

Características farmacológicas de las subunidades de los receptores de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA)

Adrián Rodríguez*
Ana María López*

Summary

The role of glutamate as an excitatory neurotransmitter is mediated by transmembrane proteins that differ in terms of its mechanism of transduction. In the case of fast excitatory neurotransmission, the existence of various types and subtypes of glutamate-gated ion channels that differ structurally and functionally from other neurotransmitter receptors, explains the diverse effects observed of this aminoacid in the central nervous system. Because of its participation in processes such as neurogenesis during development, synaptic plasticity, which is thought to be the basis for memory and learning, and neurotoxicity in convulsive and neurodegenerative illnesses such as epilepsy, Parkinson and Alzheimer's disease, ischemia and hypoxia, N-metil-D-aspartate (NMDA) receptors have been the subject of numerous studies. Cloning of a great variety of glutamate-receptor subunits cDNAs and the possibility of its expression in heterologous systems has allowed their characterization in terms of localization, structure and molecular function. The evidence provided in the last 10 years indicates that the expression of these subunits is controlled spatially and temporally during the development and adult stages, as expected of a receptive system. This review intends to give a general view of the molecular characteristics of recombinant NMDA receptors comparing them with studies on native receptors and with emphasis in the glycine binding site, which is of great importance to understand the modulation of these membrane proteins.

Key words: Excitatory neurotransmission, NMDA receptor, glycine, cloning, pharmacology.

Resumen

La diversidad funcional de la neurotransmisión excitadora rápida en el sistema nervioso central se debe a la existencia de varios tipos y subtipos de receptores glutamatérgicos formados por 5 subunidades protéicas, que forman un canal catiónico inespecífico. La clonación de una gran variedad de secuencias complementarias de DNA (cDNA) que codifican estas diferentes subunidades de receptores, y la posibilidad de emplear sistemas heterólogos de expresión, permiten localizar y caracterizar la estructura y la función de los mismos. Por su participación en fenómenos como la sinaptogénesis

durante el desarrollo, la plasticidad sináptica en la que se basa el aprendizaje y la memoria, y la neurotoxicidad que se presenta en diferentes enfermedades convulsivas y neurodegenerativas como la epilepsia, el mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la hipoxia y la isquemia, el receptor de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) ha sido objeto de numerosos estudios; su actividad puede ser modulada por varios compuestos, tanto endógenos como exógenos, y particularmente por la glicina que es coagonista del glutamato. El objetivo de esta revisión es dar un panorama general de las características moleculares de los receptores de NMDA en estudios de expresión heteróloga, y establecer una comparación con estudios similares llevados a cabo en receptores neuronales, haciendo hincapié en el sitio del coagonista glicina, que es de gran importancia para comprender cómo se lleva a cabo la modulación de la actividad de estas proteínas de la membrana.

Palabras clave: Neurotransmisión excitadora, receptor de NMDA, glicina, clonación, farmacología.

Introducción

El ácido L-glutámico es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro, en la médula espinal y en la retina de los vertebrados. La demostración de la existencia de receptores para aminoácidos excitadores y de su participación en la transducción de señales en neuronas y células gliales, ha contribuido de manera importante al estudio de la neurofisiología molecular. Mientras que la función de estos receptores en los circuitos neurales de la retina está menos estudiada, en el sistema nervioso central (SNC) se les ha asociado con procesos de memoria y de aprendizaje, ya que en preparaciones *in vitro* su actividad modifica la eficacia sináptica de las neuronas que los expresan. Por otra parte, la actividad anormal de estas moléculas puede causar la muerte de las neuronas durante procesos como la isquemia y la hipoxia, e incluso se ha propuesto su participación en enfermedades de tipo neurodegenerativo como el Alzheimer (30).

La clasificación de los receptores celulares puede hacerse en términos del mecanismo de transducción con el que se asocian. En el caso de los receptores activados por glutamato, existen receptores metabo-

* Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-253, 04510, México, D.F.
Correspondencia: Ana María López

trópicos (acoplados a proteínas G) y receptores ionotrópicos (canales iónicos operados por ligando) que, a su vez, se clasifican con base en un perfil farmacológico y se denominan de acuerdo con el agonista más potente. En términos generales, los receptores metabotrópicos corresponden a una sola cadena proteica que atraviesa 7 veces la membrana, mientras que los receptores ionotrópicos están formados por varias subunidades, algunas de las cuales pueden modificarse por procesos postranscripcionales, como el corte alternativo y la edición, lo que lleva a modificaciones importantes en la función de los receptores (13,30).

La clasificación de los receptores ionotrópicos activados por glutamato se basa en dos grandes grupos: los canales activados por el N-metil-D-aspartato (receptores NMDA) y receptores que no se activan por dicho compuesto (receptores no-NMDA). Los receptores no-NMDA se activan por el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y por el kainato; se caracterizan por tener cinética de apertura rápida y su actividad se antagoniza por quinoxalinas como la 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2, 3-diona (CNQX) y por la isotinoxima NS-102, respectivamente. En contraste, los receptores de NMDA presentan cinética de apertura lenta, y entre sus antagonistas se encuentran el ácido D-2-amino-5-fosfopentanóico (AP5) y el ácido 3-([RS]-2-carboxipiperazin-4-il)-propil-1-fosfónico (CPP) en el sitio de reconocimiento a glutamato (26).

Este receptor es un canal catiónico que en condiciones fisiológicas hiperpolarizantes está bloqueado por el ion Mg^{2+} en forma dependiente del voltaje, y se regula por varios ligandos entre los que se encuentran la glicina, el zinc, los protones, los agentes redox y las poliaminas espermina y espermidina, que junto con los denominados bloqueadores de canal, como los anestésicos disociativos ketamina, fenciclidina y el maleato de dizocilpina (MK-801), tienen sitios de unión específicos en el receptor, distintos entre sí, y cuyas características bioquímicas varían según la región del SNC de que se trate (52).

