



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

TESIS

“Estudio de la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA en neuronas agudamente disociadas de núcleo estriado de rata”

Que para obtener el título de:

Licenciado en Biomedicina.

PRESENTA:

Aldo Luna Leal

Director de Tesis:

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Puebla, Pue. Abril 2016

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Introducción | 1 |
| Antecedentes..... | 2 |
| Antecedentes generales | 2 |
| Ganglios basales..... | 2 |
| Núcleo estriado. | 4 |
| Glutamato..... | 4 |
| Receptores a glutamato..... | 5 |
| Receptores metabotrópicos..... | 6 |
| Receptores ionotrópicos | 7 |
| Receptores AMPA y Kainato | 7 |
| Receptor NMDA | 8 |
| Antagonistas competitivos y no competitivos | 11 |
| Modulación alostérica del receptor NMDA. | 14 |
| Bloqueadores del poro..... | 14 |
| Modulación en el dominio N-terminal..... | 16 |
| Modulación por poliaminas | 16 |
| Modulación por protones (H ⁺)..... | 18 |
| Otros sitios moduladores del NMDAR | 19 |
| Antecedentes específicos | 20 |
| D-Tubocurarina | 20 |
| Justificación | 22 |
| Planteamiento del problema..... | 22 |
| Hipótesis..... | 23 |
| Objetivos..... | 23 |
| Objetivo general | 23 |
| Objetivos particulares..... | 23 |
| Material y métodos | 23 |
| Muestreo | 24 |
| Definición de la unidad de población | 24 |
| Selección de la muestra..... | 24 |
| Tamaño de la muestra | 24 |
| Material | 24 |
| Metodología | 25 |
| Técnica de célula completa en protocolos de fijación de voltaje..... | 27 |
| Método de recolección de datos | 27 |
| Aplicación de fármacos..... | 28 |
| Protocolos electrofisiológicos..... | 28 |
| Análisis estadístico..... | 30 |
| Diagrama de trabajo..... | 33 |
| Resultados..... | 34 |
| Protocolo de rampa | 35 |
| Registro de las corrientes activadas por NMDA..... | 36 |
| Modulación de la corriente de NMDA por D-Tubocurarina. | 37 |
| Curva dosis-efecto NMDA vs D-Tubocurarina | 37 |
| Voltaje dependencia del efecto de D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA. .. | 40 |
| Efecto de la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA a diferentes concentraciones de glicina. | 44 |
| Discusión de resultados | 48 |
| Conclusiones | 53 |
| Referencias | 54 |
| Anexos | 60 |
| Definición de las variables y escalas de medición..... | 60 |

ÍNDICE DE TABLAS y FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Modelo clásico de la organización funcional de los ganglios basales. | 4 |
| Figura 2. Síntesis de glutamato a partir de la liberación de glutamina por las células gliales..... | 6 |
| Figura 3. Familias moleculares del receptor de glutamato. | 7 |
| Figura 4. Diversidad de las subunidades del receptor NMDA. | 11 |
| Figura 5. Topología de las subunidades que forman al receptor de NMDA. | 12 |
| Figura 6. Receptor NMDA (NR1/NR2) y sus sitios de unión a moduladores. | 13 |
| Figura 7. Estructura y sitios de modulación alostérica del receptor NMDA..... | 20 |
| Figura 8. Microfotografías de células medianas agudamente disociadas del núcleo estriado de la rata. | 35 |
| Tabla 1. Clasificación de mGluRs y efectos intracelulares de su estimulación. | 8 |
| Tabla 2. Agentes selectivos para los NMDARs. | 15 |

INTRODUCCIÓN

La Acetilcolina (ACh) y el receptor a N-metil-D aspartato (NMDAR) interactúan en la regulación de múltiples e importantes funciones cerebrales. La activación del receptor NMDA se sabe, es indirectamente modulada por ACh a través de la activación de receptores muscarínicos o nicotínicos (Fisher & Dani, 2000). Muy poca información sobre si efectivamente la Acetilcolina interactúa directamente con el receptor a NMDA está disponible actualmente.

Un gran número de moléculas naturales y sintéticas han sido identificadas como moduladoras de los receptores de NMDA, llamados así por unirse al receptor y causar aumento o disminución en la respuesta máxima o en la afinidad de su agonista. Algunos de estos moduladores como el Zn^{2+} , las poliaminas y los protones son moléculas endógenas que ejercen efectos reguladores sobre los NMDAR en condiciones fisiológicas y patológicas. (K. Williams, 2009; Ogden & Traynelis, 2011) Además, la industria farmacéutica ha desarrollado antagonistas para los diferentes sitios de unión del receptor NMDA como herramientas para estudiar sus propiedades y para el desarrollo de moléculas terapéuticamente útiles (Hansen, Ogden, Yuan, & Traynelis, 2014; Santangelo *et al.*, 2012).

Recientemente, en el estudio de los efectos que las sustancias colinérgicas producen sobre las corrientes activadas por glutamato, y en especial sobre el NMDAR, el efecto de la D-Tubocurarina, un alcaloide ampliamente conocido por su mecanismo antagónico en los receptores nicotínicos ha producido gran interés por su efecto modulador de las corrientes activadas por NMDA, sin embargo, existe poca información sobre los efectos que tiene esta droga sobre el NMDAR y otros receptores presentes en las células neuronales.

ANTECEDENTES

Antecedentes generales

Ganglios basales

Los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales altamente interconectados entre sí que están involucrados en funciones motoras, cognitivas y que participan también en procesos emocionales (Bar-Gad & Bergman, 2001; Kreitzer & Malenka, 2008).

Los ganglios basales incluyen a cuatro núcleos que se localizan en la región central-basal del encéfalo; estos núcleos son: estriado (caudado-putamen), globo pálido (parte externa e interna), núcleo subtalámico, y la sustancia nigra (parte reticulada y compacta). Estas estructuras han sido objeto de muchos estudios por estar claramente involucrados en desórdenes neurológicos relacionados con anomalías motoras (Cagnan, Duff, & Brown, 2015; O Hikosaka, Takikawa, & Kawagoe, 2000; Rikani *et al.*, 2014).

Estas anomalías o lesiones en los ganglios basales pueden producir síntomas tanto hipercinéticos como hipocinéticos, por lo que esta aparente contradicción funcional sugiere que los ganglios basales constan de dos vías distintas; una vía directa (excitadora) y una vía indirecta (inhibidora) (Figura 1) (Bolam, Hanley, Booth, & Bevan, 2000).

Una vez que los comandos corticales llegan al estriado, estos son enviados a los núcleos de salida a través de una vía directa que consiste en la proyección axonal de las neuronas estriatales hacia el globo pálido interno y la sustancia nigra reticulada y una vía indirecta que consiste en la proyección axonal hacia el globo pálido; el globo pálido las envía a través del núcleo subtalámico a los núcleos de salida (Báez-Mendoza & Schultz, 2013).

Figura 1. Modelo clásico de la organización funcional de los ganglios basales.

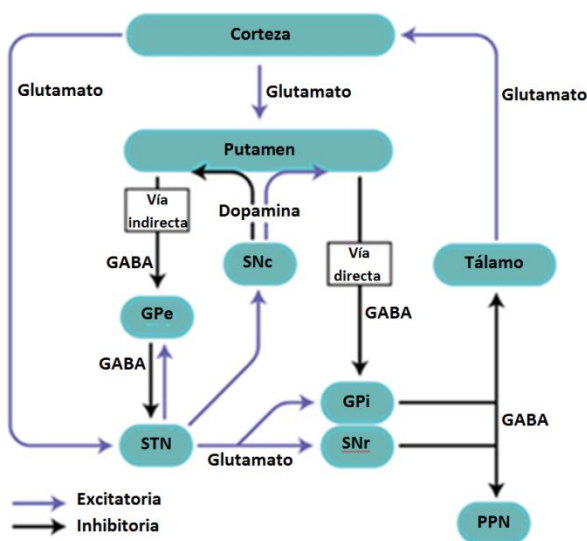


Figura 1. Modelo clásico de la organización funcional de los ganglios basales. Gpe=Globo pálido externo, Gpi=Globo pálido interno, SNc=Sustancia nigra parte compacta, STN=Núcleo subtalámico, SNr=Sustancia nigra parte reticulada, PPN=Núcleo pedúnculo pontino. Modificado de Expert reviews in molecular medicine, 2003.

En la vía directa la corteza envía información al núcleo estriado, que después inhibe al globo pálido interno y a la sustancia nigra reticulada; estas estructuras de proyección GABAérgica inhiben a su vez a los núcleos talámicos. Los núcleos talámicos activan a la corteza motora suplementaria, la cual remite la orden del movimiento a la corteza motora primaria, finalmente de la corteza se envía la orden a las motoneuronas de la médula espinal para que se ejecute el movimiento.

La vía indirecta produce el efecto contrario, es decir, tiende a inhibir los movimientos. El núcleo estriado tiene conexiones inhibitorias con el Globo Pálido externo (cuya acción es tónica) disminuyendo la inhibición hacia el núcleo subtalámico (glutamatérgico) el cual, a su vez excita al Globo Pálido interno y a la Sustancia Nigra reticulada (GABAérgicas) quienes inhiben al tálamo y no estimula a la corteza produciendo así la inhibición motora. (Bolam *et al.*, 2000; O Hikosaka *et al.*, 2000; Okihide Hikosaka, Nakamura, & Nakahara, 2006).

Núcleo estriado.

Está compuesto por dos estructuras conocidas como núcleo caudado y putamen. La importancia de este núcleo radica en que es el módulo de entrada hacia los ganglios basales (Hikosaka *et al.*, 2000), y tiene aferencias que llegan de tres orígenes principales: la corteza cerebral, el mesencéfalo y el tálamo. El núcleo estriado es una estructura heterogénea en cuanto a los tipos neuronales que lo conforman. El tipo celular más abundante es la neurona de proyección espinosa mediana (MSN), que representa aproximadamente 90-95% del total de neuronas estriatales (Graveland, Williams, & DiFiglia, 1985). Estas neuronas utilizan GABA como neurotransmisor e inervan gran cantidad de aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral (vía cortico-estriatal) por lo que las neuronas de proyección de este núcleo son GABAérgicas y tras su activación, ejercen un efecto principalmente inhibitorio por medio de su transmisor (Nakano, Kayahara, Tsutsumi, & Ushiro, 2000).

Glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central en los mamíferos, insectos, gusanos redondos y platelmintos, y juega un papel esencial en el desarrollo, plasticidad neuronal, en la transmisión sináptica excitatoria (Yu, Wu, & Wang, 2015). Se trata de un amino ácido no esencial incapaz de cruzar la barrera hemato-encefálica, por lo que debe ser sintetizado en las neuronas a partir de glucosa y otros precursores (Siegel, A., & Sapru, 2011).

La glutamina es el precursor del glutamato más común en las terminales sinápticas y es liberada por células gliales; una vez dentro de las terminales sinápticas es metabolizada a glutamato por la enzima mitocondrial glutaminasa. Además, el glutamato también puede ser sintetizado por la desaminación de 2-oxoglutarato, un intermediario en el ciclo del ácido tricarboxílico. Posteriormente es empaquetado dentro de las vesículas sinápticas por un proceso de transporte Mg^{+2}/ATP dependiente, y una vez llenas, la vesículas están listas para acoplarse y ser liberadas de su ubicación presináptica. El glutamato es removido del espacio sináptico por

varios transportadores de alta afinidad presentes en las células gliales y en la terminal presináptica (Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, *et al.*, 2001).

Las células gliales tienen la enzima glutamina sintetasa que convierte el glutamato en glutamina, la cual es transportada fuera de la célula e introducida a la terminal nerviosa (Figura 2).

Figura 2. Síntesis de glutamato a partir de la liberación de glutamina por las células gliales.

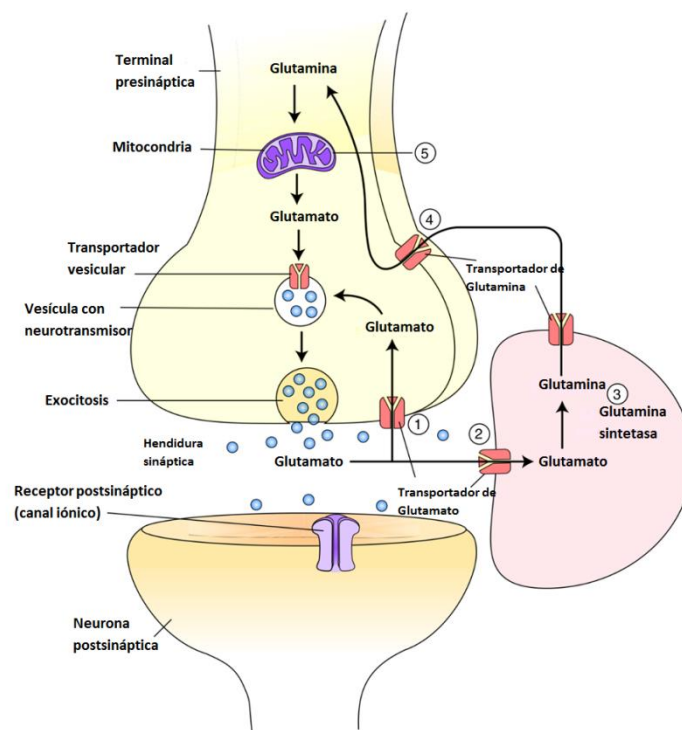


Figura 2. Síntesis del neurotransmisor glutamato a partir del precursor glutamina y mecanismo de su liberación en la sinapsis. Modificado de Siegel, A., & Sapru, 2011.

Receptores a Glutamato

Se conocen dos familias de receptores a glutamato: los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los primeros actúan directamente como canales iónicos regulados por ligando, mientras que los segundos, de forma indirecta por el acople de proteínas G. La acción que ejerce el glutamato sobre los receptores ionotrópicos es excitadora, mientras que en los metabotrópicos puede producir excitación o inhibición (Figura 3).

Figura 3. Familias moleculares del receptor de glutamato.

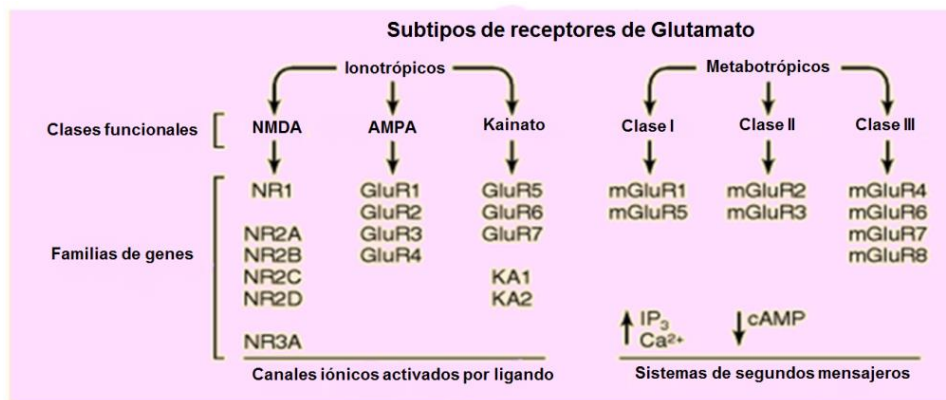


Figura 3. Cada una de las dos divisiones de receptores de glutamato comprende tres grupos definidos funcionalmente, éstos a su vez codificados por diferentes genes (Tomado de Siegel, A., & Saprú, 2011).

Receptores Metabotrópicos

Los receptores metabotrópicos (mGluRs) requieren del acople a proteínas G para su activación, dando lugar a la movilización de segundos mensajeros y activación de varias enzimas intra y extracelulares. (Senkowska & Ossowska, 2003).

Estos receptores se conforman por una cadena peptídica con siete segmentos transmembrana y en base a su similitud genética se agrupan en tres clases (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de mGluRs y efectos intracelulares de su estimulación.

| | | |
|-----------|------------------|--------------------------|
| Clase I | mGluR1 (a,b,c,d) | ↑ [Ca ²⁺] |
| | mGluR5 (a,b) | ↑ DAG, ↑ IP ₃ |
| Clase II | mGluR2 | ↓ [Ca ²⁺] |
| | mGluR3 | ↓ cAMP |
| Clase III | mGluR4 (a,b) | ↓ [Ca ²⁺] |
| | mGluR6 | ↓ cAMP |
| | mGluR7 (a,b) | ↓ cGMP |
| | mGluR8 (a,b) | |

(Las letras en paréntesis indican isoformas del receptor) Tomado de Senkowska *et al.*, 2003.

Receptores Ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos de glutamato que se conocen son AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), KA (Kainato) y NMDA (N-metil-d-aspartato), y son nombrados de acuerdo al agonista farmacológico al que responden selectivamente (Dingledine, Borges, Bowie, & Traynelis, 1999).

Receptores AMPA y Kainato

Los receptores AMPA (AMPA) y Kainato (KAR) son los responsables de la transmisión sináptica rápida en el SNC. Estos receptores se encuentran concentrados en la postsinápsis glutamatérgica y sus sitio principal de acción son las espinas dendríticas y, en menor proporción, en troncos dendríticos y soma celular. (Yamamoto, Hagino, Kasai, & Ikeda, 2015)

Las subunidades que conforman al receptor AMPA están codificadas por una familia de cuatro genes, GLUR1 a GLUR4 (Rosenmund, Stern-Bach, & Stevens, 1998). El receptor responde químicamente a quisqualato, AMPA, Kainato y Glutamato, pero no a NMDA y presenta un sitio modulador externo para cierto tipo de benzodiazepinas como la ciclótiazida que disminuye la inactivación del canal (Dingledine *et al.*, 1999).

Las subunidades que conforman al receptor KA están codificadas por cinco genes, los cuales se clasifican en dos familias, en la primera se encuentran los genes GLUR5, GLUR6 y GLUR7; y en la segunda familia están KA1 Y KA2. Dependiendo de la composición de las subunidades que lo conforman, el canal puede ser permeable a calcio o cationes monovalentes (Hollmann & Heinemann, 1994; Wollmuth & Sobolevsky, 2004).

