

**RELACIÓN EVOLUTIVA Y ESTRUCTURAL DE LAS SUBUNIDADES DE LOS
RECEPTORES IONOTRÓPICOS NMDA, AMPA Y KAINATO EN CUATRO
ESPECIES DE PRIMATES**

FRANCY JOHANNA MORENO PEDRAZA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

PROGRAMA DE POSGRADO

BOGOTÁ D.C

2010

**RELACIÓN EVOLUTIVA Y ESTRUCTURAL DE LAS SUBUNIDADES DE LOS
RECEPTORES IONOTRÓPICOS NMDA, AMPA Y KAINATO EN CUATRO
ESPECIES DE PRIMATES**

FRANCY JOHANNA MORENO PEDRAZA

Trabajo de Grado Para Optar el Título de
Magister en Ciencias Biológicas

DIRECTORES

EDGAR ANTONIO REYES MONTAÑO
MSc Biología Dr Sci Química

LEONARDO LAREO
MSc Fisiología PhD Ciencias Biológicas

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

PROGRAMA DE POSGRADO

BOGOTÁ D.C

2010

**RELACIÓN EVOLUTIVA Y ESTRUCTURAL DE LAS SUBUNIDADES DE LOS
RECEPTORES IONOTRÓPICOS NMDA, AMPA Y KAINATO EN CUATRO
ESPECIES DE PRIMATES**

FRANCY JOHANNA MORENO PEDRAZA

Manuel Antonio Franco
Director de Posgrado

Ingrid Schuler
Decana Facultad de Ciencias

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

PROGRAMA DE POSGRADO

BOGOTÁ D.C

2010

NOTA DE ACEPTACIÓN

Edgar Antonio Reyes Director
MSc Biología Dr Sci Química

Doctora Janneth Gonzalez Ph.D
Dr Sci en Ciencias Biológicas

Doctora Luz Mary Salazar Pulido
Dr Sci en Química

Doctora Ursula Ramírez Escobar Ph.D (C)
Msc en Ciencias Biológicas

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto, por su infinita bondad y amor.

Al profesor Leonardo Lareo

*Porque me enseñó que los sueños nunca desaparecen
y pueden convertirse en la realidad del mañana.*

A mis padres

*Por su apoyo, por los ejemplos de perseverancia y constancia que
los caracterizan y por el valor mostrado para salir adelante.*

A mi esposo

Por su comprensión, por su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Primero y como más importante, me gustaría agradecer sinceramente a mis directores, Dr. Leonardo Lareo que aunque ya no está con nosotros, su esfuerzo y dedicación, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia y su motivación fueron fundamentales en mi formación como investigadora; Dr Edgar Reyes por haberme apoyado en el momento que más lo necesitaba, por su oportuna orientación, por la disposición, conocimientos y tiempo dedicado, que me hacen sentir en deuda por todo lo recibido durante esta tesis.

A todos los integrantes del grupo de investigación de Bioquímica Molecular Computacional, Estructural y Bioinformática de la Pontificia Universidad Javeriana, en especial a las profesoras Janneth Gonzalez y Sonia Luz Albarracín por su oportuna orientación.

A mi compañera y amiga Nury Esperanza Vargas por su ejemplo de lucha, colaboración y compromiso.

A los Docentes de la Pontificia Universidad Javeriana que contribuyeron con sus conocimientos en mi formación como investigadora.

A mis padres Gladys e Hildebrando, por su constante motivación y apoyo incondicional, a mi hermano David por ser un ejemplo de valentía y superación, a mi esposo Luis por ser el complemento que me dio el equilibrio para seguir adelante, por ellos... y para ellos.

A Dios por iluminar mi mente y ser el soporte de mi vida.

Y en general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis de maestría, por haberme brindado colaboración, cariño y amistad.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN	20
1. OBJETIVOS	21
1.1 OBJETIVO GENERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
HIPÓTESIS.....	21
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	23
2.1 FILOGENIA	23
2.1.1 Métodos de Reconstrucción Filogenética	25
Tabla 1. Métodos de Reconstrucción Filogenética.....	25
2.2 PRIMATES	27
2.2.1 Prosimios y Antropoides.....	27
2.3 ESPECIE SELECCIONADA COMO GRUPO EXTERNO.....	32
2.4 RECEPTORES DE GLUTAMATO	33
2.4.1 NMDA	38
2.4.2 AMPA.....	42
2.4.3 KAINATO.....	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1 Recopilación de Datos	47
3.2 Identificación del Péptido Señal	47
3.3 Clasificación de transcritos de la subunidad NR1 en un sistema de nomenclatura	47
3.4 Estimación de Dominios Transmembranales	48
3.5 Alineamientos Múltiples	48
3.6 Curación de los Alineamientos	48
3.7 Selección del Modelo de Evolución	49
3.8 Estimación Filogenética	49
3.9 Estimación de Estructura Secundaria	50
3.10 Estimación de Sitios de Fosforilación (serina, treonina y tirosina)	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1 Recopilación de Datos	52

4.2	Clasificación de transcritos de la subunidad NR1	53
4.3	Alineamientos Múltiples	56
4.4	Estimación de Dominios Transmembranales	63
4.5	Curación de los Alineamientos	70
4.6	Selección del Modelo de evolución	71
4.7	Estimación Filogenética	72
4.8	Estimación de Estructura Secundaria	78
4.9	Estimación de Sitios de Fosforilación.....	91
5.	CONCLUSIONES	94
6.	PERSPECTIVAS Y APLICACIONES	96
	BIBLIOGRAFÍA	97

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Métodos de Reconstrucción Filogenética	24
Tabla 2. Nomenclatura para las Variantes de la Subunidad NR1 de NMDA.....	39
Tabla 3. Códigos de Acceso de las Secuencias Empleadas en el Estudio.....	51
Tabla 4. Clasificación de los Cambios de los Aminoácidos en un Alineamiento	56
Tabla 5. Cambios Identificados en las Subunidades AMPA1, AMPA2, AMPA3 y AMPA4.....	57
Tabla 6. Cambios Identificados en las Subunidades GLUR5, GLUR6, GLUR7, KA1 y KA2	57
Tabla 7. Cambios Identificados en las Subunidades NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A y NR3B	59
Tabla 8. Predicción de los Dominios Transmembranales para las Subunidades del Receptor AMPA	63
Tabla 9. Predicción de los Dominios Transmembranales para las Subunidades del Receptor Kainato	64
Tabla 10. Predicción de los Dominios Transmembranales para las Subunidades del Receptor NMDA.....	66
Tabla 11. Modelos de Evolución Seleccionados para los Diferentes Alineamientos	72
Tabla 12. Sitios de Fosforilación que hacen Parte de los Cambios	90

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Partes de un Árbol Filogenético	23
Figura 2. Clasificación de Primates Actuales.....	27
Figura 3. Razas Humanas.....	29
Figura 4. Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>).....	30
Figura 5. Orangutan (<i>Pongo Pigeus</i>).....	30
Figura 6. Mono Rhesus (<i>Macaca mulata</i>).....	31
Figura 7. Rata de las Cloacas (<i>Rattus norvegicus</i>)	32
Figura 8. Clasificación de los Receptores de Glutamato	33
Figura 9. Participación de los Receptores de Glutamato en los diferentes procesos del desarrollo neuronal	34
Figura 10. Ubicación en la Membrana de los Receptores Ionotrópicos de glutamato	35
Figura 11. Exploración de interfaces en las intersubunidades GluR2 del receptor AMPA.....	36
Figura 12. Simetría de los Dominios Transmembranales en las Subunidades Glur2 de AMPA.....	37
Figura 13. Propuesta del ARNm de NR1 que muestra el empalme alternativo de tres exones y la ubicación de éstos en la estructura genómica.....	38
Figura 14. Ubicación Ser670 en la subunidad NR2A del receptor de NMDA.....	40
Figura 15. Sitios de unión a ligando para las subunidades GluR2 y GluR6	42
Figura 16. Árbol Filogenético Generado por Análisis de Parsimonia entre los Genes iGLURs en Animales y GLR en Plantas como <i>Arabidopsis</i>	43
Figura 17. Modelo de la Subunidad NR2 en Vertebrados e Invertebrados	44

Figura 18. Árbol Filogenético para las subunidades NR2	45
Figura 19. Diagrama General de Actividades	50
Figura 20. Clasificación de las variantes NR1-1a de NMDA de las especies <i>Homo sapiens</i> , <i>Pan troglodytes</i> , <i>Pongo Pigmeus</i> y <i>Macaca mulata</i>	52
Figura 21. Clasificación de las variantes NR1-2b de NMDA de las especies <i>Homo sapiens</i> , <i>Pan troglodytes</i> , <i>Pongo Pigmeus</i> y <i>Macaca mulata</i>	53
Figura 22. Clasificación de las variantes NR1-3b de NMDA de las especies <i>Homo sapiens</i> , <i>Pan troglodytes</i> , <i>Pongo Pigmeus</i> y <i>Macaca mulata</i>	54
Figura 23. Clasificación de las variantes NR1-4b de NMDA de las especies <i>Homo sapiens</i> , <i>Pan troglodytes</i> , <i>Pongo Pigmeus</i> y <i>Macaca mulata</i>	55
Figura 24. Árboles Filogenéticos de las subunidades AMPA1, AMPA2, AMPA3 y AMPA4.....	72
Figura 25. Árboles Filogenéticos de las subunidades GLUR5, GLUR6, GLUR7, KA1 y KA2	73
Figura 26. Árboles Filogenéticos de las subunidades NR1 de NMDA.....	75
Figura 27. Árboles Filogenéticos de las subunidades NR2 de NMDA.....	76
Figura 28. Árboles Filogenéticos de las subunidades NR3 de NMDA.....	77
Figura 29. Predicción de Estructura Secundaria para la Subunidad GLUR5	80
Figura 30. Predicción de Estructura Secundaria para la Subunidad NR2A.....	83
Figura 31. Predicción de Estructura Secundaria para la Subunidad NR2C	86
Figura 32. Predicción de Estructura Secundaria para la Subunidad NR3A.....	89

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Secuencias en Formato Fasta de los Receptores NMDA, AMPA y Kainato.

ANEXO 2. Figuras de Predicción de Dominios Transmembranales para las Subunidades KA1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A y NR3B.

ANEXO 3. Porcentaje de pérdida de Información en los Alineamientos curados

ANEXO 4. Resultados de predicción de sitios de fosforilación en las secuencias de las subunidades Glur5, NR2A, NR2C y NR3A.

ABREVIATURAS

NMDA: N-metil-D-aspartato

NR1: receptor N-methyl-D-aspartato subunidad NR1

NR2A: receptor N-methyl-D-aspartato subunidad 2A

NR2B: receptor N-methyl-D-aspartato subunidad 2B

NR2C: receptor N-methyl-D-aspartato subunidad 2C

NR2D: receptor N-methyl-D-aspartato subunidad 2D

NR3A: receptor N-methyl-D-aspartato subunidad 3A

NR3B: receptor N-methyl-D-aspartato subunidad 3B

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato

AMPA 1: receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato subunidad 1

AMPA 2: receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato subunidad 2

AMPA 3: receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato subunidad 3

AMPA 4: receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato subunidad 4

KA: Kainato

GLUR5: receptor ionotrópico de glutamato kainato 1

GLUR6: receptor ionotrópico de glutamato kainato 2

GLUR7: receptor ionotrópico de glutamato kainato 3

KA1: receptor ionotrópico de glutamato kainato 4

KA2: receptor ionotrópico de glutamato kainato 5

IGLURs: receptores ionotrópicos de glutamato

mGLURs: receptores metabotrópicos de glutamato

SNC: Sistema Nerviosos Central

UPGMA: Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means

NJ: Neighbor Joining

MP: Maxima Parsimonia

ML: Máxima Verosimilitud

BAY: Bayesiano

RESUMEN

El glutamato es uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC), actúa a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos siendo esencial para procesos que estimulan el aprendizaje y la memoria así como diversas patologías. El estudio de los receptores sensibles al glutamato ha permitido contribuir al conocimiento de diversos procesos que se llevan a cabo en el SNC, en ese sentido la bioinformática se ha convertido en una herramienta indispensable en la colección, organización, almacenamiento y recuperación de la información biológica que se encuentra en bases de datos relacionada con los receptores y que ha permitido dar respuesta o generar nuevas ideas en el contexto biológico.

El objetivo de este proyecto fue analizar la influencia que tienen los cambios que se presentan en las secuencias proteicas de las subunidades de los receptores NMDA, AMPA Y KAINATO en la estructura secundaria para las especies ***Homo sapiens***, ***Pan troglodytes***, ***Pongo Pigmus*** y ***Macaca mulata*** y en la relación evolutiva que se pueda establecer para las mismas.

Empleando herramientas computacionales se encontró que las subunidades GluR5, GluR6, NR2A y NR3A presentan cambios que involucran los dominios de unión a ligando S1 y S2 y sugieren variaciones en la interacción con el glutamato o en la estabilización del bolsillo de unión al ligando. Por otra parte las subunidades GLUR5, NR2A, NR2C y NR3A se destacaron por presentar una mayor proporción de cambios en la región C-terminal, los cuales generan cambios en la predicción de estructura secundaria y proponen variaciones en las interacciones con las proteínas que se unen a dominios ubicados en esta región y que están involucradas en los procesos de direccionamiento, tráfico y anclaje de los receptores en las posiciones intracelulares. Lo anterior se relaciona con la predicción de sitios de fosforilación que aparecen o se pierden en la región C-terminal en las subunidades GluR5 (especies ***Homo sapiens*** y ***Pan troglodytes***), NR2A (especies ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus***), NR2C (especies ***Pan troglodytes*** y ***Rattus norvegicus***) y NR3A (especie ***Rattus norvegicus***), que nos plantean cambios en la interacción de estas subunidades con proteínas quinasas y con proteínas con dominios PDZ que se unen a los dominios PDZ en la región C-terminal de los iGluRs y actúan como complejos moleculares que se puede asociar a otras proteínas en la zona intracelular.

Por último las inferencias filogenéticas por subunidad nos permitieron observar relaciones más estrechas entre las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes* y *Pongo Pigeus* en las subunidades NR2A y B, y entre las especies *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus* y *Macaca mulata* en las subunidades AMPA 1 y 2. Para las demás subunidades la información en el alineamiento no fue suficiente para establecer relaciones significativas de parentesco.

ABSTRACT

Glutamate is the most important neurotransmitter in central nervous system (CNS). It works through ionotropic and metabotropic receptors being essential for several processes as learning and memory. The study of receptors sensitive to glutamate has lead to an understanding of various processes that take place in the CNS, in that sense, bioinformatics has become an indispensable tool in the collection, organization, storage and retrieval of biological information found in databases related to the receptors, which allowed to answer or generate new ideas in the biological context.

The goal of this project was to analyze the influence of modifications on the protein sequences of NMDA, AMPA and Kainate receptors and its influence over the secondary structure of themselves. We established an evolutive relationship between the species *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo pigmeus* and *Macaca mulata* from this information.

We used bioinformatic tools and found that GluR5, GluR6, NR2A and NR3A subunits present modifications that involve the S1 and S2 ligand binding domains and suggest some variations in the interaction with glutamate or a modification in the pocket of binding to ligand. Moreover, GluR5, NR2A, NR2C and NR3A subunits presented a higher number of modifications on the C-terminal region that could generate some modifications on the secondary structure (prediction) and proposed some variations on the interaction with some proteins that are involved in directing, trafficking and anchorage of those receptors to membrane. All that is related to the prediction of phosphorylation sites that are lost or not on the C-terminal region of GluR5 in *Homo sapiens* and *Pan troglodytes* species, on NR2A subunit in *Macaca mulata* and *Rattus norvegicus* species, on NR2C subunit in *Pan troglodytes* and *Rattus norvegicus* species and on the NR3A subunit in *Rattus norvegicus* species. Those changes are indicating that could generate some modifications on the interaction with some proteins involved in signaling processes, as kinases cascades, and with some proteins that have the PDZ domain in the intracellular region.

Finally the phylogenetic inferences subunit allowed us to see closer relations between the species *Homo sapiens*, *Pan troglodytes* and *Pongo pigmeus* in NR2A and B subunits, and between species *Pan troglodytes*, *Pongo pigmeus* and *Macaca mulatta* in AMPA1 and 2 subunits. For the other subunits in the alignment information was not sufficient to establish meaningful relationships of kinship.

INTRODUCCIÓN

El ser humano es el producto de una serie de transformaciones que nos conectan con una cadena de descendientes con características simiescas. La selección natural permitió la aparición de numerosas y complejas adaptaciones que conducen a la evolución de los simios en humanos, por lo tanto para comprender lo que somos ahora es necesario entender cómo ocurrieron esas transformaciones. En esta medida, las herramientas que brindan la biología molecular y la bioinformática juegan un papel importante en el entendimiento de cómo surge una nueva especie, permitiendo reconstruir la historia de la vida a partir de las características de los seres actuales (Boyd, R. and Silk, J. 2001).

Una forma de entender la evolución humana es a través del estudio de los primates básicamente por similitudes morfológicas, bioquímicas y de comportamiento en condiciones ambientales parecidas; por ejemplo una característica importante es que los primates presentan cerebros con mayor tamaño respecto al tamaño corporal en relación a otras especies (Boyd, R. and Silk, J. 2001). Esta tendencia es mayor en los seres humanos y es una característica evolutiva que favorece los procesos de memoria y aprendizaje (Moore, B. R. 2004). Adicionalmente las habilidades cognitivas están directamente relacionadas con el incremento en el tamaño del cerebro (Dorus, S. *et al* 2004).

Los aportes que hasta el momento se han realizado respecto al funcionamiento y estructura del cerebro, del sistema nervioso central (SNC), de los procesos sinápticos, entre otros, para los mamíferos y en especial para el ser humano son innumerables. Por ejemplo es de resaltar que uno de los principales neurotransmisores del SNC es el glutamato que es un aminoácido excitatorio el cual actúa a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Nakanishi, S. *et al*.1992).

Los receptores ionotrópicos (iGLURs) conforman canales permeables a iones como Na^{2+} , Ca^+ y K^+ ; se dividen en cuatro grupos denominados NMDA, AMPA, Kainato y Delta. Los receptores metabotrópicos (mGLURs) están acoplados a segundos mensajeros como diacilglicerol, inositol-3-fosfato y AMP cíclico (Nakanishi, S. *et al*. 1992), (Monaghan, D.; Bridges, R.; and Cotman, C.; 1989). El estudio de estos receptores ha contribuido no solo en el conocimiento de la función del SNC sino en el desarrollo de los procesos de memoria y aprendizaje (Maren, S. and Baudry, M. 1995).

La bioinformática ha jugado un papel importante en el entendimiento de la función

de los GluRs porque a través de las herramientas computacionales se ha podido analizar, comprender y predecir algunos procesos biológicos en los que éstos participan, a partir de la información acumulada en bases de datos. Los datos en varias ocasiones han sido analizados para determinar los genes que codifican para ciertas proteínas, así como también secuencias reguladoras. La bioinformática también ha sido útil en la comparación de genes en una especie o entre especies puede mostrar similitudes entre funciones de proteínas, o relaciones entre especies a través de inferencias filogenéticas.

Con base en lo anterior en este trabajo se relacionaron evolutivamente las especies ***Homo sapiens***, ***Pan troglodytes***, ***Pongo Pigeus*** y ***Macaca mulata***, a través de las secuencias proteicas de las subunidades de los receptores ionotrópicos NMDA, AMPA y KAINATO, empleando métodos ***in silico*** que permitieron: identificar los cambios que se presentan en las secuencias, reconocer la influencia que estos cambios tuvieron en la estructura secundaria de algunos de estos receptores, y proponer un modelo de evolución a partir de las inferencias filogenéticas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un objeto de estudio para el ser humano ha sido entender cómo ocurrieron las transformaciones que desde el aspecto molecular permitieron la evolución de los simios en humanos, en esa medida una característica importante que se ha tenido en cuenta en los primates es la presencia de cerebros con mayor tamaño respecto al tamaño corporal (Boyd, R. and Silk, J. 2001), cualidad que está directamente relacionada con el desarrollo de las habilidades cognitivas (Dorus, S. *et al* 2004). En ese sentido es importante tener presente el papel que juega el glutamato siendo éste uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central, que actúa a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Nakanishi, S. *et al*.1992), y es esencial para procesos que estimulan el aprendizaje y la memoria. Los receptores ionotrópicos conforman canales permeables a iones y se dividen en familias dentro de las que se destacan los receptores del tipo NMDA, AMPA y Kainato, el estudio de estos receptores ha contribuido considerablemente al conocimiento de la función del SNC.

En ese sentido las bases de datos biológicas representan un instrumento importante para ayudar a comprender y explicar una serie de fenómenos biológicos desde la estructura molecular de los receptores y los tipos de interacciones que éstos presentan. Dentro de las bases de datos más empleadas se encuentran las bases de datos de secuencias que son una gran colección de secuencias principalmente de ADN y proteínas. Partiendo de la información disponible en estas bases para los iGluRs, cabe preguntarse cuáles son los cambios en las secuencias de las subunidades de los receptores NMDA, AMPA y Kainato que permiten establecer una relación evolutiva para las especies ***Homo sapiens, Pan troglodytes, Pongo Pigeus y Macaca mulata***, y su efecto sobre la estructura secundaria de estos receptores.

JUSTIFICACIÓN

La bioinformática es una disciplina que incorpora una gran variedad de herramientas para analizar las bases de datos con el fin de mejorar no solo la calidad de vida del ser humano, por su acción en el diseño de fármacos, terapias genéticas, entre otras, sino porque juega un papel muy importante en el entendimiento de cómo surge una nueva especie, permitiendo reconstruir la historia de la vida a partir de las bases de datos de los organismos actuales. Estas bases se clasifican en primarias y son aquellas que contienen información directa de la secuencia, estructura o patrón de expresión de ADN o proteínas, y las secundarias que contienen datos e hipótesis derivados del análisis de las bases de datos primarias, como mutaciones, relaciones evolutivas, agrupación por familias o funciones, implicación en enfermedades, entre otras.

Partiendo de la información disponible en las bases de datos para los iGluRs y teniendo en cuenta la importancia que tienen estos receptores en el desarrollo de habilidades cognitivas en los mamíferos y, en especial, en el ser humano (Maren, S. and Baudry, M. 1995), es necesario identificar los cambios que se presentan en las secuencias de los receptores NMDA, AMPA y Kainato, la influencia que puedan tener estos cambios en la estructura secundaria, además de establecer un modelo de evolución entre el ser humano y parientes vivos muy cercanos como el chimpancé y el orangután y un primate más alejado como el macaca, con el propósito de tener un acercamiento al papel desarrollado por los receptores ionotrópicos en el proceso evolutivo de estos cuatro primates.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la influencia de los cambios en las secuencias proteicas de los receptores NMDA, AMPA Y KAINATO en la estructura secundaria de estos receptores para las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus* y *Macaca mulata* y en la relación evolutiva que se pueda establecer para las mismas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clasificar los diferentes variantes de la isoforma NR1 de NMDA reportadas para las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus* y *Macaca mulata*, en el sistema de nomenclatura propuesto.
- Reconocer cambios en las secuencias proteicas de los receptores NMDA, AMPA Y KAINATO para las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus* y *Macaca mulata*.
- Realizar inferencias filogenéticas para relacionar evolutivamente a las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus*, y *Macaca mulata* a partir de las subunidades de los receptores NMDA, AMPA Y KAINATO.
- Predecir la presencia y ubicación de dominios transmembranales en las secuencias proteicas de los receptores NMDA, AMPA Y KAINATO en las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus*, y *Macaca mulata*.
- Predecir, a través de una herramienta computacional, la estructura secundaria de los receptores NMDA, AMPA Y KAINATO en las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus*, y *Macaca mulata*.
- Determinar el tipo de influencia que tienen los cambios en relación a la estructura secundaria de las subunidades de los receptores NMDA, AMPA Y KAINATO en las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus*, y *Macaca mulata*.

HIPÓTESIS

Los cambios identificados en las secuencias proteicas de los receptores NMDA, AMPA y KAINATO son suficientes para establecer una relación evolutiva entre las

especies ***Homo sapiens***, ***Pan troglodytes***, ***Pongo Pigeus***, y ***Macaca mulata*** y generan cambios en la estructura secundaria predicha para estos receptores especialmente en las regiones donde se ubican los dominios de unión a glutamato.

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 FILOGENIA

Los procesos evolutivos, dentro de ellos la selección natural, han moldeado la especie humana y es a partir de ellos que se da explicación respecto a la morfología, fisiología, genética y comportamiento del ser humano. La selección natural permitió la aparición de numerosas y complejas adaptaciones que conectan al ser humano con una cadena de descendientes con características simiescas, comprender cómo ocurrieron estas transformaciones permite reconstruir la historia de la vida a partir de las características de los organismos que se encuentran en la actualidad (Boyd, R. and Silk, J. 2001).

En esa medida la filogenia nos permite representar la historia evolutiva entre diferentes grupos de organismos (taxones), una reconstrucción filogenética tiene como objetivo utilizar de la mejor manera la información actual para hacer inferencias acerca del pasado, es decir, para obtener hipótesis, Las hipótesis resultantes se expresan en forma de un árbol o cladograma; dentro de las funciones más importantes de la sistemática filogenética encontramos las siguientes (Morrone, J.; 2000):

- Proveer a través de la clasificación, los elementos conceptuales mediante los cuales los científicos pueden comunicar información acerca de los seres vivos.
- Proporcionar a través de árboles o cladogramas las bases para proveer diferentes interpretaciones evolutivas.
- Predecir mediante los árboles y las clasificaciones que se derivan de éstos, las propiedades de los organismos poco conocidos o recién descubiertos.

Un árbol filogenético consta de dos elementos los **nodos** y los **brazos**. Un brazo es una línea que conecta dos nodos, los nodos pueden ser externos, cuando representan los taxones que se están estudiando o, internos, los cuales son puntos que representan un ancestro común de otros dos nodos (véase figura 1), (Hall, B.; 2001).

Un nodo es bifurcado cuando tiene dos descendientes inmediatos o multifurcado si tiene más de dos descendientes inmediatos (politomías), las politomías se clasifican en suaves o duras, se consideran suaves cuando los linajes se bifurcan pero el cambio en la rama interna es tan corto que no puede identificarse, o duras

cuando el linaje ancestral se divide simultáneamente en varios linajes. (Hall, B.; 2001).

Los árboles filogenéticos pueden presentar o no raíz y ésta constituye el ancestro común de todos los taxones que se están analizando. Cuando se tienen árboles sin raíz se puede conocer en qué parte del árbol situar el ancestro común (el nodo raíz) al incluir un **outgroup** o grupo externo, que puede ser una proteína o gen homólogo pero de otra familia, o una especie cercana pero de un grupo distinto al que se está analizando (Hall, B.; 2001).

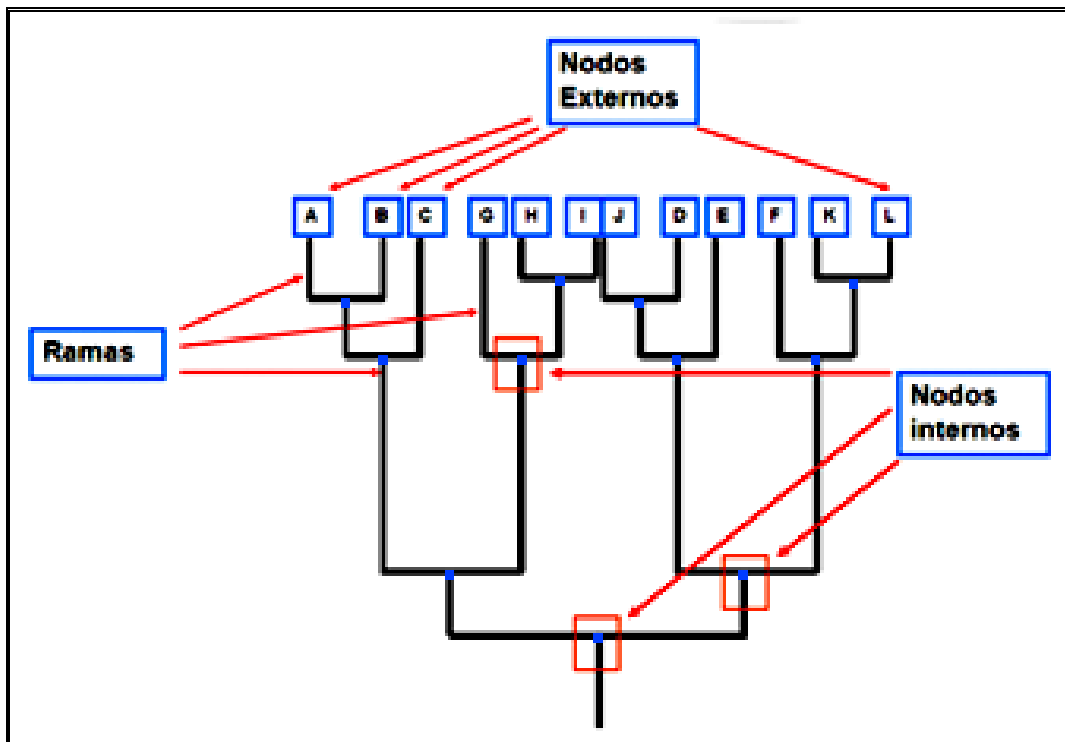


Figura 1. Partes de un Árbol Filogenético. En este caso se destacan dos elementos los brazos representados por líneas negras y los nodos éstos pueden ser internos (puntos azules) o externos cuando representan los taxones (letras mayúsculas).

Es importante tener en cuenta que los grupos de organismo se pueden clasificar como **Monofiléticos** cuando incluyen un antepasado común en todos los descendientes, **Parafiléticos** si faltan algunos de los descendientes, los cuales han sido incluidos en otros grupos y **Polifiléticos** si contienen organismos de varios clados, es decir que no proceden de un antepasado común cercano (Morrone, J.; 2000).

