

Evaluación de la expresión de subunidades recombinantes del receptor NMDA en la línea celular HEK-293.

Evaluation of recombinant NMDA receptor subunit expression in the HEK-293 cell line

Stephany Valentina Duque Guevara

Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.

Dirigido por:
Edwin Alfredo Reyes Guzmán PhD.
Laura Inés Cuervo Soto PhD.

2023

Evaluación de la expresión de subunidades recombinantes del receptor NMDA en la línea celular HEK-293.

Evaluation of recombinant NMDA receptor subunit expression in the HEK-293 cell line

Stephany Valentina Duque Guevara

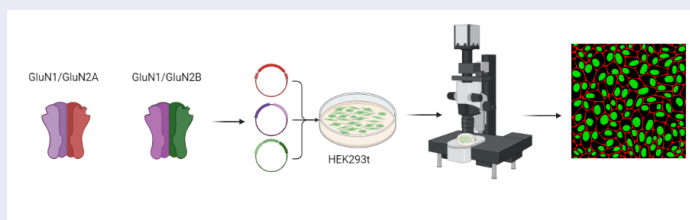
Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.

*Dirigido por:
Edwin Alfredo Reyes Guzmán PhD.
Laura Inés Cuervo Soto PhD.*

2023

Graphical Abstract (GA)

GA Figura:



GA Texto: Evaluación de la expresión de subunidades recombinantes del receptor NMDA en la línea celular HEK-293.

Resumen

El receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) desempeña un papel crucial en la función sináptica y la plasticidad neuronal, pero su hiperactivación puede llevar a la excitotoxicidad, un fenómeno implicado en diversas enfermedades neurodegenerativas. En este contexto, el uso de péptidos derivados de toxinas animales ha surgido como una estrategia prometedora para modular selectivamente la actividad del receptor NMDA y contrarrestar la excitotoxicidad. Estos péptidos, provenientes de diversas fuentes como serpientes y arañas, actúan como ligandos específicos del receptor NMDA y pueden funcionar como agonistas, antagonistas o moduladores alostéricos, interactuando con diferentes sitios de unión en el receptor. Su capacidad para modular la actividad del receptor NMDA con alta especificidad y afinidad los convierte en herramientas valiosas para investigar la función y la regulación de este receptor. Para evaluar los efectos de los péptidos en el receptor NMDA, se han utilizado sistemas de expresión recombinante de las subunidades del receptor en células heterólogas. Mediante la sobreexpresión de subunidades recombinantes del receptor NMDA, se han estudiado los efectos de los péptidos sobre la función del receptor, la cinética de la corriente iónica y la respuesta sináptica, proporcionando información detallada sobre su actividad y mecanismos de acción. En este trabajo se evaluó la expresión de las subunidades recombinantes del receptor NMDA (GluN1/GluN2A) y (GluN1/GluN2B) en la línea celular HEK293t como estudio preliminar para posteriormente evaluar la especificidad del péptido Pb53a, el cual fue diseñado a partir del veneno de la araña colombiana *Phoneutra boliviensis*.

Abstract

The NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor plays a crucial role in synaptic function and neuronal plasticity, but its hyperactivation can lead to excitotoxicity, a phenomenon implicated in several neurodegenerative diseases. In this context, the use of peptides derived from animal toxins has emerged as a promising strategy to selectively modulate NMDA receptor activity and counteract excitotoxicity. These peptides, from diverse sources such as snakes and spiders, act as specific ligands of the NMDA receptor and can function as agonists, antagonists or allosteric modulators, interacting with different binding sites on the receptor. Their ability to modulate NMDA receptor activity with high specificity and affinity makes them valuable tools for investigating NMDA receptor function and regulation. To assess the effects of peptides on the NMDA receptor, recombinant expression systems of the receptor subunits in heterologous cells have been used. By overexpressing recombinant NMDA receptor subunits, the effects of peptides on receptor function, ionic current kinetics and synaptic response have been studied, providing detailed information on their activity and mechanisms of action. In this work, the expression of recombinant NMDA receptor subunits (GluN1/GluN2A) and (GluN1/GluN2B) was evaluated in the HEK293t cell line as a preliminary study to subsequently evaluate the specificity of the Pb53a peptide, which was designed from the venom of the Colombian spider *Phoneutra boliviensis*.

Palabras clave

Receptor NMDA, transfección, subunidades recombinantes.

Keywords

NMDA receptor, transfection, recombinant subunits.

1. Introducción

A lo largo del tiempo se han estudiado las enfermedades cardiovasculares (ECV), estas conforman un grupo de cambios fisiológicos que afectan el sistema circulatorio. Entre estos se encuentran los accidentes cardiovasculares (ACV), que pueden ser hemorrágicos o isquémicos. En este caso nos enfocaremos en la problemática del accidente cardiovascular isquémico que es considerado la enfermedad neurológica más incapacitante. El ACV isquémico es causado por la obstrucción del flujo sanguíneo, agotamiento de las reservas de energía como la glucosa y el oxígeno provocando daño neuronal y lisis (Puentes Madera, IC 2014), lo que conduce a la liberación excesiva de varias moléculas, incluido el neurotransmisor glutamato, provocando una sobreestimulación en los canales iónicos, principalmente el receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA) afectando los niveles del Ca^{2+} .

El glutamato es el neurotransmisor más abundante en el cerebro, desempeña un papel crucial a nivel neurobiológico, y se dirige a dos familias de receptores: receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR) y receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) asociados a las membranas de las neuronas pre y postsinápticas en el sistema nervioso central (SNC), en especial actúa como principal neurotransmisor por estimulación de neuronas postsinápticas. (Collingridge-G,L *et al.*, 2009; Medina Marín *et al.*, 2002; Paoletti, P *et al.*, 2013;Retallack, G. J *et al.*, 2002; Watkins, J. C *et al.* , 2006). A su vez se clasifican como receptores N -metil-D-aspartato (NMDAR) y no NMDA: receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y receptores de Kainato (Pierre Paoletti *et al.*, 2013; Traynelis *et al.*, 2010). Los iGluR de tipo NMDA están involucrados en la plasticidad sináptica y son esenciales para procesos moleculares del aprendizaje y memoria, son canales iónicos que permiten la entrada de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Myers *et al.*, 2019; XiangWei *et al.*, 2018).

La elevada concentración del ión Ca^{+2} intracelular activa varias cascadas enzimáticas dependientes de calcio, como las calmodulinas, las fosfolipasas, proteína kinasa C (PKC), proteasas, óxido nítrico sintasa (NOS) y la generación de radicales libres. Varios de estos procesos, en conjunto con la producción de ácido araquidónico y factores activadores de plaquetas promueven la liberación de más glutamato extracelular capaz de mantener la estimulación de los receptores y por consiguiente elevar el daño neuronal (Gill S et al., 2001).

