

Lab-NMDAR: simuladores de la electrofisiología básica del receptor NMDA

Lab-NMDAR: simulators of NMDA receptor's basic electrophysiology

Marleni Reyes Monreal¹, María Eugenia Pérez Bonilla², Jessica Quintero Pérez³, *Arturo Reyes Lazalde²,
Jorge Flores Hernández⁴

¹ Escuela de Artes Plásticas y Audiovisuales, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
Tel. 52-222-2295500. marleni.reyes@correo.buap.mx

² Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
Tel. 52-222-2295500 ext.7072. maria.perez@correo.buap.mx.

³ Facultad de Medicina, Puebla, México. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
Tel. 52-222-2295500. jessica.quintero@correo.buap.mx, arturoreyeslazalde@gmail.com.

⁴ Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Puebla, México.
Tel. 52-222-2295500 ext. 7325. jorge.flores@correo.buap.mx

* Autor de correspondencia.

Resumen

Es necesario el desarrollo de software educativo que permita la implementación de prácticas de laboratorio. En este trabajo se presenta el diseño y desarrollo del programa Lab-NMDAR, constituido por tres simuladores para la enseñanza-aprendizaje de la electrofisiología del receptor NMDA: (1) simulador NMDAR-Bloqueo Mg^{2+} , (2) simulador NMDAR-Glicina y (3) simulador canal único NMDA-Bloqueo Mg^{2+} . El programa se implementó en Visual Basic® para ambiente Windows®. Con estos simuladores el alumno conoce la corriente NMDA, reproduce su dependencia del voltaje, simula su bloqueo por magnesio en registros de corriente macroscópica y en canal único, determina la participación de NMDA y glicina en la activación del receptor NMDA y produce experimentos virtuales dosis-respuesta. El programa es de fácil manejo, se ejecuta en una computadora personal con el mínimo de recursos.

Palabras clave: Simuladores electrofisiológicos; receptor NMDA; curvas I-V; bloqueo por Mg^{2+} ; corrientes NMDA; herramientas didácticas.

Abstract

The development of educational software that allows the implementation of laboratory practices is necessary. This paper presents the design and development of the Lab-NMDAR program, consisting of three simulators for the teaching-learning of NMDA receptor electrophysiology: (1) NMDAR-Blocking Mg^{2+} simulator, (2) NMDAR-Glycine simulator, and (3) single channel NMDA-Blocking Mg^{2+} simulator. The program was implemented in Visual Basic® for Windows® environment. With these simulators the student knows the NMDA current, reproduces its dependence on voltage, simulates its blocking by magnesium in macroscopic current recordings and in a single channel, determines the involvement of NMDA and glycine in NMDA receptor activation and produces virtual dose-response experiments. The program is easy to use, it runs on a personal computer with minimal resources.

Keywords: Electrophysiological simulators; NMDA receptor; I-V curves; Mg^{2+} blockade; NMDA currents; didactic tools.

Recibido: 03 de junio de 2022

Aceptado: 03 de octubre de 2022

Publicado: 23 de noviembre de 2022

Cómo citar: Reyes Monreal, M., Pérez Bonilla, M. E., Quintero Pérez, J., Reyes Lazalde, A., & Flores Hernández, J. (2022). Lab-NMDAR: simuladores de la electrofisiología básica del receptor NMDA. *Acta Universitaria* 32, e3597. doi: <http://doi.org/10.15174/au.2022.3597>

Introducción

El receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) es un componente principal en la transmisión excitatoria en el sistema nervioso central. Está asociado con funciones cerebrales normales como la plasticidad sináptica (Li *et al.*, 2007) y con los procesos de aprendizaje y memoria (Morris, 2013). Enfermedades neurodegenerativas, depresión, esquizofrenia, dolor, epilepsia, incluido Alzheimer, son patologías donde se ha descrito una disfunción del receptor NMDA (Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016; Zhou & Sheng, 2013). Las implicaciones de este receptor NMDA en la fisiología y fisiopatología del sistema nervioso central son razones suficientes para su estudio multidisciplinario, con la finalidad de comprender mejor su papel en la fisiología cerebral y con la esperanza de descubrir posibles blancos o mecanismos terapéuticos. Queda claro que la enseñanza-aprendizaje de este tema resulta fundamental en estudiantes de medicina, enfermería, biomedicina, biología y todas las carreras afines. Hasta la fecha, en internet, no se encuentra disponible un programa de cómputo desarrollado específicamente para la enseñanza del NMDAR. En este trabajo se desarrolló un *software* interactivo de la electrofisiología básica del receptor NMDA con fines de enseñanza.

Estructura del receptor NMDA

Los receptores NMDA son macromoléculas tetraméricas. Están formados por cuatro subunidades de entre siete diferentes tipos: NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A y NR3B. Las subunidades más frecuentes encontradas en los receptores NMDA son: dos de tipo NR1, subunidad obligatoria expresada ubicuamente (Chaffey & Chazot, 2008) y dos del tipo NR2. El tipo NR2 cuenta con cuatro isoformas (A-D) que se presentan diferencialmente de acuerdo al tipo de neurona, estado de desarrollo y localización sináptica o extrasináptica (Laube *et al.*, 1998). En consecuencia, un receptor NMDA presenta combinaciones de subunidades y forman un heterotetrámero (Kutsuwada *et al.*, 1992). Existen evidencias de diferentes combinaciones en el sistema nervioso central y neuronas del ganglio de la raíz dorsal (NR1/NR2B/NR2A, NR1/NR2B/NR2D, entre otras). Se trata de receptores heterólogos con propiedades funcionales y farmacológicas distintas (Chaffey & Chazot, 2008; Dingledine *et al.*, 1999). Los receptores NMDA homoméricos NR2 forman canales no funcionales, y los homoméricos NR1 presentan una corriente muy pequeña. Estudios de recombinación han mostrado que las propiedades del receptor NMDA están definidas por las subunidades (Cull-Candy *et al.*, 2001).

Cada subunidad presenta tres regiones (Figura 1): (1) región extracelular con dos dominios: dominio amino terminal (DAT) y dominio para la unión de ligando (DUL); (2) región transmembranal, con tres segmentos transmembranales (M1, M2, M3) y un segmento M2 que forma el poro (DTM); y (3) una región intracelular con el dominio carboxilo terminal (DCT), más largo en NR2 y más corto en NR1 con sitios de unión a Ca^{2+} y calmodulina. El receptor NMDA se activa por la unión simultánea de glutamato y glicina. El dominio DUL en NR1 tiene sitio de unión a la glicina. El dominio DUL en NR2 tiene sitio de unión al glutamato y al agonista NMDA (Hansen *et al.*, 2017; Martínez-Visbal *et al.*, 2020; Sibarov *et al.*, 2018)(Figura 1). En la parte profunda del poro el Mg^{2+} bloquea al canal. Este tipo de bloqueo depende del ensamble del canal, los receptores NR1-NR2A y NR1-NR2B se bloquean más fuertemente que NR1-NR2C y NR1-NR2D (Kuner & Schoepfer, 1996). En el dominio amino terminal (DAT) de NR2 se localiza un sitio de unión para el Zinc (Amico-Ruvio *et al.*, 2011). El efecto de diferentes agentes farmacológicos depende de los subtipos del receptor NMDA (Cull-Candy *et al.*, 2001).

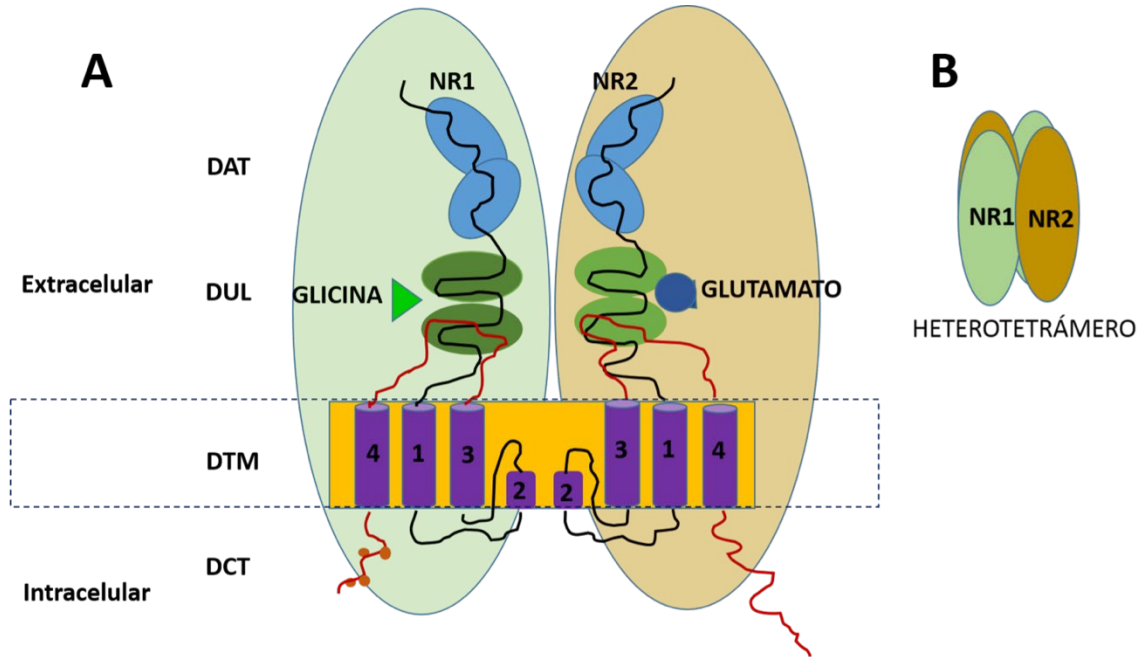


Figura 1. (a) Esquema del receptor canal NMDA. Se muestra una subunidad NR1 donde se une la glicina (triángulo verde) y una subunidad NR2 donde se une el glutamato (círculo azul). Cada una se divide en cuatro dominios: dominio amino terminal (DAT), dominio de unión a ligando (DUL), dominio transmembranral (DTM) y dominio carbono terminal (DCT). (b) heterotetrámero formado por dos subunidades NR1 (verdes) y dos NR2 (café).

Fuente: Elaboración propia con base en Hansen *et al.* (2017), Sibarov & Antonov (2018) y Martínez-Visbal *et al.* (2020).