2.1.1 Métodos de Reconstrucción Filogenética

En los análisis filogenéticos se deben tener en cuenta los métodos de reconstrucción de filogenias que se dividen en dos grupos: los basados en distancia y los basados en caracteres (Véase tabla 1):

Tabla 1. Métodos de Reconstrucción Filogenética

Métodos de Reconstrucción Filogenética	
Basados en Distancias	Basados en Caracteres
UPGMA	Maxima Parsimonia (MP)
Neighbor Joining (NJ)	Máxima Verosimilitud (ML)
	Bayesiano (BAY)

- **Métodos Basados en Distancias**

En los métodos basados en distancias, la distancia es expresada como la fracción de los sitios que difieren entre dos secuencias en un alineamiento, estos métodos convierten las secuencias alineadas en una matriz de distancias para diferenciar pares entre las secuencias (Hall, B.; 2001).

El método **UPGMA** (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means) es un método basado en distancias, emplea un algoritmo de clustering o agrupamiento, el algoritmo recibe una matriz de distancias y a partir de ella genera un árbol filogenético. El programa encuentra inicialmente el par de taxones con la menor distancia entre ellos y define la ramificación, entonces combina los dos taxones dentro de un grupo o cluster, en cada paso se unen los dos grupos más cercanos y se recalculan las distancias, definiéndose la distancia entre dos grupos como la media de las distancias que hay entre los miembros de cada grupo (Hall, B.; 2001).

El método **Neighbor Joining** es similar al método UPGMA porque manipula una matriz de distancias que minimiza en cada paso la longitud del árbol, se basa en el concepto de vecinos que son pares de nodos que están más cercanos entre sí que en relación al resto, asume que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud global, y se diferencia porque no construye clusters y calcula directamente las distancias para los nodos internos (Hall, B.; 2001).

- **Métodos Basados en Caracteres**

Los métodos basados en caracteres emplean el alineamiento múltiple para comparar los caracteres dentro de cada columna.

El método de máxima **Parsimonia** se basa en la hipótesis de que el mejor árbol es aquel que requiere menor número de cambios para explicar los datos del alineamiento, este método selecciona el árbol o los árboles que minimizan el número de pasos evolutivos incluyendo las homoplasias (cuando un carácter se desarrolla independientemente a partir de ancestros diferentes), se fija en los sitios informativos del alineamiento es decir aquellos en los que al menos existen dos estados diferentes brindando información sobre cómo se relacionan los taxones (Hall, B.; 2001).

El método de **Máxima Verosimilitud** requiere un modelo de evolución para calcular las probabilidades y generar el árbol que maximiza la probabilidad de observar los datos del alineamiento, es un método de reconstrucción filogenética que brinda información sobre las tasas probables de reemplazamiento de aminoácidos o nucleótidos y requiere del bootstrap como método de confiabilidad para la estructura del árbol (Hall, B.; 2001).

El método **Bayesiano** se basa en el teorema de Bayes que recurre a la técnica de generación de cadenas de Markov de tipo Monte Carlo (Markov Caín Monte Carlo ó MCMC) éstas consisten en la aplicación de un algoritmo de muestreo que realiza un movimiento de desplazamiento al azar a través del espacio de parámetros, mediante el muestreo de valores y el cálculo de la función de probabilidad. Cada muestreo equivale a una modificación aleatoria de la topología del árbol, de las longitudes de las ramas y de los parámetros del modelo de substitución. Si la probabilidad posterior calculada con los parámetros muestreados es mayor que la probabilidad del árbol actual, dicho movimiento es aceptado y si el número de muestreos es lo suficientemente grande puede converger hacia la probabilidad máxima correspondiente a la topología, longitudes de ramas y conjuntos de parámetros óptimos que describe más apropiadamente al conjunto de datos. Por lo tanto este método encuentra un set de árboles con las mayores probabilidades para observar los datos, sus resultados son fáciles de interpretar porque la frecuencia dada para un clado en el set de arboles es idéntica a la probabilidad de ese clado, adicionalmente no es necesario el bootstrap como prueba de confiabilidad para la estructura del árbol (Hall, B.; 2001).

El **Bootstrap** es un método de comprobación de hipótesis en el cual se toman submuestras de los sitios en el alineamiento y se producen árboles basados en estas submuestras, este proceso se repite varias veces (100-1000) y los resultados son un árbol consenso en el que se indica para cada rama en cuantas ocasiones se ha obtenido esa topología (Huelsenbeck, J. and Ronquist, F. 2001).

En la construcción de árboles filogenético a partir de información molecular se deben tener en cuenta los siguientes pasos (Hall, B.; 2001):

1. Identificar la proteína o secuencia de ADN de interés.
2. Identificar otras secuencias que estén relacionadas con la secuencia de interés y obtener archivos electrónicos de estas secuencias.
3. Alinear las secuencias.
4. Usar los resultados del alineamiento para generar un árbol filogenético

2.2 PRIMATES

Una criatura semejante a una musaraña que vivió hace millones de años dio origen a los primates, que han crecido con el tiempo y se han transformado para dar origen a una gran variedad de formas. Los primates representan un orden de mamíferos bastante diverso que se define por una serie de caracteres derivados compartidos como los que se mencionan a continuación, sin embargo no todos los primates comparten todos estos caracteres (Boyd, R. and Silk, J. 2001):

- El dedo del pie es opuesto y las manos son prensiles, permitiéndole a los primates usar sus pies y manos para agarrarse, sin embargo en los humanos el dedo pulgar opuesto del pie se ha perdido.
- En lugar de garras hay uñas planas en manos y pies, de igual forma presentan carnosidades táctiles sensibles con huellas dactilares.
- Las extremidades posteriores dominan la locomoción y su centro de gravedad se encuentra más cerca de estas extremidades.
- Presentan un sentido del olfato no especializado que se ve reducido en primates diurnos.
- Tienen un sentido de la vista altamente desarrollado, presentan ojos grandes ubicados en la parte anterior de la cabeza.
- Presentan un cerebro grande en comparación a los cerebros de mamíferos con tamaño similar.
- Las hembras tienen camadas pequeñas y los periodos de gestación y juveniles son más largos que en mamíferos de tamaño similar.
- En la mitad de las mandíbulas superior e inferior presentan dos incisivos, un canino, tres premolares y tres molares.

2.2.1 Prosimios y Antropoides

Los primates están conformados por los **Prosimios** y los **Antropoides** (Véase figura 2). Los **Prosimios** son los más parecidos a los antepasados de los primates, también se denominan primates inferiores, conforman el grupo más numeroso y se caracterizan por ser de hábitat nocturno y con una vida social pobre, se dividen en tres infraórdenes los Lemuriformes, los Lorisiformes y los Tarsiiformes (De Vore, I. and Eimerl, S. 1969).

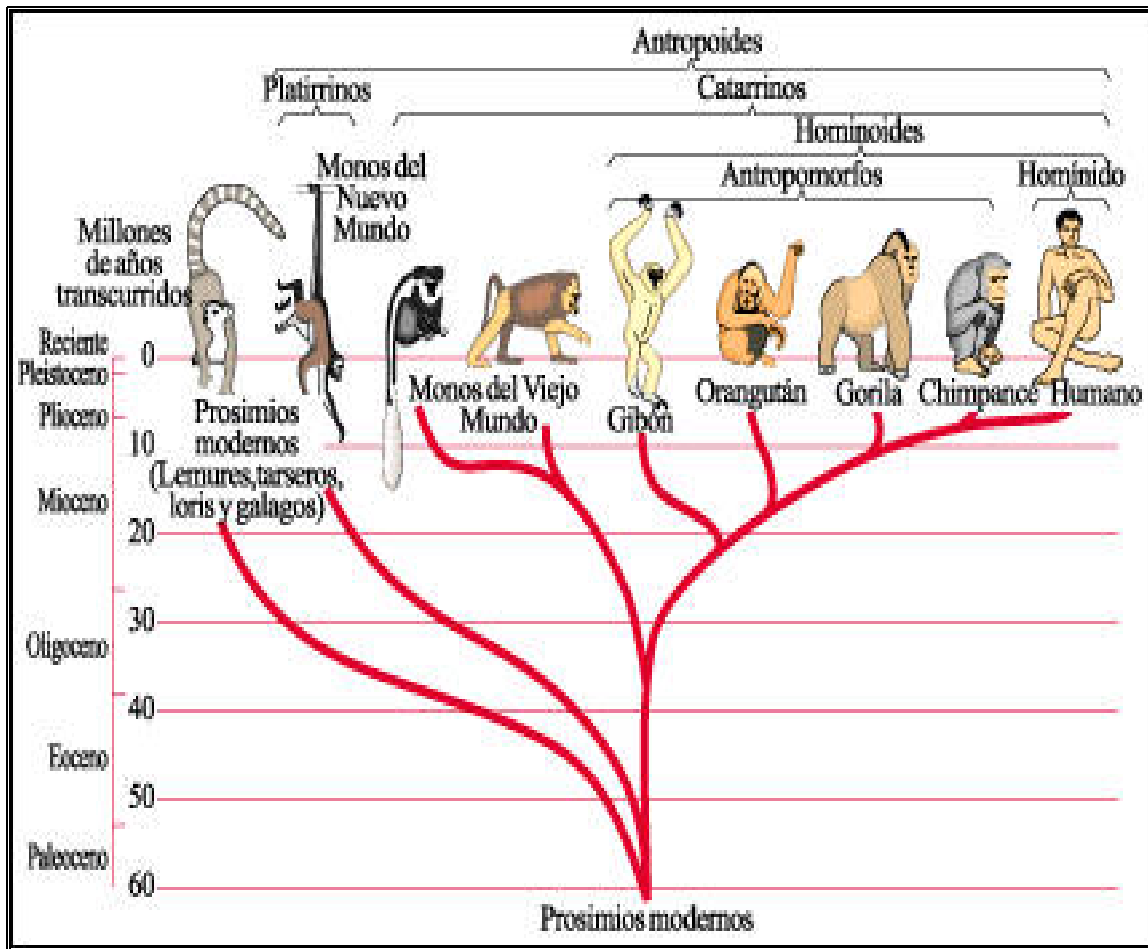


Figura 2. Clasificación de Primates Actuales. Disponible en <http://www.portalciencia.net/images/clasifi.jpg>

Los **Antropoides** se dividen en dos infraórdenes (Platyrrhini y Catarrhini), el infraorden Platyrrhini está conformado por los monos del nuevo mundo, éstos se ubican en centro y sudamérica, se diferencian de los monos del viejo mundo porque los monos del viejo mundo tienen sociedades con jefes y partidarios, mientras que los del nuevo mundo tienen una organización menos rígida, en este grupo encontramos los Cebidos, los Titíes, los Aotus, entre otros (De Vore, I. and Eimerl, S. 1969).

En el infraorden Catarrhini se encuentran los monos del viejo mundo, los Pongidos, los Hilobatidos y los Homínidos; los monos del viejo mundo se ubican en África, Asia Sudoriental y en el archipiélago de Malayo, pero no en Madagascar donde los únicos primates son los prosimios, en este grupo encontramos los Colobos, los Hanumantes, los Babinos, los Macacos, los Guenones y los Mangabis. Los Pongidos están representados por el Orangután, el Gorila y el

Chimpancé, se localizan en África y junto con los Hilobatidos (Gibones) se conocen como primates superiores, finalmente los Homínidos están representados por el humano y sus ancestros (De Vore, I. and Eimerl, S. 1969).

Hace aproximadamente unos 50 millones de años los primates empezaron a presentar tendencias al aumento en el volumen del cerebro y al desplazamiento de las órbitas de sus ojos hacia la parte frontal de la cara, estos factores permitieron un aumento en el número de neuronas y en los niveles de percepción y asociación en los hemisferios cerebrales, favoreciendo la capacidad para comprender el espacio y el tiempo coordinados con la memoria (Estrada, A. 1996).

De estos primates se originaron los primates actuales como Lemures, Tarsidos y Loris que conservaron en general la organización de sus ancestros, los monos del viejo mundo se diversificaron en numerosos géneros y especies adaptadas a la dieta vegetariana. Los Pungidos, los Hilobátidos y los Homínidos aparecieron más tarde, los Hilobátidos se adaptaron gradualmente al salto en el vacío que daban gracias al impulso de sus grandes brazos; los Pongidos fueron adaptándose tardíamente al uso de los brazos para poderse desplazar entre los árboles y avanzar en tierra apoyándose sobre el nudillo de las manos (Estrada, A. 1996).

Los primeros Homínidos surgieron hace 14 millones de años en África y posteriormente en Asia, caracterizados por una postura erguida y la liberación de las manos; durante la larga evolución de los homínidos se generaron varios generos y especies de los cuales solo persistieron las formas africanas; dentro de sus cambios se destacan la reducción del aparato dental, el aumento en el volumen del cerebro, el perfeccionamiento de la postura erguida y la locomoción bipeda (Estrada, A. 1996).

Los humanos evolutivamente nos encontramos más cerca de los primates no humanos que de otra especie animal, compartimos con ellos muchos aspectos morfológicos, fisiológicos, moleculares, de desarrollo y de comportamiento, de esta manera los primates no humanos representan un modelo único para comprender las raíces evolutivas de la naturaleza humana (Boyd, R. and Silk, J. 2001).

A la especie ***Homo sapiens*** pertenecen todos los hombres modernos aunque con variantes debido a la diversidad de razas existentes (Véase figura 3), dentro de éstas se destacan las siguientes: los Australoides que se caracterizan por ser la raza más difundida, los Caucasoides que es un grupo diverso que se especializó en vivir en climas templados, los Mogoloides que están más adaptados para vivir en climas fríos y los Negriodes que se especializaron en vivir en climas tropicales (Cockrum, E. and McCauley, W.; 1967).



Figura 3. Razas Humanas. Disponible en <http://www.etnografo.com/races.jpg>

El chimpancé (*Pan troglodytes*) es una especie muy variable en cuanto a coloración, tamaño corporal, zonas desnudas de su cuerpo, morfología craneal entre otras; sin embargo existen muchas características comunes en toda la especie, es un primate más pequeño que el orangután, los machos pueden alcanzar a medir como máximo 1.5 metros, presentan miembros posteriores más cortos que los anteriores, se mantiene erguido sobre sus extremidades posteriores, sus orejas son de gran tamaño, tiene una nariz pequeña, cara desnuda, presencia de pelo blanco en las axilas en forma de mechón, sus manos y dedos son largos menos el pulgar que es corto para permitirle efectuar un agarre de precisión y manipular herramientas simples con eficacia. Viven en familias muy numerosas integradas por un macho viejo, diversas hembras y jóvenes con edad variada, no tienen una residencia fija y vagan continuamente entre los límites de una región (Sabater, P.; 1992), (Véase figura 4).



Figura 4. Chimpancé (*Pan troglodytes*). Disponible en <http://www.geocities.com/robbinknapp/romdap/ptroglol.jpg>

El orangután (*Pongo Pigeus*) se caracteriza por presentar miembros anteriores muy largos en relación a los posteriores, sus extremidades posteriores tienen un escaso desarrollo, su frente es alta, sus orejas son pequeñas, su cuello es corto, presentan un pelaje largo y de color rojizo y su tamaño supera los 1.4 metros. Son arborícolas por excelencia, son trepadores y su existencia transcurre en la espesura de los bosques lejos de las zonas que frecuenta el hombre (Scottci, G.; 1960), (Véase figura 5).



Figura 5. Orangutan (*Pongo Pigeus*). Disponible en <http://adi-38.bio.ib.usp.br/bio5706/2005/orangutan.jpg>

El mono Rhesu o Bunder (*Macaca mulata*) es un primate que habita en la India y parte de la China, los ejemplares machos alcanzan los 60 centímetros aproximadamente, su cuerpo es robusto y su cola mide 25 centímetros, su parte superior se encuentra cubierta de un denso pelaje de color gris amarillento, mientras que en la parte inferior su pelaje es poco espeso y de color blanquecino, el rostro, las orejas las manos y pies presentan una coloración cobre y las callosidades son de un rojo intenso. Se caracterizan por vivir en bandadas dirigidas por machos, se hallan en lugares donde la vegetación es abundante y próxima a fuentes de agua y su alimentación es a base de frutos y semillas (Scortcci, G.; 1960), (Véase figura 6).



Figura 6. Mono Rhesus (*Macaca mulata*). Disponible en <http://www.fotonatura.org/galerias/fotos/usr16782/12423179zW.jpg>

2.3 ESPECIE SELECCIONADA COMO GRUPO EXTERNO

La especie *Rattus norvegicus* se caracteriza por sus pies grandes y cola cilíndrica, presentan un pelaje espeso y de color variable, la especie *Rattus norvegicus* es conocida como la rata de las cloacas es un poco más grande que la rata común o la rata negra, se caracteriza por presentar un color gris parduzco en las partes superiores y más claro en las partes inferiores (Scortcci, G.; 1960), (Véase figura 7).



Figura 7. Rata de las Cloacas (*Rattus norvegicus*). Disponible en http://www.discoverlife.org/IM/I_RB/0000/320/Rattus_norvegicus,I_RB27.jpg

2.4 RECEPTORES DE GLUTAMATO

Una característica importante en el ser humano y los primates es que presentan cerebros con mayor tamaño respecto al tamaño corporal en relación a otros mamíferos, lo anterior se explica a partir de la evolución acelerada de los genes que se expresan en el sistema nervioso, que involucraron cambios en el tamaño y complejidad del cerebro durante la evolución de los primates y especialmente del linaje de la especie *Homo sapiens* (Dorus, S. *et al.* 2004).

Las habilidades cognitivas están directamente relacionadas con el tamaño del cerebro, por esta razón en los primates la actividad pre y postsináptica es mayor mejorando la capacidad de memoria y aprendizaje, estos procesos se ven favorecidos por la acción de los receptores de glutamato (Maren, S. and Baudry, M. 1995).

El glutamato es el principal neurotransmisor del sistema nervioso central en los mamíferos, su función está relacionada con varios procesos como el desarrollo neuronal, neurotoxicidad, modelos de plasticidad neuronal, como sustrato celular en el aprendizaje, entre otros, este aminoácido actúa a través de **receptores ionotrópicos** que conforman canales iónicos y **metabotrópicos** que modulan la acción intracelular de segundos mensajeros (Nakanishi, S. *et al.* 1992), (Véase figura 8).

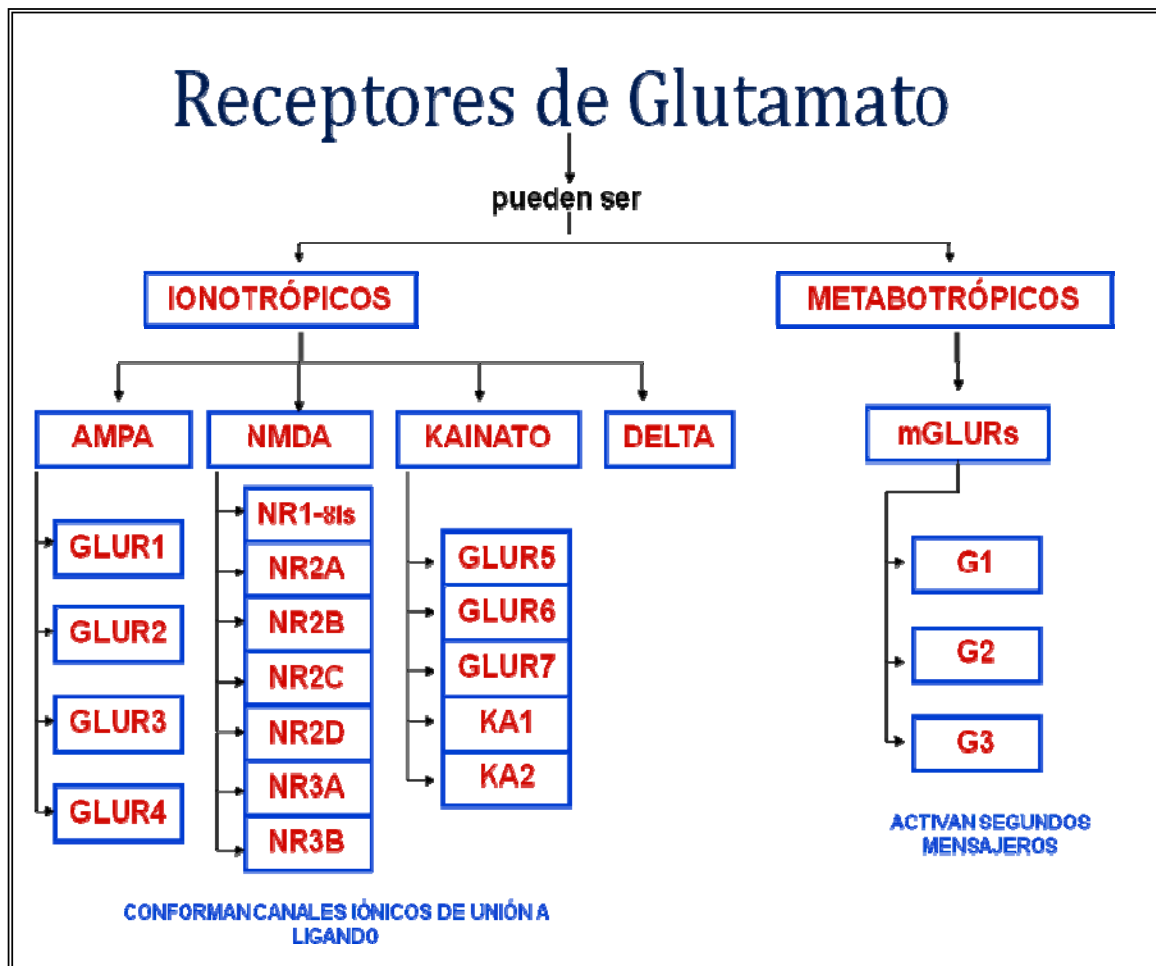


Figura 8. Clasificación de los Receptores de Glutamato

Los receptores metabotrópicos (mGLURs) están acoplados a segundos mensajeros como diacilglicerol (DAG), inositol-3-fosfato (IP₃) y AMP cíclico (AMPc) y los receptores ionotrópicos (iGLURs) conforman canales permeables a iones como Na⁺, Ca²⁺ y K⁺; se pueden clasificar de acuerdo con su estructura molecular, propiedades fisicoquímicas y sensibilidad al agonista en cuatro grupos denominados NMDA, AMPA, Kainato y Delta. (Nakanishi, S. *et al.* 1992.; Monaghan, D.; Bridges, R.; and Cotman, C.; 1989), (Véase figura 9).

Los receptores (iGLURs) son mediadores importantes de las señales de excitación sináptica, y contribuyen a los procesos de memoria y aprendizaje, así como en diversas neuropatologías como la epilepsia y la isquemia. Su función principal es recibir la señal química del glutamato que se une a un dominio extracelular del receptor, y convertirla en una señal eléctrica a través de la formación de canales transmembranales permeables a los cationes (Mayer, M.; and Armstrong, N.; 2004).

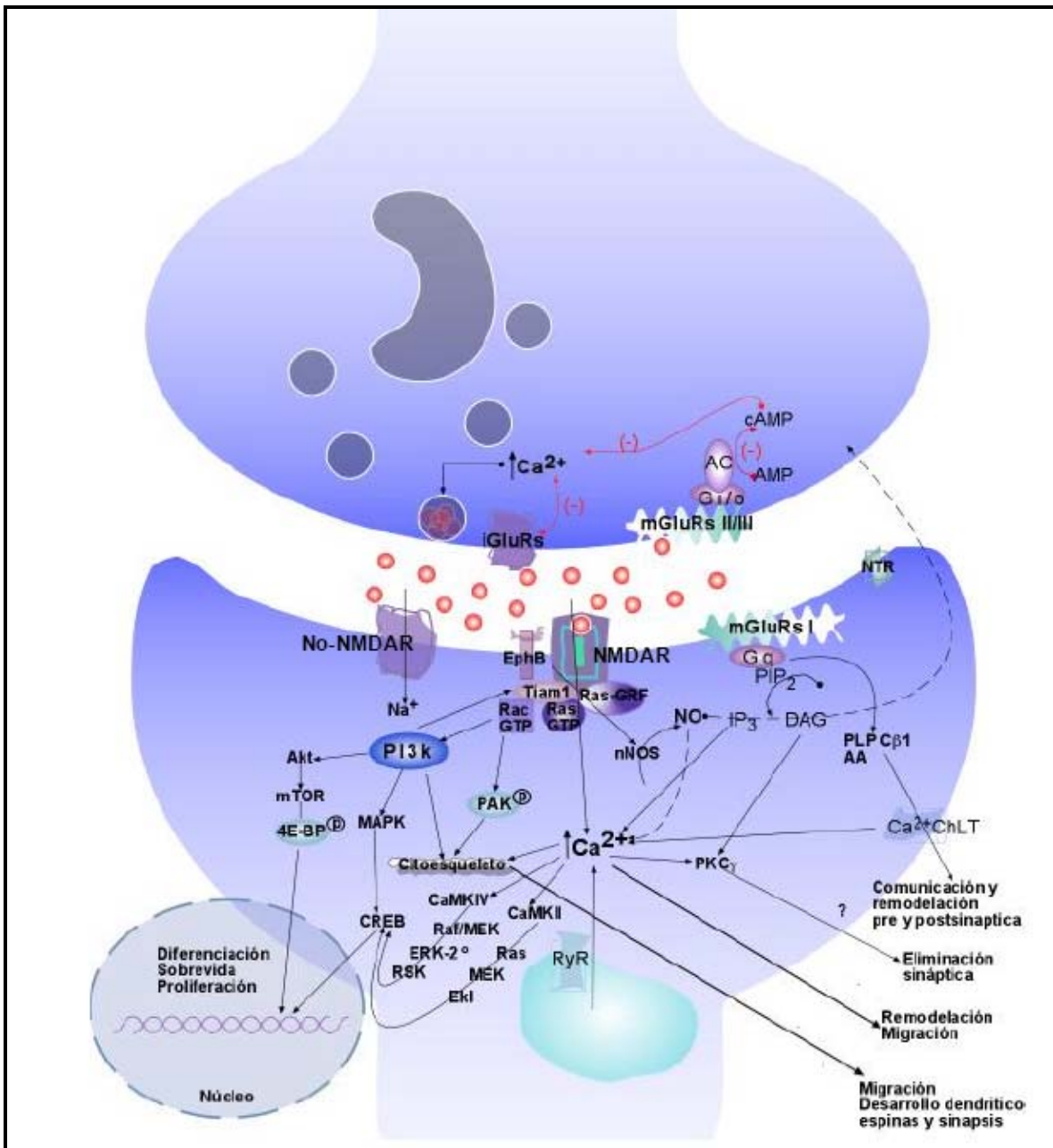


Figura 9. Participación de los Receptores de Glutamato en los diferentes procesos del desarrollo neuronal. La activación de los receptores del tipo NMDA promueve la entrada de Ca^{2+} extracelular, mientras que los receptores del tipo no NMDA favorecen la entrada de Na^+ y K^+ , en el caso de los receptores metabotrópicos se modulan la actividad de segundos mensajeros como DAG, IP_3 y AMPc. La actividad de estos receptores converge en vías de señalización que son importantes en procesos de supervivencia, diferenciación, crecimiento dendrítico, comunicación sináptica, entre otros. Tomado de Moreno, G.; y Zarain, A.; 2006.

Un Estudio a nivel estructural de los canales iónicos de glutamato en líneas celulares HEK proporciona evidencias de que estos receptores presentan una estructura heteroligoméricas (Rosenmund, C.; Stern-Bach, Y.; and Stevens, C.; 1998). Molecularmente los iGLURs se caracterizan por ser proteínas integrales de membrana que presentan tres dominios transmembranales designados como M1, M3 y M4, un bucle reentrante en la membrana en la zona citoplásmica designado como M2, el amino terminal localizado en la zona extracelular y el carboxi terminal en la zona citoplasmática, dos dominios de unión a ligando designados como S1 y S2 que se encuentran adyacentes al dominio M1 y en el bucle que se forma entre los dominios M3 y M4 y un dominio flip/flop representado por una estructura helicoidal, en el lado opuesto del dominio de unión a ligando S2 (Véase figura 10) (Dingledine, R.; Borges, K.; *et al.* 1999).