Receptor NMDA

El receptor NMDA ha recibido mucha atención debido a su participación en una amplia gama de procesos tanto fisiológicos como patológicos, de los cuales se sabe que tiene un papel importante en la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria, la excitotoxicidad neuronal y algunos trastornos y enfermedades neurológicas. (S. Cull-Candy, Brickley, & Farrant, 2001; S. F. Traynelis *et al.*, 2010).

Este receptor es un canal regulado por ligando que comparte características funcionales de canales sensibles a voltaje. Tiene una conformación tetramérica y es permeable a cationes mono y divalentes. Su activación es compleja, ya que son requeridas las uniones de glutamato y glicina para su máxima actividad. El primero actúa como neurotransmisor, el cual es liberado en las terminales presinápticas, mientras que la glicina actúa como modulador, ya que está presente en el fluido extracelular a concentraciones constantes (Mayer, 2011; S. F. Traynelis *et al.*, 2010).

Fisiológicamente, el NMDAR es bloqueado de forma voltaje dependiente por Mg^{+2} y la despolarización de la membrana celular remueve este bloqueo (Kemp & McKernan, 2002). Usualmente esta despolarización es ocasionada por la activación de receptores AMPA, cuya cinética es más rápida que la de los NMDAR. Electrofisiológicamente, la activación de los receptores AMPA puede verse como el componente inicial del potencial postsináptico excitatorio (EPSP), mientras que la de los NMDAR proporciona el componente lento. (Pierre Paoletti & Neyton, 2007)

Este receptor es altamente permeable a Ca^{+2} y la entrada de este ión induce el aumento de su concentración intracelular, provocando la activación de diversas enzimas dependientes de Ca^{+2} como proteína cinasa C (PKC), fosfolipasa C (PLC), proteína cinasa II (PKII), óxido nítrico sintasa (NOS), además de varias proteasas y endonucleasas (Kito Z. & Scheuss V., 2010).

Algunas de dichas enzimas fosforilan receptores AMPA u otros de tipo NMDA incrementando su actividad, así mismo, pueden llevar a la transcripción de varios genes que por consecuencia permitan cambios en la estructura y actividad del receptor (Mayer, 2005).

Se conocen tres familias de subunidades que conforman el canal: NR1, NR2 (A-D) Y NR3A-B (Figura 4); la subunidad NR1 posee las propiedades para constituir un receptor, sin embargo, un receptor formado solamente por subunidades de este tipo no sería eficaz; es necesaria la contribución de la subunidad NR2 para el ensamble de estructuras funcionales (Vyklícky *et al.*, 2014).

Para el correcto funcionamiento de un receptor NMDA se requiere el acople de dos subunidades NR1 con dos subunidades NR2 o una combinación de subunidades NR2 y NR3. Además, para la activación del receptor se necesita la unión simultánea de glutamato y glicina. El receptor NMDA posee cuatro sitios de unión de agonistas, una en cada subunidad. Las subunidades NR1 y NR3 proveen los sitios de unión para glicina y las subunidades NR2 para L-glutamato (Dolino *et al.*, 2015; Edman *et al.*, 2012; Furukawa, Singh, Mancusso, & Gouaux, 2005) .

De esta forma, combinaciones diferentes de subunidades dan lugar a receptores con propiedades funcionales diferentes, por ejemplo, la inclusión de la subunidad NR3A y B en el canal reduce su tiempo de apertura y la conductancia, sugiriendo que juega un papel regulatorio (S. Cull-Candy *et al.*, 2001; S. F. Traynelis *et al.*, 2010).

Estas subunidades son proteínas transmembranales formadas por tres segmentos que atraviesan completamente y un asa reentrante. La región amino terminal es extracelular y contiene sitios de unión a ligando y múltiples lugares de glucosilación. La porción carboxilo terminal es intracelular y podría contener sitios de regulación por segundos mensajeros y además varios sitios de fosforilación de tirosina y serina (Figura 5). (Lynch & Guttman, 2002).

Figura 4. Diversidad de las subunidades del receptor NMDA.

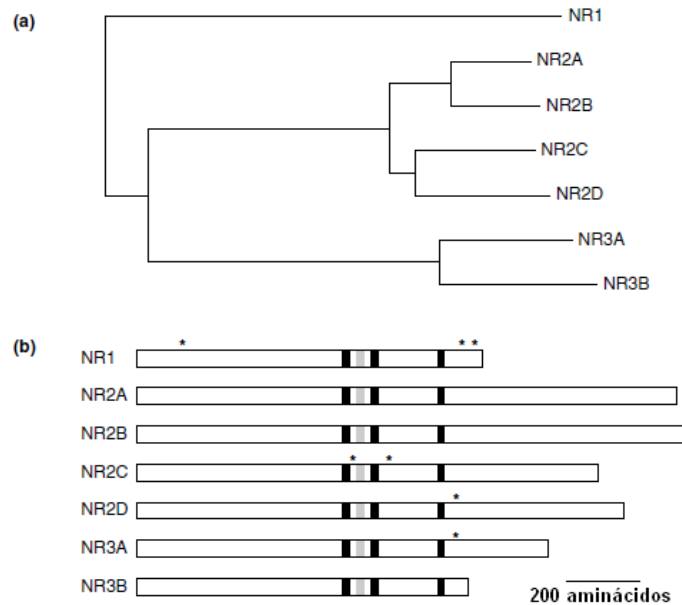


Figura 4. Diversidad de las subunidades del receptor NMDA. a) Dendrograma de las secuencias aminoacídicas completas de las subunidades del NMDAR en la rata. b) Representación de los polipéptidos de las subunidades del NMDAR. Tomado de Cull-Candy *et al.*, 2001

Se considera que los NMDAR están altamente regulados. Las subunidades de estos receptores ionotrópicos de glutamato son estructuras modulares que contienen varios dominios, los cuales además poseen sitios de acción en donde algunos ligandos endógenos como Zn^{+2} , Mg^{2+} y ciertos fármacos actúan alostéricamente influenciando la probabilidad de apertura del canal (Flores-Soto *et al.*, 2012). Estos sitios son; en la parte extracelular, el dominio de unión a agonistas (ABD) y el dominio N-terminal (NTD), el dominio del poro, que es transmembranal, y un dominio intracelular carboxilo-terminal (CTD) (Furukawa & Gouaux, 2003; Furukawa *et al.*, 2005).

Figura 5. Topología de las subunidades que forman al receptor de NMDA.

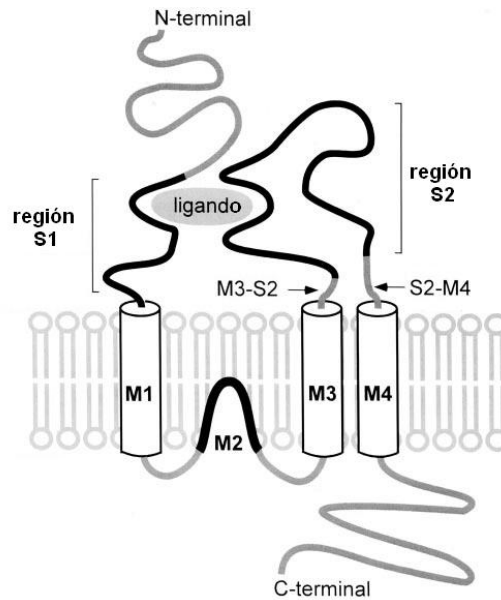


Figura 5. Estructura de las subunidades que forman al receptor NMDA Tomado de Cull-Candy *et al.* 2001.

Antagonistas competitivos y no competitivos

Un gran número de moléculas naturales y sintéticas han sido identificadas como moduladoras de los NMDARs, llamados así por unirse al receptor y causar aumento o disminución en la respuesta máxima o en la afinidad de su agonista. Algunos de estos moduladores como el Zn^{2+} , las poliaminas y los protones son moléculas endógenas que ejercen efectos reguladores sobre los NMDAR en condiciones fisiológicas y patológicas. (K. Williams, 2009; Ogden & Traynelis, 2011).

Figura 6. Receptor NMDA (NR1/NR2) y sus sitios de unión a moduladores.

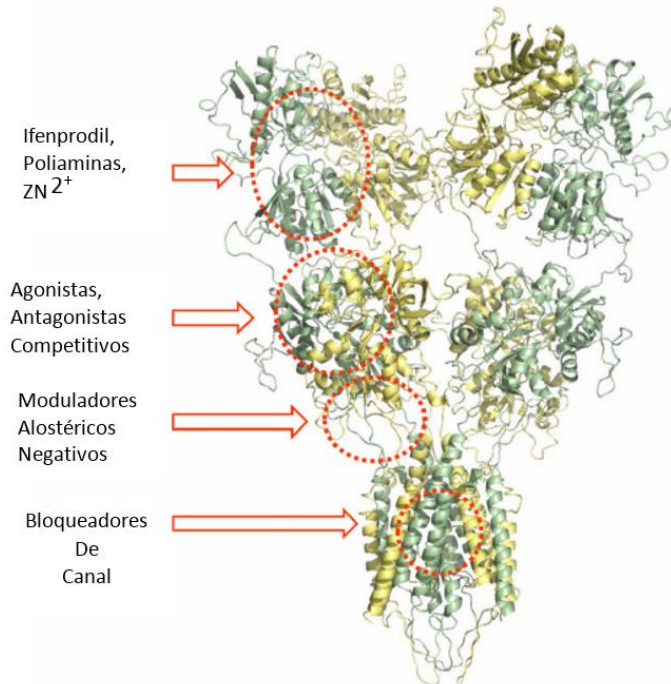


Figura 6. Se aprecian los sitios de unión de moduladores y antagonistas del receptor NMDA en cada uno de sus dominios. Tomada de: (Santangelo *et al.*, 2012).

Los primeros compuestos identificados fueron agonistas y antagonistas para el sitio de unión del glutamato (ácidos D- α -aminoadípico y D-2-amino-5-fosfonopentanóico). Poco después al corroborar la unión de glicina al receptor NMDA para su activación, se reconocieron antagonistas parciales y competitivos de la glicina como la ketamina y la fenilciclidina. También se han encontrado bloqueadores del canal iónico como el MK-801 (Monaghan, Irvine, Costa, Fang, & Jane, 2012). Los antagonistas más importantes se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Agentes selectivos para los NMDARs.

| Agente | Acción | Selectividad |
|----------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| Ifenprodil | Inhibición no competitiva de NR2B | $NR2B > 2A/2B > 2D = 2C = 2A$ |
| Haloperidol | Inhibición no competitiva de NR2B | $NR2B > 2A/2B > 2D = 2C = 2A$ |
| Ro 8.4304 | Inhibición no competitiva de NR2B | $NR2B > 2A$ |
| Felbamato | Inhibición no competitiva de NR2B | $NR2B > 2C = 2A$ |
| Conantocina-G | Inhibición competitiva de NR2B | $NR2B > 2A = 2C$ |
| _D -CPPene | Inhibición competitiva de NR2B y NR2A | $NR2A = 2B > 2C = 2D$ |
| PPDA | Inhibición competitiva de NR2C y NR2D | $NR2C = 2D > 2A = 2B$ |
| Protones | Inhibición de NR1 | $NR1 > NR2A > 2B > 2C$ |
| Zn ²⁺ | Inhibición no competitiva de NR2A | NR2B solo con NR1-1a |

Tomada de: (Stuart Cull-Candy *et al.*, 2001).

Los primeros antagonistas de los NMDARs fueron derivados de aminoácidos que actúan sobre el sitio ABD de las subunidades NR2. Son antagonistas competitivos. El más usado hasta el momento por su fuerte afinidad por los receptores NMDA más que por otros tipos de receptores ionotrópicos de glutamato es el (R)-2-amino-5-fosfonopentanoato, mejor conocido como AP5 (Wyllie, Livesey, & Hardingham, 2013a). Estos compuestos muestran una pobre selectividad entre los subtipos NR2. La falta de selectividad de estos compuestos probablemente se debe al alto grado de conservación del sitio donde se une el glutamato en las subunidades NR2 (los 10 residuos de aminoácidos en NR2A que interactúan directamente con el glutamato, son conservados entre todas las subunidades NR2) (Furukawa *et al.*, 2005).

Otros antagonistas como (R)-CPP y (R) AP7 poseen mayor selectividad hacia distintas subunidades según las propiedades de reconocimiento al sitio de unión en el receptor (Martínez *et al.*, 2002).

Existen también antagonistas competitivos por el sitio de unión a glicina, los cuales han mostrado tener poca selectividad, como habría de esperarse en compuestos con la subunidad NR1 como sitio blanco ya que está presente en todos los sub-tipos de receptores NMDA (Inanobe, Furukawa, & Gouaux, 2005) . El primero de ellos fue el ácido Kinurénico (T. L. Williams, Stone, Burton, & Smith, 1988), a partir del cual se han sintetizado nuevos compuestos (ej. 7-CDK, 5,7-DCKA y CGP 61594) mediante modificaciones estructurales (Fülöp *et al.*, 2009).

Se han usado también compuestos antagonistas de los receptores AMPA y Kainato, que se unen débilmente a los NMDAR, como CNQX y DNQX para el diseño de compuestos más potentes (Honoré *et al.*, 1988). Los antagonistas del sitio NR1 en el dominio de unión al agonista han mostrado tener una mejor capacidad terapéutica (anticonvulsivantes, neuroprotección, propiedades analgésicas) y exhiben menos efectos adversos en comparación con antagonistas de la subunidad NR2 (Dannhardt & Kohl, 1998).

Modulación alostérica del receptor NMDA.

Durante las últimas tres décadas se han encontrado compuestos que interactúan con el receptor NMDA en alguno de sus cuatro sitios de unión: el poro del canal iónico, el sitio de unión de glutamato, el sitio de unión de glicina y el dominio N-terminal (Figura 6; (Monaghan *et al.*, 2012)).

Bloqueadores del poro

Fisiológicamente, iones de Mg^{2+} se encuentran bloqueando el poro del canal cuando el potencial de membrana está en reposo, este bloqueo es dependiente de voltaje y se elimina cuando se despolariza la membrana. Este bloqueo se produce por un residuo de asparagina en el segmento M2 que produce una constricción en el poro del canal del receptor, permitiendo el flujo de calcio pero no de magnesio (Wollmuth & Sobolevsky, 2004), este sitio de unión del Mg^{2+} se encuentra en la profundidad del

canal y las subunidades más sensibles a este ión son la NR2A y NR2B en comparación de los subtipos NR2C y NR2D (Vyklícky *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015).

Un gran número de compuestos orgánicos inhiben al NMDAR obstruyendo el poro del canal. Estos compuestos, estructuralmente diversos, son bloqueadores que requieren una activación previa del receptor. Todos ellos conservan una carga positiva y actúan de una manera dependiente de voltaje. Normalmente estos bloqueadores del poro discriminan muy poco entre los subtipos de receptores NMDA. Ejemplo de estos, son algunos anestésicos clínicamente utilizados como la fenilciclidina (PCP), tionil-ciclohexil-piperidina (TCP), ketamina, y otros fármacos como memantina y amantadina (Lee *et al.*, 2014).

Se sabe que la dizolcipina (MK-801) es el fármaco más potente para bloquear las subunidades NR2A y NR2B que NR2C y NR2D, pero su diferencia de afinidad es relativamente pequeña (menor a 10 veces) (Sean, Bengtson, Bading, Wyllie, & Hardingham, 2013). No se han entendido completamente las determinantes estructurales que expliquen la selectividad de cada sustancia, pero se cree que se debe a interacciones hidrofóbicas entre los diferentes grupos funcionales del bloqueador y residuos hidrofóbicos ubicados en el vestíbulo del poro. Por lo tanto, moléculas con grandes diferencias en su selectividad como estas podrían ser muy útiles, por lo menos para diferenciar entre receptores que contengan los subtipos NR2A y NR2B de aquellos que contengan las subunidades NR2C y NR2D.

Los bloqueadores de alta afinidad como el PCP y MK-801 producen efectos indeseables como, ataxia y disturbios en el aprendizaje y memoria, por tal motivo se han restringido su uso en la clínica. La tendencia de estos compuestos para producir tales efectos adversos se relaciona a su cinética lenta para disociarse del sitio de unión, permaneciendo por más tiempo dentro del canal (Carey, Dai, & Gui, 1998; Wong *et al.*, 1986).

Modulación en el dominio N-terminal

Los únicos compuestos orgánicos que han mostrado tener una alta selectividad entre los subtipos de los NMDARs son el ifenprodil y sus derivados. Estas sustancias actúan como antagonistas no competitivos selectivos de la subunidad NR2B, que actúan independientemente del voltaje. Estos compuestos han mostrado tener un uso terapéutico prometedor en modelos de dolor neuropático y neuroprotección, por lo que se ha estado trabajado por identificar nuevos derivados con mayor selectividad y seguridad que el ifenprodil, principalmente ya que éste posee un efecto cardiotoxico. El ifenprodil se une al sitio NTD de la subunidad NR2 ejerciendo una modulación alostérica que además, se sabe aumenta la inhibición inducida por protones (Masuko *et al.*, 1999).

También el Zn^{2+} modula la función del receptor NMDA uniéndose al sitio NTD. Es un modulador alostérico endógeno, ya que es liberado de las terminales presinápticas junto con el glutamato, por tal motivo su efecto tiene relevancia fisiológica (S. F. Traynelis *et al.*, 2010). Este ión se une solamente a las subunidades NR2A y NR2B pero con una afinidad mayor a 100 veces por el subtipo NR2A (P Paoletti, Ascher, & Neyton, 1997).

La asociación del Zn^{2+} a su sitio de acción produce efectos similares a cambios de pH (aumento de protones), ya que los canales protonados tienen una menor probabilidad de apertura, sugiriendo que el efecto del Zn^{2+} es producido aumentando la inhibición por protones (Dravid *et al.*, 2007; Erreger & Traynelis, 2005).

