



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SIMULADORES DE LA ELECTROFISIOLOGÍA
DEL RECEPTOR NMDA EN NEURONA SIMULADA

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA
PRESENTA

MIRIAM YAZMÍN BELTRÁN JUÁREZ

DIRECTORA: DRA. MARÍA EUGENIA PÉREZ BONILLA



OCTUBRE 2019

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio de Biología interactiva de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Pérez Bonilla y el apoyo del Dr. Arturo Reyes Lazalde.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora María Eugenia Pérez Bonilla y al doctor Arturo Reyes Lazalde del laboratorio de Biología interactiva por integrarme a su proyecto; de igual manera agradezco su apoyo y enseñanzas.

A cada uno de los miembros de mi familia. A mis padres, gracias por el amor, los consejos, pero sobre todo la confianza que ponen al creer en mis burdas habilidades en el quehacer científico, prometo mejorar día con día.

Mary y Didi gracias por su compañía, consejos y buenos momentos que forman parte de mí.

A mis compañeros más allegados que compartieron momentos, risas, discusiones pero sobre todo una amena charla que siempre llevare conmigo. En especial a Karen Hernández Villalva por ser mi amiga, confidente y acompañante de una travesía que a veces se nos hacía interminable.

A mis padres Ángel Beltrán Cruz y María de la cruz Juárez Reyes. Por el apoyo,
amor y paciencia que me han dado siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Glutamato	2
Glicina	3
RECEPTORES NMDA	4
Filogenia	4
Estructura	4
ELECTROFISIOLOGÍA DEL NMDAR	7
Cinética del canal.....	7
Bloqueo de NMDAR por Mg ²⁺	10
Desactivación.....	12
Desensibilización del NMDAR	12
El NMDAR en la frecuencia de potenciales de acción (PA)	13
Modulación extracelular del NMDAR.....	15
Modulación de NMDAR por protones.....	15
Modulación del NMDAR por zinc.....	15
Modulación del NMDAR por poliaminas	16
Modulación del NMDAR por Neuroesteroides	16
Modulación intracelular del NMDAR	16
NMDAR Y LA PLASTICIDAD NEURONAL.....	16
PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON NMDAR.....	17
Alzheimer	17
Parkinson.....	17
Enfermedad de Huntington	18
SIMULADORES COMPUTACIONALES PARA NMDAR.....	18
Modelo para NMDAR de Keller et al.	18
Modelo para NMDAR de Singh et al.	18
Simulador NMDAR de Chen	19
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVOS.....	20
Objetivo General	20

Objetivos Particulares	20
METODOLOGÍA	21
RESULTADOS.....	23
Interfaz de usuario: Menú principal	23
Simulador de fijación de corriente (Modelo monocompartmental)	23
Experimento 1: Condiciones control (Hodking – Huxley) para INMDA	24
Experimento 2: Desbloqueo del canal NMDA.....	24
Simulador para la fijación de voltaje	25
Experimento 1: Fijación de voltaje en ausencia de Mg^{2+}	25
Experimento 2: fijación de voltaje en presencia de Mg^{2+}	27
Simulador de canal único.....	28
Experimento 1: condiciones libre de Mg^{2+}	28
Experimento 2: presencia de Mg^{2+}	28
Leccionario NMDA	29
Ejemplos de lecciones	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIÓN	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXO.....	39
Simulador 1: fijación de corriente NMDA.....	39
Simulador 2: fijación de voltaje	40
Simulador 3: Apertura para un canal fijo	41

Abreviaturas

AP potenciales de acción

AMPA ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol

ATD abreviado en inglés – dominio amino terminal

Ca calcio

CTD abreviado en inglés-dominio C-terminal

EAA abreviado en inglés -aminoácidos excitadores

EAAT transportadores excitadores

EPSC abreviado en inglés -corrientes postsinápticas excitatorias

Glu glutamato

iGluR receptor ionotrópico de glutamato

K potasio

KA ácido kaínico

MGluR receptor metabotrópico de glutamato

NaCl cloruro de sodio

NMDA N-metil-D-aspartato

NMDAR receptor NMDA

MSN abreviado en inglés neuronas espinosas de tamaño mediano

NR1 subunidad del receptor NMDA tipo 1

NR2 subunidad del receptor NMDA tipo 2

NR3 subunidad del receptor NMDA tipo 3

NFT abreviado en inglés -marañas neurofibrilares intraneuronales

LBD abreviado en inglés -dominio unión a ligando

LTD abreviado en inglés– depresión largo plazo

LTP abreviado en inglés– potenciación a largo plazo

PKC proteína Kinasa C

TMD abreviado en inglés -Dominio transmembrana

SNC sistema nervioso central

SST abreviado en inglés -transmision sináptica corta

RESUMEN

En los últimos años, ha aumentado el interés por saber cómo funciona el cerebro; principalmente por dos razones: (1) el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten explorar su función desde la parte molecular hasta las alteraciones clínicas y (2) la integración de los conocimientos multidisciplinarios que han resultado en sendas teorías que alientan posibles tratamientos. La cognición es la base fundamental para empezar a entender el funcionamiento del cerebro, para esto, una de las estructuras más estudiadas es el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) debido a que está relacionado con funciones como el aprendizaje, la memoria, la potenciación y depresión a largo plazo y con padecimientos como el Alzheimer, Parkinson y la enfermedad de Huntington. Se tiene la esperanza de que al entenderse su función, se logren mejores tratamientos para estos padecimientos. De ahí la importancia de su inclusión como tema en cursos de fisiología, biofísica, neurobiología y neurociencias. En licenciatura, el estudio de la fisiología del cerebro se limita a diapositivas. Sin embargo, no se pueden realizar prácticas de laboratorio donde el alumno experimente, debido a los altos costos que esto implica. Una alternativa es el uso de programas de cómputo que incluyan simuladores para realizar experimentos virtuales. Afortunadamente, las neuronas funcionan con mecanismos eléctricos y bioquímicos que se pueden modelar matemáticamente. A partir de ahí, se construyen simuladores que reproducen bien los datos experimentales. En este trabajo, se diseñaron y desarrollaron tres simuladores: 1.- Simulador de Neurona Monocompartamental 2.- Simulador del Receptor NMDA (NMDAR) 3.- simulador de canal único. Con el simulador monocompartamental se presenta una neurona con canales de Na^+ , K^+ y NMDAR, que reproduce el efecto que tiene el NMDAR en un tren de potenciales de acción (PA). Con el simulador para el receptor NMDA, se reproduce la corriente NMDA a diferentes potenciales y se construye un gráfica corriente (I) –vs- voltaje (V). Los experimentos con canal único se realizaron con un algoritmo computacional. Los resultados muestran que el NMDAR se activa con glutamato o su agonista NMDA, aumenta la frecuencia de disparo de PA, el canal es bloqueado por Mg^{2+} a potenciales de reposo y la curva I –vs- V tiene un comportamiento no lineal. El programa de cómputo desarrollado es interactivo, ejecutable en ambiente Windows® desde XP a Windows 10, reproduce los experimentos reportados y cuenta con un módulo de lecciones para introducir al alumno en el tema.

INTRODUCCIÓN

La actividad eléctrica de las neuronas está determinada en gran medida por la presencia de canales iónicos en su membrana. Existen diferentes tipos de canales iónicos los cuáles se pueden clasificar en: (1) canales dependientes de voltaje, (2) canales unidos a ligando y (3) canales metabotrópicos. Los primeros, se caracterizan por tener sensores de voltaje en su estructura; un cambio en el voltaje, por ejemplo, una despolarización abre el canal. En los segundos, una molécula mensajera, por ejemplo, un neurotransmisor se une a un receptor, localizado en la estructura del canal, y se abre. En los metabotrópicos, el mensajero se une a un receptor que se localiza en la membrana celular, lejos del canal; una cascada de señalización abre el canal.

Los receptores unidos a ligando reciben a neurotransmisores inhibidores, como el GABA, y excitadores, como el glutamato. Particularmente, los receptores NMDA son canales iónicos activados por ligando (glutamato) que median un componente principal de la neurotransmisión excitadora en el sistema nervioso central (SNC). Están ampliamente distribuidos en todas las etapas de desarrollo y están involucrados de manera crítica en las funciones normales del cerebro, incluido el desarrollo neuronal y la plasticidad sináptica. Los receptores NMDA también están implicados en la fisiopatología de numerosos trastornos neurológicos y psiquiátricos, como accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, trastornos del estado de ánimo y esquizofrenia. Por estas razones, los receptores NMDA se han estudiado intensamente en las últimas décadas para dilucidar sus funciones fisiológicas y son vistos con objetivos terapéuticos (Hansen et al., 2017). Existe una amplia bibliografía de estudios moleculares que determinan sus características biofísicas y electrofisiológicas. Actualmente, las explicaciones de su función están referidas a los cambios estructurales que sufre el receptor ante la unión del glutamato y de moléculas moduladoras.

Glutamato

El ácido glutámico (Glu) es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central de los mamíferos y el aminoácido no esencial que se puede sintetizar en el cuerpo a través de distintas vías metabólicas; aproximadamente, se sabe que, hay 5-15 mmol de glutamato por Kg de tejido cerebral, dependiendo de la zona, además la mayoría, si no todas, las células del sistema nervioso expresan al menos un tipo de receptor de glutamato. Se ha concluido que este aminoácido, debe de estar presente en las concentraciones, lugar y momento adecuado. Una activación excesiva de los receptores de glutamato, que regulan la entrada de iones como Ca^{2+} , puede provocar procesos dañinos como la excitotoxicidad (Watkins y Jane, 2006; Flores-Soto et al., 2012; Zhou y Danbolt

,2014; Yelamanchi et al., 2016). Existen dos tipos de receptores a glutamato: metabotrópicos (mGlu) y ionotrópicos (iGlu). En la membrana postsináptica se localizan receptores a glutamato: AMPA (ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol), Kainato y NMDA (N-metil-D-aspartato). Este trabajo se enfoca en los receptores NMDA ionotrópicos.

Glicina

El segundo receptor para el NMDAR es la glicina, este neurotransmisor se encuentra en numerosas zonas del SNC, en un principio se creía que su actividad era inhibitoria, con la cual, se ayuda a controlar la coordinación de respuestas reflejas espinales, el procesamiento de señales sensoriales y nociceptivas. Además, la glicina también está implicada en el procesamiento de la información auditiva en los núcleos cocleares, el complejo de oliva superior y el colículo inferior (Gimenez et al.,2018).

Según los estudios de Jonhson y Ascher (1987) se descubrió que no solo actúa de forma inhibitoria, ya que mejoraba las corrientes neuronales dependientes de NMDA a niveles micromolares, siendo las concentraciones endógenas de glicina lo que modula la respuesta de las corrientes NMDA (Cumming y Popescu,2015), al mismo tiempo se ha observado que puede reducir la desensibilización y generar la potenciación de la corriente (Kemp y Lesson, 1993).

El sitio de unión a glicina se encuentra en la subunidad NR1, no obstante, la afinidad por la glicina y otros agonistas depende de que subunidad NR2 se encuentre presente en el tetrámero, siendo 10 veces más baja en receptores con NR2A (Dingledine et al.,1999). Desde el descubrimiento de su participación en las corrientes de NMDA ha habido un desarrollo rápido de potentes agentes farmacológicos que interactúan efectivamente con este sitio, la disponibilidad de las herramientas farmacológicas comienza a proporcionar información con respecto a la naturaleza de la interacción entre la glicina y la función fisiológica del NMDA (Kleckner y Dingledine,1988., Kemp y Lesson, 1993).

En los últimos años se ha puesto en duda el papel de la glicina como coagonista obligatorio para el NMDAR. El principal argumento es que hay zonas en la que se expresa NMDAR y no hay concentraciones de glicina suficiente para saturar el sitio de unión (Kemp y Lesson, 1993). Además, se ha encontrado que no es el único neurotransmisor que genera efecto en este receptor.

Se ha demostrado que el acetil colina (ACh) incrementa la corriente NMDA actuando mediante receptores muscarínicos y nicotínicos durante las primeras semanas del desarrollo. De igual forma inhibe directamente la postsinapsis, las corrientes NMDA en presencia de glicina; por lo que se infiere que ocurre una

modificación del sitio de unión a glicina para el ACh (Flores-Hernandez et al., 2009).

RECEPTORES NMDA

Filogenia

Las vías glutamatérgica son directamente responsables de la mayor parte de la interconectividad de largo alcance en el cerebro humano (Lipsky y Goldman., 2003). No es sorprendente que se trate de una familia de receptores filogenéticamente antiguos. Existe una sola familia de receptores AMPA, dos familias de receptores KA y tres familias de receptores NMDA. En los seres humanos, las similitudes de secuencias de aminoácidos entre los miembros de la familia de genes varían del 16 al 62% (Lipsky y Goldman, 2003).

Estructura

La estructura de NMDAR está formada por cuatro subunidades que forman el poro del canal: dos subunidad tipo 1 (subunidad NR1/gen GluN1) y dos subunidades tipo 2 (subunidad NR2) que pueden tener los siguientes subtipos: subunidad NR2A/gen GluN2A, NR2B/GluN2B, NR2C/GluN2C y NR2D/GluN2D. La subunidad NR2 puede ser remplazada por la subunidad tipo 3 (NR3) con los siguientes subtipos: NR3A/Glu3A y NR3B/Glu3B (Flores-Soto et al., 2012; Gene group: genenames.org). Cada una contiene propiedades fisiológicas distintas y la diversidad que se puede generar de las posibles combinaciones contribuye a la diferencia en la biogénesis, el tráfico, modificaciones postraduccionales, distribución celular y propiedades biofísicas del receptor (Salussolia et al., 2011). Un receptor funcional requiere de dos subunidades NR1 y dos subunidades que son combinaciones entre NR2 (A-D) y NR3 (A-B). La expresión más común es entre NR1-NR2, este dímero es considerada la estructura base de organización funcional en cada receptor, en donde se localizan los sitios de unión y de reconocimiento para diferentes ligandos, tanto fisiológicos como farmacológicos (Salazar, 2010; Flores-Soto et al., 2012). La subunidad NR1 se expresa en todas las neuronas y en todos los desarrollos del cerebro. La subunidad NR2 se encuentra en diferentes regiones y en diferentes etapas de desarrollo: En el cerebro embrionario, NR2B y NR2D predominan, mientras que NR2A y NR2C están ausentes. En contraste NR2A es predominante (Salussolia et al., 2011; Mony et al., 2009).

