inversión del sistema de captura, en forma independiente de Ca<sup>2+</sup>, ya que no es un fenómeno exocitótico. Con el fin de investigar el mecanismo de liberación de la spm por despolarización con alto K<sup>+</sup>, se exploró la dependencia de Ca<sup>2+</sup> y de Na<sup>+</sup> en la retina completa, así como en sus componentes, glía y neuronas en cultivo.

- **Participación del  $Ca^{2+}$  en la liberación de  $spm-[^3H]$ .**

En la retina completa, como en los cultivos primarios de neuronas, ni la remoción del  $Ca^{2+}$  extracelular con EGTA, ni el intracelular con BAPTA AM, modificaron la liberación de  $spm$  inducida por alto  $K^+$ . Resultados que nos permiten concluir que la  $spm$  liberada por despolarización no procede de las neuronas de la retina a través de un proceso de exocitosis.

Los resultados de la gráfica 9 demuestran que, a diferencia de las neuronas, en la glía, el BAPTA AM (quelante intracelular) aumenta la liberación de  $spm$  inducida por alto  $K^+$ , 93% más que en las neuronas, mientras que el EGTA (quelante extracelular) no la modifica significativamente. Una posible explicación, sujeta actualmente a comprobación, sería que al quelar el  $Ca^{2+}$  intracelular durante el período de preincubación (60 min), se activara una vía de señalamiento intracelular reprimida por el  $Ca^{2+}$  intracelular en la condición no estimulada (p.ej. fosforilación-desfosforilación), lo que provocaría ese aumento en la liberación.

Independientemente del resultado de experimentos futuros, se demuestra en este estudio que la liberación de  $spm$  de la glía de la retina no es vesicular, y el mecanismo de la misma es diferente del de las neuronas.

- **Participación del  $Na^+$  en la liberación de  $spm-[^3H]$ .**

La ouabaina y la digitoxina (inhibidores de la ATPasa de  $Na^+/K^+$ ) inducen la liberación de  $spm-[^3H]$  de la retina; la estimulación se mantiene por varios minutos después de haber retirado el fármaco del medio de superfusión (excepto en las células de Müller en cultivo). Este efecto, tanto en la retina como en las neuronas y glía de la misma en cultivo, es dependiente de calcio para la ouabaina, pero no para la digitoxina. En el caso de la ouabaina, este aumento en la liberación de  $spm$ , se revierte en ausencia de calcio. El efecto de la ouabaina puede estar, en parte, relacionado con la despolarización (Fage et al., 1993). Los inhibidores de la ATPasa causan una disipación del gradiente de sodio y potasio a través de la

membrana, aumentando la concentración de sodio intracelular y dando como resultado numerosos efectos secundarios sobre la actividad celular. El aumento en la concentración intracelular de sodio, puede contribuir a la actividad inversa del sistema de captura. Varios investigadores han reportado que la inhibición de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  provoca la liberación de transmisores en el sistema nervioso autónomo, en el cerebro, en terminales neuromusculares y en la médula adrenal (Powis et al., 1983); este mecanismo está aún en controversia. La inhibición de la ATPasa induce la inversión del transporte, probablemente para eliminar el exceso de  $\text{Na}^+$  interno y contrarrestar el desajuste iónico; al quitar el estímulo, el efecto desaparece. La desaparición del efecto se presenta minutos después del retiro del fármaco, probablemente porque es el tiempo que tarda el tejido en recuperar su funcionamiento normal. En todos los experimentos de despolarización con potasio, la liberación de spm regresa a su nivel basal después de eliminar el KCl del medio.