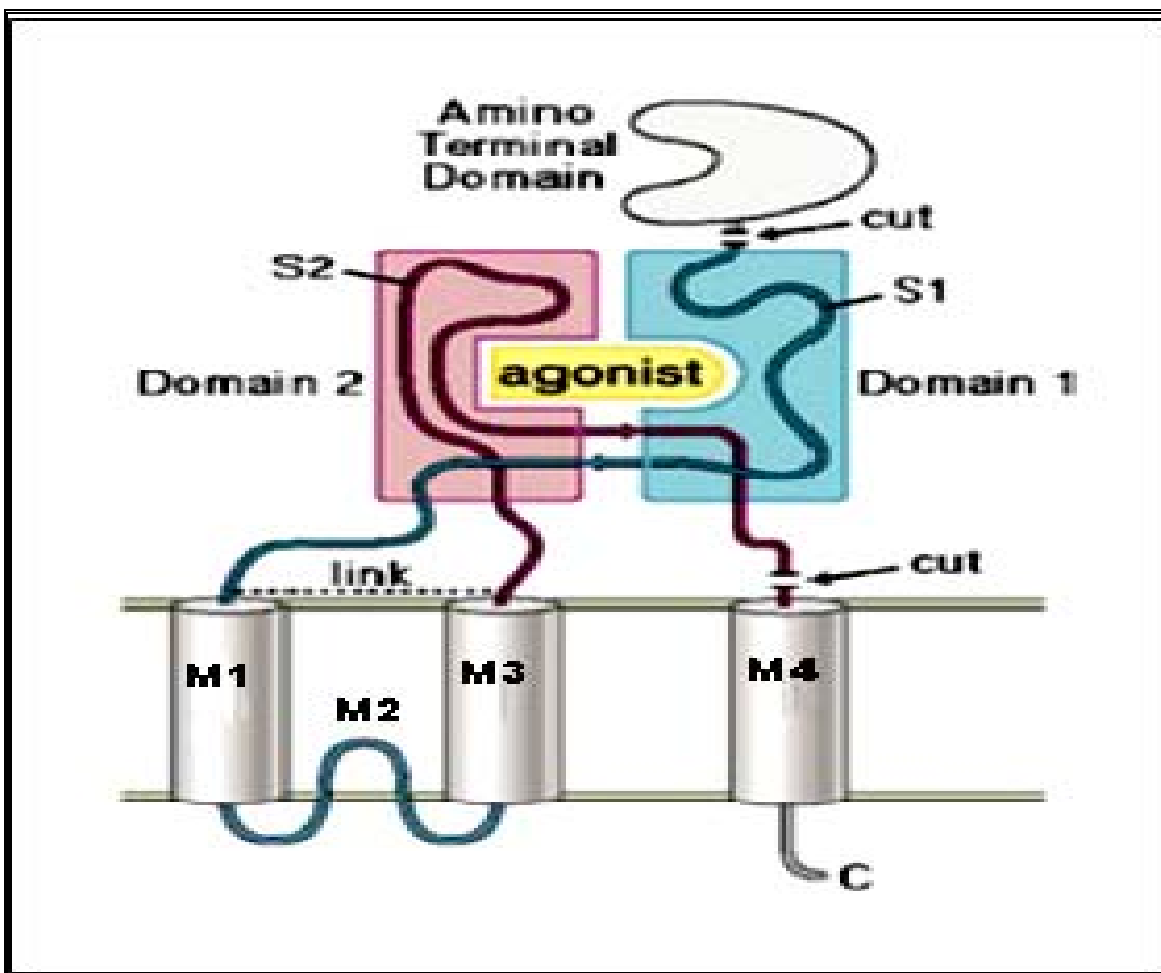


Figura 10. Ubicación en la Membrana de los Receptores Ionotrópicos de glutamato. Tomado de Mayer, M.; and Armstrong, N.; 2004.

En un estudio reciente se resolvió la estructura cristalina de los dominios extracelulares y transmembranales en un homotetrámero de subunidades GluR 2 de rata (Véase figura 11 y 12), estos hallazgos sugieren que la estructura que adoptan los canales conformados para las interacciones de subunidades NR1 y NR2A de NMDA puede ser similar (Sobolevsky, A.; Rosconi, M.; and Gouaux, E.; 2009).

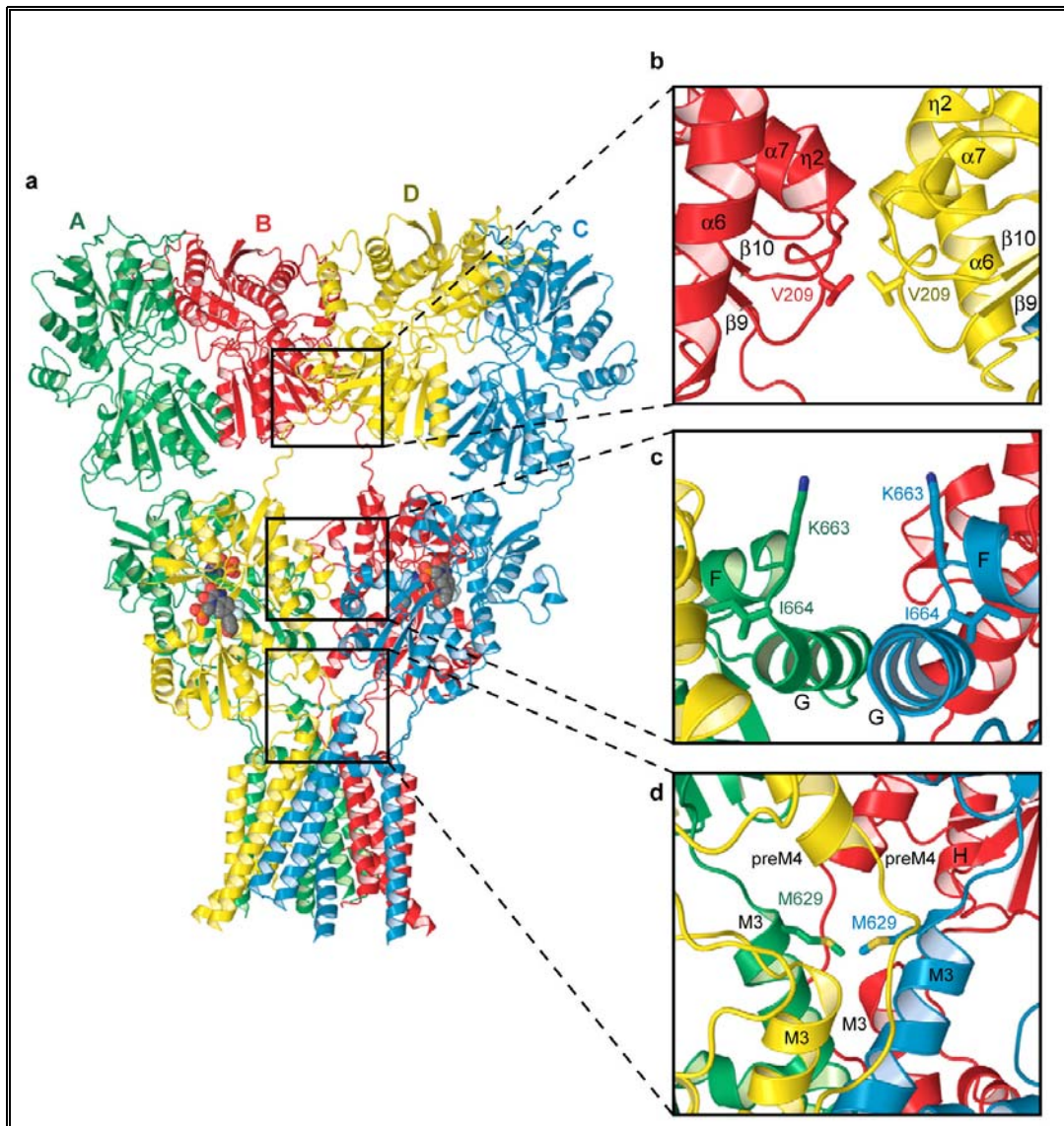


Figura 11. Exploración de interfaces en las intersubunidades GluR2 del receptor AMPA. a), diagrama de cintas de la estructura cristalina GluR2 con un color diferente para cada subunidad. b-d), planos de cierre entre: dos dímeros de la región extracelular (b), dos dímeros en la región de unión a ligando (c) y dos dímeros en la parte inferior del canal iónico. Tomado de Sobolevsky, A.; Rosconi, M.; and Gouaux, E.; 2009.

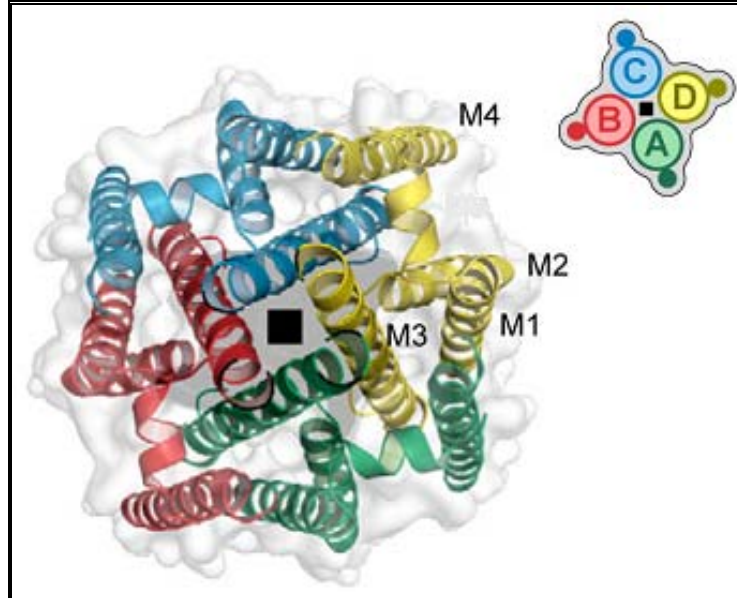


Figura 12. Simetría de los Dominios Transmembranales en las Subunidades Glur2 de AMPA. Tomado de Sobolevsky, A.; Rosconi, M.; and Gouaux, E.; 2009.

2.4.1 NMDA

Éste receptor está conformado por estructuras tetraméricas compuestas por dos subunidades NR1 y dos subunidades de la familia NR2 (NR2A-NR2D) en donde la subunidad NR1 es esencial para la funcionalidad del receptor (Dingledine, R.; Borges, K.; *et al.* 1999). Las cuatro subunidades NR2 es propia de los animales vertebrados y dada la similitud de sus secuencias proteicas sugieren que son parálogos que se originaron por eventos duplicación en el gen, en contraste con un solo ortólogo que se presenta en el linaje de los invertebrados (Ryan, T.; Emes, R.; *et al.* 2008). Dentro del grupo de subunidades que pertenecen al receptor NMDA también se encuentran las subunidades NR3A y NR3B que al asociarse con las otras subunidades actúan como reguladores negativos del receptor NMDA, porque alteran las propiedades de permeabilidad al calcio y sensibilidad al magnesio (Al-Hallaq, R.; Jarabek, B. ; *et al.* 2002).

Estudios realizados con las proteínas de las subunidades NR1 y NR2 mutadas demuestran que cuando se sustituyen los residuos que se sitúan antes del dominio transmembranal M1 y los residuos correspondientes al bucle que separa los dominios transmembranales M2 y M3 en la subunidad NR2, la afinidad por el glutamato decrece considerablemente, y cuando la sustitución de estos mismos residuos se presenta en la subunidad NR1 la afinidad por la glicina disminuye, confirmando que el sitio de unión a glicina se encuentra en la subunidad NR1 y el sitio de unión a glutamato se ubica en la subunidad NR2 (Kuryatov, A.; Laube, B.;

et al. 1994).

La subunidad NR1 contiene tres sitios alternativos de splicing: en el exón 5 en el N-terminal designado como N1, en el exón 21 en el C-terminal designado como C1 y en el exón 22 en el C-terminal designado como C2, cuando C2 está ausente se presenta un nuevo marco de lectura que codifica una secuencia alternativa que aparece antes del codón de parada designada como C2' (Zukin, R.; and Bennett, M.; 1995), (Véase figura 13).

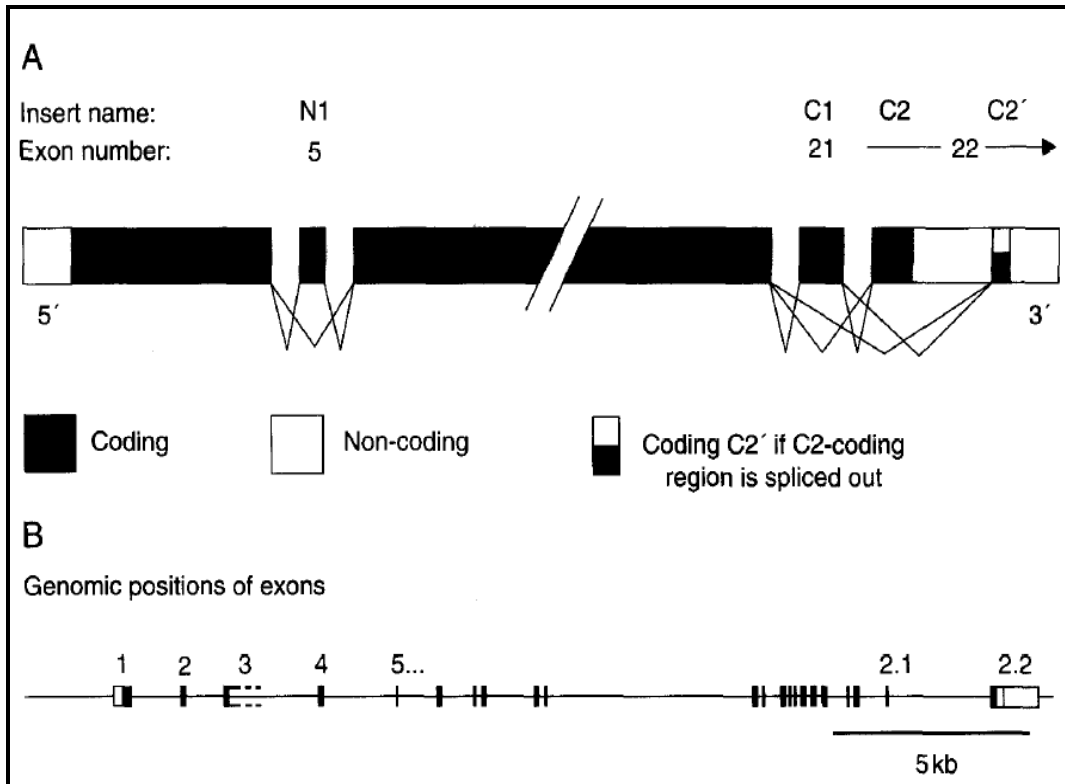


Figura 13. Propuesta del ARNm de NR1 que muestra el empalme alternativo de tres exones y la ubicación de éstos en la estructura genómica. A) El gen NR1 presenta un total de 22 exones, tres de ellos (los exones 5, 21 y 22) son sometidos a empalme alternativo para generar ocho variantes de la subunidad NR1. El exón 5 codifica una secuencia de empalme de 21 aminoácidos (denominado N1) que se inserta en el dominio amino-terminal prevista en el residuo 190 de la proteína. Los exones 21 y 22 codifican dos secuencias independientes con empalmes consecutivos de 37 aminoácidos (C1) y 38 aminoácidos (C2) respectivamente, que conforman el último tramo del dominio carboxi-terminal. **B)** Representación esquemática de la organización del gen NR1 mostrando sus 22 exones. Los exones 5, 21 y el primer segmento del exón 22 corresponden a los exones empalmados alternativamente en el ARN de la subunidad NR1. Tomado de Zukin, R.; and Bennett, M.; 1995.

Son varios los tipos de nomenclatura que se emplean para las variantes de splicing de la subunidad NR1, una de ellas consiste en nombrar las variantes como NR1-1 cuando se encuentran presentes C1 y C2, NR1-2 cuando C1 está ausente, NR1-3 cuando C2 está ausente y NR1-4 cuando C1 y C2 están ausentes, adicionalmente en cada una aparecen las letras (a) y (b) que indican la ausencia y presencia de N1 respectivamente (Véase tabla 2), (Hollmann, M. Boulter, J.; *et al.* 1993).

Tabla 2. Nomenclatura para las Variantes de la Subunidad NR1 de NMDA (Hollmann, M. Boulter, J.; *et al.* 1993)

<i>Sitios Alternativos de Splicing</i>			
N1	C1	C2	Nombre de la variante
-	-	-	NR1-4a
-	-	+	NR1-2a
-	+	-	NR1-3a
-	+	+	NR1-1a
+	-	-	NR1-4b
+	-	+	NR1-2b
+	+	-	NR1-3b
+	+	+	NR1-1b

El tiempo de permanencia del glutamato en la subunidad NR2 es fundamental para la regulación de la potencia en los receptores NMDA, empleando receptores recombinantes NR1/NR2A en oocitos de la especie *Xenopus laevis* se evaluó la función del residuo serina 670 en el dominio de unión a ligando S2 de la subunidad NR2A, el cual juega un papel importante en relación al tiempo en el que permanece unido el glutamato a esta subunidad (Véase figura 14), la mutación puntual de S670 por alanina provoca una reducción en la potencia del glutamato en 124 veces, adicionalmente el residuo S670 es un residuo que se mantiene conservado en los receptores ionotrópicos de glutamato excepto en las subunidades Glur6 y Glur7 de Kainato que presentan una alanina en esta posición, lo que sugiere que la alanina no juega un papel importante en la unión a glutamato en estas subunidades (Wyllie, D.; Johnston, A.; *et al.* 2006).

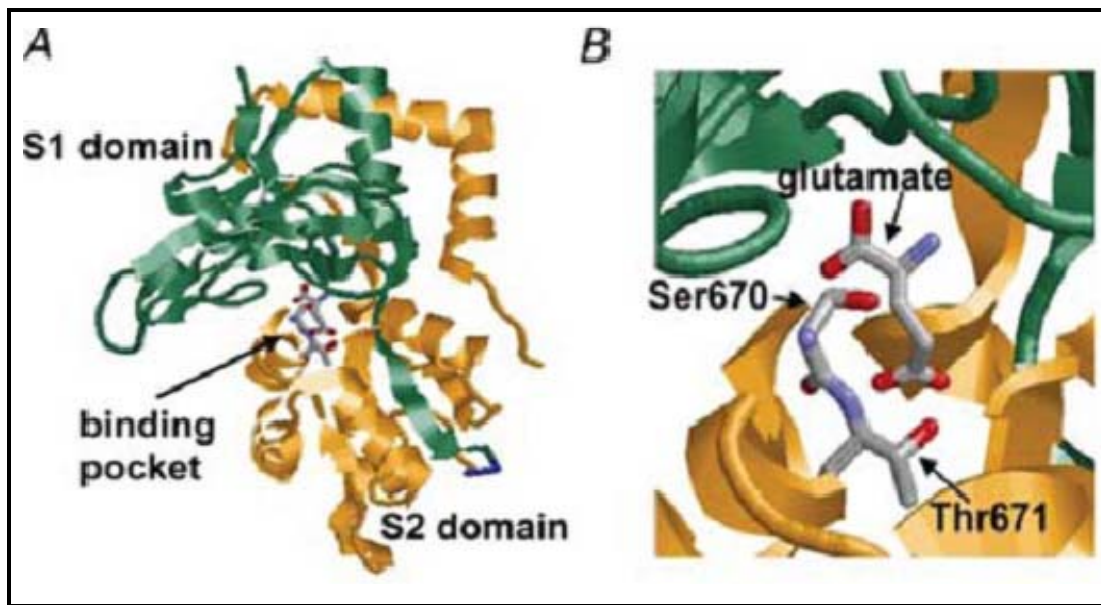


Figura 14. Ubicación Ser670 en la subunidad NR2A del receptor de NMDA A) estructura del bolsillo de unión al ligando S1S2 para la subunidad NR2A del receptor de NMDA. B) ampliación visual del bolsillo de unión a ligando resaltando los residuos Ser670 y Thr671 que interactúan con el glutamato. Tomado de Wyllie, D.; Johnston, A.; *et al.* 2006.

En otro estudio se evaluó la potencia y la eficacia del glutamato y de varios compuestos semejantes a éste en relación al sitio de unión en los receptores NR1/NR2A, NR1/NR2B, NR1/NR2C y NR1/NR2D, los resultados demuestran una mayor potencia en la subunidad NR2D en comparación con la subunidad NR2A; a partir de simulaciones de dinámica molecular con el dominio de unión a ligando S2, se observa que el residuo Tyr 732 en NR2D (Tyr 711 en NR2A) puede cambiar la interacción con el ligando generando más interdominios de contacto y favoreciendo la potencia del glutamato en 46 veces (Erreger, K.; Geballe, M.; *et al.* 2007).

El modelamiento con los dominios de unión a glicina y glutamato en las subunidades NR1 y NR2B respectivamente, demuestra que estos sitios son muy similares en su estructura y difieren en algunas cadenas laterales y en el tamaño de los residuos aromáticos; adicionalmente la predicción muestra que la sustitución de los residuos E387, K459, R493 y S664 en la secuencia de la subunidad NR2B disminuye la afinidad por el glutamato de 100 a 200 veces, la sustitución del residuo E387 por una alanina causa una pérdida de la interacción iónica con el grupo amino del agonista, el residuo K459 al parecer no interactúa directamente con el glutamato pero puede jugar un papel importante en la estabilización del bolsillo de unión al ligando y la sustitución del residuo R493 por una lisina genera un receptor no funcional (Loube, B.; Hirai, H.; *et al.* 1997).

2.4.2 AMPA

Son otro tipo de receptores de glutamato que se conforman a partir de las combinaciones de las subunidades GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, la asociación de las subunidades GluR1, GluR3 y/o GluR4 favorecen la permeabilidad al Ca^{2+} , mientras que cuando se asocia la subunidad GluR2 en la conformación del receptor la permeabilidad al Ca^{2+} se reduce (Seeburg, P. 1993; Verdoorn, T.; Burnashev, N. *et al.*, 1991; Geiger, J.; Melcher, T.; *et al.*, 1995; Hollmann, M.; Hartley, M.; *et al.*, 1991). Estos canales iónicos presentan una estructura tetramérica la cual se activa para generar una apertura del canal a partir de la unión de moléculas de glutamato, en estudios de cristalografía se determinó que la sustitución del residuo leucina 497 por tirosina genera un efecto de no desensibilización lo que impide el movimiento en la interfaz del dímero y por consiguiente en el ensamble del tetrámero (Sun, Y.; Olson, R.; *et al.*, 2002). A partir de la expresión de la subunidad GluR1Qflip en células HEK-293, que presenta la mutación L497Y se realizaron experimentos de pulso laser y fotólisis a partir de los cuales se determinó que el número mínimo de moléculas de glutamato que se requieren para unirse al receptor y generar una apertura del canal es de 2 (Pei, W.; Ritz, M.; *et al.*, 2007).

2.4.3 KAINATO

El receptor Kainato está representado por una familia de cinco subunidades designadas como GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2, las subunidades GluR5-GluR7 se caracterizan por ser altamente homólogas presentando un porcentaje de identidad entre 70% y 80%, las subunidades KA1 y KA2 presentan un 68% de identidad pero solo conservan un porcentaje de identidad del 40% respecto a las subunidades GluR5-GluR7 (Werner, P.; Voight, M.; *et al.*, 1991; Sakimura, K.; Morita, T.; *et al.*, 1992; Herb, A.; Burnashev, N.; *et al.*, 1992).

A través de estudios de cristalografía con los dominios S1 y S2 en las subunidades GluR se ha podido proponer que la unión del agonista genera un cierre en la cubierta del dominio de unión y promueve la apertura del canal, mientras el ligando esté unido, los receptores de glutamato sufren un cambio conformacional entrando en un estado de insensibilidad en el que el sitio de unión a ligando se desacopla del poro del canal, después de entrar en este estado los receptores deben invertir el cambio conformacional antes de ser reactivados por el agonista (Armstrong, N.; Sun, Y.; *et al.* 1998; Mayer, M.; 2005; Nanao, M.; Green, T.; *et al.* 2005).

Los residuos A518, A689 y N721 ubicados en el dominio de unión a ligando de la subunidad GluR6 sustituyen aminoácidos conservados de serina y treonina en se encuentran en otros receptores ionotrópicos de glutamato y juegan un papel importante en la función de la subunidad GluR6, ya que a partir de la mutación de

estos residuos (A518T, A689S, N721T) (Véase figura 15), se pudo determinar que están involucrados en la influencia estérica con el agonista, definen el tamaño del bolsillo de unión a ligando, participan en la desactivación, la desensibilización y la cinética de recuperación del receptor (Kistler, T.; and Fleck, M.; 2007).

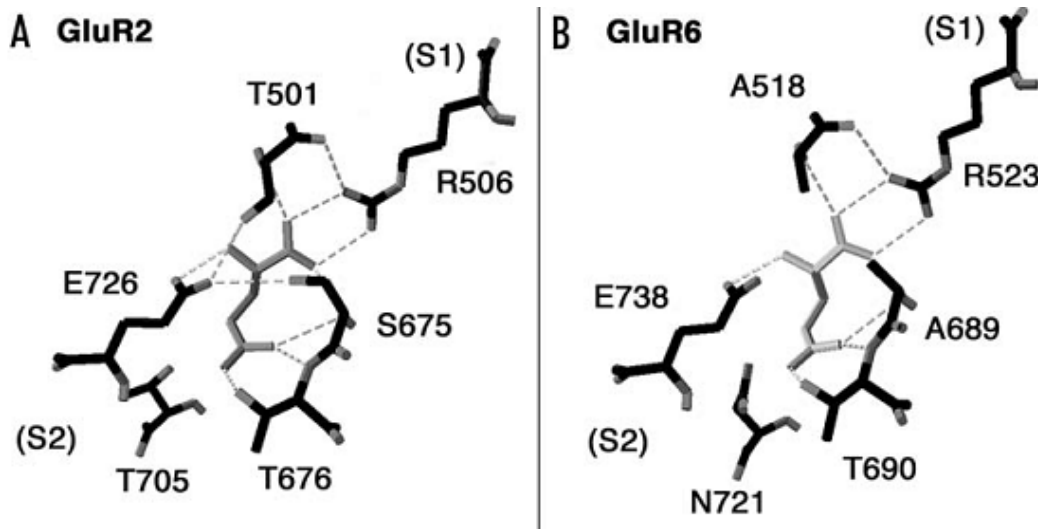


Figura 15. Sitios de unión a ligando para las subunidades GluR2 y GluR6. A) sitio de unión al ligando representado con el glutamato y su interacción con los residuos T501 y R506 que se encuentran en el dominio S1 y S675, T676, T705 y E726 que se encuentran en el dominio S2, en la subunidad GluR2. **B)** sitio de unión al ligando representado con el glutamato y su interacción con los residuos A518 y R523 se encuentran en el dominio S1 y A689, T690, E738 y N721 que están situados en el dominio S2, en la subunidad GluR6.

En un estudio filogenético se relacionaron la familia de genes iGLURs en animales y los genes GLR (glutamate receptor-like) en plantas como *Arabidopsis* y se empleó como grupo externo secuencias bacterianas, los análisis por parsimonia demuestran que los genes GLR son el grupo basal para la familia de receptores de glutamato, esta ubicación indica que la divergencia entre los receptores putativos de la planta y los iGLURs en animales surgió antes de la divergencia entre los iGLURs en animales (NMDA, AMPA, Kainato), (Véase figura 16); a partir de estos resultados se sugiere que la señalización célula-célula por aminoácidos excitatorios en el cerebro de los animales, surgió de un mecanismo de señalización primitivo que existió inicialmente en las plantas (Chiu, J.; Desalle, R.; *et al.* 1999).

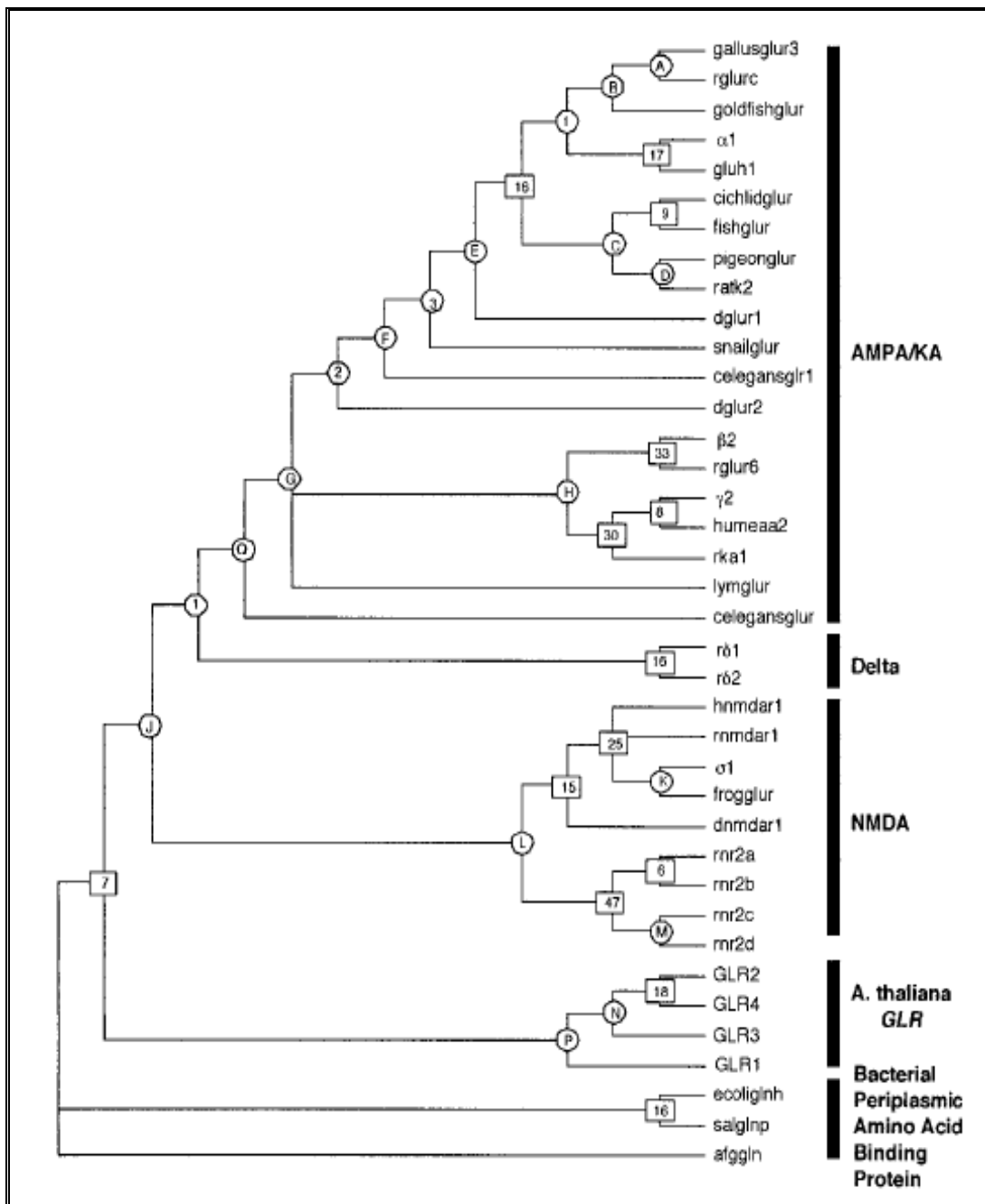


Figura 16. Árbol Filogenético Generado por Análisis de Parsimonia entre los Genes iGLURs en Animales y GLR en Plantas como *Arabidopsis*. Tomado de Chiu, J.; Desalle, R.; *et al.* 1999.

