

11281
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**La espermina como posible neuromodulador de la
transmisión excitadora en la retina de pollo**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A

Froylan Calderón de Anda

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Ana María López Colomé**

**Comité Tutorial:
Dr. J. Adolfo García Sainz
Dr. Mario Calcagno Montans**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Elsa, por lo que ha sido, es y será

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. La investigación fue parcialmente financiada por el CONACYT (proyecto 31812-N) y dos donativos de la DGEP, UNAM (PAEP 1999-201316, PAEP 2001-102307). Además se contó con una beca de estudios de Doctorado otorgada por el CONACYT y la DGEP, UNAM (agosto 1997 a junio 2002).

El Comité Tutorial estuvo conformado por los Doctores J. Adolfo García Sainz, Mario Calcagno Montans y Ana María López Colomé.

Los Doctores Miguel Pérez de la Mora, Ana María López Colomé, Arturo Ortega Soto, Miguel Morales Mendoza, Enrique Soto Eguibar, Laura Escobar Pérez y Clorinda Arias Alvarez, revisaron críticamente este documento y conformaron el Jurado de Examen de Grado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos

A Elsa, mi esposa, porque me ha enseñado a ver las cosas con entusiasmo... por todo.

A mis padres y familia, por su constante apoyo.

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

A los miembros del Jurado y Comité Tutoral, por sus comentarios y sugerencias.

A mis cuates, por lo que hemos compartido.

A mis compañeros de laboratorio, por su paciencia.

A el "puma", por la diversión de hacer "bloqueo" ahí.

A las montañas, por esa pasión que despiertan en mi. *"No es mas rico el que mas tiene sino el que menos necesita"*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Abreviaturas.....	3
I. Resumen.....	4
II. Introducción	
a) El glutamato como neurotransmisor excitador.....	5
b) Función de las poliaminas en la neurotransmisión excitadora.....	10
c) Neurotransmisión excitadora en la retina.....	17
d) Localización y función de las poliaminas en la retina.....	23
III. Objetivos.....	25
IV. Materiales y Métodos	
a) Unión específica de espermina ^[3H] a membranas sinaptosomales de la retina de pollo.....	26
b) Unión específica de glicina ^[3H] a membranas sinaptosomales de la retina de pollo.....	28
c) Liberación de espermina ^[3H] de la retina de pollo.....	30
d) Captura de espermina ^[3H] en la retina de pollo.....	31
V. Resultados (artículos)	
a) [³ H]Spermine binding to synaptosomal membranes from the chick retina.	
b) Spermine inhibits [³ H]glycine binding at the NMDA receptors from plexiform layers of chick retina.	
c) Calcium-independent release of [³ H]spermine from chick retina.	
d) Captura de espermina ^[3H] en la retina de pollo.....	44

VI. Discusión

a) Características de los sitios de unión de espermina a membranas sinaptosomales de la retina de pollo.....	49
b) Efecto de la espermina sobre la interacción de la glicina con el sitio del coagonista de los receptores de NMDA de membranas sinaptosomales de la retina de pollo.....	50
c) Mecanismos de liberación de espermina[³H] de la retina de pollo.....	52
d) Mecanismos de captura de espermina[³H] en la retina de pollo.....	54
VII. Discusión general.....	57
VIII. Conclusiones.....	58
IX. Literatura citada.....	59

ABREVIATURAS

ACPC=Ácido 1-amino ciclopropil carboxílico

AMPA=Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico

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

DFMO= α -Difluorometilornitina

DET=Dietilentriamina

EDTA=Ácido etilen-diamino-tetra acético

GABA=Ácido γ -amino butírico

GluR=Receptores ionotrópicos de tipo AMPA/KA

HEPES=Ácido N(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico)

KA=Kainato

KRB=Amortiguador Krebs Ringer Bicarbonato

MK-801= Maleato de dizocilpina

mGluR=Receptor metabotrópico glutamatérgico

NMDA=Ácido N-metil-D-aspartico

ODC=Ornitina descarboxilasa

P₁, P₂=Capas plexiformes externa e interna de la retina

PA=Poliaminas

PCP=Fenilciclidina

PI=Fosfatidil inositol

PIP₂=Fosfatidil inositol bifosfato

PLC=Fosfolipasa C

R1,R2=Subunidades del receptor NMDA

SDS=Duodecil sulfato sódico

SN=Sistema nervioso

SNC=Sistema nervioso central

TM=Transmembranal

Tris=Tris (hidroxi-metil) amino metano

I. RESUMEN

Las poliaminas (PA), particularmente la espermina y la espermidina, intervienen en fenómenos de proliferación y diferenciación en diversos tipos celulares. Recientemente se ha propuesto que, adicionalmente, las PA podrían tener funciones específicas en el sistema nervioso central (SNC) como moduladores de la neurotransmisión, a través de su interacción con los receptores de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Se ha demostrado que tanto la espermina como la espermidina producen diferentes efectos sobre la actividad de los receptores NMDA, que dependen de la concentración de la glicina, coagonista del glutamato, así como de variaciones en el potencial eléctrico de la membrana. Estos resultados han llevado a proponer la existencia de múltiples sitios de interacción para las PA en los receptores mencionados.

Los receptores de NMDA en la retina difieren de los del SNC en sus características farmacológicas y bioquímicas, así como en su modulación por las PA. En el SNC, la espermina, a través de su interacción con sitios específicos, estimula la unión de la glicina al sitio del coagonista en el receptor de tipo NMDA, mientras que en la retina, este trabajo demostró que la espermina inhibe dicha unión a través de una interacción no-competitiva.

Además de la presencia de receptores específicos, otro requisito para postular a las PA como sustancias neuroactivas, es su liberación al espacio extracelular a través de mecanismos regulados por la actividad sináptica. A este respecto, se ha demostrado que en el SNC tanto la activación de los receptores de NMDA como la actividad inversa de las proteínas transportadoras de PA, inducen la liberación de las mismas en el estriado y la corteza. En este trabajo, se demostró que en la retina, a diferencia del SNC, las PA se liberan por despolarización inespecífica con 50 mM de KCl de manera independiente de calcio extra e intracelular. Asimismo, se demostró que el sistema de captura de PA en la retina no requiere energía procedente de la síntesis de ATP o de un gradiente electroquímico.

Sumados a los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo, los datos de este estudio refuerzan la idea de que tanto los receptores de glutamato como la regulación de la neurotransmisión glutamatérgica en la retina difieren de los del SNC.

II. INTRODUCCIÓN

El glutamato como neurotransmisor excitador

El glutamato se considera como el transmisor excitador más importante en el SNC. Su interacción con receptores específicos en la membrana sináptica genera la despolarización de la misma a través de diversos mecanismos. Los receptores de glutamato se subdividen, de acuerdo con su mecanismo de acción, en ionotrópicos y metabotrópicos (Figura 1). Los ionotrópicos son proteínas tetraméricas que forman un canal catiónico inespecífico permeable al Na^+ , al K^+ o, al Ca^{2+} . Los receptores metabotrópicos son proteínas monoméricas acopladas, a través de proteínas G (que unen GTP), a la activación de la fosfolipasa C y a la hidrólisis consecuente del fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2) de la membrana, o bien, a la inhibición o la activación de la adenilil ciclasa (1). Los receptores ionotrópicos se subdividen en: los de N-metil-D-aspartato (NMDA), y los α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA)/Kainato (KA), de acuerdo con su agonista más potente. Los receptores de NMDA principalmente son permeables al Ca^{2+} mientras que los de AMPA/KA al Na^+ .

Funcionalmente, la activación de los receptores de AMPA/KA genera una respuesta rápida y de corta duración, que no depende del voltaje. La activación de los receptores de tipo NMDA es lenta, de larga duración, y requiere de una despolarización previa, dado que en condiciones fisiológicas el canal del receptor está bloqueado por Mg^{2+} (2).

Se conocen 9 subunidades de los receptores ionotrópicos de tipo AMPA/KA (GluR). Estas subunidades poseen cuatro segmentos transmembranales (TM), el segundo de los cuales no atraviesa la membrana plasmática, por lo que el carboxilo terminal es intracelular y el amino, extracelular. Las cadenas proteicas de los GluR se

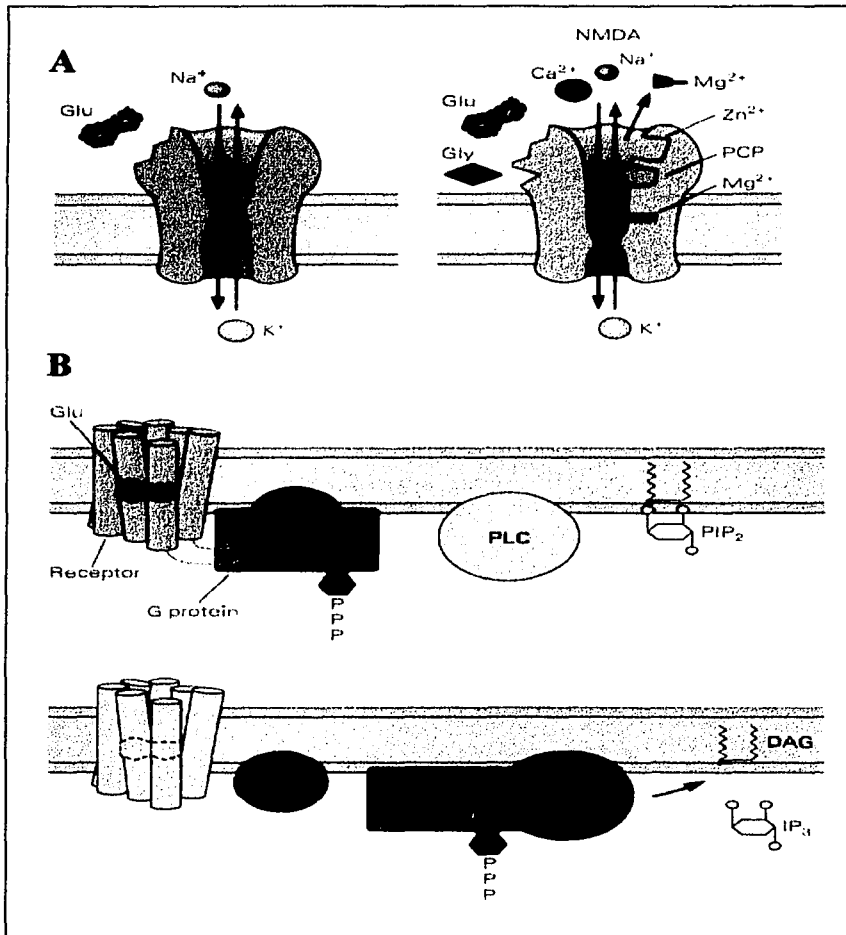


Figura 1. Esquema que representa los diferentes tipos de receptores para glutamato (Glu). Los receptores para glutamato se subdividen de acuerdo con su mecanismo de acción en: **A** ionotrópicos y **B** metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos se subdividen a su vez en: NMDA y AMPA/KA. Los receptores de NMDA forman un canal permeable al Ca^{2+} , Na^+ y al K^+ , y tienen sitios de unión para glicina (Gly), poliaminas, Zn^{2+} , fenilciclidina (PCP), maleato de dizocilpina (MK-801) y Mg^{2+} . Los receptores de AMPA/KA forman canales permeables preferentemente al Na^+ y al K^+ . Los receptores metabotrópicos están acoplados a una proteína G, que a su vez modula a la fosfolipasa C (PLC) la que hidroliza fosfatidil inositol bifosfato (PI) generando diacilglicerol (DAG) y 1-4-5 inositol trifosfato (IP_3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

agrupan por la homología entre ellas y por su afinidad por AMPA o KA. Los GluR1 a GluR4, tienen un alto grado de similitud entre ellos, alta afinidad por el AMPA y baja por el KA, mientras que los GluR5 a GluR7, tienen un alto grado de similitud entre ellos pero no así con los de la otra serie, tienen baja afinidad por AMPA y una afinidad moderada por el KA (3,4). Posiblemente las subunidades GluR5-7 forman parte, junto con dos subunidades a las que se ha denominado KA1 y KA2, de los receptores de tipo KA (5).

La subunidad GluR2 de los receptores AMPA/KA, determina las propiedades de permeabilidad y de conductancia del canal catiónico. En esta subunidad, en el segundo segmento TM, un residuo de arginina sustituye a una glutamina que poseen las otras subunidades de GluR. Los receptores AMPA (GluR1-4) tienen dos configuraciones, "flip" y "flop", producto de la modificación postranscripcional de un segmento de 9-11 aminoácidos que sigue al TM4. Estas configuraciones difieren en las propiedades farmacológicas y cinéticas de las corrientes iónicas inducidas por L-glutamato y AMPA, pero no por KA, y se expresan de manera diferencial en el tiempo y en el espacio (3,4).

Los receptores de glutamato del tipo NMDA están ampliamente distribuidos en el SNC. Se sugiere que son proteínas tetraméricas (6), formadas por tres tipos de subunidades: la NMDAR1 (R1), la NMDAR2 (R2), y la NMDAR3 (R3) que tienen cuatro dominios TM en la misma posición que los receptores de tipo AMPA/KA. La expresión de las subunidades que conforman a los receptores de NMDA en sistemas heterólogos, demostró que los receptores homoméricos de subunidades R1 tienen menor actividad que los receptores NMDA *in vivo*, lo que sugiere que, estos últimos son heteroméricos (4,7,8,9,10).

La familia R1 se compone de ocho subunidades que se generan por el empalme alternativo del mRNA del gen (R1a-h) (3,4,7). La familia R2, comprende 4 subunidades codificadas por genes diferentes (R2A-D) (3,4,7). La combinación diferencial de subunidades de las dos familias confiere a los receptores propiedades farmacológicas que corresponden, *in vivo*, a diferentes regiones del SNC (7), así como a diferentes etapas del desarrollo (7,11,12). La subunidad R1 le confiere al receptor sus propiedades básicas, y la subunidad R2 funciona como una estructura moduladora (3,4,7). La inclusión de subunidades R3 en los receptores de tipo NMDA inhibe la actividad de los mismos (13).

Se han identificado cinco sitios de reconocimiento en los receptores de NMDA: para el glutamato, que actúa como neurotransmisor, para el coagonista glicina, para el Mg^{2+} , para bloqueadores de canal abierto y para el Zn^{2+} . Asimismo, las PA, como la espermina y la espermidina, modulan la actividad del receptor a través de varios sitios de unión, como ya se explicará mas adelante (14,15,16,17,18). El Zn^{2+} reduce el tiempo de apertura del canal de los receptores de NMDA posiblemente porque inhibe de forma alostérica, un sitio sensible a PA encargado de regular la frecuencia de apertura del canal (19). En estado de reposo el canal está bloqueado por el Mg^{2+} ; la despolarización induce la salida del Mg^{2+} , y permite así una corriente principalmente de Ca^{2+} . Es importante mencionar que la sustitución de una asparagina por una glutamina en el segundo dominio TM de las subunidades R1 y R2 regula, respectivamente, la permeabilidad al Ca^{2+} , y el bloqueo por Mg^{2+} (18).

La composición heteromérica de los receptores de NMDA es motivo de controversia. Wafford *et al.* (20) proponen que dichos receptores podrían incluir tres tipos de subunidades, una R1 y dos variantes de la R2, contrario al esquema previo de

una estructura heteromérica formada por la subunidad R1 y una sola variante de la subunidad R2.

Existe evidencia de que el sitio de unión de la glicina y sus antagonistas se localiza en la subunidad R1a, mientras que para la formación de los sitios de unión para el glutamato y sus antagonistas así como para bloqueadores de canal como el maleato de dizocilpina (MK-801), se requiere de las subunidades R1a y R2A (21). Estos resultados, sin embargo, son muy particulares, ya que no se hizo un estudio más amplio con todas las subunidades que se han descrito. Asimismo, se demostró la formación de un canal y de sitios de unión para agonistas del glutamato en receptores homoméricos constituidos por subunidades R1 (22). Estas contradicciones podrían derivar del uso de diferentes tipos celulares que en cada caso se emplearon para la expresión heteróloga de las subunidades (22).

Respecto a la función de la espermina y espermidina sobre la actividad de los receptores NMDA, se propone que para que el receptor forme sitios de reconocimientos para estas moléculas se requiere de las subunidades R1a y alguna R2 (21). Guylaine *et al.* (23) demostraron que la espermina modula los receptores homoméricos R1 cuando el RNA que codifica para las subunidades de esos receptores pierde un inserto en el extremo 5', por el proceso de empalme alternativo. La ausencia del exón cinco en el RNA que codifica para la subunidad R1 expone un sitio en la proteína a través del cual los protones inhiben la corriente entrante activada por glutamato (24); este efecto se revierte por PA. Asimismo, se ha propuesto que se requiere de la inclusión de una variante de las subunidades R1, como la R1a, en los receptores heteroméricos para que la espermina aumente la corriente activada por glutamato en estos receptores, pero la manifestación de esta estimulación está controlada, diferencialmente, por el tipo de subunidad R2 (17).

Se conocen ocho subunidades de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), codificadas por genes diferentes, y dos variantes post-transcripcionales de la subunidad mGluR1. Los mGluRs tienen siete segmentos TM y un dominio amino terminal extracelular considerablemente largo (25). Los mGluR 1 y 5 están acoplados a la fosfolipasa C (PLC) y la cascada del fosfatidil inositol (PI). Los mGluR 2, 3, 4, 6, 7 y 8 están acoplados a la inhibición de la adenilil ciclasa mientras que la variante mGluR1a se acopla a la activación de ésta ciclasa. Hay evidencia de que estos receptores están involucrados con la estimulación de la síntesis de óxido nítrico, así como con la activación de protooncogenes y la modulación de canales iónicos (1,25).

Función de las poliaminas en la neurotransmisión excitadora

Las PA endógenas como la putrescina (diaminobutano) y sus derivados espermidina y espermina, son policationes presentes en todas las células, en las que interactúan con moléculas cargadas negativamente como son algunas proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos.

En los mamíferos, la putrescina se forma exclusivamente por la descarboxilación de la ornitina mediante la ornitina descarboxilasa (ODC), mientras que la espermidina deriva de la putrescina por la actividad de la espermidina sintasa, que transfiere a la putrescina un grupo propilamina procedente de la adenosilmetionina. La adición de otro grupo propilamina a la espermidina por medio de la espermina sintasa produce espermina (Figura 2); estas reacciones son reversibles. La ODC requiere de fosfato de piridoxal, mientras que las dos aminopropiltransferasas (espermidina sintasa y espermina sintasa) no requieren de esta coenzima. El paso limitante en la biosíntesis de espermidina y espermina es la transformación de la ornitina en putrescina por la ODC, por lo que los niveles

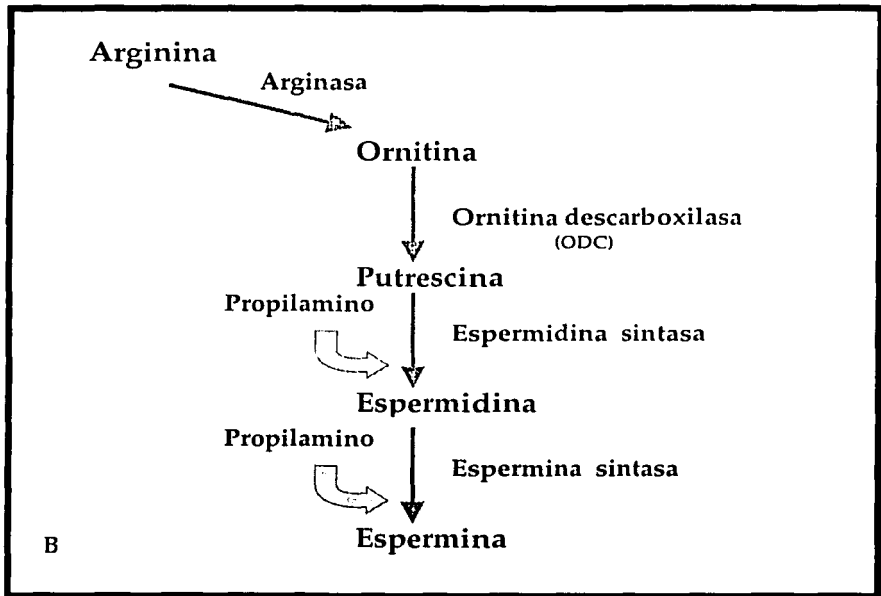
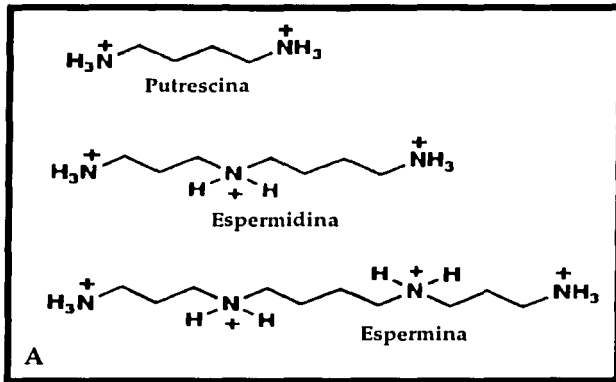


Figura 2. A) Estructura química de la putrescina, espermidina y espermina. B) Ruta metabólica para la síntesis de poliaminas endógenas en las células de mamíferos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

intracelulares de estas moléculas dependen de la concentración y actividad de dicha enzima.

La espermina y la espermidina se han relacionado con fenómenos, como el crecimiento celular y la replicación (26) debido a que, *in vitro*, las PA modulan a la RNA polimerasa II, estimulan la unión del mRNA y el aminoacil tRNA a los ribosomas, y estimulan la acetilación y fosforilación de histonas. Esto sugiere un papel multifuncional de las PA en la replicación, transcripción y traducción de la información genética (26). A este respecto, existe evidencia de la participación de las PA en el crecimiento de tumores, ya que hay un incremento en la formación de putrescina y espermidina en gliomas (26). Por lo anterior está en estudio la síntesis de inhibidores específicos de la biosíntesis de estas moléculas, que favorecen el cese de la proliferación celular, al detener el ciclo celular en la fase G1 (26). En el SNC, se ha propuesto que la espermina y espermidina podrían funcionar como neuromoduladores o neurotransmisores (18,26).

La espermina se concentra en estructuras del SNC ricas en neuronas, en tanto que la espermidina y la putrescina se concentran en la materia blanca, la médula espinal y los nervios periféricos (26). Seiler y Lamberty (27) observaron que el nivel de putrescina es alto durante el desarrollo del SNC; acorde con esto Williams-Ashman y Canellakis (28), así como Jänne *et al.* (29), demostraron que la ODC alcanza un máximo de actividad en el cerebro durante la etapa de mayor proliferación de las células nerviosas. La concentración de las sintetas de espermidina y espermina es mayor en el cerebro que en otros tejidos (30), lo que apoya la idea de que las PA no sólo están involucradas en procesos de crecimiento y replicación celular durante el desarrollo, sino que también podrían participar en la transmisión sináptica en este tejido. Sin embargo, se ha reportado que la concentración de PA en el cerebro es del

mismo orden de magnitud que en otros tejidos (26), por lo que no es posible definir la función de estos compuestos con base en su distribución. Por otra parte Harman y Shaw (31) demostraron, en rebanadas de corteza cerebral de rata, la presencia de dos sistemas de captura de espermina con alta afinidad y características similares a las de los sistemas de transporte para los neurotransmisores noradrenalina y ácido γ -aminobutírico (GABA). Asimismo, se demostró la liberación selectiva de espermina y espermidina del cuerpo estriado de la rata, tanto por la activación de receptores de tipo NMDA como por la actividad inversa del transportador de PA, por lo que la función de estas moléculas como neuromoduladores o neurotransmisores cada vez tiene mayor aceptación (32,33). En el sistema nervioso (SN), la activación de canales de calcio dependientes del voltaje o de ligando, produce un aumento de la concentración de PA (34,35,36). Cuando se inhibe la síntesis de las PA con α -difluorometilornitina (DFMO, inhibidor irreversible de la ornitina descarboxilasa), se inhibe la entrada de calcio a través de canales activados tanto por voltaje como por ligando; esta inhibición se revierte por adición de putrescina (34,36,37,38). Lo anterior evidencia claramente la importancia de estos compuestos en el control de la neurotransmisión.