La clonación de genes correspondientes a subunidades de una gran variedad de receptores glutamatérgicos por medio del uso de secuencias del DNA complementario (cDNA), y la posibilidad de emplear sistemas de expresión heterólogos, permite caracterizar a nivel molecular la localización, la función y la estructura de estas moléculas (30) (fig. 1), y comprueba la existencia de subtipos de receptores que habían sido identificados mediante el uso de técnicas indirectas (25). Así pues, a la fecha existe un gran número de publicaciones en las que se describen las características de los receptores de NMDA (subunidades- NR1a-h, NR2A-D) empleando técnicas electrofisiológicas, bioquímicas, inmunocitoquímicas y de biología molecular (análisis de la secuencia y localización de ácidos nucleicos y proteínas correspondientes a estas subunidades).

El objetivo de esta revisión es dar un panorama general de las características moleculares de los receptores de NMDA en los estudios de expresión de los mismos, en combinaciones predeterminadas, usando sistemas heterólogos, y establecer una comparación con estudios similares de receptores neuronales, ha-

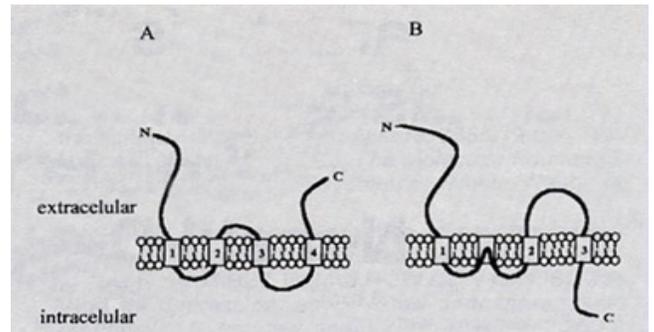


Figura 1. Distribución de los dominios transmembranales en las subunidades de los canales operados por ligando. A, receptores no glutamatérgicos; B, receptores glutamatérgicos. Estos modelos se basan en el análisis de la secuencia de los aminoácidos de las subunidades de diversos receptores ionotrópicos, estudios que han sido corroborados y complementados empleando técnicas de biología molecular. Los receptores glutamatérgicos difieren tanto en el número de dominios transmembranales como en la distribución de dominios extracelulares e intracelulares (11,50). Por otra parte, los sitios de reconocimiento de los ligandos presentan homología con las proteínas periplásmicas de origen bacteriano (11).

ciendo hincapié en el sitio de glicina insensible a estricnina, que es de gran importancia para comprender cómo se lleva a cabo la modulación de estas proteínas de la membrana.

Distribución de los receptores de NMDA

Los receptores de NMDA se distribuyen en prácticamente todo el sistema nervioso central, pero específicamente en áreas de la corteza cerebral, de los ganglios basales y de aquellas relacionadas con los sistemas sensoriales (figs. 2 y 3). Los estudios electrofisiológicos y con radioligandos indican que las características bioquímicas del receptor de NMDA varían en las diferentes regiones del SNC. En particular, las variaciones regionales de la unión específica del ácido L-glutámico- 3H , de Cpp- 3H y de la modulación de la unión de MK-801- 3H por los diversos agonistas y antagonistas del ácido glutámico, han llevado a identificar cinco subtipos de receptores: los que tienen preferencia por los agonistas, los que tienen preferencia por los antagonistas, los de tipo talámico medio, los receptores de tipo cerebelar y los receptores presinápticos en las neuronas dopaminérgicas del *locus coeruleus* y en las noradrenérgicas de la sustancia negra (21,49).

Hay 2 tipos de subunidades de estos receptores, denominadas NR1 y NR2. De la primera se han identificado 8 variantes postranscripcionales y de la segunda, 4 proteínas codificadas por genes diferentes (fig. 2) (12). Estas subunidades presentan un patrón de expresión y de localización que en ocasiones se superpone. En términos generales, se sabe que la subunidad NR2A se expresa tan ampliamente como la subunidad NR1, lo cual indica la existencia de un receptor de NMDA con una composición heteromérica común en las neuronas de diversas regiones del sistema nervioso central; la subunidad NR2B se expresa predominantemente en el cerebro anterior y se colocaliza con

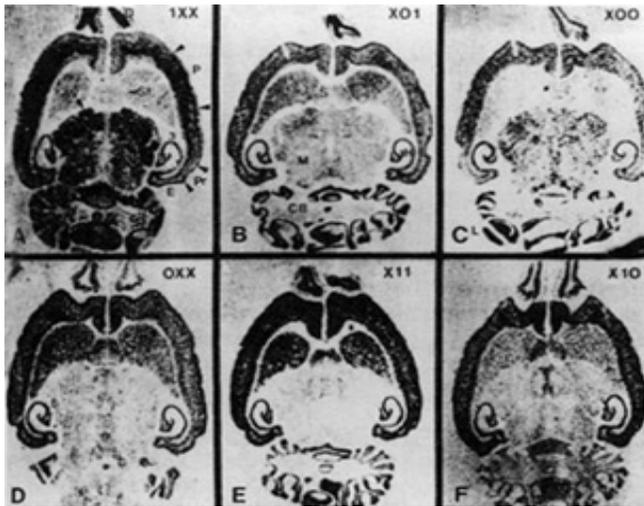


Figura 2. Distribución de algunas variantes postranscripcionales del mRNA de la subunidad NR1 determinada por hibridación *in situ* con oligonucleótidos antisentido marcados con ^{32}S en los cortes horizontales del cerebro de la rata. La posición relativa de los 3 sitios de corte alternativo en el mRNA de esta subunidad (exones 5, 21 y 22) ha dificultado la localización de cada una de las 8 variantes empleando esta técnica, por lo que sólo se han podido identificar aquellas variantes que presentan (NR1b) o carecen (NR1a) del exón 5, así como cuatro combinaciones en las que intervienen los exones 21 y 22. La presencia o ausencia de un exón se indica con 1 o 0 respectivamente, y X si no se conoce con precisión. Se enumeran de izquierda a derecha el exón 5, 21 y 22. Abreviaturas: 1, área CA1 del hipocampo; 3, área CA3 del hipocampo; A, corteza anterior cingulada; AV, tálamo anteroventral; E, corteza entorrinal; CB, cerebelo; H, hipocampo; M, cerebro medio; O, bulbo olfatorio; P, corteza parietal; S, septo; St, estriado; y T, tálamo (Tomado de Monaghan y col. [1997], con permiso de Humana Press) (26).

la subunidad NR2A en la corteza cerebral, en el hipocampo y en el cuerpo estriado, mientras que la subunidad NR2C se expresa en el cerebelo, en el tálamo y en el bulbo olfatorio. Con respecto a la subunidad NR2D, ésta se localiza predominantemente en las estructuras del diencefalo, del cerebro medio y del tallo cerebral; en estas dos últimas estructuras se colocaliza con la subunidad NR2A. En el tálamo y en el bulbo olfatorio se expresan y se colocalizan las 4 subunidades NR2 (fig. 3) (43).