Las subunidades NR1, NR2 y NR3 están organizadas en cuatro dominios semiautónomos discretos: (a) dos en la parte extracelular, (b) uno transmembranal y (c) uno intracelular.

El primero de la parte extracelular es el dominio amino terminal (ATD): en este dominio se encuentran sitios de unión alostéricos para ifenprodil, protones y Zn^{2+} . El ATD de cada subunidad adopta una estructura bilobulada formada por los primeros 350 aminoácidos que se asocian como heterodímeros (R1-R2) de lado a lado unidas entre sí por bucles. En la hendidura entre R1 y R2 se encuentran los tres sitios de unión (Figura 1): (1) región hidrófila en el extremo exterior de la hendidura, que contiene residuos polares involucrados con la unión de Zn^{2+} , (2) región hidrofóbica en el interior de la hendidura, que contiene residuos que afectan la unión de ifenprodil y (3) el sitio de unión a iones Na^+ , (Traynelis et al., 2010; Hansen et al., 2018). Este dominio tiene como funciones básicas: (1) regulación de la probabilidad de activación y desactivación, (2) la regulación alostérica de la actividad del canal iónico mediante la unión a compuestos moduladores y (3) son sitios de interacción con proteínas extracelulares y proteínas cis o trans- sinápticas (Furukawa, 2011).

El ATD es conocido por su diversidad estructural y especificidad para NMDAR (Furukawa, 2011; Lee et al., 2014; Hansen et al., 2018). Cambia su arquitectura básica y disposición de sus dímeros dependiendo de la conjugación con diferentes subunidades NR2. En diferentes estudios cristalográficos, se han observado características únicas en NMDAR comparada con AMPA y Kainato.

Al segundo dominio extracelular se le conoce como de unión a ligando (LBD). Su arquitectura es bilobulada similar a una concha (Furukawa, 2011). Es una estructura altamente conservada; se encuentra compuesta por dos lóbulos discontinuos D1 y D2. La región D1, se conecta, por un lado, al ATD y por otro a la subunidad M1 del dominio transmembranal (TMD). La región D2 se une a M3 y M4. Estas uniones son equivalentes en NR1 y NR2 (Figura1) (Sobolevsky, 2015).

El siguiente dominio es el transmembranal (TMD). Es la parte más conservada de las subunidades NMDAR (Wyllie et al., 2013). Está formada de cuatro segmentos hidrofóbicos (M1-M4), localizados en la membrana celular y define el poro del canal iónico (Lee et al., 2014). El canal está formado principalmente por los segmentos M2 reentrantes. El vestíbulo está conformado por los segmentos transmembrana M1, M4 y M3 (Chang y Kou, 2008; Wyllie et al., 2013; Hansen et al., 2018) (figura1). El vértice del bucle en M2 de NR1 está relacionado con la permeabilidad y el bloqueo por Mg^{2+} del canal (Burnashev et al., 1992). Se ha sugerido que la zona más conservada de M3 contribuye a la porción más profunda del poro (Chang y Kou, 2008; Blanke y VanDongen, 2009).

En la parte intracelular se encuentra el dominio carboxilo terminal (CTD). Presenta motivos de unión específicos para el tráfico intracelular y proteínas de señalización, proteínas estructurales y varios sitio de fosforilación (Wyllie et al., 2013). Este dominio es el más diverso en términos de secuencia y longitud de secuencia en aminoácidos entre las subunidades de NMDAR. Por ejemplo, entre las subunidades NR2: NR2A-B tiene una secuencia de 600 aminoácidos; mientras que NR2C-D, la secuencia es más corta (Traynelis et al., 2010). En general, las subunidades NR2 tienen el CTD más extenso (figura 1).

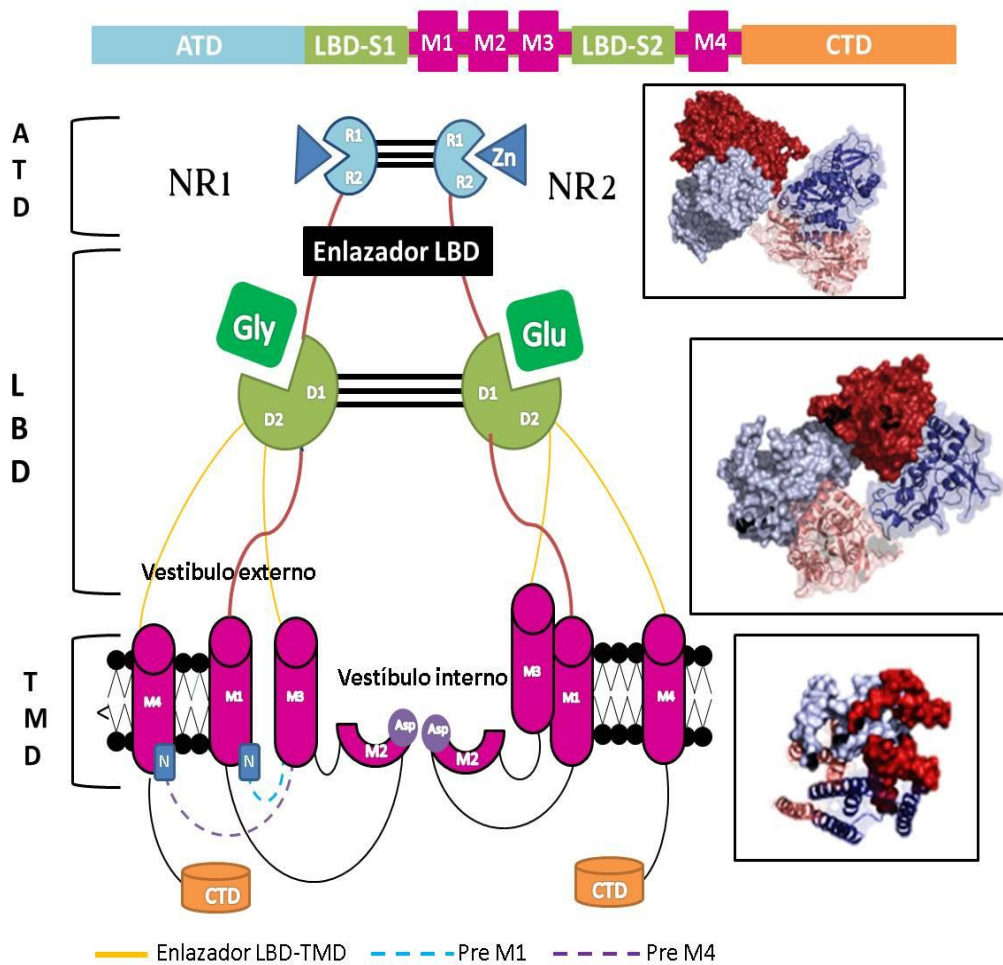


Figura 1. Dominios de los receptores NMDA. En la parte superior se muestra una representación gráfica de la ubicación de los dominios en la membrana plasmática de la célula. El siguiente esquema es una adaptación de Flores-Soto et al., 2012 con el objetivo de mostrar la conformación espacial de cada dominio, al mismo tiempo de lado izquierdo se muestra la estructura cristalina de cada dominio realizada por Regan et al., 2015.

ELECTROFISIOLOGÍA DEL NMDAR

Cinética del canal

A pesar de la sustancial similitud estructural entre los iGluR, los receptores NMDA tienen una serie de características funcionales distintivas, que se relacionan directamente con las funciones fisiológicas únicas del receptor (Iacobucci y Popescu, 2018). Se activa por la unión simultánea de glicina en dominio LBD de NR1 y de glutamato en el dominio LBD de NR2.

NMDAR tienen una alta conductancia, para canal único de 30–50 pS, con una alta permeabilidad al Ca^{2+} . Las corrientes NMDA aumentan lentamente y después se desactivan (Lester y Jahr, 1992; Blake y VanDongen, 2009; Zito y Scheuss, 2009; Salazar, 2010; Iacobucci y Popescu, 2017).

En la membrana postsináptica se encuentran receptores AMPA y NMDA. En un evento sináptico, al inicio, el canal AMPA se encuentra cerrado y el NMDA está bloqueado por Mg^{2+} (potencial de membrana en reposo). Ambos se activan por Glu y se produce una corriente sináptica excitatoria (EPSC). La EPSC puede ser descrita por dos fases. Sin embargo, su cinética es diferente: AMPA se activa y desactiva rápidamente, al abrirse el canal se despolariza la postsinapsis y obliga a que el Mg^{2+} salga del canal NMDA (se desbloquea) y se produce la corriente NMDA que es más lenta (Figura 2).

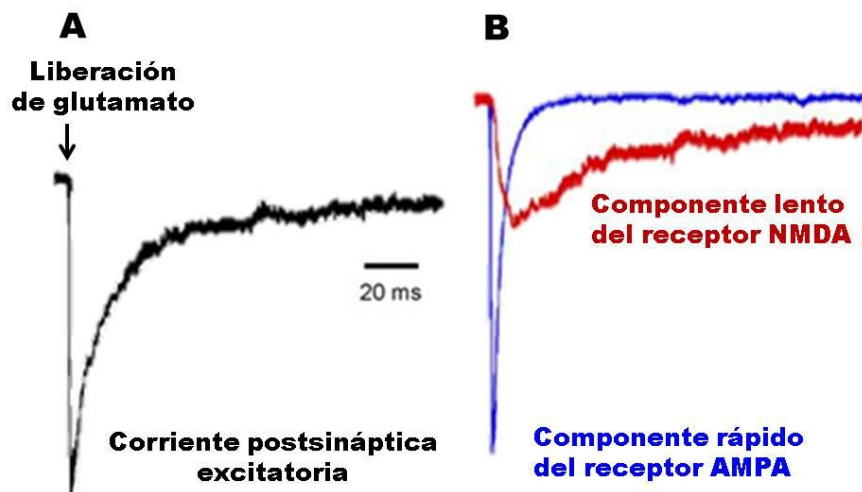


Figura 2. Corrientes sinápticas. (A) corriente sináptica excitatoria (EPSC). (B) corriente rápida AMPA y corriente lenta NMDA. Se observa que la corriente AMPA se activa antes que la NMDA.

En interneuronas de tamaño medio del neuroestriado se realizaron experimentos dosis respuesta. La corriente NMDA con respecto a la concentración del agonista

NMDA en concentraciones de: 1000, 200, 100, 50, 10 y 1 μM , puede verse en la (figura 3A). La amplitud de la corriente va disminuyendo conforme disminuye la concentración. Se trata de una corriente entrante, mayoritariamente de Ca^{2+} , lenta y de gran duración. Cuando se aplica el antagonista 2-amino-fosfonovalerato (AP5, 50 μM) se observa una reducción de la corriente (Figura 3B) (Flores-Hernández, 2002).

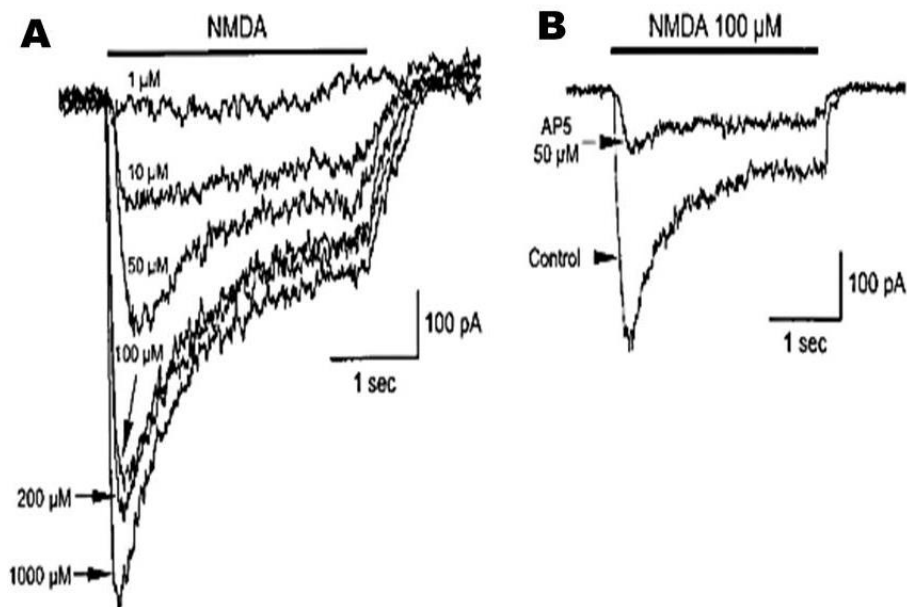


Figura 3. Registro de INMDA en neurona de neuroestriado, experimentos libres de Mg^{2+} . (A) Respuesta de la corriente según la concentración de NMDA, aplicada durante el tiempo de la barra superior. (B) Efecto del antagonista AP5, se observa una notoria reducción. Voltaje de mantenimiento -40 mV (Flores-Hernández, et al., 2002).

A partir de las corrientes AMPA y NMDA se genera el potencial postsináptico excitatorio (EPSP). La cinética de este potencial cambia con el potencial de membrana. En valores negativos y de reposo se registra un EPSP con una despolarización y repolarización rápida, debido a la corriente AMPA; la corriente NMDA se encuentra bloqueada. A potenciales menos negativos (por ejemplo, -40 mV) la despolarización es menos rápida y la repolarización se vuelve lenta y se sostiene; esto se debe a la acción de AMPA y es patente la corriente NMDA (Figura 4).

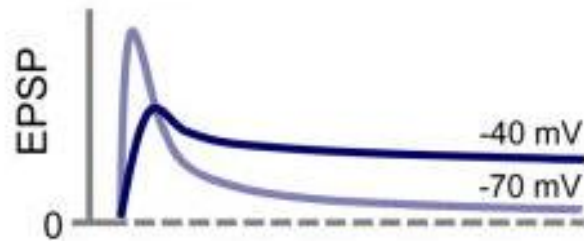


Figura 4. Potenciales postsinápticos. Se pueden observar dos EPSP, uno a -70 mV que es rápido y con una amplitud mayor, comparada con el trazo a -40 mV que es lento debido a la corriente NMDA.

La amplitud de la corriente NMDA es dependiente de voltaje: a valores negativos el canal está bloqueado por Mg^{2+} ; por ejemplo, a -80 mV no se produce corriente; de -70 a -50 mV la corriente es pequeña; el pico de corriente se produce alrededor de -30 mV. La curva corriente-voltaje (I-V) que se genera es no lineal (Figura 5).