La espermina y la espermidina interactúan con componentes estructurales de la membrana plasmática, como las proteínas y los fosfolípidos. Esta última interacción estabiliza la membrana (39), posiblemente modulando de manera indirecta la actividad de canales iónicos. También se ha demostrado, como ya se mencionó, que las PA modulan de manera directa la actividad de los receptores de tipo NMDA a través de su interacción con diferentes sitios del mismo, produciendo múltiples efectos. Entre estos efectos se cuentan la "estimulación dependiente de glicina", que consiste en un aumento de la afinidad del receptor por su coagonista, la glicina (15,40), y la "estimulación independiente de glicina", en la que las PA incrementan la

frecuencia de apertura del canal, a concentraciones saturantes de glicina, generando así un aumento de la corriente y de la unión de bloqueadores de canal. Este efecto depende de la concentración de las PA, a bajas concentraciones incrementan la corriente, mientras que a concentraciones elevadas la inhiben, posiblemente porque la espermina y la espermidina actúan como bloqueadores de canal abierto (41). A este respecto, Marvizón y Baudry (42) identificaron dos sitios de unión para las PA en los receptores de tipo NMDA: uno de alta afinidad estimulador, y otro de baja afinidad inhibidor, cuya activación conlleva una disminución tanto de la B_{max} como de la K_d de la unión del MK-801 [3H], lo que demuestra que la espermina no compite por el mismo sitio con este bloqueador de canal abierto. Se propone que el efecto inhibidor del MK-801 y la inhibición por la espermina se producen a través de mecanismos diferentes: bloqueo de canal abierto y decremento de la conductancia del canal por un "apantallamiento" de cargas en la boca del canal, respectivamente (18).

Romano *et al.* (43) han propuesto un modelo de interacción múltiple de las PA con los receptores de NMDA, basándose en el efecto de varios agonistas, antagonistas y agonistas inversos, así como por análisis estructural. Las PA que interactúan con el receptor por medio de tres grupos amino separados 5 Å entre sí funcionarían como agonistas, y las que lo hacen sólo con dos grupos, como antagonistas. Cuando uno de los grupos amino de las PA que interactúan con tres grupos está a 12 Å de los otros dos, actúan como agonistas inversos. A este respecto, Kashiwagi *et al.* (44) demostraron que un residuo de aspartato en la posición D669 de la subunidad R1a está involucrado en el reconocimiento de la espermina, y en relación directa con la estimulación "independiente de glicina" en receptores heteroméricos R1a/R2B, ya que su remoción ocasiona la pérdida de dicho efecto así como la reducción de la inhibición por protones. En este contexto, Masuko *et al.* (45) describen dos dominios

en la subunidad R1 del receptor, denominados R1-R2, que forman dos "lóbulos", en el extremo amino terminal que configuran el sitio de unión de la espermina. Estos dominios son similares a los S1-S2, "cadena abajo", que forman el sitio de unión para la glicina. Mutaciones en estos dominios R1-R2 afectan la inhibición de los receptores producida por ifenprodil (antagonista no competitivo de las PA), la sensibilidad a la estimulación por espermina y la inhibición por protones. Asimismo, se demostró que una región en el extremo amino terminal de la subunidad R2B, y no así en la R2A, determina el incremento de la frecuencia de apertura del canal del receptor por la espermina (46).

Las PA ejercen, adicionalmente, un efecto inhibitor sobre el canal de los receptores NMDA, que depende de la concentración y del voltaje; la inducción de este efecto requiere de altas concentraciones de PA en condiciones hiperpolarizantes (18). Esto último se explica si se considera a la membrana celular como un capacitor, que en condiciones hiperpolarizantes, almacena cargas negativas del lado interior, atrayendo del lado exterior a moléculas con carga positiva, como las PA, lo que ocasionaría un bloqueo del canal del receptor en función de la concentración de las cargas positivas (47). A este respecto, Zheng *et al.* (48) demuestran que tres residuos de asparagina de las subunidades R1 y R2 localizados en el filtro selectivo del canal de estos receptores, son críticos para el bloqueo de canal por espermina y por el bloqueador de canal, fenilciclidina (PCP). Aunque la espermina y la PCP compiten para unirse al receptor, el bloqueo producido por los mismos no es aditivo, lo que sugiere que la espermina impide el acceso de la PCP al canal, a través de su unión al vestíbulo del mismo.

Un aspecto que hasta el momento ha sido poco estudiado, es la posible modulación del sitio de reconocimiento del glutamato en los receptores de NMDA por

las PA. Dicha modulación podría darse a través de un mecanismo análogo al de la modulación del sitio del coagonista por las PA; sin embargo, en receptores formados por subunidades NR1a/NR2B, la espermina no sólo aumenta la apertura del canal y la afinidad del receptor por la glicina, sino que disminuye la afinidad del receptor por el glutamato (49). En estudios recientes, se demostró que cada uno de estos efectos se relaciona con combinaciones oligoméricas específicas (50,51), lo que apoya la existencia de varios sitios de unión para las PA, ubicados en diferentes subunidades de los receptores NMDA.

Otros efectos de las PA incluyen el control de la rectificación en los canales rectificadores entrantes de K^+ (52), la potenciación del efecto despolarizante del kainato (53), la inhibición de la unión de ligandos a los receptores colinérgicos nicotínicos (54), la modulación de la unión de ω -conotoxina a los canales de calcio tipo N (55), la inhibición de los canales de calcio tipo P (56), y la modificación de la actividad de canales aniónicos como el del receptor del GABA (57). El mecanismo a través del cual las PA modulan directa o indirectamente a estas proteínas membranales no se conoce con precisión, pero podría relacionarse con el bloqueo del canal, o bien deberse a una interacción directa con las proteínas de la cara extracelular, o intracelular de la membrana (58,59).

Se ha demostrado la existencia de una alta concentración de sitios relacionados con fosfolípidos de membrana con baja afinidad para las PA en el cerebro de rata (60), así como de sitios de unión específica de espermidina [3H] y espermina [3H] con alta afinidad y baja densidad (61,62). Estos datos permiten postular que las PA podrían actuar como moduladores específicos a través de su interacción con receptores de alta afinidad, o bien, como moduladores “inespecíficos” a través de sitios de baja afinidad en la membrana sináptica.

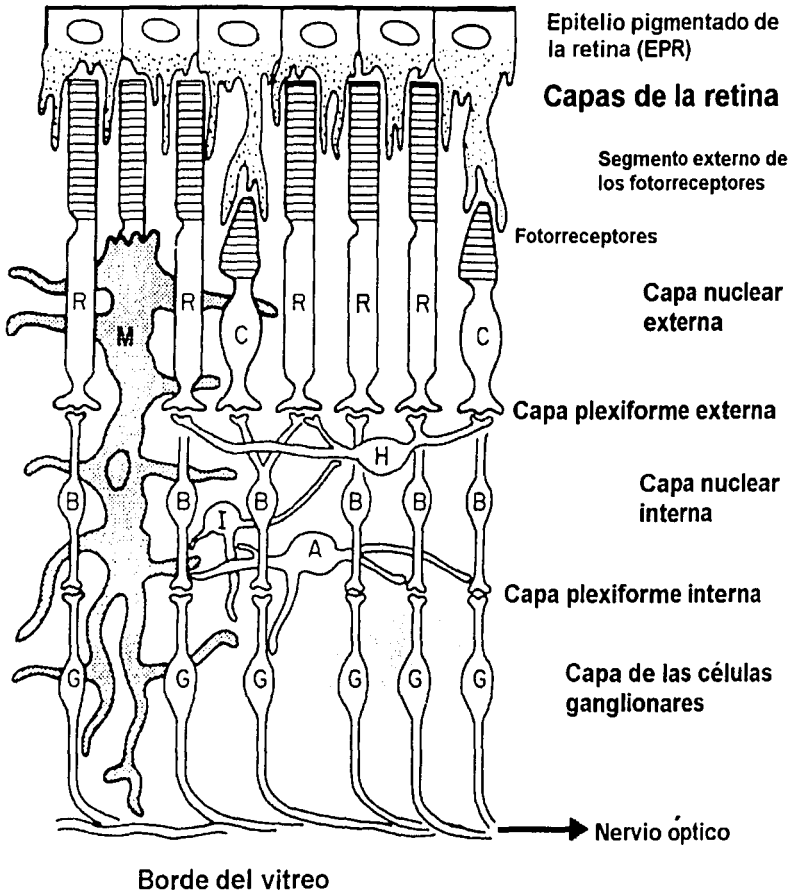
Neurotransmisión excitadora en la retina

La retina es un tejido estratificado en el que existen 5 tipos de neuronas que establecen contactos sinápticos en 2 capas plexiformes (Figura 3). En la capa plexiforme externa, los fotorreceptores (conos y bastones) hacen sinapsis con las células horizontales y bipolares, mientras que en la capa plexiforme interna, las células bipolares forman sinapsis con las células ganglionares y amacrinas, las cuales establecen sinapsis entre ellas. Las terminales axónicas de las células ganglionares forman el nervio óptico.

La retina posee dos tipos de células gliales: los astrocitos, que no difieren en sus funciones de los del SNC, y la glía radial de Müller, que interviene en el mantenimiento del ambiente iónico extracelular controlando la homeostasis del K^+ , en la estratificación durante el desarrollo, y en la eliminación del neurotransmisor durante la transmisión sináptica (63).

La absorción de la luz y su traducción en una señal eléctrica se lleva a cabo en los fotorreceptores. La información visual se transfiere de los fotorreceptores a las células ganglionares por la vía de las células bipolares. Dos tipos de interneuronas (las horizontales y las amacrinas) proveen de entradas laterales a las células bipolares y a las células ganglionares. La absorción de la luz por un pigmento fotosensible (rodopsina) en los fotorreceptores, se traduce en la hidrólisis de GMPc: el pigmento activado estimula una proteína G, transducina, la cual activa a la fosfodiesterasa que cataliza la hidrólisis de GMPc. De esta forma, la luz causa una reducción de la concentración citoplásmica de GMPc. En la obscuridad, el GMPc abre canales de Na^+ que mantienen una corriente despolarizante, por lo que la reducción de GMPc hiperpolariza a los fotorreceptores.

BORDE COROIDAL



Retina de los vertebrados

Diagrama:
diferentes capas
y relaciones
sinápticas.

Tipos
celulares.

R: bastones
C: conos
H: horizontales
B: bipolares
A: amacrinas
G: ganglionares
M: Müller

Figura 3.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para entender cómo se transfiere la información visual de los fotorreceptores hasta las células ganglionares, es necesario introducir el término "campo receptivo". El campo receptivo de una neurona se puede definir como el área de la retina en la cual la actividad de una neurona puede ser influenciada por la luz. De esta forma, el campo receptivo de una célula ganglionar es el área de la retina donde la estimulación con luz de un fotorreceptor causa un incremento o un decremento de la tasa de disparo de la célula ganglionar. Los campos receptivos de las neuronas de la retina son circulares, de tal forma que hay neuronas que responden al centro luminoso y otras alrededor obscuro o centro obscuro y alrededor luminoso. De esto, se derivan dos vías paralelas de transmisión de los fotorreceptores a las células ganglionares, la "on-center" y la "off-center". Las células ganglionares "on-center" se excitan cuando la luz estimula el centro del campo receptivo y se inhiben cuando la luz estimula alrededor. La respuesta opuesta se observa en células ganglionares "off-center". El patrón de conexión sináptica en la retina explica la forma en que las células ganglionares responden a un estímulo luminoso con relación al campo receptivo. Las células bipolares se clasifican asimismo en "on-center" y "off-center". El transmisor liberado de los fotorreceptores (glutamato) excita células bipolares de un tipo e inhibe a células bipolares del otro tipo, debido a que poseen receptores postsinápticos diferentes. En las células bipolares "on-center" el glutamato inhibe canales de Na^+ dependientes de GMPc a través de la activación de receptores metabotrópicos para este aminoácido, mientras que las células bipolares "off-center" tienen receptores ionotrópicos del tipo AMPA/kainato (64). Asimismo, la vía vertical de las interneuronas regula la interacción antagonista entre áreas vecinas. De esta forma, un fotorreceptor que es sensible al área circundante del campo receptivo de las células bipolares, en la obscuridad libera tónicamente glutamato que mantiene a la célula horizontal

despolarizada. En este estado la célula horizontal libera un transmisor inhibitor que mantiene al fotorreceptor del área central del campo receptivo hiperpolarizado. Cuando el fotorreceptor relacionado con el área circundante del campo receptivo de las células bipolares recibe un estímulo luminoso, se hiperpolariza al igual que la célula horizontal conectada a este. Esto se traduce en una disminución de la liberación del transmisor inhibitor de la célula horizontal a los fotorreceptores del campo receptivo central, que resulta en la despolarización de estos fotorreceptores y las células bipolares. De igual forma, si un fotorreceptor relacionado con el campo receptivo central recibe un estímulo luminoso la célula bipolar de este campo receptivo se hiperpolariza.

La existencia de sitios de unión específica para glutamato y aspartato en la retina (65,66) constituye una evidencia de su función como transmisores excitadores en este tejido. Mediante el uso de radioligandos, agonistas o antagonistas de los receptores para glutamato, se demostró la presencia de diferentes tipos de receptores para el mismo en la retina. Se han caracterizado receptores de NMDA y L-aspartato en la retina de bovino (67); en la retina de pollo se demostró la presencia de receptores específicos para los agonistas L-glutamato (67) y AMPA (68) así como para 3-[(±)-2-carboxipiperazin-4-yl] propil-1-fosfonato (CPP; antagonista competitivo del sitio del glutamato de los receptores NMDA) (69). Por otra parte, en la glía de Müller se caracterizó un sitio de unión de alta afinidad para glutamato que corresponde, por sus propiedades cinéticas y farmacológicas, a un receptor metabotrópico (70). Asimismo, se describió en estas células receptores ionotrópicos de glutamato de tipo NMDA y AMPA/KA, acoplados a la hidrólisis de PI (71). Es importante mencionar que en la retina se demostró que los diferentes subtipos de receptores para L-glutamato se

expresan de manera diferencial durante el desarrollo embrionario, paralelamente a cambios farmacológicos que podrían deberse a diferencias en la composición oligomérica de estos receptores (72).

En la retina, los receptores de tipo NMDA tienen propiedades farmacológicas distintas de las descritas en el SNC, lo que sugiere que, en este tejido, la neurotransmisión excitadora difiere de la del SNC. Se sabe que en diferentes áreas del cerebro, el antagonista del sitio de la glicina en los receptores de tipo NMDA, 7-Cl-tiokinurenato, reduce significativamente la pérdida neuronal inducida por isquemia global y focal (73,74), contrario a lo que se ha demostrado en la retina, donde este compuesto no inhibe la unión de glicina [³H] a los receptores de tipo NMDA ni reduce el daño producido por la isquemia (75,76). Existen también diferencias farmacológicas y bioquímicas significativas entre la unión de CPP a membranas procedentes del SNC, y aquellas de la retina (69). Asimismo, la estimulación de la unión de bloqueadores de canal como el MK-801 producida por la glicina en el SNC, es pobre en la retina (77). A diferencia del SNC, en la retina, ni la glicina ni su agonista en los receptores de tipo NMDA, 1-aminociclopropano-carboxilato (ACPC) potencian la neurotoxicidad inducida por la sobrestimulación de los receptores de NMDA, sino que protegen a las neuronas de la misma (77).

Mediante técnicas de inmunocitoquímica, recientemente se demostró la distribución espacial y temporal diferencial de las subunidades que forman a los receptores de tipo NMDA en la retina de rata (78). Los resultados de este estudio indican que todas las subunidades se expresan postnatalmente pero con patrones espaciales diferentes. La subunidad R1 se expresa en todas las células ganglionares independientemente de la edad del desarrollo, así como en las células horizontales en la parte externa de la capa nuclear interna, y en subpoblaciones de células amacrinas

de la parte interna de la capa nuclear interna. En el estado adulto, la subunidad R1 se expresa en las capas plexiformes externa e interna. En esta última aparece en forma de dos bandas. En cuanto a las subunidades R2, todas las células ganglionares, así como algunas poblaciones de células amacrinas expresan a las subunidades R2A y R2B de manera independiente de la edad del desarrollo (78). Durante el desarrollo, las células horizontales expresan tempranamente la subunidad R2B, mientras que la R2A se expresa más tardíamente. En el estado adulto, R2A y R2B aparecen como dos bandas en la capa plexiforme interna, mismas que no colocalizan con la subunidad R1. Es posible que las bandas de expresión de la subunidad R1 correspondan con las vías "on" y "off", mientras que las subunidades R2A y R2B solamente se expresan en la vía "off". La subunidad R2C se localiza en numerosas células en la capa ganglionar y en subpoblaciones de células amacrinas. En etapas tempranas del desarrollo, R2C se localiza en las dendritas de las células ganglionares, pero en estados avanzados sólo se identifica una marca difusa en la capa plexiforme interna. La subunidad R2D se restringe, en estados tempranos del desarrollo, a las células ganglionares y algunas células amacrinas en la capa nuclear interna. En el estado adulto, también se localiza en la capa plexiforme interna. La presencia de la subunidad R1 se ha demostrado también en las células de Müller (78).

Estudios más detallados sobre la localización sináptica de las subunidades que conforman al receptor de tipo NMDA demuestran que en la capa plexiforme interna de la retina de rata, las subunidades se localizan en sitios postsinápticos en dendritas de células ganglionares y de algunas amacrinas relacionadas con la vía de las células bipolares de conos (79). Asimismo, se demuestra que los receptores para NMDA de esta capa plexiforme tienen la siguiente composición heteromérica: R1/R2A, R1/R2B, y en un número menor de sinapsis R1/R2A/R2B. En la capa plexiforme externa, la

subunidad R1 se localizó presinápticamente (79,80), en las terminales sinápticas de conos y bastones. En estas células, se identificó también la subunidad R2B en la unión entre los segmentos externo e interno así como en la terminación del axón (80). Los resultados morfológicos que se mencionan sugieren que en la retina, los receptores presinápticos de NMDA participan en la regulación de la neurotransmisión excitadora, como se demostró en el SNC (81). A este respecto, López-Colomé y Roberts (82) demostraron la regulación de la liberación estimulada de glutamato de la retina por la acción de agonistas, a través de la interacción con receptores presinápticos.

Localización y función de las poliaminas en la retina

La función de las PA en la fisiología de la retina aún no es del todo clara. La degeneración específica de la porción interna de la retina de rata con glutamato, que no afecta a la glia y a los fotorreceptores, demostró que la concentración de espermina endógena no disminuye considerablemente (83). Por el contrario, si se degenera la capa de los fotorreceptores con iodoacetato, disminuye la actividad tanto de la ODC como de la *S*-adenosilmetionina descarboxilasa. Estos resultados sugieren que la síntesis y almacenaje de espermina se concentra en la capa externa o visual de la retina mientras que la concentración de putrescina y espermidina es más homogénea en este tejido. En contraste con estos estudios, mediante el uso de anticuerpos contra espermina/espermidina, Valentino *et al.* (84) localizaron a estas PA en la capa nuclear interna, en células amacrinas, ganglionares desplazadas, y ganglionares de la retina de salamandra. Con esta misma técnica, recientemente se localizó tanto espermina como espermidina y a la ODC casi exclusivamente en las células de Müller (85). La ODC también se identificó en el segmento interno de los fotorreceptores. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el cerebro de rata adulta, que localizan la mayor

inmunoreactividad contra espermina/espermidina en los astrocitos (86). Al parecer las células gliales son las encargadas de liberar al medio extracelular las PA en estos tejidos, aunque en la retina, por la diversidad de datos que se han obtenido no es fácil atribuir una función a estas poliaminas con base en su distribución y más si están involucrados en muchos procesos celulares (26). De esta forma se puede especular que el contenido de espermina en los fotorreceptores o la presencia de la ODC en estas células esta más relacionada con la renovación de los segmentos externos de dichas células que con la neurotransmisión (83).

Se tiene evidencia de que en las aves las PA, como la putrescina y sus derivados, participan en el desarrollo de la retina (87,88). En las primeras etapas del desarrollo, la putrescina es necesaria para la proliferación del tejido y en la diferenciación del segmento externo de los fotorreceptores (87,88). Asimismo, la putrescina, a través de la *N*-acetilputrescina, participa en la síntesis de GABA que tiene una acción trófica en el proceso de maduración de la retina (87,88). Un incremento tardío en la concentración de espermidina y más aun de espermina sugiere que participan en las últimas fases del desarrollo, cuando la retina alcanza la maduración (87,88).

También existen resultados en la retina que apoyan la participación de las PA en la neurotransmisión. Ientile *et al.* (89) demostraron que en la retina, las PA están involucradas en la síntesis de oxido nítrico que depende de la activación de los receptores de NMDA. Esta síntesis de oxido nítrico disminuye considerablemente al inhibir la síntesis intracelular de PA con la DFMO. Aunque se están depletando las pozas intracelulares de PA, es posible que la acción de estas poliaminas sobre los receptores de NMDA sea extracelular. A este respecto, Biedermann *et al.* (85)

demonstraron que en las células de Müller las PA modulan la actividad de los canales de K^+ por la cara extracelular de los mismos.

Por otro lado, Macaione *et al.* (90) encontraron que los niveles de putrescina, espermidina y espermina son elevados en ratones adaptados a la obscuridad, pero hay decrementos significativos cuando se estimula a estos animales con luz. Estos autores también encuentran un mayor contenido de espermidina y espermina en la corteza visual y el cerebelo de ratones adaptados a la obscuridad, pero en ninguna región del cerebro se detectó una disminución en el contenido de estas PA al estimular con luz.

III. OBJETIVOS

Planteamiento del problema

Las PA podrían tener funciones específicas en el SNC como moduladores de la neurotransmisión, a través de su interacción con los receptores de glutamato del tipo NMDA. Se ha demostrado que tanto la espermina como la espermidina producen diferentes efectos sobre la actividad de los receptores NMDA que dependen de la concentración de la glicina, coagonista del glutamato, así como de variaciones en el potencial eléctrico de la membrana. Estos resultados han llevado a proponer la existencia de múltiples sitios de interacción para las PA en los receptores mencionados.

Hipótesis

Dado que en la retina se ha demostrado que los receptores de tipo NMDA tienen características bioquímicas y farmacológicas distintas a las reportadas en el SNC (69,75,77), proponemos que en este tejido la función moduladora de las PA sobre estos receptores es distinta a lo que se ha reportado en el SNC.

Objetivos generales

Se estudiará el efecto de la espermina sobre los receptores de NMDA en la retina de pollo. Asimismo, se pretende caracterizar el posible papel modulador de la espermina sobre la neurotransmisión glutamatérgica en este tejido.

Objetivos particulares

- A) Se caracterizará el sitio de unión de las PA en los receptores de NMDA de las capas plexiformes de la retina de pollo.
- B) Determinar el efecto de las PA sobre la interacción de la glicina con el sitio del coagonista de los receptores NMDA de las capas plexiformes de la retina de pollo.
- C) Analizar los mecanismos de la liberación y captura específicas de las PA en la retina de pollo, con el fin de apoyar su función moduladora en el proceso de neurotransmisión.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

a) Unión específica de espermina [³H] a membranas sinaptosomales de la retina de pollo

Obtención de las membranas

Se enuclearon los ojos de pollos de 1 a 3 días, y se extrajo la retina libre de epitelio pigmentado, en amortiguador Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) (NaCl 118 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1.17 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 5.6 mM; pH 7.4) sobre hielo. Posteriormente, el tejido se homogeneizó en una solución de sacarosa 0.32 M y MgSO₄ 10⁻⁴ M (5.6 g. de tejido/100 ml.) a baja velocidad. El homogeneizado se centrifugó (900 x g, 10 minutos) para obtener en el precipitado las terminales sinápticas (sinaptosomas) de la capa plexiforme externa

(P₁). El sobrenadante se centrifugó a 20,000 x g 20 minutos para aislar los sinaptosomas de la capa plexiforme interna (P₂). Para obtener las membranas, los sinaptosomas se sometieron a un choque osmótico, en 25 volúmenes (con respecto al peso original del tejido) de amortiguador Tris/HCl (50 mM) a pH de 7.4, se homogeneizaron a alta velocidad y se incubaron 15 minutos en hielo. Las membranas se lavaron tres veces resuspendiendo en 25 volúmenes (peso/volumen) de amortiguador Tris/HCl (50 mM) a pH de 7.4, centrifugando 45,000 x g durante 20 minutos. Se almacenaron las membranas a -70 °C durante una semana. Previo al experimento, las membranas se lavaron dos veces en 25 volúmenes del amortiguador Tris/HCl (50mM) a pH de 7.4. Se utilizó el método de Lowry (91) para cuantificar la cantidad de proteínas por experimento.