Modulación por poliaminas

Las poliaminas son aminas alifáticas polibásicas que se encuentran cargadas positivamente a pH fisiológico. En el cerebro existe una gran variedad de poliaminas, entre ellas: espermina, espermidina y putrescina. La mayoría (putrescina, espermina) son sintetizados a partir de la ornitina durante el ciclo de la urea (Chen & Roche, 2007).

Estos compuestos son constituyentes naturales del SNC y existen en el medio intra y extracelular a concentraciones considerables para tener influencia en la neurotransmisión y en el desarrollo neuronal. Se han observado múltiples efectos por poliaminas en neuronas de hipocampo como potenciación e inhibición dependiendo el tipo celular por las diferencias en los niveles de expresión de las subunidades NR2 del receptor NMDA.(Rumbaugh, Prybylowski, Wang, & Vicini, 2000)

La liberación de poliaminas de las terminales presinápticas puede modular de diferente manera la actividad de los NMDARs. La espermina aumenta la afinidad entre la glicina y su sitio de unión (potenciación dependiente de glicina), mientras que en condiciones saturadas de glicina aumentan la amplitud máxima de la respuesta de los NMDARs (potenciación independiente de glicina), resultado de la unión de las poliaminas entre lóbulos del dominio amino terminal favoreciendo el estado abierto. Este efecto estabiliza la interfase del dímero ABD disminuyendo la sensibilidad a protones. A potenciales negativos, la espermina también puede producir un bloqueo voltaje-dependiente sobre el NMDAR. El bloqueo de espermina es similar al producido por iones Mg^{2+} pero se puede revertir mediante permeabilidad a potenciales hiperpolarizantes (Lerma, 1992; Turecek *et al.*, 2004).

Los efectos de las poliaminas dependen de la composición del NMDAR. Los receptores que presentan las isoformas NR1 con el exón 5 carecen de interacción con poliaminas debido a que la secuencia de aminoácidos que codifica este exón forma un asa superficial con estructura similar a las poliaminas (Rumbaugh *et al.*, 2000).

Adicionalmente, se sabe que hay una interacción alostérica entre la espermina con el ifenprodil, la unión de uno promueve la disociación del otro. La espermina que se encuentra en el medio intracelular también modula la actividad de los NMDARs, inhibiendo reversiblemente la actividad del canal por un mecanismo diferente a la inactivación inducida por Ca^{2+} y a diferencia del efecto inhibitorio de las poliaminas extracelulares, la inhibición intracelular por espermina no depende de la composición del NMDAR (Han *et al.*, 2008).

Modulación por protones (H⁺).

Los cambios en el pH fisiológico pueden modular la actividad de una gran variedad de canales iónicos incluyendo canales de Ca²⁺, Na⁺ y K⁺ sensibles a voltaje, canales de K⁺ rectificadores entrantes, uniones comunicantes, canales de K⁺ activados por Ca²⁺, receptores tipo nicotínicos, GABA y NMDA, entre otros. Se han propuesto varios mecanismos de protonación por el cual el pH produce su efecto: como cambios en la carga de la superficie de la membrana, protonación de carbohidratos y de aminoácidos involucrados en: la unión del agonista, conducción y mecanismos de compuerta mediante reacomodos estructurales (Dravid *et al.*, 2007).

A pH fisiológico, el NMDAR se encuentra inhibido un 50%, el aumento extracelular del pH incrementa la respuesta del NMDAR mientras que en el caso contrario, disminuye la probabilidad de apertura. La sensibilidad a protones es influenciada por la presencia de las subunidades NR1 y NR2, incluso algunos moduladores del NMDAR como el Zn²⁺, ifenprodil y poliaminas actúan, en cierto grado, afectando la modulación por protones (H⁺) (Kanemitsu *et al.*, 2003; S. Traynelis, Hartley, & Heinemann, 1995).

El dominio amino terminal de la subunidad NR1 fue el primer sitio de acción del pH considerado, también el dominio NTD de las subunidades NR2A y NR2B influye en la sensibilidad a H⁺. Los aminoácidos del dominio NTD NR1 que más afectan la sensibilidad al pH están acoplados en una estructura primaria, separados entre ellos por decenas de aminoácidos y son parte de la sección que une los dos lóbulos de este dominio encargados de la apertura y cierre del canal (Low *et al.*, 2003).

Además del dominio NTD existen dos series de aminoácidos que contribuyen más en la sensibilidad al pH del receptor NMDA, son las dos secciones que unen el dominio S2 con los segmentos transmembranales M3 y M4.

Otros sitios moduladores del NMDAR

Hipotéticamente, existen más sitios donde pueden actuar ligandos extracelulares para modular la actividad del receptor NMDA: adyacente al sitio NR1 NTD y la interfase del dímero ABD se provee otro sitio para nuevos moduladores alostéricos.

Figura 7. Estructura y sitios de modulación alostérica del receptor NMDA

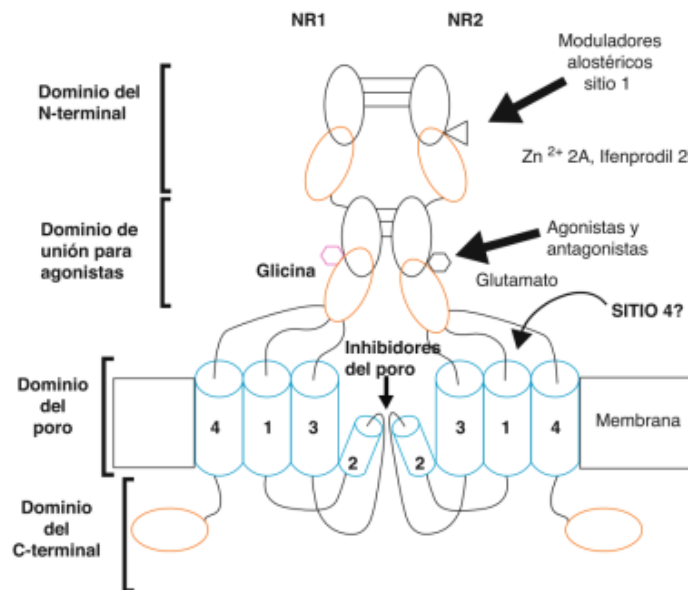


Figura 7. Estructura y sitios de modulación alostérica del NMDAR Tomado de: Flores-Soto *et al.*, 2012.

En los AMPARs, este último sitio une a moduladores alostéricos positivos que actúan por diferentes mecanismos como la ciclotiazida, que reduce la desensibilización de los AMPAR y el aniracetam que enlentece la desactivación del canal estabilizando la interfase ABD favoreciendo la conformación del estado abierto.

De tal manera, dada la alta conservación en la arquitectura del dímero ABD entre los NMDARs y AMPARs, es tentado a especular que también es un blanco para estos fármacos moduladores, pero debido a que los NMDAR presentan poca desensibilización para identificar moduladores de la interfase del dímero ABD, es

requerido un protocolo de escaneo buscando posibles cambios en la cinética de desactivación.

Otro sitio con posible interacción es la región que une los dominios ABD en el segmento transmembranal. En receptores AMPA, esta zona forma el sitio de interacción de antagonistas no competitivos de la familia GYKI. Aún no se ha explorado si esta región homóloga en NMDAR pueda unir también antagonistas u otros moduladores (Paoletti and Neyton, 2007).

Antecedentes específicos

La Acetilcolina (ACh) y el receptor a N-metil-D aspartato (NMDAR) interactúan en la regulación de múltiples e importantes funciones cerebrales. La activación del receptor NMDA se sabe, es indirectamente modulada por ACh a través de la activación de receptores muscarínicos o nicotínicos (Fisher & Dani, 2000). Actualmente, poca información sobre la interacción entre ACh y el NMDAR está disponible.

D-Tubocurarina

La D-Tubocurarina es un alcaloide, mejor conocido por ser el antagonista competitivo clásico de los receptores nicotínicos a Acetilcolina (ACh) y forma parte del compuesto conocido como curare, siendo la sustancia activa de éste. Históricamente, la D-Tubocurarina ha sido usada principalmente como un bloqueador neuromuscular en el campo de la clínica y se conoce ampliamente su función paralizante del sistema muscular (Colquhoun, Dreyer, & Sheridan, 1979; Wenningmann & Dilger, 2001).

Cuando el fármaco se aplica directamente a la placa terminal de una sola fibra muscular aislada, ésta se vuelve insensible a los estímulos del nervio motor o a la ACh aplicada directamente. Sin embargo, la fibra muscular responde a los estímulos eléctricos normales y al K^+ , lo que indica que la D-Tubocurarina impide la unión de la

ACh a su sitio de unión en el receptor. La D-Tubocurarina se fija al receptor colinérgico nicotínico de la membrana celular pre y postsináptica, bloqueando de esta forma la acción transmisora de la ACh de modo competitivo (Colquhoun *et al.*, 1979).

En el sistema nervioso, existe poca información sobre los efectos que tiene esta droga sobre su blanco farmacológico y otros receptores presentes en las células neuronales. La acción de esta sustancia se ha estudiado sobre el sistema nervioso central en preparaciones de gato anestesiado y descerebrado, demostrando que puede tener un efecto excitatorio sobre los centros respiratorios, el centro vasomotor, el centro cardíaco y otros centros autonómicos, como aquellos que inervan las células salivales; además, tiene un efecto que produce el aumento de la excitabilidad en la producción de reflejos espinales. (Salama & Wright, 1950).

Estudios más recientes hechos en rebanadas de corteza auditiva de rata, demuestran que la aplicación de D-Tubocurarina y de otras drogas que actúan sobre receptores nicotínicos y muscarínicos tienen un efecto modulador sobre la activación de los NMDARs; en el caso de la D-Tubocurarina, se ha observado que tiene un efecto inhibitorio sobre la corriente mediada por este receptor en un rango del 20% al 90% de su amplitud control. (Flores-Hernandez *et al.*, 2009)

Un análisis hecho más tarde por el mismo grupo, sugiere que la D-Tubocurarina interfiere al menos con la actividad glicina-dependiente del NMDAR. Esto nos indicaría que las corrientes mediadas por NMDARs pueden ser inhibidas directamente por drogas colinérgicas, posiblemente mediante la interacción directa con una o más de las subunidades que conforman al NMDAR.

JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio de Neuromodulación estudiamos a las corrientes activadas por Glutamato, específicamente las de tipo NMDA. El papel modulador de acetilcolina normalmente es referido por su acción a través de los receptores de tipo muscarínico. Cuando estudiamos el papel modulador colinérgico sobre la corriente activada por NMDA encontramos los siguientes resultados: el efecto reductivo de acetilcolina era mimetizado por Oxotremorina M (agonista muscarínico), pero no era antagonizado por atropina, lo cual descartaba los efectos muscarínicos. Esto abrió nuevas vías en la farmacología de efectos de los agentes colinérgicos, en específico, el estudio de agentes nicotínicos como la nicotina y la D-Tubocurarina los cuales nunca se habían relacionado con corrientes glutamatérgicas. En este proyecto decidimos enfocarnos al estudio del efecto de la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de los resultados obtenidos por Flores-Hernández en 2009 al perfundir neuronas de corteza auditiva de rata con D-Tubocurarina y otros agentes colinérgicos en los que se observa una reducción de la corriente activada por NMDA, es importante conocer la forma en que la D-Tubocurarina modula estas corrientes, en este caso, mediante el registro electrofisiológico usando la técnica de fijación de voltaje en neuronas espinosas medianas del núcleo estriado de la rata. Se plantea dilucidar el tipo de efecto farmacológico producido por la D-Tubocurarina y encontrar la concentración efectiva 50 (CE50), que hasta el momento se desconocen, en lo posible, nos proponemos plantear un mecanismo de acción.

HIPÓTESIS

La D-Tubocurarina reduce las corrientes activadas por el receptor a NMDA en las neuronas medianas del núcleo estriado de la rata entonces y podría actuar como un antagonista competitivo de los ligandos (Glutamato o Glicina) que producen esta corriente.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto de la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA en neuronas espinosas medianas agudamente disociadas del núcleo estriado de rata, determinando el mecanismo farmacológico producido sobre el NMDAR.

Objetivos Particulares

- Realizar curva dosis-efecto de D-Tubocurarina sobre la corriente activada por NMDA desde una concentración de 1 pM hasta 1 mM.
- Determinar si el efecto de la D-Tubocurarina es voltaje dependiente.
- Determinar la interacción de la glicina a diferentes concentraciones con la acción de la D-Tubocurarina en las corrientes activadas por NMDA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Definición de la unidad de población

Para los procedimientos se utilizaron neuronas agudamente disociadas del núcleo estriado procedentes de ratas macho de la cepa Wistar de 30 días de edad (100–120g) procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Selección de la muestra

Los registros se realizaron en neuronas clasificadas como espinosas medianas (NMs) del núcleo estriado de la rata (usualmente menores a los 75 μm de largo) con dendritas y axón cortos, que presenten corrientes de Na^+ y Ca^{2+} , con una capacitancia de 8 ± 4 pF, una resistencia de membrana de al menos $1\text{G}\Omega$ y una resistencia de acceso menor a $25\text{M}\Omega$.

Tamaño de la muestra

Por cada condición experimental se obtuvo el registro de un mínimo de seis neuronas estriatales. Se ocuparon como total la cantidad de 32 ratas para cumplir los objetivos del proyecto.

Material

- Material quirúrgico para disección
- Halotano
- Vibratomo Campden, modelo VSL
- Sistema de gaseado: oxígeno y carbógeno
- Pipetas Pasteur de punta corta de diferentes calibres pulidas a fuego
- Tubos de ensayo
- Cajas Petri estériles de poliestireno 35mm de diámetro (Nunclon Surface NUNC)
- Cámara de incubación seca para control de temperatura VWR – Scientific
- Microscopio invertido, marca Nikon TMS.

- Válvulas solenoides (The Lee Company, Essex CO LFAA 1201718H)
- Programa pClamp versión 8.0
- Amplificador Axopatch 1-D (Axon Instruments Foster City, CA)
- Tarjeta Digidata 1322A (Molecular Devices)
- Controlador de válvulas solenoides diseñado y armado en nuestro laboratorio.
- Micromanipulador marca Sutter Instrument Company
- PC compatible

Soluciones

Se utilizaron las siguientes soluciones para registro y mantenimiento de las células obtenidas del núcleo estriado de la rata:

- Solución de Isetionato de sodio
- Solución salina balanceada de Earle (EBSS)
- Solución balanceada de Hanks (HBSS)
- Solución externa
- Solución interna
- Solución de baño.

Metodología

Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los experimentos se realizaron en ratas macho de la cepa Wistar de 30 días de edad (100–120g) procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El registro se realizó en células agudamente disociadas provenientes del núcleo estriado de rata. El protocolo de disociación empleado ya ha sido previamente descrito (Bargas, Howe, Eberwine, Cao, & Surmeier, 1994; Flores-Hernández *et al.*,

2002; Surmeier, Bargas, Hemmings, Nairn, & Greengard, 1995); el cual se describe a continuación con algunas modificaciones:

Las ratas fueron anestesiadas con halotano y decapitadas, los cerebros se disecaron rápidamente y se colocaron en solución fría de isetionato, suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N^G – nitro – L – arginina, 1 ácido kinurénico, y gaseada con O₂. Posteriormente se obtuvieron rebanadas coronales de 350µm con ayuda de un vibratomo (Campden) mientras estuvieron sumergidas en la misma solución. Se diseccionó la región dorsal del núcleo estriado.

Posteriormente las rebanadas se mantuvieron entre 1 a 6 horas a temperatura ambiente (20-22° C) en una solución salina balanceada de Earle (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N^G –nitro – L – arginina, 1 ácido kinurénico; burbujeada con 95% O₂/ 5% CO₂, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300 – 310mOsm/L.

Después de al menos 1 hora de incubación se tomó una rebanada del núcleo estriado para su tratamiento enzimático; el cual se realizó en una cámara de cultivo de 40mL con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES burbujeada con O₂, conteniendo 0.75 mg/ml de papaína (Calbiochem) a 35° C, durante 20 min. Suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N^G – nitro – L – arginina, 1 ácido kinurénico.

Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido se lavó con la solución de isetionato y posteriormente fue dissociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al fuego). La suspensión de células se sembró en cajas Petri de 35 mm (Nunc Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. Después de 10 minutos de incubación la suspensión se lavó con una solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂ y 1% rojo fenol, burbujeada con O₂, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300 – 310mOsm/L; para

su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje. El potencial de membrana empleado fue de -80mV .

Técnica de célula completa en protocolos de fijación de voltaje

Se empleó la técnica de célula completa con fijación de voltaje (Bargas *et al.*, 1994). Los electrodos de registro fueron estirados de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (AM Systems Inc., Carlsborg, WA).

La solución interna para registro de corrientes de Ca^{2+} y activadas por NMDA está compuesta de (en mM): 175 N-metil-D-glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2 MgCl_2 , 10 ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter)-N, N, N', N'- tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na_2ATP , 0.35 Na_3GTP , 0.1 leupeptina, $\text{pH} = 7.25$ con H_2SO_4 , 265 – 270mOsm/L.

La solución externa compuesta de (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl_2 , 2 CaCl_2 , 12 glucosa, 10 HEPES, $\text{pH} = 7.4$ con NaOH, 300 – 305mOsm/L., y Glicina $20\mu\text{M}$ para la generación de las corrientes de NMDA.

Los registros se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje “voltage clamp” Axopatch 1-D (Axon Instruments Foster City, CA, controlado con el programa pClamp Versión 8 (Axon Instruments) ejecutándose en una computadora con procesador Pentium con una interfase tipo Digidata 1322A (Axon Instruments). La resistencia de los electrodos fue típicamente de 7 – 10 $\text{M}\Omega$ en el baño. Después de la ruptura del sello, la resistencia serial debió ser menor a $25\text{M}\Omega$. Los registros se realizaron en neuronas con dendritas cortas (usualmente menores a los $75\mu\text{m}$). El potencial de membrana se mantuvo en -80mV mientras no hubo protocolo activo.

