

LA SUBUNIDAD NMDAR-1 DEL RECEPTOR N-METIL-D-ASPARATO (NMDAR) EN EL HIPOTÁLAMO DEL OVINO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE *WESTERN BLOT*

Detection of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit-1 (NMDAR-1) in the Hypothalamus of the Sheep by Western Blot Analysis

Ana Z. Ruiz E.¹ y Roger Kittok²

¹ Departamento de Ciencias Biomédicas, Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 4563, Maracay, Estado Aragua, Venezuela. ² Animal Sciences Department, University of Nebraska-Lincoln, Nebraska 68503, United States. E-mail: ruizz11@yahoo.com

RESUMEN

Los aminoácidos excitatorios (AAEs), L-glutamato y aspartato, son considerados las principales sustancias endógenas neuroactivas involucradas en la transmisión excitatoria. El receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) es uno de los principales receptores de los AAEs. Este receptor estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) al facilitar la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). En este estudio se plantearon dos objetivos: Estandarizar la técnica de *Western blot* para identificar la subunidad-1 del NMDAR (NMDAR-1) en hipotálamo del ovino; y determinar si existe diferencia en la distribución de la NMDAR-1 en los diferentes cuadrantes hipotalámicos (cuadrantes dorsal-rostral, ventral-rostral, dorsal-caudal, y ventral-caudal) del ovino. Se utilizaron 100 g de proteína total para identificar la NMDAR-1 en el hipotálamo ovino. Se evidenció un efecto del cuadrante o porción del hipotálamo ovino sobre la expresión proteica de la NMDAR-1. En particular, el cuadrante dorsal-rostral (31,5567 densidad óptica \pm 13,0831; $P < 0,05$) expresó más cantidad del receptor que el cuadrante ventral caudal (17,1517 densidad óptica \pm 13,0831; $P < 0,05$) y que el cuadrante ventral-rostral (16,4683 densidad óptica \pm 13,0831; $P < 0,05$). Estos resultados demuestran que el receptor NMDA se expresa más en la región rostral del hipotálamo del ovino, área en la cual se encuentran distribuidos los cuerpos celulares y axones de las neuronas productoras de GnRH. Estos resultados sugieren la participación de la vía glutamatérgica en la regulación de la reproducción de los ovinos.

Palabras clave: Receptor NMDA, análisis *Western blot*, ovino.

ABSTRACT

The excitatory amino acids (EAAs), L-glutamate and aspartate, are considered the major endogenous neuroactive substances involved in excitatory neurotransmission. The N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) is one of the main excitatory amino acid receptors. Exogenous activation of the NMDAR results in the release of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) from the hypothalamus and subsequent release of luteinizing hormone (LH) from the anterior pituitary. The present study had two aims: to standardize the optimal amount of total protein required to identify the NMDAR subtype-1 (NMDAR-1) in the hypothalamus of the sheep; to determine whether a difference exists in the distribution of NMDAR-1 in different hypothalamic regions (dorsal-rostral, ventral-rostral, dorsal-caudal, and ventral-caudal quadrant) in male sheep. The optimal amount of total hypothalamic protein required to visualize the NMDAR-1 was 100 μ g. There was an effect of quadrant on the expression of NMDAR-1 in the hypothalamus of the intact male sheep. In particular, dorsal-rostral quadrant (31.5567 optical density \pm 13.0831) expressed more receptor than ventral-caudal quadrant (17.1517 optical density \pm 13.0831; $P < 0.05$) and ventral-rostral quadrant (16.4683 optical density \pm 13.0831; $P < 0.05$). These data suggest that NMDAR is more expressed in the rostral area of the hypothalamus, where the cell bodies and axons of the GnRH neurons are localized. Thus, these data allow suggest that glutamatergic pathway potentially is involved in modulating the reproductive activity in the ovine.

Key words: NMDA receptor, Western blots, analysis, ovine.