Curva de saturación, de asociación y experimentos dosis-respuesta

Se incubaron 100-200µg de proteína membranal durante una hora a temperatura ambiente (25°C), con varias concentraciones de espermina [³H] (5-200 nM) en un volumen final de 175µl. Los datos se expresaron como pmol/mg de proteína. La unión no-específica (5-10% de la unión total) se determinó en presencia de 1 mM de espermina no marcada. La reacción se paró por centrifugación durante 2 minutos en una aerofuga Beckman. Posteriormente, las membranas se lavaron dos veces con amortiguador Tris/HCl (50 mM), pH 7.4, frío o agua bidestilada fría para eliminar la espermina [³H] excedente. Las membranas se digirieron en SDS (duodecil sulfato sódico) al 2 % y se cuantificó la radioactividad por espectrofotometría.

La asociación se midió por la unión de espermina [³H] (10 nM) a seis diferentes tiempos entre 2 y 60 minutos. Para los experimentos de dosis-respuesta las membranas se incubaron con espermina [³H] (5-20 nM) en presencia de

concentraciones crecientes de espermina no marcada (1-1000 μM), espermidina (1-1000 μM) o dietilentriamina, antagonista del sitio de las poliaminas en los receptores de NMDA (DET; 50-1000 μM).

b) Unión específica de glicina[^3H] a membranas sinaptosomales de la retina de pollo

Obtención de las membranas

Por un proceso de centrifugación diferencial fue posible separar las fracciones sinaptosomales de las capas plexiformes interna (P_2) y externa (P_1) de retinas libres de epitelio pigmentado, de pollos de 1-3 días de edad. Las fracciones sinaptosomales P_1 y P_2 se resuspendieron en 25 volúmenes (peso/volumen) de amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM a un pH de 7.4, se homogeneizaron a alta velocidad y se incubaron 15 minutos en hielo. De esta manera se sometieron los sinaptosomas a un choque osmótico que permitió obtener las membranas de interés. Ambos homogeneizados se centrifugaron (45,000 x g, 20 minutos) y se guardaron los precipitados a -5°C de 1 a 2 días.

Las membranas se lavaron cinco veces resuspendiendo en 25 volúmenes (peso/volumen) y centrifugando (45,000 x g, 20 minutos), utilizando amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM a pH de 7.4 una vez, seguido de amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM/EDTA 1 mM a un pH de 7.4 dos veces, y por último amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM a un pH de 7.4 dos veces más. Las membranas se congelaron a -70°C de dos a tres semanas. Previo al experimento las membranas se lavaron cuatro veces como ya se describió, usando amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM a un pH de 7.4 para resuspenderlas.

Experimentos dosis-respuesta, curva de saturación y de asociación

Los experimentos dosis-respuesta se hicieron a temperatura ambiente (25 °C) y con un tiempo de reacción de 2 horas, utilizando como radioligandos glicina[³H] a una concentración de 20 nM y concentraciones crecientes del inhibidor respectivo en un volumen final de 0.175 ml de homogenado (70-190 µg de proteína por tubo), cuando la reacción se detuvo por centrifugación (2 minutos en una aerofuga Beckman), o bien de 0.500 ml de homogenado (300-400 µg de proteína por tubo) si la reacción se paró por filtración. Los datos se expresaron como pmolas/mg de proteína. Cuando la reacción se detuvo por centrifugación, se usó SDS al 2 % para digerir el precipitado de los tubos, mientras que con el método de filtración se utilizaron filtros GF/B (marca Whatman) que previamente habían sido tratados durante una hora con polietilenimina al 0.3 % para evitar unión inespecífica a los filtros. Los filtros se lavaron dos veces con amortiguador HEPES 5 mM/Tris 4.5 mM a un pH de 7.4 antes de parar la reacción. Tanto los filtros como los tubos se colocaron en viales con líquido de centelleo para poder cuantificar la radioactividad. Se utilizó el método de Lowry (91) para cuantificar la concentración de proteínas.

Los experimentos de saturación se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C), incubando durante dos horas y deteniendo la reacción por centrifugación durante 2 minutos en una aerofuga Beckman. En estos experimentos se emplearon diferentes concentraciones de glicina[³H] y se añadió glicina no marcada para alcanzar las concentraciones mas elevadas, en un volumen final de homogenado de P₁ ó P₂ de 0.175 ml. La unión inespecífica se determinó con 1 mM del ligando no marcado. Los experimentos se hicieron en presencia y ausencia de 100 µM de espermina, para determinar que tipo de modulación ejerce esta policatión sobre el sitio de la glicina.

Para los experimentos de asociación se midió la unión de glicina^[3H] a una concentración de 20, 60 y 100 nM con respecto al tiempo, en un volumen final de homogenado de P₁ ó P₂ de 0.175 ml. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente (25 °C) y se paró por centrifugación durante 2 minutos en una aerofuga Beckman a distintos tiempos en un intervalo de 2 a 203 minutos. Estos experimentos se realizaron en presencia y ausencia de espermina 50 µM. La unión inespecífica se determinó con 1 mM de glicina no marcada.

c) Liberación de espermina^[3H] de la retina de pollo

Se aislaron retinas libres de epitelio pigmentado de pollos de 1-4 días de nacidos y se incubaron durante 60 minutos a 37°C en amortiguador KRB, pH 7.4, que contenía 1 µCi/ml de espermina^[3H]. Las retinas se colocaron en las cámaras de un sistema de perfusión continua y se superfundieron con amortiguador KRB oxigenado o KRB sin Na⁺, Ca²⁺ o Mg²⁺ a una velocidad de 0.5 ml/min. Se colectaron fracciones de seis minutos. El NMDA y otras drogas se incluyeron en el medio durante 18-24 minutos, 42 minutos después de comenzar la colecta. Los antagonistas se adicionaron al medio 42 minutos antes de incluir el agonista y se removieron a la par del estímulo. El medio libre de Na⁺ se preparó reemplazando el NaCl por cloruro de colina (118 mM) y el NaHCO₃ por Tris/HCl (0.1 M), pH 7.4. La radioactividad de las fracciones colectadas y la remanente del tejido solubilizado (1ml NaOH 1N) se cuantificó por espectrofotometría empleando líquido de centelleo. Los resultados se expresaron como factor de liberación, que equivale a la tasa fraccional de radioactividad liberada por unidad de tiempo, con respecto al total de la radioactividad.

d) Captura de espermina^[3H] en la retina de pollo

Se aislaron retinas libres de epitelio pigmentado de pollos de 1-4 días de nacidos y se incubaron con espermina^[3H] durante 10-30 minutos a 37°C en amortiguador KRB, pH 7.4. Se Paró la captura pasando las retinas a amortiguador KRB sin espermina^[3H] durante un minuto. Posteriormente se homogeneizó el tejido en agua bidestilada y se cuantificó la radioactividad por espectrofotometría empleando líquido de centelleo. Se utilizó el método de Lowry (91) para cuantificar la cantidad de proteínas por experimento.

En los experimentos de saturación de la captura, se incubó el tejido durante 10 minutos en amortiguador KRB que contenía concentraciones crecientes de espermina^[3H] (2.5-200nM). Las soluciones mas concentradas se completaron con espermina no marcada. Asimismo, se midió la captura de este polición con respecto a la temperatura (37°C y 4°C) y el tiempo, para ello se paró la captura a distintos tiempos en un intervalo de 2 a 60 minutos.

Se determinó la dependencia iónica de la captura de espermina^[3H]. El medio libre de Na⁺ se preparó reemplazando el NaCl por cloruro de colina (118 mM) y el NaHCO₃ por Tris/HCl (0.1 M), pH 7.4. En el medio libre de Cl⁻ se reemplazó el NaCl por gluconato de sodio (118 mM), el KCl por gluconato de potasio (4.7 mM) y el CaCl₂ por gluconato de calcio (2.5 mM).

La dependencia energética de la captura se probó incubando las retinas 15 minutos con los inhibidores metabólicos: dinitrofenol (2 mM), iodoacetato (2 mM), cianuro de potasio (2 mM) y ouabaina (1 mM). Posteriormente, se agregó la espermina^[3H] (12.5 nM) y se incubó 20 minutos el tejido.

Para estudiar el efecto del pH extracelular en la captura de espermina se preparó amortiguador KRB a distintos valores de pH y se incubaron las retinas

durante 10 minutos en estos medios modificados con 12.5 nM de espermina^[3H]. Para el amortiguador KRB a pH de 5 y 6 se sustituyó NaHCO₃ por acetato de sodio (0.4762 g/25 ml y 0.60 g/25 ml, respectivamente) y se ajustó el pH con ácido acético al 20 %. El amortiguador KRB con pH de 8 se preparó sustituyendo NaHCO₃ por HEPES (0.2977 g/25 ml) y se ajustó el pH con KOH al 20 %. Para el amortiguador KRB de pH 8.9 se sustituyó NaHCO₃ por una solución Tris/HCl 0.1 M (6.25 ml/25 ml de amortiguador KRB) y no se le agregó CaCl₂ para evitar que se precipitara.

Para demostrar que la espermina^[3H] se captura en un compartimento osmóticamente sensible se sometieron las retinas a un choque osmótico. Se incubaron las retinas 20 minutos con espermina^[3H], después se les cambió el amortiguador KRB por H₂O bidestilada y se incubó el tejido 10 minutos; el tejido se lavó con amortiguador KRB durante 1 minuto y se homogeneizó en H₂O bidestilada.

Análisis de resultados.

Los resultados se analizaron con la ayuda del programa Prism 2.0[®] (Graphpad Software, Inc.) utilizando un método de regresión no lineal, aplicando la prueba *t* de Student ($p < 0.05$) en los casos en los que fue necesario.

RESULTADOS (artículos)

- a) [³H]Spermine binding to synaptosomal membranes from the chick retina.**

- b) Spermine inhibits [³H]glycine binding at the NMDA receptors from plexiform layers of chick retina.**

- c) Calcium-independent release of [³H]spermine from chick retina.**



Research report

[³H]Spermine binding to synaptosomal membranes from the chick retinaFroylan Calderón ^a, Israel Pichardo ^a, Edith López ^a, Ana María López-Colomé ^{a,b,*}^a Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico D.F., Mexico^b Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico D.F., Mexico

Accepted 13 July 1999

Abstract

The binding of [³H]spermine to synaptosomal membranes from chick retina was examined. Saturable specific binding of [³H]spermine to synaptosomal membranes from plexiform layers of retina (P₁ and P₂) has been characterized, and found to concentrate in the inner plexiform layer compared to the outer plexiform layer ($B_{\max} = 9.3$ and 37 pmol/mg protein for P₁ and P₂, respectively). Kinetics of specific [³H]spermine binding yield a sigmoidal saturation curve, indicating positive cooperativity (nH: 2.4 and 3.2 for P₁ and P₂, respectively) with high affinity: $K_{\text{app}} = 61$ and 67 nM for P₁ and P₂. The time required to attain equilibrium at room temperature was less than 5 min in both fractions. Dose–response curves for spermine, spermidine, and diethylene–triamine (DET) show different potencies for inhibiting [³H]spermine binding: spermine > spermidine > DET. Our results support a role for polyamines (PA) as neurotransmitters or neuromodulators in the vertebrate retina. © 1999 Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Spermine; NMDA receptor; Chick retina

1. Introduction

Endogenous polyamines (PA), such as spermine and spermidine, are synthesized from ornithine via ornithine decarboxylase (ODC); putrescine thus formed enters a closed synthetic loop in which putrescine, spermidine, and spermine are essentially interconvertible and extremely long-lived. PA concentration and metabolism as well as ODC are high in developing tissue [7], and an increase in these parameters is observed in nervous tissue upon activation of voltage- or receptor-gated calcium channels [12,14,15]. Inhibition of PA synthesis by the irreversible ODC inhibitor difluoromethylornithine abolishes calcium entry through specific receptor-linked or voltage-regulated calcium channels, which can be restored by the addition of putrescine [12–14,16]. This property would place PA in a powerful position regarding the control of neurotransmission in the central nervous system (CNS). Recently, spermidine and spermine have been postulated as neuromodulators or neurotransmitters [31,34]. These molecules

interact with the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) type of glutamate receptor, probably as neuromodulators, evoking distinct effects, which indicates the presence of more than one PA binding-site on this receptor-channel [3,31]. Two of these effects are related to the coagonist glycine. In the presence of saturating concentrations of glycine, spermine and spermidine induce an increase in whole-cell current and also in the binding of [³H]MK-801, possibly due to an increase in the frequency of NMDA receptor-channel opening [3,28,40]. On the other hand, in the presence of subsaturating concentrations of glycine, spermine and spermidine increase the affinity of the NMDA receptors for this amino acid [29,33]. PA effects are not restricted to the NMDA receptor: they also potentiate the depolarizing effects of kainate [4], inhibit the binding to nicotinic receptors [1], modulate the binding of ω -conotoxin to the N-type calcium channel [27], and inhibit P-type calcium channels [8].

Several independent lines of evidence are suggestive of the presence of specific binding sites for [³H]spermidine and [³H]spermine in rat brain, although the nature and affinity of such sites is still controversial [10,18,41].

Recent results demonstrate that the effects evoked by spermine on NMDA receptors from plexiform layers of chick retina are different from those in other regions of the CNS [6]. In order to contribute evidence in support of a

* Corresponding author. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-253, 04510, Mexico D.F., Mexico. Fax: +52-5622-56-07; E-mail: acolome@ifisiol.unam.mx

role for spermine as a neurotransmitter or neuromodulator in the chick retina, the binding of [3 H]spermine to specific sites in this tissue should be demonstrated.

2. Materials and methods

2.1. Membrane preparation

Retinas, free from pigment epithelium, were obtained from 1–3 day old chicks. Synaptosomal fractions from

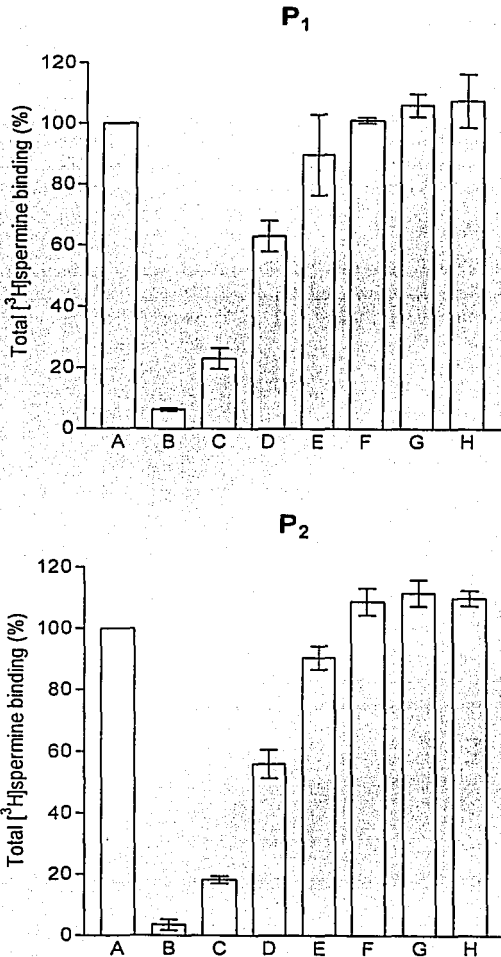


Fig. 1. Inhibition of [3 H]spermine binding by NMDA receptor-related compounds. Experiments were performed as described in Section 2. (A) Control (10–20 nM [3 H]spermine); (B) 1 mM spermine; (C) 1 mM spermidine; (D) 1 mM DET; (E) 200 μ M MK-801; (F) 1 mM glycine; (G) 1 mM glutamate; (H) 1 mM NMDA. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of 2–10 independent experiments performed in triplicate.

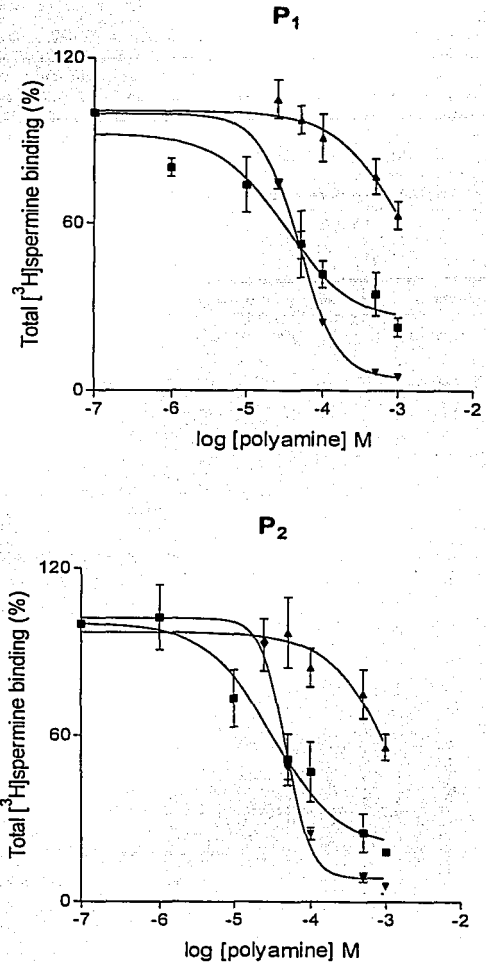


Fig. 2. Inhibition of [3 H]spermine binding by spermine (\blacktriangledown), spermidine (\bullet) and DET (\blacktriangle). Synaptosomal membranes from the outer (P₁) and the inner (P₂) plexiform layers of chick retina were obtained as described in Section 2. Membranes were incubated for 1 h in the presence of 5–20 nM [3 H]spermine. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of two to five independent curves performed in triplicate.

plexiform layers were isolated as previously described [19], from retinas homogenized in 0.32 M sucrose containing 10^{-4} M MgSO_4 . Synaptosomal fractions of the outer (P₁) and the inner (P₂) plexiform layers were homogenized in 25 vols. of 50 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4 (THB), and kept on ice for 15 min in order to allow complete osmotic disruption. Homogenates were centrifuged at $20\,000 \times g$ for 20 min for pelleting the synaptosomal membranes. The pellet was subsequently washed three times in THB followed by centrifugation at $20\,000 \times g$ for 20 min. The

Table 1

IC_{50} and Hill coefficients for spermine, spermidine, and DET
 $[^3H]$ Spermine binding was measured as described in Section 2. Half-maximal inhibition of binding was determined from competition curves using five to six different concentrations of agonists or antagonists from 1 μM to 1 mM, in the presence of 5–20 nM $[^3H]$ spermine (Fig. 2). nH was calculated as the slope of the curve by plotting $\log(B/B_{max} - B)$ vs. $\log[F]$, where B = bound ligand and F = concentration of free ligand [38]. Results were also tested by nonlinear regression. Data are the mean \pm S.E.M. of two to five independent curves performed in triplicate.

	P ₁ fraction		P ₂ fraction	
	IC ₅₀ (μM)	nH	IC ₅₀ (μM)	nH
Spermine	48 \pm 1.0	1.7 \pm 0.1	48 \pm 1.1	2.7 \pm 0.5
Spermidine	32 \pm 1.6	0.4 \pm 0.0	32 \pm 1.6	0.5 \pm 0.0
DET	1023 \pm 4.8	1.0 \pm 0.1	1514 \pm 7.1	0.9 \pm 0.2

final pellets were suspended in 8 vols. of 0.32 M sucrose containing 10^{-4} M $MgSO_4$ and stored at $-70^\circ C$ for 1 week. Previous to the assay, membranes were further washed twice with THB.

2.2. Binding assay

A total of 100–200 μg of membrane protein was incubated, for the indicated period of time, with varying

concentrations of $[^3H]$ spermine (5–200 nM for the saturation curve) to a final volume of 175 μl . Nonspecific binding (5%–10% of total binding) was defined in the presence of 1 mM unlabeled spermine. After 1 h incubation at $25^\circ C$, reaction was stopped by centrifugation at 90000 rpm, for 2 min in an air-driven microcentrifuge (Beckman). Subsequently, membranes were washed twice with cold THB or bidistilled water for separating free from bound radioligand and pellets were dissolved in 2% SDS.

Association curves were generated by measuring binding of $[^3H]$ spermine (10 nM) at six time points from 2 to 60 min (Fig. 4). Dose–response curves were obtained using 5–20 nM $[^3H]$ spermine in the presence of increasing concentrations of unlabeled spermine (1–1000 μM), spermidine (1–1000 μM) or diethylene–triamine (DET; 50–1000 μM). The radioactivity remaining in the pellets was measured in an LS-6000 SC liquid scintillation counter (Beckman Instruments) after adding 5 ml of Tritosol [9]. Protein was determined by the method of Lowry et al. [24].

2.3. Materials

$[^3H]$ Spermine (40–60 Ci/mmol) was obtained from American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA). Spermine, spermidine and DET were from Sigma Bio-

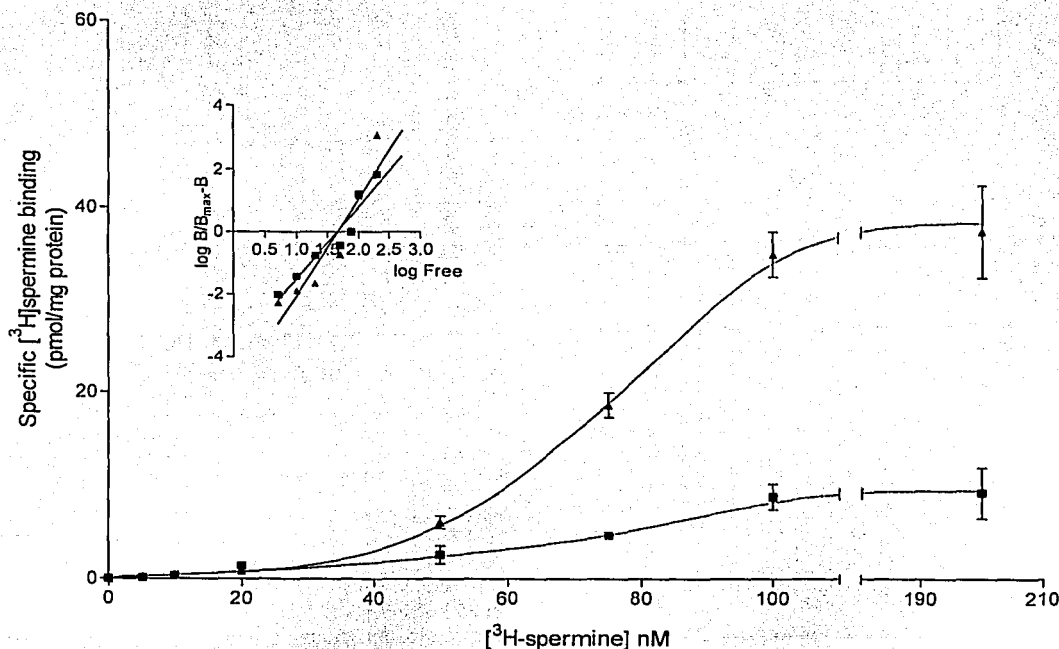


Fig. 3. Saturation curve for $[^3H]$ spermine binding. Membranes from synaptosomal fractions of chick retina were incubated for 1 h with increasing concentrations of $[^3H]$ spermine as described in Section 2. Nonspecific binding was determined in the presence of 1 mM unlabeled spermine. P₁ (■); P₂ (▲). Inset, plot of $\log(B/B_{max} - B)$ vs. $\log[F]$ (Hill plot). Line was fit by linear regression analysis. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of four independent curves performed in triplicate.