Características electrofisiológicas básicas del receptor NMDA

Las investigaciones reportan que la activación del receptor canal NMDA requiere de la acción simultánea de glutamato como neurotransmisor y de glicina como co-agonista (Johnson & Ascher, 1987). La acción del glutamato sobre el receptor NMDA está asociada al proceso de neurotransmisión sináptica. El neurotransmisor excitador que activa al receptor NMDA es el glutamato. Se presume que la acción de la glicina está asociada a la interacción de neuronas con astrocitos. El efecto de la glicina sobre el receptor NMDA se ve modificado por los cambios dinámicos de su concentración extracelular provocados por su captación o liberación del transportador (GlyT1), presentes en astrocitos (glía) y neuronas postsinápticas (Harsing & Matyus, 2013). La homeostasis de la glicina se encuentra perturbada en desórdenes neuronales como esquizofrenia y autismo (Coyle & Tsai, 2004). La glicina en concentraciones del orden cercano a micromolar ($EC_{50} < 1 \mu M$ en neuronas y de $1 \mu M$ a $3 \mu M$ en ovocitos transfectados) incrementa la amplitud de la corriente NMDA (Chen *et al.*, 2008). La concentración de glicina en la sinapsis es difícil de medir. En el espacio sináptico, la concentración de glicina medida con métodos de microdiálisis se encuentra entre valores nanomolar a valores bajos micromolar (Cummings & Popescu, 2015; Papp *et al.*, 2008). En investigaciones con la técnica de fijación de voltaje se muestra que la amplitud de la corriente es dependiente de las concentraciones de glutamato y glicina: un incremento en las concentraciones de glutamato (o NMDA) y glicina generan una mayor corriente NMDA (McBain *et al.*, 1989). La corriente NMDA está compuesta del influjo de Ca^{2+} y Na^{+} y del eflujo de K^{+} (canal catiónico). En consecuencia, su potencial de equilibrio es cercano a 0 mV (Ascher & Nowak, 1988). Después de la activación del receptor NMDA por NMDA y glicina, con el paso del tiempo (segundos) la amplitud de la corriente NMDA decrece debido a un proceso de desensibilización dependiente de calcio (Iacobucci & Popescu, 2020; Sibarov & Antonov, 2018).

El Mg^{2+} externo entra al canal NMDA y lo bloquea. Existe una dependencia del voltaje sobre el bloqueo de Mg^{2+} . En experimentos en presencia de Mg^{2+} , la corriente NMDA es nula o pequeña a valores de voltaje hiperpolarizados (< -50 mV) (Dingledine *et al.*, 1999). La curva I-V se rectifica a esos potenciales. A potenciales de reposo el receptor NMDA, en la mayoría de los subtipos de receptores NMDA, se encuentra bloqueado por Mg^{2+} . En la sinapsis, otros canales como los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) despolarizan la membrana y desbloquean al canal NMDA (Chater & Goda, 2014). El sitio de unión para el Mg^{2+} se localiza en la parte profunda del poro del receptor NMDA (McMenimen *et al.*, 2006), probablemente, cerca o más allá del campo eléctrico (Ascher & Nowak, 1988). La cinética de bloqueo por Mg^{2+} parece depender del tipo de neurona y de las subunidades NR2 presentes en el receptor (Cepeda *et al.*, 2001). En lesiones traumáticas cerebrales se reduce el bloqueo por Mg^{2+} y su dependencia de voltaje se encuentra alterada (Zhang *et al.*, 1996). En este tipo de lesión, el daño a los astrocitos produce un aumento en la concentración extracelular de glutamato, lo que ocasiona un incremento en el influjo de Ca^{2+} por el canal NMDA (excitotoxicidad por glutamato). El alto Ca^{2+} interno dispara cascadas bioquímicas que a su vez producen daño y muerte neuronal (Arundine & Tymianski, 2004; Carvajal *et al.*, 2016). Las implicaciones del receptor canal NMDA en la función cerebral y en algunas patologías del sistema nervioso han motivado su intensa investigación (André *et al.*, 2004) y refleja la importancia que tiene su enseñanza.

Receptor NMDA y su enseñanza

En diversos cursos de fisiología y biofísica a nivel licenciatura se hace una introducción a los canales iónicos. Por su mecanismo de activación a los canales iónicos, se les puede clasificar en: (1) canales dependientes de voltaje, (2) canales metabotrópicos y (3) canales iónicos asociados al ligando. Los canales iónicos dependientes de voltaje se caracterizan por ser activados por un voltaje característico llamado potencial umbral, fueron descritos por Hodgkin y Huxley (Hodgkin & Huxley, 1952) y básicamente son los que se exponen en licenciatura con cierta profundidad. Los canales metabotrópicos se caracterizan por ser un complejo formado por un receptor con sitio de unión a un ligando y un canal iónico que se localiza distante del receptor. La forma de activación de este canal se logra por la acción de segundos mensajeros. Los canales ionotrópicos asociados al ligando se caracterizan por un canal iónico en cuya estructura se encuentra el receptor. Es el caso del receptor NMDA.

Se realizó una búsqueda de la temática en los cursos de fisiología que se imparten en varias universidades de México a nivel licenciatura (Ciudad de México, Estado de México, Guadalajara, Guanajuato, Puebla, Monterrey y Yucatán), y en ningún caso se aborda el receptor NMDA. Por ejemplo, las prácticas de laboratorio de fisiología en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México se centran en temas como la fisiología cardiovascular, respiratoria y muscular, entre otras. Combinan prácticas de laboratorio tradicional con prácticas virtuales. Para este propósito, utilizan el *software* biopac (Manual Biopac Systems, Inc. Manual Biopac Student Bookstore versión 08.09.06. www.biopac.com). Ninguna de sus prácticas aborda el estudio del receptor NMDA. La página web revisada en marzo 2022 es: https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/medico/manuales/Manual_Fisiologia.pdf. La ausencia del estudio del receptor NMDA a nivel licenciatura puede deberse al menos a cuatro razones: (1) lo complicado del tema rebasa los alcances del estudio de la fisiología en la licenciatura, (2) los altos costos para la implementación de prácticas de laboratorio sobre la electrofisiología de los canales iónicos, (3) la inexistencia de simuladores de enseñanza para este tema y (4) la falta de tiempo. No se puede argumentar que el receptor NMDA es un tema poco importante o práctico en la formación médica.

El simulador se diseñó bajo la siguiente hipótesis: Si el simulador genera adecuadamente la electrofisiología básica del receptor NMDA, entonces: (1) reproducirá los experimentos dosis-respuesta generados por la unión de glicina y NMDA con el receptor; además, (2) se podrá reproducir el bloqueo por Mg^{2+} del canal NMDA cuando se encuentra a potenciales hiperpolarizados y cómo se desbloquea a potenciales despolarizados.

El objetivo de este trabajo es contar con un *software* educativo para el estudio del receptor NMDA que permita realizar experimentos virtuales, determinar el efecto de la unión de glicina y NMDA en el receptor, mostrar experimentalmente el bloqueo del canal NMDA por Mg^{2+} y generar curvas de corriente contra voltaje (curvas I-V).

Materiales y métodos

Se diseñaron tres simuladores interactivos para la enseñanza-aprendizaje de la electrofisiología básica del receptor canal NMDA. Se utilizó el lenguaje de programación Visual Basic® versión 6.0 para ambiente Windows®, y se compiló para ser ejecutable desde Windows® 7 a Windows® 11. Fue desarrollado por un grupo multidisciplinario de las siguientes áreas: educación, diseño digital, computación, medicina, fisiología, biología y patología molecular, neurociencias, matemáticas y biofísica. Brevemente, la estrategia de desarrollo consistió en (secuencialmente): selección de la temática de enseñanza, disposición del equipo de cómputo y *software*, búsqueda de publicaciones de experimentos con la mayor cantidad de datos para las variables y parámetros, selección de los modelos matemáticos y adecuación, determinación de las variables de referencia, implementación en Visual Basic®, solución de los modelos, pruebas de funcionalidad, manipulación de variables para ajustar la variable de referencia con las variables de los experimentos reales, diseño de la interfaz, pruebas de funcionalidad en diferentes Windows, pruebas en grupo piloto, retroalimentación, compilación, *software* ejecutable final.

Simulador para el estudio de bloqueo del receptor NMDA por Mg^{2+}

Se diseñó y desarrolló un simulador para el estudio del efecto de la concentración externa de Mg^{2+} y del voltaje sobre la corriente macroscópica NMDA. En este simulador, la corriente NMDA está gobernada por el modelo matemático de Jahr y Stevens modificado (Jahr & Stevens, 1990b) (ecuación 1):

$$I_{NMDA} = g_{max} \cdot g_{NMDA}(t) \cdot B(V, Mg^{2+}) \cdot F(T) \cdot (V - E_{NMDA}) \quad (1)$$

donde I_{NMDA} es la corriente macroscópica NMDA; g_{max} es la conductancia máxima del receptor NMDA; $g_{NMDA}(t)$ es el cambio de conductancia con respecto al tiempo (ecuación 3); $B(V, Mg^{2+})$ es la función de activación dependiente de voltaje y de la concentración de Mg^{2+} externo; $F(T)$ es la función escalón, con $T = 1$; V es el voltaje; y E_{NMDA} es el potencial de equilibrio NMDA.

La función de activación del receptor canal NMDA derivada del modelo de cuatro estados corresponde a la ecuación 2. Esta ecuación muestra que la conductancia del canal NMDA depende del voltaje y de la concentración externa de Mg^{2+} (Jahr & Stevens, 1990a, 1990b):

$$B(V, Mg^{2+}) = \left(1 + \frac{[Mg^{2+}]}{3.57} \exp\left(\frac{-V}{16.13}\right) \right) \quad (2)$$

donde $B(V, Mg^{2+})$ es la función de activación; $[Mg^{2+}]$ es la concentración externa de magnesio; V es el voltaje; 3.57 mM y 16.13 mV son parámetros de ajuste de datos de las curvas experimentales G_{NMDA} -vs- voltaje de registros en neuronas disociadas de hipocampo, con 30 μM y 1 μM de NMDA y glicina, respectivamente, a un voltaje de -60 mV y para una concentración de magnesio extracelular fisiológica de 1 mM (Jahr & Stevens, 1990a, 1990b).

En este simulador, la conductancia NMDA ($g_{NMDA}(t)$) se modeló con dos exponenciales según la ecuación 3, con constantes de tiempo adecuadas para experimentos de corriente macroscópica (Dave *et al.*, 2021; Sterratt *et al.*, 2011):

$$g_{NMDA}(t) = \frac{\tau_f \tau_s}{\tau_f - \tau_s} \left(\exp\left(-\frac{t-t_s}{\tau_f}\right) - \exp\left(-\frac{t-t_s}{\tau_s}\right) \right) \quad (3)$$

donde $g_{NMDA}(t)$ es la conductancia NMDA dependiente del tiempo y τ_f y τ_s son las constantes de tiempo rápida y lenta, respectivamente. Las constantes de tiempo fueron modificadas de Hestrin y colaboradores (Hestrin *et al.*, 1990), ajustadas a las corrientes iónicas NMDA, registradas con la técnica de fijación de voltaje en célula entera.

Simulador para el estudio de la interacción receptor NMDA con glicina y NMDA y generación de curvas dosis-respuesta

Este simulador está basado en los datos experimentales de McBain y colaboradores, corresponden al registro de la corriente NMDA de receptores expresados en *Xenopus oocytes* (McBain *et al.*, 1989). En este trabajo se estudió la co-activación del receptor canal NMDA por el co-agonista glicina con cuatro diferentes concentraciones: 0.0 μM , 0.3 μM , 1 μM y 30 μM . Para cada una de estas concentraciones de glicina, se generó la curva dosis-respuesta correspondiente con diferentes concentraciones del agonista NMDA: 1.0 μM , 5.0 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM y 1000 μM .