A través de procedimientos *in silico* se analizó la evolución molecular del dominio C-terminal en el receptor NMDA, los resultados demuestran que la evolución generó un dominio C-terminal no estructurado en la subunidad NR2 en el linaje de

los vertebrados, el cual participa en complejos de señalización que influyen en la plasticidad neuronal y puede contribuir a la diferenciación de las especies en relación a su comportamiento y función cognitiva, teniendo en cuenta que esta región es mucho más corta en especies invertebradas y solo presenta el dominio de señalización denominado PDZ (Véase figura 17) (Ryan, T.; Emes, R.; *et al.* 2008).

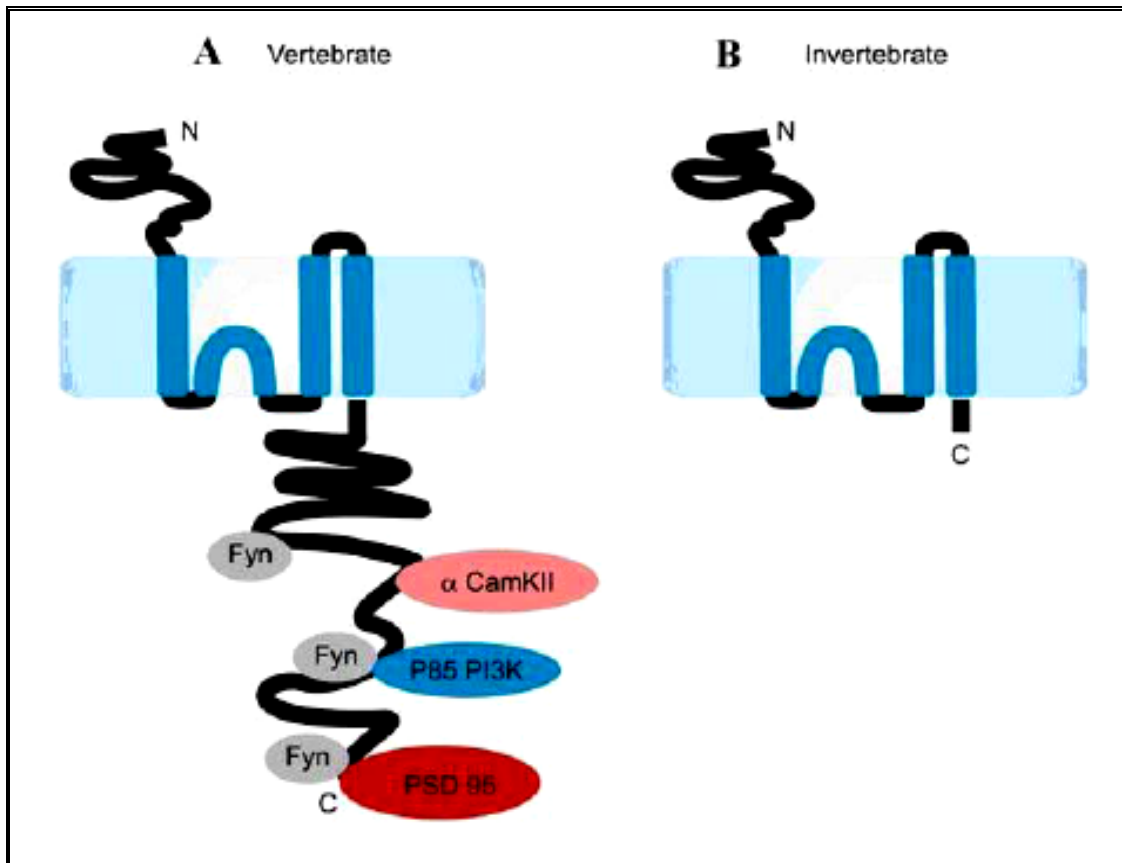


Figura 17. Modelo de la Subunidad NR2 en Vertebrados e Invertebrados. Tomado de Ryan, T.; Emes, R.; *et al.* 2008.

El resultado de un análisis filogenético con la región central de las subunidades NR2 muestra una topología en la cual las subunidades NR2A y NR2B se agrupan en un clado y las subunidades NR2C y NR2D en otro (Véase figura 18), esta agrupación se confirma a partir de los resultados obtenidos en un alineamiento con la región C-terminal, la cual resultó ser rica en serinas y con un porcentaje de identidad del 29% en las subunidades NR2A y NR2B, en comparación con las subunidades NR2C y NR2D, en donde esta región es más corta, es rica en prolinas y con un porcentaje de identidad del 19%, lo que sugiere que evolutivamente se produjo una duplicación que dio origen a los cuatro parálogos de NR2 (Ryan, T.; Emes, R.; *et al.* 2008).

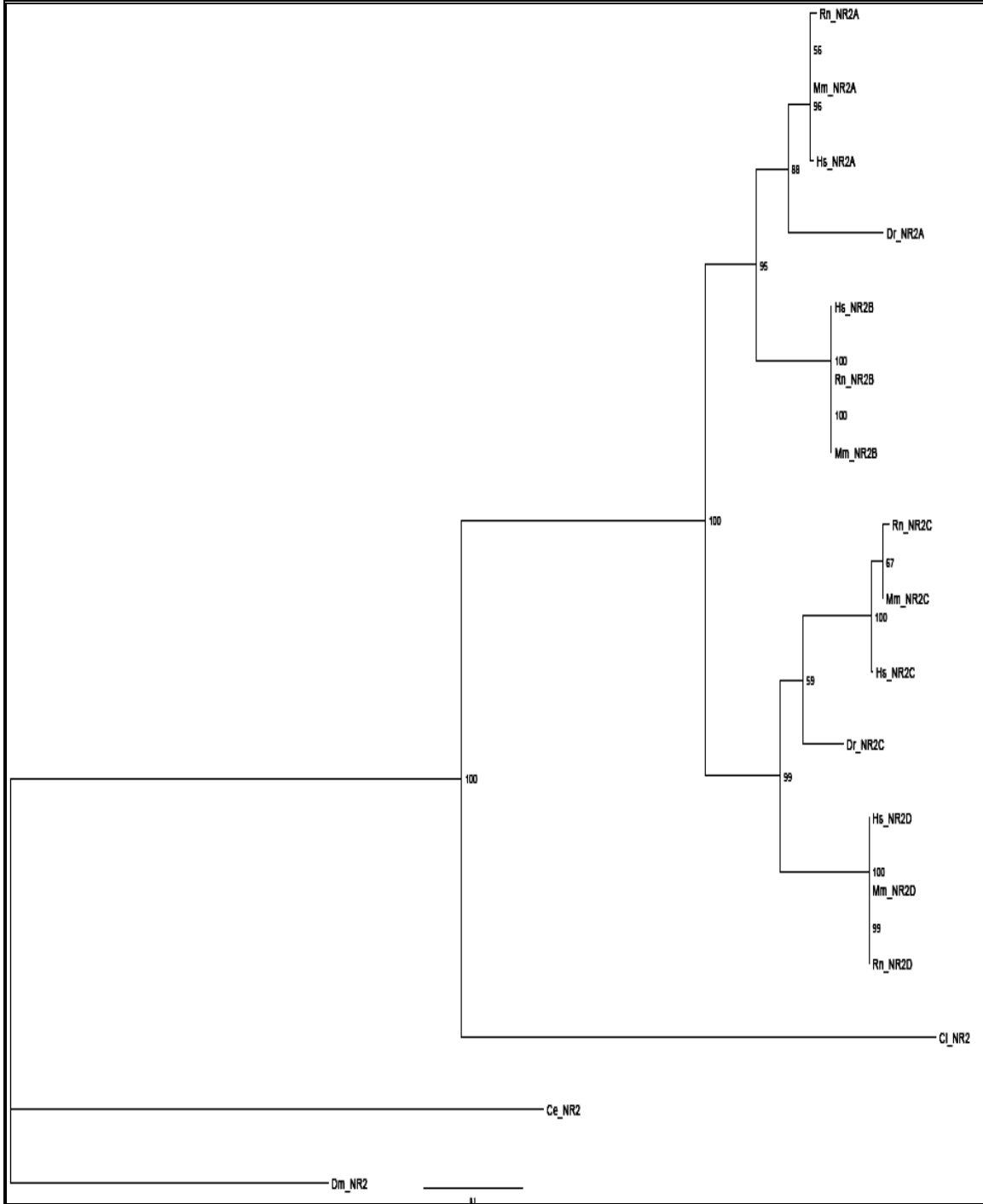


Figura 18. Árbol Filogenético para las subunidades NR2 en Humano (Hs), Ratón (Mm), Rata(Rm), zebrafish (Dr), ciona (Ci), Drosophila (Dm), C. elegans (Ce). Tomado de Ryan, T.; Emes, R.; *et al.* 2008.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recopilación de Datos

Las secuencias proteicas de las subunidades de los receptores ionotrópicos tipo AMPA (GLUR 1, GLUR 2, GLUR 3 y GLUR 4), NMDA (NR 1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A y NR3B) y Kainato (GLUR 5, GLUR 6, GLUR 7, KA 1 y KA 2) en las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus*, *Macaca mulata* y *Rattus norvegicus* se obtuvieron de las bases de datos NCBI y Ensembl.

La búsqueda se inició en NCBI empleando los posibles nombres que pueden asignar a las subunidades con base en los reportes literarios, identificar si existían reportes en las especies seleccionadas, y solo seleccionar aquellas secuencias con longitudes muy cercanas a las reportadas en estudios de tipo experimental, para evitar seleccionar secuencias que correspondieran a duplicaciones del gen o fragmentos de este. Los resultados encontrados fueron limitados, no se encontraron reportes para algunas de las especies seleccionadas y fue necesario complementar la búsqueda con la base de datos Ensembl, en este caso la búsqueda se hizo a partir de los nombres de los genes, los resultados mostraron los transcritos para cada gen y las proteínas que codificas, para seleccionar las secuencias de aminoácidos se tuvieron en cuenta los criterios mencionados anteriormente.

3.2 Identificación del Péptido Señal

La identificación de la secuencia correspondiente al péptido señal se realizó a través del servidor SIGNALP, el cual idéntica la secuencia correspondiente al péptido señal y el sitio de hendidura en secuencias proteicas de varios organismos procariotas y eucariotas, empleando en sus métodos de predicción las redes neuronales artificiales y los modelos ocultos de Markov (Bendtsen, J.; Nielsen, H.; Heijne, H.; and Brunak, S.; 2004). Los resultados permitieron identificar una secuencia en el N-terminal de las proteínas seleccionadas que osciló entre los 20 y 30 aminoácidos la cual fue retirada manualmente, teniendo en cuenta que esta secuencia tiene como función ser reconocida por otra proteína que la dirige hacia organelos celulares donde culmina su proceso de maduración, finalmente esta secuencia es retirada por una peptidasa cuando la proteína se ubica en el lugar donde va a cumplir con su función biológica.

3.3 Clasificación de transcritos de la subunidad NR1 en un sistema de nomenclatura

Este procedimiento se llevó a cabo debido a que de las secuencias proteicas seleccionadas para las variantes de la subunidad NR1 solo se encontraban clasificas en un sistema de nomenclatura las correspondientes a la especie

Rattus norvegicus. A partir de un alineamiento con las secuencias de todas las variantes de NR1 encontradas y con base en la información reportada en la literatura respecto a los sitios de splicing que presenta esta subunidad designados como N1, C1 y C2 se clasificaron los diferentes transcritos obtenidos para las especies ***Homo sapiens***, ***Pan troglodytes***, ***Pongo Pigeus*** y ***Macaca mulata***, según la nomenclatura propuesta en HOLLMANN, M. BOULTER, J.; *et al.* 1993, la cual se basa en la presencia o ausencia de las secuencias correspondientes a N1 (SKKRNYENLDQLSYDNKRGPK), C1 (DRKSGRAEPDPKKATFRAITSTLASSFKRRRSSKDT) y C2 (STGGGRGALQNQKDTVLPRAIEREEGQLQLCSRHRES) como se describe en el marco referencial.

3.4 Estimación de Dominios Transmembranales

Cada una de las secuencias recopiladas fue sometida al programa de predicción de dominios transmembranales TMHMM (Prediction of transmembrane helices in proteins), con el propósito de tener mayor información respecto a la ubicación de los cambios identificados a través de los alineamientos en cada secuencia proteica. Este programa se caracteriza por emplear uno de los métodos con mayor rendimiento en la predicción de dominios transmembranales, emplea modelos ocultos de Markov, para determinar la topologías estadísticamente más fiable a partir de una base de datos de secuencias que presentan dominios transmembranales comprobados experimentalmente (Möller, S.; Croning, M.; and Apweiler, R. 2001).

3.5 Alineamientos Múltiples

Los alineamientos se iniciaron por subunidad empleando los programas ClustalX, Muscle y T-coffee, dada la alta homología en las secuencias para cada subunidad, los alineamientos obtenidos a través de estas tres herramientas fueron muy similares, por tal razón se decidió realizar los demás alineamientos con el programa ClustalX. Se realizaron cuatro tipos de alineamientos múltiples **por subunidad** (incluye las secuencias de las cinco especies por subunidad de receptor), **por receptor** (incluye las secuencias de las cinco especies en las subunidades que representan el receptor), **por especie** (incluye todas las subunidades para los tres receptores en una especie) y uno **general** (incluye todas las secuencias para los tres receptores en las cinco especies).

3.6 Curación de los Alineamientos

Los alineamientos múltiples fueron sometidos al programa de curación de alineamientos Gblock. Este programa elimina las regiones problemáticas de los alineamientos múltiples, es decir aquellas regiones que presentan un alto

porcentaje de gaps o de posiciones no informativas, favoreciendo de esta manera la predicción filogenética (Talavera, D.; and Castresana, J.; 2007).

3.7 Selección del Modelo de Evolución

Los alineamientos también fueron sometidos al programa de selección de modelos evolutivos para proteínas Prottest (Abascal, F.; Zardoya, R.; and Posada, D. 2005), dado que los modelos evolutivos son la base de las reconstrucciones filogenéticas porque emplean matrices que describen la probabilidad de cambio de un aminoácido por otro. Para este procedimiento fue necesario descargar el programa Prottest con el propósito de mejorar la eficiencia computacional, el programa arrojó los resultados para los alineamientos por subunidad, pero no fue posible obtenerlos para los demás alineamientos debido a que por el tamaño de los archivos se requería de una mayor plataforma computacional, por lo tanto fue necesario emplear el servidor PALM el cual está representado por un marco integrado de programas como Clustal / W, PhyML, ModelTest, ProtTest, y varios programas internos, evalúa la aptitud de 112 modelos de sustitución de secuencias de proteínas con las puntuaciones en los diversos criterios y realiza la estimación filogenética por máxima verosimilitud (Chen, S., Su, S.; *et. al* 2009), que resultó importante como resultados preliminares en las inferencias filogenéticas.

3.8 Estimación Filogenética

Una vez se determinó cual es el mejor modelo de evolución para los diferentes alineamientos se realizó la predicción filogenética empleando programa PHYML, que emplea el método de reconstrucción filogenética por de máxima verosimilitud. La base de este método es un algoritmo que inicia desde un árbol inicial construido por un método rápido basado en las distancias y modifica este árbol para mejorar sus probabilidades en cada iteración. Debido a este ajuste simultáneo de la topología y longitud de las ramas, sólo unas pocas iteraciones son suficientes para llegar a un punto de topología óptimo (Guindon, S.; and Gascuel, O. 2003). Como prueba de confiabilidad se realizó un Bootstrap de 100 y fue necesario emplear varios servidores que trabajaran con el programa PhymI, debido a que se presentaron limitantes en la disponibilidad de los modelos de evolución. Los servidores empleados se encuentran reportados en los recursos electrónicos.

También se intentó realizar las predicciones filogenéticas a través del método de reconstrucción bayesiano empleando el programa MrBayes, sin embargo el requerimiento computacional es mayor en comparación a PHYML y adicionalmente el programa presentó problemas en el reconocimiento de los archivos de las secuencias proteicas, lo cual no me permitió obtener resultados.

3.9 Estimación de Estructura Secundaria

Las secuencias de las subunidades en las que se identificaron una mayor proporción de cambios en la región C-terminal fueron sometida al programa de predicción de estructura secundaria Psipred (Protein Structure Prediction Server), este programa incorpora redes neuronales para reconocer patrones de estructura secundaria a partir de una base de datos de proteínas resueltas estructuralmente en estudios experimentales (McGuffin, L.; Bryson, K.; and Jones, D.; 2000).

3.10 Estimación de Sitios de Fosforilación (serina, treonina y tirosina)

Las secuencias de las subunidades en las que se identificaron varios cambios en la región C-terminal fueron sometidas al programa de predicción de sitios de fosforilación en proteínas eucariotas, NetPhos 2,0, el cual trabaja con métodos de redes neuronales artificiales, tomando como base secuencias verificadas experimentalmente como sitios de fosforilación, estas redes reconocen patrones de secuencias biológicas (7-12 residuos de aminoácidos) que pueden ser reconocidas por quinasas y la especificidad en el reconocimiento está determinada por las características de hidropatía de los residuos aminoacídicos adyacentes al residuo fosforilado (Blom, N.; Gammeltoft, S.; and Brunak, S.; 1999).

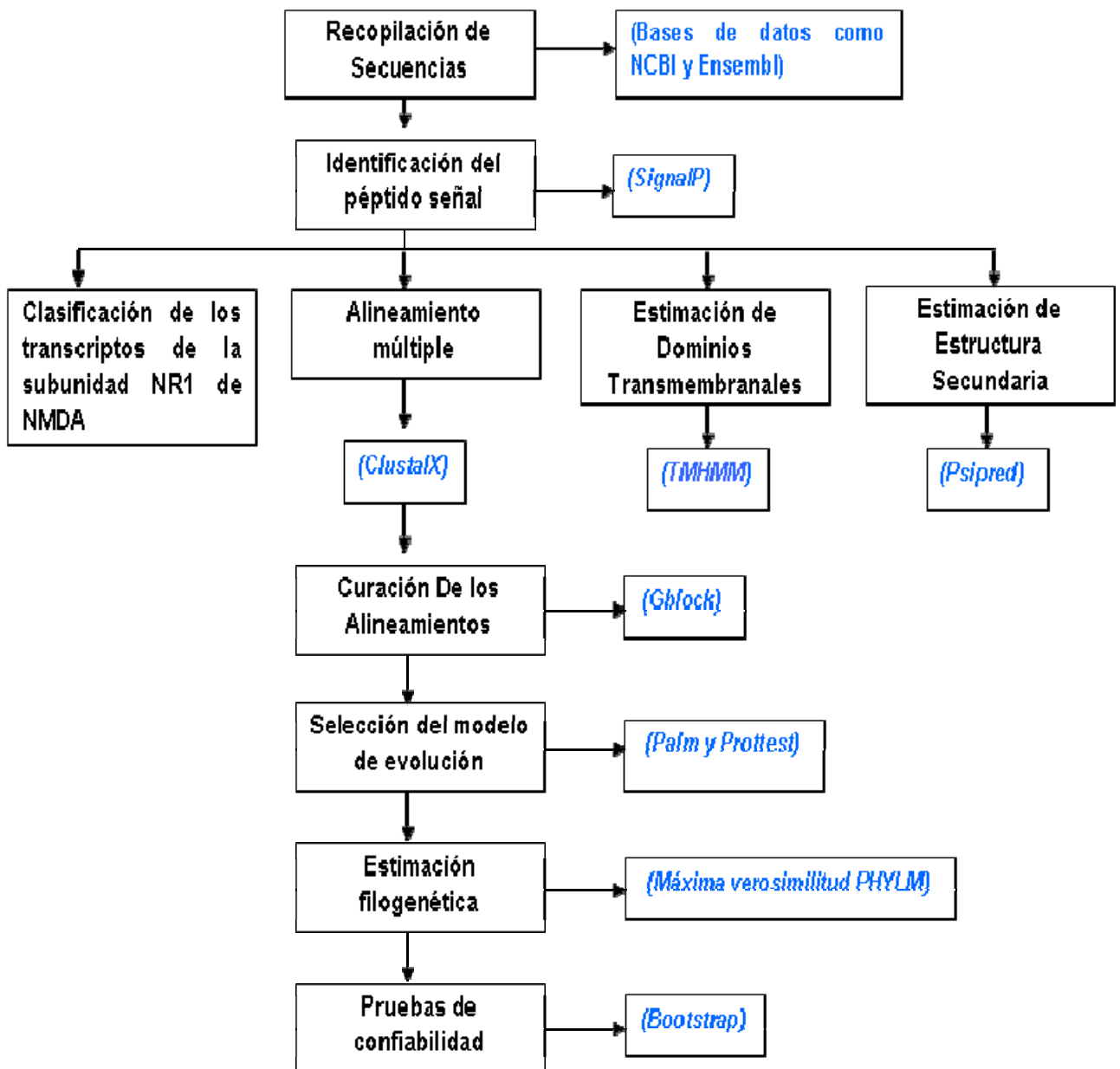


Figura 19. Diagrama General de Actividades

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Recopilación de Datos

Las secuencias de las proteínas que se emplearon en este estudio se encuentran disponibles en el anexo 1 y en la tabla 3 se reportan los correspondiente códigos con los cuales se puede acceder en las bases de datos NCBI y Ensembl. Como se puede observar para las especies *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus* y *Macaca mulata* aún no se reportan algunas secuencias, motivo por el cual no fue posible contemplar dentro del análisis las secuencias correspondientes a las variantes NR1-2a, NR1-3a y NR1-4a de NMDA, teniendo en cuenta que para un análisis filogenético el número mínimo requerido es de tres secuencias.

Tabla 3. Códigos de Acceso de las Secuencias Empleadas en el Estudio

NOMBRE DEL RECEPTOR	ESPECIES				
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Pongo pigeus</i>	<i>Pan troglodytes</i>	<i>Macaca mulata</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
AMPA					
AMPA1	NP_000818	ENSPPYP00000017871	XP_001169416	XP_001111040	NP_113796
AMPA2	NP_000817	ENSPPYP00000016933	XP_001141404	XP_001095129	NP_058957
AMPA3	NP_015564	X	ENSPTRP00000038297	ENSMMUP00000011880	NP_116785
AMPA4	NP_000820	X	ENSPTRP00000007287	ENSMMUP00000014398	NP_058959
NMDA					
1-1a	ENSP00000360614	X	ENSPTRP00000036984	ENSMMUP00000002231	AAB50926
1-1b	ENSP00000360608	ENSPPYP00000022212	ENSPTRP00000041565	ENSMMUP00000040250	AAB50928
1-2b	ENSP00000360605	X	ENSPTRP00000036983	ENSMMUP00000002232	AAB50929
1-3b	ENSP00000360616	ENSPPYP00000022211	ENSPTRP00000036985	ENSMMUP00000040251	AAB50931
1-4b	ENSP00000360615	X	ENSPTRP00000036982	ENSMMUP00000002228	AAB50933
NR2A	NP_000824	ENSPPYP00000008016	NP_001029361	ENSMMUP00000013265	NP_036705
NR2B	NP_000825	ENSPPYP00000004930	XP_528744	ENSMMUP00000025129	NP_036706
NR2C	NP_000826	ENSPPYP00000009666	XP_511665	ENSMMUP00000007584	NP_036707
NR2D	NP_000827	ENSPPYP00000011404	X	ENSMMUP00000007863	NP_073634
NR3A	NP_597702	ENSPPYP00000021802	ENSPTRP00000039833	ENSMMUP00000021930	ENSRNOP00000007957
NR3B	NP_619635	X	ENSPTRP00000049173	X	NP_579842
KAINATO					
GLU R5	NP_000821	ENSPPYP00000012647	XP_001161838	ENSMMUP00000006495	NP_058937
GLU R6	NP_068775	ENSPPYP00000018887	ENSPTRP00000031512	X	NP_062182
GLU R7	NP_000822	ENSPPYP00000001771	ENSPTRP00000000961	ENSMMUP00000012661	NP_852038
KA1	NP_055434	ENSPPYP00000004555	NP_001029331	ENSMMUP00000029417	NP_036704
KA2	NP_002079	ENSPPYP00000011230	XP_524469	ENSMMUP00000022947	NP_113696

4.2 Clasificación de transcritos de la subunidad NR1

De las secuencias reportadas en las bases de datos NCBI y Ensembl para las variantes de la subunidad NR1, solo se encontraron clasificadas en un sistema de nomenclatura las correspondientes a la especie *Rattus norvegicus*, éstas se tomaron como referencia para clasificar el resto de variantes a partir de un alineamiento múltiple y la clasificación se hizo con base en el sistema de nomenclatura propuesto en Hollmann, M. Boulter, J.; *et al.* 1993.

La ausencia de la secuencia N1 (SKKRNYENLDQLSYDNKRGPK) en el N-terminal permitió clasificar a cuatro de las variantes como NR1-1a las cuales se encuentran sombreadas en color verde (Véase figura 20).

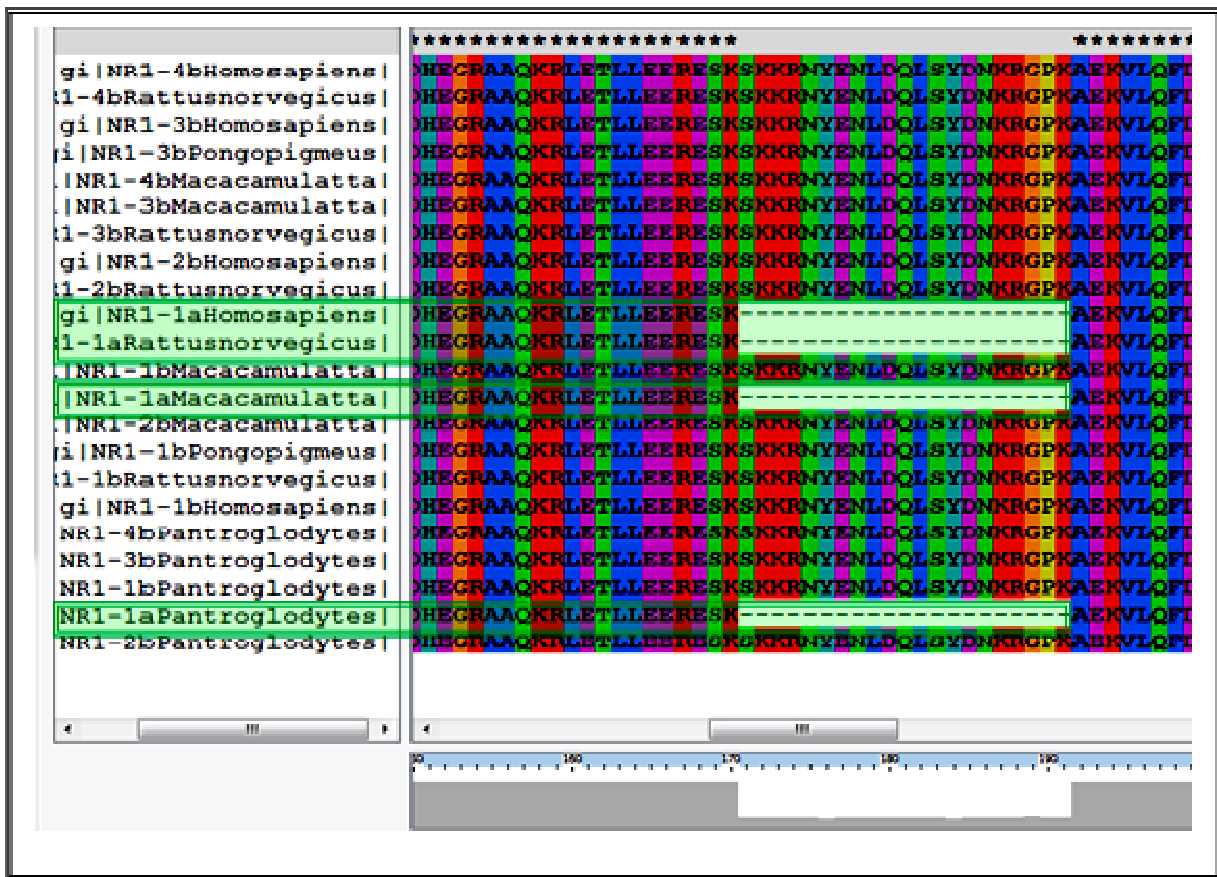


Figura 20. Clasificación de las variantes NR1-1a de NMDA de las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigmeus* y *Macaca mulata*. En el recuadro verde se resalta la ausencia de la secuencia N1 representada por gaps.

La ausencia de la secuencia C1 (DRKSGRAEPDPKKATFRAITSTLASSFKRRRSSKDT) en el C-terminal permitió

clasificar cuatro variantes como NR1-2b que se encuentran sombreadas en color rojo (Véase figura 21).