Receptores de NMDA expresados en sistemas heterólogos

Como ya se ha mencionado, el receptor de NMDA es un canal catiónico que en condiciones fisiológicas hiperpolarizantes está bloqueado por el ion Mg^{2+} . Los experimentos electrofisiológicos y bioquímicos han demostrado que la activación del canal del receptor requiere cuando menos de dos fenómenos secuenciales: una despolarización que permita eliminar el bloqueo del canal por el Mg^{2+} (52), y la unión del ácido glutámico (que es el agonista principal) y de la glicina (coagonista) a sus respectivos sitios (17,51). La activación del receptor consiste en un incremento en la apertura de un canal permeable al potasio y al sodio, pero principalmente al calcio con la consecuente acti-

vación de procesos celulares dependientes de este segundo mensajero. Los estudios de expresión de subunidades correspondientes al receptor de NMDA en los sistemas heterólogos se han hecho tomando en cuenta estas características que, a nivel molecular, definen a los receptores glutamatérgicos activados por NMDA.

Los sistemas de expresión heterólogos más empleados son los ovocitos de *Xenopus* y las células de riñón HEK-293 de mamífero. Las 8 versiones de la subunidad NR1 que se conocen hasta la fecha pueden clasificarse en dos grupos: las subunidades que presentan un dominio de 21 aminoácidos en la región amino terminal, codificada por el exón 5 del gene (NR1 "b" o NR1 e-h), y las subunidades que no lo presentan (NR1 "a" o NR1a-d) (12). Prácticamente todos los estudios han empleado la subunidad NR1a para ser coexpresada con alguna o varias subunidades NR2. La razón de coexpresar dos tipos de subunidades se basa en estudios anteriores en los que se determinó que la sola expresión de subunidades NR2 no genera receptores funcionales, y que la expresión de canales homoméricos NR1 da como resultado canales que aunque son activados por glutamato o NMDA en presencia de glicina y se bloquean por Mg^{2+} de manera dependiente del voltaje, presentan corrientes de muy baja amplitud con respecto a los receptores neuronales; en cambio,

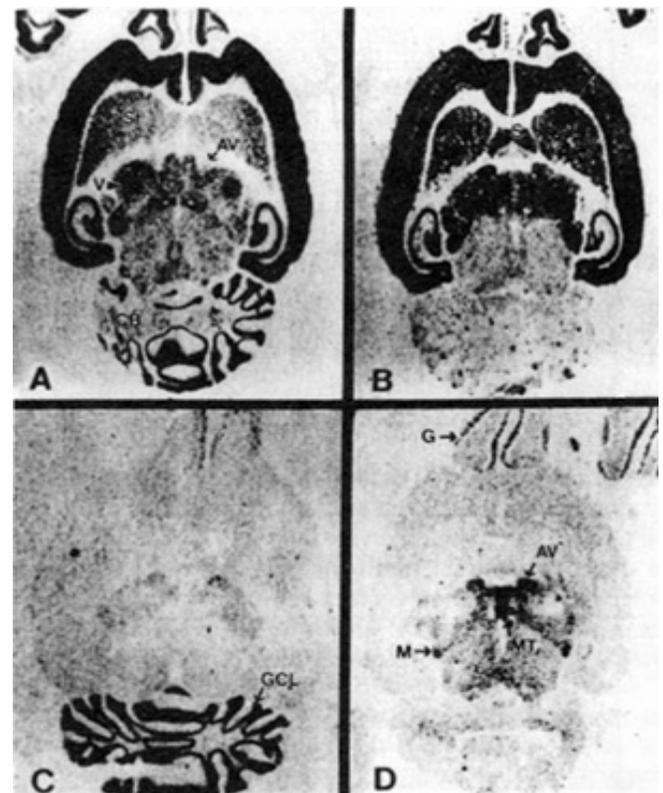


Figura 3. Hibridación *in situ* del mRNA de las cuatro subunidades NR2: A, NR2A; B, NR2B; C, NR2C, y D, NR2D usando oligonucleótidos antisentido marcados con ^{32}S . Abreviaturas: AV, tálamo anteroventral; CB, cerebelo; G, capa glomerular del bulbo olfatorio; GCL, capa de las células granulares del crebelo; M, gemiculado medio; MT, núcleo talámico de la línea media; S, septo; St, estriado; y V, tálamo ventroposterior (Tomado de Monaghan y col. [1997], con permiso de Humana Press) (26).

cuando se coexpresan, subunidades NR1 y NR2, se observa un incremento en la amplitud de la corriente que es similar a la observada en los receptores nativos. Las subunidades NR2 modulan la actividad de los receptores NMDA: el bloqueo por Mg^{2+} , la sensibilidad a la glicina (15,20,27), la cinética de apertura del canal (27), la conductancia del mismo (38), la modulación redox (19,39), la afinidad por los agonistas y antagonistas e, incluso, el efecto de las poliaminas (46,47).

Un aspecto notable es que tanto en los receptores homoméricos NR1 como en los heteroméricos NR1-NR2, la presencia de la secuencia de 21 aminoácidos, codificada por el exón 5 de la subunidad NR1, determina varias características importantes de la modulación de los mismos, ya que las subunidades NR1 "a" confieren al receptor características como la inhibición de la actividad del canal por el pH (40) la potenciación por Zn^{2+} y Ni^{2+} a bajas concentraciones (mM) (12), por poliaminas de manera dependiente de la concentración de glicina (7,46) y por histamina (45).

a. Coexpresión de las subunidades NR1a/NR2A

La expresión de la subunidad NR2A en el sistema nervioso central presenta una distribución muy parecida a la de los receptores de NMDA con alta afinidad por los antagonistas del glutamato, como el CPP- 3H y el CGP 39653- 3H (ejemplificados por los receptores de las capas externas de la corteza parietal y del estriado lateral) (5,21).

El bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje es mayor a los potenciales negativos en los receptores NR1a/NR2A, comparados con los receptores NR1a/NR2C y NR1a/NR2D cuando se expresan en células HEK-293 de mamífero (6,28). La constante de tiempo de cierre de estos heterómeros es la más rápida, siendo de 3 a 4 veces menor que la de los heterómeros NR2B o NR2C, y hasta 40 veces menor que la de los heterómeros que incluyen a la subunidad NR2D (28); además estos receptores se distinguen por ser canales de más alta conductancia que los formados por las subunidades NR1a/NR2C y NR1a/NR2D (29) (figs. 4-5). Con respecto al efecto de las poliaminas sobre estos receptores, se ha observado que la espermina estimula la actividad del canal de una manera dependiente de la concentración de glicina (incrementando la afinidad por la glicina) y la bloquea en forma dependiente del voltaje a altas concentraciones (47). Por otra parte, el etanol inhibe la corriente en los receptores recombinantes con la siguiente potencia: NR1a/NR2A \approx NR1a/NR2B > NR1a/NR2C, sin modificar la E_{50} de la glicina (24).

b. Coexpresión de las subunidades NR1a/NR2B

La expresión de las subunidades NR1a y NR2B se correlaciona con la distribución de los receptores de NMDA con alta afinidad por los agonistas (relacionados con los receptores del estriado medio) (5). En la rata, la subunidad NR2B se expresa predominantemente en el cerebro anterior de los neonatos, así como en el estriado medio y en el cerebelo, del que prácticamente desaparece en los adultos (28,42). Los estudios funcionales demuestran que los receptores que

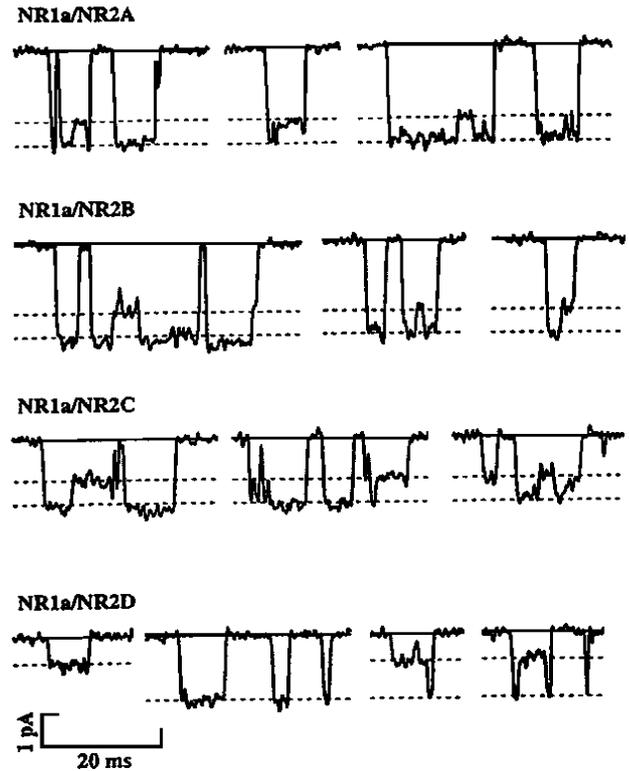


Figura 4. Distintos estados de conductancia observados en los receptores de NMDA heteroméricos expresados en ovocitos de *Xenopus* y medidos empleando la técnica de fijación de voltaje (*patch clamp, outside out*). (a) Los registros corresponden a canales unitarios presentes en los parches de ovocitos que expresan distintas combinaciones de subunidades del receptor de NMDA. Los registros fueron hechos a -60 mV empleando un filtro a 1 kHz (-3dB) con fines ilustrativos. Los canales fueron activados con ácido L-glutámico 100 mM en presencia de 1 o 10 μ M de glicina. Las líneas punteadas indican las amplitudes promedio de los dos componentes de las distribuciones de amplitud (tomado de Morrisett [1997], con permiso de Humana Press) (29).

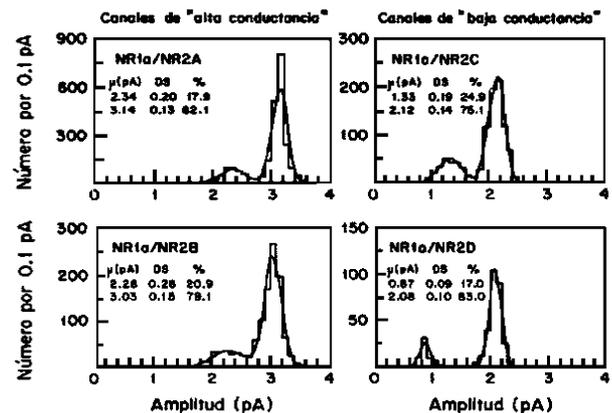


Figura 5. Distribuciones de amplitud de los estados de conductancia de los canales unitarios de los receptores de NMDA expresados en ovocitos de *Xenopus*. En cada caso, se ajustó una mezcla de dos funciones Gausianas a las amplitudes de apertura con duración > 99.8% de su amplitud total. El promedio de las amplitudes de los canales unitarios, los errores y los porcentajes del total de las aperturas por cada nivel de conductancia se indican en cada caso (tomado de Morrisett [1997], con permiso de Humana Press) (29).

incluyen esta subunidad presentan una mayor afinidad por los coagonistas glutamato y glicina que los receptores NR1a/NR2A (5).

En un estudio reciente, se ha descrito la farmacología de los receptores de los NMDA humanos (NR1a/NR2A y NR1a/NR2B), expresados en células de ratón, empleando antagonistas marcados radioactivamente. La unión específica del antagonista del sitio de glicina, L-689,560-³H, se inhibe por glicina, D-serina, D-alanina y el ácido 1-amino-ciclopropil carboxílico (ACPC), con constantes de inhibición prácticamente iguales. Sin embargo, la afinidad por los agonistas del sitio de glicina en los receptores NR1a/NR2B aumenta proporcionalmente a la concentración de la subunidad con respecto a la subunidad NR2B, y no así con el aumento de la subunidad NR2A. En cambio, el aumento en la proporción de subunidades NR1a disminuye hasta diez veces la afinidad por los agonistas mencionados (10).