INTRODUCCIÓN

Los receptores del L-glutamato son los encargados de mediar la neuro-transmisión excitatoria en el cerebro, siendo

además importantes en la adquisición de la memoria, el aprendizaje y en algunos desórdenes neuro-degenerativos [14, 16, 19, 23, 25, 26, 30]. Los receptores de este aminoácido han sido clasificados de acuerdo a sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas en dos grandes grupos: receptores ionotrópicos y metabotrópicos [24]. Los receptores ionotrópicos, están subdivididos a su vez en receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) y en receptores no N-metil-D-aspartato [21]. Los receptores NMDA son complejos proteicos heteroméricos compuestos de dos tipos de subunidades: la subunidad-1 (NMDAR-1) y la subunidad-2 (NMDAR-2) [8, 15, 16, 24, 26, 27]. La subunidad NMDAR-1 de la rata es un polipéptido compuesto de 938 aminoácidos que posee cuatro segmentos trans-membránica junto a un segmento extra-membránica largo [31]. La secuencia de aminoácidos del NMDAR-1 resultó ser 99% idéntica entre las de rata y humano [7]. Se han encontrado receptores de L-glutamato en algunos núcleos hipotalámicos tales como el ventromedial, paraventricular, supraquiásmico, magnocelular, supraóptico, arqueado, área hipotalámica lateral, eminencia media y área hipotalámica preóptica [2, 6, 20]. Se ha propuesto que el glutamato, a través de sus receptores NMDA, juega un papel importante en el control de la reproducción, la pubertad, la secreción pulsátil de las hormonas gonadotróficas, la conducta reproductiva y el estrés. Este aminoácido juega un papel determinante en la regulación de la secreción de la hormona luteinizante (LH) desde la glándula pituitaria, a través de la estimulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo. El área preóptica (APO) del hipotálamo es considerada como la posible región donde los aminoácidos excitatorios ejercen su acción sobre la secreción de la GnRH [5, 11, 12, 13]. La GnRH es producida por neuronas cuyos cuerpos celulares se encuentran ubicados a nivel de la APO del hipotálamo y sus axones terminan a nivel del hipotálamo medio-basal y la eminencia media. Activación de los receptores NMDA mediante la administración de L-glutamato exógeno o sus análogos, NMDA (N-metil-D-aspartato) o NMA (N-metil-D, L-aspartato), resultan en la liberación de GnRH desde el hipotálamo y subsiguiente liberación de LH desde la glándula pituitaria en roedores [4, 32], primates [9] y en ovejas [3]. El núcleo anteroventral -periventricular (AVPV) de la APO es considerada una región esencial para la retroalimentación hormonal ejercida sobre las hormonas gonadotróficas, la cual está mediada a través de la vía nerviosa. El núcleo AVPV parece enviar información directa a las neuronas secretoras de GnRH [1, 11, 12, 17, 18, 29]. En esta investigación se establecieron dos diferentes objetivos: a. estandarizar la técnica de *Western blot* para identificar la NMDAR-1; b. identificar en cuál porción o cuadrante del hipotálamo del ovino se expresa la subunidad NMDAR-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon seis ovinos post-puberales (6-7 meses de edad), machos enteros, mestizos del tipo cara negra de la raza

Suffolk. Los animales procedían de la sección de ovinos y caprinos de la Universidad de *Nebraska-Lincoln, EUA*. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con dietas comerciales y sujetos a los planes sanitarios establecidos para esa región.

Recolección de muestras de hipotálamo del ovino

Después de sacrificar todos los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/Kg *e.v.*; *Sleepaway, Fort Dodge Labs, Inc, Ford Dodge, IA, EUA*), los cráneos fueron abiertos y los hipotálamos fueron removidos y luego seccionados en dos mitades: derecha e izquierda. Posteriormente, cada mitad fue a su vez dividida en cuatro porciones o cuadrantes a saber: dorsal-rostral (DR), ventral-rostral (VR), dorsal-caudal (DC) y ventral-caudal (VC). La porción ventral fue cortada de tal manera que la eminencia media fuese incluida en el cuadrante ventral-rostral. Una vez divididos los tejidos, fueron colocados en crio-viales, y congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C , hasta la posterior extracción de la proteína total de cada muestra.