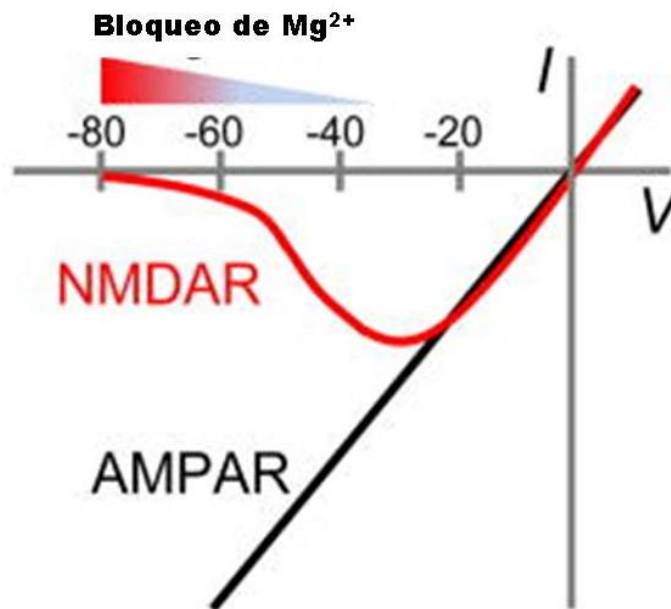


Figura 5. Comparación de la relación corriente-voltaje entre AMPAR y NMDAR. Los NMDAR exhiben una región característica de pendiente negativa de aproximadamente -70 a -35 mV donde se observa el pico máximo. A valores más negativos el canal es bloqueado por Mg^{2+} , parte roja del triángulo esquemático superior. La curva I-V para AMPA es lineal (Hunt y Castillo, 2012).

La corriente NMDA se ve afectada por la composición de las subunidades NR1, NR2 o NR3; cada subtipo, muestra comportamientos cinéticos distintos: desde la activación hasta la fase de decaimiento. Incluso la afinidad a los diferentes agonistas produce cinéticas diferentes. Otro aspecto que ha sido estudiado, es la gran variedad de moduladores endógenos a los que este receptor es sensible, generalmente moléculas pequeñas o iones, algunas como H^+ y Zn^{2+} , presentes endógenamente en el SNC; actúan como moduladores alostéricos (Jahr y Stevens, 1990; Kussius y Popescu., 2009; Iacobucci y Popescu, 2018; Hunt y Castillo, 2012).

Bloqueo de NMDAR por Mg^{2+}

El bloqueo por Mg^{2+} es uno de los rasgos más característicos de la compleja regulación de NMDAR; es un factor que restringe la permeabilidad de Ca^{2+} . En potenciales de reposo, limita el impacto en la señalización neuronal. Desde los primeros estudios del receptor NMDA revelaron un fuerte bloque dependiente del voltaje por concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} . Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, la activación de NMDAR requiere simultáneamente de la liberación presináptica de glutamato y de la despolarización postsináptica. Es esta característica la que ha permitido usar este bloqueo como blanco de diferentes fármacos, ejemplo de esto son la memantina y la amantadina, utilizadas principalmente para tratar una amplia gama de trastornos neurológico. Estos fármacos ingresan al canal abierto y se unen al sitio de bloqueo ubicado dentro del poro (Johnson et al., 2015; Sobolevsky y Yelshansky ,2000; Flores-Soto et al. 2012; Espinosa y Kavalali, 2009).

A potenciales de membrana en reposo, los iones de externos de Mg^{2+} entran al poro del canal en concentraciones micromolares debido a la fuerza electromotriz interna. El Mg^{2+} se unen fuertemente al poro del canal y evitan la permeación de los iones de Ca^{2+} (Iacobucci y Popescu, 2018; Blake y VanDongen, 2009; Salazar, 2010). La figura 6A, muestra el efecto del Mg^{2+} en el EPSP. En preparaciones con Mg^{2+} a potenciales de -60 mV el EPSP presenta una repolarización más lenta comparado con los registros realizados a potenciales menos negativos, incluso positivos. En preparaciones libres de Mg^{2+} los EPSP registrados en cualquier potencial son prácticamente iguales. En la figura 6B, se muestran los registros en canal único. En todos los casos la preparación tiene NMDA y glicina (Gly) para abrir el canal. En un caso, en el trazo superior, se registra la apertura el canal, con una duración grande. En los trazo intermedio se agrega Mg^{2+} ; se observa el cierre del canal. En el trazo inferior, se tienen las dos condiciones para su comparación.

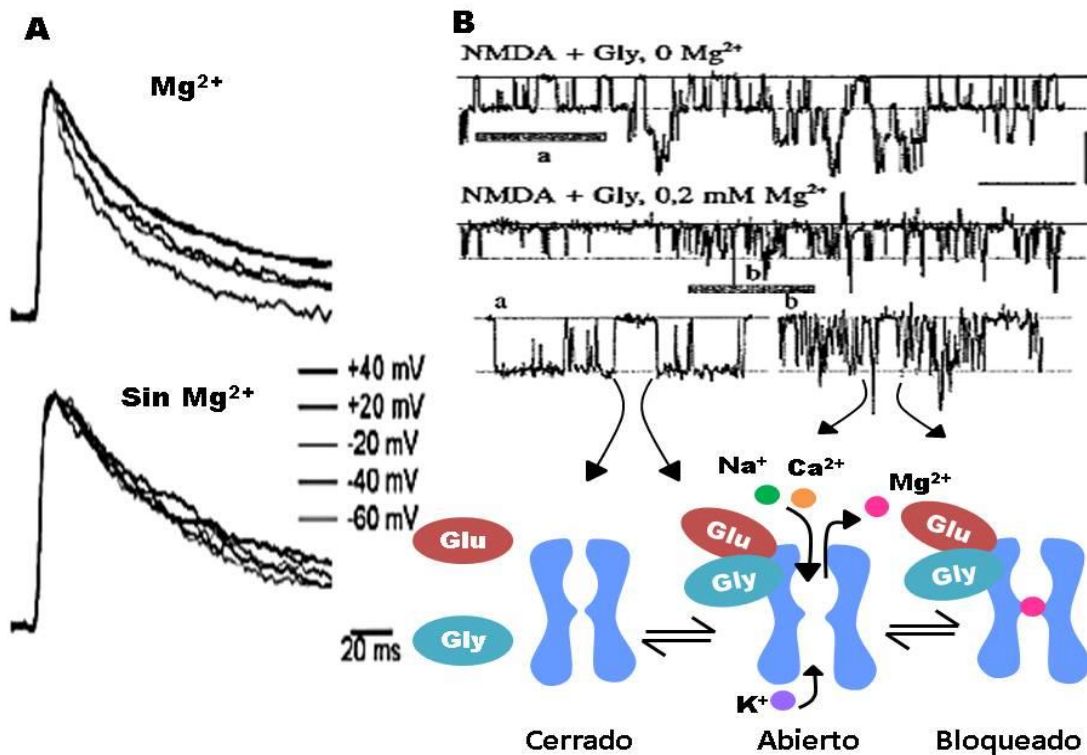


Figura 6. Relación entre voltaje y Mg^{2+} en la actividad del receptor NMDA. (A) superposición de EPSP durante 1ms de aplicación de 1 mM de glutamato y 1 μ M de Mg^{2+} a diferentes potenciales de membrana (Kampa et al., 2004). B) los registros muestran las transiciones entre aperturas y cierres de canales registrados con la técnica de patch-clamp de neurona del hipocampo en cultivo. Los fragmentos de registros indicados como a y b se muestran a mayor escala temporal en la parte inferior. Obsérvese como, en presencia de Mg^{2+} , las aperturas se ven interrumpidas frecuentemente. Esto se explica por la entrada y salida de los iones Mg^{2+} del canal, bloqueando transitoriamente la permeabilidad al Ca^{2+} , según se muestra en el esquema.

Las subunidades NR2 son las encargadas de las propiedades biofísicas del receptor. El sensor del potencial de membrana es dependiente del subtipo; por ejemplo, se sabe que tanto NR1/NR2A y NR1/NR2B son bloqueados fuertemente por Mg^{2+} , por lo tanto, necesitan de un potencial de membrana más alto que las subunidades NR2C y NR2D. Esta propiedad se debe a elementos estructurales; el determinante principal parece ser un residuo de serina para el caso de NR2A y NR2B, y una leucina en NR2C/ NR2D, ubicado en la hélice transmembrana M3 (Sobolevsky y Yelshansky, 2000; Paoletti, 2011; Hansen et al, 2018).

Desactivación

Entre las propiedades que caracterizan a los receptores NMDA, el curso de tiempo de desactivación de la corriente es crucial para la transmisión sináptica porque subyace a la cinética de las EPSC de NMDA (Vicini et al., 1998; Jahr y Stevens, 1990). Esta propiedad se debe en gran medida a la composición del receptor, específicamente el tipo de subunidad NR2 que forma el receptor (Figura 7). La subunidad NR1 no participa en la desactivación (Jahr y Stevens, 1990; Paoletti, 2011; Salazar, 2010). La desactivación empieza al momento que el agonista es removido.

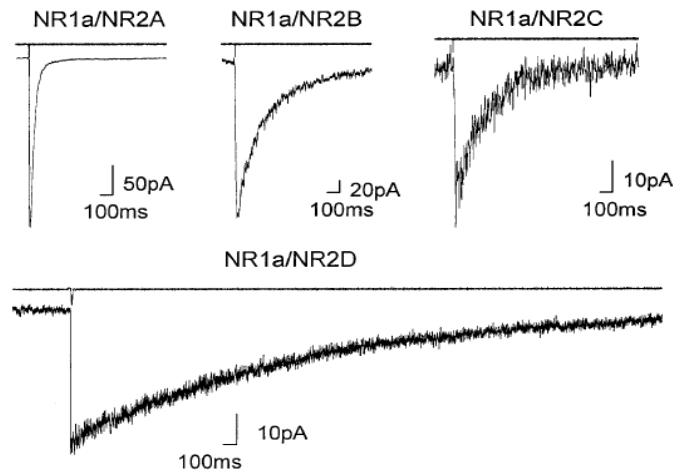


Figura 7. Tiempos de desactivación dependientes de las distintas subunidades NR2. Registros de la cinética de desactivación en células transfectadas HEK generado por la aplicación de glutamato (1mM; 1 ms). La subunidad NR2A tiene la cinética de desactivación más rápida (54 ms), seguida por NR2C y NR2B (280-360 ms) y por último NR2D (-1700ms) (Vicini et al., 1998).

Desensibilización del NMDAR

La desensibilización se refiere al proceso reversible de adaptación, en donde la respuesta celular es reducida ante la presencia de un estímulo prolongado, esto quiere decir, que el canal ya no conduce iones, pero el neurotransmisor permanece unido (Salazar, 2010). Este proceso representa una forma natural de suprimir la actividad de iGluR y así proteger a las neuronas de la entrada excesiva de calcio que produciría excitotoxicidad (Sobolevsky, 2015).

En presencia continua de Glu, la respuesta del receptor disminuye de manera dependiente del tiempo, debido a un acoplamiento alostérico negativo entre los sitios de unión de Glu y de glicina. Según este modelo, la desensibilización

conduce a la ruptura de la interfaz D1-D1; el lóbulo D2 y sus uniones al canal iónico adoptan una conformación similar a un estado cerrado (Sobolevsky, 2015).

Para este receptor, se han descrito otras formas de desensibilización: (1) la dependiente de Ca^{2+} denominada inactivación dependiente de Ca^{2+} . La magnitud de este tipo de desensibilización depende de los diferentes subtipos de NR2; es mayor cuando el NMDAR tiene NR2A y es limitada cuando está formado con NR2C o NR2B (Dingledine et al, 1999). Mutantes con carencia de ATD en la subunidad NR1, elimina la desensibilización dependiente de calcio (Sobolevsky, 2015; Hansen et al., 2018). (2) la dependiente de Zn^{2+} , los datos cristalográficos sugieren un mecanismo de modulación, que implica un cambio en el ángulo entre los dos lóbulo R1-R2, además de movimientos de torsión en ATD que favorece al cierre del canal (Hansen et al., 2018).

El NMDAR en la frecuencia de potenciales de acción (PA)

En neuronas dopaminérgicas se registran dos modos electrofisiológicos de actividad: baja y alta frecuencia de disparos de PA. La alta frecuencia se debe a la activación de NMDAR; la baja frecuencia se debe a la activación de AMPA (Ha y Kuznetsov, 2013). Los NMDAR localizados en el soma producen un aumento en la frecuencia de manera más efectiva que los localizados en las dendritas distales. El análisis matemático por sistemas dinámicos confirma que la dependencia de voltaje no lineal para el bloqueo de Mg^{2+} del NMDAR determina su capacidad para elevar la frecuencia de disparo. Esta capacidad parece estar relacionada con una disminución en la amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} . En cambio, un aumento en la amplitud de estas oscilaciones activaría canales de K^+ activados por Ca^{2+} (KCa) y frenaría la frecuencia de disparo. La aplicación ionotrópica de glutamato en neuronas dopaminérgicas activa al NMDAR y produce un aumento en la frecuencia de PA (Overton y Clark, 1992). El NMDA aplicado a neuronas dopaminérgicas induce disparo en ráfagas como se muestra en la figura 8 (Johnson et al., 1992)

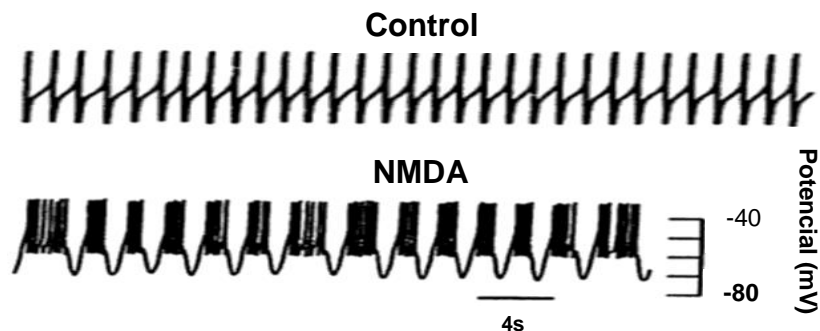


Figura 8. Efecto del NMDA en neuronas dopaminérgicas. Se observa cómo la aplicación de NMDA genera ráfagas de PA de alta frecuencia (Johnson et al., 1992).

La activación del NMDAR es necesaria para la generación de ráfagas de alta frecuencia. Al aplicar glutamato, se activa este receptor y aparecen las ráfagas. En este proceso no intervienen los receptores AMPA, como se demuestra que al aplicar un antagonista competitivo para este receptor (NBQX), la frecuencia no se bloquea, en cambio un antagonista no competitivo para NMDAR (MK-801), disminuye la frecuencia de disparo, como se observa en la figura 9 (Deister et al., 2009).