Tanto los receptores NR1a/NR2A, como los receptores NR1a/NR2B, forman canales de alta conductancia; los bloqueadores de canal ketamina y memantina, que presentan una fuerte dependencia del voltaje, así como una cinética rápida de bloqueo del canal, presentan una mayor afinidad por los receptores NR1a/NR2B (10), mientras que la poliamina argio toxina bloquea el canal con la siguiente potencia: NR1/NR2B > NR1/NR2A >>> NR1/NR2C (34). El efecto del Mg²⁺ es complejo, ya que a bajas concentraciones potencia la actividad del canal, y a mayores concentraciones la inhibe (10). Por otra parte, la poliamina espermina modula los receptores NR1a/NR2B de cuatro maneras distintas, como puede verse en el cuadro 1.

c. Coexpresión de las subunidades NR1a/NR2C

En el cerebelo, así como en ciertas neuronas del hipocampo restringidas a la capa granular, se ha demostrado la presencia de altos niveles de expresión de la subunidad NR2C (5). Usando métodos de unión de radioligandos, se ha demostrado que las células granulares del cerebelo expresan dos tipos de receptores, uno de alta y otro de baja afinidad por antagonistas como el CPP. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos usando técnicas de biología molecular en los que se observa una afinidad 100 veces mayor por el CPP en los heterómeros NR1a/NR2A que en los NR1/NR2C (21). En los estudios electrofisiológicos se ha observado que los receptores cerebelares tienen baja afinidad por los anestésicos disociativos y por el MK-801, además de ser insensibles a la potenciación por el coagonista glicina, y por los antagonistas del sitio de la glicina, 7-cloro kinurenato y CNQX (36). Los estudios con radioligandos indican que mientras la unión de ácido 5, 7-dicloro-kinurénico-³H no se modifica considerablemente por la composición heteromérica (1,21), la afinidad por el agonista glicina es mayor en los receptores NR1a/NR2C que en cualquier otra combinación de subunidades NR1/NR2 (5,41).

d. Coexpresión de las subunidades NR1a/NR2D

Los receptores de NMDA localizados principalmente en los núcleos de la línea media del tálamo, el giro

dentado del hipocampo y el bulbo olfatorio, se caracterizan por la presencia de la subunidad NR2D (5), cuyo estudio se ha visto restringido por problemas de expresión diferencial (14,15,47) (cuadro 1).

Receptores nativos

Uno de los principales problemas en neurociencias consiste en explicar cómo contribuyen los fenómenos que ocurren a nivel sináptico a la generación de las conductas y los procesos mentales. La amplia distribución de los receptores glutamatérgicos en el SNC y en particular en las sinapsis corticales durante el desarrollo, así como en las etapas posteriores, indica una participación importante de éstos en los procesos funcionales que allí se llevan a cabo. El requerimiento del coagonista glicina y la dependencia del voltaje de una conductancia de calcio (un segundo mensajero) son algunas de las características que han llevado a proponer que los receptores de NMDA forman parte de los sistemas de comunicación neuronal y glial, que son importantes en la regulación de la actividad del SNC, como la integración temporal, las respuestas rítmicas y la plasticidad sináptica, entre otros.

Se ha propuesto que la existencia de subtipos de receptores de NMDA obedece a una regulación transcripcional de la síntesis de los distintos mRNA de las subunidades que los conforman, así como a modificaciones postranscripcionales. A pesar de saberse que las subunidades con mayor expresión en el tejido nervioso son la NR1a y la NR2A, y de que existe una correlación entre las características observadas en las preparaciones de tejido nervioso y las observadas en los estudios de expresión en los sistemas heterólogos, aún no ha sido posible determinar con precisión cuál es la composición heteromérica de los receptores de NMDA. Esto podría deberse (como lo sugiere la coexpresión de 3 tipos de subunidades en un receptor en sistemas heterólogos) (41) a la presencia *in vivo* de varias posibles composiciones heteroméricas, con patrones espacio-temporales de expresión definidos durante el desarrollo y la edad adulta como resultado de la experiencia. Por mencionar sólo algunos ejemplos: los niveles del mRNA de la subunidad NR2C se incrementan después de un fenómeno hipóxico (32); el etanol modifica las características de unión de varios ligandos radioactivos, lo que sugiere un cambio en la composición de subunidades en los receptores (37); la expresión del mRNA de la subunidad NR2C se incrementa en los ratones que presentan susceptibilidad a desarrollar lesiones epilépticas audiogénicas (23). Por otra parte, se sabe que la distribución de las subunidades NR1 en la membrana no es un proceso aleatorio, sino regulado por modificaciones covalentes, como las fosforilaciones en los residuos específicos (8). La determinación de la estequiometría y la distribución de las diversas conformaciones de estos receptores en la membrana neuronal y glial, será determinante para hacer un mapa funcional a nivel celular que pueda servir de base para comprender cómo funciona un circuito neural en particular.

CUADRO 1
Modulación de receptores de NMDA por diversos ligandos: ensayos funcionales

	NR1b	NR1a	NR1a/ NR2A	NR1a/ NR2B	NR1a/ NR2C	NR1a/ NR2D
Efecto de la espermina (47)						
a. Estimulación independiente de glicina.	no	sí	no	sí	no	no
b. Estimulación dependiente de glicina (incremento en la afinidad por la glicina).	sí	sí	sí	sí	no	no
c. Inhibición dependiente del voltaje.	?	sí	sí	sí	no	no
d. Disminución en la afinidad de los agonistas (sitio del glutamato)	?	sí	no	sí	no	no
Efecto de metales divalentes (49).						
a. Estimulación por Zn ²⁺ y Ni ²⁺ (bajas concentraciones).	no	sí	no*	no*	no*	no*
b. Inhibición por Zn ²⁺ , Ni ²⁺ y Co ²⁺ (altas concentraciones).	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Efecto de la histamina (47,49).						
a. Estimulación (bajas concentraciones)	no	sí	no	sí	no	no
b. Inhibición (altas concentraciones)	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Efecto del ifenprodil (47,49).						
a. Afinidad relativa por el ifenprodil	?	alta	baja	alta	baja	baja
b. Inhibición (bajas concentraciones)	?	sí	no	sí	no	no
c. Inhibición (altas concentraciones)	?	sí	sí	sí	sí	sí
Inhibición por protones (49).	no	sí	sí	sí	sí	sí
Efecto de agentes redox (49).						
a. Estimulación por DTT (reductor)	no	no	sí	sí	sí	sí
b. Inhibición por DTNB (oxidante)	no	no	sí	sí	sí	sí

*se inhibe

Los receptores de NMDA en la retina

A finales de la década de los años 80 se descubrió el coagonismo de los aminoácidos glicina y ácido L-glutámico en el receptor de NMDA (16,18), desde entonces, el estudio de la neurotransmisión excitadora se ha centrado en la determinación de la estructura de éste y de otros receptores canal activados por gluta-

mato. Se ha demostrado que estos receptores canal pertenecen a un grupo de proteínas con una historia común, y que la heterogeneidad estructural lleva a una heterogeneidad funcional que puede servir como complemento para el estudio de la neurotransmisión excitadora en otros tejidos neurales como la retina.