Varios investigadores han descrito la liberación provocada por ouabaina de manera dependiente de calcio, mientras otros la describen como parcialmente dependiente de calcio extracelular (referencias en Sweadner, 1985). El modelo más aceptado para la liberación de transmisores provocada por ouabaina, es la que ocurre por exocitosis, mecanismo que depende de calcio. Un segundo tipo de mecanismo de liberación del transmisor, inducido por ouabaina, que no es vesicular, es a través del acarreador de la membrana plasmática dependiente de  $\text{Na}^+$  e independiente de calcio (Westerink et al., 1989). La liberación por ouabaina de spm- $^3\text{H}$ ], en la retina es dependiente de calcio, y no así la inducida por digitoxina, la cual presenta una estequiometría y composición diferente a la ouabaina; probablemente, esta característica influya en la independencia de calcio del efecto de la digitoxina en la liberación. Esto último podría relacionarse con el tipo de interacción con la bomba. Es de interés hacer notar, que existen dos formas de ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  descritas. Una tiene alta afinidad por la ouabaina, mientras que otras presentan baja afinidad (Sweadner, 1985); el cerebro contiene ambas formas de ATPasa. Estudios de "binding" suministran la evidencia de la unión de ouabaina de alta y baja afinidad, que corresponde a la asociación con los diferentes tipos de ATPasa (Athera et al., 1986). La liberación exocitótica de dopamina podría estar inducida por la inhibición de la forma de alta afinidad, mientras que la liberación de dopamina mediada por el acarreador podría deberse a la inhibición de

la forma de baja afinidad (Westerink et al., 1989). Es posible pensar que la diferencia entre el efecto de la ouabaina y el de la digitoxina sobre la liberación de spm en la retina, podría deberse a su interacción con ATPasas diferentes con respecto a su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta posibilidad, al igual que la contribución diferencial de los diferentes tipos celulares que constituyen a la retina, podría contribuir a explicar la diferencia de la respuesta de los fármacos respecto al SNC. Cabe señalar que nuestros resultados no resuelven este punto, para lo cual se requeriría otro tipo de enfoque, dirigido a explorar el efecto de los inhibidores de la ATPasa y dilucidar las causas de su diferente respuesta en ausencia de calcio.

En la retina encontramos una respuesta muy diferente sobre la liberación de spm- $^3\text{H}$ , con respecto a lo reportado por Fage et al. (1992, 1993) y Nicolas et al. (1994), quienes demostraron que hay una liberación selectiva de las PA por la activación de los canales de los receptores NMDA. Estos datos son una evidencia más de que los receptores de NMDA de la retina, presentan propiedades farmacológicas diferentes a las reportadas en otras áreas del sistema nervioso. Por otra parte, se ha reportado que en la retina el 7-cloro-tiokinurenato no inhibe la unión de la glicina- $^3\text{H}$  a los receptores de tipo NMDA, ni reduce el daño que ocasiona la isquemia (Lombardi et al., 1994; Rodríguez-Contreras; 1998). Asimismo, la unión del antagonista del sitio del glutamato de los receptores de tipo NMDA, CPP- $^3\text{H}$ , a membranas de la retina, muestra diferencias significativas con respecto a lo descrito en el SNC (López-Colomé y Somohano, 1992). También se ha demostrado que en la retina, la estimulación de la unión del bloqueador del canal de los receptores NMDA, MK-801, por la glicina, es mucho menor que la observada en el SNC. Esta propiedad se relaciona directamente con la demostración de que la glicina, así como un agonista del sitio de la glicina del receptor de NMDA, el 1-aminociclopropano-dicarboxilato (ACPD), no potencian la neurotoxicidad inducida por la sobrestimulación de los receptores de tipo NMDA en la retina, sino por el contrario, parecen tener un papel protector sobre las neuronas de la misma (Boje et al., 1992). Estas propiedades diferentes que presenta el receptor de NMDA son atribuidas a la composición heteromérica del receptor de NMDA en la retina, que muy probablemente difiere de la del receptor de NMDA estudiado en otras zonas del sistema nervioso (Hollmann y Heinemann, 1994; Wisden y Seeburg, 1993; Laurie y Seeburg, 1994).