El interés por los receptores NMDA se incrementó una vez identificados los agonistas, coagonistas y antagonistas (Li, Krupa, Kang, Bolshakov, & Liu, 2009). Además el diseño de fármacos clínicos con la capacidad de bloquear los receptores de glutamato surgen como iniciativa de tratar la epilepsia, espasticidad y prevención del daño isquémico por medio de la neuroprotección (Ej, un derrame cerebral y lesión en la cabeza o la columna vertebral (Tomek, Lacrosse, Nemirovsky, & Olive, 2013). Antagonistas dirigidos bien sea, al sitio de unión de glutamato, al sitio de unión de la glicina, al sitio de unión al canal iónico o sitios de regulación alostérica del receptor. Sin embargo, estos acercamientos no han sido totalmente efectivos (Traynelis *et al.* 2010; Kotermanski, S *et al.* 2009).

Los NMDAR están compuestos de tres subunidades: GluN1, GluN2 y GluN3 (Myers et al., 2019), se encuentran con mayor frecuencia en forma de diheterotetrámero compuestos por dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2, donde la subunidad GluN1 es producto del gen GRIN1 expresado en todo SNC y contiene un sitio de unión a glicina (XiangWei et al., 2018); por otro lado la unión del glutamato a NMDAR ocurre en la subunidad GluN2, la cual se encuentra en cuatro isoformas: GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D (codificadas por genes de GRIN 2A, 2B, 2C y 2D respectivamente); esta subunidad presenta gran variedad en cuanto perfiles de expresión espacial, junto a distintas propiedades farmacológicas y biofísicas, lo que

sugiere que la desregulación de diferentes subunidades de GluN2 puede ocasionar patologías distintas (Vance, Hansen, & Traynelis, 2012).

En estudios realizados por Estrada-Gómez *et al.*, 2015, reportaron en el veneno de la araña colombiana *Phoneutria boliviensis*, la presencia de dos péptidos: Ctenitoxina-Pb48 y Ctenitoxina-Pb53. Estos dos péptidos tienen homología con péptidos que interactúan con el receptor NMDA, por lo que infieren que podrían tener algún tipo de interacción y efecto sobre el receptor. Sin embargo, la secuencia de los péptidos Ctenitoxina-Pb48 y Ctenitoxina-Pb53 no fue elucidada completamente, por lo que Carvajal J y Reyes-Guzmán propusieron una secuencia a partir de estudios *in silico*, específicamente la secuencia CDLAMGNCICK para la Ctenitoxina-Pb48 y denominada como Pb48 y la secuencia ESNFKIGMAIR para Ctenitoxina-Pb53 denominada Pb53a “(Tesis pregrado, 2020)”. Posteriormente, Bermúdez S, Villate S y Reyes-Guzmán realizaron un análisis de la citotoxicidad del péptido sintético Pb53a en la línea celular HEK293, en donde los resultados indicaron que dicho péptido no tenía efecto significativo que afectará la viabilidad de la línea celular HEK-293 “(Tesis pregrado, 2021)” y en modelos *in vitro* que expresen las subunidades GluN2B como lo son las neuronas hipocámpales de rata. “(Tesis pregrado, 2022)”.

En este estudio se evaluó la eficiencia en la transfección de subunidades recombinantes del receptor NMDA (GluN1/GluN2A) y (GluN1/GluN2B) en la línea celular HEK293, estandarizando un protocolo de purificación de DNA plasmídico.

2. Materiales y métodos

2.1 Plásmidos

Los vectores de expresión denominados pcDNA3.1, pcDNA 1.1 y pRK5 (Addgene-Cambridge, MA), conteniendo las subunidades del NMDAR de rata GluN1, GluN2A y GluN2B y acopladas a la proteína verde fluorescente GFP, fueron utilizados para transfectar células HEK-293 y evaluar su expresión.

2.2 Purificación de los plásmidos

Durante la extracción del ADN plasmídico, este suele estar acompañado de diversos contaminantes, como proteínas celulares, enzimas, restos de ARN y productos de reacción enzimática, los cuales pueden afectar negativamente la eficiencia de las transfecciones y la estabilidad del ADN plasmídico, así como interferir en los análisis posteriores. Así mismo, concentrar el ADN plasmídico es esencial para asegurar una dosis adecuada en los experimentos de transfección. Un ADN plasmídico de alta calidad es más estable y menos propenso a la degradación, lo que garantiza la eficiencia y reproducibilidad de los experimentos (Stadler *et al.*, 2004; Andreou LV., 2013).

Con el fin de obtener el DNA plasmídico de las subunidades recombinantes del NMDAR, se utilizó el protocolo de lisis alcalina, siguiendo las indicaciones de (Maniatis Molecular Protocols). Inicialmente, se preparó un cultivo de las bacterias que contenían el plásmido en caldo nutritivo incubado durante 24 horas a 35°C. Las células fueron obtenidas por centrifugación a 8000 g por 5 minutos. A cada tubo se le añadieron 100 µL de la solución I (Glucosa a 50 mM, de TrisCL a 25 mM y de EDTA a 10 mM a un pH de 8,0), y fue agitado en vortex, luego, se añadió 200 µL de la solución II (SDS 1 % (w/v) y NaOH a 0,2 N), se mezcló suavemente por inversión y se adicionó 150 µL de la solución III (acetato de Potasio a 5 M, agua

y ácido acético glacial a 3 M), se mezclaron fuertemente por inversión en 10 tiempos. Se dejaron en la nevera 5 minutos. Transcurrido este lapso de tiempo fueron centrifugados nuevamente durante 5 min a una temperatura de 4°C a 13000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le agregó 1 mL de etanol al 100%. Posteriormente, se centrifugó bajo las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con etanol al 70%. Los tubos fueron colocados con la tapa abierta de manera invertida sobre toalla de papel para recoger el etanol sobrante, posterior a esto se dejó evaporar durante 3 min. Finalmente, el pellet de DNA plasmídico se resuspendió en 30µL de agua destilada esteril, y se almacenó a -20°C. Con el fin de verificar la presencia del DNA plasmídico se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se cuantificó en un nanodrop serie DS-11 de la marca Denovix.

2.3 Cultivo celular de la línea HEK293

Para el cultivo celular se usó la línea celular eucariótica adherente de riñón de embrión humano ó HEK-293 (Human Embryonic Kidney, ATCC, Manassas, VA) por sus siglas en inglés. Los cultivos celulares se mantuvieron de forma rutinaria en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado (Thermo Fisher) soportado con antibiótico 1% Pen/strep y 10% de Suero fetal bovino (SFB). Las células se cultivaron en frascos de cultivo celular de cuello inclinado rectangular (flask) (Thermo Fisher Scientific) de 75 cm². Cultivos con una confluencia del 80% se tripsinizaron y se realizó el correspondiente pase celular según la relación de siembra haciendo conteo celular por el método de exclusión de azul de tripán. Las células se mantuvieron en una incubadora de cultivo celular con una temperatura de 37 °C en 5% de CO₂ y aire humidificado.