En la retina de la rata se ha descrito la expresión de los RNA mensajeros (mRNA) que codifican para las

CUADRO 2
Afinidades y densidades relativas de diversos radioligandos en receptores de NMDA neuronales

	B _{máx} (pmol/mg de proteína)	K _d (nM)	nH
Membranas de cerebro anterior (corteza cerebral e hipocampo de rata) (2,10,31,44)			
MK-801- ³ H	4.75	6.86	< 1.00
L-689560- ³ H	5.93	2.77	1.00
CGP 39653- ³ H	3.47	8.59	1.00
Glicina- ³ H	3.10	130.00	1.00
	2.31	112.00	n.d.
	8.80	138.00	n.d.
5, 7 diCl-kin- ³ H	14.50	69.00	n.d.
Membranas de cerebelo de rata (31,44)			
Glicina- ³ H	0.87	310.00	1.00
	3.52	64.50	< 1.00
	18.70	619.00	< 1.00
Membranas de células granulares de cerebelo de rata (31).			
Glicina- ³ H	3.60	1900.00	1.00

n.d. = no determinado

B_{máx}, densidad relativa; K_d, constante de afinidad; nH, coeficiente de Hill. MK-801 = Maleato de dizocilpina (antagonista no competitivo, bloqueador de canal); L689, 560 = (±)-4-trans-2-carboxi-5, 7-dicloro-4-fenilamino carbonilamino- 1, 2, 3-tetrahidroquinolina (antagonista del sitio de glicina); 5, 7 diCl-kin = 5, 7 dicloro kinurenato (antagonista del sitio de glicina).

CUADRO 3
Afinidades y densidades relativas
de diversos radioligandos
en receptores de NMDA recombinantes

	<i>B</i> _{máx} (pmol/mg de proteína)	<i>K</i> _d (nM)	<i>n</i> _H
NR1a/NR2A (10,21) MK-801- ³ H	1.84 n.d.	4.28 4.90	1.00 n.d.
L-689, 560- ³ H 5, 7 diCl-kin- ³ H NR1a/NR2B (10,21) MK801- ³ H	2.61 n.d. 0.69 n.d.	3.24 59.00 8.61 5.60	1.00 n.d. 1.00 n.d.
L-689, 560- ³ H 5, 7 diCl-kin- ³ H NR1a/NR2C (21). MK-801- ³ H 5, 7 diCl-kin- ³ H NR1a/NR2D (21). MK-801- ³ H 5, 7 diCl-kin- ³ H	1.01 n.d. n.d. n.d. n.d. n.d.	3.98 97.00 189.00 113.00 151.00 113.00	1.00 n.d. n.d. n.d. n.d. n.d.

n.d. = no determinado

*B*_{máx}, densidad relativa; *K*_d, constante de afinidad; *n*_H, coeficiente de Hill. MK-801 = Maleato de dizocilpina (antagonista no competitivo, bloqueador de canal); L689, 560 = (±)-4-trans-2-carboxi-5, 7-dicloro-4-fenilamino carbonilamino- 1, 2, 3-tetrahidroquinolina (antagonista del sitio de glicina); 5, 7 diCl-kin = 5, 7 dicloro kinurenato (antagonista del sitio de glicina).

subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR2C (4). La farmacología de los receptores de glicina, insensibles a la estricnina en la retina de los pollos de uno a cinco días de nacidos, sugiere que dicho sitio forma parte del receptor de NMDA (22). El estudio farmacológico de la afinidad de los agonistas por el sitio de glicina en las membranas de las capas plexiformes externa e interna, demuestra que el orden de eficiencia es: glicina ACPC > D-serina, lo cual corrobora lo observado por otros investigadores en las membranas del cerebro (33). Dichos receptores son insensibles a la estricnina y a la β-alanina (compuestos que interactúan preferentemente con los receptores inhibidores), así como a otros compuestos análogos de la glicina que actúan

sobre el receptor de NMDA, como el 7-cloro-kinurenato y la quinoxalina ACEA-1021.

Por otra parte, hay evidencia de que los receptores de NMDA en la retina del pollo presentan baja afinidad por el antagonista no competitivo MK-801, y poca sensibilidad al bloqueo por Mg²⁺ (3). Los receptores de NMDA que contienen la cadena NR2C tienen un perfil farmacológico característico, definido por una baja afinidad por los antagonistas del sitio de glicina. Asimismo, la inhibición no competitiva de la unión de glicina-³H por la poliamina espermina únicamente se ha demostrado en la retina (35). Los experimentos en los sistemas de expresión heterólogos indican que los receptores heteroméricos de cada una de las variantes postranscripcionales de la subunidad NR1 no difieren en su afinidad por la glicina ni por el ácido 5, 7 dicloro kinurénico-³H (1,9) (cuadros 2 y 3). Las características farmacológicas de la unión de glicina-³H, descritas en la retina, corresponden a un sitio de unión en el receptor de NMDA con muy baja afinidad por los antagonistas, por lo que una hipótesis plausible para explicar las diferencias observadas en la inhibición de la unión de glicina-³H por estos compuestos a las membranas sinaptosomales de la retina, es que la edición de subunidades NR1, que forman el sitio de unión a glicina en estos receptores (11), sea un factor determinante de las características moleculares de éstos en la retina.