Extracción de la proteína total del hipotálamo ovino

Todos los procedimientos de laboratorio se llevaron a cabo a 4°C . Cada cuadrante o porción hipotalámica fue homogeneizada individualmente (*Polytron homogenizer, Kinematica GmbH, Switzerland*) con buffer de extracción a razón de 6 mL/g tejido. Dicho buffer estuvo compuesto de: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 500 mM KCl, 2 mM ditiotreitól (DTT), y 0,05% cóctel inhibidor de la proteasas (4-2-aminoetil-benzenesulfonil fluoride, pepstatin A, trans-epoxysuccinil-L-leucilamido 4-guanidino butano, bestatin, leupeptin y aprotinin; *Sigma, St. Louis, MO, EUA*). El homogeneizado fue centrifugado a $26.890 \times g$ durante 15 min a 4°C y posteriormente filtrado a través de gasas estériles. El filtrado se transfirió a un tubo de 1,5 mL para ser centrifugado a $26.890 \times g$ durante 15 min a 4°C . El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a $26.890 \times g$ durante 15min a 4°C y fue almacenado a -80°C hasta la subsiguiente cuantificación de la proteína total.

Cuantificación de la proteína total del hipotálamo ovino

Se determinó la concentración proteica total de cada muestra mediante métodos colorimétricos (*BCA protein assay kit; Pierce, Rockford, IL, EUA*). Se cuantificaron tres diferentes diluciones de las muestras de proteína total hipotalámica I: 1/1, 1/10 y 1/100, respectivamente.

Estandarización de la técnica de *Western blot* para cuantificar la subunidad NMDAR-1 del hipotálamo ovino

Se preparó un mini-gel de poli(acrilamida)-dodecil sulfato sódico del tipo discontinuo (SDS-PAGE). Dicho gel contenía 5 y 10% de Bis-poli(acrilamida) en la porción de anclaje y en la porción de resolución, respectivamente. Se dispensaron en el gel cuatro diferentes cantidades de proteína total (100 μg , 200 μg , 400 μg y 600 μg), partiendo de una muestra de tejido hipo-

talámico ovino con alta concentración de proteína. Las bandas proteicas fueron separadas mediante un sistema de electroforesis vertical (*GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA*). Este procedimiento se realizó con la finalidad de determinar la concentración óptima de proteína requerida para reaccionar con el primer anticuerpo y producir una banda proteica bien definida y claramente cuantificable. Se empleó una concentración de 100 µg/mL del primer anticuerpo (anti-NMDAR-1 de humano producido en conejo), de acuerdo a las recomendaciones de la casa productora (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA*).