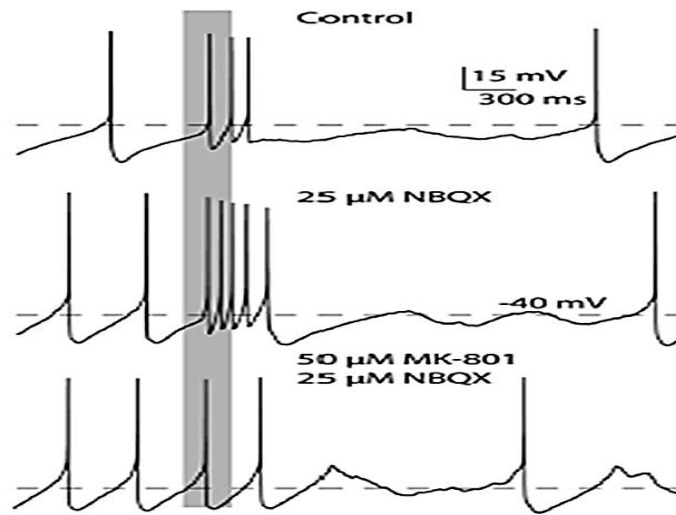


Figura 9. Activación del NMDAR por glutamato. La barra corresponde a la aplicación ionofórica de glutamato. El trazo superior muestra la generación de ráfagas después por la activación del receptor por glutamato. El trazo medio, muestra como el antagonista para AMPA (NBQX) no frena la ráfaga. Abajo, se observa el efecto del antagonista para NMDAR, donde se bloquea la activación de alta frecuencia (Deister et al., 2009).

Ha y Kuznetsov (2013) desarrollaron un modelo de neurona dopaminérgica. El estudio de la activación del NMDAR por NMDA muestra un aumento en la frecuencia de PA. La aplicación solamente en el soma ($g_{NMDA} = 26 \text{ mS/cm}^2$) produce una frecuencia de 25 Hz. Cuando se aplica globalmente (misma conductancia), aumenta más la frecuencia. Una excesiva aplicación de NMDA, bloquea la frecuencia (Figura 10). El modelo de neuronas dopaminérgicas desarrollado por Zakharov et al. (2016), muestra también un incremento en la frecuencia de PA debido a la activación del NMDAR.

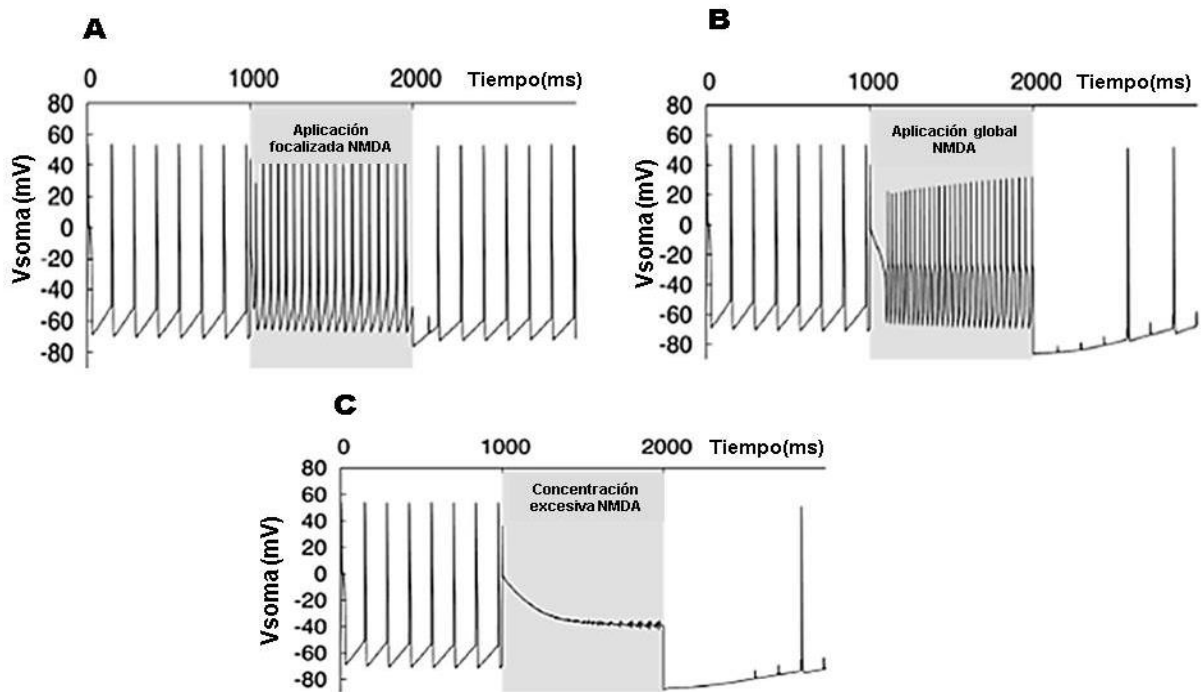


Figura 10. Efecto de aplicar NMDA en un modelo. (A) aplicación focalizada en el soma. (B) aplicación global. (C) excesiva concentración de NMDA. Se observa cómo aumenta la frecuencia de PA y un bloqueo en el último caso (Ha y Kuznetsov, 2013).

Modulación extracelular del NMDAR

Modulación de NMDAR por protones

Los NMDAR son inhibidos tónicamente por los protones a un pH fisiológico, por lo tanto, están preparados para responder a pequeños cambios del pH extracelular que puede ocurrir al momento de la liberación del contenido vesicular o al movimiento de protones a través de la membrana plasmática mediante bombas (Mony et al., 2009; Hansen et al., 2018). La actividad de los protones extracelulares inhibe la función de este receptor, la cual puede ser total al atraparlos en un estado cerrado, actuando de manera independiente del voltaje y sin cambiar la sensibilidad a los agonistas (Mony et al., 2009; Paoletti, 2011).

Modulación del NMDAR por zinc

El Zn^{2+} se encuentra en las vesículas sinápticas en muchas sinapsis glutamatérgicas, es considerado modulador de los NMDAR. Esta modulación implica un cambio en el ángulo entre los lóbulos R1-R2 del dominio LBD, promoviendo un cierre del canal (Mony et al., 2009). A concentraciones altas el

Zn²⁺ puede llegar a producir un bloqueo de canales dependientes del voltaje, sin embargo esto aún no se encuentra claro (Hansen et al., 2018).

Modulación del NMDAR por poliaminas

Poliaminas endógenas como espermidina, espermina y putrescina, liberadas por las células son moduladores del NMDAR (Paoletti, 2011). En el SNC la espermina puede ser liberada por las neuronas o células gliales. El efecto es un bloqueo dependiente de voltaje, se ha descrito este comportamiento parecido al bloqueo de Mg²⁺, comparte un sitio de unión en la profundidad del poro del canal (Jin et al., 2008). El segundo efecto es una potenciación dependiente de glicina, el cual solo ocurre en receptores que contiene la subunidad NR2A y NR2B y es capaz de aumentar la afinidad de glicina hasta 3 veces aproximadamente y produce una disminución en la tasa de disociación de glicina con su sitio de unión en NR1 (Mony et al., 2009; Paoletti, 2011).

Modulación del NMDAR por Neuroesteroides

Se sabe que existen varios neuroesteroides endógenos que modulan positiva o negativamente la actividad del receptor NMDA, aunque las acciones de estas moléculas son complejas (Hansen et al., 2018). Los neuroesteroides endógenos actúan localmente y producen efectos sobre la excitabilidad neuronal. El colesterol modula la función del receptor y su eliminación inhibe la actividad del receptor NMDA, lo que sugiere que el entorno de la membrana influye en la actividad del receptor NMDA y puede ser un determinante importante de la acción neuroesteroides (Mony et al., 2009; Hansen et al., 2018).

Modulación intracelular del NMDAR

La fosforilación es un mecanismo regulador importante que subyace a la respuesta de los NMDAR a los agonistas; generalmente, se potencian después de la fosforilación causada por proteínas quinasas C (PKC), proteínas quinasas A (PKA) y proteínas quinasas II dependientes de calcio-calmodulina (CaMKII) (Dingledine et al. 1999; Zito-Scheuss, 2009). La fosforilación directa se identifica como un mecanismo clave que regula la función del canal y la localización del receptor en la sinapsis (Chen y Roche, 2007). En la mayoría de los casos la fosforilación sucede por PKC o PKA y es más pronunciado en las subunidades NR1 y NR2. PKC reduce la afinidad por los iones de Mg²⁺ aumentando la probabilidad de apertura del canal (Dingledine et al. 1999; Zito y Scheuss, 2009).

NMDAR Y LA PLASTICIDAD NEURONAL

La plasticidad sináptica se refiere a la capacidad de modificar la eficacia del estímulo sináptico. Existen muchas formas de plasticidad neuronal; existen las de duración corta conocidas como *short synaptic transmission* (SST) y se encuentran

las que tienen una duración más larga, mejor conocida como *long term potentiation* (LTP).

La LTP y la depresión a largo plazo (LTD) son formas de plasticidad sináptica que juegan un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria (Akhondzadeh, 1999). En la década de 1980, se encontró que NMDAR está involucrado en la generación de LTP en el hipocampo. En la región CA1, del hipocampo, la LTP suele ser inducida por estímulos de alta frecuencia de las fibras glutamatérgica excitadoras y se manifiesta como un aumento en la fuerza sináptica que dura desde horas hasta días (Akhondzadeh, 1999; Li et al., 2007; Volianskis et al., 2015).

PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON NMDAR

Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es considerada una enfermedad neurodegenerativa relacionada con la edad. Según la Organización Mundial de la Salud, esta enfermedad es la principal causa de demencia que representa del 60 al 70 por ciento de los casos. La fisiopatología incluye anomalías tanto estructurales como funcionales: aparición de placas seniles A β y ovillos neurofibrilares que contienen proteína tau fosforilada, lo que llega a generar un disfunción cognitiva global, con cambios en el comportamiento, la personalidad y especialmente pérdida de memoria (Zhang, et al., 2016; Wang y Reddy, 2017). La participación del NMDAR en esta patología a ha sido relacionada con aumento en el flujo Ca²⁺ por el canal por sobre liberación de glutamato causando excitotoxicidad que genera una pérdida gradual de la función sináptica y la muerte neuronal, subyacente a la neurodegeneración por EA (Wang y Reddy, 2017). Otro factor importante de esta patología es que la excitotoxicidad inducida por el glutamato aumenta la expresión de tau, así como su fosforilación. Recientemente se ha reportado que la activación de NMDAR extrasinápticas induce una sobre expresión de esta proteína junto con una degeneración neuronal simultánea y disminución de la supervivencia neuronal (Liu et al., 2019).

Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico, caracterizado por síntomas motores y no motores. Las manifestaciones clínicas típicas de la EP son las alteraciones del control motor, como temblor, rigidez muscular y bradicinesia (movimientos no voluntarios).

La fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP) está relacionada con una degeneración generalizada de las neuronas liberadoras de dopamina de la sustancia Nigra compacta (SNpc). La degeneración de la vía dopaminérgicas

nigroestriatal conduce a cambios morfológicos y funcionales significativos en los circuitos neuronales del estriado, incluidas las modificaciones de la arquitectura sináptica glutamatérgica corticoestriatal y la consiguiente pérdida de la plasticidad sináptica estriatal (Petralia et al., 2009; Gardoni y Bellone, 2015).

Los desequilibrios entre la vía directa e indirecta se han indicado como un evento importante subyacente a los déficits motores observados en la EP. La composición de NMDAR en las sinapsis de la neurona espinosa mediana (NEM); la reducción de NR2B y el aumento dramático de NR2A causan una modificación de la arquitectura sináptica glutamatérgica con la consiguiente pérdida de la plasticidad sináptica estriatal (Petralia et al., 2009; Gardoni y Bellone, 2015).

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo hereditario, autosómica dominante que afecta a la proteína huntingtina (htt) (Fernandes y Raymond, 2009). En condiciones patológicas, esta proteína genera una variedad de alteraciones motoras que se caracterizan en su mayoría con movimiento involuntarios de corea (Nopoulos, 2016). Se ha reportado que la proteína htt mutada afecta la activación del NMDAR generando neurotoxicidad por la vía apoptótica (Fernandes y Raymond, 2009).

SIMULADORES COMPUTACIONALES PARA NMDAR

Modelo para NMDAR de Keller et al.

Se trata de un modelo computacional desarrollado por Keller et al. (2017). De acuerdo con los autores, el Enfoque de este modelo computacional constituye una herramienta complementaria para investigar las propiedades de los sistemas biológicos basados en el conocimiento proporcionado por los experimentos de laboratorio. Es un modelo cinético basado en cadenas de Markov para cada subtipo NMDAR, capaz de reproducir varios resultados experimentales. Los modelos de receptores y sinápsis fueron implementadas y validadas usando RHENOMS®, y LibRoarunner. Los modelos de células y redes en NEURON. Se usó una computadora con procesador dual XEON. Este modelo fue desarrollado para fines de investigación, no se encuentra disponible en Internet.

Modelo para NMDAR de Singh et al.

Los autores crearon un modelo estocástico de señalización glutamatérgica en una espina dendrítica para estudiar diferencias la activación en diferentes subtipos NMDAR en varias condiciones fisiológicas en resoluciones temporales y espaciales que son difíciles de obtener experimentalmente. Para este propósito se usó el programa Smoldyn® versión 1.84, un simulador estocástico espacial, para redes bioquímicas. El objetivo fue examinar cómo el subtipo NMDAR y el

contenido NMDAR general de la espina dendrítica pueden afectar la extensión y la confiabilidad de la transmisión sináptica. Además, se determinó cómo las propiedades únicas de activación entre los subtipos NMDAR crean distintos patrones de activación entre sinapsis con composiciones diferentes. El modelo se implementó para propósitos de la investigación de los autores (Singh et al., 2011) y no está disponible en Internet.