La diversidad fenotípica de los receptores de NMDA se ha correlacionado con la existencia de varias subunidades homólogas que determinan las características funcionales de los mismos en distintas regiones del SNC; sin embargo, aún no hay una teoría que explique las relaciones existentes entre la interacción de ligandos, la actividad del canal, y los distintos estados conformacionales de estas proteínas de membrana en relación con un comportamiento específico. El problema es mucho más complicado de lo que parece, sin embargo, el estudio de la neurotransmisión excitadora retroalimenta el conocimiento que se tiene sobre otros sistemas de transducción. Actualmente, la estructura y función de los receptores glutamatérgicos se encuentra en uno de sus mejores momentos y, en perspectiva, el desarrollo de drogas que puedan aliviar los efectos derivados de la sobrestimulación de estos receptores en condiciones patológicas es un área que podría beneficiarse con estos estudios.

REFERENCIAS

1. ANEGAWA NJ, LYNCH DR, PRITCHETT DL: Characterization of [³H]dichlorokynurenic acid binding in cloned NMDA receptors expressed in transfected cells. *Neurosci Abst*, 20:469, 1994.
2. BARON BM, SIEGEL BW, SLONE AL, HARRISON BL, PALFREYMAN MG, HURT SD: [³H]5,7-dichlorokynurenic acid, a novel radioligand labels NMDA receptor-associated glycine binding sites. *Eur J Pharmacol*, 206:149-154, 1991.
3. BOJE KM, SKOLNICK P, RABER J, FLETCHER RT, CHADER G: Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem Int*, 20(4):473-486, 1992.
4. BRANDSTÄTTER JH, HARTVEIT E, SASSOË-POGNETTO M, WÄSSLE H: Expression of the NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult retina. *Eur J Neurosci*, 6:1100-1112, 1994.
5. BULLER AL, LARSON HC, SCHNEIDER BE, BEATON JA, MORRISETT RA, MONAGHAN DT: The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J Neurosci*, 14:5471-5484, 1994.
6. BURNASHEV N, ZHOU S, NEHER E, SAKMANN B: Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol*, 485(2):403-418, 1995
7. DURAND GM, GREGOR P, ZHENG X, BENNETT MV, UHL GR, ZUKIN RS: Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein

- kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:9359-9363, 1992.
8. EHLERS MD, WHITTEMORE GT, HIGANIR RL: Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science*, 269:1734-1737, 1995.
 9. GRIMWOOD S, LE BOURDELLES B, WHITING PJ: Recombinant human NMDA homomeric NR1 receptors expressed in mammalian cells form a high-affinity glycine antagonist binding site. *J Neurochem*, 64:525-530, 1995.
 10. GRIMWOOD S, LE BOURDELLES B, ATTACK JR, BARTON C, COCKETT W, COOK SM, GILBERT E, HUTSON PH, MCKERNAN RM, MYERS J, RAGAN CI, WINGROVE PB, WHITING PJ: Generation and characterization of stable cell lines expressing recombinant human N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Neurochem*, 66(6):2239-2247, 1996.
 11. HIRAI H, KIRSCH J, LAUBE B, BETZ H, KUHSE J: The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: Identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci*, 93:6031-6036, 1996.
 12. HOLLMAN M, BOULTER J, MARON C, BEASLEY L, SULLIVAN J, PECHT G, HEINEMANN S: Zinc potentiates agonist-induced currents at certain spliced variants of the NMDA receptor. *Neuron*, 10:943-954, 1993.
 13. HOLLMANN M, HEINEMANN S: Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17:31-108, 1994.
 14. IKEDA K, NAGASAWA M, MORI H, ARAKI K, SAKIMURA K, WATANABE M, INOUE Y, MISHINA M: Cloning and expression of the epsilon4 subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Lett*, 313:34-38, 1992.
 15. ISHII T, MORIYOSHI K, SUGIHARA H, SAKURADA H, KADOTANI H, YOKOI M, AKAZAWA C, SHIGEMOTO R, MIZUNO N, MASU M, NAKANISHI S: Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem*, 268:2836-2843, 1993.
 16. JOHNSON JW, ASCHER P: Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325:529-531, 1987.
 17. KEMP JA, LEESON PD: The glycine site of the NMDA receptor - five years on. *Trends Neurosci*, 14:20-25, 1993.
 18. KLECKNER NW, DINGLEDINE R: Regulation of hippocampal NMDA receptors by magnesium and glycine during development. *Mol Brain Res*, 11:151-159, 1991.
 19. KOHR G, ECKARDT S, LUDDENS H, MONYER H, SEEBURG PH: NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron*, 56:81-85, 1994.
 20. KUTSUWADA T, KASHIWABUCHI N, MORI H, SAKIMURA K, KUSHIYA E, ARAKI K, MEGURO H, MASAKI H, KUMAHISHI T, ARAKAWA M, MISHINA M: Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*, 358:36-41, 1992.
 21. LAURIE DJ, SEEBURG PH: Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. *Eur J Pharmacol*, 268:334-345, 1994.
 22. LOPEZ-COLOME AM, CALDERON F, RODRIGUEZ A: Modulatory effects of polyamines on strychnine-insensitive glycine receptors in chick retina. *Neurosci Abst*, 21, 1995.
 23. MARIANOWSKI R, POLLARD H, MOREAU J, DESPRES G, BEN ARI Y, TRAN BA HUY P, ROMAND R: N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1 and NR2C are over expressed in the inferior colliculus of audiogenic mice. *Neurosci Lett*, 189:190-194, 1995.
 24. MIRSHAHI T, WOODWARD JJ: Ethanol sensitivity of heteromeric NMDA receptors: effects of subunit assembly, glycine and NMDAR1 Mg²⁺-insensitive mutants. *Neuropharmacol*, 34(3):347-355, 1995.
 25. MONAGHAN DT, BRIDGES RJ, COTMAN CW: The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 29:365-402, 1989.
 26. MONAGHAN DT, BULLER AL, ANDALORO VJ: On the molecular basis of NMDA receptor diversity. En: *The Ionotropic Glutamate Receptors*. Monaghan DT, Wenthold RJ (Eds) Humana Press. Totowa, 1997.
 27. MONYER H, BURNASHEV N, LAURIE DJ, SAKMANN B, SEEBURG PH: Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256:31-37, 1992.
 28. MONYER H, BURNASHEV N, LAURIE DJ, SAKMANN B, SEEBURG PH: Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12:529-540, 1994.
 29. MORRISETT R: Electrophysiologic characteristics of heteromeric recombinant NMDA receptors: Comparison with native receptors. En: *The Ionotropic Glutamate Receptors*. Monaghan DT, Wenthold RJ (Eds) Humana Press, Nueva Jersey, 1997.
 30. NAKANISHI S: Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 258:597-603, 1990.
 31. OSHEA RD, MANALLACK DT, CONWAY EL, MERCER LD, BEART PM: Evidence for heterogenous glycine domains but conserved multiple states of the excitatory amino acid recognition site of NMDA receptor: regional binding studies with [³H]glycine and [³H]glutamate. *Exp Brain Res*, 86:652-662, 1991.
 32. PEREZ-VELASQUEZ JL, ZHAN L: In vitro hypoxia induces expression of the NR2C subunit of the NMDA receptor in rat cortex and hippocampus. *J Neurochem*, 63:1171-1173, 1994.
 33. PULLAN LM, POWELL RJ: Comparison of binding at strychnine-sensitive (inhibitory glycine receptor) and strychnine-insensitive (N-methyl-D-aspartate receptor) glycine binding sites. *Neurosci Lett*, 148:199-201, 1992.
 34. RADITSCH M, RUPPERSBERG JP, KUNER T, GÜNTHER W, SCHOEPFER R, SEEBURG PH, JAHN W, WITZERMANN V: Subunit-specific block of cloned NMDA receptors by argiotoxin. *FEBS Lett*, 324(1):63-66, 1993.
 35. RODRIGUEZ C. A, CALDERON DE ANDA F, LOPEZ C. AM: La espermina como un inhibidor no competitivo de los receptores de glicina insensibles a estricnina en la retina de pollo. XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Puebla, México, 1996.
 36. SEKIGUCHI M, OKAMOTO K, SAKAI Y: Glycine-insensitive receptor expressed in *Xenopus* oocytes by guinea pig cerebellar mRNA. *J Neurosci*, 10(7):2148-2155, 1990.
 37. SNELL LD, TABAKOFF B, HOFFMAN PL: Radioligand binding to the N-methyl-D-aspartate receptor/ionophore complex: alterations by ethanol in vitro and by chronic in vivo ethanol ingestion. *Brain Res*, 602:91-98, 1993.
 38. STERN P, BÉHÉ P, COLQUHOUN D: Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc R Soc Lond Biol*, 250:271-277, 1992.
 39. SULLIVAN JM, TRAYNELLIS SF, CHEN HSV, ESCOBAR W, HEINEMANN SF, LIPTON S: Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron*, 13:929-936, 1994.
 40. TRAYNELIS SF, HARTLEY M, HEINEMANN SF: Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*, 268:873-876, 1995.
 41. WAFFORD KA, BAIN CJ, BOURDELLES B, WHITING PJ, KEMP JA: Preferential co-assembly of recombinant NMDA receptors composed of three different subunits. *Neuroreport*, 4:134-1349, 1993.
 42. Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M: Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport*, 3:1138-1140, 1992.
 43. WENZEL A, SCHEURER L, KÜNZI R, FRITSCHY JM, MHOLER H, BENKE D: Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport*, 7(1):45-48, 1995.
 44. WIDDOWSON PS, TRAINOR A, LOCK EA: NMDA receptors in rat cerebellum and forebrain: subtle differences in pharmacology and modulation. *J Neurochem*, 64(2):651-661, 1995.
 45. WILLIAMS K, ZAPPAL AM, PRICHETT DB, SHEN YM, MOLINOFF PB: Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol Pharmacol*, 45:803-809, 1994.