Ajuste de curvas experimentales corriente -vs- [NMDA] reportadas por McBain y colaboradores

Los datos de las curvas I_{NMDA} -vs- [NMDA] reportadas por McBain y colaboradores (McBain *et al.*, 1989) se ajustaron con modelos matemáticos mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt para ajuste no lineal con mínimo cuadrados, con el programa Origin Pro (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

Con 0.0 μM de glicina no se registró corriente NMDA. Para valores de glicina, iguales o menores a 0.3 μM , las curvas I_{NMDA} -vs- [NMDA] se ajustaron con dos exponenciales (ecuación 4):

$$I_{NMDA(pico)} = y_0 + A1 \exp\left(-\frac{[NMDA]}{\tau_1}\right) + A2 \exp\left(-\frac{[NMDA]}{\tau_2}\right) \quad (4)$$

Con glicina > 0.3 mM, las curvas I_{NMDA} -vs- [NMDA] se ajustaron con una exponencial (ecuación 5):

$$I_{NMDA(pico)} = y_0 + A1 \exp\left(-\frac{[NMDA]}{\tau_1}\right) \quad (5)$$

donde I_{NMDA} es la corriente NMDA registrada, y_0 es el valor inicial, A_1 y A_2 son los coeficientes, [NMDA] es la concentración de NMDA aplicada y τ_1 y τ_2 son constantes de tiempo.

Determinación de la corriente NMDA pico para el simulador NMDA-glicina (dosis-respuesta)

En el simulador, primero se calculó la conductancia NMDA pico a partir de la ecuación 6 (experimentos con $V = -60$ mV y $[Mg^{2+}] = 1$ mM):

$$g_{NMDA(pico)} = g_{max} \cdot B(V, Mg^{2+}) \quad (6)$$

Los valores teóricos de la conductancia pico resultantes de la ecuación 6 se igualan con las ecuaciones de los ajustes de los datos experimentales de McBain y colaboradores para las diferentes concentraciones de glicina (McBain *et al.*, 1989). Así, para los datos experimentales con glicina ≤ 0.3 μ M se ajustan a la función con dos exponenciales (ecuación 4) y se divide por el voltaje ($V - E_{NMDA}$).

donde $E_{NMDA} = 0$ mV (ecuación 7).

$$g_{NMDA(pico)} = [y_0 + A1 \exp\left(-\frac{[NMDA]}{\tau_1}\right) + A2 \exp\left(-\frac{[NMDA]}{\tau_2}\right)] / (V - E_{NMDA}) \quad (7)$$

En los experimentos con glicina > 0.3 μ M, el valor teórico para $g_{NMDA(pico)}$ se iguala con la función de ajuste de los datos experimentales (ecuación 5) y se divide por el voltaje (ecuación 8).

$$g_{NMDA(pico)} = [y_0 + A1 \exp\left(-\frac{[NMDA]}{\tau_1}\right)] / (V - E_{NMDA}) \quad (8)$$

La corriente NMDA pico depende de la concentración externa de NMDA, de la concentración de glicina con valores experimentales (0.0 μ M, 0.3 μ M, 1.0 μ M, 30 μ M) y del voltaje ($V = -60$ mV) (ecuación 9).

$$I_{NMDA(pico)} = g_{NMDA(pico)} * (V - E_{NMDA}) \quad (9)$$

Determinación de la corriente NMDA durante el tiempo de duración de la función escalón

En el simulador que reproduce los experimentos dosis-respuesta para diferentes concentraciones de NMDA y glicina, la función $g_{NMDA(D-R)}(t)$ sigue un comportamiento exponencial. Inicia con el valor pico de corriente NMDA calculado para cada concentración de NMDA y de glicina y finaliza al tiempo de terminación la función escalón (función modificada de Sterratt y colaboradores) (Sterratt *et al.*, 2011) (ecuación 10):

$$g_{NMDA(D-R)}(t) = (1 + \exp\left(-\frac{t}{\tau_{NMDA}}\right)) \quad (10)$$

donde τ_{NMDA} es la constante de tiempo de decremento de la corriente NMDA pico (desensibilización) y t es el tiempo.

La corriente NMDA ($I_{NMDA(D-R)}$) resultante sigue la ecuación 11:

$$I_{NMDA(D-R)} = g_{NMDA(pico)} \cdot A \cdot g_{NMDA(D-R)}(t) \cdot F(T) \cdot (V - E_{NMDA}) \quad (11)$$

donde A es un parámetro de ajuste para que la función $g_{NMDA(D-R)}(t)$ inicie en $I_{NMDA(pico)}$. Las demás variables están definidas arriba.

Simulador de canal único

Este simulador reproduce la apertura y cierre del canal receptor NMDA único en dos condiciones experimentales: $Mg^{2+} = 0.0 \mu M$ y $Mg^{2+} = 500 \mu M$.

Los experimentos sin magnesio generan una curva I_{NMDA} -vs- voltaje de tipo lineal, con un potencial de inversión $E_{NMDA} = 0$ mV (Jahr & Stevens, 1990a, 1990b). Los experimentos con $500 \mu M$ de magnesio generan curvas I_{NMDA} -vs- voltaje de tipo no lineal. Tanto el tiempo de aparición de apertura del canal como la duración de apertura del canal están determinados mediante un algoritmo al azar (Jahr & Stevens, 1990b). La amplitud de la corriente está gobernada por la ecuación 12.

$$I_{NMDA(\text{único})} = g_{NMDA(\text{único})} \cdot B(V, Mg^{2+}) \cdot (V - E_{NMDA}) \quad (12)$$

donde $I_{NMDA(\text{único})}$ es la amplitud de la corriente del canal único, $g_{NMDA(\text{único})}$ es la conductancia NMDA, V es el voltaje y E_{NMDA} es el potencial de equilibrio NMDA. $B(V, Mg^{2+})$ es la función definida anteriormente.

Resultados

Se desarrolló el programa de cómputo interactivo Lab-NMDAR versión 1.0, integrado por tres simuladores: (1) el simulador NMDAR-Bloqueo Mg^{2+} permite el estudio de la dependencia de voltaje del bloqueo por Mg^{2+} de la corriente NMDA; (2) el simulador NMDAR-Glicina permite realizar experimentos virtuales dosis-respuesta -se aumentan o disminuyen las concentraciones de NMDA y glicina y se registran las corrientes NMDA correspondientes-; y (3) el simulador canal único NMDA-Bloqueo Mg^{2+} permite el estudio del bloqueo de Mg^{2+} en canal único y su dependencia con el voltaje.

La ventana inicial del programa muestra un menú con botones para acceder a cada uno de los simuladores (Figura 2). El menú presenta además un botón para acceder a un leccionario, el cual introduce a los alumnos a los principios básicos del tema.

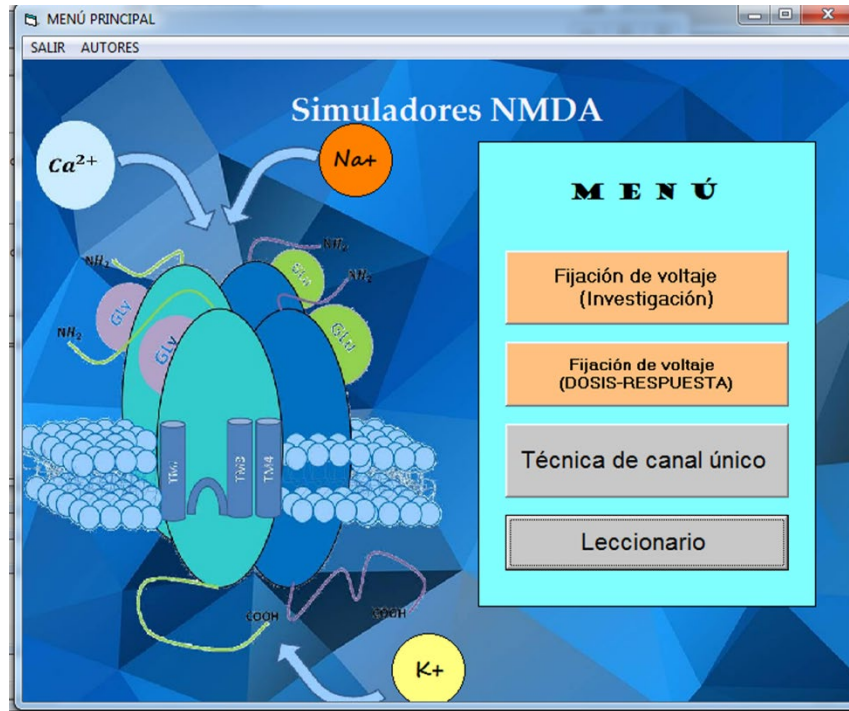


Figura 2. Menú principal del acceso a los simuladores. De arriba abajo: El botón <Fijación de voltaje (Investigación)> permite acceder al simulador para el registro de la corriente macroscópica NMDA en neuronas de hipocampo variando el voltaje de estímulo en condiciones experimentales con y sin magnesio. El botón <Fijación de voltaje (Dosis-Respuesta)> abre el simulador para experimentos de dosis-respuesta variando la de concentración NMDA y de glicina en ovocitos transfectados. El botón <Técnica de canal único> acceder al simulador para el registro de la corriente NMDA unitaria variando el voltaje de estímulo en condiciones experimentales con y sin magnesio. El botón <Leccionario> lleva a las lecciones introductorias del tema.

Fuente: Elaboración propia.

Simulador NMDAR-Bloqueo Mg^{2+}

Interfaz de usuario

La Figura 3 muestra la interfaz de usuario del simulador NMDAR-Bloqueo Mg^{2+} . Cuenta con un módulo de ingreso de datos de las variables: Voltaje y concentración externa de Mg^{2+} . En la parte central de la interfaz se muestran cuatro osciloscopios: (A) osciloscopio para el registro de la corriente NMDA, (B) osciloscopio que muestra la conductancia NMDA (gNMDA), (C) osciloscopio para el trazo de la concentración de Ca^{2+} interno, y (D) osciloscopio que muestra el voltaje de estímulo. Los recuadros verdes que se localizan en el lado izquierdo del osciloscopio superior (A) indican el tiempo y la corriente NMDA medida con el cursor sobre el trazo de la corriente. El color del trazo se puede seleccionar entre los colores negro, azul y rojo. El botón amarillo <Graficar (I-V)> lleva a una ventana donde se puede graficar toda la curva de valores de corriente pico NMDA contra el voltaje de estímulo. El objetivo de este simulador es construir una curva corriente-vs- voltaje en dos condiciones: sin Mg^{2+} extracelular y con Mg^{2+} extracelular (1 mM). El alumno puede seleccionar valores de Mg^{2+} entre 0 mM a 2 mM (concentración fisiológica 1 mM [Nowak *et al.*, 1984]).