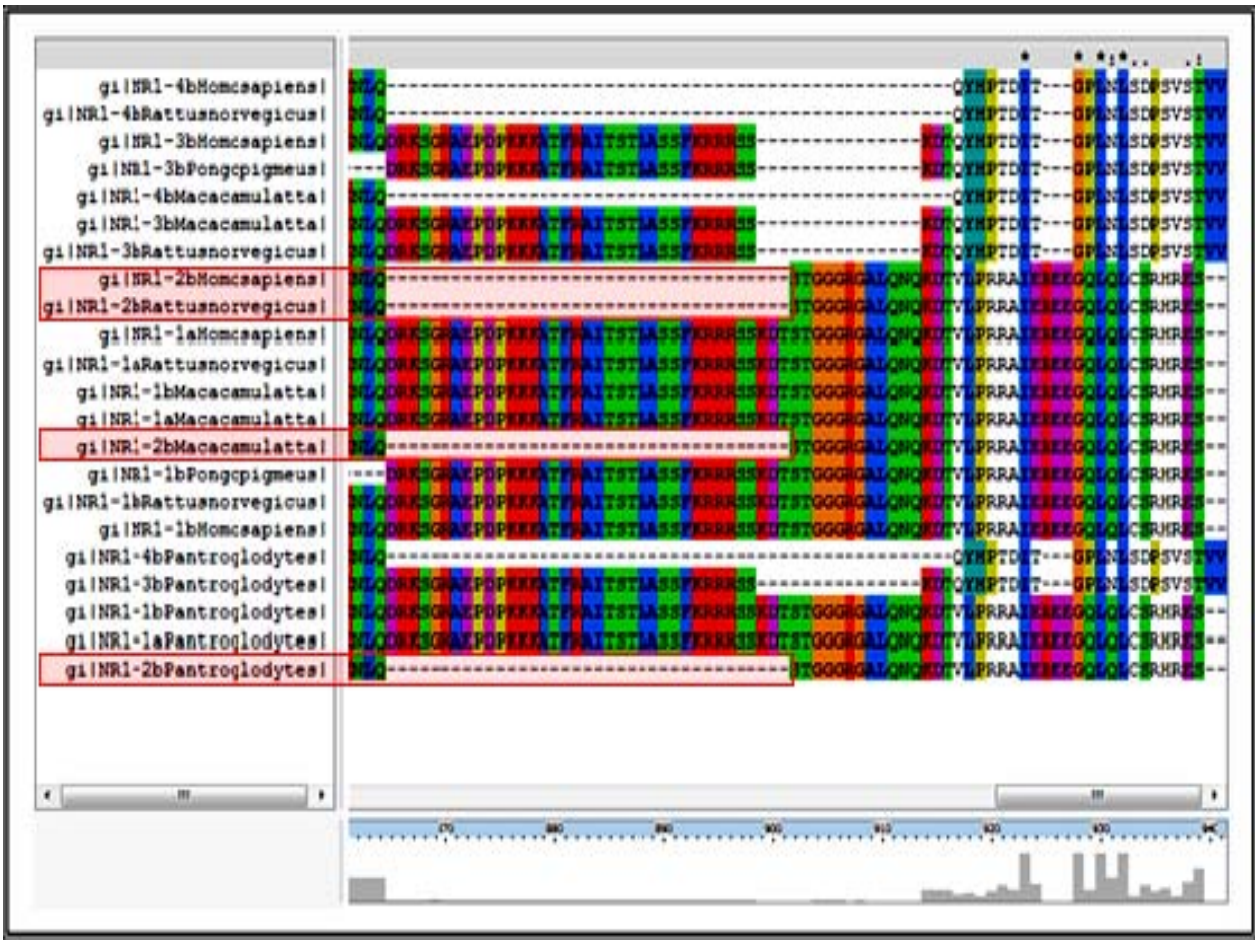


Figura 21. Clasificación de las variantes NR1-2b de NMDA de las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigmeus* y *Macaca mulata*. En el recuadro rojo se resalta la ausencia de la secuencia C1 representada por gaps.

La ausencia de la secuencia C2 (STGGGRGALQNQKDTVLPRAIEREEGQLQLCSRHRES) en el C-terminal permitió clasificar cinco variantes como NR1-3b que se encuentran sombreadas en color morado, adicionalmente se confirma que cuando C2 está ausente se presenta la secuencia alternativa C2' (QYHPTDITGPLNLS DPSVSTVV) que se encuentran sombreadas en color amarillo (Véase figura 22).

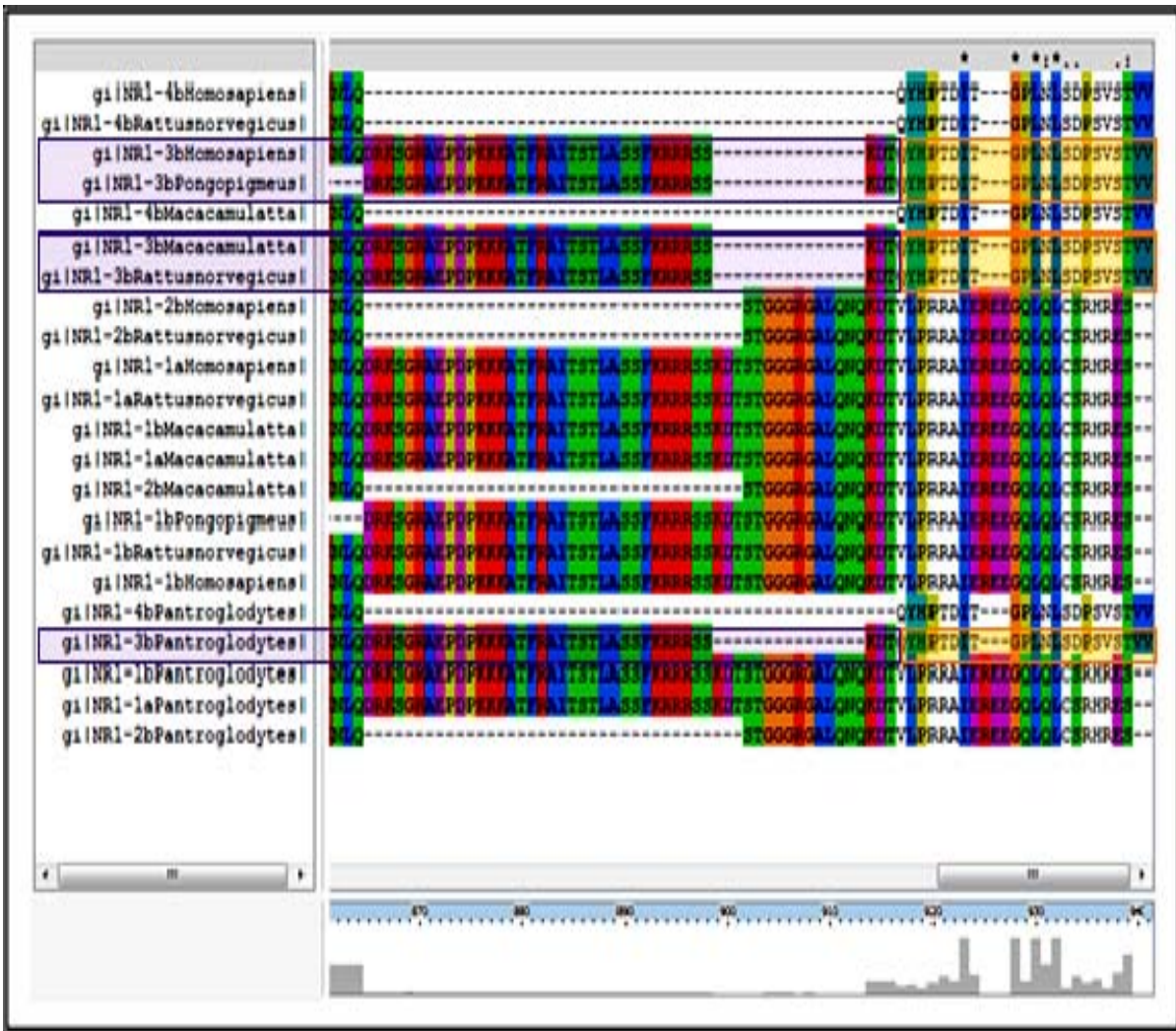


Figura 22. Clasificación de las variantes NR1-3b de NMDA de las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus* y *Macaca mulata*. En los recuadros de color morado y amarillo se resalta la ausencia de la secuencia C2 y la presencia de la secuencia C2' respectivamente.

Finalmente la ausencia de las secuencias C1 y C2 en el C-terminal permitió clasificar cuatro variantes como NR1-4b que se encuentran sombreadas en color azul, en este caso también se observa la presencia de la secuencia C2' sombreada en color amarillo (Véase figura 23). Las variantes que presentaron las secuencias C1 y C2 se clasificaron como NR1-1, se asignó la letra (b) cuando la variante presentó la secuencia N1 y la letra (a) en ausencia de ésta. Estos resultados demuestran que los sitios alternativos de splicing en las 22 secuencias que corresponden a las variantes de la subunidad NR1 de NMDA, están representados por las mismas secuencias peptídicas en las cinco especies.



Figura 23. Clasificación de las variantes NR1-4b de NMDA de las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus* y *Macaca mulata*. En los recuadros de color azul se resalta la ausencia de las secuencias C1 y C2 y en los recuadros amarillos la presencia de la secuencia C2’.

4.3 Alineamientos Múltiples

Los alineamientos múltiples se realizaron empleando el programa Clustal X que presenta una interfaz gráfica para la visualización del alineamiento, se caracteriza por ser un programa rápido que permite el alineamiento de un número considerable de secuencias.

Los resultados de los alineamientos múltiples por subunidad para cada receptor permitieron identificar los cambios que se presentan en cada secuencia, adicionalmente se realizaron alineamientos por subunidad con los residuos correspondientes a los dominios de unión a glutamato S1 y S2 reportados en estudios de cristalografía como residuos de unión al agonista en las subunidades GluR2 GluR5, GluR6, NR2A y NR1, y por comparación para los demás iGluRs (Gereau, R.; and Swanson, G.; 2008), lo anterior con el propósito de identificar los cambios que se presentan específicamente en estas regiones.

Los cambios en un alineamiento son clasificados como conservados, menos conservados y no conservados, esta clasificación se realiza con base en las características de tamaño e hidropatía de las cadenas radicales de los residuos de aminoácidos, con base en lo anterior los aminoácidos se clasifican como apolares, polares, aromáticos, ácidos y básicos, en ese sentido cuando los cambios de residuos en la columna de un alineamiento conservan el tamaño e hidropatía se dice que el cambio es de tipo conservado, representado por un carácter de dos puntos (:), cuando las características de tamaño e hidropatía no se conservan por completo el cambio es menos conservado, representado por un punto (.) y se dice que es no conservado cuando ninguna de las características se conserva, ejemplos de sustituciones conservadas o menos conservadas se representan en la tabla 4 (Hall, B.; 2001).

Tabla 4. Clasificación de los Cambios de los Aminoácidos en un Alineamiento. A) Representa cambios conservados ocurren cuando los residuos en la columna tienen aproximadamente el mismo tamaño o hidropatía. B) Representa cambios menos conservados.

A) cambios conservados “:”	B) Cambios menos conservados “.”
STA	CSA
NEQK	ATV
NHQK	SAG
NDEQ	STNK
QHRK	STPA
MILV	SGND
MILF	SNDEQK
HY	NDEQHK
FYW	NEQHRK
	FVLIM
	HFY

Los resultados se reportan en las tablas 6, 7 y 8, para cada columna de cambio, el primer aminoácido representa el aminoácido que se mantiene conservado en las demás especies y el segundo es el aminoácido sustituyente para la especie en particular. Los cambios sombreados en verde representan cambios no conservados, los sombreados en amarillo son cambios menos conservados y los que no se resaltan son cambios conservados.

Se puede observar en la tabla 5 que la proporción de cambios para las diferentes subunidades del receptor AMPA es pequeña, solo la subunidad **AMPA 2** se destaca por presentar mayor cantidad de sustituciones no conservadas en relación al resto. En la tabla 6 se presentan los cambios identificados en las subunidades del receptor Kainato, donde la subunidad con mayor proporción de sustituciones es **GLUR 5**, de forma semejante en la tabla 7 se observa que las subunidades con mayor proporción de sustituciones para el receptor NMDA son **NR2A, NR2C, NR3A y NR3B**, estas subunidades serán tenidas en cuenta más adelante en la estimación de estructura secundaria, con el propósito de reconocer cambios en la

estructura que puedan estar involucrados en la función del receptor.

Tabla 5. Cambios Identificados en las Subunidades AMPA1, AMPA2, AMPA3 y AMPA4. Los cambios sombreados en verde representan cambios no conservados, los sombreados en amarillo son cambios menos conservados y los cambios no sombreados son cambios conservados.

Receptor	Especie	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	
AMPA1	<i>Homo sapiens</i>	740	G por N	750	S por N	760	S por N	772	K por G	
		773	D por G	774	S por G	775	G por D			
	<i>Pongo pigmeus</i> <i>Rattus norvegicus</i>	358	D por N							
		113	D por E	126	K por T	142	K por R	247	K por R	
		253	K por R	254	N por T	257	A por S	740	G por N	
		750	S por N	760	S por N	772	K por G	773	D por G	
		774	S por G	775	G por D	852	S por G	864	H por Q	
AMPA2	<i>Homo sapiens</i>	583	Q por R	741	N por T	742	A por P	751	N por S	
		755	L por V	772	S por A	773	G por K	774	G por D	
		775	G por S	776	D por G					
	<i>Rattus norvegicus</i>	167	M por T	267	T por A	583	Q por R	740	R por G	
		741	N por T	742	A por P	751	N por S	755	L por V	
		772	S por A	773	G por K	774	G por D	775	G por S	
		776	D por G							
AMPA3	<i>Pan troglodytes</i>	562	P por L							
		748	T por N	749	P por A	758	S por N	779	A por S	
	<i>Rattus norvegicus</i>	780	K por G	781	D por G	782	S por G	783	G por D	
		127	H por Y	145	I por V	390	A por S			
AMPA4	<i>Pan troglodytes</i> <i>Rattus norvegicus</i>	9	P por X							
		252	I por T	381	M por M					

Tabla 6. Cambios Identificados en las Subunidades GLUR5, GLUR6, GLUR7, KA1 y KA2. Los cambios sombreados en verde representan cambios no conservados, los sombreados en amarillo son cambios menos conservados y los no sombreados son cambios conservados, adicionalmente se resaltan en un recuadro rojo los cambios que se ubican en los dominios de unión a glutamato (S1-S2).

Receptor	Especie	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio
GLUR5	<i>Homo sapiens</i>	838	M por C	839	E por F	840	E por F	841	L por Y
		843	I por L	844	S por Q	845	L por C	847	N por Q
		848	Q por T	849	K por H	850	K por P	851	L por T

		852	K por N	853	K por S	854	K por T	856	R por G
		858	K por T	859	G por L	860	K por S	861	S por T
		862	S por D	863	F por L	864	T por E	865	S por C
		866	I por G	867	L por K	868	T por L	869	C por I
		870	H por R	871	Q por E	872	R por E	874	T por G
		875	Q por I	878	E por Q	879	T por S	880	V por S
	<i>Pan troglodytes</i>	838	M por C	839	E por F	840	E por F	841	L por Y
		843	I por L	844	S por Q	845	L por C	847	N por Q
		848	Q por T	849	K por H	850	K por P	851	L por T
		852	K por N	853	K por S	854	K por T	856	R por G
		858	K por T	859	G por L	860	K por S	861	S por T
		862	S por D	863	F por L	864	T por E	865	S por C
		866	I por G	867	L por K	868	T por L	869	C por I
		870	H por R	871	Q por E	872	R por E	874	T por G
		875	Q por I	878	E por Q	879	T por S	880	V por S
	<i>Pongo pigmeus</i>	296	H por V						
	<i>Rattus norvegicus</i>	108	N por S	109	K por K	127	I por V	173	S por P
		174	G por A	188	G por G	341	H por R	348	N por D
		398	S por G	400	K por K	402	K por R	404	S por N
		459	I por L	696	T por S	700	R por K	790	N por S
		824	I por L	833	I por V				
GLUR6	<i>Rattus norvegicus</i>	463	A por V	536	I por V	540	Y por C	590	Q por R
GLUR7	<i>Homo sapiens</i>	279	A por S						
	<i>Pan troglodytes</i>	388	V por I						
	<i>Pongo pigmeus</i>	71	L por G						
	<i>Macaca mulata</i>	11	L por P	178	I por V	388	V por A		
	<i>Rattus norvegicus</i>	138	Y por S	410	V por L				
KA1	<i>Homo sapiens</i>	383	R por H	847	G por A				
	<i>Pan troglodytes</i>	847	G por A						
	<i>Pongo pigmeus</i>	217	V por A	332	R por H				
	<i>Rattus norvegicus</i>	108	K por R	111	F por L	262	A por S	392	T por S
		417	E por D	513	K por R	630	D por E	817	T por S
		826	V por M	838	S por N	846	A por S	848	V por G
		849	P por L	852	R por Q	855	I por V	856	P por L
		927	E por D						
KA2	<i>Homo sapiens</i>	276	P por L	787	V por I				
	<i>Pan troglodytes</i>	287	R por K	296	P por L				
	<i>Pongo pigmeus</i>	40	R por H	646	A por E				
	<i>Macaca mulata</i>	817	V por T	827	R por C	828	H por S	830	V por L
		831	S por G	832	C por S	834	K por T	835	T por P
		836	S por L	837	R por K	838	S por E	839	R por L
		840	R por S	841	R por M	842	R por Q	843	R por L
		844	P por V	845	G por K	846	G por V	849	R por P
		850	A por C	851	L por V	858	L por T	861	R por Q
		862	A por Q	864	R por S	865	E por P	866	M por F
		867	R por L	869	S por Q	870	N por H		
	<i>Rattus norvegicus</i>	207	I por V						

Tabla 7. Cambios Identificados en las Subunidades NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A y NR3B. Los cambios sombreados en verde representan cambios no conservados, los sombreados en amarillo son cambios menos conservados y los no sombreados son cambios conservados, adicionalmente se resaltan en un recuadro rojo los cambios que se ubican en los dominios de unión a glutamato (S1-S2).

Receptor	Especie	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	
NR1-b	<i>Pongo pigmeus</i>	83	L por M	Solo en NR1-1b y NR1-3b						
	<i>Macaca mulata</i>	2	I por L	3	S por C	4	S por P	632	A por D	
	<i>Rattus n</i>	139	S por N	213	K por R	268	L por I			
NR1-1a	<i>Macaca mulata</i>	2	I por L	3	S por C	4	S por P	611	A por D	
	<i>Rattus n</i>	139	S por N	192	K por R	247	L por I			
NR2A	<i>Homo sapiens</i>	354	Q por H	879	N por S	991	H por V	1010	G por A	
		1127	H por P	1194	L por M					
	<i>Pan troglodytes</i>	109	A por N	354	Q por H	991	H por V	1010	G por A	
		1053	H por P	1127	H por P	1131	F por L	1146	H por Q	
	<i>Pongo pigmeus</i>	174	Q por K	1010	A por G	1063	V por G	1151	L por P	
	<i>Macaca mulata</i>	4	P por S	19	V por M	92	H por Q	95	V por I	
		155	E por D	302	V por I	914	L por M	944	Q por H	
			1010	A por G	1034	I por V	1143	N por K	1152	S por P
			1153	N por D	1154	N por T	1155	D por E	1236	G por R
			1387	I por M						
	<i>Rattus n</i>	12	M por L	26	I por N	34	A por T	92	H por Q	
		95	V por I	155	E por D	160	V por I	297	M por A	
		299	R por K	302	V por T	304	M por L	309	P por Q	
		680	K por R	684	K por R	895	A por T	905	M por V	
		915	M por I	926	E por D	944	Q por H	949	N por S	
		979	V por G	992	D por E	994	I por L	1000	S por N	
		1010	A por K	1029	M por V	1039	N por S	1050	S por N	
		1063	V por M	1073	E por D	1075	E por D	1079	L por M	
		1083	S por A	1100	G por S	1112	V por I	1119	D por G	
		1123	P por T	1128	S por N	1149	E por D	1152	S por P	
		1161	S por A	1176	T por G	1178	E por D	1236	G por R	
	1238	Q por E	1245	A por S	1252	L por F	1260	S por N		
	1335	T por A	1343	S por T	1344	H por Y	1345	R por G		
		1393	N por S	1410	N por T					
NR2B	<i>Pongo pigmeus</i>	1266	N por T							
	<i>Macaca mulata</i>	413	V por I	1155	T por A					
	<i>Rattus n</i>	244	A por S	414	V por I	415	I por S	970	A por T	
		988	S por P	1152	I por L	1158	D por E	1164	S por G	
		1178	E por D	1200	T por S	1203	T por A	1229	E por K	
		1251	T por S	1316	S por P	1321	T por S	1340	G por S	
		1388	A por T	1411	A por G					

NR2C	<i>Homo sapiens</i>	18	G	por	S	27	V	por	F	52	N	por	T	70	R	por	H		
		81	G	por	D	300	A	por	V	577	S	por	A	1108	T	por	I		
		1193	C	por	R														
	<i>Pan troglodytes</i>	13	G	por	S	22	V	por	F	67	H	por	R	295	A	por	V		
		329	L	por	Q	341	R	por	P	342	H	por	Q	827	S	por	T		
		862	E	por	S	864	L	por	Q	866	H	por	A	868	A	por	P		
		869	W	por	S	895	T	por	I	897	R	por	P	903	G	por	S		
		22	F	por	V	47	N	por	T	282	H	por	Y	293	V	por	A		
	<i>Pongo pigmeus</i>	353	V	por	I	824	S	por	T	1047	R	por	Q	1118	Q	por	L		
		27	F	por	V	112	T	por	S	115	E	por	V	116	P	por	H		
		117	G	por	V	118	S	por	Q	119	A	por	T	120	F	por	H		
		121	L	por	V	122	Q	por	P	123	L	por	S	124	G	por	C		
		125	V	por	L	126	S	por	R	127	L	por	P	128	E	por	G		
		129	Q	por	T	130	Q	por	R	132	Q	por	G	133	V	por	R		
		134	L	por	A	135	F	por	V	136	K	por	L	137	V	por	R		
		138	L	por	R	140	E	por	T	141	Y	por	F	143	S	por	A		
		145	F	por	C	146	A	por	T	147	V	por	L	148	I	por	Y		
		149	I	por	P	150	S	por	E	151	L	por	G	152	H	por	R		
		155	H	por	M	156	A	por	E	157	L	por	V	158	F	por	H		
	159	L	por	S	162	V	por	K	163	R	por	T	164	A	por	G			
	165	V	por	C	166	A	por	C	177	D	por	E	169	S	por	A			
	171	S	por	A	173	R	por	L	174	L	por	M	175	L	por	H			
	176	D	por	R	179	A	por	T	180	L	por	R	182	L	por	A			
	184	P	por	C	185	G	por	D	187	P	por	G	189	A	por	G			
	191	T	por	A	193	R	por	E	194	L	por	R	195	L	por	I			
	196	R	por	K	197	Q	por	K	198	L	por	V	199	D	por	K			
	200	A	por	P	202	V	por	Y	203	F	por	I	204	V	por	I			
	205	A	por	I	206	Y	por	L	207	C	por	F	208	S	por	A			
	210	E	por	I	212	A	por	S	213	E	por	Q	214	V	por	I			
	215	L	por	S	217	A	por	S	218	E	por	Q	219	A	por	P			
	220	A	por	L	221	Q	por	G	222	A	por	P	223	G	por	S			
	224	L	por	S	226	G	por	S	228	G	por	S	229	H	por	F			
	230	V	por	F	231	W	por	L	232	L	por	A	233	V	por	I			
	234	P	por	S	235	N	por	G	236	L	por	S	240	S	por	F			
	241	T	por	C	242	D	por	A	243	A	por	F	246	A	por	S			
	247	T	por	G	248	F	por	L	249	P	por	R	250	V	por	P			
	252	L	por	G	253	I	por	V	255	V	por	Q	256	V	por	S			
	257	T	por	S	258	E	por	W	281	S	por	G	283	W	por	R			
	298	V	por	A	829	S	por	T	1114	A	por	T	1146	H	por	Q			
	<i>Rattus norvegicus</i>	5	G	por	A	6	M	por	V	18	P	por	L	20	A	por	T		
		24	A	por	F	28	P	por	S	32	S	por	N	53	L	por	I		
		76	G	por	D	83	I	por	L	87	I	por	V	166	H	por	Y		
		198	L	por	V	200	F	por	L	244	T	por	A	280	W	por	R		
		283	H	por	Y	331	Q	por	R	352	E	por	D	368	A	por	T		
		422	V	por	L	423	A	por	T	443	R	por	K	496	V	por	I		
		512	A	por	S	564	R	por	K	568	S	por	P	756	F	por	L		
		844	S	por	N	1044	L	por	M	1046	H	por	R	1104	C	por	R		
		1107	T	por	S	1109	R	por	P	1113	Q	por	V	1116	E	por	V		
		1117	Q	por	P	1120	A	por	V	1121	P	por	A	1122	A	por	T		
		1125	H	por	P	1135	A	por	T	1136	H	por	R	1143	A	por	T		
		1146	P	por	R	1148	L	por	P	1152	A	por	T	1155	G	por	S		
		1156	S	por	P	1159	S	por	I	1161	A	por	T	1163	G	por	E		
		1165	L	por	P	1166	G	por	A	1169	G	por	V	1183	G	por	V		
		1190	V	por	E	1199	G	por	R	1200	P	por	S						
		NR2D	<i>Pongo pigmeus</i>	47	A	por	D	54	S	por	N	489	M	por	L	509	S	por	N
				20	L	por	P	40	E	por	D	41	A	por	S	407	T	por	S
			<i>Rattus norvegicus</i>	7	A	por	V	12	G	por	A	13	A	por	V	16	L	por	T
				205	S	por	G	240	S	por	P	259	A	por	V	264	P	por	L
	270			A	por	S	280	R	por	A	322	A	por	T					
	NR3A	<i>Homo sapiens</i>	4	G	por	S	45	G	por	D	95	T	por	A	596	S	por	R	
			664	I	por	V	859	S	por	A	876	V	por	M	883	K	por	R	

	962	V	por	I	1015	R	por	Q	1032	S	por	L	1033	L	por	R
<i>Pan troglodytes</i>	93	A	por	T	112	V	por	M	314	E	por	K	596	S	por	R
	664	I	por	V	876	V	por	M	883	K	por	R	1032	S	por	L
<i>Pongo pigmeus</i>	34	T	por	A	49	G	por	A	50	A	por	T	62	S	por	P
	66	S	por	L	323	P	por	S	423	I	por	V	507	D	por	A
	596	S-R	por	N	973	R	por	H	982	P	por	L	1023	P	por	L
<i>Macaca mulata</i>	91	A	por	T	92	R	por	G	361	H	por	Y	431	V	por	I
	453	I	por	M	525	S	por	A	596	R	por	S	804	E	por	Q
	957	I	por	L	1002	I	por	M	1027	R	por	K				
<i>Rattus norvegicus</i>	4	G	por	S	43	P	por	Q	46	S	por	G	54	E	por	D
	57	P	por	S	60	R	por	W	62	S	por	P	75	T	por	A
	87	P	por	L	92	R	por	G	107	D	por	E	138	L	por	M
	188	L	por	S	195	I	por	L	258	Q	por	E	266	G	por	E
	268	I	por	V	276	P	por	S	279	Q	por	K	287	I	por	V
	289	L	por	M	290	E	por	D	291	S	por	N	293	K	por	R
	299	V	por	M	307	E	por	D	311	R	por	Q	315	I	por	M
	316	T	por	S	321	V	por	L	322	M	por	S	327	R	por	H
	361	H	por	Y	387	I	por	L	395	E	por	D	397	E	por	K
	424	R	por	K	431	V	por	I	462	K	por	R	467	Y	por	S
	485	N	por	S	527	T	por	M	530	S	por	R	560	K	por	Q
	561	I	por	L	596	R	por	S	600	H	por	N	677	L	por	M
	685	S	por	N	706	V	por	A	804	E	por	Q	930	Y	por	H
	953	L	por	F	957	I	por	L	967	Q	por	P	968	H	por	R
	969	F	por	S	1000	V	por	L	1003	R	por	Q	1006	T	por	M
	1018	R	por	Q	1024	S	por	N	1034	I	por	T	1035	R	por	Q
	1036	I	por	A	1044	P	por	Q	1065	S	por	T	1067	N	por	S
	1070	M	por	I												

NR3B	<i>Homo sapiens</i>	82	I	por	L	392	R	por	W	446	V	por	A	477	I	por	L
		555	M	por	T												
	<i>Pan troglodytes</i>	68	G	por	D	256	R	por	C	378	Y	por	C	381	R	por	C
	<i>Rattus norvegicus</i>	6	G	por	R	8	L	por	P	9	A	por	T	11	A	por	L
		13	G	por	A	18	G	por	A	26	L	por	A	31	A	por	V
		32	R	por	L	37	R	por	T	38	A	por	P	52	V	por	A
		53	A	por	V	55	P	por	S	57	A	por	T	70	A	por	V
		72	V	por	A	77	A	por	V	79	L	por	S	126	H	por	D
		134	L	por	I	140	A	por	S	141	V	por	L	142	L	por	V
		143	Q	por	R	153	A	por	V	157	T	por	V	158	Q	por	R
		162	G	por	S	165	A	por	T	169	S	por	N	170	R	por	H
		172	G	por	S	173	R	por	Q	174	P	por	A	177	L	por	F
		184	R	por	L	186	T	por	S	187	G	por	R	188	D	por	N
		189	A	por	D	190	G	por	S	194	R	por	G	197	P	por	L
		198	M	por	L	199	A	por	G	201	P	por	L	202	V	por	E
		372	L	por	F	376	G	por	A	378	S	por	A	379	A	por	L
		381	P	por	V	383	P	por	S	385	Q	por	S	387	A	por	T
		389	V	por	A	406	A	por	T	409	P	por	S	431	T	por	R
		440	A	por	V	447	A	por	T	467	T	por	L	468	P	por	A
		535	A	por	T	555	L	por	V	587	S	por	G	605	R	por	G
		620	L	por	F	803	S	por	G	804	I	por	V	808	A	por	S
		824	A	por	T	830	A	por	V	832	F	por	Y	835	A	por	V
		843	S	por	N	844	R	por	K								

4.4 Estimación de Dominios Transmembranales

En este procedimiento se empleó el método de predicción TMHMM, que basado en un modelo oculto de Markov determina la topología estadísticamente más probable para la proteína completa (Möller, S.; Croning, M.; and Apweiler, R. 2001), lo cual nos permite hacer una predicción de los dominios transmembranales en las secuencias en estudio.