Con el fin de identificar las células responsables de la liberación de spm-[<sup>3</sup>H] se llevaron a cabo experimentos equivalentes a los de la retina completa, en cultivos primarios de glía (células de Müller) y neuronas de la retina. Los resultados obtenidos fueron similares a los de retina completa. El L-GLU, el KA y el NMDA no provocaron aumento en la liberación, por lo cual es claro que el receptor de NMDA (o en general los receptores a glutamato de tipo ionotrópico) no participan en la liberación de spm-[<sup>3</sup>H]. Asimismo, los ionóforos de sodio tampoco modificaron la liberación en los cultivos primarios. El alto potasio en los cultivos (en Müller 100mM y en neuronas 50mM), provoca también la liberación de spm, con una cinética similar a la obtenida en la retina. En la gráfica 9, se presenta, comparativamente, el aumento de liberación de spm por despolarización con alto potasio obtenido en los tres sistemas estudiados (retina, cultivo de células de Müller y cultivo de neuronas). En dicha gráfica se observa una disminución en el porcentaje de liberación de spm cuando se despolariza el tejido en un medio sin sodio, que es significativo en las neuronas, de  $165.3 \pm 5.6 \%$  a  $114 \pm 12.7 \%$ , lo que demuestra que la liberación por despolarización es parcialmente dependiente de sodio, aunque la ausencia de efecto de la nigericina y la veratrina sugieren lo contrario. Esta incongruencia podría relacionarse con cambios en la interacción  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , mencionada con anterioridad.

El efecto estimulador de los inhibidores de la ATPasa sobre la liberación de spm en los cultivos celulares, es controvertido. Sin embargo, dada la diferencia en el perfil de la liberación inducida por ouabaina en células de Müller y neuronas, puede afirmarse que los mecanismos subyacentes son diferentes en ambos tipos celulares (gráficas 10 y 11). La liberación provocada por ouabaina en Células de Müller y neuronas, al igual que en la retina, es dependiente de calcio, ya que su efecto se ve claramente disminuido en presencia de los quelantes de calcio (EGTA y BAPTA AM). La digitoxina no estimula la liberación de spm-[<sup>3</sup>H] en el cultivo de Müller, pero lo hace en las neuronas en forma dependiente de calcio. Nuevamente el efecto de la digitoxina es diferente al de la ouabaina en estos dos sistemas, lo que apoya que la interacción de este fármaco con la ATPasa, pudiera ser diferente a la de la ouabaina, como ya se mencionó.

En general los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que la liberación de espermina-[<sup>3</sup>H] de la retina no depende de la activación del receptor de NMDA, como ha sido demostrado en otras áreas del sistema nervioso, por lo que este trabajo apoya la idea de que el receptor de NMDA en la retina presenta características farmacológicas diferentes a las reportadas en otras áreas del sistema nervioso. Asimismo encontramos que tanto las células de Müller como las neuronas de la retina en cultivo, liberan espermina, por mecanismos muy diferentes, descartando la liberación vesicular.

## VII CONCLUSIONES

El ácido glutámico, el NMDA y el KA no estimulan la liberación de  $\text{spm-}[^3\text{H}]$  en la retina, por lo que tampoco se vio efecto alguno, de estos fármacos, en los cultivos primarios de células de Müller y neuronas de la retina.

La despolarización con alto potasio, en la retina completa como en las células de Müller y neuronas, en cultivo, induce la liberación de  $\text{spm-}[^3\text{H}]$  en un  $65\% \pm$ . Liberación que es independiente de calcio en la retina y neuronas en cultivo, mientras que en las células de Müller es dependiente de calcio intracelular.

La liberación de  $\text{spm-}[^3\text{H}]$  por despolarización con alto potasio es independiente de sodio tanto en retina como en cultivos primarios de células de Müller y no así en neuronas la cual es parcialmente dependiente de sodio.

La inhibición de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  por ouabaina [1mM] y digitoxina [150 $\mu\text{M}$ ], en los tres sistemas, incrementa la liberación de  $\text{spm-}[^3\text{H}]$  minutos después de superfundir con el fármaco, excepto por la digitoxina que no tuvo efecto en las células de Müller. Esta liberación es dependientes de calcio, ya que la cinética de liberación de dichos fármacos se ve afectada por la presencia de los quelantes de calcio (EGTA y BAPTA AM).

En la retina la  $\text{spm}$  es liberada por los dos principales tipos celulares que la componen, mediante diferentes mecanismos, y posiblemente se de por la actividad inversa del transportador de poliaminas, además de que podría haber una ruta de segundos mensajeros involucrada en la modulación negativa de dicha liberación. Por lo que este fenómeno es modulado de manera diferente a lo reportado en otras áreas del SNC.