Modo de uso

Simulación en neurona de corriente NMDA sin Mg^{2+} externo

La corriente NMDA es dependiente de voltaje. En experimentos sin Mg^{2+} externo se observa cómo a valores hiperpolarizados la corriente registrada es máxima. La Figura 3 muestra un experimento en neurona con un voltaje de estímulo de -90 mV y una duración de tres segundos. La concentración externa de Mg^{2+} fue de 0 mM. El trazo superior corresponde a la corriente NMDA simulada (Figura 3a). Se observa una corriente entrante con una amplitud inicial de -414.1 pA (corriente pico). Al paso del tiempo, la corriente NMDA va disminuyendo hasta alcanzar al final del estímulo una amplitud de -86.9 pA (corriente final). Esta disminución se debe al proceso de desensibilización dependiente de calcio interno (grado de desensibilización = 0.79). En el osciloscopio que muestra la concentración de Ca^{2+} interno se observa cómo la concentración aumenta lentamente (Figura 3c). La conductancia disminuye (Figura 3b).

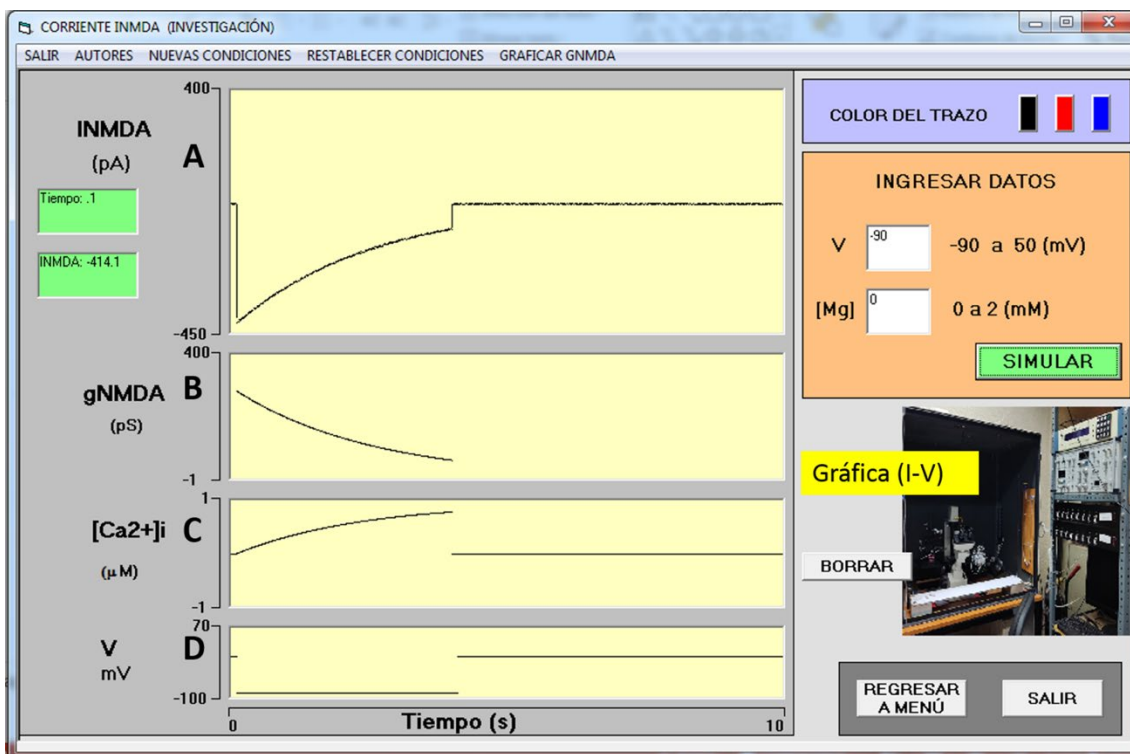


Figura 3. Interfaz del simulador NMDAR-Bloqueo Mg^{2+} y experimento sin magnesio. Registro en neuronas de hipocampo con $30 \mu M$ de NMDA y $1 \mu M$ de glicina. (A) muestra el registro de la corriente NMDA generada a un voltaje de -90 mV y con cero magnesio. Es una corriente entrante que alcanza una amplitud pico de -414.1 pA (recuadro en verde). Se observa la desensibilización (disminución de la amplitud con el paso del tiempo). (B) muestra la disminución de la conductancia NMDA. (C) muestra trazo del incremento de calcio interno. (D) muestra el registro del voltaje de estímulo.

Fuente: Elaboración propia con base en Jahr & Stevens (1990a, 1990b).

Para la construcción de la curva corriente $-vs-$ voltaje (curva I-V), se ingresan al simulador valores sucesivos de voltaje de estímulo en un rango de -90 mV a $+30$ mV con pasos de 10 mV. El grupo de corrientes simuladas durante estos experimentos se muestra en la Figura 4a. El alumno debe medir la amplitud pico de cada corriente NMDA y anotarla en su bitácora con el voltaje de estímulo correspondiente. Con el botón <Graficar (I-V)> se accede a la interfaz donde se ingresan los datos medidos para generar la gráfica corriente $-vs-$ voltaje. Del lado derecho de la interfaz se ingresan los datos de voltaje de estímulo de -90 mV a $+30$ mV junto a las amplitudes de corrientes pico simuladas (Figura 4b). El botón <GRAFICAR> traza la curva I-V correspondiente. En condiciones sin magnesio, relación corriente-voltaje (I-V) sigue una cinética lineal semejante a la reportada en ovocitos y células HEK 293 transfectadas con receptores NMDA (NR1a-NR2A) (Paoletti *et al.*, 1997). El potencial de equilibrio para la corriente NMDA fue de 0 mV (Figura 4c).

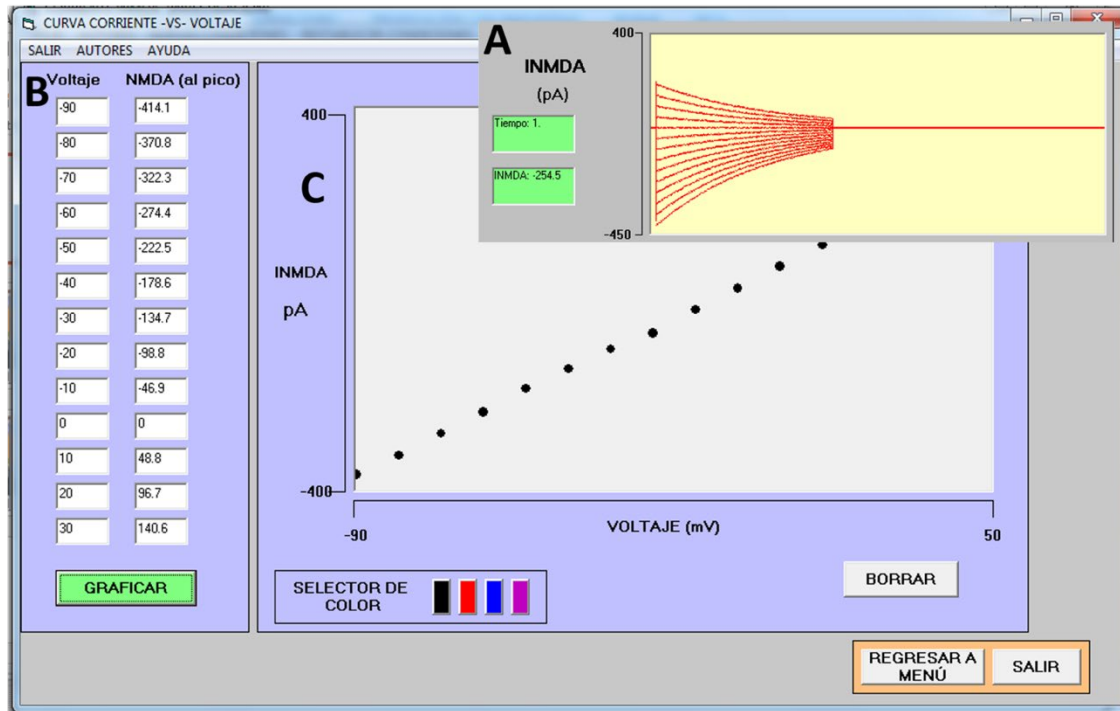


Figura 4. Interfaz de la curva I-V. Experimento sin magnesio. (A) Corrientes NMDA simuladas con voltajes de estímulo de -90 mV a $+30$ mV en pasos de 10 mV. (B) Las amplitudes pico en potenciales hiperpolarizantes son grandes debido a que no existe bloqueo por Mg^{2+} . (C) La cinética de la relación I-V es lineal.

Fuente: Elaboración propia con base en Jahr & Stevens (1990a, 1990b).

Simulación de corriente NMDA con Mg^{2+} externo 1 mM en neuronas

El Mg^{2+} externo ingresa dentro del poro del canal NMDA y lo bloquea cuando los valores de voltaje de estímulo se encuentran hiperpolarizados (entre -90 mV a -70 mV). Esta dependencia de voltaje domina el papel fisiológico de los canales NMDA (McMenimen *et al.*, 2006; Nowak *et al.*, 1984). A potenciales de reposo, la mayoría de los canales se encuentra bloqueado (no todos) y la corriente NMDA registrada es mínima. La Figura 5 muestra una simulación con $Mg^{2+} = 1$ mM y a un voltaje de estímulo de -90 mV con una duración de 3 s. En estas condiciones la corriente NMDA generada es muy pequeña (-3.1 pA), comparada con la corriente NMDA cuando el $Mg^{2+} = 0$ mM (-414.1 pA). En estas condiciones prácticamente no se presenta conductancia y no existe incremento notorio de Ca^{2+} interno.