Cuantificación de la NMDAR-1 mediante la Técnica de *Western blot*

Se cargó en el gel SDS-PAGE tres diferentes estándares: el estándar pre-coloreado de proteínas (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA*), una muestra de los hipotálamos de ratas y ratones (100 µg, como controles positivos) y una muestra de músculo esquelético de carnero (100 µg, como control negativo). Se verificó la cantidad de proteína total de cada muestra cargada en cada hoyo del gel, con la coloración de Azul de *Coomassie* (*Bio-Rad, Hercules, CA, EUA*). Dicha coloración fue visualizada con un sistema de imagen infrarroja (*Licor Odyssey, Lincoln, NE, EUA*). Se realizó la corrida electroforética del gel a 200 voltios, durante 3 horas. Las bandas proteicas fueron transferidas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa (45 µm; *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA*), mediante un equipo de transferencia semi-seco (*Owl Separation System, Portsmouth, NH, EUA*). Para este procedimiento, se aplicaron 14 voltios durante 1,5 horas a 4°C. Se verificó la transferencia de bandas proteicas del gel a la membrana de nitrocelulosa, mediante la coloración de *Ponceau* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA*). Se bloquearon las membranas con solución buffer Tris-Tween (2,42 g de Base Tris + 29,24 g de NaCl + 0,5 mL Tween-20 / 1 L de H₂O destilada; TBST, pH 7,5) que contenía 5% de leche deshidratada y descremada. Este procedimiento se realizó durante 1 hora a 4°C. Las membranas se incubaron con el primer anticuerpo (200 µg/mL) durante 16-20 horas. Dicho anticuerpo es específico para la NMDAR-1 del humano (*NMDAR1-H-300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA*) y es producido en conejos. Se lavaron las membranas tres veces con TBST durante 5 min para retirar los restos del primer anticuerpo. Posteriormente, se incubaron las membranas durante 1 hora con un segundo anticuerpo, policlonal de cabra anti-conejo (*Pierce, Rockford, IL, EUA*). Este anticuerpo fue usado a una dilución de 1:120,000. El segundo anticuerpo trae conjugada la enzima peroxidasa. Las bandas proteicas inmuno-reactivas se visualizaron mediante una reacción de quimoluminiscencia (*Signal[®] West Pico; Pierce, Rockford, IL, EUA*). Finalmente, las membranas se expusieron a películas de rayos x durante 1,5 a 2 horas para visualizar las bandas proteicas respectivas.

Las películas de rayos x, conteniendo las bandas proteicas, fueron escaneadas (*Hewlet Packard Scanjet 3970, Palo*

Alto CA, EUA) y almacenadas en imágenes de 811 x 614 píxeles (5,41 x 4,10 pulgadas). Las imágenes digitales fueron analizadas usando un programa de computación, *Imagen Scion* (*Scion Image, Frederick, MD, EUA*). Cada banda proteica fue medida en un área específica de 658 píxeles². Dicho programa transforma el valor en píxeles obtenido en un valor de densidad óptica, el cual viene determinado tanto por la densidad como por el tamaño de cada banda proteica. La densidad óptica del fondo de la membrana es sustraída de la densidad de la banda proteica.

Análisis Estadístico

Todos los análisis fueron realizados usando el Sistema de Análisis Estadístico (SAS 1999-2001), versión 8,2 TS2MO [34]. Los valores de densidad óptica obtenidos de las bandas de proteínas fueron analizados a través del procedimiento mixto del programa SAS. El modelo estadístico usado fue: $Y_{ijklm} = \mu + Q_i + R_j + Membrana_k + Animal (Membrana)_{kl} + \epsilon_{ijklm}$, donde: Y es la variable respuesta (densidad de la banda proteica o receptor NMDA), μ es el promedio general de la variable respuesta, Q es el efecto del cuadrante hipotalámico, **Membrana** es el efecto de membrana (aleatorio), **Animal (Membrana)** es el efecto animal incorporado dentro del efecto membrana (aleatorio) y ϵ es el efecto residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de la proteína total del hipotálamo ovino

Se utilizó una dilución de 1/10 para la cuantificación de la proteína total de las muestras de tejido hipotalámico en cada uno de los cuadrantes (DR, VR, DC, y VC) evaluados. El promedio de concentración proteica total encontrado en los diferentes cuadrantes hipotalámicos fue de 26,366 µg/mL.

Estandarización de la Técnica de *Western Blot* para cuantificar la subunidad NMDAR-1 del hipotálamo ovino

Se seleccionó la cantidad de 100 µg de proteína total hipotalámica (FIG. 1), como la cantidad óptima de proteína a ser utilizada, que permitió visualizar e identificar la banda proteica de la subunidad NMDAR-1, como una banda bien definida y de aproximadamente 115 kDa (kilo-daltons) de masa molecular. Aunque el anticuerpo usado es específico para la subunidad NMDAR-1 de humano, debido a que el receptor es altamente homólogo entre especies filogenéticamente distantes como el humano y el ratón [25, 31], se asume que este anticuerpo debería ser capaz de reconocer la subunidad NMDAR-1 del ovino. Además, el anticuerpo usado para reconocer la subunidad NMDAR-1 en el hipotálamo del ovino, no detectó la presencia de la subunidad NMDAR-1 en el músculo esquelético del ovino, siendo empleado dicho tejido como el control negativo (FIG. 2). La masa molecular de esta banda coincide con el reportado por la casa comercial productora del anticuerpo. Además, investigaciones sobre este receptor en