Table 2

Constants for [³H]spermine binding

Experiments were performed as described in Section 2. Constants were calculated from the saturation curves in Fig. 3. nH was calculated as described in Table 1. Affinity of [³H]spermine binding was calculated by nonlinear regression analysis and Hill plot analysis, where $K_{app} = [F]_{0.5}$; when $\log(B/B_{max} - B) = 0$ the corresponding position on the $\log[F]$ axis gives $\log[F]_{0.5}$. Data are the mean \pm S.E.M. of four independent curves performed in triplicate.

	P ₁ fraction	P ₂ fraction
B_{max} (pmol/mg protein)	9.3 \pm 1.0	37 \pm 1.6
K_{app} (nM)	61 \pm 1.2	67 \pm 1.1
nH	2.4 \pm 0.3	3.2 \pm 0.6

chemicals (St. Louis, MO, USA). One- to three-day old chicks (*Gallus domesticus*) were supplied by ALPES (Tehuacán, Puebla, México).

2.4. Statistical analysis

Radioligand binding data were analyzed by nonlinear regression using PRISM computer program (GRAPHPAD). The significance of results was assessed by Student's *t*-test; $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Pharmacological profile of [³H]spermine binding to synaptic membranes from the chick retina

The inhibition of [³H]spermine binding to synaptic membranes from the chick retina by compounds related to the NMDA receptors was determined: dizocilpine (MK-801), 200 μ M; glycine, 1 mM; glutamate, 1 mM; NMDA, 1 mM; spermidine, 1 mM; DET, 1 mM; spermine, 1 mM. Concentrations used were higher than those reported to saturate their sites in the receptor [10,11,18,25,32,41]. Only unlabeled spermine, spermidine and DET, considered as an antagonist of the modulatory site for spermine on NMDA receptors [39], inhibited significantly [³H]spermine binding to membranes from both plexiform layers of the retina (Fig. 1). In membranes from both plexiform layers, the order of efficiency of these compounds was: spermine > spermidine > DET (Fig. 2). The IC_{50} for spermine, spermidine and DET was determined; results show that spermine and spermidine are more potent than DET for inhibiting [³H]spermine binding (Table 1). Hill slope of inhibition curves, obtained by nonlinear regression analysis of Hill plots, showed that nH for spermine and spermidine

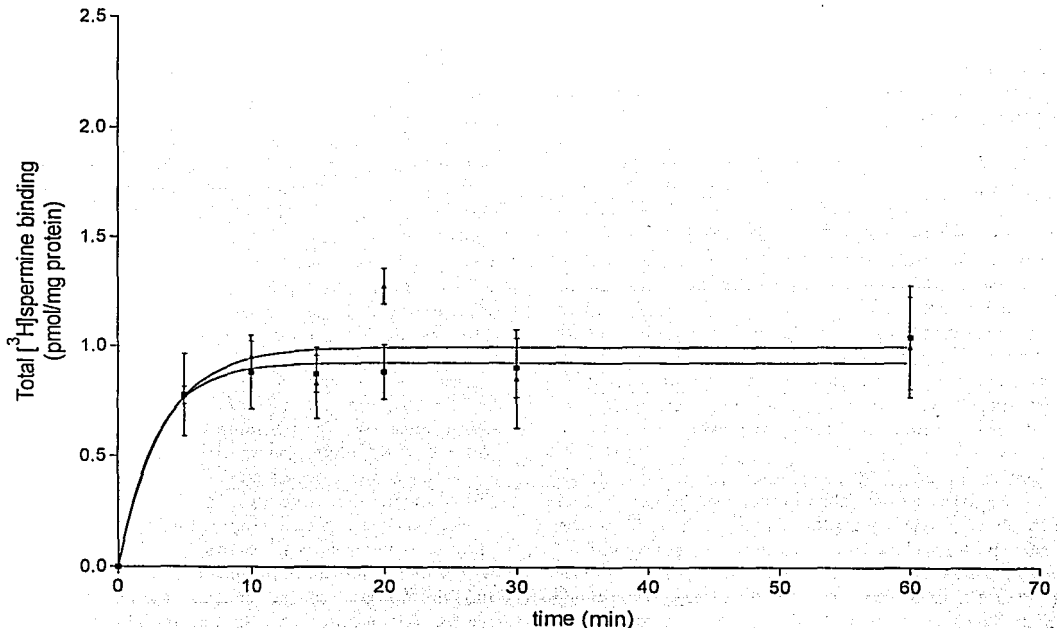


Fig. 4. Association curves for [³H]spermine. Membranes from synaptosomal fractions of chick retina were incubated in the presence of 10 nM [³H]spermine for different periods of time as described in Section 2. P₁ (■); P₂ (▲). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of three to four independent curves performed in triplicate.

significantly deviated from unity in both plexiform layers (Table 1), suggesting distinct interactions for these compounds [38], whereas the nH for DET approaches unity, indicating a single site of interaction for this compound [38].

[³H]Spermine binding was not affected by the channel blocker MK-801 (200 μM) or glycine (1 mM), glutamate (1 mM) and NMDA (1 mM) (Fig. 1).

3.2. Kinetic analysis of [³H]spermine binding to synaptic membranes from the chick retina

Specific [³H]spermine binding to P₁ and P₂ membrane fractions was found saturable (Fig. 3). Binding reached a plateau at concentrations above 100 nM in both plexiform layers and concentrated in the inner plexiform layer compared to the outer plexiform layer ($B_{\max} = 9.3 \pm 1.0$ and 37 ± 1.6 pmol/mg protein for P₁ and P₂, respectively). Kinetics of specific [³H]spermine binding was studied within a concentration range of 5–200 nM; a sigmoidal saturation curve was obtained, indicating positive cooperative binding, with high affinity ($K_{\text{app}} = 61 \pm 1.2$ and 67 ± 1.1 nM for P₁ and P₂, respectively). Hill slope of saturation curves, obtained from the Hill plot, showed that nH is higher than unity in both plexiform layers (nH: 2.4 ± 0.3 and 3.2 ± 0.6 for P₁ and P₂, respectively). Binding constants are summarized in Table 2.

Time-course of [³H]spermine binding at 10 nM was determined. In these experiments, [³H]spermine binding reached a plateau within 2 min after the initiation of incubation at room temperature (Fig. 4). Nonspecific binding did not increase significantly.

4. Discussion

PA have been shown to affect excitatory neurotransmission through a multiple interaction with NMDA-type glutamate receptors, although the molecular mechanisms involved remain unclear.

In the vertebrate retina, the main excitatory pathway uses glutamate as the neurotransmitter, and ionotropic, as well as metabotropic receptors for this compound have been identified and characterized in membranes from the outer (P₁) and the inner (P₂) plexiform layers of this tissue [20–23,36].

Regarding retinal NMDA receptors, previous studies have shown pharmacological and kinetic properties distinct from those of NMDA receptors in the CNS [23,32]. PA have been postulated as neurotransmitters or neuromodulators acting on NMDA receptors. Recent results from our group demonstrate that spermine inhibits [³H]glycine binding to the coagonist site of NMDA receptors from plexiform layers of chick retina, by a reduction in B_{\max} without affecting K_d , contrary to its reported effects in the CNS. In the present study, we have characterized specific, sat-

urable high-affinity binding sites for [³H]spermine in membranes from both synaptic layers of the retina, concentrated in the inner plexiform layer, as also seen for [³H]glycine binding to NMDA receptors [6,32]. Binding was found specific, since it was inhibited by spermine, spermidine and the PA antagonist DET, but not by other compounds interacting at different domains of NMDA receptors, such as glutamate, NMDA, glycine and MK-801 (Fig. 1). These data thoroughly demonstrate the presence of specific receptors for spermine in the retina, through which a modulatory function could be exerted.

Sigmoidal saturation curves for specific [³H]spermine binding obtained, indicate an interaction with different populations of binding sites with high affinity in both plexiform layers (Fig. 3, Table 2). This is confirmed by the values for nH calculated by Hill analysis of the curves which was higher than unity in P₁ and P₂, demonstrating positive cooperativity within binding sites, as well as more than one population of binding sites for the PA. These results are in keeping with previous evidence showing that PA, as spermine and spermidine, interact with NMDA receptors evoking different effects, which suggests an interaction of these PA with more than one site on the receptor-channel [3,31].

Previous studies in order to demonstrate the presence of specific receptors for PA in membranes from synaptosomal fractions from rat brain have shown distinct results regarding number and affinity of binding sites. [³H]Spermidine binding sites were characterized [41], and a single low affinity site was reported with a K_d value of 161 μM. Further studies in the same system showed the presence of two populations of binding sites with low ($K_d = 271$ μM) and high affinity ($K_d = 3.3$ nM) for spermidine [18]. Discrepancy among these studies is clearly related to the concentration range of spermidine employed in saturation experiments: while in the first case 20 μM to 1 mM spermidine was used, in the latest, a wider concentration range was explored, starting from low nanomolar. Our present results exploring concentrations from 5 to 200 nM for saturation and kinetics of [³H]spermine binding show the presence of high-affinity sites ($K_{\text{app}} \approx 60$ nM). Also on this line, the affinity values obtained here for spermine receptors in the retina are in keeping with the finding by Gilad and Gilad [10], in rat brain, of high affinity receptors for spermine ($K_d = 83$ nM) and spermidine ($K_d = 43$ nM) which were obtained, as in our case, using nanomolar concentrations of the PA for the calculation of kinetic constants (5–100 nM).

Fast association of [³H]spermine was observed in our study, in agreement with results from Yoneda et al. [41] in membranes from rat brain. In this preparation, the time for maximal [³H]spermidine binding was shorter in Triton-treated, as compared to untreated membranes. Our results are close to those obtained in detergent treated, delipidated membranes, suggesting we are looking to spermine binding to a protein fraction.

The presence of high-affinity binding sites for spermidine and spermine [10,18] is consistent with the nanomolar extracellular content of PA in the brain, as measured by microdialysis in awake rats [37]. In contrast, micromolar K_d values of the low-affinity sites, correlates with high intracellular concentrations of PA in the brain [35]. It has been suggested that low-affinity binding sites could relate to the stabilization of cell membrane, as demonstrated in erythrocyte membranes [2], which involves PA-phospholipid interaction. In this respect, low affinity spermidine binding to rat brain membranes is potentiated by phospholipase A_2 and, additionally, a strong association of spermidine with phosphatidylserine has been demonstrated [41]. Recent studies using patch-clamp technique demonstrate that the potentiation of NMDA-induced currents by spermine shows a fast on-off kinetics, and an increase in intracellular spermine concentration does not occlude potentiation by extracellularly applied spermine [17], which strongly suggests the presence of a PA modulatory site in the extracellular domain of the NMDA receptor, with high affinity for spermine.

Our previous results on glycine binding to NMDA receptors together with those from this study indicate that although PA recognition sites in the retina share pharmacological properties with those on NMDA receptors from other regions of the CNS [39], the mechanism linking the spermine site to the glycine site could be different. Such differences could arise from distinct heteromeric assemblies of NMDA receptors in the CNS and the retina, probably related to the expression of NR2C subunit, which is restricted to the retina and the cerebellum [5,26]. In support of this assumption, spermine and spermidine have been found to inhibit cGMP accumulation in the cerebellum, through the activation of the glycine site on NMDA receptors [30].

The results from the present study suggest that spermine could participate as a neuromodulator of excitatory neurotransmission in the retina, and demonstrate a distinct effect of this PA at the glycine site on retinal NMDA receptors, from that observed in the CNS.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants 3286P-N from CONACyT, 201316 and IN-210998 from DGAPA-UNAM.

References

- [1] N. Anis, S. Sherby, R. Goodnow Jr., M. Niwa, K. Konno, T. Kallimopoulos, R. Bukownik, K. Nakanishi, P. Usherwood, A. Eldefrawi, M. Eldefrawi, Structure-activity relationships of philanthotoxin analogs and polyamines on *N*-methyl-D-aspartate and nicotinic acetylcholine receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254 (1990) 764–773.
- [2] S.K. Ballas, N. Mohandas, L.J. Marton, S. Shohet, Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 (1983) 1942–1946.
- [3] M. Benveniste, M.L. Mayer, Multiple effects of spermine on *N*-methyl-D-aspartate acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurons, *J. Physiol.* 464 (1993) 131–163.
- [4] P. Brackley, R. Goodnow Jr., K. Nakanishi, H.L. Sudan, P.N.R. Usherwood, Spermine and philanthotoxin potentiate excitatory amino acid responses in *Xenopus* oocytes injected with rat and chick brain RNA, *Neurosci. Lett.* 114 (1990) 51–56.
- [5] J.H. Brandstätter, E. Hartveit, M. Sassòg-Pognetto, H. Wässle, Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina, *Eur. J. Neurosci.* 6 (1994) 1100–1112.
- [6] F. Calderón, A.M. López-Colomé, Spermine inhibits [3 H]glycine binding at the NMDA receptors from plexiform layers of chick retina, *Neurochem. Res.* 23 (1998) 1363–1369.
- [7] E.S. Canelakakis, D. Viceps-Madore, D.A. Kyriakidis, J.S. Heller, The regulation and function of ornithine decarboxylase and of the polyamines, *Curr. Top. Cell. Regul.* 15 (1979) 155–202.
- [8] B.D. Cherksey, R. Llinas, M. Sugimori, International Patent, WO 91/00853, 1991.
- [9] V. Fricke, Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton-X 100, *Anal. Biochem.* 63 (1975) 555–558.
- [10] G.M. Gilad, V.H. Gilad, Polyamines uptake, binding and release in rat brain, *Eur. J. Pharmacol.* 193 (1991) 41–46.
- [11] K. Hashimoto, E.D. London, Specific binding sites for polyamines in the brain, in: C. Carter (Ed.), *Neuroscience Perspectives: The Neuropharmacology of Polyamines*, Academic Press, London, 1994, pp. 155–166.
- [12] Z. Iqbal, H. Koenig, Polyamines appear to be second messengers in mediating Ca^{2+} fluxes and neurotransmitter release in potassium-depolarized synaptosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133 (1985) 563–573.
- [13] Z. Iqbal, H. Koenig, A.D. Goldstone, C.Y. Lu, F. Siddiqui, Presynaptic NMDA receptors regulate polyamine synthesis, Ca^{2+} fluxes, and transmitter release at axon terminal, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11 (1991) S114, Abstr., Suppl.
- [14] H. Koenig, A. Goldstone, C.Y. Lu, Polyamines regulate calcium fluxes in rapid plasma membrane response, *Nature* 305 (1983) 530–534.
- [15] H. Koenig, C.C. Fan, A.D. Goldstone, C.Y. Lu, J.J. Trout, Polyamines mediate androgenic stimulation of calcium fluxes and membrane transport in rat heart myocytes, *Circ. Res.* 64 (1989) 415–426.
- [16] H. Koenig, A.D. Goldstone, C.Y. Lu, Polyamines mediate the reversible opening of the blood-brain barrier by the intracarotid infusion of hyperosmolar mannitol, *Brain Res.* 483 (1989) 110–116.
- [17] J. Lerma, Spermine regulates *N*-methyl-D-aspartate receptor desensitization, *Neuron* 8 (1992) 343–352.
- [18] E.D. London, V.L. Dawson, C.R. Mantione, Specific binding sites for polyamines in mammalian brain, in: T. Kameyama, T. Nabeshima, E.F. Domino (Eds.), *NMDA Receptor Related Agents: Biochemistry Pharmacology and Behavior*, NPP Books, Ann Arbor, USA, 1991, pp. 71–78.
- [19] A.M. López-Colomé, R. Salceda, H. Pasantes-Morales, Potassium-stimulated release of GABA, glycine and taurine from the chick retina, *Neurochem. Res.* 3 (1978) 431–441.
- [20] A.M. López-Colomé, High affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes, *Neurochem. Res.* 6 (1981) 1019–1033.
- [21] A.M. López-Colomé, F. Somohano, Characterization of L- 3 H-aspartate binding to chick retinal subcellular fractions, *Vision Res.* 22 (1982) 1495–1501.
- [22] A.M. López-Colomé, F. Somohano, Characterization of quisqualate type L-glutamate receptors in the retina, *Brain Res.* 414 (1987) 99–108.
- [23] A.M. López-Colomé, F. Somohano, *N*-Methyl-D-aspartate receptors in the retina: 3-(\pm)-2-carboxypiperazin-4-yl-propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies, *Neuropharmacology* 31 (1992) 577–584.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- [24] O.H. Lowry, W.H. Rosebrough, A.L. Farr, R.S. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [25] D.T. Monaghan, C.W. Cotman, Distribution of *N*-methyl-D-aspartate-sensitive [³H]glutamate binding sites in rat brain, *J. Neurosci.* 5 (1985) 2909–2919.
- [26] H. Monyer, R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann, P.H. Seeburg, Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes, *Science* 256 (1992) 1217–1221.
- [27] L.M. Pullan, R.A. Keith, D. LaMonte, R.J. Stumpo, A.I. Salama, The polyamine spermine affects ω -conotoxin binding and function at *N*-type voltage-sensitive calcium channels, *J. Auton. Pharmacol.* 10 (1990) 213–219.
- [28] R.W. Ransom, N.L. Stec, Cooperative modulation of [³H]MK-801 binding to the *N*-methyl-D-aspartate receptor–ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines, *J. Neurochem.* 51 (1988) 830–836.
- [29] R.W. Ransom, N.L. Deschenes, Polyamines regulate glycine interaction with the *N*-methyl-D-aspartate receptor, *Synapse* 5 (1990) 294–298.
- [30] T.S. Rao, J.A. Cler, S.J. Mick, S. Iyengar, P.L. Wood, Polyamines modulate events mediated by the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex through an ifenprodil-insensitive pathway: in vivo measurement of cyclic GMP in the cerebellum, *Neuropharmacology* 30 (1991) 567–573.
- [31] D.M. Rock, R.L. MacDonald, Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 (1995) 463–482.
- [32] A. Rodríguez-Contreras, F. Calderón, A.M. López-Colomé, Strychnine-insensitive [³H]glycine binding to synaptosomal membranes from the chick retina, *Int. J. Dev. Neurosci.* 16 (1998) 413–421.
- [33] A.I. Sacaan, K.M. Johnson, Spermine enhances binding to the glycine site associated with the *N*-methyl-D-aspartate receptor complex, *Mol. Pharmacol.* 63 (1989) 836–839.
- [34] N. Seiler, Polyamine metabolism and function in brain, *Neurochem. Int.* 3 (1981) 95–110.
- [35] T.A. Slotkin, J. Bartolome, Role of ornithine decarboxylase and the polyamines in nervous system development: a review, *Brain Res. Bull.* 17 (1986) 307–320.
- [36] F. Somohano, P.J. Roberts, A.M. López-Colomé, Maturation changes in retinal excitatory amino acid receptors, *Dev. Brain Res.* 42 (1988) 59–67.
- [37] C. Speciale, M. Marconi, L. Raimondi, R.G. Fariello, Extracellular content of polyamines in the striatum: a microdialysis study in awake rats, *Soc. Neurosci. Abstr.* 17 (1991) 254.
- [38] G.A. Weiland, P.B. Molinoff, Quantitative analysis of drug-receptor interactions: I. Determination of kinetic and equilibrium properties, *Life Sci.* 29 (1981) 313–330.
- [39] K. Williams, C. Romano, M.A. Dichter, P.B. Molinoff, Modulation of the NMDA receptor by polyamines, *Life Sci.* 48 (1991) 469–498.
- [40] K. Williams, A.M. Zappia, D.B. Pritchett, Y.M. Shen, P.B. Molinoff, Sensitivity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits, *Mol. Pharmacol.* 45 (1994) 803–809.
- [41] Y. Yoneda, K. Ogita, R. Enomoto, T. Suzuki, S. Kito, Identification and characterization of specific binding sites of [³H]spermidine in synaptic membranes of rat brain, *Brain Res.* 563 (1991) 17–27.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Spermine Inhibits [³H]Glycine Binding at the NMDA Receptors from Plexiform Layers of Chick Retina

Froylan Calderón¹ and Ana María López-Colomé^{1,2,3}

(Accepted March 19, 1998)

Saturable specific binding of glycine to synaptosomal membranes from plexiform layers of the retina has been described, which seems to correspond to the modulatory site on NMDA-receptors (26). Spermine inhibited specific [³H]glycine binding to membranes from synaptosomal fractions from the outer (P₁) and the inner (P₂) plexiform layers of 1-3 day-old chick retinas in a dose-dependent manner with an IC₅₀ = 35 μM for the P₁ fraction and 32 μM for the P₂ fraction. Kinetic experiments and non-linear regression analysis of [³H]glycine-specific binding showed a K_d ~ 100-150 nM in both fractions, and a higher B_{max} (4.11 ± 0.47 pmol/mg protein) for the inner plexiform layer compared to the outer plexiform layer (B_{max} = 2.76 ± 0.25 pmol/mg protein). Strychnine-insensitive [³H]glycine binding was inhibited by 100 μM spermine, due to a reduction in B_{max} (P₁ = 0.84 ± 0.16 pmol/mg protein; P₂ = 0.81 ± 0.16 pmol/mg protein) without affecting the K_d. Association and dissociation constants in the absence and presence of 50 μM spermine remained unchanged. Results demonstrate the presence of a single modulatory site for spermine on NMDA receptors, in both synaptic layers of the chick retina.

KEY WORDS: NMDA receptors; spermine; glycine; chick retina.

INTRODUCTION

Endogenous polyamines such as spermine and spermidine have multiple effects in the central nervous system (CNS) and have been recently postulated as neuromodulators or neurotransmitters (1,2). These molecules interact with the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) type of glutamate receptor evoking different effects, which suggests an interaction of this polyamine with more than one site on the receptor-channel (1,3). Two of these effects are related to the coagonist glycine. In the presence of a saturating concentration of glycine, spermine and spermidine induce an increase in whole-

cell current and also in the binding of [³H]MK-801, possibly due to an increase in the frequency of NMDA receptor-channel opening (3,4,5). On the other hand, in the presence of subsaturating concentrations of glycine, spermine and spermidine increase the affinity of the NMDA receptors for this amino acid (6,7).

The considerable variation in the stimulatory effect of polyamines on NMDA-channel conductance in cultured neurons (3,8,9) suggests the presence of NMDA receptors bearing different subunit composition. Two families of NMDA receptor subunits have been cloned: the NMDAR1 family which consists of eight splice variants of the NR1 gene, and the NMDAR2 family com-

¹ Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurociencias, and

² Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

³ Address reprint requests to: Dr. Ana María López-Colomé. Apartado Postal 70-253, 04510, México, D.F., México. e-mail: acolome@ifesunl.ifisiol.unam.mx.

Abbreviations: EDTA, ethylenediamine-tetracetic acid; HEPES, (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]); SDS, sodium dodecyl sulfate; TRIS, tris(hydroxymethyl)aminomethane; MK-801 (dizocilpine), 5-methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohept-5,10-imine; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; ACPC, 1-amino-cyclopropane-carboxylic acid; DET, diethylenetriamine;

posed by NR2A, NR2B, NR2C and NR2D, encoded by different genes (10). Alone, NMDAR1 is very poorly expressed in oocytes, however, in combination with one of the NR2 subunits, expression is dramatically increased and the corresponding receptors show different properties depending on the type of NR2 subunit present (11–14). NR1, but not NR2 subunit family, form functional homomeric channels, but when coexpressed the resulting heteromeric receptors induce much larger whole-cell currents than homomeric NR1 receptors (11–15).

Glutamate plays an important role in retinal function (16), although the molecular characteristics of glutamate receptors in this tissue remain unclear. Hybridization studies performed *in situ* have shown that neurons from the inner retina, express all subtypes of ionotropic glutamate receptor subunits (17), in addition to inhibitory receptors for GABA and glycine (18).

NMDA receptors in the chick retina show distinct pharmacological properties, regarding antagonists directed to the strychnine-insensitive glycine binding site (19). On this line, although 7-Cl-thiokynurenic acid has been shown to reduce significantly neuronal loss in different brain areas, using models of focal and global ischemia (20,21), in the retina this compound completely failed to reduce ischemic damage (19). Similarly, [³H]CPP binding to retinal membranes shows significant pharmacological and biochemical differences from that described in the CNS (22). Furthermore, potentiation of MK-801 binding by glycine, is weak in embryonic chick retina compared to the CNS (23). Also in this tissue, neither glycine nor 1-aminocyclopropane-carboxylic acid (ACPC) potentiate NMDA toxicity, but actually protect retinal neurons (23).