Simulador NMDAR de Chen

El modelo apoya la hipótesis de que la cinética de los receptores NMDA para dos composiciones de subunidades diferentes: NR2A y NR2B. La respuesta depende de la duración de la aplicación del agonista. El simulador se desarrolló en NEURON como un módulo independiente que reproduce los registros experimentales de los autores (Figura 11A y B). Está disponible en Internet de manera gratuita. http://sim.neuroinf.jp/modules/xoonips/detail.php?item_id=292

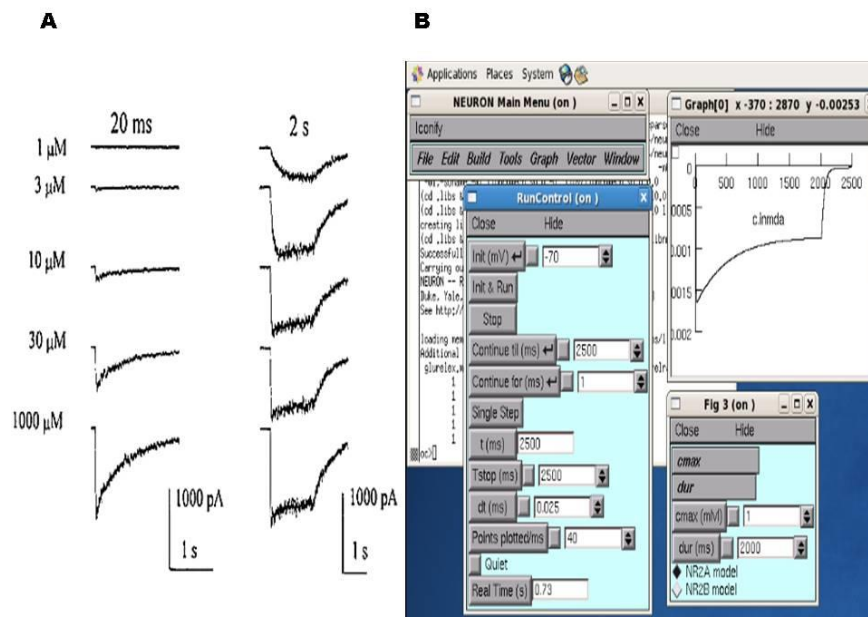


Figura 11. Simulador de Chen. (A) módulo de NEURON para reproducir estos experimentos (B) resultados experimentales: corriente NMDA dependiente de la concentración del agonista (mM) y del tiempo (Chen, 2001).

JUSTIFICACIÓN

Desde su descubrimiento los receptores NMDA son considerados elementos cruciales para el entendimiento de los circuitos del sistema nervioso central. Están ligados a procesos importantes como el aprendizaje y la memoria, muestran características únicas entre los iGluR, empezando por el doble ligando para su activación: glutamato y glicina, la despolarización de membrana, seguida por una actividad retardada y un bloqueo de magnesio dependiente de voltaje. Además de esto, muestran una cinética diferente dependiente de su composición estructural, siendo la subunidad NR2 el principal factor dependiente, generando así, una mayor complejidad a la actividad de este receptor. La complejidad aumenta si se estudia el ambiente en el que están inmersos, pequeñas moléculas endógenas como los protones (H^+) y el zinc modulan la actividad de este receptor. Se ha observado que cambios en el influjo de calcio, pH, entre otros pueden llegar a alterar la conductancia de estos receptores. Una sobre excitación por glutamato puede producir excitotoxicidad. Estas características, lo hacen un receptor muy interesante para su estudio en prácticas de laboratorio para licenciatura y los primeros cursos de posgrado. Sin embargo, las condiciones económicas cada vez más difíciles, impiden la enseñanza en laboratorios reales. Una alternativa para subsanar estas condiciones es el desarrollo de simuladores interactivos computacionales. Como alternativa, se han desarrollado algunos simuladores para la neurociencia, la fisiología y la biofísica, un ejemplo es el desarrollo de lenguajes especializados como NEURON y Genesis que están disponibles en Internet de forma gratuita; con ellos se han desarrollado algunos módulos para la enseñanza, sin embargo, la mayoría son para la investigación y están destinados a modelos para resultados experimentales y no para la enseñanza.

Para llegar a comprender como funciona este receptor se han introducido diferentes modelos para su estudio, que van desde lo biológico, molecular hasta computacionales. Estos últimos son una forma de estudio muy útil y de vanguardia, que combinan los conocimientos proporcionados por la experimentación y el modelado matemático. Con los datos experimentales se pueden desarrollar simuladores de la actividad del receptor NMDA para el proceso de enseñanza-aprendizaje del tema.

OBJETIVOS

Objetivo General

Diseñar y desarrollar un simulador de una neurona simulada con NMDAR para la enseñanza-aprendizaje de sus propiedades electrofisiológicas.

Objetivos Particulares

- Desarrollar un modelo unicompartmental con las corrientes dependientes de voltaje para Na^+ y el K^+ , y el receptor NMDA.
- Implementar los modelos matemáticos para estas corrientes de acuerdo con la descripción fenomenológica de Hodgkin y Huxley (1952).

- Desarrollar un simulador para experimentos virtuales en fijación de corriente.
- Desarrollar un simulador para experimentos virtuales en fijación de voltaje.
- Determinar los cambios intracelulares de la concentración de Ca^{2+} a partir de la corriente de Ca^{2+} producto de la activación del NMDAR a distintos voltajes de estímulo.
- Generar la curva I vs V en presencia y ausencia de Mg^{2+} .
- Desarrollar un simulador para experimentos virtuales en configuración de canal único (Patch clamp) del NMDAR en ausencia y presencia de Mg^{2+} .

METODOLOGÍA

Se diseñaron y desarrollaron tres simuladores interactivos para el estudio y aprendizaje de las características electrofisiológicas del receptor NMDA. Se implementaron tres condiciones experimentales: (1) fijación de corriente, (2) fijación de voltaje y (3) registro de canal único.

Para el simulador en fijación de corriente, se creó un modelo de un compartimiento con canales en la membrana de Na^+ , K^+ y NMDAR. Cada canal iónico fue modelado con ecuaciones diferenciales no lineales de acuerdo con Hodgkin y Huxley (1952) (ver anexo). El efecto de bloqueo del Mg^{2+} para el NMDAR fue modelado con una ecuación diferencial dependiente del voltaje. La determinación de la concentración intracelular del Ca^{2+} se realizó con una ecuación diferencial dependiente de la corriente de Ca^{2+} , con un coeficiente y constante de tiempo ajustados para reproducir los datos experimentales reportados en la literatura especializada.

Para el simulador de fijación de voltaje se implementó un modelo solo para NMDAR. Las ecuaciones diferenciales fueron las mismas que para el simulador anterior. Se resolvieron las ecuaciones con la siguiente condición (fijación de voltaje):

$$\frac{dV}{dt} = 0$$

El simulador para canal único se desarrolló utilizando un algoritmo computacional. Para las condiciones experimentales libre Mg^{2+} , las amplitudes de la corriente con respecto al voltaje fueron de tipo lineal, el tiempo de apertura del canal corresponde a canales no bloqueados. En condiciones con Mg^{2+} , el bloqueo en valores de voltaje negativos (menores a -50 mV) fue representado con menores amplitudes y cierre instantáneo del canal.

Para la solución de las ecuaciones diferenciales se usaron métodos numéricos. Todos los algoritmos matemáticos se implementaron en el lenguaje Visual Basic®

versión 6.0. Los sistemas de ecuaciones pueden consultarse en el anexo. La figura12 muestra el diagrama de flujo para los simuladores.

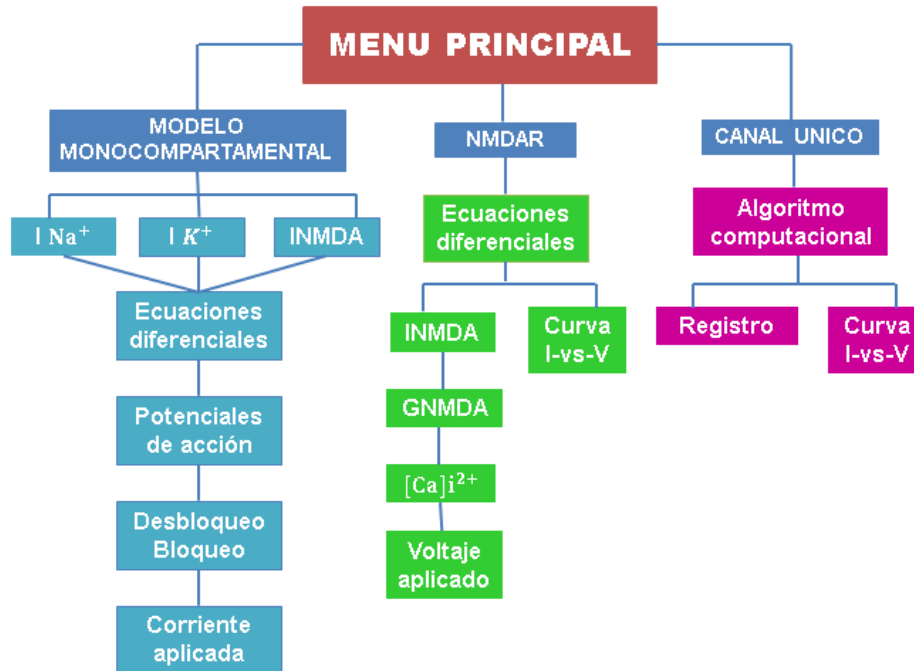


Figura 12. Diagrama de flujo para el desarrollo de los simuladores.El programa de cómputo cuenta con tres simuladores y un menú de lecciones para introducir al usuario en el tema. La figura 13, presenta el diagrama de flujo de las lecciones.

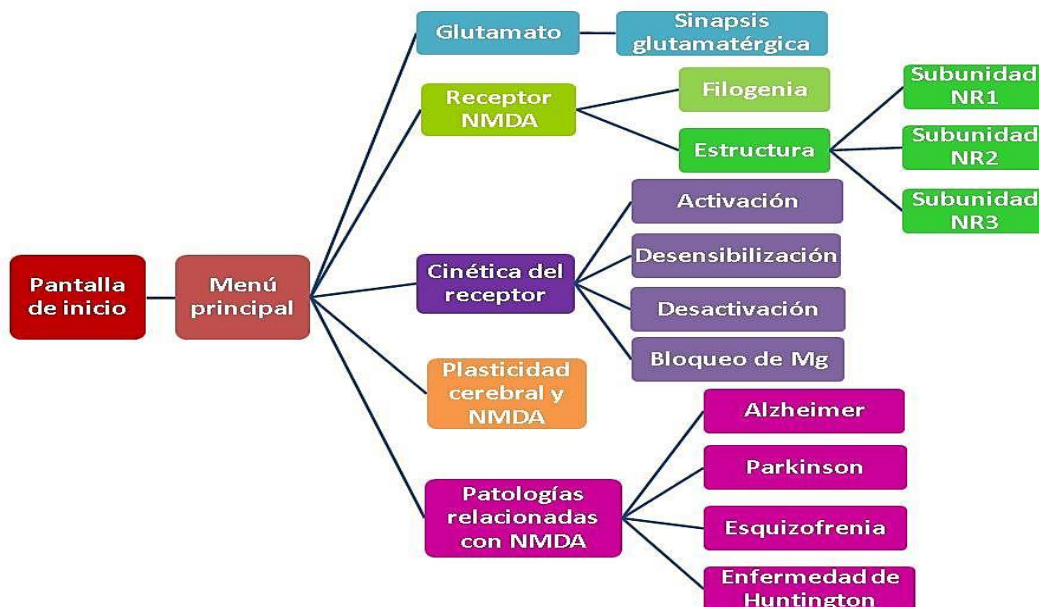


Figura 13. Diagrama de flujo para el desarrollo de las lecciones.

RESULTADOS

Se diseñó y desarrolló un programa computacional interactivo para la enseñanza-aprendizaje de las propiedades electrofisiológicas del NMDAR. Está formado por tres simuladores y un módulo de lecciones.

Interfaz de usuario: Menú principal

Al abrir el archivo NMDAR.exe, aparece la pantalla de interfaz donde se encuentra el menú principal formado por cuatro botones: «Fijación de corriente (Potenciales de acción)», «Fijación de voltaje », «Técnica de canal único», y «Leccionario» (Figura 14). El primer botón lleva al simulador para realizar experimentos virtuales en fijación de corriente (Figura 15).

Simulador de fijación de corriente (Modelo monocompartmental)

La interfaz de este simulador cuenta con tres osciloscopios: (1) para el registro de PA, (2) indicador de desbloqueo/bloqueo, (3) para el pulso de corriente de estímulo. Del lado derecho, muestra tres módulos: Módulo de estímulo, aquí el usuario ingresa la duración y amplitud de pulso de estímulo, Módulo canal NMDAR, aquí el usuario ingresa la conductancia máxima del canal (nS), el agonista NMDA (mM) y el Mg^{2+} (mM) que se aplica al experimento, y un módulo para elegir el color de los trazos registrados para poder comparar. A partir de los datos de entrada, se pueden realizar varios experimentos. En seguida se presentan algunos ejemplos de experimentos realizados con este simulador.

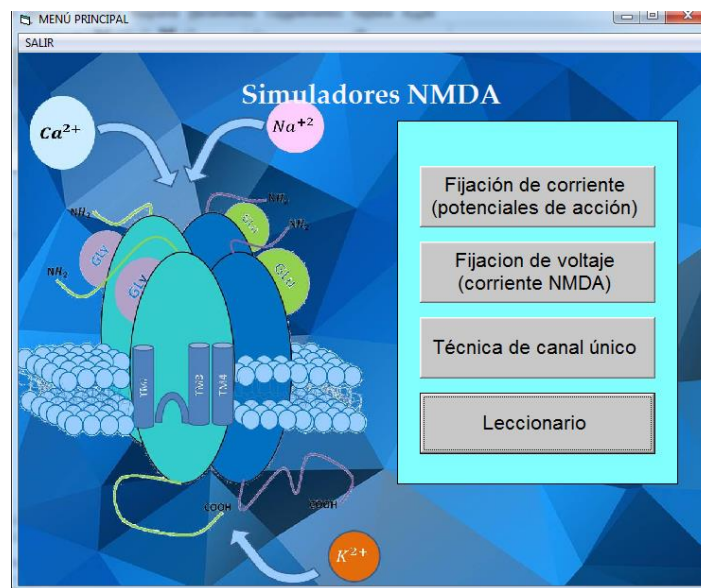


Figura 14. Pantalla del menú principal. Muestra los accesos hacia los distintos simuladores y al leccionario. El usuario puede navegar libremente en el programa o salir en el momento que lo desee.