46. WILLIAMS K: Subunit-specific potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors by histamine. *Mol Pharmacol*; 46:531-541, 1994
47. WILLIAMS K: Pharmacological properties of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors containing the $\epsilon 4$ (NR2D) subunit. *Neurosci Lett*, 184:181-184, 1995.
48. WONG EHF, KNIGHT AR, WOODRUFF GN: [^3H]MK-801 labels a site on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex in rat brain membranes. *J Neurochem*, 50:274-281, 1988.
49. WONG JKT, THUKRAL V: Presynaptic NMDA receptors display physiological characteristics of homomeric complexes of NR1 subunits that contain the exon 5 insert in the N-terminal domain. *J Neurochem*, 66(2):865-868, 1996.
50. WOOD MW, VAN DONGEN HMA, VAN DONGEN AMJ: Structural conservation of ion conduction pathways in K^+ channels and glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:4882-4886, 1995.
51. WOOD PL: The co-agonist concept: is the NMDA-associated glycine receptor saturated *in vivo*?. *Pharmacol Lett*, 57(4):301-310, 1995.
52. YOUNG AB, FAGG GE: Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends Pharmacol Sci*, 11:126-133, 1990.

acta

PSIQUIÁTRICA Y PSICOLÓGICA DE AMERICA LATINA

Editoriales: Neurociencias-Psicociencias (J. Azcoaga)

Unidad y heterogeneidad en psicología (A. Vilanova)

Transtornos emocionales en Santiago de Chile (R. Florenzano Urzua, Julia Acuña Rojas, C. Fullerton Ugade, Cecilia Castro Muñoz)

Reflexiones y propuestas en torno a la prevención del consumo de drogas (J. Pons Diez)

La sexualidad en la tercera edad (Beatriz Dorfman Lerner)

Alucinación verbal y estructura de la psicosis (Graziela Napolitano, Laura Rizzo, Andrea Perdoni)

Estresores cotidianos familiares y depresión en adolescentes mexicanos (Catalina González-Forteza, Patricia Andrade Palos, A. Jimenez Tapia)

Género y mortalidad por causas externas en jóvenes argentinos (Roxana Ynoub)

El juego patológico en estudiantes universitarios (E. García, Ciro A. Correa)

Niveles plasmáticos de pimozida y psicopatología del trastorno delirante (H. Silva Ibarra et al.)

Javier Brandam y los orígenes del Hospital Psiquiátrico de San Luis (H. Klappenbach, Andrea Piñeda, Eugenia Galanzini)

Atalaya: De éticas y robots (Beatriz Dorfman Lerner)

Quo vadis, Psychiatry? (Fernán Thynaud)

Psicolexicología: Graves y severos (D. Ibarra)

Publicación trimestral-Órgano de la Fundación Acta
Buenos Aires/Diciembre de 1997/Vol. 43 No. 4