En la tabla 8 se presentan los resultados de la predicción de los dominios transmembranales para las subunidades del receptor AMPA, se puede observar la presencia de tres dominios transmembranales, la ubicación del N-terminal en la región extracelular y el C-terminal en la región intracelular, que es acorde con el modelo molecular propuesto para los receptores de glutamato en el que se destacan tres dominios transmembranales designados como M1, M3 y M4 (Dingledine, R.; Borges, K.; *et al.* 1999).

Al relacionar estos resultados con los obtenidos en los alineamientos se puede destacar que los cambios que se presentan en la subunidad AMPA1 de la especie *Homo sapiens* y que en su mayoría son cambios poco conservados (Véase tabla 6), se ubican entre el segundo dominio transmembranal (M3) y el tercero (M4) (aminoácidos 740-775), de forma semejante ocurre en la especie *Rattus norvegicus*, sin embargo estos cambios no se ubican dentro de la región correspondiente al dominio de unión a ligando S2 por lo tanto no interfieren en la interacción con el glutamato. De igual forma ocurre con la subunidad AMPA 2 en donde las sustituciones se presentan entre los aminoácidos 741-776, mientras que en la subunidad AMPA 3 las sustituciones se presentan principalmente en la especie *Macaca mulata*, entre los aminoácidos 748-783.

En la tabla 9 se presentan los resultados de la predicción de los dominios transmembranales para las subunidades del receptor Kainato, al igual que en receptor AMPA se pueden observar tres dominios transmembranales acordes al planteamiento molecular realizado para los receptores ionotrópicos de glutamato, adicionalmente en la subunidad KA1 se observa un cuarto dominio transmembranal, en las gráficas correspondientes a esta predicción (Véase Anexo 3, figura 1), se observa que el segundo dominio presenta una baja probabilidad (0.7 según escala del programa) en relación al resto, el cual podría estar representando el bucle reentrante en la membrana en la zona citoplasmática designado como M2 (Dingledine, R.; Borges, K.; *et al.* 1999).

Tabla 8. Predicción de los Dominios Transmembranales para las Subunidades del Receptor AMPA. La región extracelular e intracelular corresponden al dominio N-terminal y C-terminal respectivamente, los dominios 1, 2 y 3 representan los dominios M1, M3 y M4.

Receptor	Especie	Extracelular	1. ^{er} Dominio	Intracelular	2. ^{do} Dominio	Extracelular	3. ^{er} Dominio	Intracelular
AMPA1	<i>Homo sapiens</i>	1-516	517-539	540-599	600-622	623-789	790-812	813-888
	<i>Pan troglodytes</i>	1-420	421-443	444-503	504-526	527-693	694-716	717-792
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-498	499-521	522-581	582-604	605-771	772-794	795-870
	<i>Macaca mulata</i>	1-420	421-443	444-503	504-526	527-693	694-716	717-792
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-516	517-539	540-599	600-622	623-789	790-812	813-888
	<i>Homo sapiens</i>	1-517	518-540	541-600	601-623	624-790	791-813	814-859
AMPA2	<i>Pan troglodytes</i>	1-517	518-540	541-600	601-623	624-787	-	-
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-517	518-540	541-600	601-623	624-790	791-813	814-859
	<i>Macaca mulata</i>	1-517	518-540	541-600	601-623	624-790	791-813	814-877
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-517	518-540	541-600	601-623	624-790	791-813	814-859
	<i>Homo sapiens</i>	1-522	523-545	546-607	608-630	631-797	798-820	821-866
	<i>Pan troglodytes</i>	1-522	523-545	546-607	608-630	631-778	779-801	802-847
AMPA3	<i>Pongo pigmeus</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Macaca mulata</i>	1-522	523-545	546-607	608-630	631-797	798-820	821-866
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-522	523-545	546-607	608-630	631-797	798-820	821-866
	<i>Homo sapiens</i>	1-521	522-544	545-604	605-627	628-794	795-817	818-881
	<i>Pan troglodytes</i>	1-499	500-522	523-582	583-605	606-772	773-795	796-859
	<i>Pongo pigmeus</i>	-	-	-	-	-	-	-
AMPA4	<i>Macaca mulata</i>	1-521	522-544	545-604	605-627	628-794	795-817	818-881
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-521	522-544	545-604	605-627	628-794	795-817	818-881

Tabla 9. Predicción de los Dominios Transmembranales para las Subunidades del Receptor Kainato. La región extracelular e intracelular corresponden al dominio N-terminal y C-terminal respectivamente, los dominios 1, 2 y 3 representan los dominios M1, M3 y M4. Los valores resaltados en rojo presenta un dominio de baja probabilidad y en el caso de KA1 puede estar representando el bucle reentrante en la membrana M2.

Receptor	Especie	Extracelular	1. ^{er} Dominio	Intracelular	2. ^{do} Dominio	Extracelular	3. ^{er} Dominio	Intracelular		
GLUR5	<i>Homo sapiens</i>	1-543	544-563	564-619	620-642	643-802	803-825	826-884		
	<i>Pan troglodytes</i>	1-543	544-563	564-619	620-642	643-802	803-825	826-884		
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-543	544-563	564-619	620-642	643-802	803-825	826-915		
	<i>Macaca mulata</i>	1-530	531-550	551-606	607-629	630-789	790-812	813-873		
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-543	544-563	564-619	620-642	643-802	803-825	826-886		
	GLUR6	<i>Homo sapiens</i>	1-531	532-551	552-607	608-630	631-790	791-813	814-877	
	<i>Pan troglodytes</i>	1-531	532-551	552-607	608-630	631-790	791-813	814-877		
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-457	458-477	478-533	534-556	557-716	717-739	740-803		
	<i>Macaca mulata</i>	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-531	532-551	552-607	608-630	631-790	791-813	814-877		
GLUR7	<i>Homo sapiens</i>	1-533	534-553	554-609	610-632	633-791	792-814	875-888		
	<i>Pan troglodytes</i>	1-533	534-553	554-609	610-632	633-791	792-814	875-888		
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-533	534-553	554-609	610-632	633-666	-	-		
	<i>Macaca mulata</i>	1-533	534-553	554-609	610-632	633-791	792-814	875-888		
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-533	534-553	554-609	610-632	633-791	792-814	875-879		
	KA2	<i>Homo sapiens</i>	1-520	521-543	544-600	601-623	624-781	782-801	802-958	
<i>Pan troglodytes</i>		1-540	541-563	564-620	621-643	644-801	802-821	822-978		
<i>Pongo pigmeus</i>		1-310	311-333	334-390	391-413	414-571	572-591	592-663		
<i>Macaca mulata</i>		1-520	521-543	544-600	601-623	624-781	782-801	802-953		
<i>Rattus norvegicus</i>		1-523	524-546	547-603	604-626	627-784	785-804	805-960		
Receptor		Especie	Extracel.	1. ^{er} Domin.	Intracel.	2. ^{do} Domin.	Extracel.	3. ^{er} Domin.	Intracel.	4. ^{to} Domin
KA1	<i>Homo sapiens</i>	1-523	524-546	547-566	567-589	590-603	604-626	627-784	785-807	808-936
	<i>Pan troglody.</i>	1-523	524-546	547-566	567-589	590-603	604-626	627-784	785-807	808-936
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-472	473-495	496-515	516-538	539-552	553-575	576-733	734-756	757-885
	<i>Macaca mulata</i>	1-523	524-546	547-566	567-589	590-603	604-626	627-784	785-807	808-936
	<i>Rattus norvegic.</i>	1-523	524-546	547-566	567-589	590-603	604-626	627-784	785-807	808-936

Dentro de las subunidades del receptor Kainato se encontró que en la subunidad Glur5 los cambios se presentaron en mayor proporción en las especies ***Homo sapiens*** y ***Pan troglodytes***, entre los aminoácidos 843-875 (Véase tabla 6), estos residuos se ubican en la región C-terminal y podrían estar involucrados en procesos de señalización, razón por la cual esta subunidad se tuvo en cuenta para la predicción de estructura secundaria y sitios de fosforilación. También es de

resaltar que en la especie ***Rattus norvegicus*** se encontraron tres cambios conservados que se ubican en los dominios de unión a ligando en las posiciones I459L, T696S y R700K (Véase tablas 6), de forma semejante ocurre en la subunidad GLUR6 donde se reporta un cambio menos conservado que se ubica en la región del dominio de unión S1 en la posición A463V, estos cambios podrían influir en la interacción con el agonista o en la estabilización del bolsillo o pocket de unión al ligando, por lo que a futuro sería interesante comprobar de manera experimental la acción de estos residuos en la interacción con el glutamato.

Para la subunidad GLUR7 los cambios que se reportan no participan en los dominios de unión ni en la región C-terminal, en la subunidad KA1 la mayor proporción de cambios se presentó en la especie ***Rattus norvegicus*** con cambios que en su mayoría son conservados y se ubican en la región C-terminal, de forma similar ocurrió con la subunidad KA2 pero en la especie ***Macaca mulata***, entre los aminoácidos 817 y 870 (véase tabla 6).

Los resultados de predicción de dominios transmembranales para las subunidades del receptor NMDA se presentan en la tabla 10. Se observó que las variantes de la subunidad NR-1 presentan los tres dominios transmembranales excepto en el caso de la especie ***Pan troglodytes***, que presenta un solo dominio transmembranal, lo anterior se debe a que la extensión de las secuencias para esta subunidad en esta especie solo llega máximo hasta los 598 aminoácidos dependiendo de la variante, y los resultados del alineamiento muestran que la región ausente corresponde al primer dominio transmembranal (M1), al bucle reentrante en la membrana (M2), al primer dominio de unión a glutamato (S1), al segundo dominio transmembranal (M3) y parte del segundo dominio de unión a glutamato S2 (se conservan 13 residuos), sugiriendo que la interacción con el glutamato sería diferente para esta especie.

Es de resaltar que las subunidades NR2A-D, NR3A y NR3B al igual que la subunidad KA1 presentan cuatro dominios transmembranales. La subunidad NR2A presenta un dominio transmembranal con una probabilidad más baja (0.7) en relación a los otros tres (Véase anexo 3, figura 2), el cual podría estar representando un bucle reentrante en la membrana similar a M2 y que se ubica entre los dominios que podrían corresponder a M3 y M4; la gran mayoría de cambios que presentan las cinco especies en esta subunidad se ubican en la región C-terminal, adicionalmente en la especie ***Rattus norvegicus*** se encontraron dos cambios conservados que pertenecen al dominio de unión S2 en las posiciones K680R y K684R (Véase tabla 7), que como anteriormente se propuso, sería interesante comprobar de forma experimental la influencia de estos cambios en la interacción con el agonista.

Los cambios que se presentan en la subunidad NR2B son en su mayoría conservados y no involucran los dominios de unión a glutamato, la especie en la que se observan más cambios es ***Rattus norvegicus*** los cuales se ubican

principalmente en la zona C-terminal, NR2B presenta un dominio transmembranal con menor probabilidad (0.8) en relación al resto (Véase anexo 2, figura 3), el cual se sitúa después del primer dominio transmembranal y podría corresponder al bucle reentrante en la membrana en la zona citoplasmática designado como M2 (Véase tabla 10). De forma semejante se presenta en la subunidad NR2C donde el segundo dominio transmembranal presenta una probabilidad cercana a 1 en las especies *Homo sapiens*, *Pongo pigmeus*, y *Macaca mulata*, y de 0.8 en las especies *Pan troglodytes* y *Rattus norvegicus* (Véase anexo 2, figura 4).

Tabla 10. Predicción de los Dominios Transmembranales para las Subunidades del Receptor NMDA. La región extracelular e intracelular corresponden al dominio N-terminal y C-terminal respectivamente, los dominios 1, 2 y 3 representan los dominios M1, M3 y M4. Los valores resaltados en rojo presentan un dominio de baja probabilidad y en el caso de NR2A y NR2B puede estar representando el bucle reentrante en la membrana M2.

Receptor	Especie	Extracelular	1.º Dominio	Intracelular	2.º Dominio	Extracelular	3.º Dominio	Intracelular
NR1-1a	<i>Homo sapiens</i>	1-540	541-560	561-614	615-637	638-794	795-817	818-918
	<i>Pan troglodytes</i>	1-469	470-492	493-593	-	-	-	-
	<i>Pongo pigmeus</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Macaca mulata</i>	1-479	480-499	500-511	512-534	535-691	692-714	715-815
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-540	541-560	561-614	615-637	638-794	795-817	818-918
NR1-1b	<i>Homo sapiens</i>	1-561	562-581	582-635	636-658	659-815	816-838	839-939
	<i>Pan troglodytes</i>	1-490	491-513	514-614	-	-	-	-
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-526	527-546	547-600	601-623	624-779	780-802	803-887
	<i>Macaca mulata</i>	1-500	501-520	521-532	533-555	556-712	713-735	736-836
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-561	562-581	582-635	636-658	659-815	816-838	839-939
NR1-2b	<i>Homo sapiens</i>	1-561	562-581	582-635	636-658	659-815	816-838	839-902
	<i>Pan troglodytes</i>	1-490	491-513	514-577	-	-	-	-
	<i>Pongo pigmeus</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Macaca mulata</i>	1-500	501-520	521-532	533-555	556-712	713-735	736-799
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-561	562-581	582-635	636-658	659-815	816-838	839-902

NR1-3b	<i>Homo sapiens</i>	1-561	562-581	582-635	636-658	659-815	816-838	839-923		
	<i>Pan troglodytes</i>	1-490	491-513	514-598	-	-	-	-		
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-526	527-546	547-600	601-623	624-779	780-802	803-871		
	<i>Macaca mulata</i>	1-500	501-520	521-532	533-555	556-712	713-735	736-820		
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-561	562-581	582-635	636-658	659-815	816-838	839-923		
NR1-4b	<i>Homo sapiens</i>	1-561	562-581	582-635	636-658	659-815	816-838	839-886		
	<i>Pan troglodytes</i>	1-490	491-513	514-561	-	-	-	-		
	<i>Pongo pigmeus</i>	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Macaca mulata</i>	1-500	501-520	521-532	533-555	556-712	713-735	736-883		
	<i>Rattus norvegicus</i>	1-561	562-581	582-635	636-658	659-815	816-838	839-886		
Receptor	Especie	Extracel.	1. ^{er} Domin.	Intracel.	2. ^{do} Domin.	Extracel.	3. ^{er} Domin.	Intracel.	4. ^{to} Domin.	Extracel.
NR2A	<i>Homo sapiens</i>	1-529	530-552	553-605	606-628	629-719	720-738	739-790	791-810	811-1437
	<i>Pan troglody.</i>	1-529	530-552	553-605	606-628	629-719	720-738	739-790	791-810	811-1437
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-529	530-552	553-605	606-628	629-719	720-738	739-790	791-810	811-1437
	<i>Macaca mulata</i>	1-529	530-552	553-605	606-628	629-719	720-738	739-790	791-810	811-1391
	<i>Rattus norvegic.</i>	1-529	530-552	553-605	606-628	629-719	720-738	739-790	791-810	811-1437
NR2B	<i>Homo sapiens</i>	1-529	530-552	553-570	571-593	594-602	603-625	626-792	793-815	816-1456
	<i>Pan troglody.</i>	1-529	530-552	553-570	571-593	594-602	603-625	626-792	793-815	816-1456
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-529	530-552	553-570	571-593	594-602	603-625	626-792	793-815	816-1456
	<i>Macaca mulata</i>	1-529	530-552	553-570	571-593	594-602	603-625	626-792	793-815	816-1456
	<i>Rattus norvegic.</i>	1-530	531-553	554-571	572-594	595-603	604-626	627-793	794-816	817-1455
NR2C	<i>Homo sapiens</i>	1-532	533-555	556-575	576-598	599-607	608-630	631-796	797-816	817-1214
	<i>Pan troglody.</i>	1-530	531-553	554-573	574-593	594-602	603-625	626-791	792-811	812-1001
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-528	529-551	552-571	572-591	592-600	601-623	624-789	790-809	810-1207
	<i>Macaca mulata</i>	1-533	534-556	557-576	577-596	597-605	606-628	629-794	795-814	815-1205
	<i>Rattus norvegic.</i>	1-530	531-553	554-573	574-593	594-602	603-625	626-791	792-811	812-1213
NR2D	<i>Homo sapiens</i>	1-560	561-583	584-595	596-618	619-632	633-655	656-820	821-840	841-1311
	<i>Pan troglody.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-485	486-508	509-674	675-694	695-915	-	-	-	-
	<i>Macaca mulata</i>	1-558	559-581	582-633	634-656	657-725	-	-	-	-
	<i>Rattus norvegic.</i>	1-557	558-580	581-592	593-615	616-629	630-652	653-817	818-837	838-1298

NR3A	<i>Homo sapiens</i>	1-648	649-668	669-687	688-707	708-721	722-744	745-907	908-930	931-1089
	<i>Pan troglody.</i>	1-648	649-668	669-687	688-707	708-721	722-744	745-907	908-930	931-1089
	<i>Pongo pigmeus</i>	1-648	649-668	669-687	688-707	708-721	722-744	745-907	908-930	931-1079
	<i>Macaca mulata</i>	1-648	649-668	669-687	688-707	708-721	722-744	745-907	908-930	931-1089
	<i>Rattus norvegic.</i>	1-648	649-668	669-687	688-707	708-721	722-744	745-906	907-929	930-1109
NR3B	<i>Homo sapiens</i>	1-552	553-575	576-587	588-606	607-625	626-648	649-805	806-828	829-1021
	<i>Pan troglody.</i>	1-360	361-383	384-430	431-453	454-472	473-495	496-522	-	-
	<i>Pongo pigmeus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Macaca mulata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Rattus norvegic.</i>	1-551	552-574	575-586	587-609	610-623	624-646	647-803	804-826	827-978

En NR2C *Macaca mulata* es la especie que presenta mayores cambios (Véase tabla 7), los cuales se ubican principalmente en el N-terminal, sin involucrar el dominio de unión S1, la segunda especie con mayor proporción de cambios es *Rattus norvegicus* y se encuentran distribuidos en el N y en el C-terminal, de forma semejante pero con menor proporción de cambios ocurre en las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes* y *Pongo pigmeus*.

En la subunidad NR2D se presentan cuatro dominios transmembranales en las especies *Homo sapiens* y *Rattus norvegicus*, el segundo dominio presenta una probabilidad de 0.8 y podría corresponder al bucle M2, en las especies *Pongo pigmeus* y *Macaca mulata* solo se destacan dos dominios transmembranales (Véase anexo 2, figura 5), esto se debe principalmente a que la longitud de estas secuencias es más corta en relación a las otras dos especies y las regiones ausentes se ubican principalmente en el C-terminal. Los cambios que se presentan en esta subunidad son muy pocos y se ubican en la región N-terminal sin reportar sustituciones ubicadas en las regiones correspondientes a S1 y S2 (Véase tabla 7).

Los cuatro dominios transmembranales en la subunidad NR3A presentan una probabilidad de 1 (Véase anexo 2, figura 6), en este caso el segundo dominio podría estar representando el bucle reentrante en la membrana, sin embargo sería importante comprobar de forma experimental la conformación estructural que adopta la subunidad. En relación a los cambios, se encontró que la posición 596 es muy variable y participa en el dominio de unión S1, en esta posición *Homo sapiens* y *Pan troglodytes* presentan una arginina, *Macaca mulata* y *Rattus norvegicus* presentan una serina y *Pongo pigmeus* una asparagina (Véase tabla 8), adicionalmente *Macaca mulata* presenta un cambio conservado en la posición E804Q (dominio S2), y *Rattus norvegicus* en las posiciones H600N (dominio S1) y E804Q (dominio S2); como se planteó anteriormente se requiere

de la comprobación experimental para poder determinar la influencia de estos residuos en la interacción con el agonista. En esta subunidad ***Rattus norvegicus*** se destacó por ser la especie con mayor proporción de cambios en el N-terminal y C-terminal.

Por último para la subunidad NR3B solo se tienen tres especies de las cuales ***Homo sapiens*** y ***Rattus norvegicus*** presentan cuatro dominios transmembranales donde el segundo podría estar representando el bucle reentrante en la membrana, en ***Pan troglodytes*** solo se destacan tres dominios debido a su corta longitud (Véase anexo 2, figura 7), en este caso con base en el alineamiento las regiones ausentes se ubican en el N-terminal y una región amplia que involucra el dominio S2, sugiriendo que la interacción con el glutamato podría ser diferente para esta especie. Adicionalmente la especie que se destaca por su gran proporción de cambios en la región N-terminal es ***Rattus norvegicus*** (Véase tabla 7).

De acuerdo con los anteriores resultados las secuencias de las subunidades GLUR5, NR2A, NR2C y NR3A son la que presentaron mayores cambios en la región C-terminal, por lo tanto fueron sometidas a la predicción de estructura secundaria y sitios de fosforilación, teniendo en cuenta que se han identificado proteínas con dominios PDZ que interactúan con el C-terminal de los iGluRs, como es el caso de la subunidad NR2 que participa en complejos de señalización que influyen en la plasticidad neuronal (Cull-Candy, S.; Brickley, S.; and Farrant, M.; 2001.; Lim, I.; Merrill, M.; ***et al.*** 2003.; Kim, E.; and Sheng, M.; 2004).

4.5 Curación de los Alineamientos

Este procedimiento se realizó con el propósito de favorecer la estimación filogenética, teniendo en cuenta que se ha demostrado que la eliminación de las regiones problemáticas (alto porcentaje de divergencia y de gaps) del alineamiento de forma manual o empleando métodos automáticos como en este caso el programa Gblocks, permite generar mejores árboles filogenéticos y a pesar de la pérdida de información existe un aumento de la señal filogenética (Talavera, D.; and Castresana, J.; 2007). Este procedimiento no se llevó a cabo con los alineamientos por especie, por receptor y el general, debido a que los resultados obtenidos nos muestran que las diferentes subunidades proteicas no fueron alineables, y para llegar a hacer una curación adecuada es necesario la implementación de otros algoritmos donde el requerimiento computacional y de tiempo son mayores, por lo tanto el procedimiento que se sigue para las inferencias filogenéticas solo se realizó con los alineamientos por subunidad.

4.6 Selección del Modelo de evolución

En el proceso evolutivo de las proteínas se puede destacar por ejemplo, que los sitios que se ubican en el núcleo de una estructura proteica aceptarán aminoácidos hidrofóbicos, mientras que los residuos en un sitio activo son más propensos a ser cargados electrostáticamente. Esto sugiere una forma alternativa de describir la evolución de una proteína, en ese sentido los modelos probabilísticos están explícitamente formulados en términos de las variaciones de aminoácidos a través de sitios. Para la selección del modelo de evolución se emplearon los programas Palm y ProtTest de acuerdo con lo descrito en la metodología y los resultados obtenidos para cada alineamiento se presentan en la tabla 11.

Dentro de los modelos seleccionados se destacan JTT (Jones-Taylor-Thornton), que se basan en el intercambio empírico de aminoácidos estimado a partir de matrices de bases de datos de las alineaciones de proteínas, que incorporan una frecuencia promedio de aminoácidos (Wang, H.; Li, K.; *et al.* 2008), Blosum, en este caso la matriz de sustitución se basa en los bloques de alineamientos de proteínas menos homólogas (Henikoff, S.; and Henikoff, J. 1992) y HIV que emplea una matriz basada en máxima verosimilitud (Nickle, D.; Heath, H. *et al.* 2007), algunos de estos métodos presentan ajustes de aminoácidos invariables (+I), consideran las frecuencias de los aminoácidos (+F) o asignan a cada sitio la probabilidad de pertenecer a una categoría (+G) (Abascal, F.; Zardoya, R.; and Posada, D.; 2005).

Tabla 11. Modelos de Evolución Seleccionados para los Diferentes Alineamientos por subunidad.

RECEPTORES	NOMBRE	Modelo
AMPA	AMPA1	JTT
	AMPA 2	VT
	AMPA 3	VT
	AMPA 4	JTT
NMDA	1-1a	JTT
	1-1b	JTT
	1-2b	JTT
	1-3b	JTT
	1-4b	JTT
	NR2A	JTT+G+F
	NR2B	HIVb+F
	NR2C	JTT+I+F
	NR2D	JTT+F
	NR3A	HIVw+G+F

	NR3B	JTT+F
KAINATO	GLU R5	Blosum62
	GLU R6	JTT
	GLU R7	VT+I
	KA1	JTT
	KA2	Blosum62+G+F

4.7 Estimación Filogenética

Una vez seleccionado el modelo de evolución más apropiado para cada alineamiento se precedió a realizar la estimación filogenética empleando el método de reconstrucción por máxima Verosimilitud, que se caracteriza por generar el árbol que maximiza la probabilidad de observar los datos del alineamiento, adicionalmente este programa presenta un mayor rendimiento respecto a los métodos por distancia y basados en parsimonia, con una reducción considerable en el tiempo de cálculo (Guindon, S.; and Gascuel, O. 2003).

Subunidades AMPA

Para la subunidad AMPA1 se observa que las especies *Pan troglodyes*, *pongo pigmeus* y *Macaca mulata* se encuentran más estrechamente relacionadas dado que comparten un mismo linaje, y las especies *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens* se presentan como ramas no resueltas. En el caso de la subunidad AMPA2 se observa una topología semejante a la subunidad AMPA1, con la diferencia que la especie *Rattus norvegicus* presenta una rama más corta (Véase figura 24 A y B). Lo anterior se debe a que los cambios que se presentan en las secuencias AMPA 1 y AMPA 2 no son suficientes para establecer relaciones de parentesco más estrechas.

En las subunidades AMPA3 y AMPA4 no se observan nodos internos sino linajes independientes, por lo tanto son estimaciones filogenéticas poco informativas debido a que no existen relaciones de parentesco de las especies a partir de éstas subunidades, esto se debe a que los alineamientos resultan poco informativos para la inferencias filogenéticas debido a la poca cantidad de cambios (Véase figura 24 C y D).

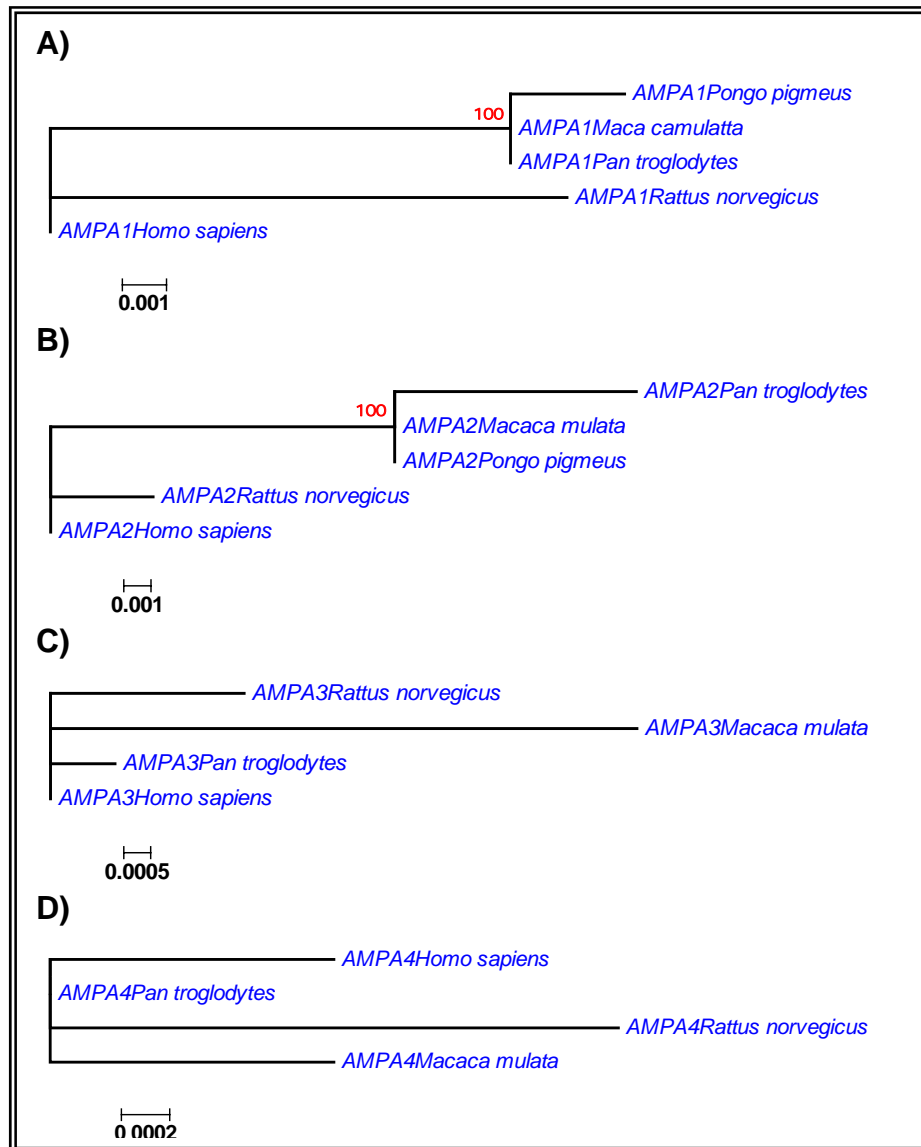


Figura 24. Árboles Filogenéticos de las subunidades AMPA1, AMPA2, AMPA3 y AMPA4. El método de reconstrucción filogenética empleado fue Máxima Verosimilitud con un Bootstrap de 100, los valores en rojo indican el porcentaje con el cual se generó esa topología.