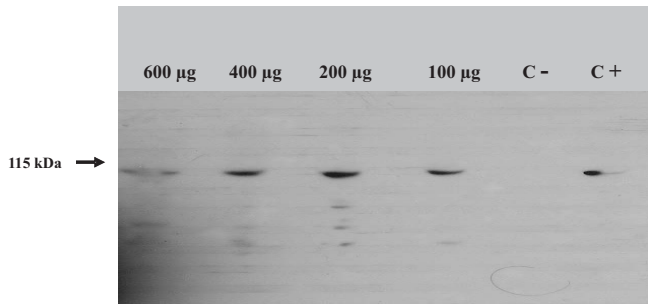


FIGURA 1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT PARA LA SUBUNIDAD NMDAR-1 DEL RECEPTOR NMDA EN EL HIPOTÁLAMO DEL OVEJO/ STANDARDIZATION OF WESTERN BLOT ANALYSIS FOR NMDAR-1 RECEPTOR IN THE HYPOTHALAMUS OF MALE SHEEP.

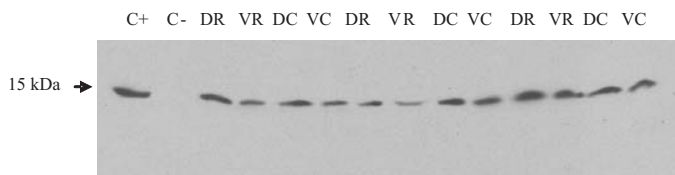


FIGURA 2. MUESTRA REPRESENTATIVA DE UN WESTERN BLOT PARA LA CUANTIFICACION DE LA SUBUNIDAD NMDAR-1 DEL RECEPTOR EN CUATRO DIFERENTES CUADRANTES DEL HIPOTÁLAMO DEL OVINO/ A REPRESENTATIVE WESTERN BLOT ANALYSIS FOR NMDAR-1 RECEPTOR IN FOUR DIFFERENT HYPOTHALAMIC QUADRANTS OF MALE SHEEP.

roedores y usando este mismo anticuerpo, han identificado una banda proteica con un peso molecular similar al anterior mencionado [26, 33]. Adicionalmente, estudios sobre la expresión del receptor NMDA en el hipotálamo de diferentes especies de mamíferos domésticos, han reportado dicho receptor como una banda proteica de aproximadamente 115 kDa [10, 13, 14, 21, 22, 28].

Se cargaron cuatro (4) diferentes concentraciones de proteína total del hipotálamo (100 µg 200 µg, 400 µg y 600 µg). Proteína del hipotálamo de la rata fue usada como control positivo (C+), mientras que el control negativo fue preparado con proteína del músculo esquelético del ovino, en el cual no se expresa este receptor. La flecha negra señala el peso molecular específico (aproximadamente 115 kDa) de la banda proteica de la subunidad NMDAR-1.

Los cuatro cuadrantes del hipotálamo son identificados como: dorsal-rostral (DR), ventral-rostral (VR), dorsal-caudal (DC), y ventral-caudal (VC), respectivamente. Igual cantidad de proteína (100 µg/mL) de cada muestra problema se dispuso en cada pozo del gel. Proteínas totales del hipotálamo de la rata fueron usadas como controles positivos (C+), mientras que el control negativo fue preparado con proteína total del

músculo esquelético del ovino. La flecha negra señala el peso molecular específico (aproximadamente 115 kDa) de la banda proteica de la subunidad NMDAR-1.