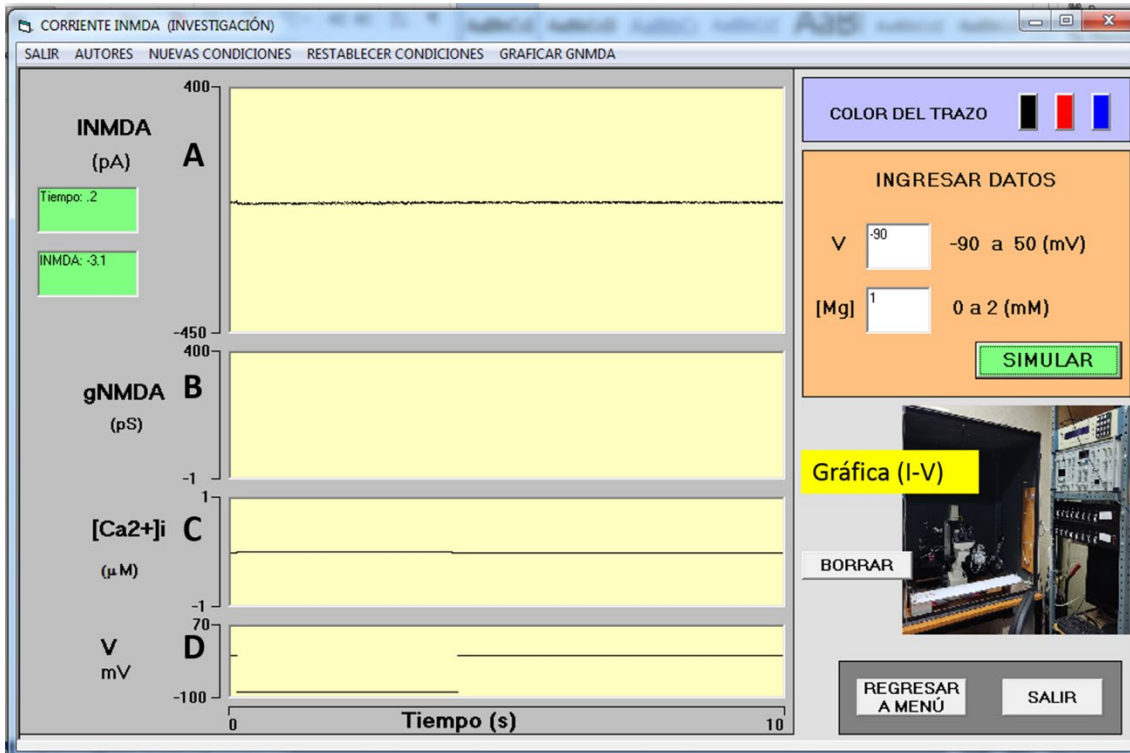


Figura 5. Interfaz del simulador NMDAR-Bloqueo Mg^{2+} y experimento con magnesio. Registro en neuronas de hipocampo con $30 \mu M$ de NMDA y $1 \mu M$ de glicina. (A) se muestra el registro de la corriente NMDA generada a un voltaje de $-90 mV$ y con $1 mM$ de magnesio. Se observa un bloqueo de la corriente NMDA, su amplitud pico solamente alcanza $-3.1 pA$ (recuadro en verde). (B) No se alcanza a ver la conductancia NMDA. (C) Prácticamente no existe incremento de calcio interno. En (D) se muestra registro del voltaje de estímulo.

Fuente: Elaboración propia con base en Jahr & Stevens (1990a, 1990b).

Se realizaron dos grupos (un grupo sin magnesio y otro con $Mg^{2+} = 1 mM$) de simulaciones con estímulos de voltaje de $-90 mV$ a $+30 mV$ con pasos de $10 mV$. Los datos fueron ingresados en la interfaz para graficar simultáneamente las curvas I-V. Las curvas resultantes se muestran en la Figura 6. Para el caso de $0 Mg$, el proceso es lineal, y para el caso de $Mg^{2+} = 1 mM$, se observa una curva no lineal con rectificación a valores hiperpolarizantes ($< -70 mV$) debido al bloqueo por Mg^{2+} externo. A partir de $-50 mV$, conforme el voltaje de estímulo es menos negativo, se desbloquea el canal NMDA y la cinética se hace lineal.

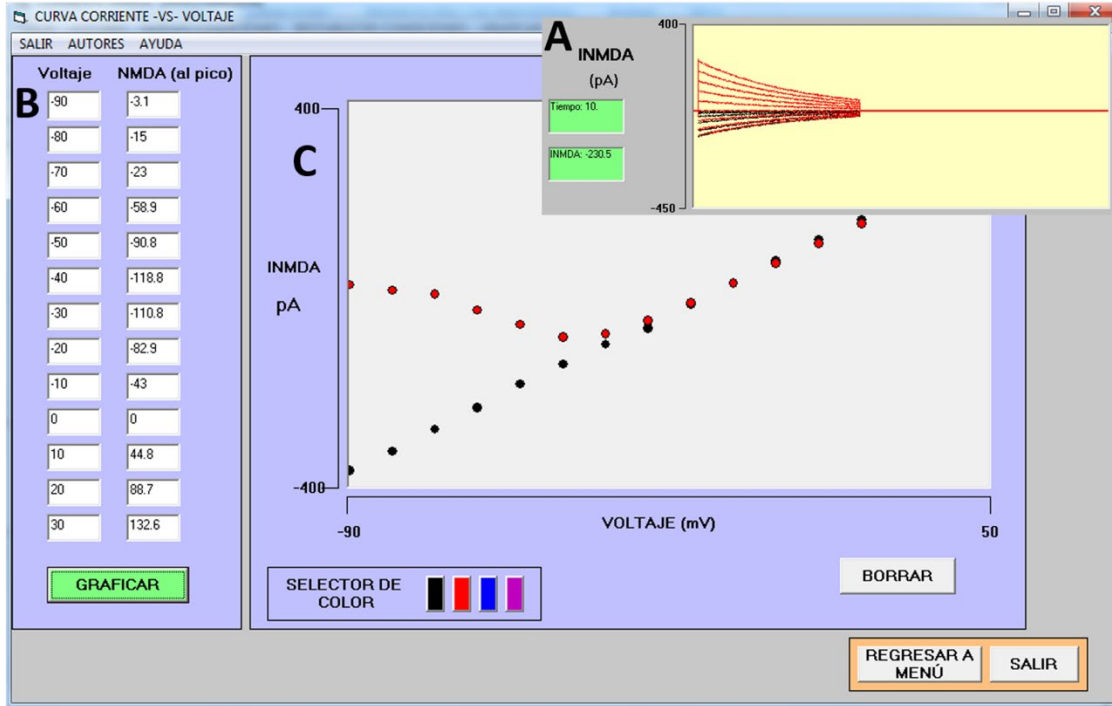


Figura 6. Interfaz de la curva I-V. (A) Experimentos sin magnesio. Se muestran las corrientes NMDA simuladas con voltajes de estímulo de -90 mV a +30 mV en pasos de 10 mV. (B) Las amplitudes pico en potenciales hiperpolarizantes (-90 mV a -70 mV) son pequeñas debido al bloqueo por Mg^{2+} . A partir de -60 mV a -30 mV se observa un incremento en la amplitud pico de la corriente NMDA (trazos en negro, A). Con valores depolarizantes a partir de -30 mV la curva se hace lineal (círculos en rojo, C, trazos en rojo en A). (B) Datos de voltaje de estímulo y corriente generada para el caso con Mg^{2+} . (C) Comparativa de las simulaciones con magnesio (círculos en rojo) y sin magnesio (círculos en negro).

Fuente: Elaboración propia con base en Jahr & Stevens (1990^a, 1990^b).

Simulador NMDAR-Glicina

Trabajos pioneros reportaron que el receptor canal NMDA se activa por la acción del glutamato en las sinapsis excitatorias del cerebro (Watkins & Evans, 1981). En ovocitos transfectados con canales NMDA se probó la participación de la glicina como un coagonista que incrementa la amplitud de la corriente NMDA (Dingledine *et al.*, 1999). Minuciosos estudios describen que el glutamato o el NMDA se une a la parte del dominio de unión al ligando (DUL) del segmento NR2, y la glicina se une al correspondiente dominio en el segmento NR1 (Traynelis *et al.*, 2010). En este simulador se usaron los datos reportados por McBain y colaboradores en ovocitos transfectados con canales NMDA y se realizaron curvas dosis respuesta variando la concentración de NMDA de 1 μM a 1000 μM para grupos de investigación con glicina: 0 μM , 0.3 μM , 1 μM y 30 μM . Las condiciones de voltaje de estímulo fueron de -60 mV y $Mg^{2+} = 1$ mM (McBain *et al.*, 1989). El simulador reproduce las amplitudes de la corriente NMDA (nA) reportadas en McBain y colaboradores. La corriente NMDA registrada presenta una corriente pico que disminuye con el tiempo (segundos). Se considera un registro con dos electrodos en el ovocito en una cámara de superfusión, donde se alcanza rápidamente la concentración adecuada de los coagonistas (NMDA y glicina) cerca del canal.

Interfaz de usuario

La Figura 7 muestra la interfaz de usuario del simulador NMDA-glicina. Del lado derecho, se encuentran tres módulos: MOD1 para seleccionar la concentración de glicina (0 μM , 0.3 μM , 1 μM y 30 μM), MOD2 para seleccionar el color del trazo y MOD3 para seleccionar la concentración de NMDA. El osciloscopio A muestra los trazos de la corriente NMDA simulada.

Modo de uso

Simulación de la corriente NMDA con glicina 1 μM en ovocito

Como ejemplo, se realizaron un grupo de simulaciones para la construcción de una curva dosis-respuesta. Las condiciones fueron glicina de 1 μM , voltaje de estímulo -60 mV y 1 mM de Mg^{2+} . Se activó el receptor NMDA con diferentes concentraciones de NMDA (10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 1000 μM). La amplitud de la corriente NMDA aumenta conforme se incrementa la concentración de NMDA. A partir de 150 μM de NMDA, la amplitud de la corriente NMDA prácticamente se mantiene sin cambio (Figura 7). La curva dosis respuesta obtenida de los datos simulados se muestra en la Figura 8. La $\text{EC}_{50} = 37.98 \mu\text{M}$.

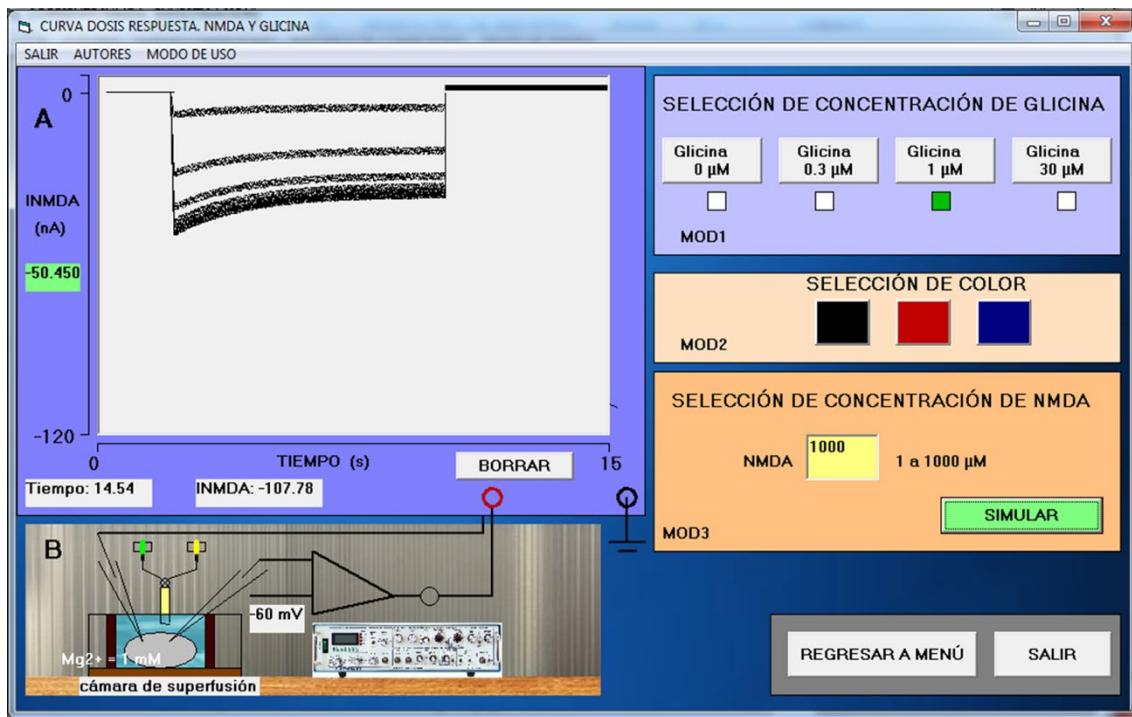


Figura 7. Interfaz del simulador NMDAR-Glicina y simulación dosis-respuesta. MOD1: módulo para seleccionar la concentración de glicina; MOD2: selector de color de trazo; MOD3: ingreso de la concentración de NMDA. (A) Osciloscopio de registro de la corriente NMDA, muestra varios trazos de corriente NMDA de simulaciones en condiciones de voltaje de estímulo en -60 mV, $\text{Mg}^{2+} = 1 \text{ mM}$, glicina = 1 μM . Se realizaron experimentos dosis-respuesta modificando la concentración de NMDA (μM): 10, 50, 100, 150, 200 y 1000. Se observa un incremento en la amplitud de la corriente conforme se incrementa la concentración de NMDA. A partir de 150 μM de NMDA, la corriente se incrementa cada vez menos, hasta llegar a un máximo.