2.4 Expresión de subunidades recombinantes del NMDAR

Un día antes de la transfección, se sembraron 64.000 células HEK293 en 500 μL /pozo de medio DMEM high glucose (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum, HI FBS, Invitrogen), para que las células tengan una confluencia del 70-90 % en el momento de la transfección. Se sembraron las células en laminillas de vidrio previo recubrimiento con Poli-D-Lisina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en 18 pozos de placa de 24 pozos empleando 9 pozos para la subunidad GluN2A y los 9 restantes para la subunidad GluN2B y se incubaron a 37°C, 5% CO_2 y 95% de humedad. Transcurrido este tiempo se trasfectaron las células HEK293 con cada uno de los plásmidos, usando lipofectamina 2000 (Invitrogen), para ello se rotularon 2 tubos eppendorf para GluN2A y GluN2B, se añadieron a cada uno 900 μL de medio Opti-MEM, 4 μL de la subunidad GluN1 en cada tubo, 10 μL GluN2A y 14 μL GluN2B respectivamente, por último se añadieron 15,75 μL de lipofectamina 2000, se agitó suavemente los tubos y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se agregaron 100 μL de la mezcla respectiva a los los pozos de la subunidad correspondiente, se mezcló suavemente la placa y se incubó manteniendo las condiciones antes mencionadas durante 4 h.

Transcurrido este lapso de tiempo se preparó una solución de 5 mL de medio DMEM suplementado y 24 μL de ketamina con el fin de disminuir la citotoxicidad de las células HEK-293 por acción del NMDAR. Se retiraron 250 μL de cada uno de los 18 pozos y se agregaron 250 μL de la mezcla previamente preparada y se incubaron durante 24 horas a 37°C, 5% CO_2 y 95% de humedad.

Una vez realizada la transfección y culminado este tiempo se evidenció que el proceso fue eficiente mediante detección de fluorescencia de la proteína reportera (EGFP) empleando un microscopio de fluorescencia Invitrogen EVOS - M7000.

3. Resultados y Discusión

3.1. Purificación del DNA plasmídico que contiene los genes GluN1a, GluN2A y GluN2B del receptor NMDA.

Durante la preparación del ADN plasmídico, es esencial eliminar el ADN genómico de las bacterias, el cual puede interferir en las reacciones de transfección (Burrell, M. M. 2003; Ausubel et al., 2005). En este trabajo se realizó la purificación del ADN plasmídico de las subunidades GluN1a, GluN2A y GluN2B del receptor NMDA, utilizando el protocolo de lisis alcalina (Maniatis Molecular Protocols). El DNA plasmídico obtenido fue verificado en gel de agarosa al 1% para determinar su integridad. La figura 1 muestra bandas únicas para cada plásmido, lo que determina un DNA plasmídico de calidad para ser usado en el proceso de transfección. Por otra parte, se determinó la concentración usando nanodrop, las cuales estuvieron en rango de 234 a 4121 ng/ μ L y su relación 260/280 (1.8 a 2.0) (tabla 2), lo que determina un DNA plasmídico óptimo para ser usado en la transfección.

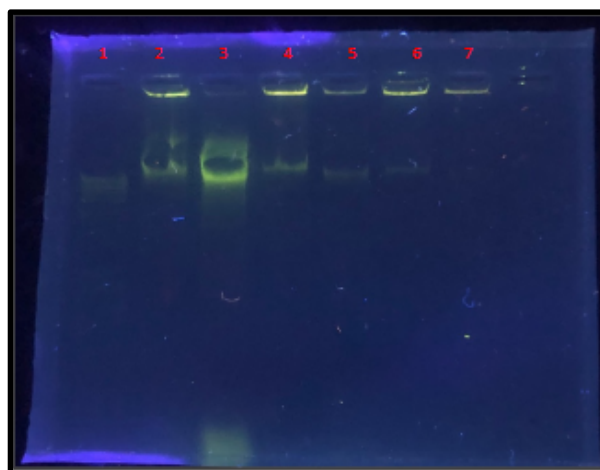


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1% DNA plasmídico subunidades recombinantes del NMDAR. Carril 1: Marcador de peso. Carriles 2 y 3: Subunidad GluN1a. Carriles 4 y 5: Subunidad GluN2A. Carriles 6 y 7: Subunidad GluN2B.

Tabla 1. Concentración DNA plasmídico de las subunidades recombinantes NMDAR

Plásmido	Concentración ng/μL	Relación 260/280
GluN1	418,105	1,8
GluN1	4121,105	2,1
GluN2A	389,469	1,6
GluN2A	689,400	1,7
GluN2B	476,379	1,7
GluN2B	234,300	1,7

3.2 Estandarización y mantenimiento de un cultivo de la línea celular HEK-293t.

Con el fin de expresar los genes de las subunidades del receptor NMDAR presentes en el DNA plasmídico previamente purificado, fue necesario realizar un cultivo de la línea celular HEK-293t. La línea celular fue escogida debido a que no es una línea neuronal y se buscó expresar subunidades del receptor neuronal lo cual permite hacer análisis de especificidad. Las células HEK293t son altamente susceptibles a la transfección, esto las hace adecuadas para la expresión y producción de proteínas recombinantes, así como para estudios de señalización celular y manipulación genética. Las células HEK293t son adherentes y se pueden mantener en medios de cultivo estándar. Además, tienen una tasa de crecimiento rápida, lo que permite obtener grandes cantidades de células en poco tiempo.

Teniendo en cuenta lo anterior se realizaron varios cultivos celulares los cuales fueron correspondientes con la morfología celular de la línea y estuvieron libres de contaminación (Figura 2).

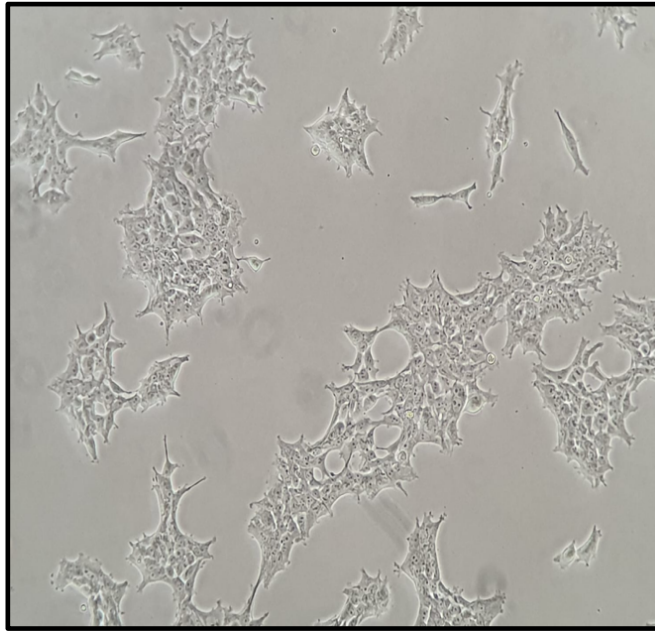


Fig. 2. Células HEK-293t pase 3 magnificación 10x 48 horas desde la siembra

Además, se obtuvo una viabilidad entre 97%-100% (Figura 3), puesto que el mantenimiento de estas fue eficaz y no hubo gran porcentaje de muerte celular.