Método de recolección de datos

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje (voltage clamp) Axopatch 1-D (Axon Instruments Foster City, CA), controlado con el programa pClamp Versión 8 (Molecular Devices) ejecutándose en una computadora con procesador Pentium con una interfase tipo Digidata 1322A (Molecular Devices).

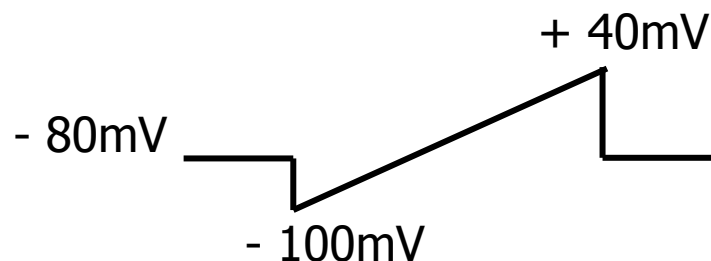
Aplicación de fármacos

Para la inducción de corrientes activadas por ligando NMDA, este fue aplicado a través de un sistema de dos capilares con un ángulo de 45° entre ellos y una distancia de 200 a $600\mu\text{m}$ de la célula a registrar. Un capilar contuvo la solución externa (control) y el otro, ésta misma más el ligando a utilizar. El intercambio de solución se realizó por la apertura de válvulas solenoides (The Lee Company, Essex CO LFAA 1201718H) comandadas por la salida digital del sistema Digidata 1322A de Axon Instruments y un aparato de control fabricado en el laboratorio. La célula fue bañada por la solución del primer capilar con la solución externa o control, después del cambio, la célula se bañó con la solución del segundo capilar conteniendo el ligando a probar durante 3s, para posteriormente regresar a la solución control. El tiempo en que el electrodo detecta el cambio de las condiciones iónicas entre una solución y otra es de 6ms.

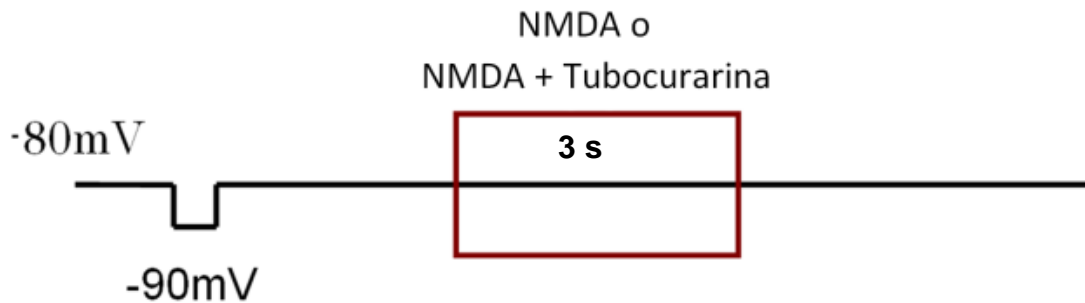
Protocolos electrofisiológicos.

Los protocolos empleados para el registro electrofisiológico fueron los siguientes:

Rampa: Rampa de voltaje (-100mV a $+40\text{mV}$) con una duración de 100ms para generar las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} y con el objetivo de conocer el estado funcional de la célula.

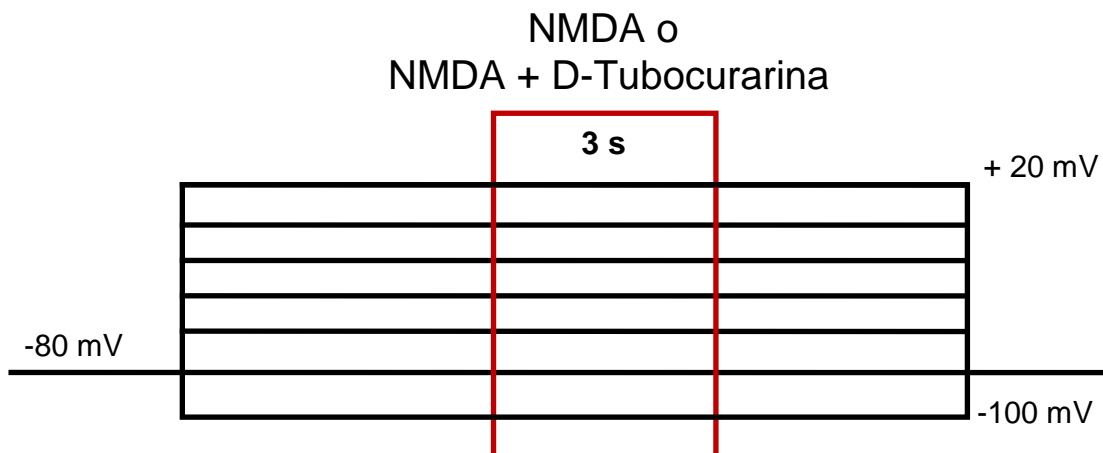


Aplicación de NMDA o NMDA+ D-Tubocurarina: El potencial de mantenimiento fue de -80mV durante 15 segundos; de los cuales 3 segundos son para la aplicación del neurotransmisor (NMDA) a una frecuencia de 500 Hertz.



Con el protocolo de aplicación de NMDA y NMDA+ D-Tubocurarina se efectuaron las curvas dosis-efecto de D-Tubocurarina sobre la corriente activada por NMDA.

I-V con Aplicación de NMDA y NMDA + D-Tubocurarina: Se hizo el registro a diferentes potenciales de mantenimiento (Desde -100 mV hasta $+20\text{ mV}$ en pasos de 20 mV).



Análisis estadístico

Los valores en tablas, gráficas o texto mostrados representan el valor de la media de los resultados obtenidos \pm su error estándar de la media (EEM). En el caso de la curva dosis-efecto, se muestra cada una de las concentraciones utilizadas de D-Tubocurarina, ajustando con una ecuación doble logística para identificar la concentración efectiva 50 (CE50) del fármaco. Los datos de los resultados de los experimentos fueron analizados primero con una prueba de Shapiro ($p < 0.05$) para determinar el comportamiento de una distribución normal; para los datos de la curva dosis-efecto se utilizará una prueba de ANOVA de medidas repetidas con una postprueba de bonferroni ($p < 0.05$), mientras que en los datos de bloqueo de corriente se utilizó una prueba t-Student de dos colas para muestras pareadas ($p < 0.05$). En datos que no muestren una distribución normal, se emplearon otro tipo de pruebas que se ajusten correspondientemente a los datos recolectados. Los programas utilizados para el análisis y graficación de los datos son Origin versión 9 (Microcal Software Inc., Norton Hampton, MA) y GraphPad Prism versión 5.

BIOÉTICA

Este trabajo de investigación fue desarrollado con la previa revisión, conocimiento y seguimiento de los lineamientos de documentos nacionales e internacionales de normas de seguridad así como de las medidas a seguir para tratar con animales de investigación, uso debido y desecho de los materiales biológicos.

En la presente investigación se tomaron en cuenta los títulos V, XII y XIII de la Ley General de la Salud, con el objetivo de respaldar la investigación y establecer que los animales usados en la experimentación no sufrirán innecesariamente y que durante el tiempo de su manutención se le asegurará el bienestar máximo.

El Título V de la Ley General de Salud, el cual se refiere a la Investigación para la Salud, en el artículo 96, en el apartado III, establece que la investigación para la salud comprende el desarrollo de acciones que contribuyan a la prevención y control

de los problemas de salud que se consideren prioritarios para la salud. Este proyecto pretende obtener conocimiento que puede ayudar a la prevención o tratamiento de problemas sanitarios (Título V, Investigación para la Salud, Ley General de Salud, 2015).

En el Título XII, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su importación y Exportación, cabe resaltar que la sustancia usado para esta investigación, la D-Tubocurarina, es usada únicamente con fines de investigación básica, no se administra a ningún sujeto de investigación directamente (Título XII, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su Importación y Exportación, Ley General de Salud, 2015).

En la presente investigación no se busca obtener algún beneficio, ni se pretende promover el uso de la D-Tubocurarina sin la sustentación, ni los fundamentos adecuados, como establece el Título XIII de la Ley General de Salud, la publicidad referente a la salud (Título XIII, Publicidad, Ley General de la Salud, 2015).

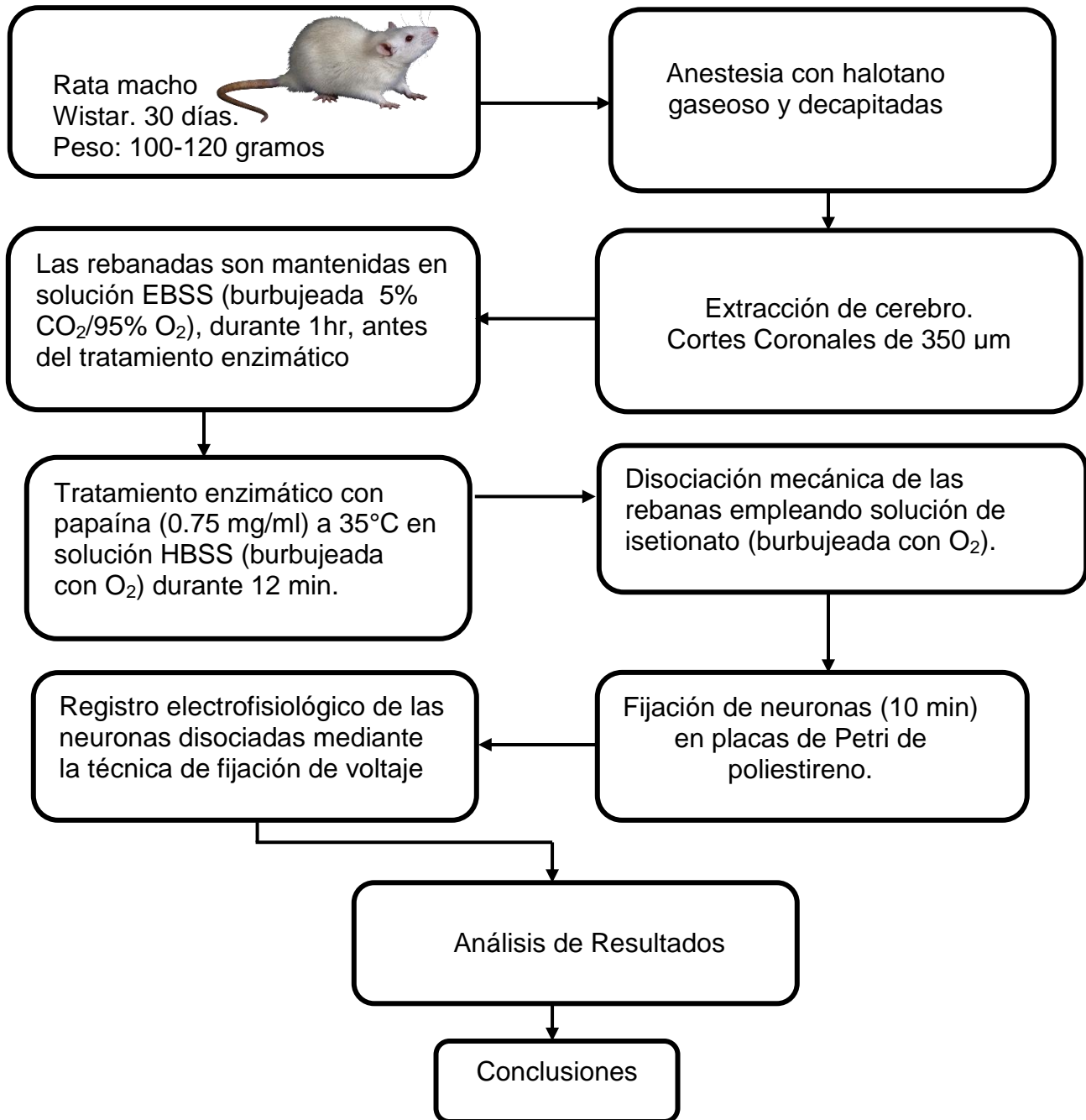
También se toma en cuenta la Declaración de Helsinki II, el cual establece los principios y derechos universales en estudios de investigación en especies, en este caso la rata Wistar, utilizados en laboratorios. Se hace constatar que se respetará cada a uno de los lineamientos establecidos en la Declaración, vigilando que al animal sufra lo menos posible y se garantice su seguridad en el tiempo en que sea utilizado. La Declaración de Helsinki, marca que el uso de animales es esencial para el progreso médico, sin embargo, exige que la investigación respete el bienestar de los animales usados en investigación, se debe tratar a los animales de una forma compasiva y que el uso de animales es necesario para lograr un resultado importante cuando no se disponga de ningún otro método posible (Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en Investigación Biomédica, 2013). Además, como se marca en "Principios para toda investigación médica" en el punto 15 de la Declaración de Helsinki II de la Asociación Médica Mundial, el protocolo de investigación será enviado para su revisión a un comité de ética de investigación.

El laboratorio donde se desarrolló el proyecto cuenta con las normas de bioseguridad de un laboratorio básico, según el artículo 76 del reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación para la salud y las normas establecidas en el manual de procedimientos de bioseguridad de la UNAM, capítulo 3, sección 3.1.1, sección 3.1.2 y 3.1.4. El “Manual de procedimientos en bioseguridad”, fue elaborado por la Comisión de Bioseguridad atendiendo lineamientos y recomendaciones existentes en la materia para el manejo de agentes biológicos descritos en la normatividad y reglamentación nacional; como ejemplo, en la “Ley general de salud en materia de investigación para la salud”, publicado en el Diario Oficial de la Federación, México D. F., 3 de febrero de 1983. Todas las ratas usadas para el desarrollo del presente estudio serán proporcionadas por el Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 30 días de edad (100–120g) previamente alojadas en jaulas de policarbonato y mantenidas en condiciones de temperatura constante con un ciclo de luz-oscuridad (12/12 horas) con libre acceso a agua y alimento. El manejo, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizó en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

El sacrificio de los animales fue realizado únicamente por personal de laboratorio que previamente ha recibido la capacitación y la certificación necesaria para el uso y manejo del modelo murino por parte de los expertos del Bioterio Claude Bernard de nuestra Universidad. Los animales han sido anestesiados con halotano (apartado 9.4.1.2 de la NOM-062-ZOO-1999) en un espacio bien ventilado y en ausencia de flamas u otras fuentes de ignición (apartado 9.4.1.2.1 de la NOM-062-ZOO-1999).

En cuanto a las medidas de bioseguridad y contención, el transporte y manipulación de material biológico, la desinfección y limpieza de laboratorio se realizaron de acuerdo a las recomendaciones realizadas en el capítulo 8, secciones 8.1., 8.2. y 8.3 del “Manual de procedimientos de bioseguridad de la UNAM”.

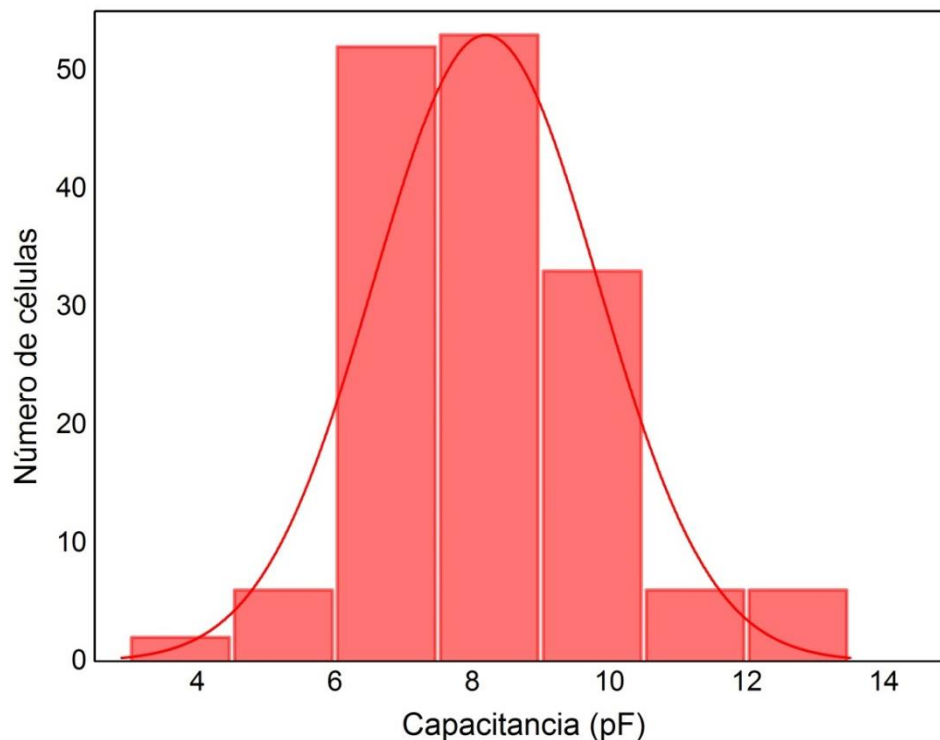
Diagrama de trabajo



RESULTADOS

Durante el presente trabajo de tesis se registraron un total de 158 células provenientes del núcleo estriado de la rata, tomando en cuenta sólo aquellas que presentaron una resistencia de membrana mayor a $1\text{ G}\Omega$ y una resistencia de acceso menor a $25\text{ M}\Omega$.

El tamaño de las células registradas se determinó por su capacitancia; la cual se considera una medida electrofisiológica que equivale a $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$, dichas células oscilaron en tamaño entre 4 y 13 pF. (Gráfica 1).