The aim of this study was to characterize the effect of spermine on the glycine site of NMDA receptors in chick retina, measuring the binding of [³H]glycine to synaptosomal membranes from this tissue. Results on this line could provide evidence for a regulatory role of polyamines on the vertical excitatory pathway of the retina, and hence, have implications for the understanding of neurotransmission in this tissue.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Membrane Preparation. Retinas, free from pigment epithelium, were obtained from 1–3 day-old chicks. Synaptosomal fractions from plexiform layers were isolated as previously described (24), from retinas homogenized in 0.32 M sucrose containing 10⁻⁴ M MgSO₄. Synaptosomal fractions of the outer (P₁) and the inner (P₂) plexiform layers, were homogenized in 25 vol. of 5 mM HEPES/4.5 mM TRIS buffer, pH 7.4 (HTB), and kept on ice for 15 minutes in order to allow

complete osmotic disruption. Homogenates were centrifuged at 20,000 g for 20 minutes and the pellets containing the synaptosomal membranes were stored at -4°C for 1–2 days. Membranes were subsequently washed once in HTB buffer, twice in the same buffer containing 1 mM EDTA (pH 7.4), and two more times without EDTA. Pellets were stored at -70°C for two weeks. Previous to the assay, membranes were further washed four times with HTB.

Binding Assay. 100–200 µg of membrane protein were incubated, for the indicated period of time, with varying concentrations of [³H]glycine (20–1,600 nM) in the presence or absence of 100 µM spermine (175 µl, final volume). Non-specific binding (20–40% of total binding) was defined in the presence of 1 mM unlabeled glycine. After two hours incubation at 25°C, reaction was stopped by centrifugation at 90,000 rpm, for two minutes in an air-driven microcentrifuge (Beckman) and pellets were dissolved in 2% SDS.

Association curves were generated by measuring binding of [³H]glycine (20 nM, 60 nM, and 100 nM) in the presence or absence of 50 µM spermine at 9 time points from 2 min to 205 min. Dose-response curves for spermine were obtained using 20 nM [³H]glycine in the presence of increasing concentrations of spermine (1–1000 µM) to a final volume of 500 µl (300–700 µg of protein). In these experiments, reaction was terminated by filtration through GF/C filters. Subsequently, membranes were washed twice with cold HTB in order to separate free from bound radioligand. The radioactivity remaining in the pellets or the filters was measured in an LS-6000 SC liquid scintillation counter (Beckman Instruments). Protein was determined by the method of Lowry et al. (25).

Materials. [³H]Glycine (42–51.1 Ci/mmol) was obtained from DuPont NEN Research Products (Boston, MA). Spermine and glycine were from Sigma Biochemicals (St. Louis Missouri, USA). 1–3 day-old chicks (*Gallus domesticus*) were supplied by ALPES, S.A. (Tehuacán, Puebla, México).

Statistic Analysis. Radioligand binding data were analyzed by non-linear regression using PRISM computer program (GRAPHPAD). The significance of results was assessed by Student's *t* test; *p* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Dose-response experiments show a clear inhibition of [³H]glycine binding by spermine with an IC₅₀ = 46.46 µM for P₁ and 36.76 µM for P₂ (Fig. 1). Strychnine showed extremely low potency for inhibiting [³H]glycine binding: IC₅₀ = 428.74 ± 37.90 µM (n = 2) for P₁ and 469.43 ± 104.68 µM (n = 2) for P₂. Glycine and ACPC, agonists at the glycine site of the NMDA receptor complex, exhibited high and similar potencies: IC₅₀ = 1.26 ± 0.14 µM (n = 3) in P₁ and 7.31 ± 3.21 µM (n = 3) for P₂ in the case of glycine, and IC₅₀ = 3.58 ± 2.72 µM (n = 3) in P₁; 6.37 ± 1.39 µM (n = 3) for P₂ in that of ACPC, suggesting that we are mainly dealing with NMDA receptors (26). The low effect of strychnine, at high doses, is probably due to an interaction with glycine inhibitory receptors.

Saturation experiments were performed in order to determine the type of inhibition exerted by spermine on [³H]glycine binding. The results in Fig. 2 show that, in

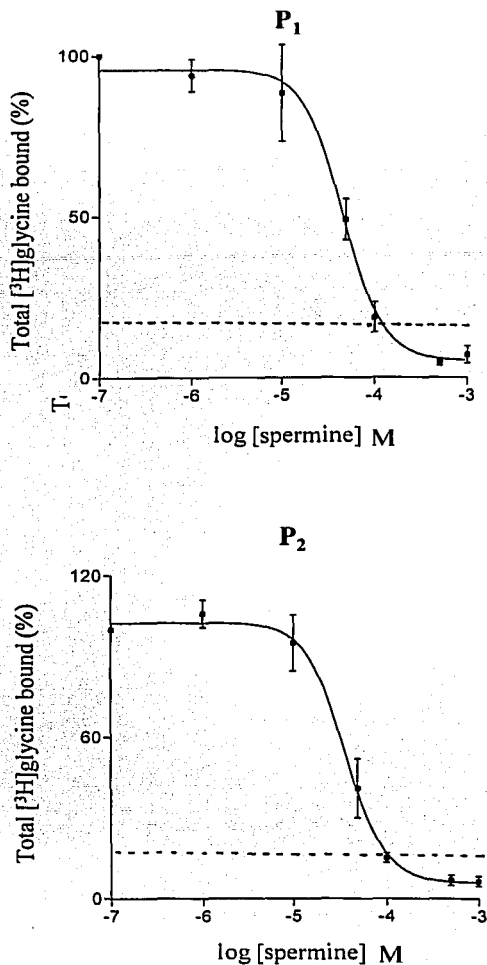


Fig. 1. Inhibition of $[^3\text{H}]$ glycine binding by spermine. Synaptosomal membranes from the outer (P_1) and the inner (P_2) plexiform layers of chick retina were obtained as described in Methods. Membranes were incubated for 2 hrs in the presence of 20 nM $[^3\text{H}]$ glycine. Data are expressed as the mean \pm SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. Dashed line indicates non-specific $[^3\text{H}]$ glycine binding.

membranes from both subcellular fractions, spermine significantly decreased maximum $[^3\text{H}]$ glycine binding without altering affinity, indicating that this polyamine does not compete for the glycine-binding site. Binding

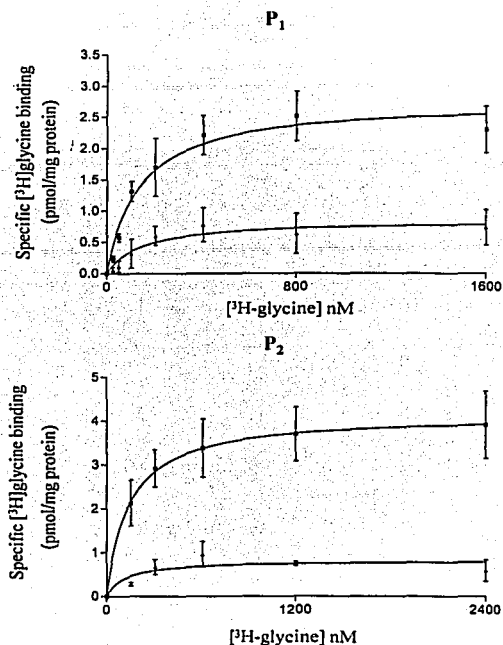


Fig. 2. Saturation curve for $[^3\text{H}]$ glycine binding. Membranes from synaptosomal fractions of chick retina, were incubated for 2 hrs, with increasing concentrations of $[^3\text{H}]$ glycine as described in Methods. Non-specific binding was determined in the presence of 1 mM unlabeled glycine. Spermine concentration was 100 μM . (■) Control; (▲) spermine. Values are the mean \pm SEM from 2-5 independent experiments performed in triplicate.

constants are summarized in Table I. At high (1 mM) concentrations, this polyamine slightly inhibits non-specific binding of $[^3\text{H}]$ glycine, since displaceable $[^3\text{H}]$ glycine binding increases from 60-80% to 90% of total binding (Fig. 1).

Association of $[^3\text{H}]$ glycine was determined in the absence (Fig. 3) and presence (Fig. 4) of 50 μM spermine. For the calculation of association (k_{+1}) and dissociation (k_{-1}) constants, the observed association constant values (k_{obs} , Table II) obtained in the presence of 20, 60 and 100 nM $[^3\text{H}]$ glycine, were plotted versus $[^3\text{H}]$ glycine concentration, and values were calculated using the equation: $k_{\text{obs}} = k_{+1} ([^3\text{H}] \text{glycine}) + k_{-1}$ (27).

These experiments show that spermine reduces $[^3\text{H}]$ glycine binding, without altering association and dissociation constants (Table III).

Table I. Effects of Spermine on [³H]Glycine-Binding Parameters

	P ₁ fraction		P ₂ fraction	
	Control	Spermine (100 μM)	Control	Spermine (100 μM)
B _{max} (pmol/mg protein)	2.76 ± 0.25	0.84 ± 0.16 ^a	4.11 ± 0.47	0.81 ± 0.16 ^a
K _d (nM)	139.12 ± 17.92	144.85 ± 15.95	133.73 ± 11.67	108.56 ± 12.24

^a Significantly different from control, $p < 0.05$, Student's t test. Experiments were performed as described in Methods. Constants were calculated from the saturation curves in Figure 2. Data are expressed as the mean ± SEM of 2-5 determinations performed in triplicate. P₁, membranes from the outer plexiform layer; P₂, membranes from the inner plexiform layer.

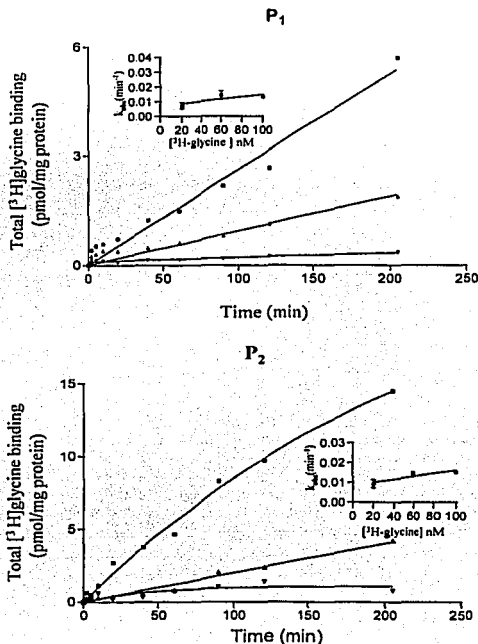


Fig. 3. Association curves for [³H]glycine at 20 nM (▼), 60 nM (▲) and 100 nM (■) concentration. Each point is the mean of triplicate determinations which vary < 10%. Inset, plot of k_{obs} versus concentration of [³H]glycine. Line was fit by linear regression analysis using PRISM program from GRAPHPAD. Non-specific binding did not vary significantly.

DISCUSSION

The main finding of the present study is that, [³H]glycine binding to membranes from both synaptic layers of the chick retina, is inhibited by spermine. The data presented here, show that spermine decreases maximal [³H]glycine binding, without changing the affinity of glycine for its recognition site on the receptor (Tables

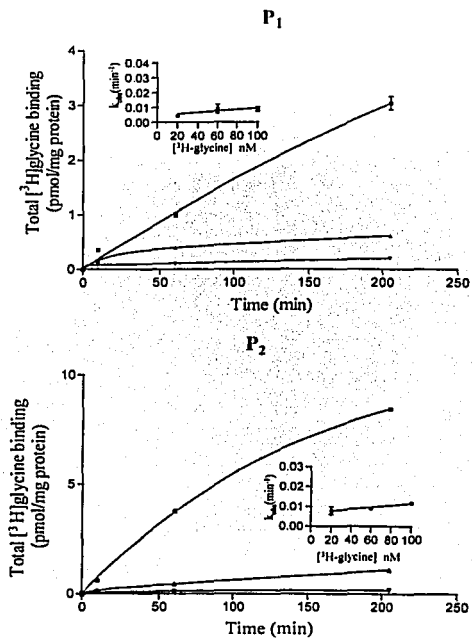


Fig. 4. Association curves for [³H]glycine at 20 nM (▼), 60 nM (▲) and 100 nM (■) concentration in the presence of 50 μM spermine. Each point is the mean of triplicate determinations which vary < 10%. Inset, plot of k_{obs} versus concentration of [³H]glycine. Line was fit by linear regression analysis using PRISM program from GRAPHPAD. Non-specific binding did not vary significantly.

I and III), indicating that spermine does not interact directly with this site.

Experiments performed in our laboratory¹ have shown specific [³H]spermine binding to chick retinal membranes, sensitive to diethylentriamine (DET), considered as an antagonist of the modulatory site for sper-

¹ Unpublished observations^{**}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Spermine Inhibits Glycine Binding at NMDA Receptors

Table II. Observed Association Constants (k_{obs}) for [³H]Glycine Binding

	P ₁ fraction		P ₂ fraction	
	Control	Spermine (50 μM)	Control	Spermine (50 μM)
[³ H]Glycine concentration	k_{obs} ($\times 10^{-3}$ min ⁻¹)		k_{obs} ($\times 10^{-3}$ min ⁻¹)	
20 nM	7.51 ± 2.00	4.54 ± 0.46	9.30 ± 1.98	7.93 ± 1.96
60 nM	14.45 ± 2.60	8.95 ± 2.80	14.19 ± 0.99	9.13 ± 0.81
100 nM	13.45 ± 0.52	8.81 ± 1.49	15.31 ± 0.13	11.80 ± 0.03

Constants were derived from time-course experiments in the presence of the indicated concentrations of the radioligand. Results are the mean ± SEM of 2-3 association curves performed in triplicate.

Table III. Kinetic Constants for [³H]Glycine Association

	P ₁ fraction		P ₂ fraction	
	Control	Spermine (50 μM)	Control	Spermine (50 μM)
k_{+1} ($\times 10^{-5}$ nM ⁻¹ min ⁻¹)	7.42 ± 3.82	4.89 ± 3.88	7.50 ± 2.50	4.72 ± 2.54
k_{-1} ($\times 10^{-3}$ min ⁻¹)	7.35 ± 2.60	4.61 ± 2.80	8.61 ± 1.68	6.81 ± 1.62
$K_d = k_{-1}/k_{+1}$ (nM)	98.96	94.17	114.80	144.10

k_{+1} and k_{-1} values from association experiments were calculated by linear regression from the graph obtained plotting mean k_{obs} values in Table II versus [³H]glycine concentration according to the equation $k_{obs} = k_{+1}([^3\text{H}]\text{glycine}) + k_{-1}$ (27). k_{+1} and k_{-1} values represent, respectively, the slope and the ordinate intercept. Values obtained for P₁ and P₂ fraction in the absence (control) and presence of spermine, did not differ significantly ($p < 0.05$, Student's *t* test).

spermine on NMDA receptors (28). These findings favor the idea that inhibition of [³H]glycine binding by spermine could participate in the modulation of NMDA receptor activity. Thus, our results indicate that although the polyamine recognition site in chick retina shares pharmacological properties with that in NMDA receptors from other regions of the CNS (28), the mechanism linking the spermine site to the glycine site could be different.

On the other hand, the inhibitory effect of high concentrations (1 mM) of spermine on non-specific glycine binding, could be due to changes in the ionic environment or, alternatively, to a charge-induced modification of synaptosomal membranes (29).

Previous reports (30) have shown that [³H]spermidine binding sites in synaptic membranes are solubilized by deoxycholic acid, which suggests that endogenous polyamines could interact with negative charges on synaptic membranes, including the NMDA receptors (5,31,32), thus exerting a neuromodulatory role on NMDA-induced responses. Moreover, spermine, even at 1 mM concentration, does not affect non-specific [³H]glutamate binding,² which involves different charge-interactions from those of glycine.

Our results differ from those published by Ransom and Deschenes (6) and by Sacaan and Johnson (7), demonstrating an increase in [³H]glycine binding induced by

spermine in membranes from cerebral cortex, under similar conditions to the present study, which further supports that retinal NMDA receptors differ from those in the cerebral cortex. In this regard, Monyer et al. (11) found that the expression of mRNA for the NMDA receptor subunits shows a distinct distribution within the CNS, suggesting that stoichiometry could determine the regional variation in pharmacological properties of NMDA heteromeric receptors.

On this line, the expression of NMDA receptor subunit NR2C is restricted to the retina and the cerebellum (11,17). In the later, Rao et al. (33) found in an *in vivo* preparation, an inhibition of cGMP accumulation, by spermine and spermidine, induced by the activation of the glycine site of NMDA receptors. Furthermore, Reynolds and Palmer (34) have shown that cerebellar NMDA receptors exhibit a significantly lower affinity for [³H]MK801 than those in the cortex. Comparatively, potentiation of MK-801 binding by glycine in embryonic chick retina is much lower than in the CNS (23). Based on these studies it can be speculated that inhibitory effect of spermine is related to NMDA receptors bearing NR2C chain. However, this effect was not observed in recombinant NR1/NR2C receptors expressed in a heterologous system (35).

Wafford et al. (36) have postulated that NMDA receptors contain a minimum of two NR2 subunits, which

² **Unpublished observations**

could be different. In support of this assumption, Luo et al (37) demonstrated, in adult rat cerebral cortex, that most NMDA receptors contain at least three different subunits: NR1/NR2A/NR2B, and only a minor fraction is composed of two subunits, NR1/NR2B or NR1/NR2A. Possibly in the retina, NR2C coexpressed with NR1 and other NR2 subunits, has different properties from recombinant heteromeric receptor assemblies with only one type of NR2. Moreover, the possibility of splice variants of the NR1 subunit being involved in the regulation of spermine stimulation (38,39), cannot be excluded. Thus, differences in the effects of polyamines on NMDA receptor properties, in the retina and the CNS, might be related to differential expression of splice variants and/or of NR2 subunits.

In conclusion, our findings indicate that the glycine site of NMDA retinal receptors shows a negative modulation by polyamines, and hence differs from those described in the CNS.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge the excellent technical support of Q.F.B. Edith López-Hernández. This work was supported by grant 3286P-N from CONACyT to A. M. López-Colomé.

REFERENCES

- Rock, D. M., and MacDonald, R. L. 1995. Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:463-482.
- Seiler, N. 1981. Polyamines metabolism and function in brain. *Neurochem. Int.* 3:95-110.
- Benveniste, M., and Mayer, M. L. 1993. Multiple effects of spermine on *N*-methyl-D-aspartate receptor responses of rat cultured hippocampal neurons. *J. Physiol.* 464:131-163.
- Ransom, R. W., and Stec, N. L. 1988. Cooperative modulation of [³H]MK-801 binding to the *N*-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J. Neurochem.* 51:830-836.
- Williams, K., Zappia, A. M., Pritchett, D. B., Shen, Y. M., and Molinoff, P. B. 1994. Sensitivity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol. Pharmacol.* 45:803-809.
- Ransom, R. W., and Deschenes, N. L. 1990. Polyamines regulate glycine interaction with the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Synapse* 5:294-298.
- Sacaan, A. I., and Johnson, K. M. 1989. Spermine enhances binding to the glycine site associated with the *N*-methyl-D-aspartate receptor complex. *Mol. Pharmacol.* 36:836-839.
- Rock, D. M., and MacDonald, R. L. 1992. The polyamine spermine has multiple actions on *N*-methyl-D-aspartate receptor single channel currents in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* 41: 83-88.
- Rock, D. M., and MacDonald, R. L. 1992. Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of *N*-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. *Mol. Pharmacol.* 42:157-164.
- Hollmann, M., and Heinemann, S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17:31-108.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., and Mishina, M. 1992. Molecular diversity of NMDA receptor channel. *Nature* 358:36-41.
- Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K., and Mishina, M. 1992. Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* 357:70-74.
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akasawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M., and Nakanishi, S. 1993. Molecular characterization of the family of the *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 268: 2836-2843.
- Nakanishi, S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- López-Colomé, A. M. 1986. Amino acids as excitatory transmitters in the retina. Pages 143-157, in P. J. Roberts, J. Storm-Mathisen and H. F. Bradford (eds.), *Excitatory amino acids*, Macmillan Press, London.
- Brandstätter, J. H., Hartveit, E., Sassoè-Pognetto, M., and Wässle, H. 1994. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 6:1100-1112.
- Koulen, P., Sassoè-Pognetto, M., Grunert, U., and Wässle, H. 1996. Selective clustering of GABA(A) and glycine receptors in the mammalian retina. *J. Neurosci.* 6:2127-2140.
- Lombardi, G., Moroni, F., and Moroni, F. 1994. Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. *Eur. J. Pharmacol.* 271:489-495.
- Chen, J., Graham, S., Moroni, F., and Simon, R. 1993. A dose-response study of a glycine receptor antagonist in focal ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 937.
- Pellegrini-Giamperio, D., Cozzi, A., and Moroni, F. 1993. 7-Cl-Thiokynurenic acid: a glycine antagonist and free radical scavenger that reduced CA1 ischemic damage in vivo. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19:1645.
- López-Colomé, A. M., and Somohano, F. 1992. *N*-methyl-D-aspartate receptors in the retina: 3-[(±)-2-carboxypiperazin-4-yl]-propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies. *Neuropharmacology* 6:577-584.
- Boje, K. M., Skolnick, P., Raber, J., Fletcher, R. T., and Chader, G. 1992. Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem. Int.* 4:473-486.
- López-Colomé, A. M., Salceda, R., and Pasantes-Morales, H. 1978. Potassium-stimulated release of GABA, glycine and taurine from the chick retina. *Neurochem. Res.* 3:431-441.
- Lowry, O. H., Rosebrough, W. H., Farr, A. L., and Randall, R. S. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- López-Colomé, A. M., Calderón, F., and Rodríguez, A. 1995. Modulatory effects of polyamines on strychnine-insensitive glycine receptors in chick retina. *Soc. Neurosci. Abstr.* Vol. 21, p. 145.20.
- Weiland, G. A., and Molinoff, P. B. 1981. Quantitative analysis of drug-receptor interactions. I. Determination of kinetic and equilibrium properties. *Life Sci.* 29:313-330.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

28. Williams, K., Romano, C., Dichter, M. A., and Molinoff, P. B. 1991. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.* 48:469-498.
29. Ballas, S. K., Mohandas, N., Marton, L. J., and Shohet, S. B. 1983. Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:1942-1946.
30. Yoneda, Y., Ogita, K., Enomoto, R., Suzuki, T., and Kito, S. 1991. Identification and characterization of specific binding sites of [³H]spermidine in synaptic membranes of rat brain. *Brain Res.* 563:17-27.
31. Kashiwagi, K., Fukuchi, J., Chao, J., Igarashi, K., and Williams, K. 1996. An aspartate residu in the extracellular loop of the *N*-methyl-D-aspartate receptor controls sensitivity to spermine and protons. *Mol. Pharmacol.* 49:1131-1141.
32. Gallagher, M. J., Huang, H., Pritchett, D. B., and Lynch, D. R. 1996. Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 271:9603-9611.
33. Rao, T. S., Cler, J. A., Mick, S. J., Iyengar, S., and Wood, P. L. 1991. Polyamines modulate events mediated by the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex through an ifenprodil-insensitive pathway: in vivo measurements of cyclic GMP in the cerebellum. *Neuropharmacology* 30:567-573.
34. Reynolds, I. J., and Palmer, A. M. 1991. Regional variations in [³H]MK801 binding to rat brain *N*-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurochem.* 56:1731-1740.
35. Williams, K. 1995. Pharmacological properties of recombinant *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors containing the $\epsilon 4$ (NR2D) subunit. *Neurosci. Lett.* 184:181-184.
36. Wafford, K. A., Bain, C. J., Bourdelles, B. L., Whiting, P. J., and Kemp, J. A. 1993. Preferential co-assembly of recombinant NMDA receptors composed of three different subunits. *Neuroreport.* 4:1347-1349.
37. Luo, J., Wang, Y., Yasuda, R. P., Dunah, A. W., and Wolfe, B. B. 1997. The majority of *N*-methyl-D-aspartate receptor complexes in rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol. Pharmacol.* 51:79-86.
38. Guylaine, M. D., Bennett, M. V. L., and Zukin, S. 1993. Splice variants of the *N*-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6731-6735.
39. Traynelis, S. F., Hartley, M., and Heinemann, S. F. 1995. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268:873-876.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Research report

Calcium-independent release of [³H]spermine from chick retina

Froylan Calderón^a, Gabriela Rodríguez^a, Edith López^a, Ana María López-Colomé^{a,b,*}

^a Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-253, 04510 Mexico D.F., Mexico

^b Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-253, 04510 Mexico D.F., Mexico

Accepted 21 September 1999

Abstract

Spermine has been shown to influence NMDA receptor function through an interaction at the coagonist site for glycine in the central nervous system (CNS) and the retina. In order to support a role for spermine as neurotransmitter or neuromodulator in the chick retina, specific stimulated-release of spermine should be demonstrated. Isolated chick retinas, preloaded with [³H]spermine, were stimulated with 1 mM NMDA and other glutamate agonists at ionotropic receptors, in a continuous superfusion system. [³H]spermine was released from the retina by depolarization with 50 mM KCl, in a Ca²⁺-independent manner. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by ouabain or digitoxigenin also induced spermine release following 36 min in the presence of the drugs; such effect seems unrelated to changes in Na⁺ electrochemical gradients, since nigericin and veratrine did not induce release in Na⁺ containing medium. The lack of effect of glutamate, NMDA and kainate at 1 mM concentration, suggests that release of spermine in the retina is mediated by the reversal of uptake and not necessarily linked to EAA-receptor activation. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Spermine; NMDA receptor; Chick retina

1. Introduction

Endogenous polyamines, as spermine and spermidine, are synthesized from ornithine via ornithine decarboxylase (ODC), and putrescine thus formed enters a closed synthetic loop in which putrescine, spermidine, and spermine are essentially interconvertible and extremely long-lived. Polyamine concentration and metabolism as well as ODC are high in developing tissue [6]; an increase in these parameters is observed in nervous tissue upon activation of voltage- or receptor-operated calcium channels [14,19,20]. Inhibition of polyamine synthesis by the irreversible ODC inhibitor difluoromethylornithine abolishes calcium entry through various receptor-linked or voltage-regulated calcium channels, which can be restored by the addition of putrescine [14,15,19,21]. This property would place such compounds in a powerful position in relation to the control of cerebral neurotransmission. Recently, spermidine and

spermine have been postulated as neuromodulators or neurotransmitters [31,34]. These molecules interact with the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) type of glutamate receptor, probably as neuromodulators, evoking distinct effects which indicates the presence of more than one polyamine binding-site on this receptor-channel [2,31]. Two of these effects are related to the coagonist glycine. In the presence of a saturating concentration of glycine, spermine and spermidine induce an increase in whole-cell current and also in the binding of [³H]MK-801, possibly due to an increase in the frequency of NMDA receptor-channel opening [2,29,37]; in the presence of subsaturating concentrations of glycine, spermine and spermidine increase the affinity of the NMDA receptors for this amino acid [30,33]. Polyamine effects are not restricted to the NMDA receptor; they also potentiate the depolarizing effects of kainate [4], inhibit the binding of nicotinic receptor and channel ligands [1], modulate the binding of ω -conotoxin to the N-type calcium channel [27], and inhibit P-type calcium channels [8].