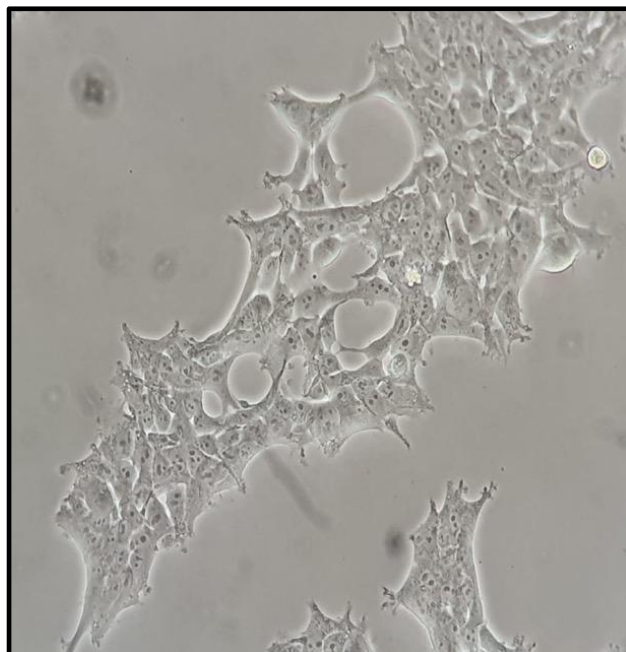


Fig. 3. Células HEK-293t pase 3 magnificación 20x 48 horas desde la siembra

3.3. Expresión de las subunidades recombinantes del receptor NMDA (GluN1/GluN2A) y (GluN1/GluN2B) en la línea celular HEK293t.

Al tener unas células con morfología adecuada y buena viabilidad se procedió a realizar la expresión de las subunidades recombinantes del receptor NMDA por medio de la técnica de transfección empleando un kit de lipofectamina 2000.

El análisis de las diferentes combinaciones de subunidades del receptor NMDA es crucial para comprender su diversidad funcional y su importancia en el sistema nervioso. La combinación de diferentes subunidades del receptor NMDA influye en sus propiedades funcionales, como la afinidad por los ligandos, la cinética de la corriente iónica y la respuesta sináptica. Además, las diferentes combinaciones de subunidades se expresan de manera heterogénea en regiones cerebrales específicas y en diferentes etapas del desarrollo neuronal, lo que confiere una diversidad funcional a los receptores NMDA. Por tanto, en este trabajo se buscó la expresión de las siguientes combinaciones de subunidades; (GluN1/GluN2A) y (GluN1/GluN2B). Cada gen de las subunidades está además fusionado con el gen de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). Cabe resaltar que la proteína verde fluorescente es un marcador de expresión que se excita a una longitud de onda de 489 nm y emite fluorescencia a 511 nm, esto debido a la formación del núcleo fluorescente conjugado por los aminoácidos glicina, tirosina y treonina. Por tanto, si después de la transfección hay emisión de fluorescencia se puede inferir que las subunidades del receptor NMDA fueron expresadas y se ensamblan de acuerdo con las combinaciones después de los procesos de n, traducción, y tráfico de proteínas.

Al evaluar cada una de las transfecciones, se puede ver que la expresión de la subunidad recombinante GluN1/GluN2A fue satisfactoria. Mediante el análisis de las imágenes en microscopía de fluorescencia se observa que un 90% de las células HEK-293t emiten

fluorescencia (Figura 4).

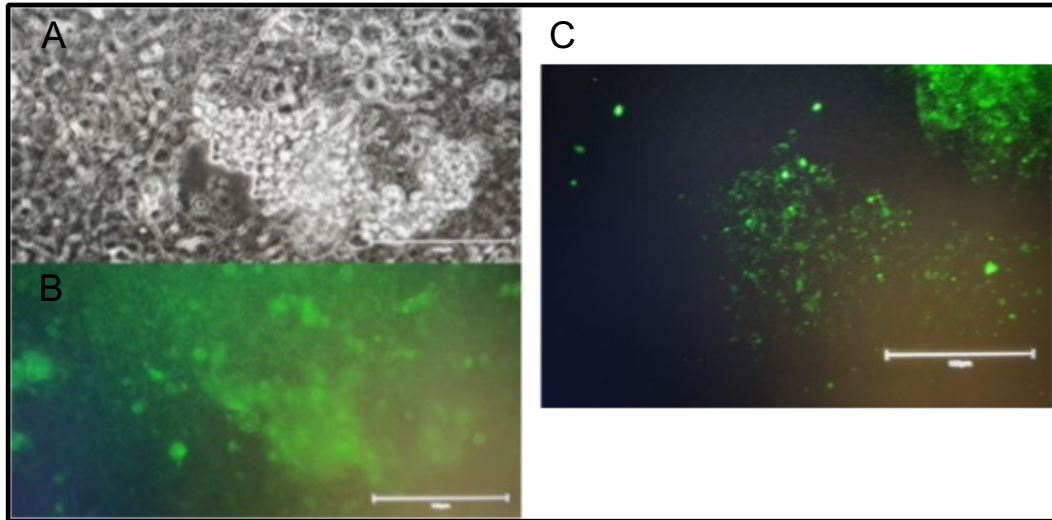


Fig. 4.A) Células HEK-293t sin estímulo de fluorescencia. B) Células HEK-293t emitiendo fluorescencia
C) Observación microscopía de fluorescencia células HEK-293t subunidades recombinantes GluN1/GluN2A

Así mismo, se logró la expresión de la subunidad recombinante GluN1/GluN2B , estimando un 90% de eficiencia en la transfección, en las zonas analizadas se observan cúmulos de células producto de la siembra emitiendo fluorescencia y de igual forma células aisladas expresadas de forma satisfactoria (Figura 5).