Gráfica 1. Histograma de frecuencia de la capacitancia de las células registradas. Se muestra la distribución de las capacitancias de las células registradas. $n=158$

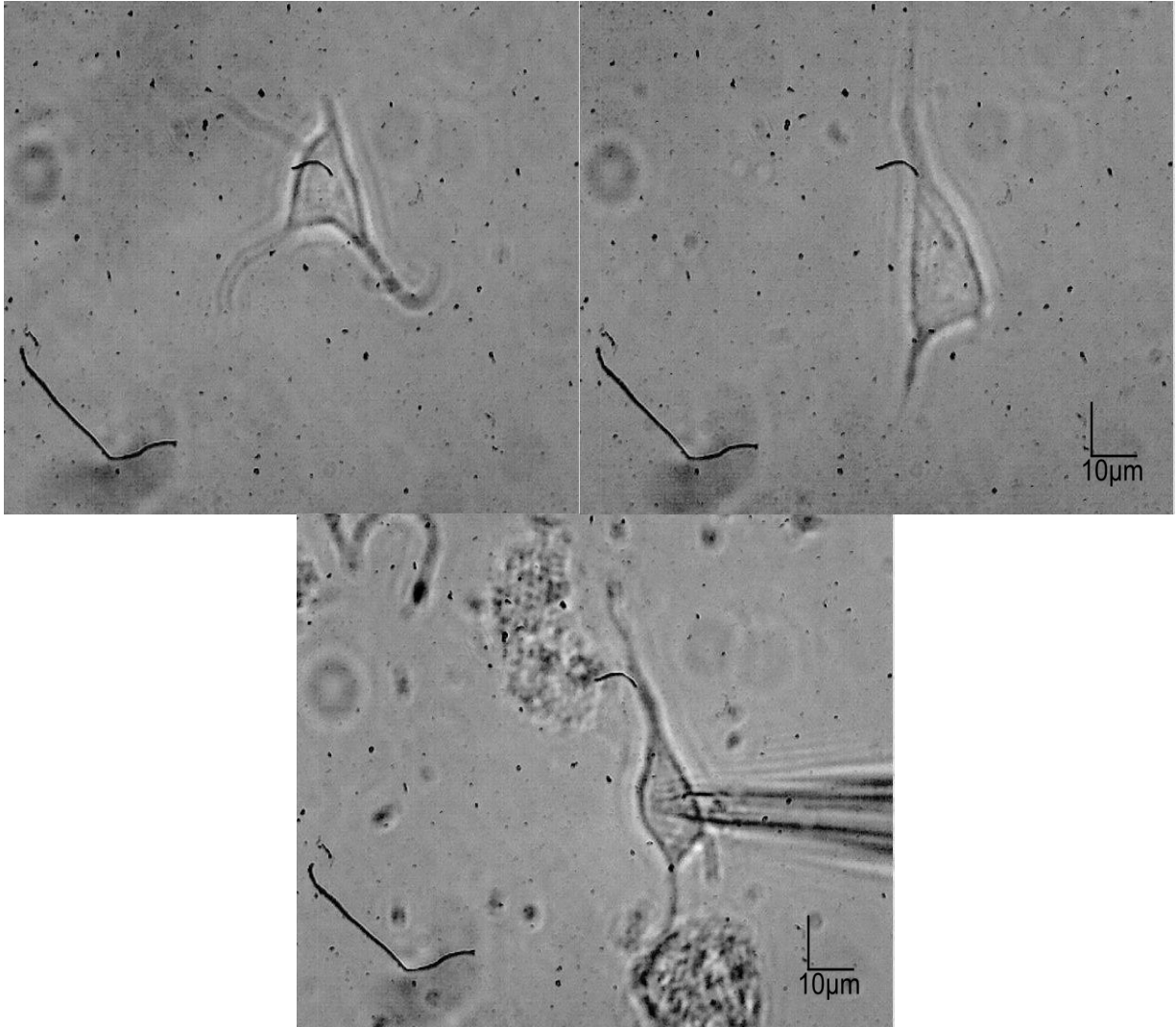
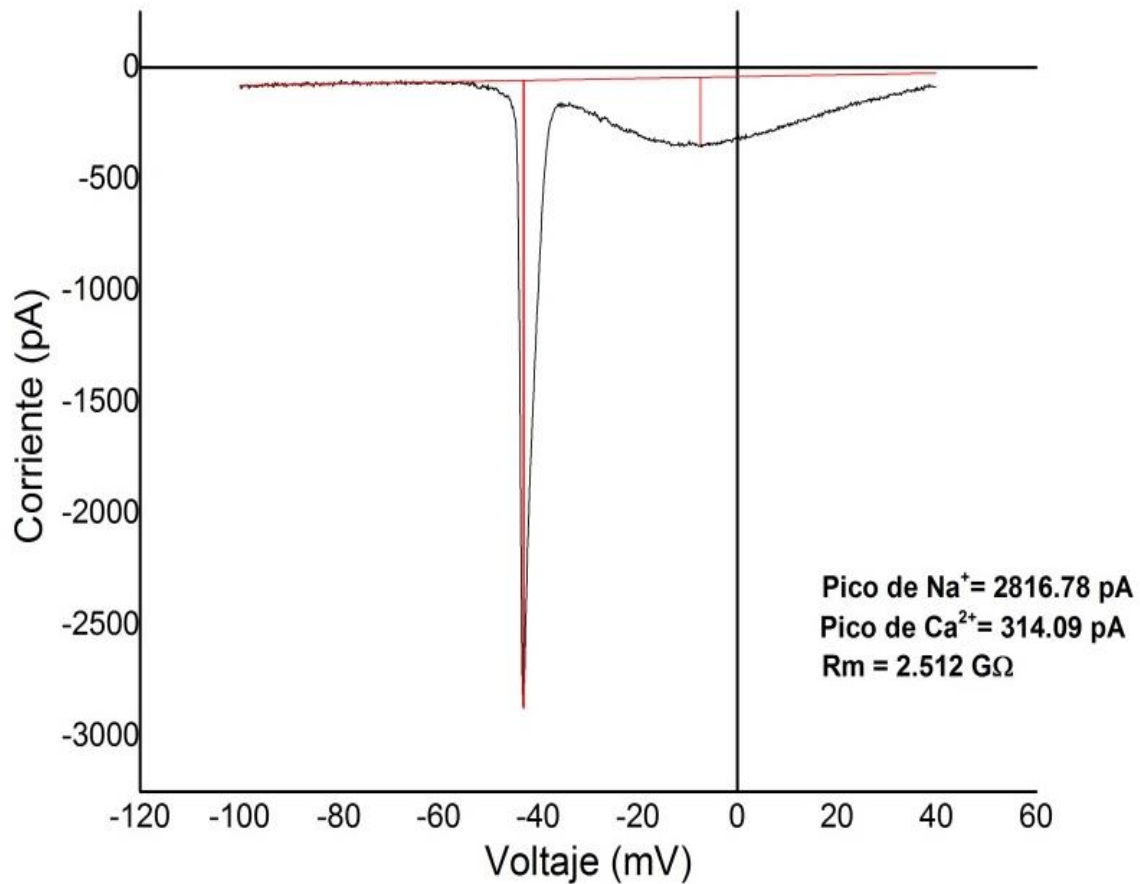


Figura 8. Microfotografías de células medianas agudamente disociadas del núcleo estriado de la rata. En la imagen de la parte inferior se muestra la microfotografía de una neurona disociada durante el registro electrofisiológico de corrientes de NMDA. El aumento es de 40x en todas las imágenes.

Protocolo de rampa

Al inicio de cada registro se realizó un protocolo de rampa de voltaje, en el cual se hace un cambio en los valores de voltaje de la célula que va de -100 mV hasta +40 mV con una duración de 100 ms, esto con el propósito de conocer las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} activadas por voltaje, indicándonos la viabilidad de la célula (Gráfica 2).

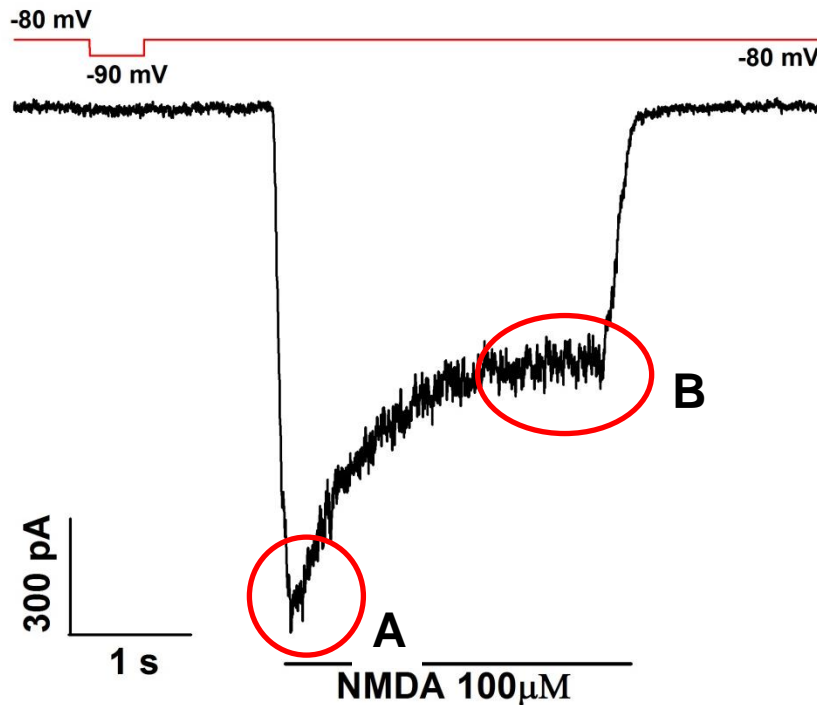


Gráfica 2. Trazo representativo del protocolo de rampa. Registro de un protocolo de rampa de voltaje. Se muestra el cambio de voltaje y la activación de corrientes iónicas de Na^+ y Ca^{2+} . Se observa la corriente de sodio aprox. a -45 mV y la corriente de calcio aprox. a -10 mV. La línea roja horizontal indica la corriente basal, mientras que las líneas verticales indican el pico máximo de las corrientes.

Registro de las corrientes activadas por NMDA

Para generar las corrientes activadas por NMDA (I_{NMDA}), se utilizó el protocolo de aplicación de NMDA anteriormente descrito. En este trabajo de tesis, la concentración usada para todos los experimentos fue de 100 μM (Flores-Hernández *et al.*, 2002).

Una vez generada la corriente activada por NMDA, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros para la caracterización y análisis de la corriente: tamaño de la corriente al pico por densidad de corriente (pA/pF) y estado estacionario de la corriente. (Gráfica 3).



Gráfica 3. Trazo representativo del protocolo de aplicación de NMDA 100µM. Se señala en A el pico máximo de la corriente y en B el estado estacionario de la misma. En la línea horizontal en rojo se muestra el cambio de voltaje durante el protocolo de aplicación.

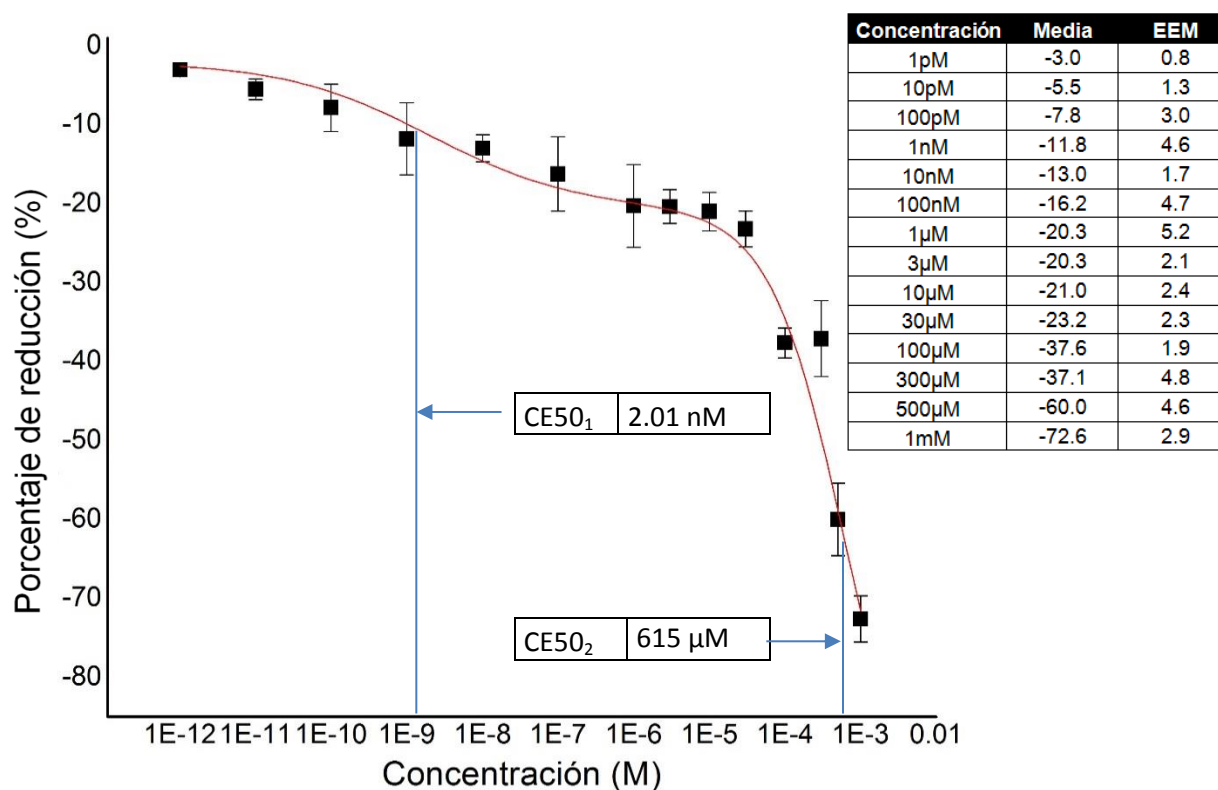
Modulación de la corriente de NMDA por D-Tubocurarina.

Curva dosis-efecto NMDA vs D-Tubocurarina

Una vez obtenidas las corrientes activadas por NMDA, el primer objetivo a cumplir fue conocer el efecto que tiene la D-Tubocurarina sobre las mismas. Estudios realizados anteriormente en rebanadas de corteza auditiva, demuestran que la D-Tubocurarina inhibe las corrientes glutamatérgicas activadas por NMDA.

El primer paso para cumplir este objetivo fue realizar una curva dosis-efecto con la aplicación de este fármaco. Las concentraciones de D-Tubocurarina usadas fueron de 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM, 30 μM, 100 μM, 300 μM, 500 μM y 1 mM.

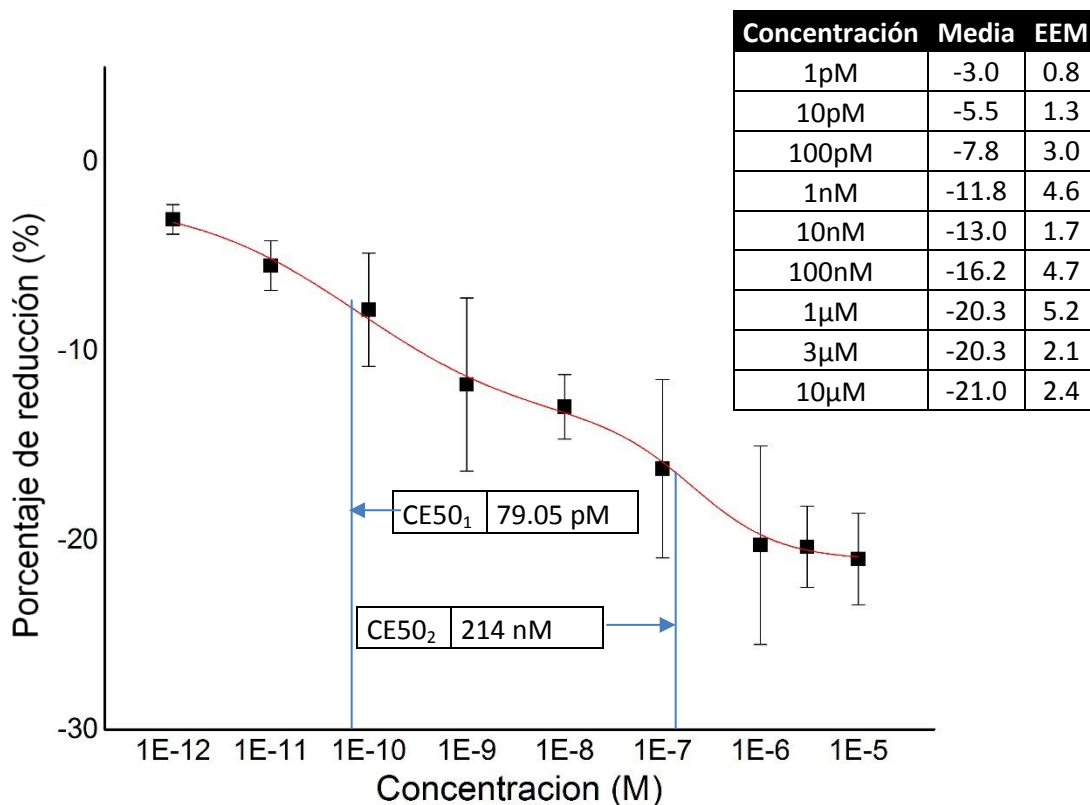
Para calcular la concentración efectiva de la D-Tubocurarina, se tomó en cuenta solo la inhibición producida sobre el pico de las corrientes. Se puede observar, que el efecto modulador de la D-Tubocurarina reduce el pico de las corrientes activadas por NMDA (Gráfica 4).



Gráfica 4. Curva Dosis-efecto de Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA con respecto al porcentaje de reducción de la corriente. Se graficó el porcentaje de reducción contra la concentración utilizada de D-Tubocurarina. La tabla de la derecha indica los valores de cada punto, los cuales representan el efecto medio $\bar{X} \pm \text{EEM}$; obteniéndose una CE50 de 2.01 nM para el primer ajuste y una CE50 de 615 μM para el segundo ajuste. n=117

Con los datos obtenidos se hizo un ajuste de tipo doble logístico, utilizando el programa Origin 9.0. Se obtuvieron mediante este ajuste dos CE50, una de 2 nM para el primer ajuste y una de 615 μ M para el segundo ajuste. Se observa que el efecto de la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA es dosis dependiente.