Cuantificación de la subunidad NMDAR-1 en diferentes cuadrantes hipotalámicos del ovino

En esta investigación se evidencio un efecto del cuadrante o porción hipotalámica evaluada sobre la expresión de la subunidad NMDAR-1 (P<0,05; TABLA I). En particular el cuadrante dorsal-rostral (DR: 31,5567 densidad óptica ± 13,0831) expresó mayor cantidad de la subunidad NMDAR-1 que el cuadrante ventral caudal (VC: 17,1517 densidad óptica ± 13,0831; P<0,05) y que el cuadrante ventral-rostral (VR: 16,4683 densidad óptica ± 13,0831; P<0,05), respectivamente. Como se mencionó previamente, la porción dorsal rostral del hipotálamo del ovino debería incluir el APO, como se observa en otras especies. La APO es considerada como la región del hipotálamo donde el L-glutamato ejerce su acción sobre la secreción de la GnRH. El núcleo AVPV del APO envía información directa a las neuronas secretoras de la LHRH [1, 11, 12, 17, 18, 29]. Kus y col. [18] evidenciaron expresión de la NMDAR-1 en núcleos específicos del hipotálamo, tales como el núcleo supra-óptico, supraquiasmático, ventromedial y la región arqueada del hipotálamo de la rata macho. Hsu y col. [13] cuantificaron la expresión del NMDAR en el APO de ratas hembras y machos neonatos, mediante el análisis de *Western blot*. Similarmente, Mahesh y col. [20] empleando esta técnica, detectaron la presencia de la NMDAR-1 en el hipotálamo de la rata hembra. El hipotálamo expresa los subtipos NMDAR-1, NMDAR-2A y NMDAR-2B del receptor NMDA, los cuales han sido co-localizadas en el cuerpo celular de las neuronas productoras de la GnRH en el APO/ hipotálamo anterior de ratas hembras, en diferentes momentos de su ciclo de vida reproductiva [22].

Partiendo de los resultados obtenidos, se puede sugerir que la NMDAR-1 se expresa más en determinada área del hipotálamo del ovino. Dichas área incluye ciertos núcleos hipota-

**TABLA I
CUANTIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD NMDAR-1 MEDIANTE EL ANÁLISIS DE WESTERN BLOT EN EL HIPOTÁLAMO DEL OVEJO/ NMDAR-1 QUANTIFICATION BY WESTERN BLOT ANALYSIS IN THE HYPOTHALAMUS OF MALE SHEEP.**

Cuadrante ^a	Densidad ^b
DR	31,5567 ^{c,d}
VR	16,4683 ^d
DC	23,4333
VC	17,1517 ^c

^a Cuadrante del hipotálamo: dorsal-rostral (DR), ventral-rostral (VR), dorsal-caudal (DC), y ventral-caudal (VC). ^b Densidad óptica de la banda de la subunidad NMDAR-1; Prueba de los cuadrados mínimos; Error estándar 13,0831. ^{c, d} Valores promedios de densidades ópticas de la banda de la subunidad NMDAR-1 de los cuadrantes con igual letra difieren (P<0,05).

lámicos, los cuales participan activamente en el mecanismo regulatorio de la secreción de las hormonas gonadotróficas. Por lo que estos resultados nos permiten sugerir la participación de la vía glutamatergica en la regulación de la actividad reproductiva del ovino.

CONCLUSIONES

La subunidad NMDAR-1 se expresa más en el área rostral del hipotálamo del ovino, la cual incluye ciertos núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la secreción de la LH a través de la regulación de la GnRH. Dichos resultados sugieren la participación de la vía glutamatérgica, en la regulación de la actividad reproductiva en esta especie.