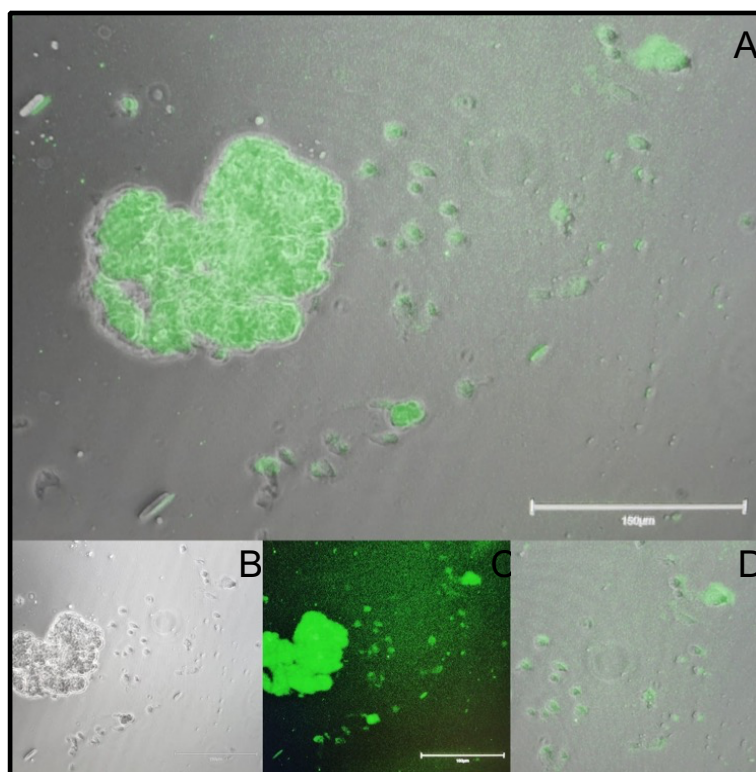


Fig. 5. A) Células HEK-293t emitiendo fluorescencia. B) Células HEK-293t sin estímulo de fluorescencia C) Observación microscopía de fluorescencia células HEK-293t subunidades recombinantes GluN1/GluN2B D) células HEK-293t aisladas.

Si bien a partir del marcador de expresión se puede inferir la expresión de las subunidades recombinantes, es necesario evaluar si en efecto las subunidades del receptor NMDA se ensamblaron en la membrana celular y si son funcionales.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se espera continuar con los estudios que permitan identificar la funcionalidad de estas subunidades recombinantes sobre el receptor NMDA por medio de la técnica de electrofisiología que permitirá medir el flujo del ion Ca^{2+} y definir la especificidad del péptido Pb53a sobre las subunidades (GluN1/GluN2A) y (GluN1/GluN2B).

4. Conclusiones

1. Se logró la purificación del ADN plasmídico de cada una de las subunidades del receptor

NMDA de forma independiente (GluN1a, GluN2A y GluN2B), cuyas concentraciones fueron 4.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la subunidad GluN1a, de 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para GluN2A y 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de GluN2B.

2. Los cultivos celulares de la línea HEK293 se mantuvieron en muy buenas condiciones de acuerdo con su morfología, comportamiento y libres de contaminación.
3. La transfección y expresión tanto de las subunidades del receptor NMDA como de la proteína EGFP fue exitosa evidenciado por la fluorescencia verde característica.
4. A través del análisis de imágenes en microscopía de fluorescencia se pudo estimar que el porcentaje de la transfección en las zonas evaluadas fue mayor al 90%.

5. Agradecimientos

Al proyecto “Diseño, síntesis y evaluación de péptidos moduladores de la actividad del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA)”, código 57069, financiado por Minciencias, por los recursos aportados para el desarrollo de este trabajo de grado. Agradezco a mis directores el Dr. Edwin Alfredo Reyes y la Dra. Laura Inés Cuervo por las asesorías, guías y apoyo que me brindaron durante todo este proceso, de igual manera agradezco al grupo de investigación de Biología celular y Funcional e Ingeniería de Biomoléculas en la línea de investigación de Biología de Membranas: Canales Iónicos y Modelos de Fisiopatologías Celulares de la Universidad Antonio Nariño por brindarme los medios para realizar este proyecto.

A todos los docentes que hicieron parte de mi aprendizaje brindando sus conocimientos que enriquecieron mi discernimiento, asimismo a mis compañeros quienes estuvieron presentes en mi proceso.

A mi mamá Adriana Guevara, por ser mi mayor apoyo e inspiración, quien con su amor acompañó cada uno de mis aciertos y caídas. Además, a mi hermano Andrés Duque quien es mi mayor motivación, y la persona por la cual busco ser cada día mejor, igualmente a mi abuelo Arturo Guevara, que creyó en mí y siempre estuvo orgulloso de cada paso dado. A mi papá Fredy Duque por sus consejos y apoyo, de igual forma a toda mi familia quienes estuvieron pendientes de cada etapa.

A mi novio Nicolás Patiño quien fue una pieza muy importante en este proceso, puesto que estuvo animándome y apoyándome.

A el FIDIC, institución que me brindó la oportunidad de hacer mis prácticas profesionales en donde perfeccioné mi trabajo práctico y conocí a Melissa Puerto quien me brindó conocimiento para mi enriquecimiento personal y profesional que hace parte de lo que soy ahora.

6. Referencias

Amico-Ruvio, S. A., Paganelli, M. A., Myers, J. M., & Popescu, G. K. (2012). Ifenprodil effects on GluN2B-containing glutamate receptors. *Molecular Pharmacology*, 82(6), 1074-1081. <https://doi.org/10.1124/mol.112.078998>.

Asztély F, Gustafsson B. Ionotropic glutamate receptors: Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol*. 1996;12(1):1–11.

Aizenman E, Frosch MP, Lipton SA. Responses mediated by excitatory amino acid receptors in solitary retinal ganglion cells from rat. *J Physiol*. 1988;396(1):75–91.

Andreou LV. Isolation of plasmid DNA from bacteria. *Methods Enzymol.* 2013;529:135-42.
doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00010-0. PMID: 24011041.

Albensi, B. C. (2007). The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. *Current pharmaceutical design*, 13(31), 3185-3194.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (Eds.). (2005). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons.

Baez, S. D. L. C., García del Barco, D., Hardy-Sosa, A., Guillen Nieto, G., Bringas-Vega, M. L., Llibre-Guerra, J. J., & Valdes-Sosa, P. (2021). Scalable Bio marker combinations for early stroke diagnosis: A systematic review. *Frontiers in neurology*, 12, 638693.

Beaudoin, G. M., Lee, S. H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y. G., Reichardt, L. F., & Arikath, J. (2012). Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature protocols*, 7(9), 1741-1754.

Beesley, S., Sullenberger, T., Pilli, J., Abbasi, S., Gunjan, A., & Kumar, S. S. (2019). Colocalization of distinct NMDA receptor subtypes at excitatory synapses in the entorhinal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 121(1), 238-254.
<https://doi.org/10.1152/jn.00468.2018>

Bermúdez Urrego, Y. S. (2022). Evaluation of the effect of the Pb53a a synthetic peptide obtained from toxins of the spider *Phoneutria boliviensis* on the cell viability of the HEK293 line.