Haciendo énfasis en los resultados obtenidos en la curva dosis-efecto, se hizo un ajuste complementario para las concentraciones que van desde 1 pM hasta 10 μ M ya que es posible que existan sitios de sensibilidad además de los encontrados en el ajuste hecho al total de las concentraciones utilizadas. En este ajuste que se realizó, se encontró que para este rango de concentraciones existen dos CE50, una de 79.05 pM y una segunda de 2.14 nM (Gráfica 5).

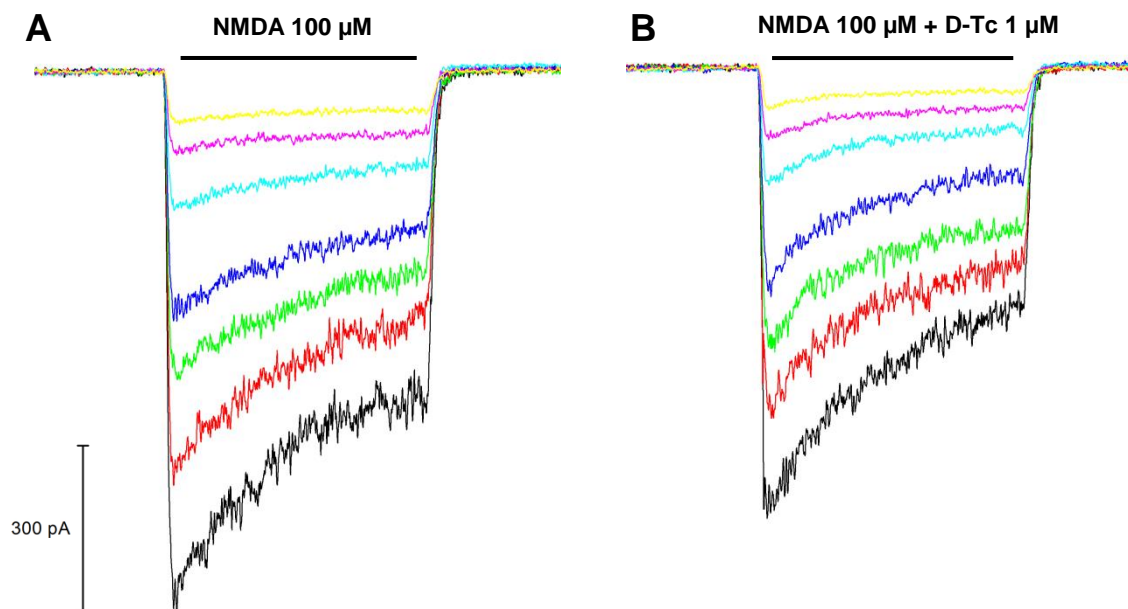


Gráfica 5. Curva Dosis-efecto de Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA con respecto al porcentaje de reducción de la corriente. Se graficó el porcentaje de reducción contra la concentración utilizada de D-Tubocurarina en un rango de concentraciones desde 1 pM hasta 10 μ M. La tabla de la derecha indica los valores de cada punto, los cuales representan el efecto medio $\bar{X} \pm$ EEM; obteniéndose una CE50 de 79.05 pM para el primer ajuste y una CE50 de 214 nM para el segundo ajuste. Este ajuste se hizo para complementar la información proporcionada por el total de concentraciones usadas de D-Tubocurarina en este protocolo.

La concentración de D-Tubocurarina elegida para continuar con los registros de coaplicación fue de 1 μM debido a que se consideró como un punto intermedio entre las CE50 obtenidas y a que esta concentración de D-Tubocurarina es capaz de inhibir aproximadamente un 20% de las corrientes mediadas por NMDA.

Voltaje dependencia del efecto de D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA.

El siguiente objetivo consistió en analizar la posible dependencia al voltaje en la unión de la D-Tubocurarina al receptor de NMDA. Para este propósito, se registraron 14 células provenientes del núcleo estriado, se utilizó la coaplicación de NMDA y D-Tubocurarina 1 μM durante un protocolo de registro de corrientes a diferentes voltajes de mantenimiento, con cambios de 20 mV desde -100 mV hasta +20 mV (Gráfica 6).



Gráfica 6. Efecto de la modulación por D-Tubocurarina sobre las corrientes de NMDA en el protocolo IV. Se muestra un registro representativo del efecto de D-Tubocurarina sobre las corrientes de NMDA a diferentes voltajes de mantenimiento, donde A es la situación control y B ejemplifica la coaplicación de D-Tubocurarina. A y B corresponden a la misma célula en las diferentes condiciones de aplicación de los fármacos, cada color representa un voltaje diferente al cual ha sido mantenido la célula registrada.

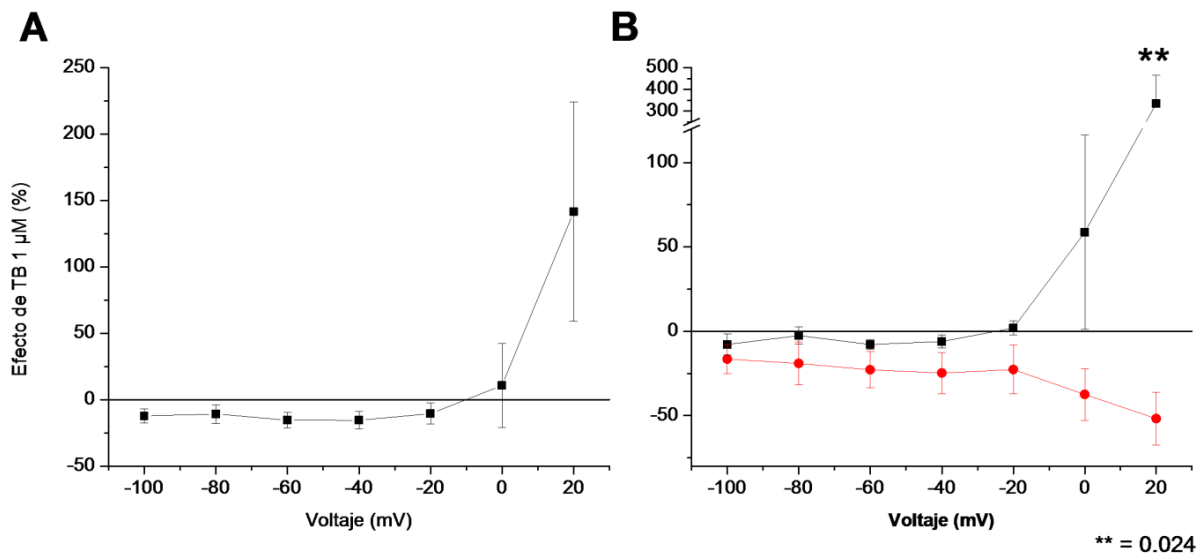
Los datos obtenidos de los registros obtenidos mediante el uso del protocolo de corriente vs voltaje se analizaron tomando en cuenta la modulación observada en el pico y en el estado estacionario como el porcentaje de reducción o aumento de la corriente.

El efecto observado sobre el pico de la corriente con el protocolo IV fue que la corriente es inhibida aproximadamente un 20% desde voltajes de -100 mV hasta -20 mV, sin embargo, a voltajes de 0 mV y +20 mV se observaron efectos muy variables que tendieron a un aumento en el pico de la corriente, con media \pm EEM de $10.1 \pm 31.5\%$ y $141 \pm 82.5\%$ respectivamente. No se encontró diferencia significativa en comparación con la condición control, es decir, no hay voltaje dependencia.

Se decidió separar a las 14 células registradas en dos grupos de células que mostraron diferentes patrones de inhibición y aumento de sus corrientes. El primer grupo de estas células consistió de 6 células en las cuales la inhibición producida por la D-Tubocurarina fue menor que en el otro grupo a voltajes desde -100 mV hasta -20 mV, y además, a voltajes de 0 mV y +20 mV la corriente aumentó en valores con una media de $58.75 \pm 57.5\%$ y de $335.1 \pm 129\%$.

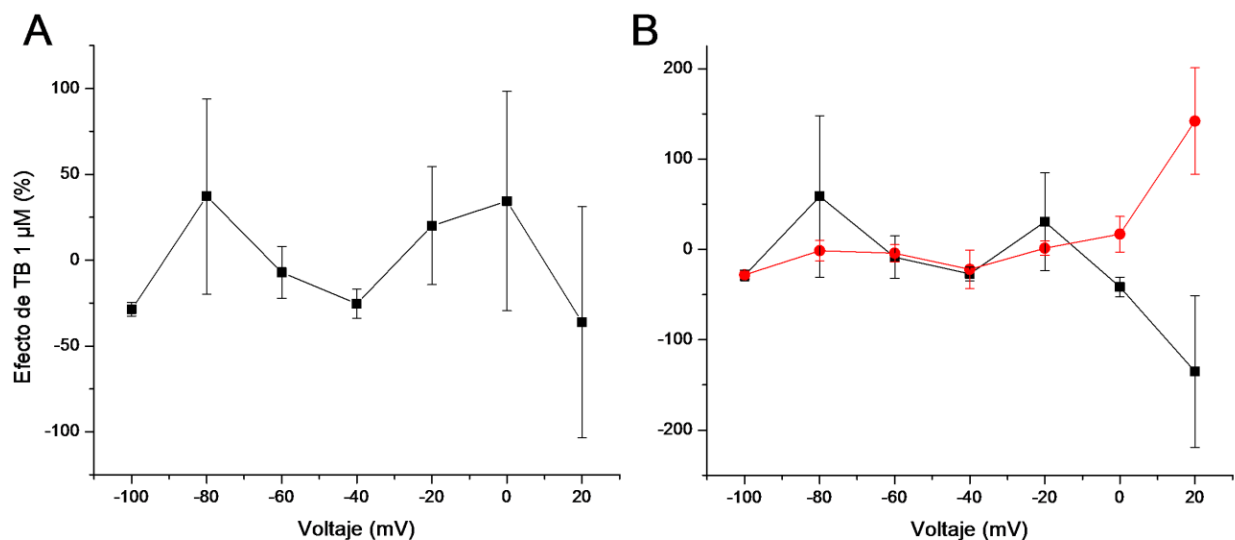
En las 8 células registradas restantes, el efecto de la D-Tubocurarina produjo una inhibición de aproximadamente 20% a voltajes de -100 mV hasta -20 mV, y en estas células, a voltajes de 0 mV y +20 mV se produjo una reducción mayor de la corriente, con medias en los valores porcentuales de $-37.4 \pm 15.3\%$ y $-51.8 \pm 15.6\%$ de reducción respectivamente.

Es notable que en ambos grupos, el efecto de la D-Tubocurarina produce reducción de la corriente a voltajes entre -100 mV y -20 mV, sin embargo, a valores de 0 mV y +20 mV, un grupo de células tuvo aumento en el pico de la corriente, mientras que el otro grupo tuvo una reducción mayor. Es posible que se trate de dos poblaciones neuronales con diferentes arreglos en la conformación del receptor NMDA. Se encontró una diferencia significativa entre los efectos producidos por la D-Tubocurarina solamente a un voltaje de +20 mV entre los grupos de células registradas (Gráfica 7).



Gráfica 7. Efecto de D-Tubocurarina en el pico de corrientes activadas por NMDA en un protocolo IV. **A)** Se muestra el porcentaje de aumento o reducción del pico de la corriente de NMDA a voltajes desde -100 mV hasta +20 mV (n=14). **B)** Se muestra el porcentaje de aumento o reducción del pico de la corriente en el total de células, que han sido separados en dos grupos según el efecto que produce la D-Tubocurarina sobre el pico de la corriente a voltajes de 0 mV y +20 mV. En negro (n=6), el grupo de células en las que la D-Tubocurarina produce aumento en el pico. En rojo (n=8) se muestra el grupo de células sobre las cuales la D-Tubocurarina induce una reducción en la corriente al pico en todo el protocolo. Se aprecian diferencias significativas entre los efectos vistos entre estos dos grupos a valores positivos de voltaje. $p < 0.05$

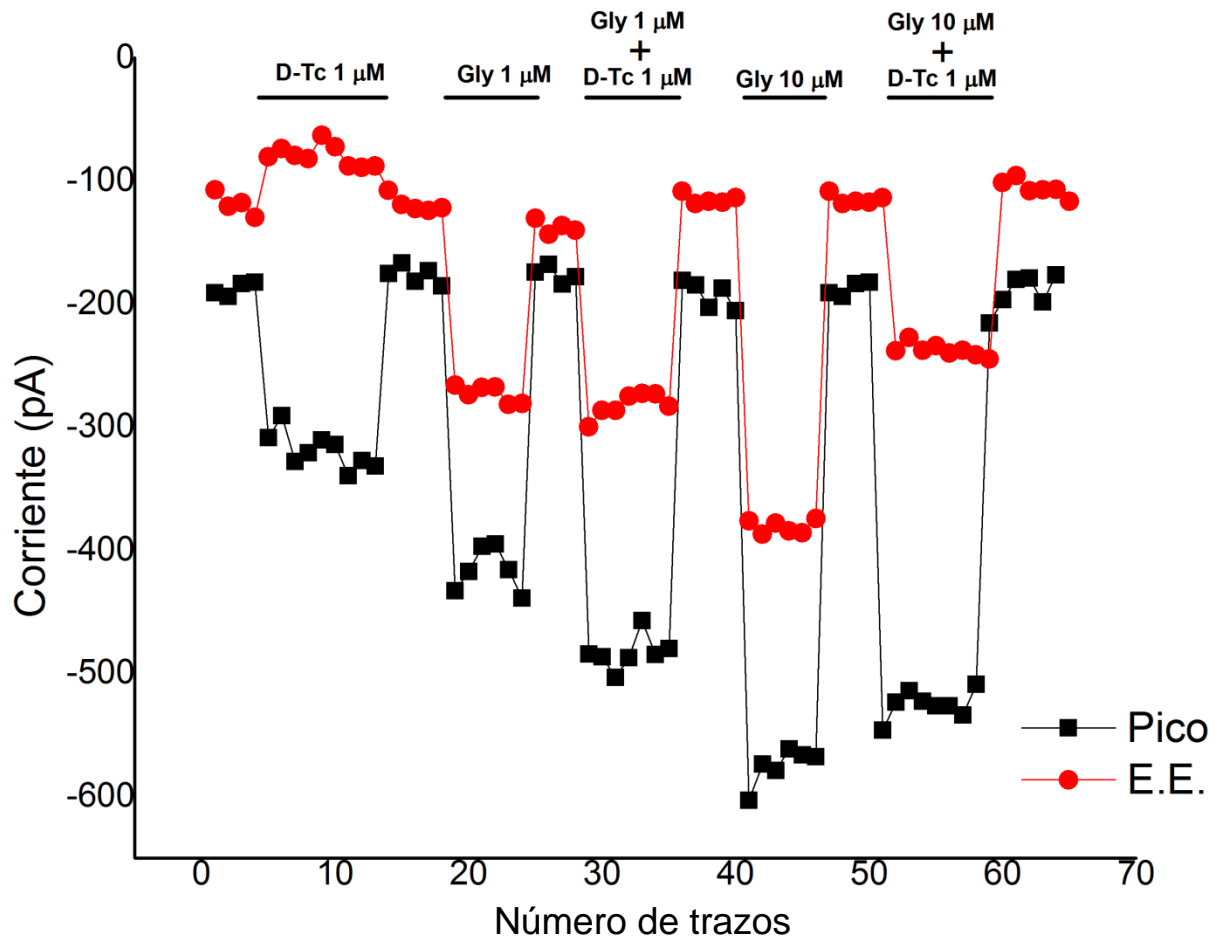
El efecto que la D-Tubocurarina produce sobre el estado estacionario de la corriente en el protocolo IV aplicado fue muy variable, sin embargo, no se encontró una diferencia significativa entre los porcentajes de reducción y aumento producidos a los diferentes voltajes del protocolo. De la misma forma que en los valores obtenidos del pico de la corriente, en este caso también se hizo la separación del total de neuronas registradas en dos grupos que mostraron valores diferentes de reducción y aumento de la corriente en estado estacionario a voltajes de 0 y +20 mV. En el grupo que mostró valores de aumento en la corriente en el estado estacionario, los valores obtenidos fueron de $17.3 \pm 16.4\%$ y $133.2 \pm 63.3\%$ respectivamente ($n=8$). En el grupo que mostró valores de reducción de la corriente en el estado estacionario a estos voltajes, los valores porcentuales de cambio fueron de $-56.5 \pm 11.3\%$ y $-137.6 \pm 83.6\%$. No hubo diferencia significativa en el efecto producido por la D-Tubocurarina en cada uno de los grupos de células registrados. (Gráfica 8).



Gráfica 8. Efecto de D-Tubocurarina en el estado estacionario de corrientes activadas por NMDA en un protocolo IV. **A)** Se muestra el porcentaje de aumento o reducción del pico de la corriente de NMDA a voltajes desde -100 mV hasta +20 mV ($n=14$). **B)** Se muestra el porcentaje de aumento o reducción del pico de la corriente en el total de células, que han sido separados en dos grupos según el efecto que produce la D-Tubocurarina sobre el pico de la corriente a voltajes de 0 mV y +20 mV. En negro ($n=8$), el grupo de células en las que la D-Tubocurarina produce aumento en el estado estacionario. En rojo ($n=6$) se muestra el grupo de células sobre las cuales la D-Tubocurarina induce una reducción en la corriente al estado estacionario en los mismos valores de voltaje.

Efecto de la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA a diferentes concentraciones de Glicina.

Con el objetivo de conocer si la D-Tubocurarina compite con la Glicina por el sitio de unión de este coagonista del receptor NMDA, se utilizó la coaplicación de NMDA con y sin la presencia de D-Tubocurarina 1 μM a diferentes concentraciones de Glicina en 27 neuronas. En los registros obtenidos mediante este protocolo se utilizó como condición control la aplicación de solución de control TEA-free adicionada solo con el agonista NMDA, es decir, no se adicionó Glicina para la activación de la corriente.