Subunidades Kainato

El árbol para la subunidad GLUR5 nos muestra que las especies *Homo sapiens* y *Pan troglodytes* se presentan como ramas no resueltas, mientras que las especies *Pongo Pigmeus*, *Macaca mulata* y *Rattus norvegicus* se encuentran más relacionadas entre ellas porque comparten un ancestro común (Véase figura 25 A), esto se debe a que los cambios para *Homo sapiens* y *Pan troglodytes*

son los mismos (Véase tabla 7). Las subunidades GLUR6 y GLUR7 al igual que en las subunidades AMPA3 y AMPA4 se observan como ramas no resueltas lo cual se debe a las razones anteriormente expuestas (Véase figura 25 B y C).

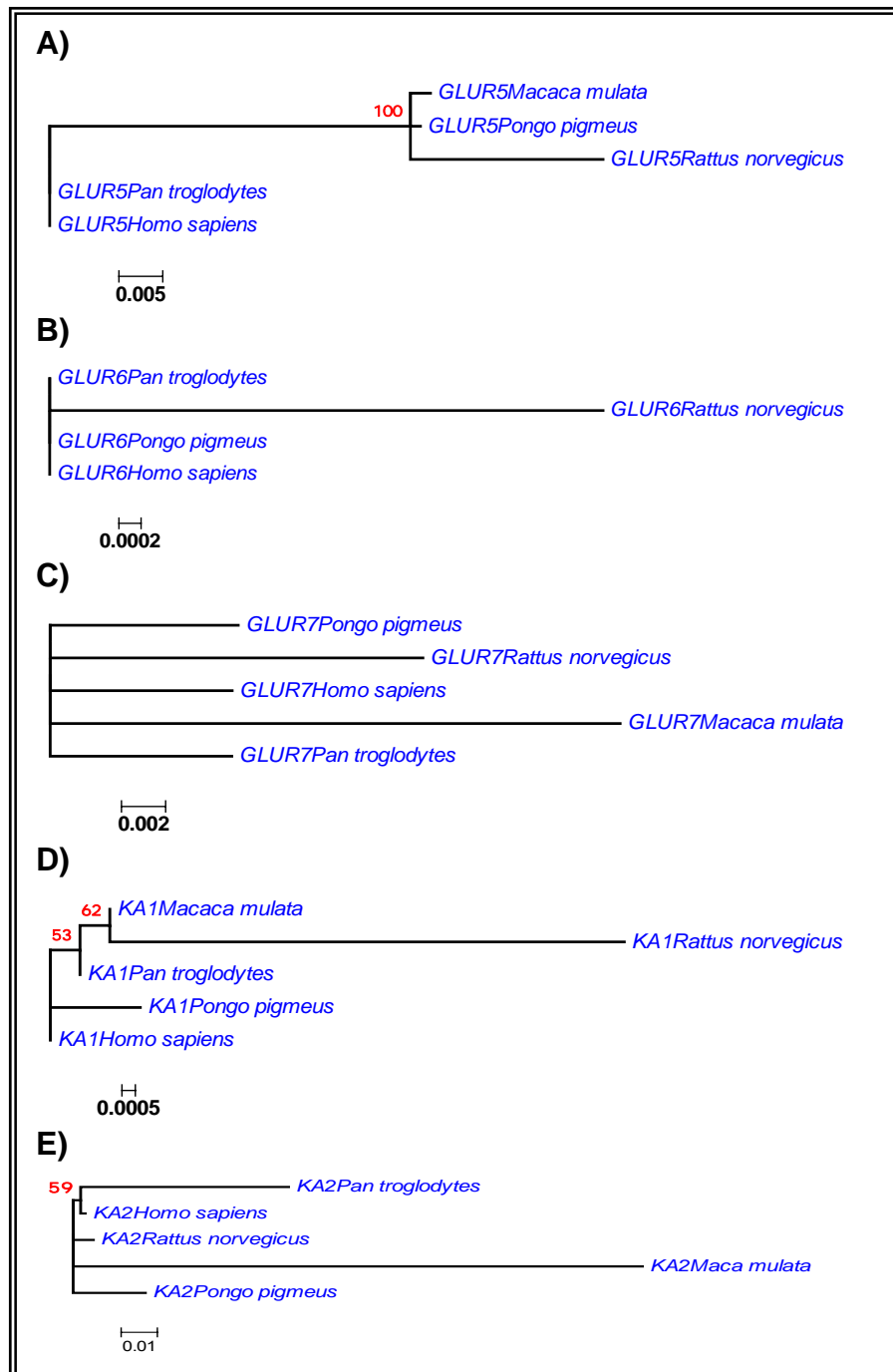


Figura 25 Árboles Filogenéticos de las subunidades GLUR5, GLUR6, GLUR7, KA1 y KA2. El método de reconstrucción filogenética empleado fue Máxima Verosimilitud con un Bootstrap de 100, los valores en rojo indican el porcentaje con el cual se generó esa topología.

En la estimación para la subunidad KA1 se destaca por presentar relaciones de parentesco más estrechas en comparación a las subunidades GluR de Kainato, en este caso las especies más relacionadas son ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus*** seguidas por la especie ***Pan troglodytes***, (Véase figura 25 D). Para la subunidad KA2, aparecen las especies ***Homo sapiens*** y ***Pan troglodytes*** relacionadas por un nodo ancestral mientras que las demás especies se presentan como ramas no resueltas (Véase figura 25 E).

Subunidades NMDA

Los árboles filogenéticos para las variantes de la subunidad NR1 se caracterizan por no presentar nodos internos indicándonos que los cambios identificados en los alineamientos no son suficientes para presentar arboles resueltos, (Véase figura 26 A-E).

El árbol para la subunidad NR2 nos muestra que las especies ***Homo sapiens*** y ***Pan troglodytes*** están más relacionadas entre ellas en comparación a la especie ***Pongo Pigeus*** y las especies ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus*** se presentan como ramas no resueltas (Véase figura 27 A).

Para la subunidad NR2B el árbol nos muestra que las especies ***Homo sapiens***, ***Pan troglodytes*** y ***Pongo Pigeus*** comparten un linaje ancestral por lo tanto su relación evolutiva es más estrecha mientras que para las especies ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus*** no se observan relaciones de parentesco (Véase figura 27 B).

En la subunidad NR2C aparecen las especies ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus*** compartiendo un linaje ancestral, seguidos por la especie ***Pongo Pigeus*** y las especies ***Homo sapiens*** y ***Pan troglodytes*** presentan ramas no resueltas (Véase figura 27 C). El árbol que se observa para la subunidad NR2D presenta un nodo interno que relaciona las especies ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus*** a diferencia de las especies ***Homo sapiens*** y ***Pongo Pigeus*** donde no se observan relaciones evolutivas (Véase figura 27 D).

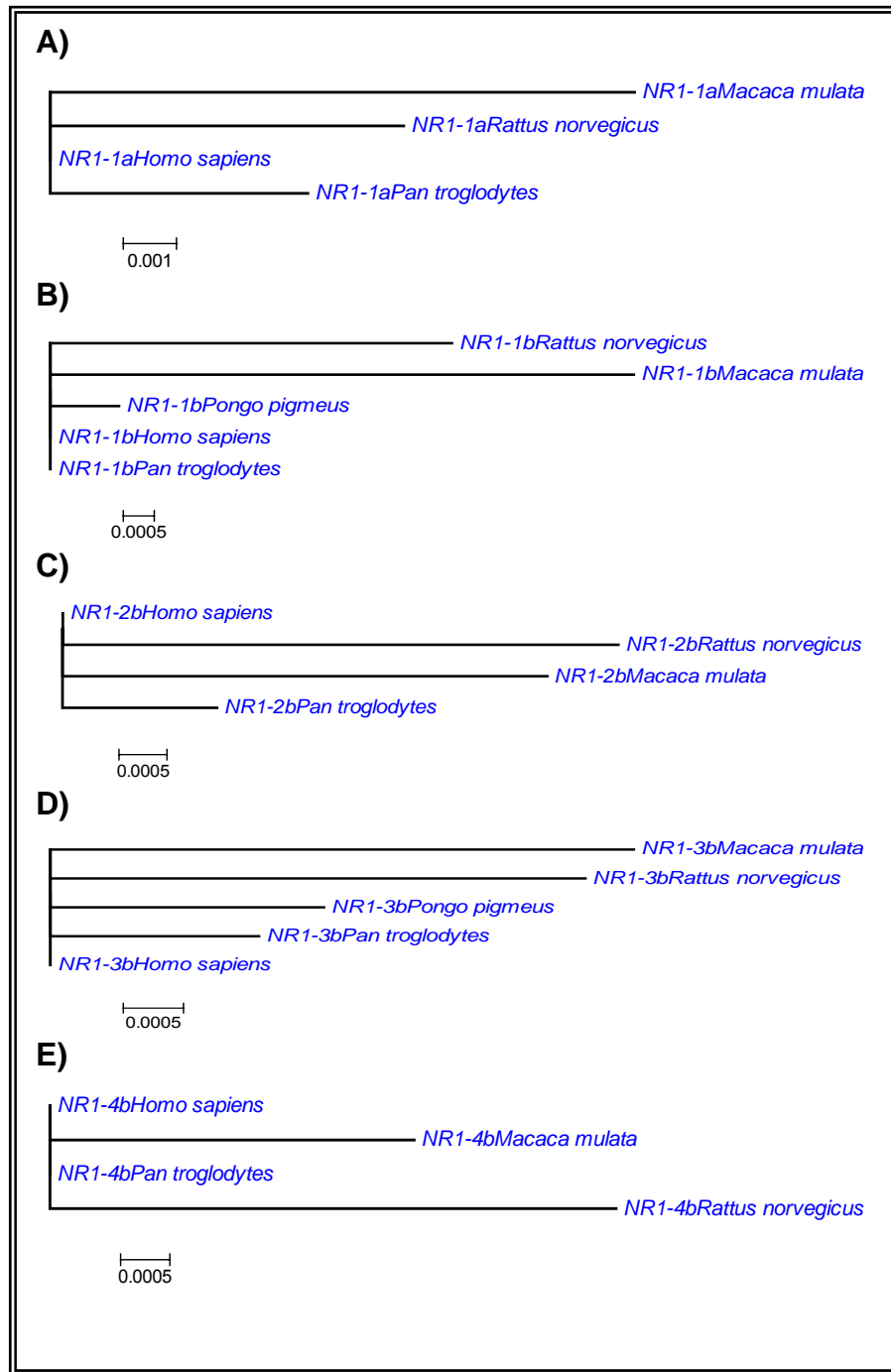


Figura 26. Árboles Filogenéticos de las subunidades NR1 de NMDA. El método de reconstrucción filogenética empleado fue Máxima Verosimilitud con un Bootstrap de 100, los valores en rojo indican el porcentaje con el cual se generó esa topología.

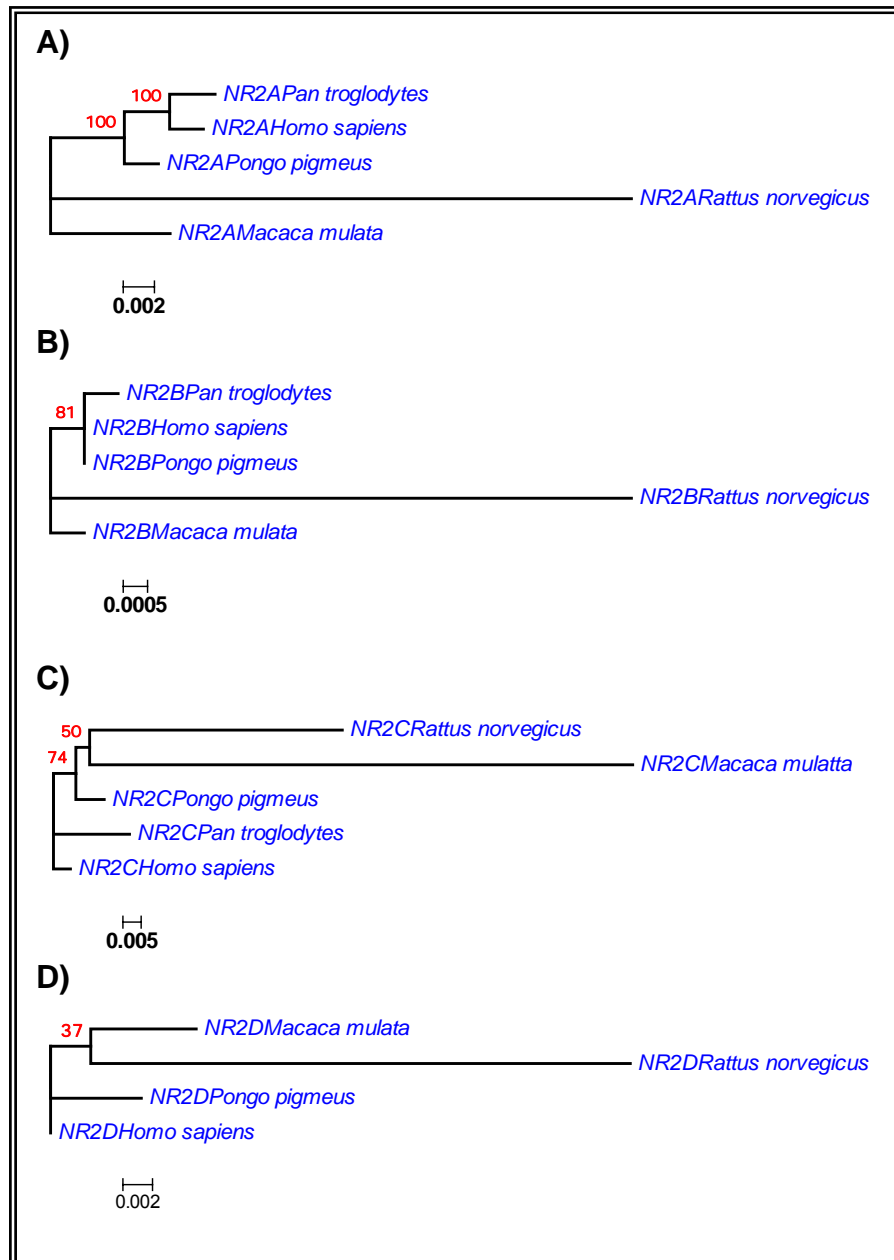


Figura 27. Árboles Filogenéticos de las subunidades NR2 de NMDA. El método de reconstrucción filogenética empleado fue Máxima Verosimilitud con un Bootstrap de 100, los valores en rojo indican el porcentaje con en el cual se generó esa topología.

La estimación para la subunidad NR3A nos muestra que las especies **Homo sapiens** y **Pan troglodytes** no presentan relaciones de parentesco y que las especies **Macaca mulata** y **Rattus norvegicus** se encuentran más relacionadas entre ellas y a su vez se relacionan con la especie **Pongo Pigmeus** (Véase figura

28A), mientras que en la subunidad NR3B no se observan nodos internos (Véase figura 28B).

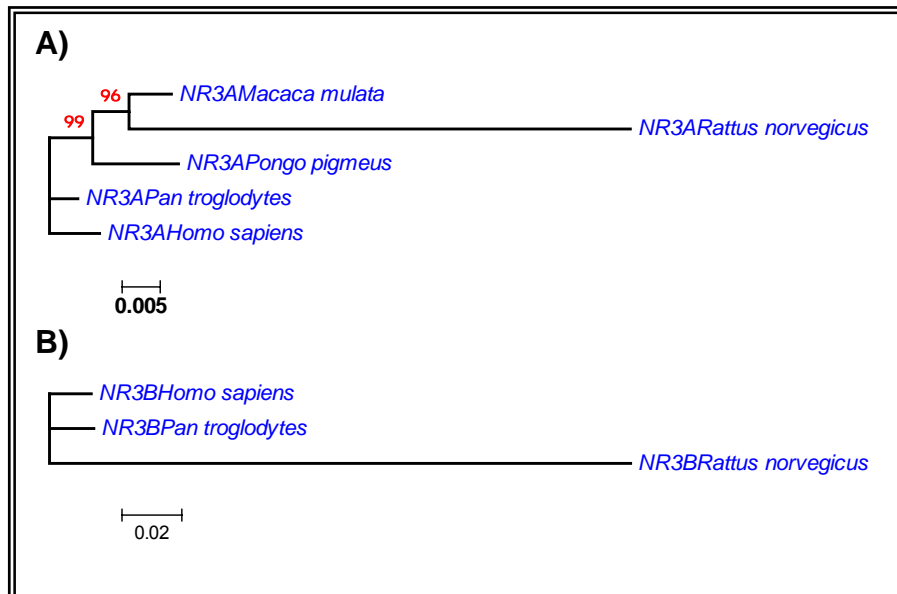


Figura 28. Árboles Filogenéticos de las subunidades NR3 de NMDA. El método de reconstrucción filogenética empleado fue Máxima Verosimilitud con un Bootstrap de 100, los valores en rojo indican el porcentaje con el cual se generó esa topología.

Es importante resaltar que las anteriores inferencias filogenéticas se caracterizaron por presentar politomías, estas secciones en las filogenias nos muestran que las relaciones evolutivas no pudieron ser resueltas por completo, es posible que los linajes se separaron en diferentes momentos pero los datos disponibles de los alineamientos no son suficientes para establecer relaciones de parentesco dentro de la filogenia. Esto se debe a que la tasa de cambio en proteínas es más lenta y genera cambios poco informativos en el contexto evolutivo en comparación con la información que brindan las secuencias de ADN.

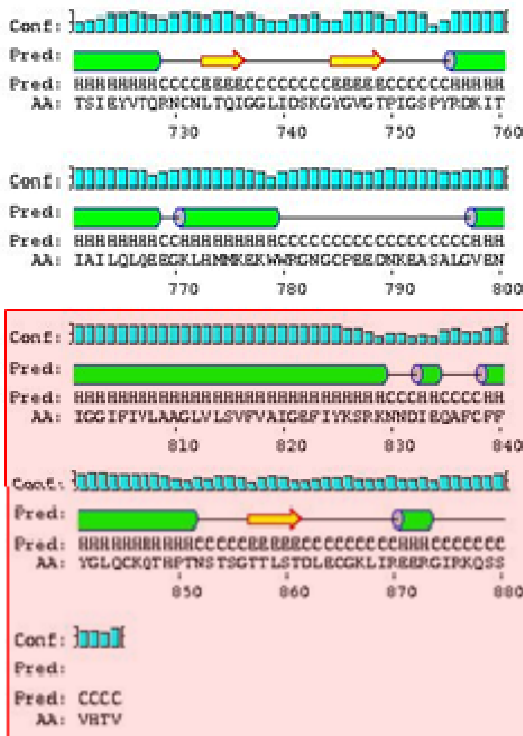
4.8 Estimación de Estructura Secundaria

En este caso se empleó el programa de predicción PSIPRED, el cual incorpora redes neuronales artificiales en las que se alinea la secuencia de la proteína en estudio con bases de datos de pliegues que facilitan la asignación de la estructura secundaria. Las predicciones empleando este programa han logrado un score promedio de 76,5% que se considera un alto nivel de precisión en comparación con otros métodos (McGuffin, L.; Bryson, K.; and Jones, D.; 2000). A continuación

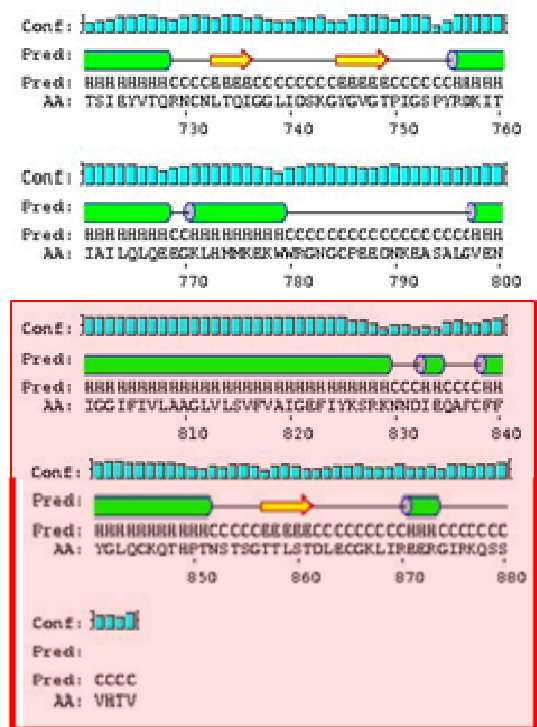
se presentan las predicciones de estructura secundaria para las subunidades GLUR5, NR2A, NR2C y NR3A que se caracterizaron por presentar cambios en la región C-terminal, esto se realiza con el propósito de identificar la influencia de éstos cambios sobre la estructura secundaria que adoptan las subunidades y que puedan sugerir cambios en la interacción del dominio C-terminal con otras proteínas.

La predicción de estructura en la subunidad Glur5 nos muestra que las especies *Homo sapiens* y *Pan troglodytes* presentan la misma estructura en su región C-terminal (Véase figura 29 A y B), mientras que para las especies *Pongo Pigeus*, *Macaca mulata* y *Rattus norvegicus* se observan diferencias; en el caso de la especie *Pongo Pigeus* la secuencia es más larga (915 aminoácidos) y las diferencias se presentan a partir del aminoácido 848 con la presencia adicional de una hoja β , dos hélices α y regiones de enrollamientos (Véase figura 29C), la especie *Macaca mulata* presenta la secuencia más corta (873 aminoácidos), su estructura es semejante a la de las otras especies sin embargo no coincide en la posición de los aminoácidos y finaliza con un enrollamiento desde el aminoácido 838 (Véase figura 29D) y en la especie *Rattus norvegicus* las diferencias se presentan desde el aminoácido 850 donde prima la estructura de enrollamiento (Véase figura 29E).

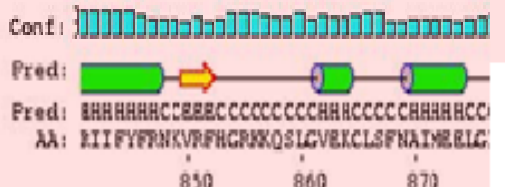
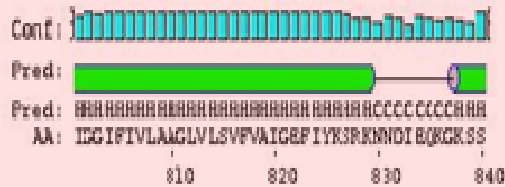
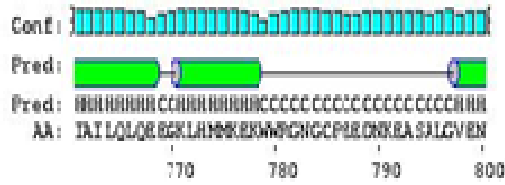
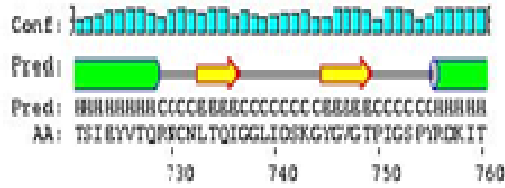
A) *Homo sapiens* Glur5



B) *Pan troglodytes* Glur5



C) *Pongo pygmaeus* Glur5



D) *Macaca mulata* Glur5



E) *Rattus norvegicus* Glur5

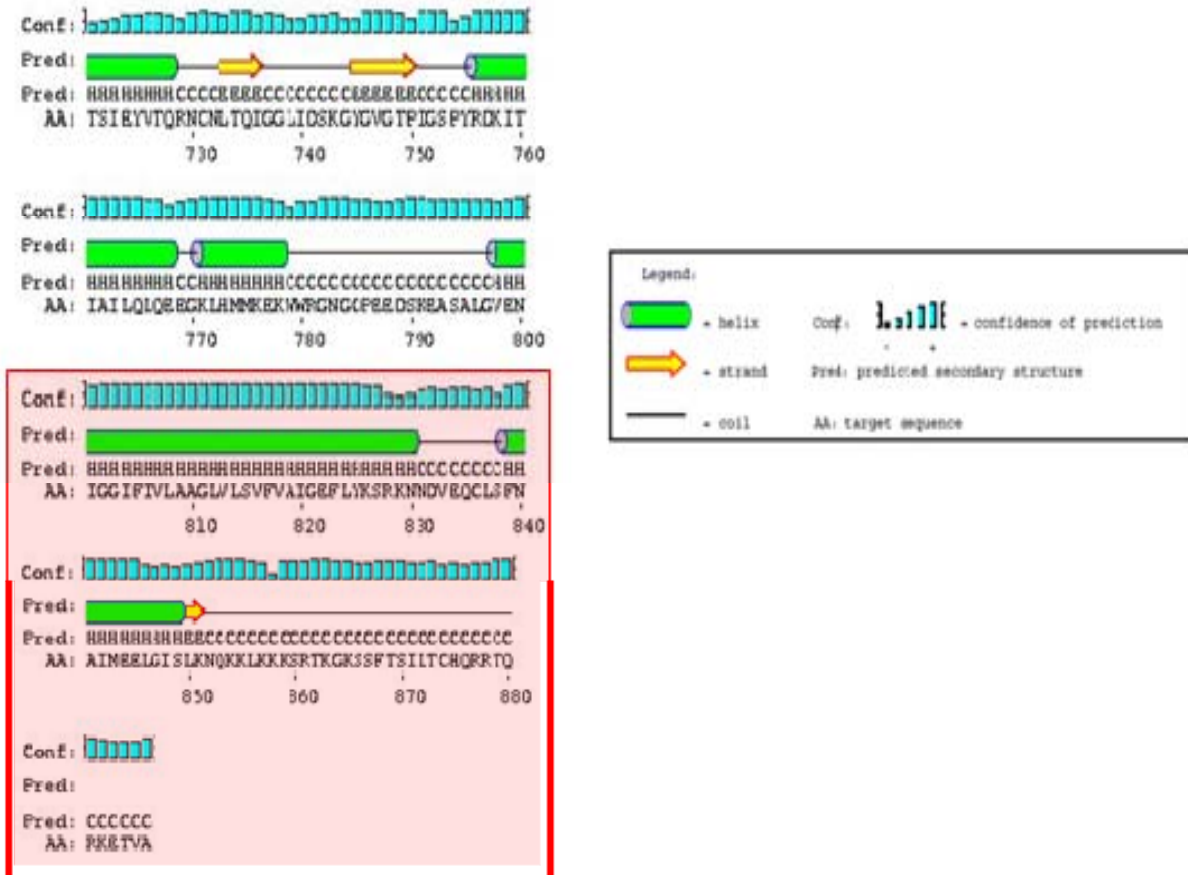
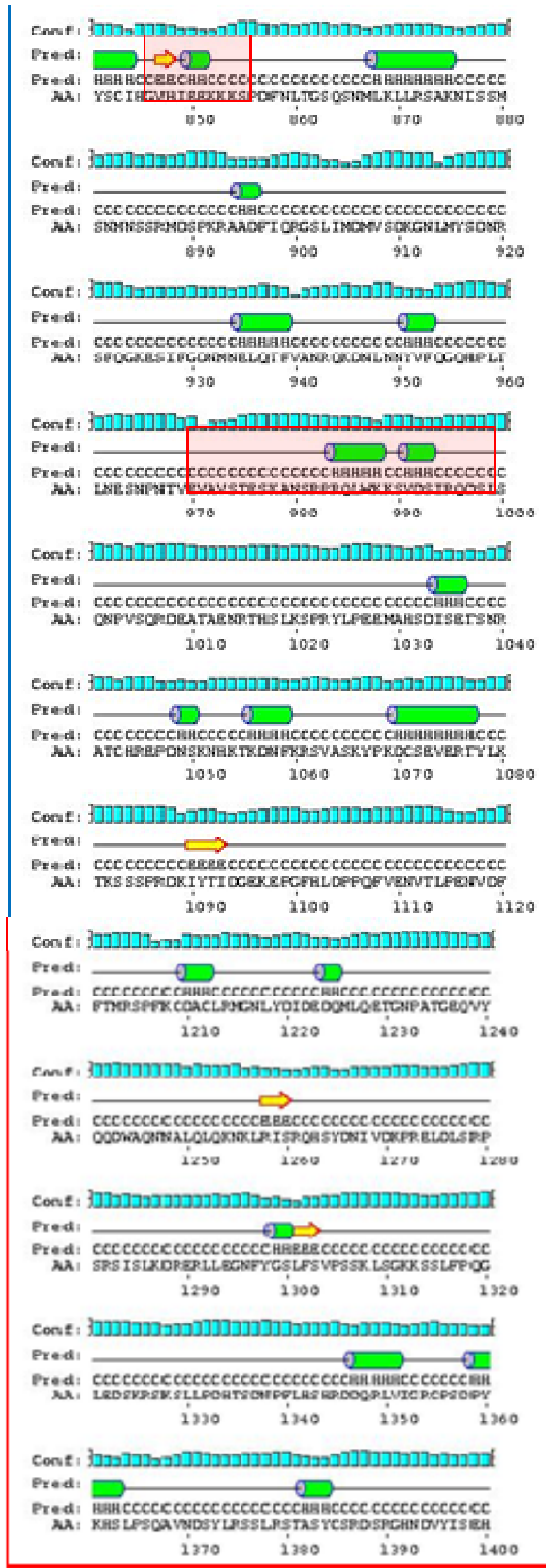


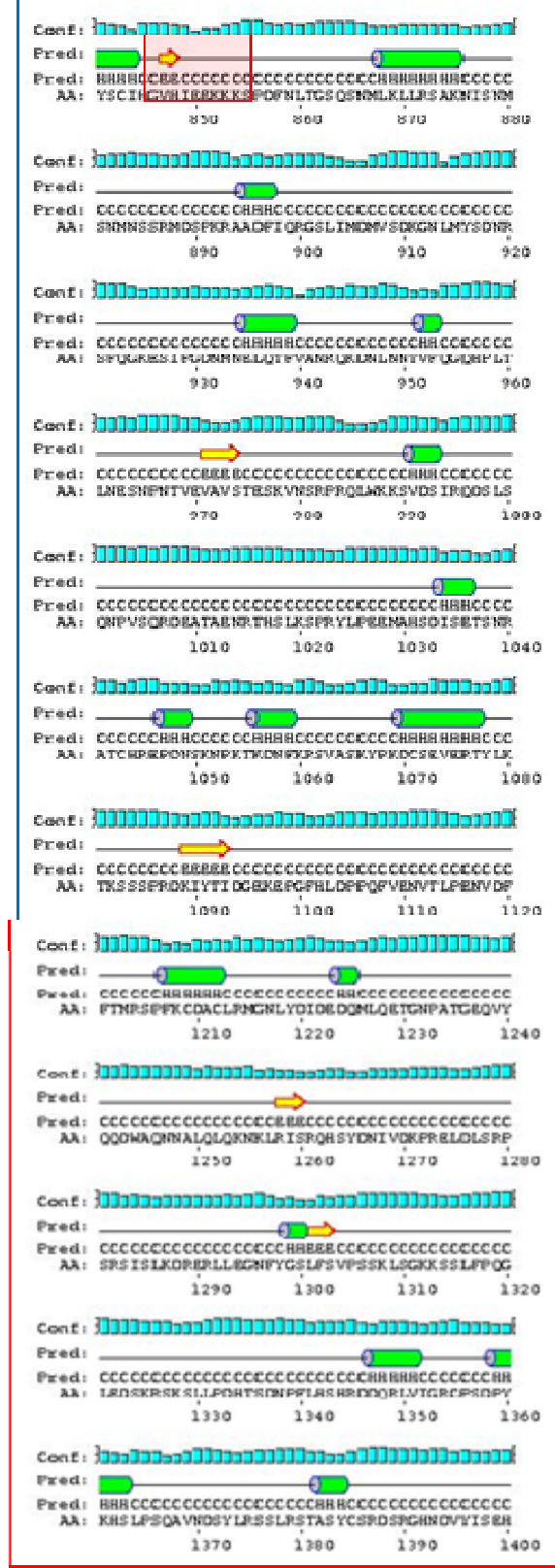
Figura 29. Predicción de Estructura Secundaria para el Dominio C-terminal en la Subunidad GLUR5. A) *Homo sapiens*, B) *Pan troglodytes*, C) *Pongo Pigmus*, D) *Macaca mulata* y E) *Rattus norvegicus*. Los recuadros rojos resaltan las regiones de cambio. Los barriles verdes representan hélices α , las flechas amarillas hojas β y las líneas negras regiones de enrollamiento.