### III APÉNDICE

#### 1. D-MEM (Medio Eagle Modificación de Dulbecco)

CaCl <sub>2</sub>	200.00	L-Metionina	30.00
Fe(NO <sub>3</sub> ) · 9 H <sub>2</sub> O	0.10	L-Fenilalanina	66.00
KCl	400.00	L-Serina	42.00
MgSO <sub>4</sub>	97.67	L-Treonina	95.00
NaCl	6400.00	L-Triptofano	16.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	125.00	L-Tirosina	104.00
D_glucosa	4500.00	L-Valina	94.00
Rojo de fenol	15.00	D-Ca pantotenato	4.00
L-Arginina	84.00	Cloruro de colina	4.00
L-Cisteína	63.00	Ácido fólico	4.00
L-Glutamina	584.00	i-inositol	7.20
Glicina	30.00	Niacinamida	4.00
L-Histidina	42.00	Pirodoxal	4.00
L-Isoleucina	105.00	Tiamina	4.00
L-Leucina	105.00	Riboflavina	0.40
L-Lisina	146.00		

#### 2. Hank's-BBS (100ml)

NaCl	0.8 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.0125 g
KCl	0.04 g	Rojo fenol	0.002 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.006 g	Glucosa	0.1 g

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

### 3. H-MEM al 10% de FBS (100ml)

NaHCO <sub>3</sub>	0.22 g
FBS (Suero fetal bovino)	10 %
L-MEM	aforar

### 4. L-MEM (100ml)

D-MEM	1.338 g	PNS (Penicilina, neomicina, estreptomicina)	0.025%
Glucosa	0.05 g	Gentamicina	0.025 %
NaHCO <sub>3</sub>	0.022 g	BSA (Albúmina bovina)	1 %

### 5. OPTI-MEM I (medio reducido en suero modificado de MEM Eagle (LIFE TECHNOLOGIES)).

OPTI\_MEM I es una modificación del medio mínimo esencial de Eagle, con un sistema de buffer basado en HEPES y bicarbonato de sodio, suplementado con hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L-glutamina o GlutaMAX, elementos traza y factores de crecimiento. El nivel de proteína es mínimo (15 ug/ml) Los únicos complementos proteicos son insulina y transferrina. Contiene rojo de fenol a una concentración reducida como indicador de pH OPTI-MEM I se puede suplementar con 2-mercaptoetanol antes de usarse.

#### OPTI-MEM I Completo para el cultivo (100ml)

OPTI-MEM I	96 ml
PNS	1 ml
FBS	3 ml

## 6. RINGER KREBS BICARBONATO (RKB)

NaCl	118 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
KCl	4.7 mM
CaCl	2.5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.17 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Glucosa	5.6 mM

## VIX BIBLIOGRAFIA

- ❖ Adler Ruben y Farber Debora (1986) *The Retina: A model for cell biology studies (part-1)*. Academic Press. Orlando, USA. 363 pp.
- ❖ Agnati L. F., K. Fuxe, P. Davalli, I. Zini, A. Corti y M. Zoli (1985) Striatal ornithine decarboxylase activity following neurotoxic and mechanical lesions of the mesostriatal dopamine system of the male rat. *Acta Physiol. Scand.*, 125(1): 173-175.
- ❖ Ascher P. y L. Nowak (1987) Electrophysiological studies of NMDA receptors. *Trends in Neurosci.*, 10: 248-288.
- ❖ Ascher P. y L. Nowak (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons. *J. Physiol.*, 399: 247-266.
- ❖ Athera T., Y-C. Ng, R. Hadley, Y. Kanato y T. M. Brody (1986) High affinity and low affinity ouabain binding sites in the rat heart. *Eur. J. Pharmacol.*, 132, 137-146.
- ❖ Ballas S. K., N Mohandas, L. J. Marton y S. Shohet (1983) Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80: 1942-1946.
- ❖ Barnard E. A. y J. M. Henley (1990) The non-NMDA receptors: types, protein structure and molecular biology. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 11: 500-507.
- ❖ Benveniste M. y M. L. Mayer (1993) Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurons. *J. Physiol.*, 464: 131-163.
- ❖ Bignami A. y D. Dahl (1973) Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res.*, Jan 30; 49(2): 393-402.
- ❖ Bliss T. V. P. y G. L. Collingridge (1993) A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-39.
- ❖ Boje K. M., P. Skolnick, J. Raber, R. T. Fletcher y G. Chader (1992) Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem. Int.*, 20(4): 473-486.
- ❖ Bussow H. (1980) The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res.*, 206(3): 367-378.
- ❖ Calderón F. y A. M. López-Colomé (1998) Spermine inhibits [<sup>3</sup>H]glycine binding at the NMDA receptors from plexiform layers of chick retina. *Neurochem. Res.*, 23: 1363-1369.
- ❖ Carter C. (1994) *Neuropharmacology of polyamines*. Academic Press, San diego, CA. 318p.