- Bermudez, S and Reyes-Guzman EA. (2020). Tesis de pregrado. Evaluation of the effect of the Pb53a, a synthetic peptide obtained from toxins of the spider *Phoneutria boliviensis* on the cell viability of the HEK-293 line
- Bettini, E., Sava, A., Griffante, C., Carignani, C., Buson, A., Capelli, A. M., ... Cardullo, F. (2010). Identification and characterization of novel NMDA receptor antagonists selective for NR2A- over NR2B-containing receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(3), 636-644. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.172544>.
- Bleich, S., Römer, K., Wiltfang, J., & Kornhuber, J. (2003). Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *International journal of geriatric psychiatry*, 18(S1), S33-S40.
- Bogin, O. (2005). Venom peptides and their mimetics as potential drugs. *Modulator*, 19(9), 14-20.
- Brewer, G. J. Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in b27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, 35, 567-76.
- Brosnan JT. Glutamate, at the Interface between Amino Acid and Carbohydrate Metabolism. *J Nutr*. 2018;130(4):988S-990S.
- Burrell, M. M. (2003). Plasmid purification. In *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons.
- Calvo-Rodriguez, M., Hernando-Pérez, E., López-Vázquez, S., Núñez, J., Villalobos, C., & Núñez, L. (2020). Remodeling of intracellular ca^{2+} homeostasis in rat hippocampal neurons aged in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4).

<https://doi.org/10.3390/ijms21041549>.

Carvajal, J and Reyes-Guzman EA. (2020). Tesis de pregrado. In silico analysis of the interacción of peptides derived from the Ctenitoxin-Pb48 and Ctenitoxin-Pb53 toxins of the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* with the NMDA receptor.

Cercato, M. C., Vázquez, C. A., Kornisiuk, E., Aguirre, A. I., Colettis, N., Snitcofsky, M., ... Baez, M. V. (2016). GluN1 and GluN2A NMDA Receptor Subunits Increase in the Hippocampus during Memory Consolidation in the Rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 242. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00242>.

Chen, Y. S., Tu, Y. C., Lai, Y. C., Liu, E., Yang, Y. C., & Kuo, C. C. (2020). Desensitization of NMDA channels requires ligand binding to both GluN1 and GluN2 subunits to constrict the pore beside the activation gate. *Journal of Neurochemistry*, 153(5), 549-566.

Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Laboratory animals*, 30(4), 293–316.

Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J., & Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 56(1), 2-5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.063>

Cull-Candy, S., Brickley, S. y Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Opinión actual en neurobiología* , 11 (3), 327-335.

- Deep, S. N., Mitra, S., Rajagopal, S., Paul, S., & Poddar, R. (2019). GluN2A-NMDA receptor-mediated sustained Ca²⁺ influx leads to homocysteine-induced neuronal cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(29), 11154-11165.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008820>.
- Donnan, G. A., Fisher, M., Macleod, M., & Davis, S. M. (2008). Stroke. *Lancet (London, England)*, *371*(9624), 1612-1623.
- Drissi, I., Deschamps, C., Fouquet, G., Alary, R., Peineau, S., Gosset, P., ... Pierrefiche, O. (2020). Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addiction Biology*, *25*(3), e12760. <https://doi.org/10.1111/adb.12760>
- Edman, S., McKay, S., Macdonald, L. J., Samadi, M., Livesey, M. R., Hardingham, G. E., & Wyllie, D. J. A. (2012). TCN 201 selectively blocks GluN2A-containing NMDARs in a GluN1 co-agonist dependent but non-competitive manner. *Neuropharmacology*, *63*(3), 441-449. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.027>
- Enciu, A.-M., Constantinescu, S. N., Popescu, L. M., Mureşanu, D. F., & Popescu, B. O. (2011). Neurobiology of vascular dementia. *Journal of Aging Research*, *2011*, 401604. <https://doi.org/10.4061/2011/401604>.
- Estrada-Gomez, S., Vargas Munoz, L. J., Lancho, P., & Segura Latorre, C. (2015). Partial characterization of venom from the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* (Araneae: Ctenidae). *Toxins*, *7*(8), 2872-2887.
- Feigin, V. L., Forouzanfar, M. H., & Krishnamurthi, R. (2014). Carga global y regional de accidente cerebrovascular durante 1990-2010: resultados del estudio Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, *383*, 245.

- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurología*, *27*(5), 301-310.
- Fluyau, D., Revadigar, N., & Pierre, C. G. (2020). Clinical benefits and risks of N-methyl-d-aspartate receptor antagonists to treat severe opioid use disorder: A systematic review. *Drug and Alcohol Dependence*, *208*, 107845.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2020.107845>.
- Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*, *20*(1), 122-128.
- Foster, K. A., McLaughlin, N., Edbauer, D., Phillips, M., Bolton, A., Constantine-Paton, M., & Sheng, M. (2010). Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience*, *30*(7), 2676-2685.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4022-09.2010>
- Fouilloux, C., Contreras, F., Rivera, M., Terán, A., & Velasco, M. (2004). Receptores de glutamato: Implicaciones terapéuticas. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, *23*(2), 99-108.
- Fulop, F., Szatmári, I., Vámos, E., Zádori, D., Toldi, J., & Vécsei, L. (2009). Syntheses, transformations and pharmaceutical applications of kynurenic acid derivatives. *Current medicinal chemistry*, *16*(36), 4828-4842.
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., & Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, *438* (7065), 185–192.

- Furukawa, H., & Gouaux, E. (2003). Mechanisms of activation, inhibition, and specificity: Crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO Journal*, 22(12), 2873–2885.
- Gaspar Toro, J. M. (2019). El papel de la neuroglia después de un accidente cerebrovascular isquémico: una revisión sistemática a partir de un modelo integrador. *Departamento de Ciencias Fisiológicas*.
- Gass, JT y Olive, MF (2008). Sustratos glutamatérgicos de la drogadicción y el alcoholismo. *Farmacología bioquímica* , 75 (1), 218-265.
- Gill SS, Pulido OM. Review Article: Glutamate Receptors in Peripheral Tissues: Current Knowledge, Future Research, and Implications for Toxicology. *Toxicol Pathol*. 2001;29(2):208–23.
- Gilquin, B., Bourgoin, M., Ménez, R., Le Du, M. H., Servent, D., Zinn-Justin, S., & Ménez, A. (2003). Motions and structural variability within toxins: implication for their use as scaffolds for protein engineering. *Protein science*, 12(2), 266-277.
- Glasgow, N. G., Wilcox, M. R., & Johnson, J. W. (2018). Effects of Mg²⁺ on recovery of NMDA receptors from inhibition by memantine and ketamine reveal properties of a second site. *Neuropharmacology*, 137, 344-358.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.05.017>
- Gray, J. A., Shi, Y., Usui, H., During, M. J., Sakimura, K., & Nicoll, R. A. (2011). Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron*, 71(6), 1085-1101.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.007>

- Hahm, J. O., Langdon, R. B., & Sur, M. (1991). Disruption of retinogeniculate afferent segregation by antagonists to NMDA receptors. *Nature*, *351*(6327), 568-570.
<https://doi.org/10.1038/351568a0>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, *391*(2), 85-100.
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in neurosciences*, *26*(2), 81-89.
- Hardingham, GE (2009). Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Transacciones de la Sociedad Bioquímica* , *37* (6), 1147-1160.
- Hardingham, GE, Fukunaga, Y. y Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDAR oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Neurociencia de la naturaleza* , *5* (5), 405-414.
- Hansen, K. B., Ogden, K. K., Yuan, H., & Traynelis, S. F. (2014). Distinct functional and pharmacological properties of Triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors. *Neuron*, *81*(5), 1084-1096. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.035>.
- Hassel, B., Tessler, S., Faull, R. L., & Emson, P. C. (2008). Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurochemical research*, *33*(2), 232-237.
- Herman, Moreno y Moreno, Carlos B .. (2005). Transmisión sináptica-canales de calcio y liberación de neurotransmisores. *Revista Ciencias de la Salud* , *3* (1), 47-61.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.057>.