Little is known regarding the factors that control polyamine activity in the brain. In rat striatum, spermine and spermidine are selectively released by NMDA-recep-

* Corresponding author. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-253, 04510 Mexico D.F., Mexico. Fax: +52-5-622-56-07; e-mail: acolome@ifisiol.unam.mx

tor activation [10] and by sodium-pump inhibition with ouabain [11]. [^3H]spermidine can also be released from brain slices by depolarizing stimuli in a Ca^{2+} -dependent manner [12].

In the retina, excitatory transmission from photoreceptors to bipolar cells, as well as from bipolar cells to ganglion cells uses glutamate as a transmitter, acting through ionotropic (NMDA, AMPA/KA) as well as metabotropic receptors [9].

Recent results demonstrate that the effects evoked by spermine on NMDA receptors from plexiform layers of chick retina, differ from those in other regions of the central nervous system (CNS [5]). In order to understand the role of spermine as neurotransmitter or neuromodulator in chick retina, specific release of spermine should be demonstrated.

2. Materials and methods

Retinas, free from pigment epithelium, were obtained from 1–3-day-old chicks and incubated for 60 min at 37°C in Krebs Ringer Bicarbonate buffer (NaCl, 118 mM; KCl, 4.7 mM; KH_2PO_4 , 1.2 mM; CaCl_2 , 2.5 mM; MgSO_4 , 1.17 mM; NaHCO_3 , 25 mM; glucose, 5.6 mM) pH 7.4 (KRB), containing 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^3H]spermine. After washing, retinas were transferred to isolated superfusion chambers and superfused with oxygenated KRB or Na^+ , Ca^{2+} -, Mg^{2+} -free KRB at a flow rate of 0.5 ml/min; 6-min fractions were collected. NMDA or other stimulants were included for 18–24 min, 42 min after the start of collection. Antagonists were present from the beginning of superfusion and removed with the withdrawal of the stimulus. Na^+ -free media were prepared by replacement of NaCl by choline chloride and of NaHCO_3 by Tris-Cl, pH 7.4. Radioactivity in the perfusates and that remaining in solubilized tissue (1 ml of 1 N NaOH) at the end of the experiment, were counted by liquid scintillation spectrometry.

Table 1

Effect of glutamate receptor agonists and antagonists on [^3H]spermine release from chick retina

[^3H]spermine release was measured as described in Section 2. CNQX and MCPG were included 42 min before the agonist. The results were expressed as percent release over pre-stimulation value (100%). Data are the means \pm S.E.M. of two to four independent experiments.

Stimulating agent	ERC (%)
None	100.00
Glutamate (1 mM)	103.68 \pm 14.17
Glutamate (5 mM) + threo-3-hydroxyaspartate (200 μM)	95.96 \pm 4.03
Kainate (1 mM)	105.47 \pm 6.65
NMDA (1 mM)	98.28 \pm 5.82
NMDA (1 mM) + MCPG (200 μM)	92.19 \pm 1.16
Glutamate (1 mM) + CNQX (100 μM)	83.33 \pm 3.33
Glutamate (1 mM) + MCPG (200 μM)	100.00 \pm 0.00

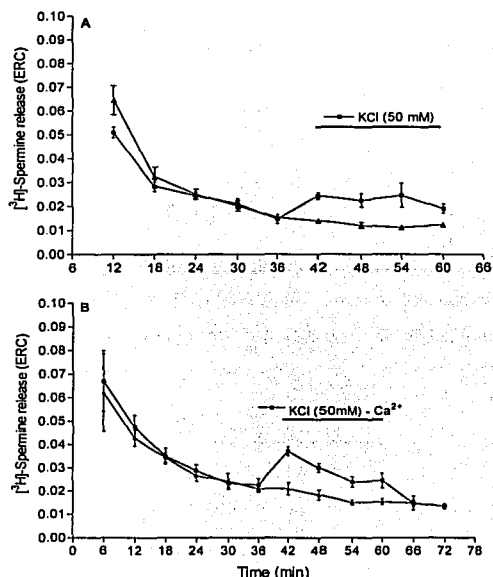


Fig. 1. Stimulation of [^3H]spermine release from chick retina by high K^+ . Superfusion was carried out as described in Section 2. KRB was substituted by KRB containing 50 mM KCl during the period indicated by the horizontal bar, after which, medium was replaced by normal KRB. (A) Release in Ca^{2+} -containing KRB. (B) Release in Ca^{2+} -free KRB, containing 100 μM EGTA plus 10 μM BAPTA AM. (\blacktriangle - \blacktriangle) Control conditions. Data are the means \pm S.E.M. of four experiments. ERC: efflux rate constant.

try. The results were expressed as the efflux rate constant (ERC), which is the fractional rate of radioactivity released per unit time, with respect to the total radioactivity incorporated by the tissue.

Table 2

Na^+ - and Ca^{2+} -dependence of depolarization-induced release of [^3H]spermine

[^3H]spermine release was measured as described in Section 2. The results were expressed as percent release over pre-stimulation value (100%). Data are the means \pm S.E.M. of two to four independent experiments.

Stimulating agent	ERC (%)
None	100.00
KCl (50 mM)	170.13 \pm 13.94
KCl (50 mM) - Na^+	140.33 \pm 7.27
KCl (50 mM) + TTX (1 μM)	136.35 \pm 6.16
KCl (50 mM) + EGTA (500 μM)	169.98 \pm 11.99
KCl (50 mM) + BAPTA AM (10 μM)	142.67 \pm 1.97
KCl (50 mM) + EGTA (100 μM) + BAPTA AM (10 μM)	168.82 \pm 11.73
Nigericin (5 μM)	99.73 \pm 3.44
Veratrine (67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	101.72 \pm 6.96
Veratrine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	87.41 \pm 3.95

3. Results

Results in Table 1 show that 1 mM glutamate in the superfusion media had no effect on spontaneous [3 H]spermine release. The inclusion of threo-3-hydroxyaspartate, a glutamate uptake inhibitor, at 200 μ M concentration, did not modify this result.

The effect of specific agonists at ionotropic glutamate receptors on spermine release was also explored. Kainate (1 mM) and NMDA (1 mM) were tested; neither compound showed an effect on control release (\approx 20% of total [3 H]spermine incorporated by the tissue).

No effect was observed when 6-ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 100 μ M) or (*RS*)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG, 200 μ M), antagonists at AMPA/KA and metabotropic glutamate receptors, respectively, were tested in order to discard crossed-inhibition of NMDA receptor activation by glutamate. As can be seen in Table 1, NMDA itself had no effect on release even in the presence of MCPG.

Depolarization induced by 50 mM KCl, stimulated [3 H]spermine release in a Ca^{2+} -independent fashion, since the effect was not modified in the presence of EGTA (100 μ M–1 mM) and the intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA-AM (10 μ M) (Fig. 1A,B; Table 2).

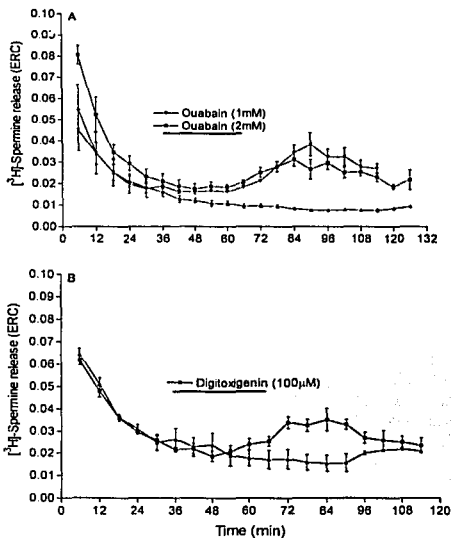


Fig. 2. Effect of Na^+/K^+ -ATPase inhibitors on [3 H]spermine release from chick retina. (A) Ouabain-induced release of [3 H]spermine. The horizontal bar denotes the inclusion of 1–2 mM ouabain. (B) Effect of digitoxigenin on the release of [3 H]spermine. The horizontal bar denotes the inclusion of 100 μ M digitoxigenin. (\blacktriangle - \blacktriangle) Control conditions. Data are the means \pm S.E.M. of two to four experiments. ERC: efflux rate constant.

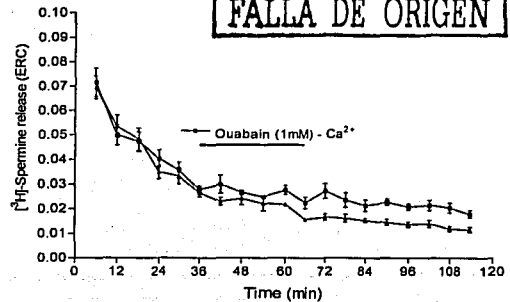


Fig. 3. Ca^{2+} -dependence of [3 H]spermine release induced by ouabain. Retinas were incubated for 1 h at 37°C in Ca^{2+} -free KRB pH 7.4, containing 1 μ Cl/ml [3 H]spermine and BAPTA AM (10 μ M). Superfusion was performed in Ca^{2+} -free KRB containing 500 μ M EGTA. The horizontal bar denotes the inclusion of ouabain. (\blacktriangle - \blacktriangle) Control conditions. Data are the means \pm S.E.M. of four experiments. ERC: efflux rate constant.

High K^+ -induced release is also Na^+ -independent, since it was evident in Na^+ -free medium, as well as in the presence of 1 μ M TTX, and was also unaffected by veratrine (67–100 μ g/ml) or 5 μ M nigericin (Table 2).

Inhibition of Na^+/K^+ -ATPase by ouabain (1 mM) or digitoxigenin (100 μ M) by superfusion with the drugs during 36 min, potently stimulated [3 H]spermine release from the retina which peaked 15 min after the withdrawal of the drugs (Fig. 2A,B). Ouabain has no effect in Ca^{2+} -free KRB containing 500 μ M EGTA plus 10 μ M BAPTA AM (Fig. 3). The release evoked by both, high K^+ and steroids, returned to control levels upon removal of the compounds.

4. Discussion

The main finding of the present study is that [3 H]spermine release from chick retina is not mediated by glutamate receptor activation. Polyamines have been shown to affect NMDA receptors in different ways [2,29–31,33,37] and also, their release from rat striatum upon stimulation of these receptors has been documented [10], suggesting a modulatory role for these compounds in EAA neurotransmission. Our results show that [3 H]spermine is released from the retina by K^+ -depolarization, in a Ca^{2+} -independent manner. These data suggest that the release of spermine in this preparation could be mediated by the reversal of uptake, and not necessarily linked to specific receptor activation, as proposed in the CNS. On this line, it is well known that a high concentration of KCl in the extracellular medium changes the driving force for the transport system [24,28,35]. In such condition, release is triggered by the reversal of uptake.

The effect of ouabain and digitoxigenin on polyamine release (Fig. 2A,B) may be, in part, directly related to depolarization. Ca^{2+} -independent ouabain-induced release

of diverse neurotransmitters such as DA, ACh and GABA has been documented and ascribed to the inversion of the Na^+/K^+ ion gradients and the consequent reversal of high affinity uptake [24,28,36]. Additionally, the release of [^3H]spermine from cortical slices induced by ouabain is Ca^{2+} -independent [12].

High-affinity Na^+ - and energy-dependent transport of spermine and spermidine has been characterized in cerebral cortex preparations [13], which is only partially inhibited by ouabain [17]; the small residual internalization of spermidine might reflect a Na^+ -independent component of transport. This has also been observed in rat intestinal brush-border membrane vesicles, in which spermine uptake showed to be independent of Na^+ electrochemical gradient [16,18]. In the retina, neither veratrine nor nigericin evoked [^3H]spermine release (Table 2), suggesting a Na^+ -independent component of polyamine transport. In support of this idea, although ouabain and digitoxigenin stimulate [^3H]spermine release, this effect is observed only after 30 min in the presence of the steroids (Fig. 1A,B). Based on these data, we suggest that ouabain and digitoxigenin potentiate [^3H]spermine release through an increase in intracellular $[\text{Na}^+]$ due to Na^+/K^+ -ATPase inhibition, which in turn activates the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport system. The resulting increase in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$, possibly activates a second messenger pathway which regulates spermine release. On this regard, ouabain has no effect in Ca^{2+} -free KRB (Fig. 3), and the PKC inhibitors H-7 and sphingosine have been shown to inhibit spermidine efflux from human lymphocytes [17].

NMDA receptors in chick retina show distinct pharmacological properties regarding antagonists directed to the strychnine-insensitive glycine binding site [22]. Although 7-Cl-thiokynurenic acid has been shown to reduce significantly neuronal loss in different brain areas, following focal and global ischemia [7,26], in the retina, this compound completely failed to prevent ischemic damage and to inhibit strychnine-insensitive [^3H]glycine binding [22,32]. Furthermore, potentiation of MK-801 binding by glycine, is weak in embryonic chick retina compared with the CNS [3]. Also in this tissue, neither glycine nor its selective agonist at NMDA modulatory site, 1-aminocyclopropane-carboxylic acid (ACPC), potentiate NMDA toxicity, but actually protect retinal neurons [3]. [^3H]CPP binding to retinal membranes, also shows significant pharmacological and biochemical differences from that in the CNS [23].

Differences observed in the interaction of polyamines with NMDA receptors in the retina and the CNS, could well be related to a distinct heteromeric assembly in both cases. This assumption is in keeping with results showing that although [^3H]spermidine and [^{14}C]acetylcholine are released by NMDA receptor activation in rat striatum, the release of such compounds shows different sensitivity to Mg^{2+} and ifenprodil, suggesting the activation of different populations of NMDA receptors [25].

Results presented here support a physiological role for polyamines in the modulation of excitatory neurotransmission in the retina, and show that the release of spermine is triggered by a different mechanism from that in the CNS.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants 3286P-N from CONACyT, 201316 and IN-210998 from DGAPA-UNAM.

References

- [1] N. Anis, S. Sherby, R. Goodnow Jr., M. Niwa, K. Konno, T. Kallimopoulos, R. Bukownik, K. Nakanishi, P. Usherwood, A. Eldefrawi, M. Eldefrawi, Structure-activity relationships of philanthotoxin analogs and polyamines on *N*-methyl-D-aspartate and nicotinic acetylcholine receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254 (1990) 764–773.
- [2] M. Benveniste, M.L. Mayer, Multiple effects of spermine on *N*-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurons, *J. Physiol.* 464 (1993) 131–163.
- [3] K.M. Boje, P. Skolnick, J. Raber, R.T. Fletcher, G. Chader, Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity, *Neurochem. Int.* 4 (1992) 473–486.
- [4] P. Brackley, R. Goodnow Jr., K. Nakanishi, H.L. Sudan, P.N.R. Usherwood, Spermine and philanthotoxin potentiate excitatory amino acid responses in *Xenopus* oocytes injected with rat and chick brain RNA, *Neurosci. Lett.* 114 (1990) 51–56.
- [5] F. Calderón, A.M. López-Colomé, Spermine inhibits [^3H]glycine binding at the NMDA receptors from plexiform layers of chick retina, *Neurochem. Res.* 23 (1998) 1363–1369.
- [6] E.S. Canellakis, D. Viceps-Madore, D.A. Kyriakidis, J.S. Heller, The regulation and function of ornithine decarboxylase and of the polyamines, *Curr. Top. Cell. Regul.* 15 (1979) 155–202.
- [7] J. Chen, S. Graham, F. Moroni, R. Simon, A dose-response study of a glycine receptor antagonist in focal ischemia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267 (1993) 937.
- [8] B.D. Cherksey, R. Llinas, M. Sugimori, International patent, WO 91/00853, 1991.
- [9] C.J. Barnstable, Glutamate and GABA in retinal circuitry, *Curr. Opin. Neurobiol.* 3 (1993) 520–525.
- [10] D. Fage, C. Voltz, B. Scatton, C. Carter, Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by *N*-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo, *J. Neurochem.* 58 (1992) 2170–2175.
- [11] D. Fage, C. Voltz, C. Carter, Ouabain releases striatal polyamines in vivo independently of *N*-methyl-D-aspartate receptor activation, *J. Neurochem.* 61 (1993) 261–265.
- [12] R.J. Harman, G.G. Shaw, The spontaneous and evoked release of spermine from rat brain in vitro, *Br. J. Pharmacol.* 73 (1981) 165–174.
- [13] R.J. Harman, G.G. Shaw, High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex, *J. Neurochem.* 36 (1981) 1609–1615.
- [14] Z. Iqbal, H. Koenig, Polyamines appear to be second messengers in mediating Ca^{2+} fluxes and neurotransmitter release in potassium-depolarized synaptosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133 (1985) 563–573.
- [15] Z. Iqbal, H. Koenig, A.D. Goldstone, C.Y. Lu, F. Siddiqui, Presynaptic NMDA receptors regulate polyamine synthesis, Ca^{2+} fluxes, and transmitter release at axon terminals, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11 (Suppl.) (1991) S114, Abstr.

- [16] K. Iseki, M. Kobayashi, K. Miyazaki, Spermine uptake by rat intestinal brush-border membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1068 (1991) 105–110.
- [17] N.A. Khan, V. Quemener, J.-Ph. Moulinoux, Characterization of polyamine transport pathways, in: C. Carter (Ed.), *The Neuropharmacology of Polyamines*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 61–80.
- [18] M. Kobayashi, K. Iseki, H. Saitoh, K. Miyazaki, Uptake characteristics of polyamines into rat intestinal brush-border membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 1105 (1992) 177–183.
- [19] H. Koenig, A. Goldstone, C.Y. Lu, Polyamines regulate calcium fluxes in rapid plasma membrane response, *Nature* 305 (1983) 530–534.
- [20] H. Koenig, C.C. Fan, A.D. Goldstone, C.Y. Lu, J.J. Trout, Polyamines mediate androgenic stimulation of calcium fluxes and membrane transport in rat heart myocytes, *Circ. Res.* 64 (1989) 415–426.
- [21] H. Koenig, A.D. Goldstone, C.Y. Lu, Polyamines mediate the reversible opening of the blood-brain barrier by the intracarotid infusion of hyperosmolar mannitol, *Brain Res.* 483 (1989) 110–116.
- [22] G. Lombardi, F. Moroni, F. Moroni, Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage, *Eur. J. Pharmacol.* 271 (1994) 489–495.
- [23] A.M. López-Colomé, F. Somohano, *N*-methyl-D-aspartate receptor receptors in the retina: 3-[(±)-2-carboxypiperazin-4-yl]-propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies, *Neuropharmacology* 6 (1992) 577–584.
- [24] D. Nicholls, D. Attwell, The release and uptake of excitatory amino acids, *Trends Pharmacol. Sci.* 11 (1990) 462–468.
- [25] C. Nicolas, D. Fage, C. Carter, NMDA receptors with different sensitivities to magnesium and ifenprodil control the release of [¹⁴C]acetylcholine and [³H]spermidine from rat striatal slices in vivo, *J. Neurochem.* 62 (1994) 1835–1839.
- [26] D. Pellegrini-Giampietro, A. Cozzi, F. Moroni, 7-Cl-thiokynureic acid: a glycine antagonist and free radical scavenger that reduced CA1 ischemic damage in vivo, *Soc. Neurosci. Abstr.* 19 (1993) 1645.
- [27] L.M. Pullan, R.A. Keith, D. LaMonte, R.J. Stumpo, A.I. Salama, The polyamine spermine affects ω-conotoxin binding and function at N-type voltage-sensitive calcium channels, *J. Auton. Pharmacol.* 10 (1990) 213–219.
- [28] M. Raiteri, F. Ferrito, A.M. Cervoni, G. Levi, Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208 (1979) 195–202.
- [29] R.W. Ransom, N.L. Stec, Cooperative modulation of [³H]MK-801 binding to the of *N*-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines, *J. Neurochem.* 51 (1988) 830–836.
- [30] R.W. Ransom, N.L. Deschenes, Polyamines regulate glycine interaction with the *N*-methyl-D-aspartate receptor, *Synapse* 5 (1990) 294–298.
- [31] D.M. Rock, R.L. MacDonald, Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 (1995) 463–482.
- [32] A. Rodríguez-Contreras, F. Calderón, A.M. López-Colomé, Strychnine-insensitive [³H]glycine binding to synaptosomal membranes from the chick retina, *Int. J. Dev. Neurosci.* 16 (1998) 413–421.
- [33] A.I. Saccaan, K.M. Johnson, Spermine enhances binding to the glycine site associated with the *N*-methyl-D-aspartate receptor complex, *Mol. Pharmacol.* 36 (1989) 836–839.
- [34] N. Seiler, Polyamines metabolism and function in brain, *Neurochem. Int.* 3 (1981) 95–110.
- [35] G.G. Shaw, Polyamines as neurotransmitters or modulators, in: C. Carter (Ed.), *The Neuropharmacology of Polyamines*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 61–80.
- [36] B.H.C. Westerink, G. Damsma, J.B. De Vries, 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 (1989) 705–712.
- [37] K. Williams, A.M. Zappia, D.B. Pritchett, Y.M. Shen, P.B. Molinoff, Sensitivity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits, *Mol. Pharmacol.* 45 (1994) 803–809.

d) Captura de espermina^[3H] en la retina de pollo.