- ❖ Choi D. W. (1998) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1: 623-624.
- ❖ Christian R., Y. Stern-Bach y C. F. Stevens (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Sci.*, 280: 1596-1599.
- ❖ Collingridge G. L. y W. Singer (1990) Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 11: 290-296.
- ❖ Corsi M., P. Fina y D. G. Trist (1996) Co-agonism in drug-receptor interaction: Illustrated by the NMDA receptors. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 17: 220-222.
- ❖ Cotman C. W. y L. L. Iversen (1987) Excitatory amino acids in the brain: focus on NMDA receptors. *Trends in Neurosci.*, 10: 263-265.
- ❖ Cotman C. W., D. T. Monaghan, O. P. Ottersen y J. Storm-Mathisen (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends in Neurosci.*, 10: 273-280.
- ❖ Dowling J. E. (1970) Organization of vertebrate retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 9: 655-680.
- ❖ Fage D., C. Voltz, B. Scatton y C. Carter (1992) Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation *in vivo*. *J. Neurochem.*, 58: 2170-2175.
- ❖ Fage D., C. Voltz, y C. Carter (1993) Ouabain releases striatal polyamines *in vivo* independently of N-methyl-D-aspartate receptor activation. *J. Neurochem.*, 61 (1): 261-265.
- ❖ Forsythe J. D. (1995) Ion channel. A physiological function for polyamines?. *Curr. Biol.*, 5(11): 1248-1251.
- ❖ Gasic G. P. y M. Hollmann (1992) Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.*, 54: 507-536.
- ❖ Gilad G. M. y V. H. Gilad (1991) Polyamine uptake, binding and release in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 193: 41-46.
- ❖ Gilbertson T. A., R. Scobey y M. Wilson (1991) Permeation of calcium ions through non-NMDA glutamate channels in retina bipolar cells. *Science.*, 251(5001): 1613-1615.
- ❖ Gotti B., J. Benavides, E. MacKenzie y B. Scatton (1990) The pharmacology of focal cortical ischaemia in the mouse. *Brain Res.*, 522: 290-307.
- ❖ Harman R. J. y G. G. Shaw (1981) The spontaneous and evoked release of spermine from rat brain *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, 73: 165-174.
- ❖ Heby O. (1981) Role of the polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*, 19: 1-20.