AGRADECIMIENTO

Agradecimientos a la Universidad de Nebraska-Lincoln, EUA., por el suministro de los recursos para realizar este trabajo de investigación así como al grupo de trabajo del laboratorio de Fisiología Animal del Departamento de Ciencias de los Animales. Además, al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por financiar los estudios de Doctorado en el exterior.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRANN, D. W. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinol.* 61: 213-225. 1995.
- [2] BRANN, D.W.; MAHESH, V.B. Excitatory amino acid: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocrine Rev.* 18: 678-700. 1997.
- [3] BUCHOLTZ, D. C.; VIDWANS, N. M.; HERBOSA, C. G.; SCHILLO, K. K; FOSTER, D. L. Metabolic interfaces between growth and reproduction: pulsatile luteinizing secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinol.* 137: 601-607. 1996.
- [4] CARBONE, S.; SZWARCFARB, B.; OTERO-LOSADA, M. E.; MOGUILVSKY, J. A. Effects of ovarian steroids on gonadotropin response to N-methyl-D-aspartate and on hypothalamic excitatory amino acid levels during sexual maturation in female rats. *Endocrinol.* 130: 365-370. 1992.
- [5] CHAKRABORTY, T. R.; LAURIE, N. G.; GORE, A. C. Colocalization and hormone regulation of estrogen receptor α and N-methyl-D-aspartate receptor in hypothalamus of female rat. *Endocrinol.* 144:299-305. 2003.
- [6] DURAND, G.M.; GREGOR, P.; ZHENG, X.; BENNETT, M.V.; UHL, G.R.; ZUKIN, R.S. 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.* 89:9359-63. 1992.
- [7] FOLDES, R.L.; RAMPERSAD, V.; KAMBOL, R. K. Cloning and sequence analysis of additional splice variants encoding human N-methyl-D-aspartate receptor (hNR1) subunits. *Gene.* 147:303-305. 1994.
- [8] FURUKAWA, H.; SINGH, S.K.; MANCUSSO, R.; GOU-AUX, E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature.* 438: 185-192. 2005.
- [9] GAY, V.; PLANT, T. M. N-methyl-D-aspartate elicits hypothalamic gonadotropin-releasing hormone released in prepubertal male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinol.* 120:2289-96. 1987.
- [10] GROVE, K.L.; SMITH, S. M. Resistance of the hippocampus in the lactating rat to N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated excitation is not due to a nonfunctional receptor system. *Brain Res.* 814:157-163. 1998.
- [11] GU, G. B.; SIMERLY, R. B. Projection of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J. Comp. Neurol.* 384:142-164. 1997.
- [12] GU, G. B.; VAROQUEAUX, F.; SIMERLY, R. B. Hormone regulation of glutamate receptor gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neurosci.* 19:3213-3222. 1999.
- [13] HSU, C.; HSIEH, Y.; LUE, S.; HSU, H. Sex specific expression of N-methyl D-aspartate receptor (NMDAR) in the preoptic area of neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 262: 85-88. 1999.
- [14] HSU, H.; YANG, R.; SHIH, H.; HSIEH, Y.; CHEN, U.; HSU, C. Prenatal exposure of testosterone prevents SDN-POA neurons of postnatal male rats from apoptosis through NMDA receptor. *J. Neurophysiol.* 86:2374-2380. 2001.
- [15] ISHII, T.; MORIYOSHI, K.; SUGIHARA, H.; SAKURADA, K.; KADOTANI, H.; YOKOI, M.; AKAZAWA, C.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N.; MASU, M.; NAKANISHI, S. Molecular characterization of the family of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 268: 2836-2843. 1993.
- [16] JACQUARD, C.; TRIOULIER, Y.; COSKER, F.; ESCARTIN, C.; NICOLAS BIZAT, N.; PHILIPPE HANTRAYE, P.; CANCELA, J.M.; GILLES BONVENTO, G.; BROUILLET, E. Brain mitochondrial defects amplify intracellular $[Ca^{2+}]$ rise and neurodegeneration but not Ca^{2+} entry during NMDA receptor activation. *FASEB J.* 20:1021-1023. 2006.
- [17] KIA, H. K.; YEN, G.; KREBS, C. J.; PFAFF, D. W. Colocalization of estrogen receptor α receptor and NMDA-