Se caracterizó la captura de espermina^[3H] en la retina de pollo. En este tejido la captura de este polication no se satura (Figura 1, A). El tiempo requerido para alcanzar el equilibrio a 37°C es ≈ 30 min (Figura 2) y no depende del gradiente electroquímico del Na⁺ (Tabla 1). Asimismo, ni la ausencia de Cl⁻, ni la despolarización inespecifica inducida con KCl (50 mM) afectan la captura (Tabla 1).

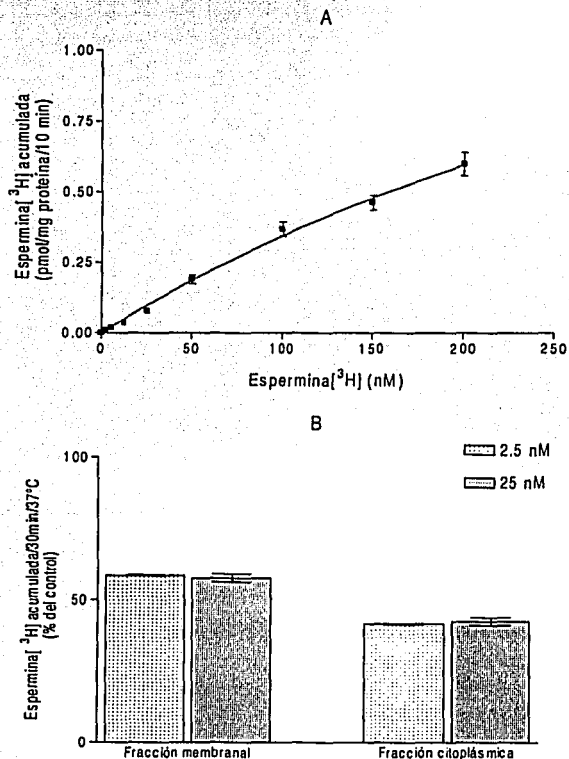


Figura 1. Curva de saturación de la captura de espermina^[3H] en la retina de pollo. **A)** las retinas se incubaron 10 min a 37°C en medio KRB que contenía concentraciones crecientes de espermina^[3H] **B)** El tejido se incubó 30 min a 37°C en medio KRB que contenía 2.5 nM o 25 nM de espermina^[3H]. Las fracciones citoplásmica y membranal se obtuvieron por centrifugación. Los resultados representan la media ± E.S. de 2-3 determinaciones.

Tabla 1. Dependencia iónica de la acumulación de espermina[³H] en la retina.

Condición	Captura (%)
Control	100.00
KCl (50mM)	108.10 ± 14.84
KCl (100mM)	81.12 ± 8.48
- Na ⁺	123.28 ± 4.86
- Cl ⁻	112.83 ± 7.08
- Ca ²⁺	106.29 ± 5.8
EGTA (100μM)	108.90 ± 8.25
BAPTA (10μM)	98.43 ± 6.30
BAPTA/EGTA	93.38 ± 5.89

El tejido se incubó 10 min en la presencia de 12.5nM de espermina[³H] a 37°C en medio KRB que contenía 118 mM NaCl, o en medio KRB sin Na⁺ o Cl⁻. El Na⁺ se reemplazó con 118 mM cloruro de colina y el Cl⁻ fue reemplazado isoosmoticamente por gluconato de sodio, gluconato de potasio y gluconato de calcio. Los resultados están expresados como el porcentaje del valor control (100%). Los resultados son la media ± E.S. de 3-5 experimentos independientes.

En la retina de pollo la captura de espermina[³H] depende de la temperatura ya que fue mayor a 37°C que a 4°C (Figura 2). Aunque los inhibidores metabólicos que se probaron no afectaron considerablemente dicha captura (Tabla 2). Estos resultados sugieren que en la retina de pollo los lípidos de la membrana probablemente están directamente involucrados en el proceso de transporte de espermina[³H].

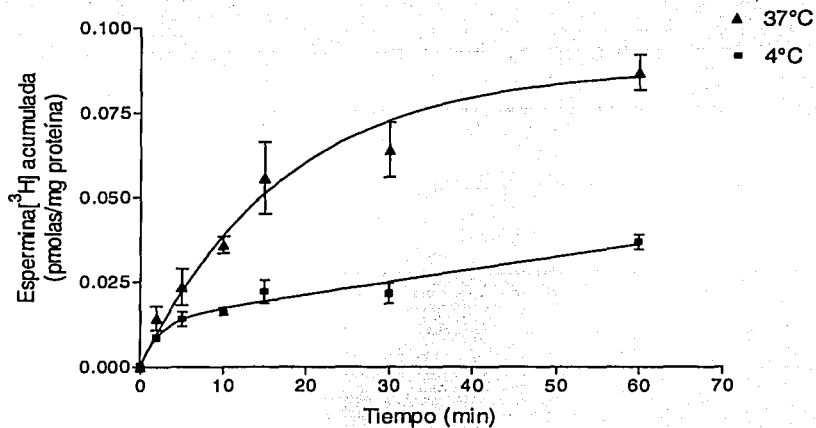


Figura 2. Curso-temporal de la captura de espermina^[3H] en la retina de pollo. El experimento se llevó a cabo en medio KRB que contenía 12.5 nM de espermina^[3H]. Los resultados representan la media \pm E.S. de 3-4 determinaciones.

Tabla 2. Efecto de inhibidores metabólicos en la acumulación de espermina^[3H] en la retina de pollo.

Agente	Captura (%)
Control	100.00
KCN (2mM)	92.81 \pm 5.07
Iodoacetato (2mM)	78.36 \pm 4.85
Dinitrofenol (2mM)	70.05 \pm 6.09
Ouabaina (1mM)	104.83 \pm 13.80

El tejido fue expuesto al agente 15 min, y se removió previo a la adición de espermina^[3H] (12.5nM). se midió la captura después de 20 min de incubación a 37°C. Los resultados están expresados como el porcentaje del valor control (100%). Los resultados son la media \pm E.S. de 3 experimentos independientes.

Para determinar si la captura de espermina en este tejido representa transporte o unión a membranas, se midió el efecto de un medio hipoosmótico en la captura de este polication. Asimismo, se determinó la radioactividad acumulada en la fracción

citoplásmica y en la membranal. Los resultados de estos experimentos demuestran que la espermina^[3H] se acumula en un compartimento osmóticamente sensible (Figura 3, A), aunque una proporción de este polication se une a membranas (Figura 3, B). Esta unión es mayor a 37°C que a 4°C (Figura 3, B). La relación radioactividad citoplásmica/membranal no varía con la concentración de espermina^[3H] empleada (Figura 1, B).

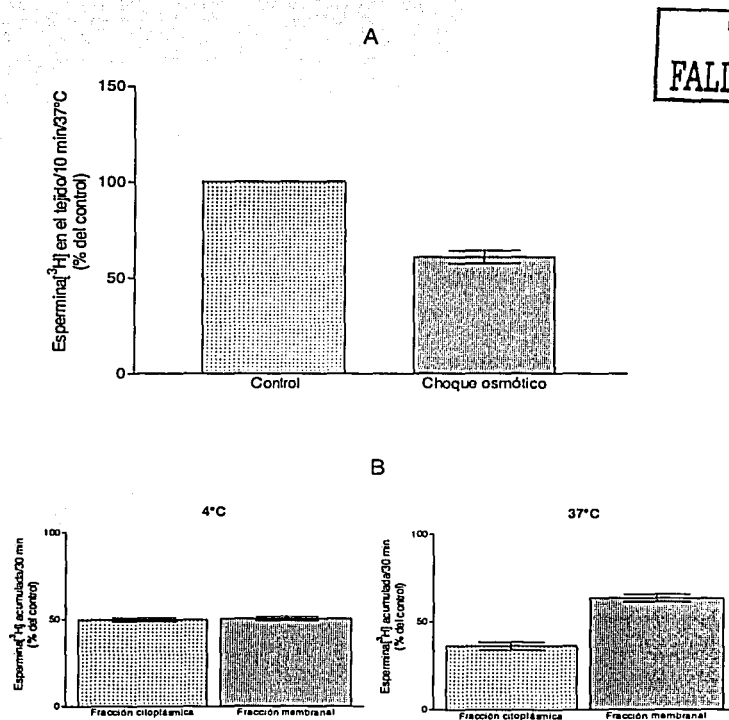


Figura 3. Efecto del choque osmótico en la acumulación de espermina^[3H]. **A)** Las retinas de pollo se incubaron 20 min a 37°C en medio KRB que contenía 12.5 nM de espermina^[3H], posteriormente se expusieron 10 min a condiciones hiposmóticas. **B)** El tejido se incubó 30 min a 37°C o 4°C en medio KRB que contenía 12.5 nM de espermina^[3H]. Las fracciones citoplásmica y membranal se obtuvieron por centrifugación. Los resultados representan la media ± E.S. de 2-6 determinaciones.

En la retina de pollo, la captura de espermina[³H] no se afecta por la espermina, espermidina o DET (Tabla 3), y es mayor a pH neutro y básico (Figura 4).

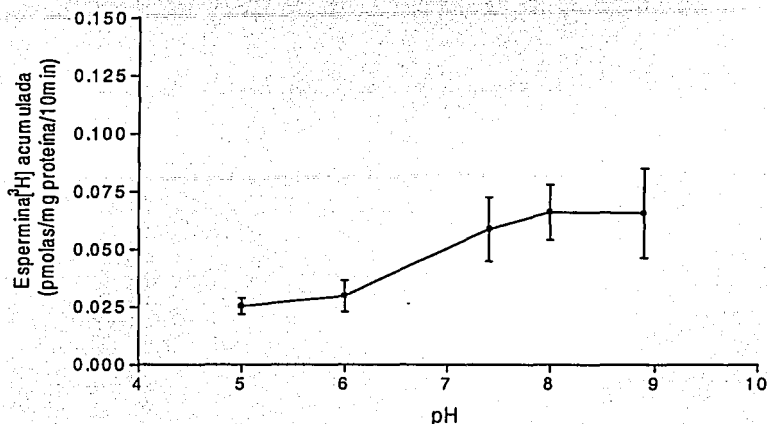


Figura 4. Efecto del pH en la acumulación de espermina[³H]. Las retinas de pollo se incubaron 10 min a 37°C en medio KRB a diferente pH (de 5 a 8.9) que contenían 12.5 nM de espermina[³H]. Los resultados representan la media ± E.S. de 4 determinaciones.

Tabla 3. Especificidad farmacológica de la captura de espermina[³H] en la retina.

Compuesto	Captura (%)
Control	100.00
Espermina (1mM)	107.03 ± 6.83
Espermina (2mM)	102.82 ± 4.44
Espermidina (1mM)	102.68 ± 11.24
Espermidina (2mM)	119.98 ± 12.88
Dietilentriamina (1mM)	111.13 ± 6.33
Dietilentriamina (2mM)	102.60 ± 7.11

El tejido se incubó 10 min en presencia de 12.5nM de espermina[³H] a 37°C junto con el compuesto indicado. Los resultados están expresados como el porcentaje del valor control (100%). Los resultados representan la media ± E.S. de 4-7 experimentos independientes.

VI. DISCUSIÓN

a) Características de los sitios de unión de la espermina a membranas sinaptosomales de la retina de pollo

Nuestros resultados demuestran la presencia de sitios de alta afinidad en ambas capas plexiformes de la retina de pollo. La unión específica de espermina^[3H] se concentra en la capa plexiforme interna con respecto a la externa, como ya se describió para la unión de glicina^[3H] a los receptores de tipo NMDA en esta misma preparación (75). La unión de espermina^[3H] a las membranas sinaptosomales de la retina de pollo se inhibe por DET, la espermina, y la espermidina. Las constantes de inhibición (IC₅₀) que se obtuvieron para estos compuestos están en el mismo intervalo de concentración de lo que ya se reportó en el SNC (92). Estos resultados demuestran en nuestra preparación la presencia de sitios de unión para PA de los receptores de tipo NMDA.

La espermina y espermidina generan varios efectos sobre los receptores de tipo NMDA, lo que sugiere la presencia de más de una población de sitios receptores para las PA en este receptor canal (16,18). Nuestros resultados indican que existe más de un sitio de unión y cooperatividad positiva para la unión de espermina^[3H] en las membranas sinaptosomales de la retina, porque la curva de saturación fue sigmoideal con un coeficiente de Hill mayor a 1.

En el SNC existen sitios saturables para la espermidina^[3H] y espermina^[3H], tanto de baja afinidad como de alta afinidad (60,61,62). Los sitios de baja afinidad se relacionan con fosfolípidos de membrana, puesto que se demostró una fuerte asociación de la espermina con la fosfatidil serina, además de que la unión de estas PA a estos sitios es insensible al tratamiento con proteasas y se potencia con la fosfolipasa A₂ y C (60). Es probable que los sitios de baja afinidad para estas PA sean

intracelulares y se relacionen con la estabilización de la membrana celular, como se demostró en la membrana de eritrocito (39). Por otra parte, cabe mencionar que se han medido concentraciones bajas de estas PA en el medio extracelular (93). A este respecto, se demostró que la espermina aplicada de manera extracelular en un parche de membrana, tiene un efecto de potenciación sobre los receptores de tipo NMDA (94), por lo que se propone que los sitios de alta afinidad se relacionan con los receptores de tipo NMDA.

Nuestros resultados indican que los sitios de las PA en los receptores de tipo NMDA de la retina, tienen características farmacológicas similares a las que se han descrito en el SNC, aunque en este tejido demostramos un proceso de cooperatividad positiva para la unión de espermina a estos receptores, que no está presente en los receptores de NMDA del SNC. Al menos uno de estos sitios corresponde con los que se han descrito en el SNC, ya que el coeficiente de Hill para la curva dosis-respuesta con DET es igual a 1. Asimismo, el efecto que tienen las PA sobre estos receptores difiere, como veremos más adelante, posiblemente porque la composición heteromérica de los receptores NMDA es distinta a la de los receptores que se expresan en el SNC.

b) Efecto de la espermina sobre la interacción de la glicina con el sitio del coagonista de los receptores de NMDA de membranas sinaptosomales de la retina de pollo

Encontramos que la unión de glicina^[3H] insensible a estriquina a las membranas de las capas plexiformes de la retina de pollo se inhibe por espermina. Dicha inhibición es de tipo no competitivo, ya que la espermina disminuye la unión máxima de glicina^[3H] sin afectar la afinidad de este aminoácido en ambas fracciones.

En la corteza cerebral, Ransom y Deschenes (15) y Sacaan y Johnson (40) demuestran que la espermina incrementa la unión de glicina^[3H] a los receptores de tipo NMDA. Los experimentos de estos investigadores se llevaron a cabo bajo condiciones similares a las empleadas en este trabajo, y la EC₅₀ que reportan esta en el mismo intervalo de concentración que la IC₅₀ que nosotros obtuvimos para la inhibición de glicina^[3H]. Lo anterior apoya la idea de que los receptores para NMDA en la retina difieren de los que se han caracterizado en la corteza cerebral. A este respecto, Monyer *et al.* (7) encontraron que la expresión del mRNA para las subunidades de los receptores de tipo NMDA muestra una distribución diferencial dentro del SNC, que sugiere una estequiometría muy particular para cada región del cerebro con variaciones farmacológicas de estos receptores heteroméricos.

La expresión de la subunidad NR2C se restringe a la retina y el cerebelo (7,95). Rao *et al.* (96) encontraron que en el cerebelo la espermina y espermidina inhiben la acumulación de cGMP producida por la activación del sitio de la glicina de los receptores de NMDA. Basándonos en estos estudios podemos especular que el efecto inhibitorio de la espermina se relaciona con los receptores de tipo NMDA que contienen subunidades NR2C. Sin embargo, este efecto inhibitorio de la espermina no se observó en receptores recombinantes que contenían subunidades NR1/NR2C, expresados en un sistema heterólogo (50). A este respecto, Wafford *et al.* (20) han postulado que los receptores de tipo NMDA contienen un mínimo de dos tipos de subunidades NR2. Apoyando esta idea están los experimentos de Luo *et al.* (97) en los que se demuestra que en la corteza cerebral de rata adulta, la mayoría de los receptores de tipo NMDA contienen al menos tres diferentes tipos de subunidades NR1/NR2A/NR2B y solo una fracción minoritaria está compuesta por subunidades NR1/NR2B o NR1/NR2A. Por esto último es probable que en los receptores

heteroméricos con un sólo tipo de subunidad NR2, no se observe el efecto que en este trabajo se describe. Asimismo, no se puede descartar la posibilidad de que la subunidad NR1 participe en el efecto que aquí se describe, ya que en el SNC las variantes del empalme alternativo de la subunidad NR1 están involucradas en la regulación del efecto estimulador que tiene la espermina en estos receptores (23,24).

En suma, nuestros resultados sugieren que la neurotransmisión excitadora en la retina difiere de lo que se conoce en el SNC.

c) Mecanismos de liberación de espermina^[3H] de la retina de pollo.

La espermina^[3H] se libera por despolarización inespecífica con KCl (50 mM), en una forma independiente de Ca²⁺ intracelular y extracelular. Lo anterior sugiere que la liberación del policatión está mediada por la actividad inversa del transportador de las PA, porque altas concentraciones de K⁺ extracelular, cambian la fuerza impulsora del sistema de transporte (98,99,100). Asimismo, nuestros resultados demuestran que la liberación de espermina^[3H] de la retina no está mediada por la activación de los receptores ionotrópicos para glutamato.

En la retina, al parecer, el transportador de las PA no depende de Na⁺, ya que la espermina^[3H] no se libera con la veratrina, o la nigericina, que funcionan como activador de los canales de Na⁺ dependientes del voltaje o como ionóforo de Na⁺ respectivamente. Asimismo, la liberación inducida con KCl (50 mM) no depende de Na⁺, ya que la liberación no se afecta aunque se estimule empleando medio sin Na⁺ o en presencia de TTX. Cabe mencionar que se han descrito sistemas de transporte de estos policatiónes que no se inhiben por la ouabaina (101), lo cual puede reflejar una independencia del Na⁺ para su funcionamiento. A este respecto, en la retina la espermina^[3H] se libera con inhibidores de la ATPasa de Na⁺ y K⁺, como la ouabaina

y la digitoxigenina. En este caso, el curso-temporal de esta respuesta (la liberación se da \approx 30 min después de adicionar el esteroide) nos sugiere que estos esteroides potencian la liberación de espermina [^3H] debido a que generan un incremento en la concentración de Na^+ intracelular, lo cual induce la entrada de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. El resultante incremento de Ca^{2+} intracelular podría estar activando una ruta de segundos mensajeros que regule la liberación de espermina [^3H] en este tejido. Apoyando esta idea están nuestros resultados que indican que la ouabaina no tiene efecto en medio KRB sin Ca^{2+} .

Nuestros resultados demuestran que la liberación de espermina en la retina es diferente al SNC, ya que en el cuerpo estriado de rata Fage *et al.* (32) demuestran una liberación selectiva de espermina y espermidina por la activación de los receptores de tipo NMDA. Lo anterior se puede apoyar por datos que indican que los receptores de tipo NMDA en la retina tiene propiedades farmacológicas distintas a las reportadas en el SNC (69,75). De esta manera, las diferencias en la liberación de espermina en la retina, en presencia de glutamato o NMDA, pueden estar relacionadas con las diferencias farmacológicas y bioquímicas que existen entre los receptores de tipo NMDA de la retina y el SNC. A este respecto, se demostró que aunque la espermidina [^3H] y la acetilcolina [^3H] se liberan del cuerpo estriado de la rata por activación de los receptores NMDA, el perfil farmacológico de los antagonistas de los mismos difiere considerablemente, lo que sugiere que los receptores NMDA estimulados en cada caso tienen estructura heteromérica diferente (102).

d) Mecanismos de captura de espermina^[3H] en la retina de pollo.

En células de mamífero las PA son capturadas por sistemas saturables y no saturables. Los sistemas de transporte saturables dependen de energía, temperatura y operan contra un gradiente de concentración. En muchos tipos celulares los sistemas de transporte de la putrescina y la espermidina son sensibles al Na⁺ (103,104). En su contraparte, en muchos tipos celulares, la captura de espermina no se afecta por cambios en la concentración extracelular de este catión (105).

En rebanadas de corteza cerebral de rata se describieron dos componentes de transporte de espermina de alta afinidad, dependientes de Na⁺ sensibles a inhibición por ouabafina (31). Recientemente en cultivos de astrocitos de cerebelo de ratón, se describió un sistema de transporte de espermina de alta afinidad que no sólo no está mediado por el cotransporte de Na⁺, sino que este catión lo inhibe (106). Resultados similares se obtuvieron en cultivos de células de arteria pulmonar de bovino (107). En la retina, la captura de esta PA no se satura a las concentraciones de espermina^[3H] que se emplearon (Figura 1, A) y no depende de un gradiente electroquímico (Tabla 1), ni de energía (Tabla 2). Por lo tanto, la dependencia de la temperatura que se detectó en esta captura (Figura 2), sugiere la participación de los fosfolípidos membranales en dicho proceso. A este respecto, se encontró que hay una mayor unión de espermina^[3H] en la fracción membranal a 37°C que a 4°C (Figura 3, B). Dentro de este contexto, existen resultados que indican que PA como la espermina y la espermidina se unen a fosfolípidos cargados negativamente como el PI y la fosfatidil serina (60). Lo anterior sugiere que la unión de este polication en la cara interior de la membrana es relevante para la acumulación de espermina. Experimentos con liposomas enriquecidos con fosfatidil serina apoyan esta hipótesis, ya que en estos se detecta un drástico incremento en la unión de espermina (108). A este respecto, Ballas

et al. (39) demostraron con "fantasmas" de eritrocitos que una de las múltiples tareas de las PA en las células es la de generar estabilidad en la membrana citoplásmica al interactuar con los fosfolípidos que la componen.

Al parecer la interacción de cargas es indispensable en estos procesos. En nuestros experimentos de captura de espermina a diferentes valores del pH encontramos una mayor acumulación de espermina [^3H] a pH neutro y básico (Figura 4). Esta dependencia al pH podría deberse a las propiedades de unión de los fosfolípidos de la membrana citoplásmica, mas que a la tasa de transporte a través de la membrana. Resultados similares se registran en los experimentos en epitelio intestinal de Kobayashi *et al.* (108)

En vesículas del epitelio en cepillo del intestino delgado, al igual que en la retina, la captura de espermina no depende de Na^+ (108,109). Probablemente la captura de espermina en estas vesículas depende de una unión rápida a la cara externa de la membrana y una unión lenta a la cara interna de la membrana después de la translocación (109). Se ha propuesto que el pK_a de aminas primarias decrece en fase lipídica permitiendo su difusión en membranas biológicas (108). Recientemente Belting *et al.* (110) proponen que en fibroblastos de pulmón humano los proteoglicanos con heparán sulfato son los responsables de mediar el transporte de espermina. Al parecer, en estas células, este transporte es específico ya que si la síntesis de PA se inhibe, hay un incremento en proteoglicanos con heparán sulfato con mayor afinidad por espermina (110). Asimismo, la espermina se une al heparán sulfato con una K_d en el mismo intervalo de concentración que la K_m para el transporte (110). Por otra parte, estos investigadores demostraron que en células deficientes en la biosíntesis de heparán sulfato, el condroitín sulfato es el glucosaminglicano responsable de mediar el transporte de espermina (110). Apoyando estos resultados,

Mislick y Baldeschweiler (111) demostraron que los proteoglicanos son los responsables de la transferencia al interior de las células de complejos policationicos asociados a plásmidos de DNA.

Lo anterior sugiere la hipótesis de que en células en las que la captura de espermina no se lleva a cabo mediante un sistema de transporte que requiere la energía de un gradiente electroquímico, la internalización podría estar mediada, en un primer término, por los proteoglicanos. En un segundo plano, ya en el interior celular, podría ser significativa la unión a fosfolípidos de la membrana citoplásmica.