- ❖ Hollmann M., M. Hartley y S. Heinemann (1991)  $Ca^{2+}$  permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Sci.*, 252(5007): 851-853.
- ❖ Hollmann M. y S. Heinemann (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17: 31-108.
- ❖ Ikeda K., M. Nagasawa, H. Mori, K. Araki, K. Sakimura, M. Watanabe, Y. Inoue y M. Mishina (1992) Cloning and expresion of the  $\epsilon 4$  subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Letters.*, 313(1): 34-38.
- ❖ Iqbal Z. y H. Koenig (1985) Polyamines appear to be second messengers in mediating  $Ca^{2+}$  fluxes and neurotransmitter release in potassium-depolarized synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 133: 563-573.
- ❖ Iqbal Z., H. Koenig, A. D. Goldstone, C. Y. Lu y F. Siddiqui (1991) Presynaptic NMDA receptors regulate polyamine synthesis,  $Ca^{2+}$  fluxes, and transmitter release at axon terminals. (*Abstr*) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11 (Suppl), S114.
- ❖ Ishii T., K. Moriyoshi, H. Sugihara. K. Sakurada, H. Kadotani, M. Yokoi, C. Akazawa, R. Shigemoto, N. Mizuno, M. Masu y S. Nakanishi (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.*, 268(4): 2836-2843.
- ❖ Johnson T. D. (1996) Modulation of channel function by polyamines. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 17(1): 22-27.
- ❖ Johnson J. W. y P. Ascher (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurones. *Nature*, 325: 529-531.
- ❖ Kandel E. R., J. H. Schwartz y T. M. Jessell (2000) Principles of Neural Science (fourth edition). *Elsevier. New York.*, 1135 pp.
- ❖ Kleckner N. W. y R. Dingledine (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in xenopus oocytes. *Sci.*, 241(4867): 835-837.
- ❖ Koenig H., A. D. Goldstone y C. Y. Lu (1983) Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. *Nature.*, 305: 530-534.
- ❖ Koenig H., A. D. Goldstone y C. Y. Lu (1989) Polyamines mediate the reversible opening of the blood-brain barrier by the intracarotid infusion of hyperosmolal mannitol. *Brain Res.*, 483: 110-116.
- ❖ Koenig H., A. D. Goldstone, C. Y. Lu y J. J. Trout (1990) Brain polyamines are controlled by N-methyl-D-aspartate receptors during ischemia and recirculation. *Stroke.*, 21: 98-102.
- ❖ Krnjevic K. (1974) Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.*, 54: 418-540.
- ❖ Kuffler S. W. (1953) Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J. Neurophysiol.*, 16: 37-68.

- ❖ Kutsuwada T., N. Kashiwabuchi, H. Mori, K. Sakimura, E. Kushiya, K. Araki, H. Meguro, H. Masaki, T. Kumanishi, M. Arakawa y M. Mishina. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*, 358: 36-41.
- ❖ Laurie D. J. y P. H. Seeburg (1994) Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. *Eur. J. Pharmacol.*, 268(3): 335-345.
- ❖ Lombardi G., F. Moroni y F. Moroni (1994) Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. *Eur. J. Pharmacol.*, 271(2-3): 489-495.
- ❖ López-Colomé A. M. y M. Romo de vivar (1991) Excitatory amino acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina. *Glia*, 4: 431-439.
- ❖ López-Colomé A. M. y F. Somohano (1992) N-methyl D-aspartate receptors in the retina: 3-[(±)-2-carboxypiperazin-4-YL]-propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies. *Neuropharmacol.*, 31: 577-584.
- ❖ MacDermott A. B., M. L. Mayer, G. L. Westbrook, S. L. Smith y J. L. Barker (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321: 519-522.
- ❖ Maple B. R. y W. S. Werblin (1991) Glutamate receptor subtypes in off-center bipolar cells. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 17: 1013.
- ❖ Massey S. C. (1990). Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. In *progress in Retinal Research.*, vol. 9 . Osborne N. and Chader J. pp. 399-425.
- ❖ Mayer M. L., M. Benveniste, D. K. Patneau y Jr. L. Vyklicky (1992) Pharmacologie properties of NMDA receptors. *Ann. Acad. Sci.*, 648: 194-204.
- ❖ Mayer M. L. y G. L. Westbrook (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.*, 394: 501-527.
- ❖ McCulloch J., R. Bullock y G. M. Teasdale (1991). Excitatory amino acid antagonists: opportunities for the treatment of ischaemic brain damage in man, in Excitatory amino acid antagonists. *Blackwell, Oxford (Meldrum B. S., ed.)*, 287-326p.
- ❖ Meguro H., H. Mori, K. Araki, E. Kushiya, T. Kutsuwada, M. Yamazaki, T. Kumanishi, M. Arakawa, K. Sakimura y M. Mishina (1992) Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cDNAs. *Nature*, 357: 70-74.
- ❖ Michaelis E. K. (1998) Molecular Biology of glutamate in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. In Neurobiol.*, 54: 369-415.
- ❖ Miller R. F. y M. M. Slaughter (1986) Excitatory amino acid receptor of the retina: Diversity of subtypes and conductance mechanisms. *Trends in Neurosci.*, 9: 211-218.