Ide, S., Ikekubo, Y., Mishina, M., Hashimoto, K., & Ikeda, K. (2019). Cognitive Impairment That Is Induced by (R)-Ketamine Is Abolished in NMDA GluN2D Receptor Subunit Knockout Mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 22(7), 449-452. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyz025>.

Iwasa, K., Ehrenstein, G., Moran, N., & Jia, M. (1986). Evidence for interactions between batrachotoxin-modified channels in hybrid neuroblastoma cells. *Biophysical journal*, 50(3), 531-537.

Jalali-Yazdi, F., Chowdhury, S., Yoshioka, C., & Gouaux, E. (2018). Mechanisms for zinc and proton inhibition of the glun1/glun2a NMDA receptor. *Cell*, 175(6), 1520-1532.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.043>

Jauch, E. C., & FACEP, M. D. (2019). Ischemic Stroke: Practice Essentials, Background, Anatomy. *Chief of System Research, Mission Research Institute, Mission Health; Adjunct Professor, Department of Bioengineering, Clemson University*.

Johnson, J. W., Glasgow, N. G., & Povysheva, N. V. (2015). Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine. *Current Opinion in Pharmacology*, 20, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.11.006>.

Kemp JA, McKernan RM. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci*. 2002;5(11s):1039–42.

Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., Beck JS. ²»ÉøÍ,ĐÔμÄ © 1992 Nature Publishing Group. *Nature*. 1992;359:710–3.

- Kornreich, B. G. (2007). The patch clamp technique: principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1), 25-37.
- Kotermanski, S. E., & Johnson, J. W. (2009). Mg²⁺ imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *Journal of Neuroscience*, 29(9), 2774-2779.
- Lai, TW, Shyu, WC y Wang, YT (2011). Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Tendencias en medicina molecular* , 17 (5), 266-275.
- Lee, C.-H., Lü, W., Michel, J. C., Goehring, A., Du, J., Song, X., & Gouaux, E. (2014). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature*, 511(7508), 191-197. <https://doi.org/10.1038/nature13548>.
- Leveille, F., Gaamouch, FE, Goux, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O. y Buisson, A. (2008). Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *El Diario FASEB* , 22 (12), 4258-4271.
- Lind, G. E., Mou, T.-C., Tamborini, L., Pomper, M. G., De Micheli, C., Conti, P., ... Hansen, K. B. (2017). Structural basis of subunit selectivity for competitive NMDA receptor antagonists with preference for GluN2A over GluN2B subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(33), E6942-E6951. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707752114>.
- Li V, Wang YT. Molecular mechanisms of NMDA receptor-mediated excitotoxicity: implications for neuroprotective therapeutics for stroke. *Neural Regen Res*. 2016 Nov;11(11):1752-1753.
- Li, Y., Krupa, B., Kang, J.-S., Bolshakov, V. Y., & Liu, G. (2009). Glycine site of NMDA

receptor serves as a spatiotemporal detector of synaptic activity patterns. *Journal of Neurophysiology*, *102*(1), 578-589. <https://doi.org/10.1152/jn.91342.2008>.

Llansola, M., Sanchez-Perez, A., Cauli, O., & Felipo, V. (2005). Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *The Cerebellum*, *4*(3), 154-161.

Longart, M., Liu, Y., Karavanova, I., & Buonanno, A. (2004). Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *Journal of Comparative Neurology*, *472*(2), 156-172.

Lynch, D. R., & Guttman, R. P. (2001). NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Current drug targets*, *2*(3), 215-231.

MacDougall, G., Anderton, R. S., Mastaglia, F. L., Knuckey, N. W., & Meloni, B. P. (2019). Mitochondria and neuroprotection in stroke: Cationic arginine-rich peptides (CARPs) as a novel class of mitochondria-targeted neuroprotective therapeutics. *Neurobiology of Disease*, *121*, 17-33.

Mansbach, R. A., Travers, T., McMahon, B. H., Fair, J. M., & Gnanakaran, S. (2019). Snails in silico: A review of computational studies on the conopeptides. *Marine drugs*, *17*(3), 145.

Marwick, K., Skehel, P., Hardingham, G., & Wyllie, D. (2015). Effect of a GRIN2A de novo mutation associated with epilepsy and intellectual disability on NMDA receptor currents and Mg²⁺ block in cultured primary cortical neurons. *The Lancet*, *385* Suppl 1, S65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60380-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60380-4)

- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, *309*(5965), 261-263.
- M.A. Raghanti, ... P.R. Hof, in *Evolution of Nervous Systems (Second Edition)*, 2017
- Medina Marín, A., & Escobar, M. (2002). Sistema glutamatérgico, primera parte: Sinaptología, homeostasis y muerte celular. *Revista colombiana de Psiquiatria*, *31*(3), 193-218.
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, *130*, 1007S-15S.
- Merwick, A., O'Brien, M., & Delanty, N. (2012). Complex single gene disorders and epilepsy. *Epilepsia*, *53 Suppl 4*, 81-91. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03617.x>
- Michaelis, E. K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in neurobiology*, *54*(4), 369-415.
- Myers, S. J., Yuan, H., Kang, J.-Q., Tan, F. C. K., Traynelis, S. F., & Low, C.-M. (2019). Distinct roles of GRIN2A and GRIN2B variants in neurological conditions. [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, *8*.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.18949.1>
- Monaghan, D. T., Irvine, M. W., Costa, B. M., Fang, G., & Jane, D. E. (2012). Pharmacological Modulation of NMDA Receptor Activity and the Advent of Negative and Positive Allosteric Modulators. *Neurochemistry International*, *61*(4), 581–592.

Moreno-González, G., & Zarain-Herzberg, A. (2006). Papel de los receptores de glutamato durante la diferenciación neuronal. *Salud mental*, 29(5), 38-48.

Nahum-Levy, R., Lipinski, D., Shavit, S., & Benveniste, M. (2001). Desensitization of NMDA receptor channels is modulated by glutamate agonists. *Biophysical Journal*, 80(5), 2152-2166.

Nowak, L. P. P. A. A., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462-465.

Nutt, J. G., Gunzler, S. A., Kirchhoff, T., Hogarth, P., Weaver, J. L., Krams, M., ...

Landen, J. W. (2008). Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and Parkinsonism. *Movement Disorders*, 23(13), 1860-1866.

<https://doi.org/10.1002/mds.22169>.

Oreiro García, M. T. (2006). Estudio electrofisiológico y neuroquímico del efecto de la eslicarbazepina acetato, un nuevo fármaco antiepiléptico, sobre las crisis inducidas por la Latrunculina A.