Fuente: Elaboración propia con base en McBain *et al.* (1989).

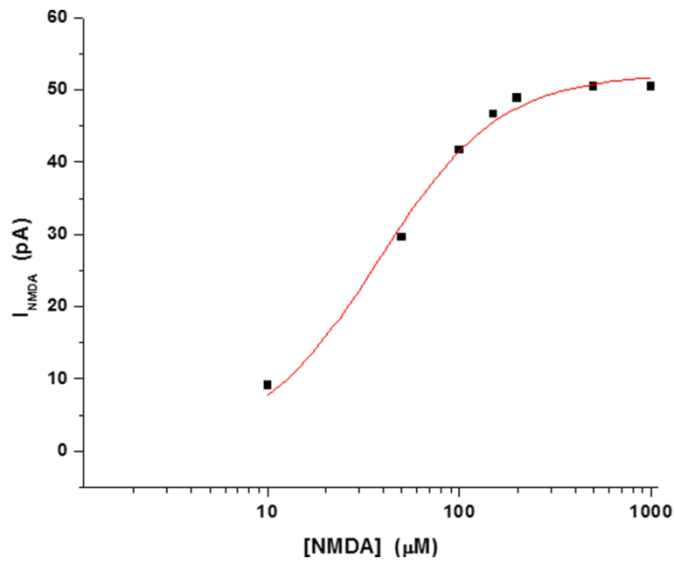


Figura 8. Curva dosis-respuesta en condiciones de glicina 1 μM . Se graficaron las amplitudes pico de las corrientes generadas en los experimentos anteriores (cuadros en negro) (Figura 7). La línea roja continua es el ajuste matemático (Boltzmann). El valor calculado para EC_{50} fue de 37.98 μM .

Fuente: Elaboración propia con base en McBain *et al.* (1989).

Simulación en ovocito de la corriente NMDA con glicina 30 μM

Se realizaron otro grupo de simulaciones para la construcción de una curva dosis- respuesta a una concentración de glicina de 30 μM ($V_h = -60 \text{ mV}$, $Mg^{2+} = 1 \text{ mM}$). La concentración de NMDA se aumenta, y con cada dosis se registra una corriente. Por ejemplo, con NMDA 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM y 1000 μM se generan las corrientes NMDA mostradas en el osciloscopio (A) (Figura 9). Se puede observar que la amplitud de la corriente es mayor que las simuladas con una concentración de glicina de 1 μM . Cada corriente presenta una cinética semejante: Iniciado el estímulo con los coagonistas, se alcanza la corriente pico que disminuye su amplitud con el tiempo (segundos). La curva dosis-respuesta se muestra en la Figura 10. La $EC_{50} = 33 \mu\text{M}$. Se trata de una EC_{50} menor que la encontrada con 1 μM de glicina. Esto significa que a mayor concentración de glicina la acción del NMDA se ve aumentada, y la corriente NMDA generada alcanza mayor amplitud para las mismas concentraciones de NMDA.

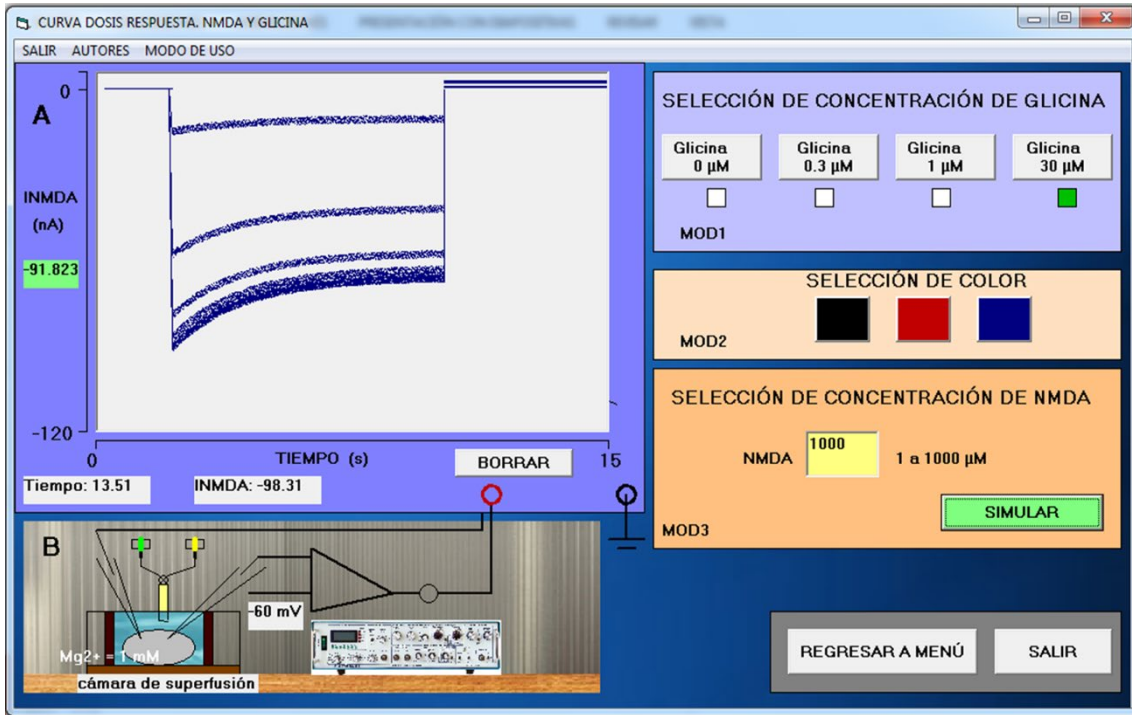


Figura 9. Simulación dosis-respuesta. Las condiciones experimentales fueron: voltaje de estímulo en -60 mV, $Mg^{2+} = 1$ mM, glicina = 30 μ M. Se realizaron experimentos dosis-respuesta modificando la concentración de NMDA: 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M y 1000 μ M. Se observa que las amplitudes de las corrientes son mayores cuando se incrementa la glicina de 1 μ M a 30 μ M.
Fuente: Elaboración propia con base en McBain *et al.* (1989).

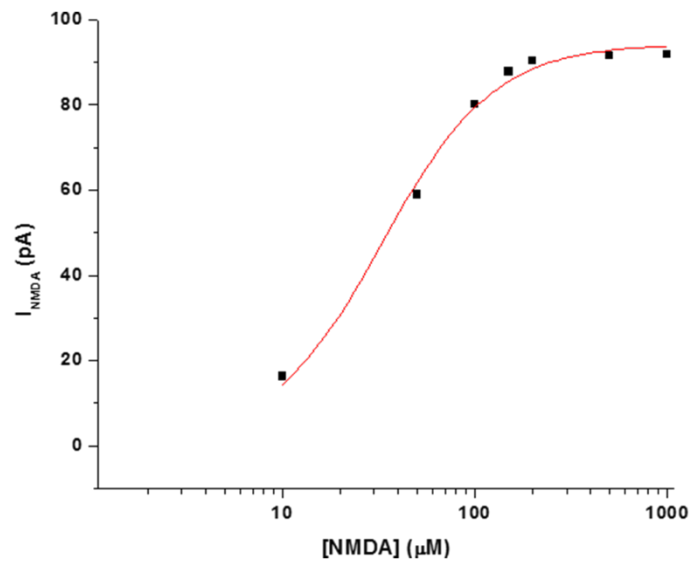


Figura 10. Curva dosis-respuesta en condiciones de glicina 30 μ M. En cuadros negros se presentan los datos experimentales simulados. La línea roja continua es el ajuste matemático (Boltzmann). El valor calculado para EC_{50} fue de 33 μ M.
Fuente: Elaboración propia con base en McBain *et al.* (1989).

Simulador NMDAR-Bloqueo Mg^{2+} en canal único

Interfaz de usuario

Trabajos tempranos fueron realizados para investigar el bloqueo del receptor NMDA por Mg^{2+} externo en canal único en neuronas de ratón (Nowak *et al.*, 1984). Las condiciones experimentales fueron: glutamato = $10 \mu M$ y $Mg^{2+} = 0 \mu M$ o $500 \mu M$. Las amplitudes máximas de la corriente NMDA en condiciones de $Mg^{2+} = 0 \mu M$ alcanzan alrededor de $20 pA$. La concentración de glutamato fue de $1 \mu M$. Se pueden realizar experimentos en dos condiciones de magnesio: $Mg^{2+} = 500 \mu M$ y $Mg^{2+} = 0 \mu M$.

La ventana de interfaz del simulador cuenta con un osciloscopio para el registro de la corriente del canal único NMDA (Un recuadro verde en el eje Y de la corriente indica la amplitud de la corriente NMDA en cada estímulo de voltaje.) Del lado derecho, se encuentra un recuadro para las curvas corriente NMDA -vs- voltaje de estímulo. En la parte inferior se muestra un módulo para ingresar datos: (1) voltaje de estímulo y (2) concentración externa de Mg^{2+} (Figura 11). Con este simulador, el alumno puede realizar la curva corriente -vs- voltaje en condiciones sin bloqueo o con bloqueo por magnesio externo. En las simulaciones se observa que la amplitud de las corrientes es mucho menor, comparada con las corrientes macroscópicas de los experimentos descritos arriba. La curva I-V sigue una cinética lineal cuando el magnesio externo es 0. Los resultados son parecidos a los obtenidos por Kloda y colaboradores en canales NMDA (NR1a-NR2A) reconstituidos en liposomas (Kloda *et al.*, 2007). La cinética de la dependencia de voltaje del bloqueo del canal NMDA es igual a la obtenida en corrientes macroscópicas.