- ❖ Monaghan D. T., R. J. Bridges y C. W. Cotman (1989) The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29: 365-402.
- ❖ Monyer H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann y P. H. Seeburg (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Sci.*, 256: 1217-1221.
- ❖ Moriyoshi K., M. Masu, T. Ishii, R. Sigemoto, N. Mizuno y S. Nakanishi (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354: 31-36.
- ❖ Nathans J. (1987) Molecular biology of visual pigments. *Ann. rev. Neurosci.*, 10: 163-194.
- ❖ Nawy S. y C. E. Jahr (1990) Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature*, 346: 269-271.
- ❖ Newman E. A. (1985) Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature.*, 317: 809-811.
- ❖ Newman E. y A. Reichenbach (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosci.*, 19: 307-312.
- ❖ Nicholls D. y D. Attwell (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends in Pharmacol. Sci.* 11: 462-468.
- ❖ Nicholls J. G., A. R. Martin y B. G. Wallace (1992) From Neuron to Brain. *Third edition. Sinauer Associates, inc. Massachusetts, USA.* 807p.
- ❖ Nicolas C., D. Fage y C. Carter (1994) NMDA receptors with different sensitivities to magnesium and ifenprodil control the release of [<sup>14</sup>C]acetylcholine and [<sup>3</sup>H]-spermidine from rat striatal slices *in vitro*. *J. Neurochem.*, 62(5): 1835-1839.
- ❖ Nowak L., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbert y A. Prochiantz (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307: 462-465.
- ❖ Paschen W., G. Rohn, C. O. Meese, B. Djuricic y R. Schmidt-Kastner (1988) Polyamine metabolism in reversible cerebral ischemia: Effect of alpha-fluoromethylornithine. *Brain Res.*, 453: 9-16.
- ❖ Phillis J. W. (1970) The pharmacology of synapses. *Oxford, Pergamond Press.* 1-358p.
- ❖ Powis D.A., T. A. Anderson, H. Jackson y G. D. Wattus (1983) Stimulation of neuronal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase by calcium. *Biochem Pharmacol.* Apr 1;32(7):1219-1227.
- ❖ Raina A., L. R. Pajula y T. Eloranta (1976) 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.

- ❖ Raiteri M., F. Cerrito, A. M. Cervoni y G. Levi (1979) Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208: 195-202.
- ❖ Ransom R. W. y N. L. Deschenes (1990) Polyamines regulate glycine interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Synapse*, 5: 294-298.
- ❖ Ransom R. W. y N. L. Stec (1988) 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.
- ❖ Rasmussen K. E. (1974) The Müller cell: a comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.*, 19: 243-257.
- ❖ Robinson S. R. y Z. Dreher (1990) Müller cells in adult rabbit retinae: Morphology, distribution and implications for functions and development. *J. Comp. Neurol.*, 292: 178-192.
- ❖ Rock D. M. y R. L. Macdonald (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 463-482.
- ❖ Rodríguez-Contreras A., F. Calderón y A. M. López-Colomé (1998) Strychnine-insensitive [<sup>3</sup>H]-glycine binding to synaptosomal membranes from the chick retina. *Int. J. Devl. Neurosci.* 16: 413-421.
- ❖ Romano C., K. Williams y P. B. Molinoff (1991) Polyamines modulate the binding of [<sup>3</sup>H]-MK-801 to the solubilized N-methyl-D- aspartate receptor. *J. Neurochem.* 57: 811-818.
- ❖ Sacaan A. I. y K. M. Johnson (1989) Spermine enhances binding to the glycine site associated with the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Mol. Pharmacol.* 36: 836-839.
- ❖ Schnapf J. L. y D. A. Baylor (1987) How photoreceptor cells respond to light. *Sci. American*, 256: 40-47.
- ❖ Schoepp D. D. y P. J. Conn (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 14:13-20.
- ❖ Scott R. H., K. G. Sutton y A. C. Dolphin (1993) Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends in Neurosci.*, 16: 153-160.
- ❖ Seiler N. y U. Lamberty (1975) Interrelations between polyamines and nucleic acids: changes of polyamines and nucleic acid concentrations in developing rat brain. *J. Neurochem.*, 24: 5-13.
- ❖ Seiler N. (1981) Polyamine metabolism and function in brain. *Neurochem. Intl.* 3: 95-110.
- ❖ Shaw G. G. y A. J. Paterman (1973) The regional distribution of the polyamines spermidine and spermine in brain. *J. Neurochem.*, 20: 1225-1230.
- ❖ Shaw G. G. (1979) The polyamines in the central nervous system. *Biochem. Pharmacol.*, 28(1): 1-6.