Otsu, Y., Darcq, E., Pietrajtis, K., Mátyás, F., Schwartz, E., Bessaih, T., ... Diana, M. A.

(2019). Control of aversion by glycine-gated GluN1/GluN3A NMDA receptors in the adult medial habenula. *Science*, 366(6462), 250-254.

<https://doi.org/10.1126/science.aax1522>.

- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(6), 383-400.
- Paoletti, P., Perin-Dureau, F., Fayyazuddin, A., Le Goff, A., Callebaut, I., & Neyton, J. (2000). Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron*, *28*(3), 911-925. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00163-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00163-x).
- Pennington, M. W., Czerwinski, A., & Norton, R. S. (2018). Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *26*(10), 2738-2758.
- Prieto-Arribas, R., Moreno-Gutiérrez, A., Simal-Hernández, P., Pascual-Garvi, J. M., Matías-Guiu, J., Roda, J. M., & Barcia-Albacar, J. A. (2008). Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev Neurol*, *47*(08), 414.
- Puentes Madera, I. C. (2014). Epidemiología de las enfermedades cerebrovasculares de origen extracraneal. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vascul*, *15*(2), 66-74.
- Rajendra, W., Armugam, A., & Jeyaseelan, K. (2004). Neuroprotection and peptide toxins. *Brain research reviews*, *45*(2), 125-141.
- Rao, A., & Craig, A. M. (1997). Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron*, *19*(4), 801-812. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80962-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80962-9)

- Rash, L. D., & Hodgson, W. C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, 40(3), 225-254.
- Reyes Guzmán, E. A., Vega Castro, N. A., & Reyes Montano, E. A. (2017). Diseño de péptidos inhibidores de interacciones de la subunidad GluN2B del receptor NMDA en isquemia. *Revista De Ciencia Y Tecnología*, 27(1), 11–22.
- Reyes-Guzman, E. A., Vega-Castro, N., Reyes-Montaña, E. A., & Recio-Pinto, E. (2017). Antagonistic action on NMDA/GluN2B mediated currents of two peptides that were conantokin-G structure-based designed. *BMC neuroscience*, 18(1), 1-13.
- Retallack, G. J., & Tanner, L. H. (2002). Brief Communications. *Nature*, 415(January), 2002-2002.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sasaki T, Kaneko A. L-glutamate-induced responses in OFF-type bipolar cells of the cat retina. *Vision Res*. 1996;36(6):787–95.
- Scatton, B., Carter, C., Benavides, J. y Giroux, C. (1991). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: a novel therapeutic perspective for the treatment of ischemic brain injury. *Enfermedades cerebrovasculares*, 1 (3), 121-135.
- Stadler J, Lemmens R, Nyhammar T. Plasmid DNA purification. *J Gene Med*. 2004 Feb;6 Suppl 1:S54-66. doi: 10.1002/jgm.512. PMID: 14978751.
- Siegler Retchless, B., Gao, W., & Johnson, J. W. (2012). A single GluN2 subunit residue controls NMDA receptor channel properties via intersubunit interaction. *Nature*

Neuroscience, 15(3), 406-413, S1. <https://doi.org/10.1038/nn.3025>

Swanger, S. A., Chen, W., Wells, G., Burger, P. B., Tankovic, A., Bhattacharya, S., ...

Yuan, H. (2016). Mechanistic Insight into NMDA Receptor Dysregulation by Rare Variants in the GluN2A and GluN2B Agonist Binding Domains. *American Journal of Human Genetics*, 99(6), 1261-1280. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.10.002>.

Symonds, J. D., Zuberi, S. M., & Johnson, M. R. (2017). Advances in epilepsy gene discovery and implications for epilepsy diagnosis and treatment. *Current Opinion in Neurology*, 30(2), 193-199. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000433>.

Tang, N., Wu, J., Zhu, H., Yan, H., Guo, Y., Cai, Y., ... & Lu, Y. (2018). Genetic mutation of GluN2B protects brain cells against stroke damages. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 2979-2990.

Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62(3), 405-496.

Tomek, SE, LaCrosse, AL, Nemirovsky, NE y Olive, MF (2013). NMDA receptor modulators in the treatment of drug addiction. *Productos farmacéuticos* , 6 (2), 251-268.

Tu, W., Xu, X., Peng, L., Zhong, X., Zhang, W., Soundarapandian, M. M., ... Lu, Y. (2010). DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell*, 140(2), 222-234. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.055>.

Tymianski M. (2011). Mecanismos emergentes de señalización celular interrumpida en isquemia cerebral. *Nat Neurosci*.

- Vance, K. M., Hansen, K. B., & Traynelis, S. F. (2012). GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *The Journal of Physiology*, *590*(16), 3857-3875.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.234062>.
- Vieira, M., Yong, X. L. H., Roche, K. W., & Anggono, V. (2020). Regulation of NMDA glutamate receptor functions by the GluN2 subunits. *Journal of Neurochemistry*.
<https://doi.org/10.1111/jnc.14970>.
- Villate, S, and Reyes-Guzman EA. (2022). Tesis de pregrado. Puesta a punto de las condiciones para la medición de corrientes de calcio evocadas del receptor NMDA y evaluación de la viabilidad celular de un cultivo primario de neuronas de hipocampo en presencia del péptido sintético Pb53a.
- Villegas Bruguera, E. B. (2015). Estudio autorradiográfico de las alteraciones de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato en el sistema nervioso central en consumidores crónicos de alcohol.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., ... & Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological research*, *63*, S191.
- Watkins, J. C., & Jane, D. E. (2006). The glutamate story. *British journal of pharmacology*, *147*(S1), S100-S108.
- Williams, T. L., Stone, T. W., Burton, N. R., & Smith, D. A. S. (1988). Kynurenic acid and AP5 distinguish between NMDA receptor agonists. *Experimental neurology*, *102*(3), 366-367.

Wyllie, DJA, Livesey, MR y Hardingham, GE (2013). Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neurofarmacología* , 74 , 4-17.

XiangWei, W., Jiang, Y., & Yuan, H. (2018). De novo mutations and rare variants occurring in NMDA receptors. *Current opinion in physiology*, 2, 27-35.

Yi, F., Bhattacharya, S., Thompson, C. M., Traynelis, S. F., & Hansen, K. B. (2019). Functional and pharmacological properties of triheteromeric GluN1/2B/2D NMDA receptors. *The Journal of Physiology*, 597(22), 5495-5514.

<https://doi.org/10.1113/JP278168>

Yi, F., Rouzbeh, N., Hansen, K. B., Xu, Y., Fanger, C. M., Gordon, E., ... Volkman, R. A. (2020). PTC-174, a positive allosteric modulator of NMDA receptors containing GluN2C or GluN2D subunits. *Neuropharmacology*, 107971.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107971>

Zhu, S., & Gouaux, E. (2017). Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 112(Pt A), 11-15.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.034>