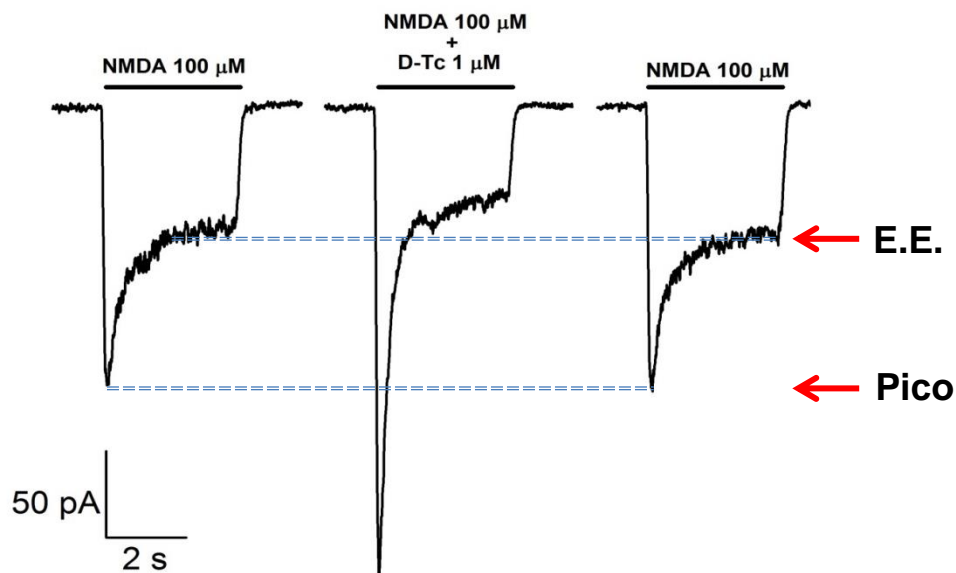


Gráfica 9. Curso temporal representativo del efecto de D-Tubocurarina 1 μM en el pico y estado estacionario de corrientes activadas por NMDA en un protocolo de coaplicación de NMDA en ausencia y presencia de Glicina a diferentes concentraciones. Se muestran en negro los valores obtenidos al pico y en rojo los obtenidos en el estado estacionario de las corrientes registradas.

Las concentraciones usadas de Glicina para este protocolo fueron 0 Glicina, 1 μM y 10 μM . Se midió el cambio producido en el pico y el estado estacionario de la corriente (Gráfica 9).

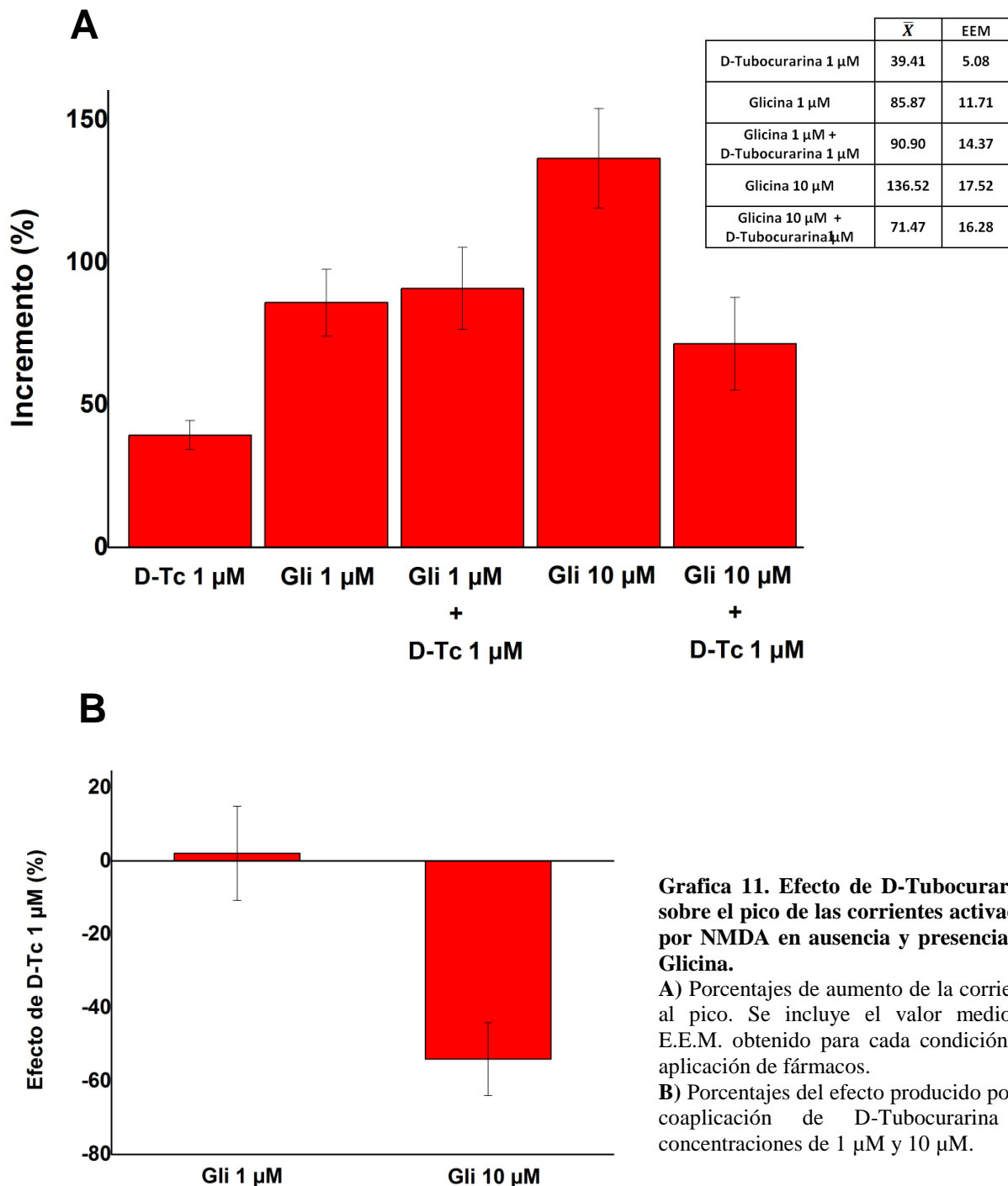
Con los datos obtenidos en estos registros, se calcularon y se graficaron los porcentajes de aumento o disminución de la corriente en cada condición de aplicación de los fármacos en presencia o en ausencia de Glicina.

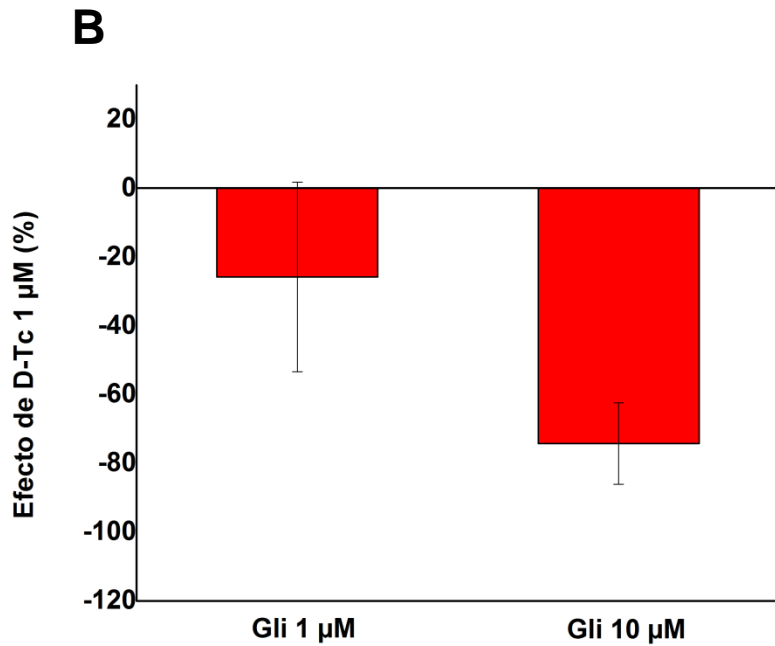
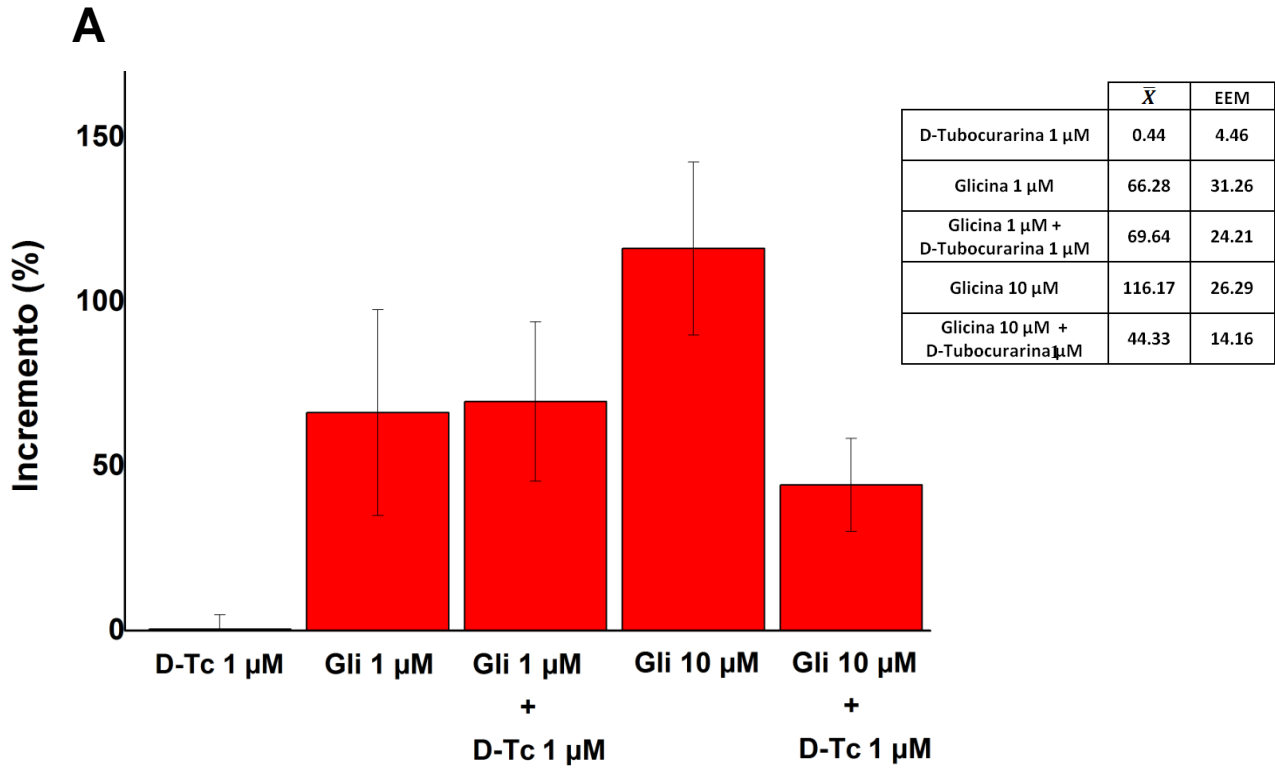
Bajo la aplicación de este protocolo, se observó que en ausencia del coagonista Glicina, la D-Tubocurarina a una concentración 1 μM produjo un aumento considerable en la corriente al pico, sin embargo, en las corrientes en el estado estacionario no se nota un cambio importante (Gráfica 10). En la aplicación de Glicina 1 μM más D-Tubocurarina se encontró un ligero aumento tanto en la corriente al pico como en la corriente en el estado estacionario con respecto a la aplicación de Glicina 1 μM en ausencia de D-Tubocurarina (Gráfica 11).



Gráfica 10. Trazo representativo del efecto de D-Tubocurarina 1 μM en ausencia de Glicina en el pico y estado estacionario de corrientes activadas por NMDA. Existe aumento de la corriente en el pico, pero no en el estado estacionario (E.E). Las líneas punteadas muestran el nivel control de las corrientes registradas en el pico y estado estacionario según se indica.

Por último, cuando se aplicó Glicina 10 μM , el efecto observado fue un aumento en el porcentaje de incremento de las corrientes al pico y en el estado estacionario en comparación con la aplicación de Glicina 10 μM más de D-Tubocurarina, se produjo una reducción en las corrientes producidas en presencia de este fármaco (Gráfica 12).





Gráfica 12. Efecto de D-Tubocurarina sobre el estado estacionario de las corrientes activadas por NMDA en ausencia y presencia de Glicina.

A) Porcentajes de aumento de la corriente al estado estacionario. Se incluye el valor medio \pm E.E.M. obtenido para cada condición de aplicación de fármacos.

B) Porcentajes del efecto producido por la coaplicación de D-Tubocurarina a concentraciones de 1 μ M y 10 μ M.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El trabajo anterior tuvo como objetivo principal estudiar el efecto modulador que ejerce la D-tubocurarina en las corrientes activadas por NMDA e intentar comprender su mecanismo de acción. Para lograr este propósito se registraron neuronas medianas del núcleo estriado de la rata mediante el registro electrofisiológico por fijación de voltaje, las cuales para ser incluidas en este estudio, debieron cumplir con los siguientes requisitos: dendritas y axón cortos (usualmente menores a los 75 μ m), presencia de corrientes de Na⁺ y Ca²⁺ en el protocolo de rampa, una capacitancia de 8 \pm 4 pF, una resistencia de membrana de 1G Ω y una resistencia de acceso menor a 25 M Ω .

Las células registradas pertenecían al núcleo estriado debido a que esta estructura, que forma parte de los ganglios basales, es de las más afectadas en enfermedades neurodegenerativas que producen discapacidades motoras y cognitivas como la Enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Qiu, Li, & Zhuo, 2011), por lo tanto, fármacos que sean capaces de modular o contrarrestar cambios indeseados en la excitabilidad de estas neuronas son probados continuamente y se busca exponer el papel que desempeñan en el tratamiento y mejora de los síntomas de estos desordenes.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis confirmaron estudios previos realizados en el Laboratorio de Neuromodulación del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Flores-Hernandez *et al.*, 2009), en los que se observó que la D-Tubocurarina reduce la corriente de NMDA, en aquel estudio, en una preparación de registro en rebanada de corteza auditiva de rata en un rango del 20 al 90%.

Los resultados obtenidos en la curva dosis-efecto nos indican que el efecto de la D-Tubocurarina es dosis dependiente y tiene un efecto multifásico sobre las corrientes activadas por NMDA, ya que se obtuvieron dos CE50 en el análisis de todas las concentraciones utilizadas en este protocolo de trabajo (Gráfica 4). Esto nos sugiere que existen distintos sitios de unión del fármaco al NMDAR, al menos dos, uno que

tiene una afinidad muy alta por el fármaco y otro en el que la concentración necesaria para producir un efecto sobre la corriente es alta, con afinidad menor por la D-Tubocurarina y probablemente con un mecanismo parecido al de bloqueo del canal según la proporción de la corriente que es reducida. Además, haciendo otro ajuste a concentraciones bajas del fármaco, es posible encontrar otros posibles sitios de unión al NMDAR, sin embargo, para confirmar esto, es necesario profundizar en el efecto producido por la D-Tubocurarina en el rango de concentraciones desde 1 pM hasta 10 μ M. Estos puntos dan pauta a conocer la afinidad que la D-Tubocurarina tiene en diferentes sitios de unión dentro del NMDAR y nos abren camino a conocer más sobre las capacidades modulatorias de este fármaco sobre este receptor.

En el estudio del efecto de la D-Tubocurarina a diferentes voltejes sobre el NMDAR, al realizar un protocolo IV durante la coaplicación del fármaco a una concentración 1 μ M se encontró que las corrientes en presencia de este, son moduladas negativamente, con una reducción en el pico de \sim 20% de su amplitud control a valores negativos de voltaje, mientras que a valores de 0 y +20 mV, se observa un aumento en las corrientes registradas.

Este efecto de reducción de la corriente en valores negativos de voltaje concuerda con los resultados obtenidos en la curva dosis-efecto, pero no se tiene una idea clara de la razón por la que a valores de 0 y +20 mV la corriente aumenta. Al separar el total de células registradas en dos grupos según las diferencias observadas en el análisis, se observó que en un grupo de células, había un aumento en las corrientes tanto en el pico como en el estado estacionario, y de forma contraria, en el grupo formado por las células restantes, se vio una reducción en el pico y estado estacionario.

Esto parece indicar que se registraron dos grupos de células que contienen una conformación diferente del receptor NMDA. Se sabe que en el estriado abunda el receptor de NMDA en su forma heterotetramérica, constituido principalmente por las subunidades NR2A y NR2B (Dunah & Standaert, 2003), por lo que podríamos

suponer que el efecto producido por la D-Tubocurarina a voltajes positivos es diferente en cada uno de estos receptores. Se puede afirmar en general que el efecto de la D-Tubocurarina no es voltaje dependiente.

Por otro lado, con el fin de conocer si existe una competencia entre la D-Tubocurarina y Glicina por el sitio de unión del coagonista, se realizó otro protocolo de coaplicación de fármacos, en esta ocasión, de D-Tubocurarina 1 μ M en ausencia y presencia de Glicina.

El efecto producido por la D-Tubocurarina muestra que en ausencia de Glicina, la D-Tubocurarina está probablemente ocupando el sitio de actividad de la Glicina y funcionando como un agonista parcial, ya que la D-Tubocurarina por sí sola, fue capaz de aumentar las corrientes en el pico en un $39.4 \pm 5.08\%$.

Es interesante notar que en esta condición, solo la corriente al pico fue aumentada y la corriente en el estado estacionario no sufrió cambios relevantes ($0.44 \pm 4.46\%$), por lo que es de suponer que el efecto de la D-Tubocurarina se está dando sobre una subunidad del receptor que interviene en la activación rápida de la corriente, probablemente la subunidad NR2A, la cual confiere al receptor una cinética de apertura rápida y una desensibilización rápida también (Stuart Cull-Candy, Brickley, & Farrant, 2001; Qiu *et al.*, 2011; Wyllie, Livesey, & Hardingham, 2013b).