Experimento 1: Condiciones control (Hodking – Huxley) para INMDA

En este caso, el usuario ingresa los datos del pulso de estímulo: 200 ms de duración y 10 nA de amplitud del estímulo. El módulo para NMDAR, se inicia con valores muy pequeños: 0.001 nM de NMDA, 0.001 gNMDA y $Mg^{2+} = 0$. En estas condiciones el modelo solamente resuelve las ecuaciones de Hodking y Huxley para las corrientes: I_{Na^+} e I_{K^+} y queda fuera la corriente NMDA. El resultado de la simulación se muestra en la figura 15. Se observa un tren de PA, se indica desbloqueado, pero no está activo el canal y el pulso de estímulo. Al tren de PA que se generó, será el control.

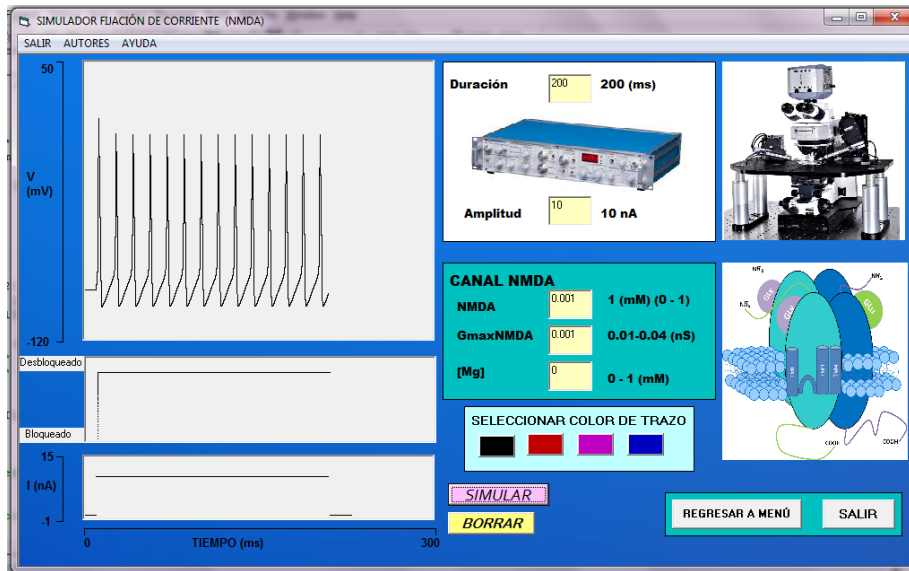


Figura. 15. Simulación control. Tren de PA generado con el modelo de Hodgkin y Huxley (1952). Los valores de default para NMDA lo eliminan.

Experimento 2: Desbloqueo del canal NMDA

El experimento se realizó en el modelo monocompartmental, con canales dependientes de voltaje de Na^+ , K^+ y NMDAR. En este caso, la conductancia del NMDA fue de 0.04 nS, y a la solución se le agregó NMDA = 5 mM y $Mg^{2+} = 1$ mM. La simulación muestra un aumento en la frecuencia de PA (Figura 16).

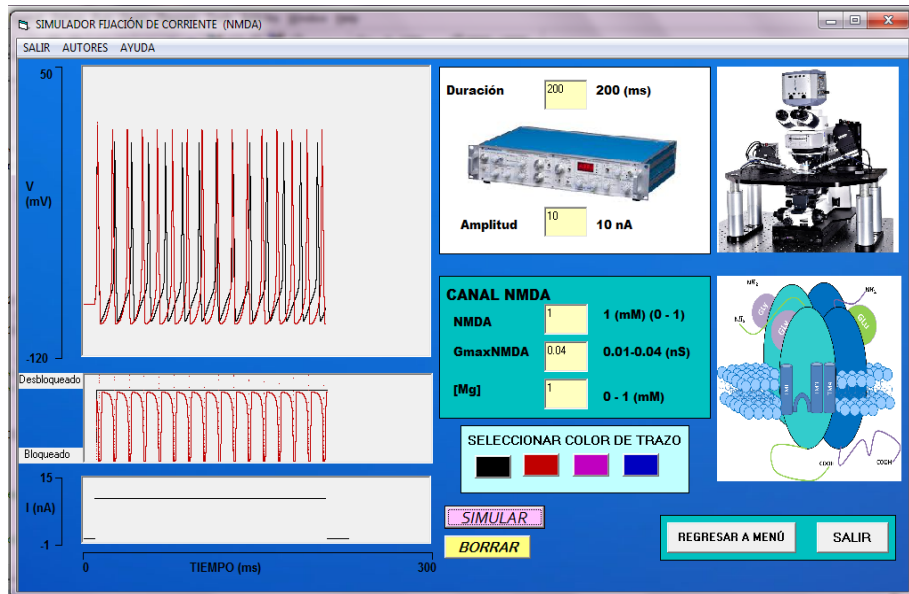


Figura 16. Simulación con el modelo monocompartamental. Las condiciones experimentales son: presencia de las corrientes I_{Na^+} , I_{K^+} e I_{NMDA} . Se ingresaron los siguientes datos: agonista NMDA = 1 mM, g_{NMDA} = 0.04 nS, Mg^{2+} = 1 mM. Se comparó el tren de PA control (trazo negro) contra estas nuevas condiciones. Se observa un aumento en la frecuencia de PA, resultado equivalente a los reportados experimentalmente (trazo rojo). El indicador desbloqueado/bloqueado muestra cómo el canal NMDA se bloquea cada vez el potencial de membrana de los PA se encuentra en valores de reposo.

Simulador para la fijación de voltaje

El simulador reproduce la corriente NMDA a diferentes voltajes de estímulo con la técnica de fijación de voltaje. La interfaz del simulador presenta cuatro osciloscopios: (1) registro de la corriente NMDA, (2) graficado de la conductancia máxima NMDA, (3) presentación de la concentración intracelular de Ca^{2+} y (4) pulso de estímulo. La interfaz cuenta con un módulo para el ingreso de los datos del voltaje fijado (-70 a 50 mV), y la concentración de Mg^{2+} aplicada (0 a 1 mM). Con este simulador el usuario puede realizar dos tipos de experimentos virtuales: en presencia o en ausencia de Mg^{2+} .

Experimento 1: Fijación de voltaje en ausencia de Mg^{2+}

Con el simulador, se pueden realizar experimentos con estímulos subsecuentes de fijación de voltaje, en pasos constantes, desde -70 a 50 mV. Con el cursor, el usuario mide el máximo valor de la corriente generada en cada estímulo. En su libreta de investigación realiza una tabla: voltaje aplicado y corriente máxima generada. La figura 17, muestra la interfaz y la simulación en ausencia de Mg^{2+} .

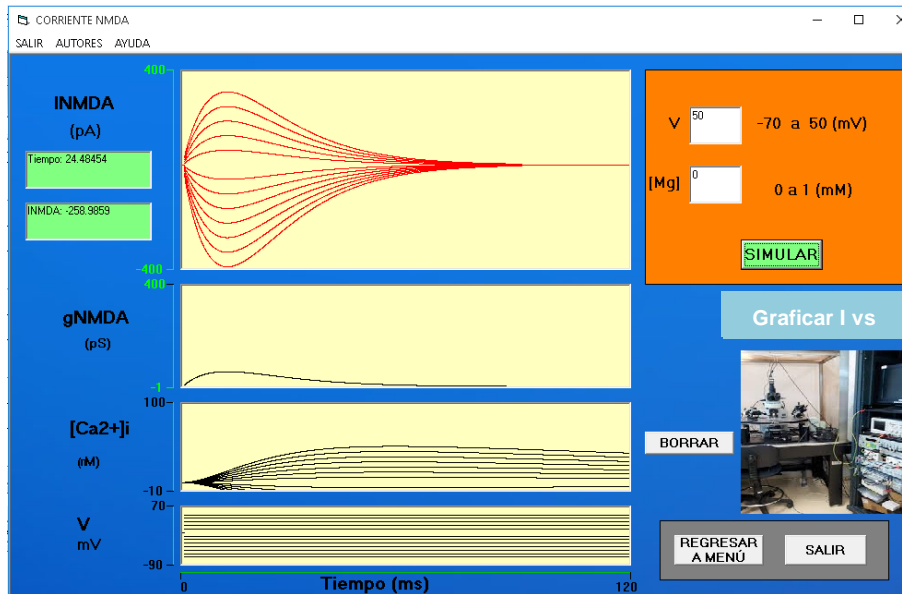


Figura 17. Interfaz y simulación de experimentos en fijación de voltaje. Simulación en ausencia de Mg^{2+} . En el osciloscopio superior, se muestran las corrientes generadas con estímulos desde -70 a 50 mV con pasos de 10 mV (osciloscopio inferior).

Con la tabla construida con los resultados experimentales, el usuario selecciona el botón <<Graficar (V-NMA)>>. Inmediatamente, se abre una interfaz para realizar la curva corriente -vs- voltaje (Figura 18). En las casillas de la izquierda, se ingresan los datos experimentales con el botón <<GRAFICAR>> se genera la curva I -vs- V. Se observa un proceso lineal en ausencia de Mg^{2+} .

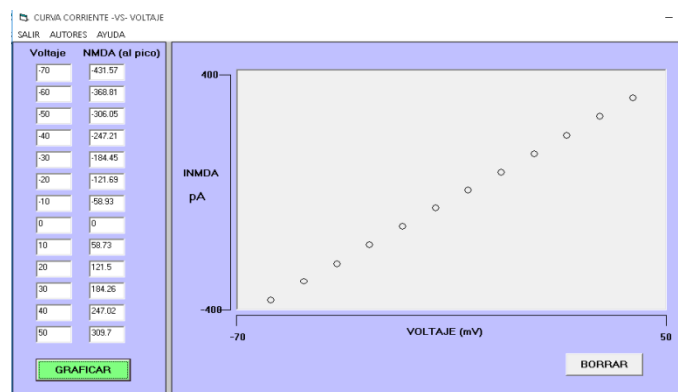


Figura 18. Curva corriente -vs- voltaje en ausencia de Mg^{2+} . Con los datos experimentales ingresados en las casillas se genera la curva. El comportamiento es lineal, el potencial de inversión fue de -3 mV.

Experimento 2: fijación de voltaje en presencia de Mg^{2+}

Este experimento se realizó en presencia de Mg^{2+} (1mM) y se generaron las corrientes NMDA de la misma manera que el experimento anterior (-70 a 50 mV con pasos de 10 mV). Se observa que en potenciales negativos menores a -50 mV, la corriente es nula, después aumenta hasta que se invierte (Figura 19). Estos cambios en la intensidad de la corriente se deben al bloqueo del canal por el Mg^{2+} en potenciales en el reposo (-70 mV). Cuando se realiza la curva I -vs- V, se observa un comportamiento no lineal debido al bloqueo (Figura 20).

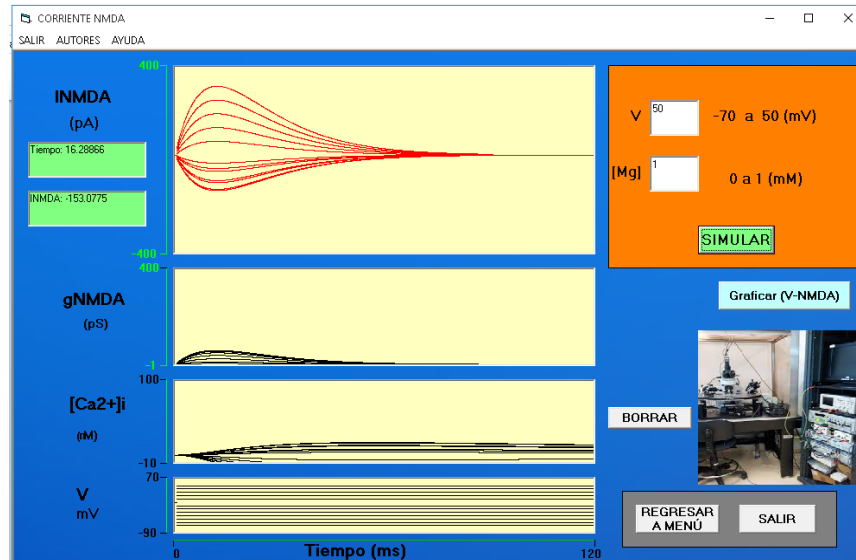


Figura 19. Simulación de experimento en presencia de Mg^{2+} . La corriente NMDA registrada muestra una asimetría entre los trazos generados en potenciales negativos con respecto a los generados con potenciales positivos (mediante la técnica de fijación de voltaje).

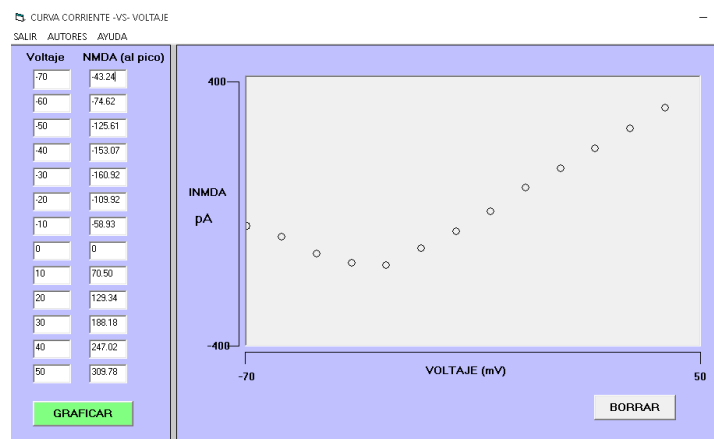


Figura 20. Grafica corriente vs voltaje en presencia de Mg^{2+} . La corriente NMDA se generó con voltaje de -70 a 50, en pasos de 10 (mV). En los recuadros

de lado izquierdo se ingresaron los datos experimentales. La curva muestra claramente cómo la amplitud de la corriente disminuye debido al bloqueo por Mg^{2+} .

Simulador de canal único

Para el simulador de registro de canal único se diseñó una interfaz que muestra en un osciloscopio la apertura de canal y una gráfica para la curva corriente –vs- voltaje.

Experimento 1: condiciones libre de Mg^{2+}

El usuario ingresa el valor del voltaje fijado. Con los valores ingresados se puede realizar el experimento para generar una curva I –vs- V . Se barren voltajes desde -70 a -50 en pasos de 10 (mV). En el eje de las abscisas se muestra el valor alcanzado para cada estímulo. En este simulador, la curva I –vs- V se genera automáticamente: se traza un círculo en cada caso. Cada vez que se oprime el botón <<SIMULAR>> se muestra la apertura del canal. La figura 20, muestra la simulación de experimentos en ausencia de Mg^{2+} (Figura 21).