- ❖ Shaw G. G. (1994) Polyamines as neurotransmitters or modulators, in *The Neuropharmacology of Polyamines* (Carter C., ed), *Academic Press, San Diego*, pp. 61-80.
- ❖ Sparapani M.; M. Virgili; M. Caprini; F. Facchinetti; E. Ciani y A. Contestabile (1996) Effects of gestational or neonatal treatment with alpha-difluoromethylornithine on ornithine decarboxylase and polyamines in developing rat brain and on adult rat neurochemistry. *Exp. Brain Res.*, 108: 433-440.
- ❖ Sweadner K. J. y R. C. Gilkeson (1985) Two isozymes of the Na, K-ATPase have distinct antigenic determinants. *J. Biol. Chem.* 260: 9016-9022.
- ❖ Szatkowsky M., B. Barbour y D. Attwell (1990) Non vesicular release of glutamate from glial cells by reverse electrogenic glutamate uptake. *Nature*, 348: 443-446.
- ❖ Tabor C. W. y H. Tabor (1984) Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.*, 53: 749-790.
- ❖ Thoreson B. y R. F. Miller (1991) Two different excitatory amino acid receptor in on-bipolar of the Mudpuppy retina. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 17: 1013.
- ❖ Virgili M., M. Sparapani, F. Facchinetti, E. Ciani, R. Dall' Olio y A. Contestabile (1992) *In vitro* and *in vivo* evidence for spermine and spermidine neurotoxicity. *Neurodegeneration*, 1: 273-279.
- ❖ Watkins J. C., P. Krosggaard-Larsen y T. Honoré (1990) Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 11: 25-33.
- ❖ Westerink B. H., C. G. Damsma y J. B. De Vries (1989) Effect of ouabain applied by intrastriatal microdialysis on the *in vivo* release of dopamine, acetylcholine, and amino acids in the brain of conscious rats. *J. Neurochem.*, 52: 705-712.
- ❖ Williams-Ashman H. G. y Z. N. Cannellakis (1979) Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspec. in Biol. Med.*, 22: 421-453.
- ❖ Williams K. (1995) Pharmacological properties of recombinant *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors containing the  $\epsilon$ 4 (NR2D) subunit. *Neurosci. Lett.* 184(3): 181-184.
- ❖ Williams K., C. Romano, M. A. Dichter y P. B. Molinoff (1991) Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.*, 48: 469-498.
- ❖ Williams K., A. M. Zappia, D. B. Pritchett, Y. M. Shen y P. B. Molinoff (1994) Sensitivity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol. Pharmacol.*, 45: 803-809.
- ❖ Wisden W. y P. H. Seeburg (1993) Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Op. Neurobiol.*, 3(3): 291-298.
- ❖ Wroblewski J. T. y W. Danysz (1989) Modulation of glutamate receptors: molecular mechanisms and functional implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29: 441-474.

- ❖ Yoneda Y., K. Ogita, R. Enomoto, T. Suzuki y S. Kito (1991) Identification and characterization of specific binding sites of [<sup>3</sup>H]-spermidine in synaptic membranes of rat brain. *Brain Res.*, 563: 17-27.
- ❖ Young A. B. y G. E. Fagg (1990) Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 11: 126-133.