En la retina, ni la espermina, espermidina o DET afectan la acumulación de espermina[³H]. A este respecto, en vesículas de epitelio en cepillo de intestino delgado, la captura de espermina[¹⁴C] se inhibe muy poco por la putrescina y sus derivados (108). Las diferencias detectadas entre estos experimentos podrían deberse a la utilización de tejido intacto por un lado y la utilización de vesículas por otro. Las PA son componentes de todas la células y participan en procesos como la replicación, transcripción y traducción de la información genética; cuando los ensayos se llevaron a cabo en el tejido completo, estas propiedades pudieron afectar la unión intracelular a membrana citoplásmica por la demanda intracelular de estos policationes evitando la competencia de la espermina, espermidina y DET así como la saturación de la captura de espermina[³H], a diferencia de las vesículas, donde el número de sitios membranales es menor y las PA no participan en tan variados procesos.

Nosotros demostramos que en la retina de pollo la espermina[³H] se acumula de manera pasiva, mientras que en la corteza de rata la captura de espermina es saturable y depende de un gradiente electroquímico (31). Nuestros resultados se asemejan a lo reportado en tejidos no excitables como el endotelio, epitelio intestinal y en células de arteria pulmonar (106,107,108,109). Esto sugiere que en la retina la

participación de la espermina en la neurotransmisión excitadora es diferente a lo que se reporta en el SNC.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

Para que un compuesto sea considerado como un neuromodulador o neurotransmisor clásico, se deben tomar en cuenta los mecanismos generales de la transmisión sináptica química. El probable neurotransmisor o neuromodulador debe ser sintetizado en la presinapsis; debe haber un mecanismo de almacenaje del neurotransmisor o precursor en la terminal presináptica; se debe liberar al espacio sináptico y unirse a un receptor; y debe existir un mecanismo de inactivación y terminación de la acción del compuesto liberado.

Las PA como la espermina y la espermidina están presentes en el SNC, pero su función no es del todo clara. Recientemente se ha propuesto que estas policationes pueden funcionar como neuromoduladores, dada la participación tan notoria de estas moléculas en la modulación de canales iónicos del SNC.

La cinética de las corrientes sinápticas está determinada por el curso temporal de la liberación del neurotransmisor, la tasa de inactivación del neurotransmisor (por captura o degradación), y la cinética de los receptores postsinápticos. En la retina, en la capa visual, el glutamato se libera tónicamente de los fotorreceptores durante la oscuridad. Asimismo, las células bipolares generan potenciales graduados, por lo que pueden liberar glutamato con un curso temporal más prolongado (112). De esta manera, es importante determinar los factores que dan forma a las corrientes sinápticas de las células bipolares y en especial de las ganglionares que forman potenciales de acción y el nervio óptico. Nuestros resultados sugieren que la modulación negativa de la espermina sobre el sitio de la glicina de los receptores de

NMDA tiene relevancia en este proceso. Es probable que esta modulación negativa sea de mayor importancia para las células ganglionares, ya que la mayor densidad de receptores de tipo NMDA se encuentra en la capa plexiforme interna, aunado a que en la capa plexiforme externa estos receptores se relacionan con las células horizontales.

En suma, proponemos que la espermina no potencia la vía glutamatergica en la retina, a través de los receptores de NMDA, como ya se ha descrito en el SNC, sino que controla su actividad inhibiendo sus respuestas. Es probable que después de un evento excitador mediado a través de los receptores de AMPA/KA, la respuesta de los receptores de tipo NMDA se reduzca por el efecto inhibitor de la espermina sobre el sitio de la glicina de estos receptores. A este respecto, los resultados de Gilad G. y Gilad V. (113) indican que en la retina de rata las PA previenen la neurotoxicidad que se genera con glutamato.

VIII. CONCLUSIONES

A) En la retina de pollo, encontramos sitios de unión específica para espermina en ambas capas plexiformes, pero el efecto inhibitor que esta polimerización tiene sobre el sitio de la glicina de los receptores de tipo NMDA de ambas capas plexiformes es distinto a lo que se reporta en el SNC.

B) En la retina de pollo, la liberación de espermina no depende de Ca^{2+} , pero se estimula con una despolarización inespecífica con alto K^+ . Esto sugiere que la liberación esta mediada por la actividad inversa de un transportador de espermina, pero como en este tejido no se detectó un sistema de transporte para espermina que depende de un gradiente electroquímico, se apoya la idea de que la liberación se da por cambios en el voltaje mas que por los gradientes de concentración de K^+ .

C) Nuestros resultados sugieren que en la retina de pollo la captura y la liberación no están relacionadas a un mismo elemento, como podría ser un transportador que depende de un gradiente electroquímico. Es indispensable tener otras aproximaciones para poder describir con detalle cuales son los mecanismos moleculares involucrados en los sistemas de captura y de liberación de espermina en este tejido.

IX. LITERATURA CITADA

1. Schoepp D.D. and Conn P.J. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharm. Sci.* 1993; 14: 13-20.
2. Cotman C.W. and Iversen L.L. Excitatory amino acids in the brain: focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci.* 1987; 10: 263-265.
3. Gasic G.P. and Hollmann. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 1992; 54: 507-536.
4. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992; 258: 597-603.
5. Huettner J.E. Functional properties of kainate receptors, in Monaghan D.T. and Wenthold R.J. (Ed.) The ionotropic glutamate receptors. New Jersey, Humana Press. 1997; pp. 265-283.
6. Rosenmund C., Stern-Bach Y., and Stevens C.F. The tetrameric structure of glutamate receptor channel. *Science* 1998; 280: 1596-1599.
7. Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B., and Seeburg P.H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992; 256: 1217-1221.

8. Kutsuwada T., Kashiwabuchi N., Mori H., Sakimura K., Kushiya E., Araki K., Meguro H., Masaki H., Kumanishi T., Arakawa M., and Mishina M. Molecular diversity of NMDA receptor channel. *Nature* 1992; 358: 36-41.
9. Meguro H., Mori H., Araki K., Kushiya E., Kutsuwada T., Yamazaki M., Kumanishi T., Arakawa M., Sakimura K., and Mishina M. Functional characterization of an heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* 1992; 357: 70-74.
10. Ishii T., Moriyoshi K., Sugihara H., Sakurada K., Kadotani H., Yokoi M., Akasawa C., Shigemoto R., Mizuno M., Masu M., and Nakanishi S. Molecular characterization of a family of the N-methyl-D- aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 2836-2843.
11. Subramaniam S. and McGonigle P. Regional profile of developmental changes in the sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines. *J. Neurochem.* 1994; 62: 1408-1415.
12. Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B., Seeburg P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994; 12:529-540.
13. Das S., Sasaki Y.F., Rothe T., Premkumar, L.S., Takasu M., Crandall J.E., Dikkes P., Conner D.A., Rayudu P.V., Cheung W., Chen H.S., Lipton S.A., Nakanishi N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 1998; 393: 377-381.
14. Ransom R.W. and Stec N.L. Cooperative modulation of [³H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J. Neurochem.* 1988; 51: 830-836.

15. Ransom R.W. and Deschenes N.L. Polyamines regulate glycine interaction with the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Synapse*. 1990; 5: 294-298.
16. Benveniste M. and Mayer M.L. Multiple effects of spermine on *N*-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J. Physiol*. 1993; 464: 131-163
17. Williams K., Zappia A.M., Pritchett D.B., Shen Y.M., and Molinoff P.B. Sensitivity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol. Pharmacol*. 1994; 45: 803-809.
18. Rock D.M., and MacDonald R.L. Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 1995; 35: 463-482.
19. Berger M.L., and Rebernik P. Zinc and ifenprodil allosterically inhibit two separate polyamine-sensitive at *N*-methyl-D-aspartate receptor complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1999; 289: 1584-1591
20. Wafford K.A., Bain C.J., Bourdelles B.L., Whiting P.J. and Kemp J.A. Preferential co-assembly of recombinant-NMDA receptors composed of three different subunits. *Neuroreport* 1993; 4: 1347-1349.
21. Lynch D.R., Anegawa N.J., Verdoorn T., and Pritchett D.B. *N*-methyl-D-aspartate receptors: different subunit requirements for binding of glutamate antagonists, glycine antagonists, and channel-blocking agents. *Mol. Pharmacol*. 1994; 45: 540-545.
22. Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N., and Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the NMDA receptor. *Nature* 1991; 354: 31-37.

23. Guylaine M.D., Bennett M.V.L., and Zukin S. Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 6731-6735.
24. Traynelis S.F., Hartley M., and Heinemann S.F. Control of proton sensitivity of the NMDA receptors by RNA splicing and polyamines. *Science* 1995; 268: 873-876.
25. Michaelis E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology* 1998; 54: 369-415.
26. Seiler N. Polyamine metabolism and function in brain. *Neurochem. Int.* 1981; 3: 95-110.
27. Seiler N. and Lamberty U. Interrelations between polyamines and nucleic acids: changes of polyamines and nucleic acid concentrations in developing rat brain. *J. Neurochem.* 1975; 24: 5-13.
28. Williams-Ashman H.G. and Canellakis Z. Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspective in Biology and Medicine* 1979; 22: 421-453.
29. Jäne J., Pösö H., and Raina A. Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochem. Biophys. Acta* 1978; 473: 241-293.
30. Raina A., Pajula L.R., and Eloranta T. A rapid assay method for spermidine and spermine synthase. Distribution of polyamine synthesizing enzymes and methionine adenosyltransferase in rat tissues. *FEBS Lett.* 1976; 67: 252-256.
31. Harman R.J. and Shaw G.G. High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 1981; 36: 1609-1615.

32. Fage D., Voltz C., Scatton B., and Carter C. Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by *N*-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. *J. Neurochem.* 1992; 58: 2170-2175.
33. Fage D., Voltz C., and Carter C. Ouabain releases striatal polyamines in vivo independently of *N*-methyl-D-aspartate receptor activation. *J. Neurochem.* 1993; 61: 261-265.
34. Koenig H., Goldstone A., and Lu C.Y. Polyamines regulate calcium fluxes in rapid plasma membrane response. *Nature* 1983; 305: 530-534.
35. Koenig H., Fan C.C., Goldstone A.D., Lu C.Y. and Trout J.J. Polyamines mediate androgenic stimulation of calcium fluxes and membrane transport in rat heart myocytes. *Circ. Res.* 1989; 64: 415-426.
36. Iqbal Z. and Koenig H. Polyamines appear to be second messengers in mediating Ca^{2+} fluxes and neurotransmitter release in potassium-depolarized synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985; 133: 563-573.
37. Koenig H., Goldstone A.D., and Lu C.Y. Polyamines mediate the reversible opening of the blood-brain barrier by the intracarotid infusion of hyperosmolar mannitol. *Brain Res.* 1989; 483: 110-116.
38. Iqbal Z., Koenig H., Goldstone A.D., Lu C.Y., and Siddiqui F. Presynaptic NMDA receptors regulate polyamines synthesis, Ca^{2+} fluxes, and transmitter release at axon terminals. (Abstr) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11 (Suppl), S114., 1991.
39. Ballas S.K., Mohandas N., Marton L.J., and Shohet S. Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80: 1942-1946.

40. Sacaan A.I. and Johnson K.M. Spermine enhance binding to the glycine site associated with the *N*-methyl-D-aspartate receptor complex. *Mol. Pharmacol.* 1989; 36: 836-839.
41. Williams K., Romano C. And Molinoff P.B. Effects of polyamines on the binding of [³H]MK-801 to *N*-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of polyamine recognition site. *Mol. Pharmacol.* 1989; 36: 575-581.
42. Marvizón J.C. and Baudry M. [³H]dizocilpine association kinetics distinguish stimulatory and inhibitory polyamine sites of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurochem.* 1994; 63: 963-971.
43. Romano C., Williams K., DePriest S., Seshadri R. Marshall R.G., Israel M., and Molinoff P.B. Effects of mono-, di-, and triamines on the *N*-methyl-D-aspartate receptor complex: a model of polyamines recognition site. *Mol. Pharmacol.* 1992; 41: 785-792.
44. Kashiwagi K., Fukuchi J., Chao J., Igarashi K., and Williams K. An aspartate residue in the extracellular loop of the *N*-methyl-D-aspartate receptor controls sensitivity to spermine and protons. *Mol. Pharmacol.* 1996; 49: 1131-1141.
45. Masuko T., Kashiwagi K., Kuno T., Nguyen N. D., Pakk A.J., Fukuchi J., Igarashi K., and Williams K. A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the *N*-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol. Pharmacol.* 1999; 55: 957-969.
46. Gallagher M.J., Huang H., Pritchett D.B., and Lynch D.R. Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 9603-9611.

47. Rock D.M. and MacDonald R.L. Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of *N*-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. *Mol. Pharmacol.* 1992; 42: 157-164.
48. Zheng X., Zhang L., Wang A.P., Araneda R.C., Lin Y., Zukin R.S. and Bennett M.V.L. Mutation of structural determinants lining the *N*-methyl-D-aspartate receptor channel differentially affects phencyclidine block and spermine potentiation and block. *Neuroscience* 1999; 93:125-134.
49. Williams K. Mechanisms influencing stimulatory effects of spermine at recombinant *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* 1994; 46: 161-168.
50. Williams K. Pharmacological properties of recombinant *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors containing the $\epsilon 4$ (NR2D) subunit. *Neurosci. Lett.* 1995; 184: 181-184.
51. Johnson T.D. Modulation of channel function by polyamines. *Trends Pharmacol. Sci.* 1996; 17: 22-27.
52. Lopatin A.N., Makhina A.N., Nichols C.G. Potassium channel block for cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*; 372: 366-369.
53. Brackley P., Goodnow R. Jr., Nakanishi K., Sudan H.L., Usherwood P.N.R., Spermine and philanthotoxin potentiate excitatory amino acid responses in *Xenopus* oocytes injected with rat and chick brain RNA. *Neurosci. Lett.* 1990; 114: 51-56.
54. Pullan L.M., Keith R.A., LaMonteD., Stumpo R.J., Salama A.I. The polyamine spermine affects ω -conotoxin binding and function at N-type voltage-sensitive calcium channels. *J. Auton. Pharmacol.* 1990; 10: 213-219.

55. Anis N., Sherby S., Goodnow R. Jr., Niwa M., Konno K., Kallimopoulos T., Bukownik R., Nakanishi K., Usherwood P., Eldefrawi A., Eldefrawi M. Structure-activity relationships of philanthotoxin analogs and polyamines on N-methyl-D-aspartate and nicotinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; 254: 764-773.
56. Cherksey B.D., Llinas R., Sugimori M. International patent, WO 91/00853, 1991.
57. Scott R.H., Sweeney E.I., Kobrinsky E.M., Pearson H.A., Timms G.H., Pullar I.A., Wedley S., Dolphin A.C. Actions of arginine polyamine on voltage and ligand-activated whole cell currents recorded from cultured neurones. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 106: 199-207.
58. Scott R.H. Sutton K.G., and Dolphin A.C. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends Neuroscience.* 1993; 16: 153-160.
59. Kerry C. J., Ramsey R.L., Sansom M.S.P., and Usherwood P.N.R. Single channel studies of non-competitive antagonism of a quisqualate-sensitive glutamate receptor by argitoxin₆₃₆ – a fraction isolated from orb-web spider venom. *Brain Res.* 1988; 459: 312-327.
60. Yoneda Y., Ogita K., Enomoto R., Suzuki T., and Kito S. Identification and characterization of specific binding sites of [³H]spermidine in synaptic membranes of rat brain. *Brain Res.* 1991; 563: 17-27.
61. London E.D., Dawson V.L., and Mantione C.R. Specific binding sites for polyamines in mammalian brain. In *NMDA receptor Related Agents: Biochemistry Pharmacology and Behavior*, (eds Kameyama T., Nabeshima T. and Domino E.F.) Ann Arbor, USA, NPP Books, 1991.
62. Gilad G.M. and Gilad V.H. Polyamines uptake, binding and release in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 193: 41-46.

63. Nicholls D.G. Proteins, transmitters and synapses. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1994, pp. 5-6.
64. Barnstable C.J. Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1993; 3: 520-525.
65. López-Colomé A.M. High affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. *Neurochem. Res.* 1981; 6: 1019-1033.
66. López-Colomé A.M., Somohano F. Characterization of L-³H-aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. *Vision Res.* 1982; 22: 1495-1501.
67. López-Colomé A.M. Amino acids as excitatory transmitters in the retina, in Roberts P.J., Storm-Mathisen J., Bradford H.F. (Eds.), Excitatory amino acids. London Macmillan Press. 1986, pp. 143-157.
68. López-Colomé A.M. and Somohano F. Characterization of quisqualate type L-glutamate receptors in the retina. *Brain Res.* 1987; 414: 99-108.
69. López-Colomé A.M., Somohano F. N-methyl D-aspartate receptors in the retina: 3-[(±)-2-carboxypiperazin-4-yl]-propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies. *Neuropharmacol.* 1992; 31: 577-584.
70. López-Colomé A.M. and Romo-de-Vivar M. Excitatory amino acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina. *Glia* 1991; 4: 431-439.
71. López-Colomé A.M., Ortega A., and Romo-de-Vivar M. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hidrolisis in Müller glia. *Glia* 1993; 9: 127-135.
72. Somohano F., Roberts P.J., and López-Colomé A.M. Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors. *Dev. Brain Res.* 1988; 42: 59-67.
73. Chen J., Graham S., Moroni F., and Simon R. A dose-response study of a glycine receptor antagonist in focal ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 267: 937

74. Pellegrini-Giampietro D., Cozzi A., and Moroni F. 7-Cl-Thiokynureic acid: a glycine antagonist and free radical scavenger that reduced CA1 ischemic damage in vivo. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19:1645, 1993.
75. Rodríguez-Contreras A., Calderón F., and López-Colomé A.M. Strychnine-insensitive [³H]glycine binding to synaptosomal membranes from the chick retina. *Int.J.Devl.Neuroscience.* 1998; 16: 413-421.
76. Lombardi G., Moroni F., and Moroni F. Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 271: 489-495.
77. Boje K.M., Skolnick P., Raber J., Fletcher R.T., and Chader G. Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem. Int.* 1992; 4: 473-486.
78. Gründer T., Kohler K., Kaletta A., Guenther E. The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and the inner retina of the rat. *J. Neurobiol.* 2000; 44:333-342.
79. Fletcher E.L, Hack I., Brandstätter J.H., Wässle H. Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 2000; 420:98-112.
80. Pourcho R.G., Qin P., Goebel D.J. Cellular and subcellular distribution of NMDA receptor subunit NR2B in the retina. *J. Comp. Neurol.* 2001; 433:75-85.
81. McBean G.J., Roberts P.J. Glutamate-preferring receptors regulate the release of D-³H-aspartate from rat hippocampal slices. *Nature* 1981; 291:593.
82. López-Colomé A.M., Roberts P.J. Effect of excitatory amino acid analogues on the release of D-[³H]aspartate from chick retina. *Eur. J. Pharmacol.* 1987; 142:409-417.
83. Ientile R., Russo P., Macaione S. Polyamine localization and biosynthesis in chemically fractionated rat retina. *J. Neurochem.* 1986; 47:1356-1360.

84. Valentino T.L., Lukasiewicz P.D., Romano C. Immunocytochemical localization of polyamines in tiger salamander retina. *Brain Res.* 1996; 713: 278-285.
85. Biedermann B., Skatchkov S.N., Brunk I., Bringmann A., Pannicke T., Bernstein H.G., Faude F., Germer A., Veh R., Reichenbach A. Spermine/spermidine is expressed by retinal glial (Müller) cells and controls distinct K⁺ channels of their membrane. *Glia* 1998; 23: 209-220.
86. Laube G., Veh R.W. Astrocytes, not neurons, show most prominent staining for spermidine/spermine-like immunoreactivity in adult rat brain. *Glia* 1997; 19: 171-179.
87. Taibi G., Schiavo M.R., Calvaruso G., Tesoriere G. Pattern of polyamines and related monoacetyl derivatives in chick embryos retina during development. *Int. J. Devl. Neuroscience* 1994; 12:423-429.
88. Taibi G., Schiavo M.R., Nicotra C. Polyamines and ripening of photoreceptor outer segments in chicken embryos. *Int. J. Devl. Neuroscience* 1995; 13:759-766.
89. Ientile R., Pedale S., Ginoprelli T., Cannavó L., Macaione S. Intracellular polyamine levels are involved in NMDA-evoked nitric oxide production in chick retina cells. *J. Neurochem.* 1999; 72:1744-1749.
90. Macaione S., Cangemi F., Fabiano C., Cristafulli G., Aronica T., Ientile R. Putrescine, polyamines, and N1-acetylpolyamine levels in retina, visual cortex and cerebellum of free-running mice kept under continuous light or darkness. *Ital. J. Biochem.* 1993; 42:151-164.
91. Lowry O.H., Rosebrough W.H., Farr A.L., Randall S. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.

92. Shaw G.G. Polyamines as neurotransmitters or modulators, in *The Neuropharmacology of Polyamines*, (Carter C., ed), Academic Press, San Diego, 1994, pp. 61-80.
93. Speciale C., Marconi M., Raimondi L., and Fariello R.G. Extracellular content of polyamines in the striatum: A microdialysis study in awake rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 17: 254, 1992.
94. Lerma J. Spermine regulates *N*-methyl-D-aspartate receptor desensitization. *Neuron* 1992; 8: 343-352.
95. Brandstätter J.H., Hartveit E., Sassoé-Pognetto M., Wässle H., Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 1994; 6: 1100-1112.
96. Rao T.S., Cler J.A., Mick S.J., Iyengar S., Wood P.L. Polyamines modulate events mediated by the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex through an ifenprodil-insensitive pathway: in vivo measurements of cyclic GMP in the cerebellum. *Neuropharmacology* 1991; 30: 567-573.
97. Luo J., Wang Y., Yasuda R.P., Dunah A.W., Wolfe B.B. The majority of *N*-methyl-D-aspartate receptor complexes in rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol. Pharmacol.* 1997; 51: 79-86.
98. Raiteri M., Cerrito F., Cervoni A.M., and Levi G. Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1979; 208: 195-202.
99. Westerink B.H.C., Damsma G., and De Vries J.B. 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.* 1989; 52: 705-712.

100. Nicholls D. and Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990; 11: 462-468.
101. Khan N.A., Quemener V., and Moulinoux J-Ph. Characterization of polyamines transport pathways, in *The Neuropharmacology of Polyamines*, (Carter C., ed), Academic Press, San Diego, 1994, pp. 37-60.
102. Nicolas C., Fage D., and Carter C. NMDA receptors with different sensitivities to magnesium and ifenprodil control the release of [¹⁴C]acetylcholine and [³H]spermidine from rat striatal slices in vivo. *J. Neurochem.* 1994; 62: 1835-1839.
103. Pohjanpelto P. Putrescine transport is greatly increased in human fibroblasts initiated to proliferate. *J. Cell Biol.* 1976; 68: 512-520.
104. Feige J. J. and Chambaz E. M. Polyamines uptake by bovin adrenocortical cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 846: 93-100.
105. Morgan D.M.L. Uptake of polyamines by human endothelial cells: characterization and lack of effect of agonists of endothelial function. *Biochem. J.* 1992; 286: 413-417.
106. Dot J., Lluch M., Blanco I., Rodríguez-Alvarez J. Polyamine uptake in cultured astrocytes: characterization and modulation by protein kinases. *J. Neurochem.* 2000; 75: 1917-1926.
107. Aziz S.M., Lipke D.W., Olson J.W., Gillespie M.N. Role of ATP and sodium in polyamine transport in bovine pulmonary artery smooth cells. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 48: 1611-1618.
108. Kobayashi M., Iseki K., Saitoh H., Miyazaki K. Uptake characteristics of polyamines into rat intestinal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1105: 177-183.

109. Iseki K., Kobayashi M., Miyazaki K. Spermine uptake by rat intestinal brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1068: 105-110.
110. Belting M., Persson S., Fransson L. Proteoglycan involvement in polyamine uptake. *Biochem J.* 1999; 338: 317-323.
111. Mislick K.A., Baldeschwieler J.D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 12349-12354.
112. Lagnado L., Gomis A., Job C. Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron* 1996; 17: 957-967.
113. Gilad G.M., Gilad V.H. Treatment with polyamines can prevent monosodium glutamate neurotoxicity in the rat retina. *Life Science* 1989; 44:1963-1969.