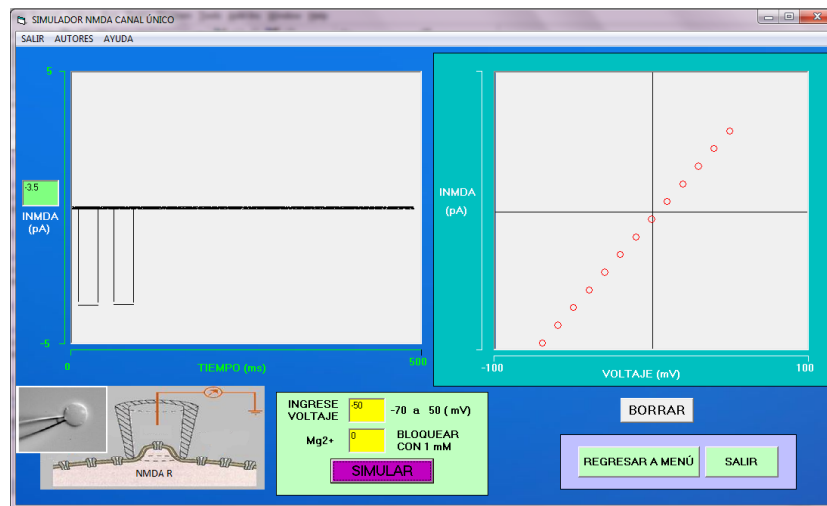


Figura 21. Experimentos en “patch clamp”. $[Mg^{2+}] = 0$. La curva I –vs- V es lineal. Obsérvese la duración de la apertura del canal.

Experimento 2: presencia de Mg^{2+}

La figura 22, muestra los resultados de los experimentos con la técnica de patch clamp. Se realizó una curva I –vs- V . Se estimuló con valores de -70 a 50, en pasos de 10 (mV). La curva resultante es no lineal debido al bloqueo del canal NMDA por el Mg^{2+} .

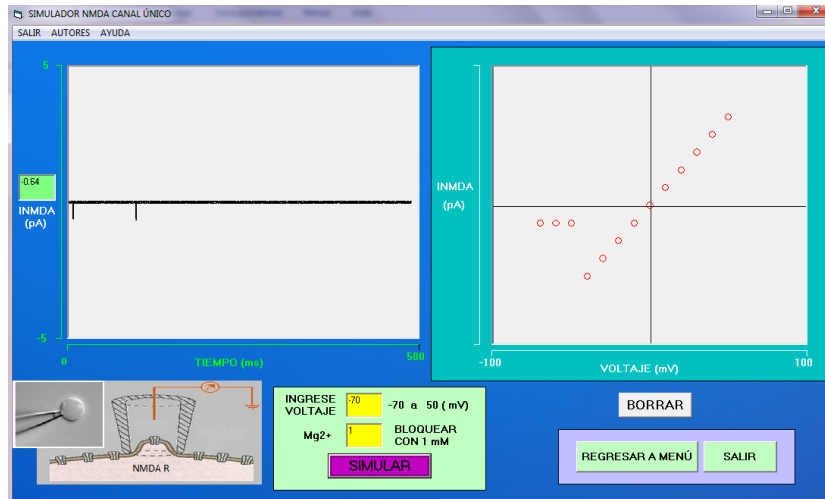


Figura 22. Experimento en presencia de Mg^{2+} . Se muestra una simulación con 1 mM de Mg^{2+} y un voltaje de estímulo de -70 mV. Se observa a los canales cerrados.

Leccionario NMDA

El programa de cómputo interactivo cuenta con unos módulos de lecciones para que el usuario se introduzca en el tema. Una vez seleccionado el botón <<Lecciones>> del menú principal, aparece la interfaz del menú de lecciones. En su interior se muestra un esquema del receptor NMDA, el glutamato, una curva corriente -vs-voltaje del NMDA y del AMPA, y unos trenes de potenciales de acción (PA) que muestran cómo el NMDA aumenta la frecuencia de disparo. Estos esquemas representan la parte estructural y electrofisiológica que se abordará en las lecciones. Cada botón que se muestra permite acceder a la lección correspondiente (Figura 23).

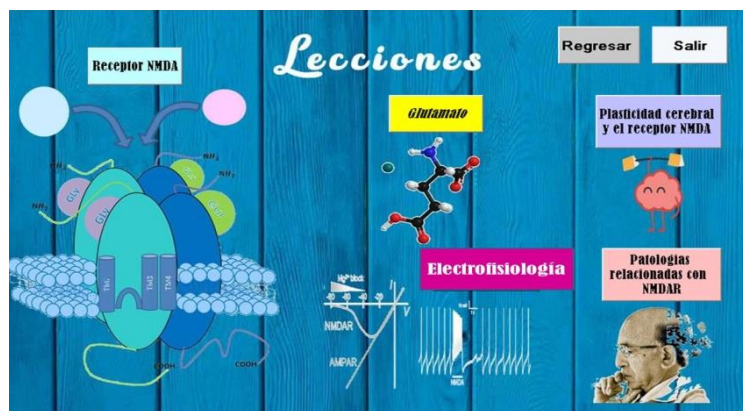


Figura 23. Pantalla del menú principal del módulo de lecciones. Las lecciones iniciales son: receptor NMDA, glutamato, plasticidad cerebral, Cinética del receptor NMDA, patologías relacionadas con NMDAR.

Ejemplos de lecciones

Estructura del receptor NMDA

En esta lección se esquematizan la estructura del NMDAR. Está formado por dos subunidades: NR1 y NR2, y cada subunidad tiene un dominio transmembranal (TMD) formado por cuatro segmentos transmembranales (tres que atraviesan la membrana y uno en forma semilunar que forma el poro del canal.) Cuenta con un dominio intracelular donde se localiza el segmento carboxilo terminal. La parte extracelular está formada por dos dominios: (1) dominio amino terminal (ATD) localizado en la parte más distal, es aquí donde el receptor es modulado por zinc, (2) dominio de unión a ligando (LBD), localizado entre ATD y TMD. Es este dominio se encuentran los receptores para la unión al neurotransmisor. En la subunidad NR1, está el receptor para glicina y en la subunidad NR2, el receptor para el glutamato (Figura 24)

Estructura Dominios

La estructura de NMDAR consta de proteínas transmembranales compuestas por cuatro subunidades que forman un poro del canal, estas subunidades son: subunidad tipo 1 (NR1), subunidad tipo 2 (NR2) y la subunidad tipo 3 (NR3) (Flores et al., 2014) cada una contiene propiedades fisiológicas distintas y la diversidad que se puede generar de las posibles composiciones (combinaciones) del receptor contribuye a la diferencias en la biogénesis, el tráfico, modificaciones postraduccionales, distribución celular y propiedades biofísicas del receptor (Salussolia et al., 2011). Cada una de estas subunidades está organizada en cuatro dominios semiautónomos discretos. El primero, de la parte extracelular a la intracelular, se encuentra el dominio extracelular con el amino terminal (ATD), en el

Subunidades **Regresar**

Figura 24. Interfaz de la lección de la estructura del NMDAR. Del lado izquierdo, se muestran los esquemas. En el recuadro de texto se explica cada una de las estructuras. El botón “Subunidades”, permite el acceso a otra lección donde se abordan las diferentes subunidades, sus diversos ensamblajes proveen funciones diferentes.

Electrofisiología del NMDAR

La estructura del NMDAR forma un canal por donde pasan de fuera a dentro iones de sodio y de calcio; y de dentro afuera iones de potasio. Este canal se localiza en la sinapsis glutamatérgica. Se han reportado también fuera de la sinapsis. El neurotransmisor glutamato o su agonista NMDA, junto con la glicina activan el canal. El registro electrofisiológico describe una corriente entrante: se activa rápidamente y se desensibiliza lentamente. En la neurona postsináptica se registra un potencial sináptico excitatorio. En presencia de Mg^{2+} y en potenciales cercanos al reposo el canal es bloqueado por este ión. La figura 25, muestra una de las lecciones relacionadas con este tema. En el lado izquierdo, se ilustra el NMDAR en sus diferentes estados. Al lado y arriba, se presenta un trazo de la corriente entrante, principalmente de Ca^{2+} . Esta entrada de calcio está implicada en LTP. Una sobre excitación produciría un incremento en la concentración de calcio intracelular ocasionando citotoxicidad. En la parte de abajo, se muestran los registros del potencial sináptico excitatorio: arriba, en presencia de Mg^{2+} . Abajo, en ausencia de Mg^{2+} . En el lado derecho, se localiza el recuadro de texto que explica las ilustraciones (figura 25).

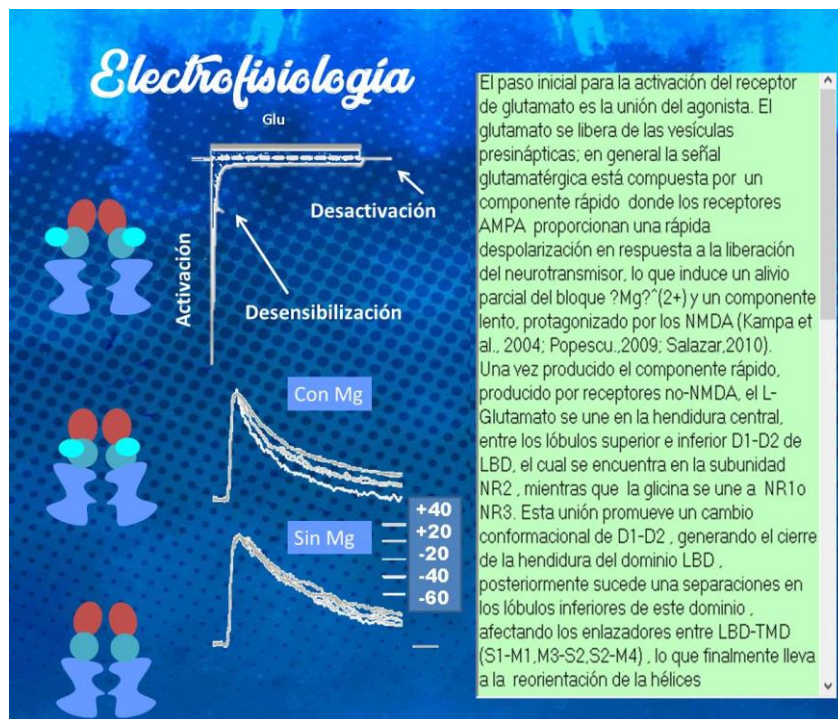


Figura 25. Interfaz de la lección de electrofisiología. El registro superior corresponde a la corriente entrante de Ca^{2+} , las flechas indican la activación, desensibilización y desactivación relacionadas con los cambios conformacionales del canal por la unión del ligando (Sobolevsky, 2015). Los botones respectivos llevan a lecciones que profundizan estos cambios. Los trazos inferiores son potenciales sinápticos excitatorios, que muestran cómo en presencia de Mg^{2+} y a potenciales de reposo la duración del potencial decrece.

Patologías relacionadas con NMDAR

La hiperactividad como la hipofunción del NMDAR puede contribuir a patologías como Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia y enfermedad de Huntington. Alteraciones en su presencia o en su función están asociadas a enfermedades del sistema nervioso central (SNC); son patologías provocadas por disfunciones sinápticas, consideradas, actualmente, como muy importantes. Estas alteraciones en el receptor pueden ser producto de la expresión de las subunidades, de alteraciones en el tráfico intracelular, e incluso de su localización. Por ejemplo, una reducida actividad alteraría el balance excitación-inhibición en circuitos neuronales que afectan la función del SNC con una probable ocurrencia de esquizofrenia. Una hiperfunción del NMDAR provocaría un influjo de Ca^{2+} muy grande y ocasionaría muerte celular. La figura 26, muestra la lección de la asociación de la actividad del NMDAR con diferentes enfermedades. Las subunidades GluN2A forman canales con una función normal. Las subunidades GluN2B contribuyen a la excitotoxicidad.

Patologías relacionadas con el NMDAR

Regresar Terminal dopaminérgica

Salir Terminal glutamatergica

NO LTP
NO LTD

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico, caracterizado por síntomas motores y no motores. Las manifestaciones clínicas típicas de la EP son las alteraciones del control motor, como temblor, rigidez muscular y bradicinesia (movimientos no voluntarios). Además de esto, se ha encontrado que existe una gran cantidad de deficiencias neuropsiquiátricas no motoras implicadas en la EP, como ansiedad, apatía, disfunción cognitiva y depresión que afectan la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad.

La fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP) está relacionada con una degeneración generalizada de las neuronas liberadoras de dopamina de la sustancia nigra compacta (SNpc). La degeneración de la vía dopaminérgica nigrostriatal conduce a cambios morfológicos y funcionales significativos en los circuitos neuronales del estriado, incluidas las modificaciones de la arquitectura sináptica glutamatergica corticostriatal y la consiguiente pérdida de la plasticidad sináptica estriatal (Petralia et

Figura 26. Interfaz de la lección para patologías relacionadas con NMDA. Del lado izquierdo, se muestra un esquema de dos terminales sinápticas: una activa (glutamatergica) liberando abundante glutamato y otra dopaminérgica, que deja de liberar el neurotransmisor. El mecanismo se refiere a las condiciones patológicas encontradas en el Párkinson (Gardoni y Bellone, 2015). Del lado derecho, se presenta un recuadro de texto explicativo.

DISCUSIÓN

El curso de biofísica de la Facultad de Biología tiene dentro de su temática el estudio físico y matemático de los canales dependientes de voltaje Na^+ y K^+ presentes en el axón gigante de calamar. A partir de este tema, se aborda el modelo desarrollado por Hodgkin y Huxley (1952). Sin embargo, por su extensión y complejidad los canales iónicos propios de neuronas de sistema nervioso central quedan fuera. Uno de ellos es el receptor NMDA. En el curso de neurobiología se toca el tema de plasticidad, donde se mencionan. La importancia de estos receptores en la fisiología del SNC y su relación con varias patologías motivaron este trabajo. El desarrollo de los tres simuladores que conforman el programa computacional presentado aquí, permite reproducir algunas características electrofisiológicas del receptor NMDA. En esta primera versión, se reprodujo el efecto del NMDAR en la frecuencia de PA; el simulador de la corriente NMDA permite construir una curva I -vs- V , y observar el bloqueo del canal por el Mg^{2+} ; se agregó un algoritmo computacional para reproducir registros de canal único. Las lecciones que acompañan al programa, permiten al usuario acercarse al tema. Como perspectivas del trabajo, queda incluir la interacción con glicina u otras moléculas, el efecto de algunos moduladores descritos en la introducción, el desarrollo de curvas dosis respuesta y el uso de antagonistas; su interacción con AMPA y su relación en una red neuronal.