- 2D mRNAs in amygdaloid and hypothalamic nuclei of the mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 104:47-54. 2002.
- [18] KUS, L.; HANDA, R.; SANDERSON, J.; KERR, J. ; BE-ITZ, A. Distribution of NMDAR-1 receptor subunit m-RNA and [125] MK-801 in the hypothalamus of intact, castrated and castrated DHTP treated male rats. *Mol. Brain Res.* 28:55-60. 1995.
- [19] LONG-JUN W.; XU, H.; REN, M.; CAO, X.; ZHUO, M. Pharmacological isolation of postsynaptic currents mediated by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in the anterior cingulate cortex. **Mol. Pain**, 3:11. 2007.
- [20] MAHESH, V.B.; ZAMORANO, P.; DE SEVILLA, L.; LEWIS, D.; BRANN, D. W. Characterization of ionotropic glutamate receptor in rat hypothalamus, pituitary and immortalized gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons (GT₁₋₁ cells). **Neuroendocrinol.** 69:397-407. 1999.
- [21] MEEKER, R.B.; SWANSON, D.J.; GREENWOOD, R.S.; HAYWARD, J.N. Quantitative mapping of glutamate presynaptic terminals in the supraoptic nucleus and surrounding hypothalamus. *Brain Res.* 600:112-122. 1993.
- [22] MILLER, B.H.; GORE, A. C. N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in GnRH neurons changes during reproductive senescence in female rat. *Endocrinol.* 143:3568-3564. 2002.
- [23] MONTGOMERY, J.M.; JOEL C SELCHER, J.C.; JESSE E HANSON, J.E.; MADISON D.V. Dynamin-dependent NMDAR endocytosis during LTD and its dependence on synaptic state. **BMC Neurosc.** 6:48. 2005.
- [24] MONYER, H.; SPRENGEL, R.; HERB, A.; HIGUCHI, M.; LOMELI, H.; BURNASHEV, N.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P.H. Heteromeric NMDA receptor: Molecular and functional distinction of subtypes. *Sci.* 256:1217-1221. 1992.
- [25] MORIYOSHI, K.; MASU, M.; ISHII, T.; SHIGEMOTO, R. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* 354:31-37. 1991.
- [26] NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptor and implications for brain function. *Sci.* 258:597-603. 1992.
- [27] NAKANISHI, N.; AXEL, R.; SCHNEIDER, N. A. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:8552-8556. 1992.
- [28] NASH, N.R.; HEILMAN, C. J.; REES, H. D.; LEVERY, A. I. Cloning and localization of *exon 5-containing isoforms of the NMDAR1 subunit in human and rat brains.* **J. Neurochem.** 69:485-493. 1997.
- [29] OTTEM, E.; GODWIN, J. G.; PETERSEN, S. L. Glutamatergic signaling through the N-methyl-D-aspartate receptor directly activates medial subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons, but does not appear to mediate the effect of estradiol on LHRH gene expression. **Endocrinol.** 143:4837-4845. 2002.
- [30] PLANELLS-CASES, R.; SUN, W.; FERRE-MONTIEL, A. V.; MONTAL, M. Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of an N-Methyl-D-aspartate receptor subunit from human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5057-5061. 1993.
- [31] SUGIHARA, H.; MORIYOSHI, K.; ISHII, T.; MASU, M.; NAKANISHI, S. Structure and properties of seven isoforms of the NMDA receptors generated by alternative splicing. **Bioch. Biophys. Res. Comm.** 185:826-832. 1992.
- [32] URBANSKI, H. F.; OJEDA, R. Activation of luteinizing hormone releasing hormone release advances the onset of female puberty. **Neuroendocrinol.** 46:273. 1987.
- [33] WATANABE, M; MISHINA, M.; INOUSE, Y. Distinct distributions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brainstem. *J. Comp. Neurol.* 343:520-531. 1994.
- [34] ZAIDI, S.; SENCHYNA M.; SIVAK, J.G. Quantification of chick lens α A – and δ crystallins in experimentally induced ametropia. **Mol. Vision.** 8:472-476. 2002.