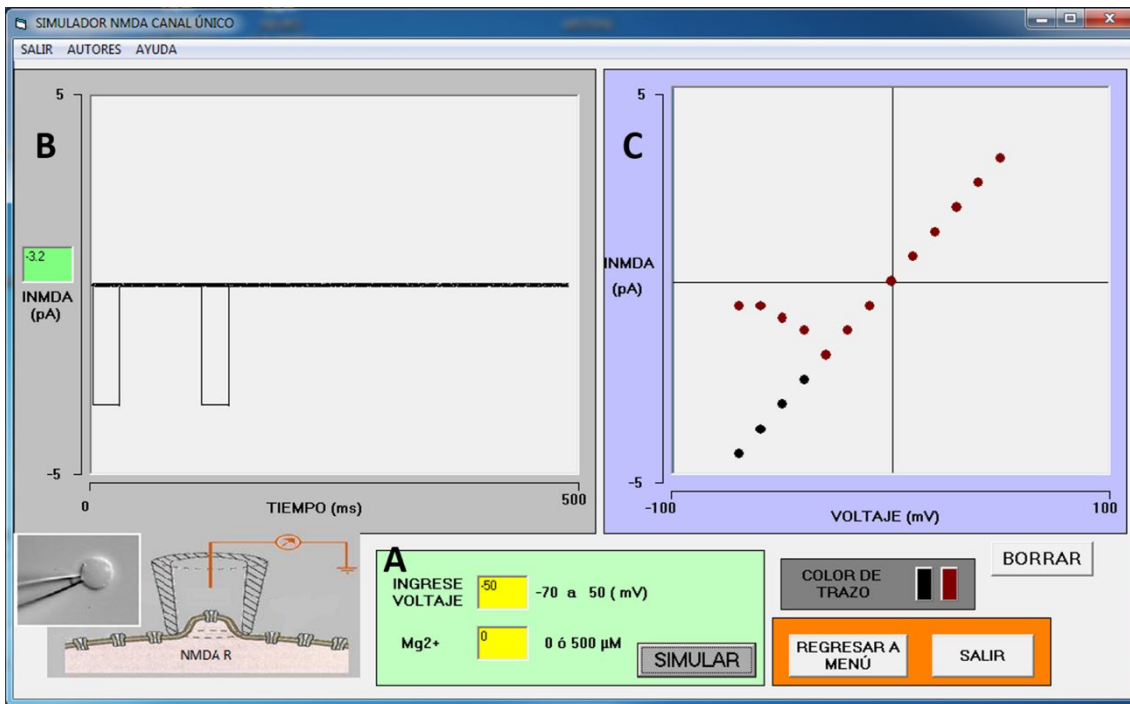


Figura 11. Interfaz del simulador NMDAR-Bloqueo Mg^{2+} en canal único. (A) módulo de entrada de datos. (B) Osciloscopio para trazos de corriente NMDA en canal único. (C) Graficado de curvas I-V. Se corrieron dos grupos de simulaciones para la construcción de las curvas I-V en condiciones con $Mg^{2+} = 0 \mu M$. Curva I-V en puntos negros (lineal), y con $Mg^{2+} = 500 \mu M$. Curva I-V en puntos rojos (no lineal). En (B), se observa la apertura de dos canales NMDA ($-3.2 pA$) con un voltaje de estímulo de $-50 mV$ y cero magnesio.
Fuente: Elaboración propia.

Discusión

El modelo matemático tipo Hodgkin y Huxley para el receptor NMDA se ha modificado para ser utilizado en diversos trabajos de investigación. Por conveniencia, los experimentos se realizan sin Mg^{2+} con la finalidad de reducir la ecuación 1. La función escalón y la función de conductancia con respecto al tiempo son sustituidas por la probabilidad de apertura del canal (P_o). Esta probabilidad es determinada con un modelo multicompartmental donde cada compartimiento representa un estado del canal como: receptor, receptor unido al ligando, cerrado 1, cerrado 2, desensibilizado, abierto, etc. Estas adecuaciones transforman al modelo en un modelo cinético (ecuación 12).

$$I_{NMDA} = g_{max} \cdot P_o \cdot (V - E_{NMDA}) \quad (12)$$

$$P_o \text{ es (Clements \& Westbrook, 1991): } C_0 \leftrightarrow C_1 \leftrightarrow \frac{C_2}{D} \leftrightarrow O$$

donde C_0 es cerrado cero, C_1 es cerrado uno, C_2 es cerrado dos, D es desensibilizado y O es abierto.

El número de compartimientos depende de la pregunta a investigar. Para el estudio de la sensibilidad y saturación del glutamato en el receptor NMDA se realizaron experimentos dosis-respuesta (Chen *et al.*, 2001). El modelaje de los resultados se realizó con un modelo cinético con cinco compartimientos (Clements & Westbrook, 1991). El valor experimental de referencia para ajustar las variables del modelo fue EC_{50} de la curva dosis-respuesta. En el caso de investigar la cinética de interacción glicina y glutamato con el receptor, se realizaron experimentos en canal único (Keller *et al.*, 2017). Para la simulación, se utilizó un modelo cinético de 15 estados que describe cada paso de la interacción (Schorge *et al.*, 2005). Singh y colaboradores estudiaron dos subtipos de receptores NMDA con modelos cinéticos de ocho compartimientos para un receptor diheteromérico y de nueve compartimientos para un receptor triheteromérico (Singh *et al.*, 2011). A mayor número de compartimientos, se incrementan las ecuaciones que se tienen que resolver simultáneamente. Para su solución se emplean cadenas de Markov y se utilizan lenguajes de programación especializados. En los ejemplos citados, se utilizaron NEURON (lenguaje especializado para neurociencias), Systems Biology Markup Language (SBML) (lenguaje especializado para cadenas de Markov) y Smoldyn (lenguaje especializado para redes de reacción bioquímica), respectivamente. En cambio, los simuladores presentados en este trabajo están diseñados para ser ejecutables y que no requieran de ningún otro programa. El tiempo de aprendizaje de su uso es muy rápido comparado con el tiempo de capacitación necesario para dominar un lenguaje especializado. Estos simuladores utilizan un modelo matemático básico que incluye el bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje y tienen como referencia la corriente pico NMDA experimentales para ajustar los valores de las variables correspondientes. Están pensados para ser utilizado en una sala de cómputo o a distancia durante la clase. Como limitaciones, se puede decir que solamente abarca los casos experimentales referidos.

Existen diferentes razones que motivan el desarrollo de *software* para la enseñanza de la electrofisiología. En primer lugar, se encuentran las características propias de la fisiología y la biofísica. La mayoría de las investigaciones efectuadas en estos campos son fuertemente cuantitativas. La medida de variables de estudio y su relación con otras propicia el surgimiento de teorías que al final llevan al planteamiento de un modelo matemático (Gavaghan *et al.*, 2006; Hodgkin & Huxley, 1952). En ciertas condiciones, la solución de estos modelos reproducen los datos experimentales (Pérez-Bonilla *et al.*, 2020); en otros casos, se pueden calcular valores de variables que no pueden ser medidas directamente. En segundo lugar, están los altos costos que implica la implementación de prácticas de laboratorio reales para la enseñanza de la fisiología y la biofísica: aparatos especializados, reactivos y drogas muy costosas (Diwakar *et al.*, 2014). En tercer lugar, se encuentra el uso indiscriminado de animales de experimentación para la enseñanza (Doke & Dhawale, 2015). Una alternativa es implementar simuladores computacionales para sustituir las prácticas de laboratorio reales (Badyal *et al.*, 2009). La utilización de modelos matemáticos ayuda a integrar los conocimientos sobre un tema en específico. Permite probar ideas sin la necesidad de utilizar modelos experimentales animales. En internet no existe un simulador del receptor NMDA con fines de enseñanza-aprendizaje. En este trabajo se diseñó y desarrolló un *software* educativo e interactivo de las funciones electrofisiológicas básicas del receptor NMDA. El simulador NMDAR-Glicina permite estudiar la interacción de NMDA y glicina con el receptor NMDA. El alumno descubre la existencia de una interacción entre el receptor NMDA con la glicina y el NMDA y observa cómo se afecta la respuesta del receptor NMDA a diferentes concentraciones. Los simuladores presentados en este trabajo permiten la reproducción de los aspectos electrofisiológicos básicos del receptor NMDA e introduce al alumno al tema mediante un aprendizaje activo.

Desde los años ochenta a la fecha, la investigación del receptor NMDA ha sido continua y profunda. Actualmente, se conoce mejor la estructura molecular del receptor canal NMDA y las afinidades del neurotransmisor (glutamato y NMDA) y del co-activador (glicina) (Chou *et al.*, 2020). Se ha encontrado afinidad de otras moléculas al sitio de la glicina (Islas *et al.*, 2022). Existe una relación entre el tipo de subunidad y la sensibilidad al Mg^{2+} (Cull-Candy *et al.*, 2001). La disminución de la sensibilidad al Mg^{2+} está implicada en alteraciones neuronales (André *et al.*, 2004). Se tiene establecido que la desensibilización del canal se debe al Ca^{2+} intracelular (Sibarov & Antonov, 2018). Se sabe que el receptor NMDA participa en diferentes alteraciones como el dolor (Martínez-Visbal *et al.*, 2020) y el Alzheimer (Zhang *et al.*, 2016), entre otras (Arundine & Tymianski, 2004). Como perspectivas del trabajo está pendiente la conclusión de un simulador que aborde la desensibilización por Ca^{2+} . El *software* se utiliza en la sala de cómputo durante el curso de biofísica. El programa de cómputo ejecutable se comparte solicitándolo al correo del autor de correspondencia para ser utilizado sin fines de lucro (no subministrar a terceros) y dando crédito a sus autores.

Conclusiones

El programa de cómputo interactivo presentado posibilita un aprendizaje activo de la electrofisiología del receptor canal NMDA. Está formado de tres simuladores. (1) El simulador NMDAR-Bloqueo Mg^{2+} permite explorar el bloqueo del Mg^{2+} sobre el poro del receptor NMDA y su dependencia con su concentración y con el voltaje. Con los datos generados, se construye la curva corriente -vs- voltaje y se analiza su cinética con y sin magnesio. Este simulador es capaz de reproducir las corrientes macroscópicas NMDA y de generar la cinética de las curvas I-V de experimentos efectuados en neuronas. (2) El simulador NMDAR-glicina permite implementar experimentos dosis-respuesta en ovocitos transfectados con receptores NMDA. Este simulador reproduce las amplitudes de los experimentos de McBain y colaboradores. Se puede explorar la activación del receptor NMDA con diferentes concentraciones de NMDA y glicina. Con los datos generados en los experimentos virtuales es posible construir curvas dosis-respuesta y realizar su análisis. (3) El simulador de canal único permite analizar de bloqueo del receptor NMDA por magnesio y su dependencia con voltaje en canal único. El programa cuenta con un leccionario para introducción al tema. El *software* se probó en ambiente Windows desde Windows 7 hasta Windows 11 en una PC con recursos mínimos: Windows®, espacio en disco de 50 MB, se visualiza mejor en una resolución de pantalla de 1366 X 768p. Este *software* educativo debe considerarse una herramienta didáctica y no sustituye al profesor.