CONCLUSIÓN

El programa desarrollado es ejecutable en ambiente Windows desde XP a 10. No se requiere otro programa para su ejecución, no es necesario contar con conocimientos especiales de computación. Al ser interactivo, el usuario puede realizar múltiples experimentos; modificar el valor de las diferentes variables y observar su efecto. Este programa es una alternativa para el desarrollo de experimentos virtuales en nivel licenciatura y los primeros años de posgrado, donde es imposible realizar prácticas de laboratorio reales debido a los altos costos de equipo especializado, reactivos y animales de experimentación. Los simuladores reproducen datos experimentales y puede ser utilizado como una herramienta didáctica de apoyo en los cursos. Sin embargo, es conveniente el apoyo del profesor.

BIBLIOGRAFÍA

Akhondzadeh, S. (2003) Hippocampal synaptic plasticity and cognition. *J Clin Pharm Ther*, 24(4):241-248. doi:10.1046/j.1365-2710.1999.0023.

Blanke, M.L., and VanDongen, A.M.J. (2009). Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. En: Van Dongen A.M, Editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Capítulo 13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5274/>

Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppertsberg, J., Gunther, W., Seeburg, P., and Sakmann, B. (1992). Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science*, 257(5075):1415–1419. doi:10.1126/science.1382314.

Chang, H.R., and Kuo, C.C (2008). The Activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *J Neurosci*, 28(7):1546–1556. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3485-07.2008.

Chen, N., Ren, J., Raymond, L. A., and Murphy, T. H. (2001). Changes in agonist Concentration Dependence That are a function of duration of exposure suggest N-Methyl-d-aspartate receptor non saturation during Synaptic Stimulation. *Mol Pharma*, 59(2):212–219. doi:10.1124/mol.59.2.212.

Chen, B. S. and Roche, K. W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuro Pharm*, 53(3):362–368. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.05.018

Cummings, K. A., and Popescu, G. K. (2015). Glycine-dependent activation of NMDA receptors. *J. Gen Physiol*, 145(6), 513–527. doi:10.1016/0165-6147(93)90108-v.

Deister, C. A., Teagarden, M. A., Wilson, C. J., and Paladini, C. A. (2009). An intrinsic neuronal oscillator underlies dopaminergic neuron bursting. *J Neurosci*, 29(50):15888–15897. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4053-09.2009.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.T. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. 51 (1): 7-6.

Espinosa, F., and Kavalali, E. T. (2009). NMDA receptor activation by spontaneous glutamatergic neurotransmission. *J Neurophysiol.* 101(5): 2290–2296. doi: 10.1152/jn.90754.2008

Fernandes, H.B., and Raymond, L.A. (2009). NMDA Receptors and Huntington's Disease. En: Van Dongen AM, (ED). *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Capitulo 2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5279/>

Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., and Levine, M. S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol.* 88(6):3010–3020. doi:10.1152/jn.00361.2002

Flores-Hernandez J , Salgado, H.,De la rosa, Avila-Ruiz, T.,Torres-Ramirez,O., Lopez-Lopez, G.and Atzori M.(2009) Cholinergic Direct Inhibition of N-Methyl-D Aspartate Receptor-Mediated Currents in the Rat Neocortex. *Synapse* 63:308–318. doi:10.1002/syn.20609

Flores-Soto, M.E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., Gonzales-Castañeda, R.E., y Beas-Zarate (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología.* 27(5): 301-310. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>

Furukawa H. (2011). Structure and function of glutamate receptor amino terminal domains. *J Physiol.* 590(1):63-72. doi:10.1113/jphysiol.2011.213850

Gardoni, F., and Bellone, C. (2015). Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front Cell Neurosci.* 9(25). doi: 10.3389/fncel.2015.00025.

Gimenez . C., Zafra, F., y Aragon ,C (2018) Fisiopatologías de los transportadores de glutamato y glicina :nuevas dianas terapéuticas. *Rev. Neurol.* 2018 .67(12):491-504.

Ha, J., and Kuznetsov, A. (2013) Interaction of NMDA Receptor and Pacemaking Mechanisms in the Midbrain Dopaminergic Neuron. *PLoS ONE.* 8(7).doi:10.1371/journal.pone.0069984.

Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Menniti, F.S., and Traynelis, S.F. (2017) Receptores NMDA en el Sistema Nervioso Central. En: Burnashev ,N., Szepetowski, P. (eds) *NMDA Receptores. Methods in Molecular Biology*, vol 1677. Humana Press, Nueva York, NY, 1-80.

Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Furukawa, H., Wollmuth, L.P., Gibb, A.J., and Traynelis, S.F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J Gen Physiol*, 150 (8): 1081-1105. doi:10.1085/jgp.201812032.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117(4):500-544. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764.

Hunt, D. L., and Castillo, P. E. (2012). Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Curr Opin Neurobio*, 22(3): 496–508. Doi:10.1016/j.conb.2012.01.007.

Iacobucci, G. J., and Popescu, G. K. (2017). NMDA receptors: linking physiological output to biophysical operation. *Nat rev Neurosci.* 18(4):236–249. doi: 10.1038/nrn.2017.24

Iacobucci, G. J., and Popescu, G. K. (2018). Kinetic models for activation and modulation of NMDA receptor subtypes. *Curr Opin physiol.* 2: 114–122. doi: 10.1016/j.cophys.2018.02.002.

Jahr, C.E, and Stevens, C. F. (1990). Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single-channel kinetics. *J Neurosci* 10 (9):3178-3182. doi:https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-09-03178.1990.

Jin, L., Miyazaki, M., Mizuno, S., Takigawa, M., Hirose, T., Nishimura, K., Toida, T., Williams, K., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2008) The pore region of *N*-methyl-D-aspartate receptors differentially influences stimulation and block by spermine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327(1):68–77. doi:10.1124/jpet.108.140459.

Johnson , J.W and Ascher, P.(1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons . *Nature.* 325:529-531. doi:10.1038/325529a0.

Johnson, S., Seutin, V., and North, R. (1992). Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump. *Science*, 258(5082):665–667. doi:10.1126/science.1329209.

Johnson, J. W., Glasgow, N. G., and Povysheva, N. V. (2015). Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine. *Curr Opin Pharmacol*, 0:54–63.

Kampa, B. M., Clements, J., Jonas, P., and Stuart, G. J. (2004). Kinetics of Mg²⁺ unblock of NMDA receptors: implications for spike-timing dependent synaptic plasticity. *J physiol*, 556 (2): 337–345. doi: 10.1016/j.coph.2014.11.006.

Keller, A.F., Bouteiller, J. M.C., Berger. T.W. (2017) Development of a Computational Approach/Model to Explore NMDA Receptors Functions. En:

Burnashev N., Szepetowski P. (editor) NMDA Receptors. Methods in Molecular Biology. Human Press, New York, NY

Kemp J. and Leeson., P. D. (1993)The glycine site of the NMDA receptor - five years on . cell Press. 14(1):20-25.

Lee, C. H., Lü, W., Michel, J. C., Goehring, A., Du, J., Song, X., and Gouaux, E. (2014). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature*. 511(7508): 191-197. doi:10.1038/nature13548.

Li, R., Huang, F. S., Abbas, A. K., and Wigström, H. (2007). Role of NMDA receptor subtypes in different forms of NMDA-dependent synaptic plasticity. *BMC Neurosci*. 8 (55).doi:10.1186/1471-2202-8-55 .

Liu, J., Chang, L., Song, Y., Li, H., & Wu, Y. (2019). The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front neurosci*, 13, 43. doi:10.3389/fnins.2019.00043

Lester, R. A., and Jahr, C,E. (1992). NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *J Neurosci*, 12(2):635-643.doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-02-00635.1992

Lipsky, R., and Goldman, D. (2003) Genomics and variations of ionotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sc*,1003:22-35. doi:10.1007/s00726-005-0164-2.

Liu, J., Chang, L., Song, Y., Li, H., and Wu, Y. (2019). The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 13(43). doi:10.3389/fnins.2019.00043

Mony, L., Kew, J. N., Gunthorpe, M. J., and Paoletti, P. (2009) Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J o Pharmacol*, 157(8):1301–1317. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x.

Nopoulos, P. C. (2016). Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues Clin Neurosci*, 18(1):91–98.

Overton, P., and Clark, D. (1992). Iontophoretically administered drugs acting at the N-methyl-D-aspartate receptor modulate burst firing in A9 dopamine neurons in the rat. *Synapse*, 10(2):131–140. doi:10.1002/syn.890100208.

Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci*, 33(8):1351-1365. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x.

Petralia, R.S., Al-Hallaq, R.A., and Wenthold R.J. (2009). Trafficking and Targeting of NMDA Receptors. En: Van Dongen AM, (editor). *Biology of the NMDA Receptor*.

Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Capítulo 8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5290>

Regan, M. C., Romero-Hernandez, A., and Furukawa, H. (2015). A structural biology perspective on NMDA receptor pharmacology and function. *Curr Opin Struct Biol.* 33: 68–75. doi:10.1016/j.sbi.2015.07.012

Salazar F. P. (2010) Impacto funcional de la prioridades biofísicas y farmacológicas del receptor NMDA compuesto por subunidades NR2(A-D) (tesis de maestría). Universidad de colima, Centro universitario de investigaciones biomédicas. 99

Salussolia, C.L., Prodromou, M. L., Borker, P., and Wollmuth, L.P. (2011) Arrangement of Subunits in Functional NMDA Receptors. *J Neurosci*, 31(31):11295–11304. doi:10.1523/JNEUROSCI.5612-10.2011.

Singh, P., Hockenberry, A.J., Tiruvadi, V.R., and Meaney, D.F. (2011). Computational Investigation of the Changing Patterns of Subtype Specific NMDA Receptor Activation during Physiological Glutamatergic Neurotransmission. *PLoS Comput Biol* 7(6).doi:10.1371/journal.pcbi.1002106.

Sobolevsky, A. I. (2015). Structure and gating of tetrameric glutamate receptors. *J Physiol*, 593(1): 29-38. doi: 10.1113/jphysiol.2013.264911.

Sobolevsky A.I., and Yelshansky, M.V. (2000) The trapping block of NMDA receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurones. *J Physiol*, 526(Pt 3):493-506. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00493.x.

Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev.* 62:405–49. doi:10.1124/pr.109.002451.

Vicini, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.H., Wolfe, B.B., and Grayson, D.R. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophy.* 79 (2): 555-566. doi:10.1152/jn.1998.79.2.555.

Volianskis, A., France, G., Jensen, M. S., Bortolotto, Z. A., Jane, D. E., and Collingridge, G. L. (2015). Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain res*, 1621:5–16. doi: 10.1016/j.brainres.2015.01.016.

Wang, R., and Reddy, P. H. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : J Alzheimers Dis*, 57(4):1041–1048. doi: 10.3233/JAD-160763.

Watkins, J.C and Jane D.E. (2006).The Glutamate Story. *Br J Pharmacol* . 147(Suppl 1): S100–S108. doi:10.1038/sj.bjp.0706444

Wyllie, D.J.A., Livesey, M.R., and Hardingham, G.E. (2013) Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *NeuroPharma*, 74: 4-17. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.01.016

Yelamanchi, S. D., Jayaram, S., Thomas, J. K., Gundimeda, S., Khan, A. A., Singhal, A., and Gowda, H. (2016). A pathway map of glutamate metabolism. *J Cell Commun Signal*, 10(1): 69–75. doi: 10.1007/s12079-015-0315-5.

Zakharov D., Lapish C., Gutkin B., Kuznetsov A. (2016). Synergy of AMPA and NMDA Receptor Currents in Dopaminergic Neurons: A Modeling Study. *Front Comp Neurosci*, 10 (48). doi:10.3389/fncom.2016.00048.

Zhang, Y., Li, P., Feng, J., and Wu, M. (2016). Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol Sci*, 37(7):1039–1047. doi: 10.1007/s10072-016-2546-5

Zhou, Y., and Danbolt, N. C. (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm*, 121(8): 799–817. doi:10.1007/s00702-014-1180-8.

Zito, K. and Scheuss, V. (2009) NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. En: Larry R. Squire , editor . *Enciclopedia de neuroscience* . Senior editors. Disponible en:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080450469012250?via%3Dhub>

ANEXO

Simulador 1: fijación de corriente NMDA

Este simulador está basado en el modelo matemático utilizado por Wandenberg 2010.

$$dv/dt = g_{NMDA} * [NMDA] * p (V - E_{NMDA})$$

Dónde:

g_{NMDA} = conductancia del NMDA
 $[NMDA]$ = concentración del agonista NMDA
 p = probabilidad de apertura del canal
 E_{NMDA} = potencial de equilibrio del NMDA

Bloqueo de Mg^{2+}

$$dp/dt = a_p * (1 - p) - \beta_p * p \quad [2]$$

p = la fracción de canales-NMDA en estado abierto

constante de velocidad para pasar de bloqueado a desbloqueado

$$a_p = a_A * e^{(V/a_C)} \quad [3]$$

constante de velocidad de bloqueo por magnesio

$$\beta_p = \beta_A * [Mg] * e^{(-V/\beta_C)} \quad [4]$$

Simulador 2: fijación de voltaje

Para la generación de este simulador se hicieron modificaciones a diferentes ecuaciones presentadas por Jack et al. (1975) para la corriente del receptor NMDA y corriente sináptica, además de la corriente sináptica de Huguenard –McCormick, 1997.

Corriente NMDA

$$I_{NMDA}(t) = G_{syn} * (V - E_{NMDA}) \quad [5]$$

Donde

Conductancia NMDA

$$G_{syn} = G_{max} * \left(t - t_1 / \tau \right) * \frac{e^{1-t/\tau_1} - e^{-(t-t_1)/\tau_1}}{\tau_2} * \frac{escalon * 1}{1 + factor1 + [Mg] * e^{-factor2 * V}} \quad [9]$$

Donde

G_{max} = conductancia máxima

τ_1 = constante de tiempo 1

τ_2 = constante de tiempo 2

t_1 = 0 ms

$tt_1=2$

Factor 1 = 0.01

Factor 2 = 0.1

Escalon = función escalón

Simulador 3: Apertura para un canal fijo

Este simulador se realizó basado en el experimento de Ascher et al., (1988). Se usó un algoritmo aleatorizado para la apertura y duración de apertura del canal. En condiciones de 10 μM de NMDA y en presencia ó ausencia de Mg^{2+} (1 mM).