La literatura menciona que los receptores de NMDA con las subunidades NR1/NR2A poseen la probabilidad de apertura más alta, con una duración de activación de 30 a 50 ms, la probabilidad de apertura de los NMDARs con NR1/NR2B es de tres a cinco veces menor que la anterior y los que contienen las subunidades NR1/NR2C-D tienen una probabilidad de apertura muy baja, tardando de 2000 a 4000 ms en activarse (Wyllie *et al.*, 2013b).

Cuando la D-Tubocurarina fue coaplicada con Glicina 1 μM se observó que también se produjo un aumento en el porcentaje de las corrientes activadas por NMDA en comparación con la aplicación de Glicina 1 μM sin D-Tubocurarina, esto nos habla de una clara competencia entre estas dos moléculas por el mismo sitio de unión, ya que hay un ligero aumento que puede ser explicado por el efecto mostrado anteriormente por la D-tubocurarina.

Por último, en la coaplicación de D-Tubocurarina 1 μM con Glicina 10 μM se observó una disminución al pico de las corrientes registradas en comparación con las corrientes producidas en presencia solo de Glicina 10 μM , resultados similares a los obtenidos en el protocolo utilizado para obtener la curva dosis-efecto en este trabajo.

Como se puede notar, la D-Tubocurarina produjo una reducción en la corriente de NMDA en presencia de Glicina, suceso que ya había sido reportado en estudios anteriores, pero que no había sido visto en registros de célula dissociada. No obstante, para saber el efecto que la D-Tubocurarina tiene en estas corrientes y tratar de dilucidar el sitio de unión del fármaco a receptor se utilizaron los protocolos antes descritos.

Los resultados de esta tesis dan información importante de la interacción entre la D-Tubocurarina y el NMDAR, ya que podemos observar que en presencia del coagonista Glicina, la D-Tubocurarina tiene la capacidad de inhibir las corrientes activadas por NMDA y en condiciones en ausencia del mismo coagonista, la D-Tubocurarina es capaz de potenciar estas corrientes, hecho que nos sugiere un papel modulador de la D-Tubocurarina del sitio de unión a glicina de NR1 (Kvist, Greenwood, Hansen, Traynelis, & Bräuner-Osborne, 2013), esta teoría puede ser puesta a prueba con el uso de antagonistas del sitio de unión a glicina. Este papel modulador del sitio de glicina ya había sido propuesto por Flores-Hernández *et al.*, por lo que este trabajo permite profundizar y afirmar los resultados obtenidos en estudios anteriores.

Gracias a los datos obtenidos en este trabajo, es posible sugerir nuevos trabajos de investigación enfocados al efecto que la D-Tubocurarina parece tener sobre una subunidad específica del receptor a NMDA, probablemente la subunidad NR2A en ausencia de Glicina (pico) y es necesario aclarar el efecto que tiene la D-Tubocurarina en las subunidades restantes.

La mayor limitación del estudio realizado fue la escasa información sobre el efecto que tiene la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA, ya que muy pocos trabajos se han enfocado a conocer el efecto de este fármaco en el cuerpo humano y en especial, en el sistema nervioso. Los resultados obtenidos son de gran impacto por el hecho de ser datos completamente nuevos sobre el efecto de la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA, que dan pauta a continuar con el estudio del mecanismo de acción de esta sustancia para su potencial uso y aplicación en el tratamiento y manejo de desórdenes neurodegenerativos.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados presentados podemos concluir:

1. La D-Tubocurarina ejerce un efecto de reducción dosis dependiente sobre las corrientes activadas por NMDA en células del núcleo estriado de la rata.
2. La D-Tubocurarina no tiene un efecto voltaje dependiente sobre las corrientes activadas por NMDA en células del núcleo estriado de la rata.
3. LA D-Tubocurarina compite por el sitio de unión a Glicina en el receptor NMDA y posiblemente funcione como un agonista parcial en condiciones de ausencia de Glicina.

REFERENCIAS

- Báez-Mendoza, R., & Schultz, W. (2013). The role of the striatum in social behavior. *Frontiers in Neuroscience*, 7(7 DEC), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fnins.2013.00233>
- Bar-Gad, I., & Bergman, H. (2001). Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(6), 689–695.
- Bargas, J., Howe, a, Eberwine, J., Cao, Y., & Surmeier, D. J. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(11 Pt 1), 6667–6686.
- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. a, & Bevan, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*, 196 (Pt 4, 527–542. <http://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x>
- Cagnan, H., Duff, E. P., & Brown, P. (2015). The relative phases of basal ganglia activities dynamically shape effective connectivity in Parkinson's disease. *Brain*, 1667–1678. <http://doi.org/10.1093/brain/awv093>
- Carey, R. J., Dai, H., & Gui, J. (1998). Effects of dizocilpine (MK-801) on motor activity and memory. *Psychopharmacology*, 137(3), 241–246. <http://doi.org/10.1007/s002130050616>
- Chen, B. S., & Roche, K. W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.05.018>
- Colquhoun, D., Dreyer, F., & Sheridan, R. E. (1979). The actions of tubocurarine at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 293, 247–284.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: Diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*. [http://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](http://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 327–335. [http://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](http://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)
- Dannhardt, G., & Kohl, B. K. (1998). The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and possible therapeutic applications. *Current Medicinal Chemistry*, 5(4), 253–263.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 7–61. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2005.05.004>
- Dolino, D. M., Cooper, D., Ramaswamy, S., Jaurich, H., Landes, C. F., & Jayaraman, V. (2015). Structural Dynamics of the Glycine-binding Domain of the N

- Methyl-d-Aspartate Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), 797–804. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.605436>
- Dravid, S. M., Erreger, K., Yuan, H., Nicholson, K., Le, P., Lyuboslavsky, P., ... Traynelis, S. F. (2007). Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *The Journal of Physiology*, 581(Pt 1), 107–128. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124958>
- Dunah, A. W., & Standaert, D. G. (2003). Subcellular segregation of distinct heteromeric NMDA glutamate receptors in the striatum. *Journal of Neurochemistry*, 85(4), 935–943. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01744.x>
- Edman, S., McKay, S., MacDonald, L. J., Samadi, M., Livesey, M. R., Hardingham, G. E., & Wyllie, D. J. a. (2012). TCN 201 selectively blocks GluN2A-containing NMDARs in a GluN1 co-agonist dependent but non-competitive manner. *Neuropharmacology*, 63(3), 441–449. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.027>
- Erreger, K., & Traynelis, S. F. (2005). Allosteric interaction between zinc and glutamate binding domains on NR2A causes desensitization of NMDA receptors. *The Journal of Physiology*, 569(Pt 2), 381–393. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.095497>
- Fisher, J. L., & Dani, J. A. (2000). Nicotinic receptors on hippocampal cultures can increase synaptic glutamate currents while decreasing the NMDA-receptor component. *Neuropharmacology*, 39(13), 2756–2769. [http://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00102-7](http://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00102-7)
- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., ... Levine, M. S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology*, 88(6), 3010–3020. <http://doi.org/10.1152/jn.00361.2002>
- Flores-Hernandez, J., Salgado, H., De La Rosa, V., Avila-Ruiz, T., Torres-Ramirez, O., Lopez-Lopez, G., & Atzori, M. (2009). Cholinergic direct inhibition of N-methyl-D aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. *Synapse*, 63(4), 308–318. <http://doi.org/10.1002/syn.20609>
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301–310. <http://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
- Fülöp, F., Szatmári, I., Vámos, E., Zádori, D., Toldi, J., & Vécsei, L. (2009). Syntheses, transformations and pharmaceutical applications of kynurenic acid derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, 16(36), 4828–4842. <http://doi.org/10.2174/092986709789909602>
- Furukawa, H., & Gouaux, E. (2003). Mechanisms of activation, inhibition and specificity: Crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO Journal*, 22(12), 2873–2885. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg303>

- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., & Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438(7065), 185–192. <http://doi.org/10.1038/nature04089>
- Graveland, G. A., Williams, R. S., & DiFiglia, M. (1985). Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4688), 770–773. <http://doi.org/10.1126/science.3155875>
- Han, X., Tomitori, H., Mizuno, S., Higashi, K., Füll, C., Fukiwake, T., ... Igarashi, K. (2008). Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of Neurochemistry*, 107(6), 1566–1577. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05729.x>
- Hansen, K. B., Ogden, K. K., Yuan, H., & Traynelis, S. F. (2014). Distinct functional and pharmacological properties of triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors. *Neuron*, 81(5), 1084–1096. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.035>
- Hikosaka, O., Nakamura, K., & Nakahara, H. (2006). Basal ganglia orient eyes to reward. *Journal of Neurophysiology*, 95(2), 567–584. <http://doi.org/10.1152/jn.00458.2005>
- Hikosaka, O., Takikawa, Y., & Kawagoe, R. (2000). Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiological Reviews*, 80(3), 953–978. <http://doi.org/http://physrev.physiology.org/content/80/3/953>
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 31–108. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.17.1.31>
- Honoré, T., Davies, S. N., Drejer, J., Fletcher, E. J., Jacobsen, P., Lodge, D., & Nielsen, F. E. (1988). Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4866), 701–703. <http://doi.org/10.1126/science.2899909>
- Inanobe, A., Furukawa, H., & Gouaux, E. (2005). Mechanism of partial agonist action at the NR1 subunit of NMDA receptors. *Neuron*, 47(1), 71–84. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.022>
- Kanemitsu, Y., Hosoi, M., Zhu, P. J., Weight, F. F., Peoples, R. W., McLaughlin, J. S., & Zhang, L. (2003). Dynorphin A inhibits NMDA receptors through a pH-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(3), 525–537. [http://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00214-8](http://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00214-8)
- Kemp, J. A., & McKernan, R. M. (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature Neuroscience*, 5 Suppl, 1039–1042. <http://doi.org/10.1038/nn936>
- Kito Z., & Scheuss V. (2010). NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. In *Intercellular Communication in the Nervous System*. Academic Press.
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron*. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005>
- Kvist, T., Greenwood, J. R., Hansen, K. B., Traynelis, S. F., & Bräuner-Osborne, H.

- (2013). Structure-based discovery of antagonists for GluN3-containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuropharmacology*, 0. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.08.003>
- Lee, C.-H., Lü, W., Michel, J. C., Goehring, A., Du, J., Song, X., & Gouaux, E. (2014). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature*, 511(7508), 191–197. <http://doi.org/10.1038/nature13548>
- Lerma, J. (1992). Spermine regulates N-methyl-d-aspartate receptor desensitization. *Neuron*, 8(2), 343–352. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90300-3](http://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90300-3)
- Lynch, D. R., & Guttman, R. P. (2002). Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(3), 717–723. <http://doi.org/10.1124/jpet.300.3.717>
- Martínez, G., Ropero, C., Funes, A., Flores, E., Landa, A. I., & Gargiulo, P. A. (2002). AP-7 into the nucleus accumbens disrupts acquisition but does not affect consolidation in a passive avoidance task. *Physiology and Behavior*, 76(2), 205–212. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00696-0](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00696-0)
- Masuko, T., Kashiwagi, K., Kuno, T., Nguyen, N. D., Pahk, A. J., Fukuchi, J., ... Williams, K. (1999). 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. *Molecular Pharmacology*, 55(6), 957–969. <http://doi.org/10.1124/mol.55.6.957>
- Mayer, M. L. (2005). Glutamate receptor ion channels. *Current Opinion in Neurobiology*. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2005.05.004>
- Mayer, M. L. (2011). Structure and mechanism of glutamate receptor ion channel assembly, activation and modulation. *Current Opinion in Neurobiology*. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2011.02.001>
- Monaghan, D. T., Irvine, M. W., Costa, B. M., Fang, G., & Jane, D. E. (2012). Pharmacological Modulation of NMDA Receptor Activity and the Advent of Negative and Positive Allosteric Modulators. *Neurochemistry International*, 61(4), 581–592. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.01.004>
- Nakano, K., Kayahara, T., Tsutsumi, T., & Ushiro, H. (2000). Neural circuits and functional organization of the striatum. *Journal of Neurology*, 247 Suppl , V1–V15. <http://doi.org/10.1007/PL00007778>
- Ogden, K. K., & Traynelis, S. F. (2011). New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(12), 726–733. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2011.08.003>
- Paoletti, P., Ascher, P., & Neyton, J. (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(15), 5711–5725.
- Paoletti, P., & Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>

- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, *et al.*, E. (2001). *Neuroscience. Sunderland (MA): Sinauer Associates.*
- Qiu, S., Li, X. Y., & Zhuo, M. (2011). Post-translational modification of NMDA receptor GluN2B subunit and its roles in chronic pain and memory. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(5), 521–529. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.06.003>
- Rikani, A. A., Choudhry, Z., Choudhry, A. M., Rizvi, N., Ikram, H., Mobassarah, N. J., & Tulli, S. (2014). The mechanism of degeneration of striatal neuronal subtypes in Huntington disease, 21(3), 112–114.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., & Stevens, C. F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5369), 1596–1599. <http://doi.org/10.1126/science.280.5369.1596>
- Rumbaugh, G., Prybylowski, K., Wang, J. F., & Vicini, S. (2000). Exon 5 and spermine regulate deactivation of NMDA receptor subtypes. *Journal of Neurophysiology*, 83(3), 1300–1306.
- Salama, S., & Wright, S. (1950). Action of d-tubocurarine chloride on the central nervous system of the cat. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 5(1), 49–61.
- Santangelo, R. M., Acker, T. M., Zimmerman, S. S., Katzman, B. M., Strong, K. L., Traynelis, S. F., & Liotta, D. C. (2012). Novel NMDA Receptor Modulators: An Update. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(11), 1337–1352. <http://doi.org/10.1517/13543776.2012.728587>
- Sean, M., Bengtson, C. P., Bading, H., Wyllie, D. J. A., & Hardingham, G. E. (2013). Recovery of NMDA receptor currents from MK-801 blockade is accelerated by Mg²⁺ and memantine under conditions of agonist exposure. *Neuropharmacology*, 74, 119–125. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.024>
- Senkowska, A., & Ossowska, K. (2003). Role of metabotropic glutamate receptors in animal models of Parkinson's disease. *Pol J Pharmacol*. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14730087
- Siegel, A., & Sapru, H. N. (2011). *Essential Neuroscience*. (W. K. Health, Ed.). Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins.
- Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings, H. C., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, 14(2), 385–397. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90294-5](http://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90294-5)
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496. <http://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Traynelis, S., Hartley, M., & Heinemann, S. (1995). Control of proton sensitivity of the

- NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*, 268(5212), 873–876. <http://doi.org/10.1126/science.7754371>
- Turecek, R., Vlcek, K., Petrovic, M., Horak, M., Vlachova, V., & Vyklicky, L. (2004). Intracellular spermine decreases open probability of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neuroscience*, 125(4), 879–887. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.03.003>
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, a, Krausova, B., Kaniakova, M., ... Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 63 Suppl 1, S191–203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564659>
- Wenningmann, I., & Dilger, J. P. (2001). The kinetics of inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by (+)-tubocurarine and pancuronium. *Molecular Pharmacology*, 60(4), 790–796.
- Williams, K. (2009). Extracellular Modulation of NMDA Receptors. In A. M. Van Dongen (Ed.), *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Williams, T. L., Stone, T. W., Burton, N. R., & Smith, D. A. (1988). Kynurenic acid and AP5 distinguish between NMDA receptor agonists. *Experimental Neurology*, 102(3), 366–367. [http://doi.org/10.1016/0014-4886\(88\)90232-4](http://doi.org/10.1016/0014-4886(88)90232-4)
- Wollmuth, L. P., & Sobolevsky, A. I. (2004). Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends in Neurosciences*. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2004.04.005>
- Wong, E. H., Kemp, J. A., Priestley, T., Knight, A. R., Woodruff, G. N., & Iversen, L. L. (1986). The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(18), 7104–7108. <http://doi.org/10.1073/pnas.83.18.7104>
- Wyllie, D. J. A., Livesey, M. R., & Hardingham, G. E. (2013a). Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology*, 74, 4–17. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.016>
- Wyllie, D. J. A., Livesey, M. R., & Hardingham, G. E. (2013b). Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology*, 74(100), 4–17. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.016>
- Yamamoto, H., Hagino, Y., Kasai, S., & Ikeda, K. (2015). Specific Roles of NMDA Receptor Subunits in Mental Disorders. *Current Molecular Medicine*, 15(3), 193–205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25817860>
- Yu, G., Wu, F., & Wang, E. (2015). BQ-869 , a novel NMDA receptor antagonist , protects against excitotoxicity and attenuates cerebral ischemic injury in stroke, 8(2), 1213–1225.

Anexos

Definición de las variables y escalas de medición

Voltaje. Es una magnitud física que cuantifica la diferencia de potencial eléctrico entre dos puntos. También se puede definir como el trabajo por unidad de carga ejercido por el campo eléctrico sobre una partícula cargada para moverla entre dos posiciones determinadas. El voltaje se mide en Volts (V).

Corriente. Es el flujo de carga eléctrica por unidad de tiempo que recorre un material. Este se expresa en Coulombios sobre segundo (C/s), unidad que se denomina Amperio (A).

Capacitancia. Es la propiedad que tienen los cuerpos para mantener una carga eléctrica. La capacitancia también es una medida de la cantidad de energía eléctrica almacenada para una diferencia de potencial eléctrico dada. La capacitancia es medida en faradios (F); esta unidad es relativamente grande y suelen utilizarse submúltiplos como el microfaradio (μF) o picofaradio (pF).

Resistencia de membrana. Es una medida que mide el impedimento de la membrana para el flujo de iones. Se expresa en Ohms (Ω).

Resistencia de acceso: Es la suma de la resistencia del electrodo y la resistencia del electrodo y su unión con la célula. Se expresa en Ohms (Ω).

Constante de inactivación: Es la constante de tiempo ajustada al periodo después del pico de la corriente.