Referencias

- Amico-Ruvio, S. A., Murthy, S. E., Smith, T. P., & Popescu, G. K. (2011). Zinc effects on NMDA receptor gating kinetics. *Biophysical Journal*, *100*(8), 1910–1918. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.042>
- André, V. M., Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Starling, A. J., Nguyen, S., Lobo, M. K., Vinters, H. V., Levine, M. S., & Mathern, G. W. (2004). NMDA receptor alterations in neurons from pediatric cortical dysplasia tissue. *Cerebral Cortex*, *14*(6), 634–646. doi: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh024>
- Arundine, M., & Tymianski, M. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *61*(6), 657–668. doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3319-x>
- Ascher, P., & Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *The Journal of Physiology*, *399*(1), 247–266. doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017078>
- Badyal, D. K., Modgill, V., & Kaur, J. (2009). Computer simulation models are implementable as replacements for animal experiments. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, *37*(2), 191–195. doi: <https://doi.org/10.1177/026119290903700208>
- Carvajal, F. J., Mattison, H. A., & Cerpa, W. (2016). Role of NMDA receptor-mediated glutamatergic signaling in chronic and acute neuropathologies. *Neural Plasticity*, *2016*, 2701526. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/2701526>
- Cepeda, C., Itri, J. N., Flores-Hernández, J., Hurst, R. S., Calvert, C. R., & Levine, M. S. (2001). Differential sensitivity of medium- and large-sized striatal neurons to NMDA but not kainate receptor activation in the rat. *European Journal of Neuroscience*, *14*(10), 1577–1589. doi: <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01783.x>
- Chaffey, H., & Chazot, P. L. (2008). NMDA receptor subtypes: structure, function and therapeutics. *Current Anaesthesia and Critical Care*, *19*(4), 183–201. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.05.004>
- Chater, T. E., & Goda, Y. (2014). The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 1–14. doi: <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00401>
- Chen, N., Ren, J., Raymond, L. A., & Murphy, T. H. (2001). Changes in agonist concentration dependence that are a function of duration of exposure suggest N-methyl-D-aspartate receptor nonsaturation during synaptic stimulation. *Molecular Pharmacology*, *59*(2), 212–219. doi: <https://doi.org/10.1124/mol.59.2.212>

- Chen, P. E., Geballe, M. T., Katz, E., Erreger, K., Livesey, M. R., O'toole, K. K., Le, P., Lee, C. J., Snyder, J. P., Traynelis, S. F., & Wyllie, D. J. A. (2008). Modulation of glycine potency in rat recombinant NMDA receptors containing chimeric NR2A/2D subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Physiology*, *586*(1), 227–245. doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.143172>
- Chou, T., Tajima, N., Romero-Hernandez, A., & Furukawa, H. (2020). Structural basis of functional transitions in mammalian NMDA receptors. *Cell*, *182*(2), 357–371. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.052>
- Clements, J. D., & Westbrook, G. L. (1991). Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron*, *7*(4), 605–613. doi: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90373-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90373-8)
- Coyle, J. T., & Tsai, G. (2004). The NMDA receptor glycine modulatory site: A therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology*, *174*, 32–38. doi: <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1709-2>
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(3), 327–335. doi: [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)
- Cummings, K. A., & Popescu, G. K. (2015). Glycine-dependent activation of NMDA receptors. *Journal of General Physiology*, *145*(6), 513–527. doi: <https://doi.org/10.1085/jgp.201411302>
- Dave, V., Shrimankar, A. D., Gokani, D., & Dashora, A. (2021). Computational modeling of NMDA receptor response in Alzheimer's disease. *Microsystem Technologies*, *27*(5), 2183–2188. doi: <https://doi.org/10.1007/s00542-020-05058-3>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *51*(1), 7–62. <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/51/1/7.short>
- Diwakar, S., Parasuram, H., Medini, C., Raman, R., Nedungadi, P., Wiertelak, E., Srivastava, S., Achuthan, K., & Nair, B. (2014). Complementing neurophysiology education for developing countries via cost-effective virtual labs: case studies and classroom scenarios. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*, *12*(2), 130–139. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970995/>
- Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *23*(3), 223–229. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpsps.2013.11.002>
- Gavaghan, D., Garny, A., Maini, P. K., & Kohl, P. (2006). Mathematical models in physiology. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *364*(1842), 1099–1106. doi: <https://doi.org/10.1098/rsta.2006.1757>
- Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Menniti, F. S., & Traynelis, S. F. (2017). NMDA receptors in the central nervous system. En J. M. Walker (ed.), *Methods in Molecular Biology* (pp. 1–80). Springer. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7321-7_1
- Harsing, L. G., & Matyus, P. (2013). Mechanisms of glycine release, which build up synaptic and extrasynaptic glycine levels: the role of synaptic and non-synaptic glycine transporters. *Brain Research Bulletin*, *93*, 110–119. doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.12.002>
- Hestrin, S., Sah, P., & Nicoll, R. A. (1990). Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocampal slice. *Neuron*, *5*(3), 247–253. doi: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90162-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90162-9)
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology*, *117*(4), 500–544. doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Iacobucci, G. J., & Popescu, G. K. (2020). Ca²⁺-dependent inactivation of GluN2A and GluN2B NMDA receptors occurs by a common kinetic mechanism. *Biophysical Journal*, *118*(4), 798–812. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.057>
- Islas, Á. A., Scior, T., Torres-Ramirez, O., Salinas-Stefanon, E. M., Lopez-Lopez, G., & Flores-Hernandez, J. (2022). Computational molecular characterization of the interaction of acetylcholine and the NMDA receptor to explain the direct glycine-competitive potentiation of NMDA-mediated neuronal currents. *ACS Chemical Neuroscience*, *13*(2), 229–244. doi: <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00639>

- Jahr, C. E., & Stevens, C. F. (1990a). A quantitative description of NMDA receptor-channel kinetic behavior. *Journal of Neuroscience*, *10*(6), 1830–1837. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-06-01830.1990>
- Jahr, C. E., & Stevens, C. F. (1990b). Voltage dependence of NMDA-activated predicted by single-channel kinetics. *Journal of Neuroscience*, *10*(9), 3178–3182. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-09-03178.1990>
- Johnson, J. W., & Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, *325*, (529–531). doi: <https://doi.org/10.1038/325529a0>
- Keller, A. F., Bouteiller, J. C., & Berger, T. W. (2017). Development of a computational approach/model to explore NMDA receptors functions. En N. Burnashev & P. Szepietowski (eds.), *Methods in Molecular Biology* (pp. 291–306). doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7321-7_17
- Kloda, A., Lua, L., Hall, R., Adams, D. J., & Martinac, B. (2007). Liposome reconstitution and modulation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels by membrane stretch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(5), 1540–1545. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0609649104>
- Kuner, T., & Schoepfer, R. (1996). Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg²⁺ block in NMDA receptor channels. *Journal of Neuroscience*, *16*(11), 3549–3558. doi: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-11-03549.1996>
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., & Mishina, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*, *358*, 36–41. doi: <https://doi.org/10.1038/358036a0>
- Laube, B., Kuhse, J., & Betz, H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *Journal of Neuroscience*, *18*(8), 2954–2961. doi: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-08-02954.1998>
- Li, R., Huang, F., Abbas, A., & Wigström, H. (2007). Role of NMDA receptor subtypes in different forms of NMDA-dependent synaptic plasticity. *BMC Neuroscience*, *8*(55), 1–12. doi: <https://doi.org/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. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(FEB), 1–22. doi: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00043>
- Martínez-Visbal, A., Fernández-Delgado, A., & Zarza-Zúñiga, M. (2020). NMDA receptors: foundations and therapeutic implications in the management of pain. *Revista Chilena de Anestesia*, *49*(5), 632–639. doi: <https://doi.org/10.25237/REVCHILANESTV49N05-07>
- McBain, C. J., Kleckner, N. W., Wyrick, S., & Dingledine, R. (1989). Structural requirements for activation of the glycine coagonist site of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Molecular Pharmacology*, *36*(4), 556–565. doi: <https://molpharm.aspetjournals.org/content/36/4/556.short>
- McMenimen, K. A., Dougherty, D. A., Lester, H. A., & Petersson, E. J. (2006). Probing the Mg²⁺ blockade site of an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor with unnatural amino acid mutagenesis. *ACS Chemical Biology*, *1*(4), 227–234. doi: <https://doi.org/10.1021/cb6000944>
- Morris, R. G. M. (2013). NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*, *74*, 32–40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.014>
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, *307*, 462–465. doi: <https://doi.org/10.1038/307462a0>
- Paoletti, P., Ascher, P., & Neyton, J. (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *Journal of Neuroscience*, *17*(15), 5711–5725. doi: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-15-05711.1997>
- Papp, A., Juranyi, Z., Nagymajtenyi, L., Matyus, P., & Harsing, L. G. (2008). The synaptic and nonsynaptic glycine transporter type-1 inhibitors Org-24461 and NFPS alter single neuron firing rate in the rat dorsal raphe nucleus: further evidence for a glutamatergic-serotonergic interaction and its role in antipsychotic action. *Neurochemistry International*, *52*(1), 130–134. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.030>
- Pérez-Bonilla, M. E., Reyes-Monreal, M., Pérez-Escalera, M. F., & Reyes-Lazalde, A. (2020). Set of simulators of the electrophysiology of the A-type potassium current (IA) in neurons. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, *41*(3), 28–39. doi: <https://doi.org/10.17488/RMIB.41.3.2>

- Schorge, S., Elenes, S., & Colquhoun, D. (2005). Maximum likelihood fitting of single channel NMDA activity with a mechanism composed of independent dimers of subunits. *Journal of Physiology*, 569(2), 395–418. doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.095349>
- Sibarov, D. A., & Antonov, S. M. (2018). Calcium-dependent desensitization of NMDA receptors. *Biochemistry (Moscow)*, 83, 1173–1183. doi: <https://doi.org/10.1134/S0006297918100036>
- Sibarov, D. A., Poguzhelskaya, E. E., & Antonov, S. M. (2018). Downregulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization by sodium-calcium exchangers: a role of membrane cholesterol. *BMC Neuroscience*, 19(1), 1–9. doi: <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0475-3>
- Singh, P., Hockenberry, A. J., Tiruvadi, V. R., & Meaney, D. F. (2011). Computational investigation of the changing patterns of subtype specific NMDA receptor activation during physiological glutamatergic neurotransmission. *PLoS Computational Biology*, 7(6). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002106>
- Sterratt, D., Graham, B., Gillies, A., & Willshaw, D. (2011). *Principles of computational modelling in neuroscience*. Cambridge University Press.
- 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., & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496. doi: <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Watkins, J. C., & Evans, R. H. (1981). Excitatory amino acid transmitters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 21, 165–204. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.21.040181.001121>
- Zhang, L., Rzigalinski, B. A., Ellis, E. F., & Satin, L. S. (1996). Reduction of voltage-dependent Mg²⁺ blockade of NMDA current in mechanically injured neurons. *Science*, 274(5294), 1921–1923. doi: <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1921>
- Zhang, Y., Li, P., Feng, J., & Wu, M. (2016). Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*, 37(7), 1039–1047. doi: <https://doi.org/10.1007/s10072-016-2546-5>
- Zhou, Q., & Sheng, M. (2013). NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology*, 74, 69–75. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.030>