En la subunidad NR2A se presentan pequeños cambios estructurales a partir del aminoácido 845 resaltados por los recuadros rojos, las secuencias más semejantes son las que corresponden a las especies *Homo sapiens* y *Pan troglodytes* mientras que la secuencia de *Macaca mulata* es en la que se observa mayor variación (Véase figura 30).

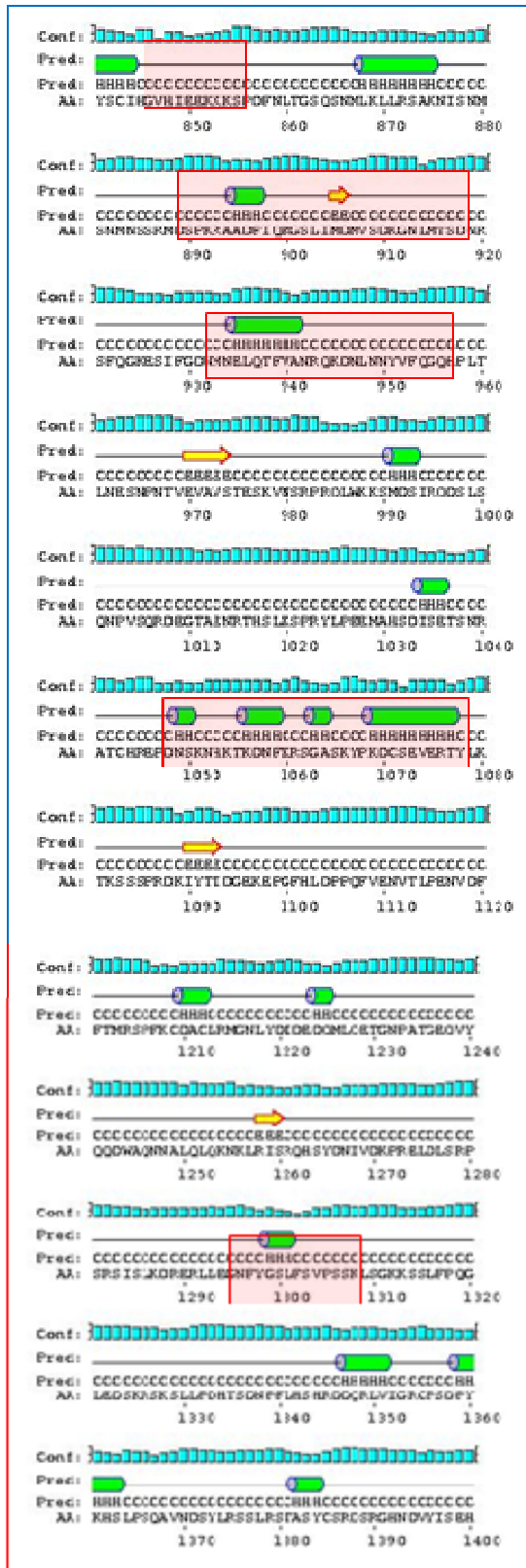
A) Homo sapiens NR2A



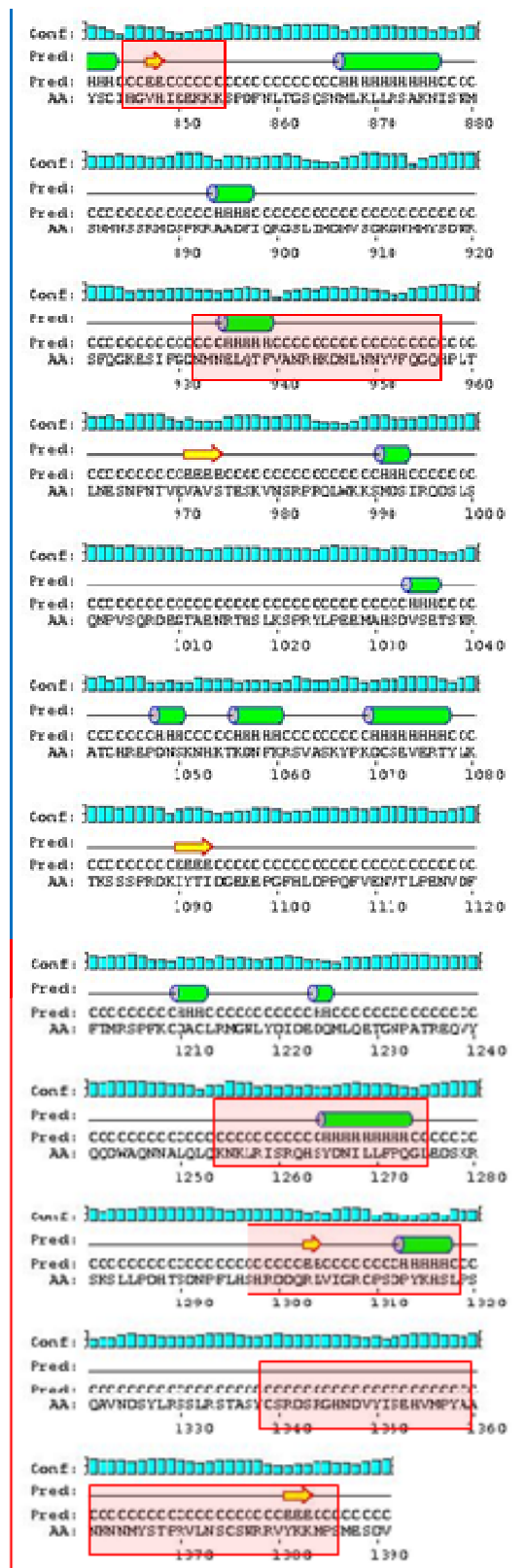
B) Pan troglodytes NR2A



C) *Pongo pygmaeus* NR2A



D) *Macaca mulatta* NR2A



E) *Rattus norvegicus* NR2A

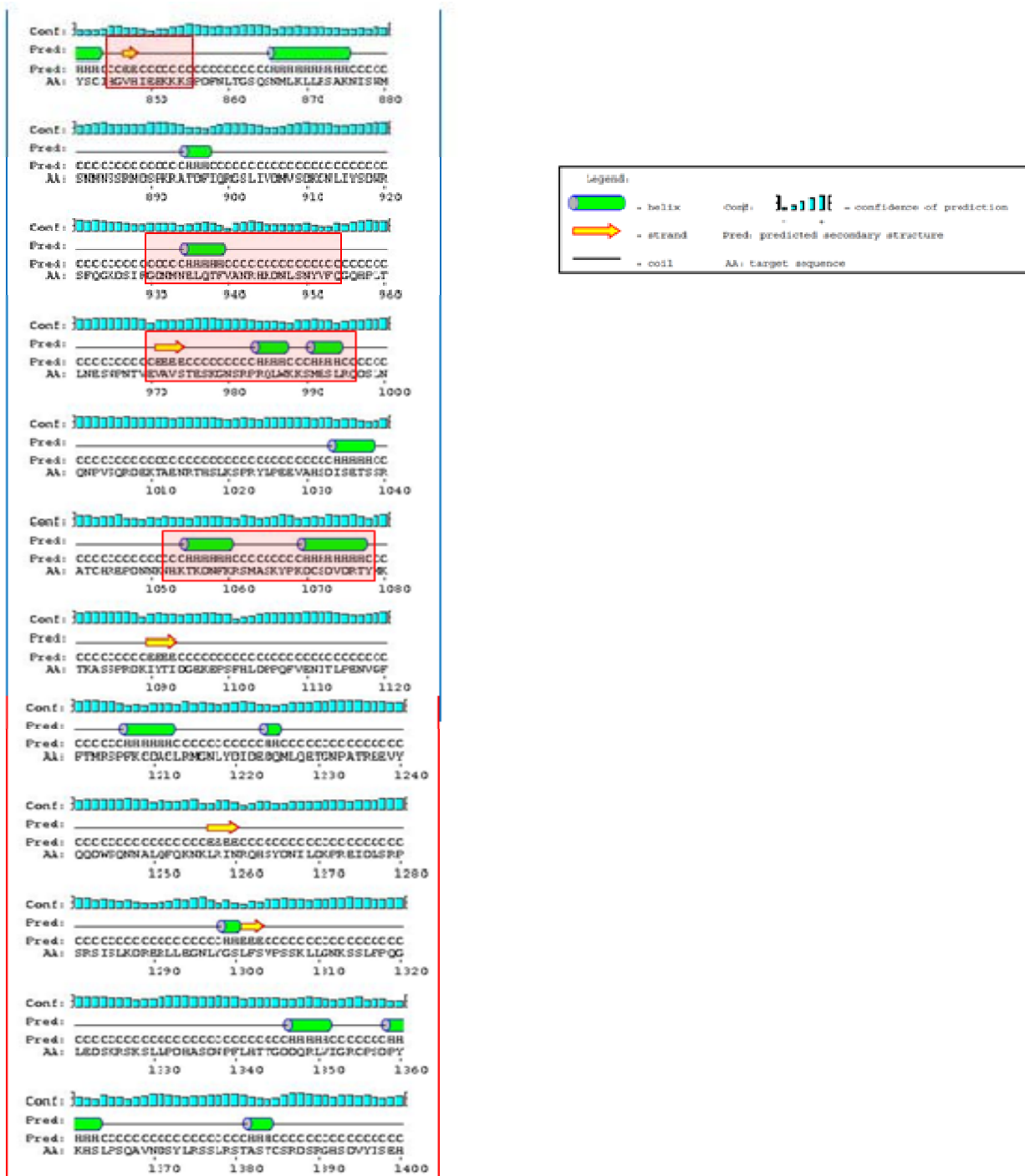
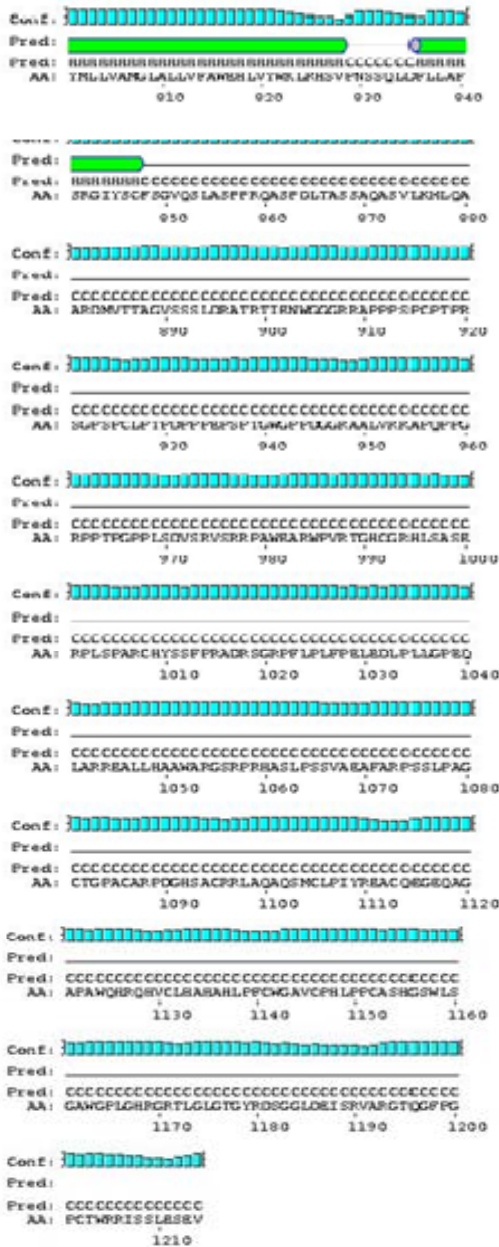


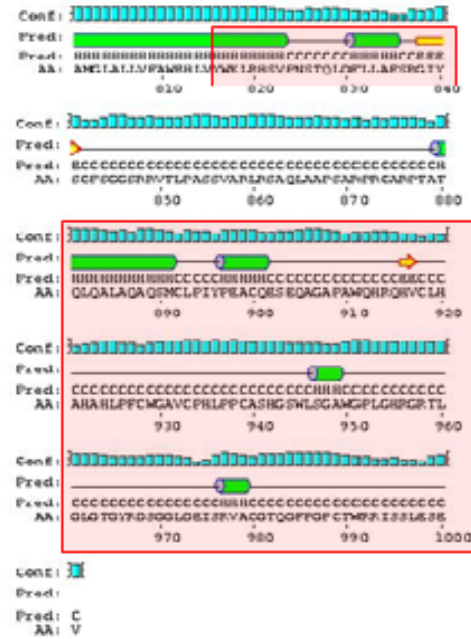
Figura 30. Predicción de Estructura Secundaria para el Dominio C-terminal en la Subunidad NR2A. A) *Homo sapiens*, B) *Pan troglodytes*, C) *Pongo Pigeus*, D) *Macaca mulata* y E) *Rattus norvegicus*. Los recuadros rojos resaltan las regiones de cambio. Los barriles verdes representan hélices α , las flechas amarillas hojas β y las líneas negras regiones de enrollamiento.

En la subunidad NR2C la región C-terminal está caracterizada por una estructura de enrollamiento a partir del aminoácido 847 en las especies *Homo sapiens* y *Macaca mulata* (Véase figura 31 A y D), en las especies *Pongo Pigeus* y *Rattus norvegicus* prima la estructura de enrollamiento sin embargo se presentan algunas hojas β o hélices α que se resaltan en los recuadros rojos (Véase figura 31 C y E), por último en la especie *Pan troglodytes* la secuencia es más corta y se caracteriza por la presencia de hélices α y enrollamientos (Véase figura 31B).

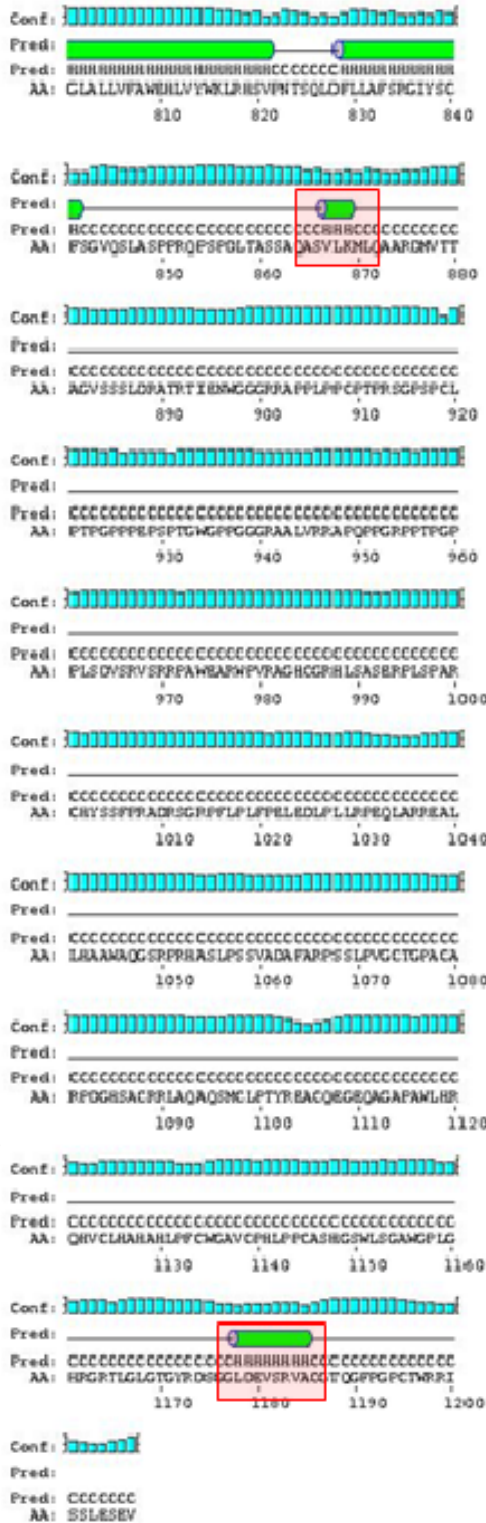
A) *Homo sapiens* NR2C



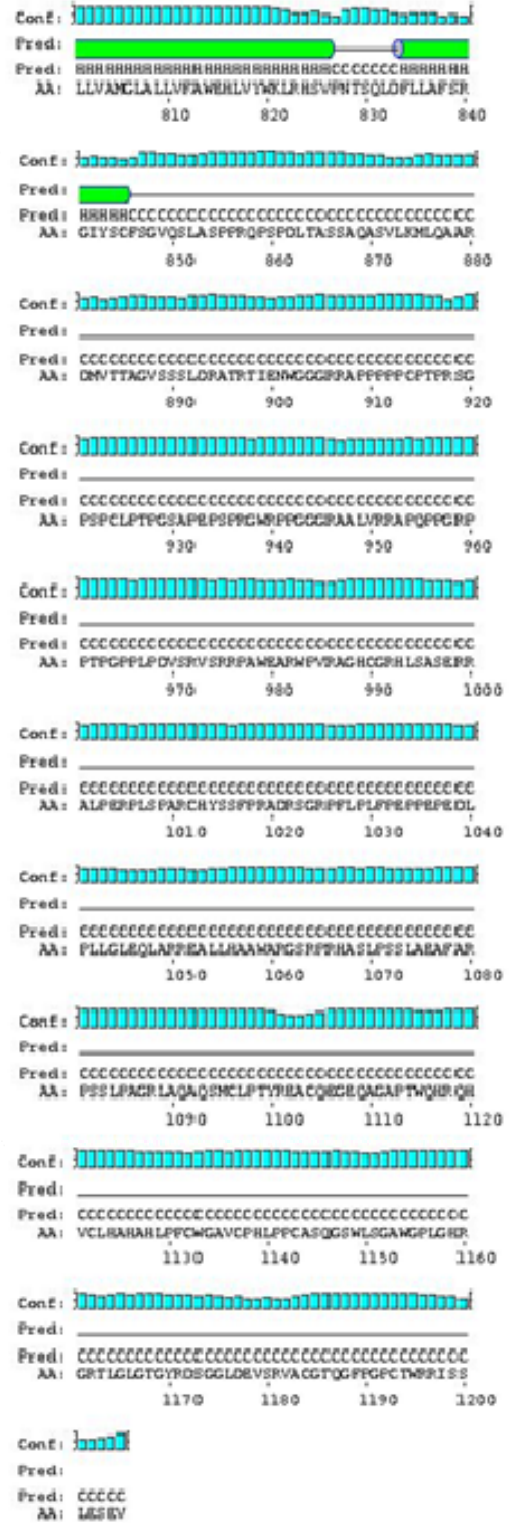
B) *Pan troglodytes* NR2C



C) *Pongo pygmaeus* NR2G



D) *Macaca mulata* NR2G



E) *Rattus norvegicus* NR2C

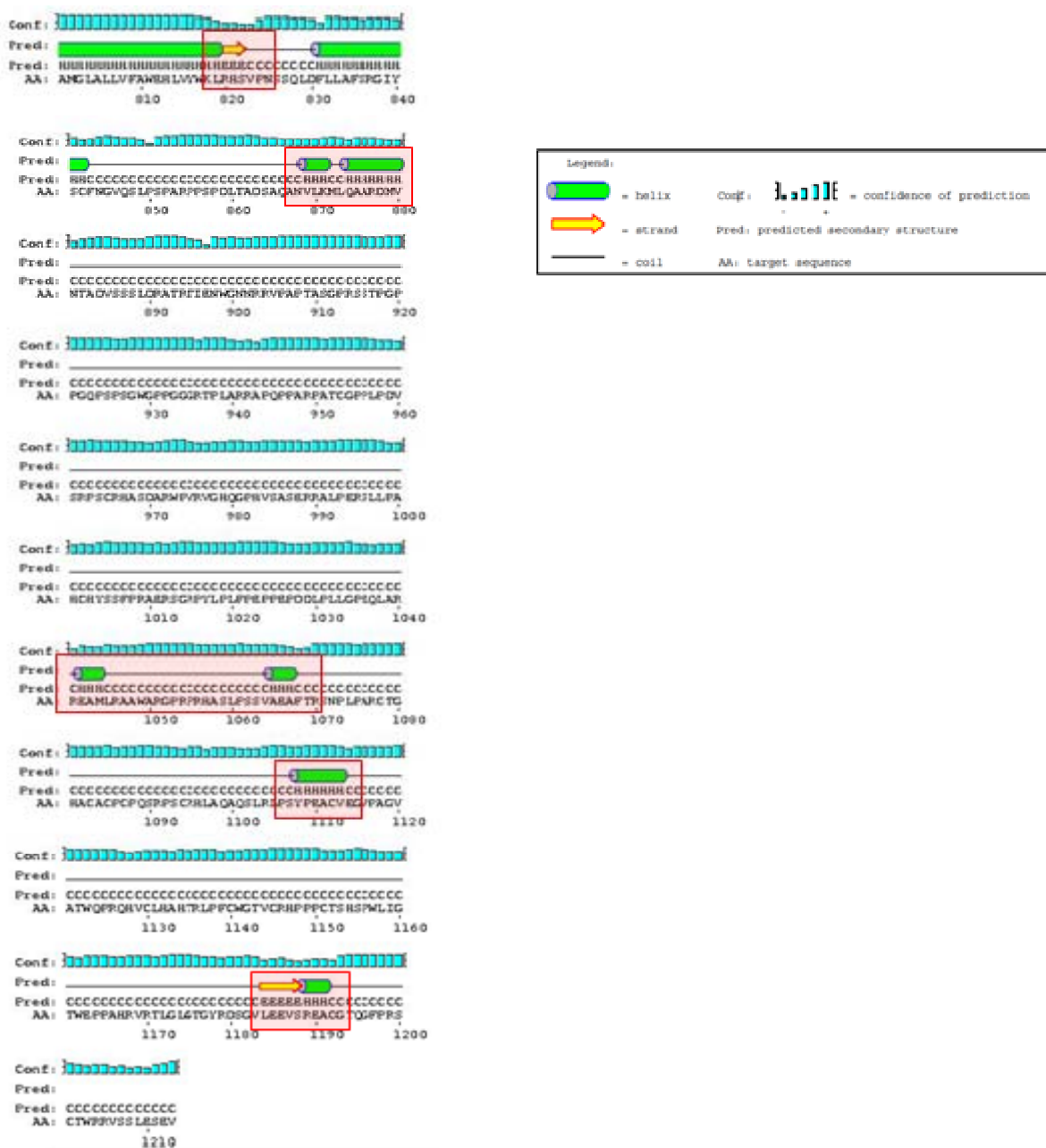
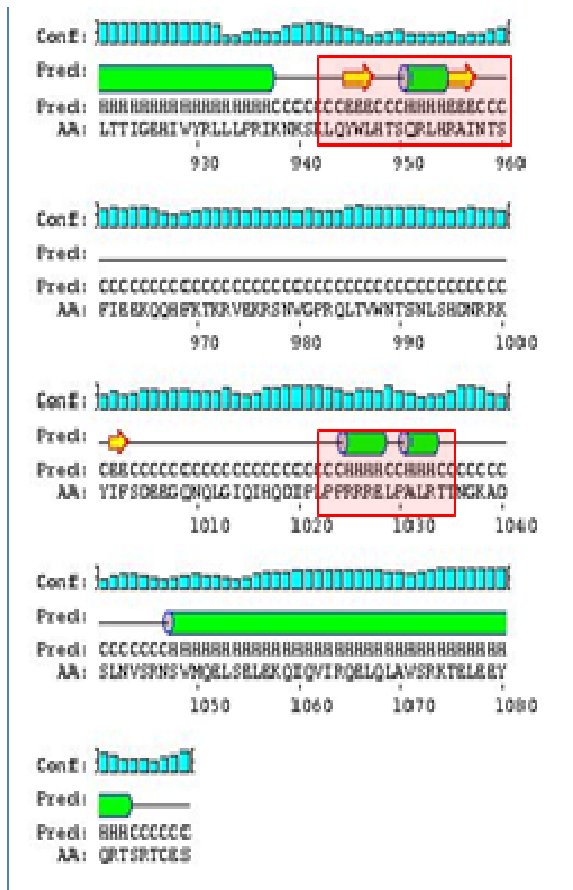


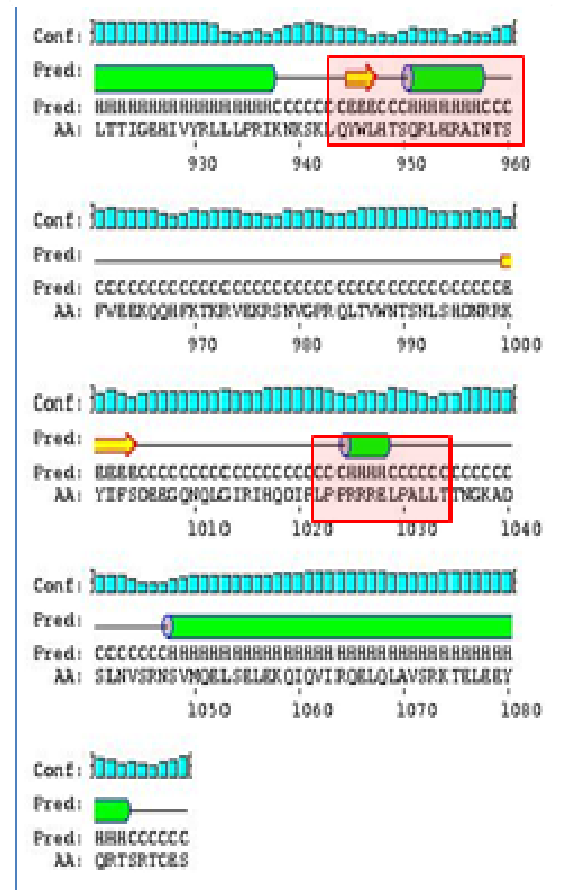
Figura 31. Predicción de Estructura Secundaria para el Dominio C-terminal en la Subunidad NR2C. A) *Homo sapiens*, B) *Pan troglodytes*, C) *Pongo Pigmeus*, D) *Macaca mulata* y E) *Rattus norvegicus*. Los recuadros rojos resaltan las regiones de cambio. Los barriles verdes representan hélices α , las flechas amarillas hojas β y las líneas negras regiones de enrollamiento.

En la subunidad NR3A se presentan pequeños cambios de estructura resaltados en los recuadros rojos entre los aminoácidos 944-958 y 1023-1035 para las especies *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pongo Pigeus*, y *Macaca mulata* (Véase figura 32 A-D), mientras que la secuencia con mayor variación de estructura se presenta en la especie *Rattus norvegicus* con cambios adicionales entre los aminoácidos 962-977, 1002-1020 y 1048-1066 (Véase figura 32 E).

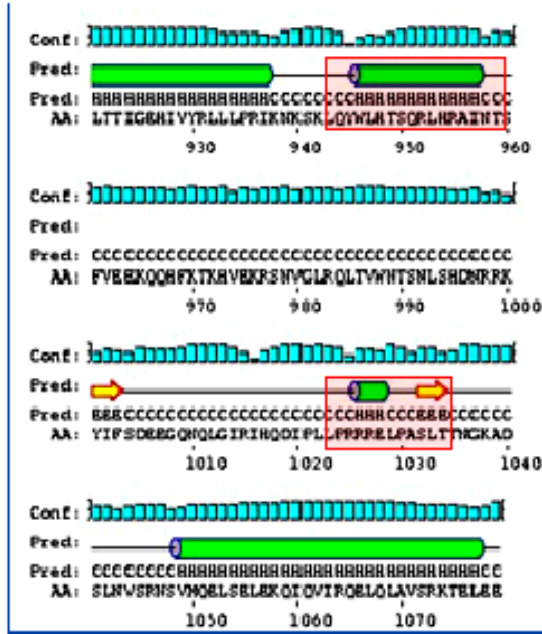
A) *Homo sapiens* NR3A



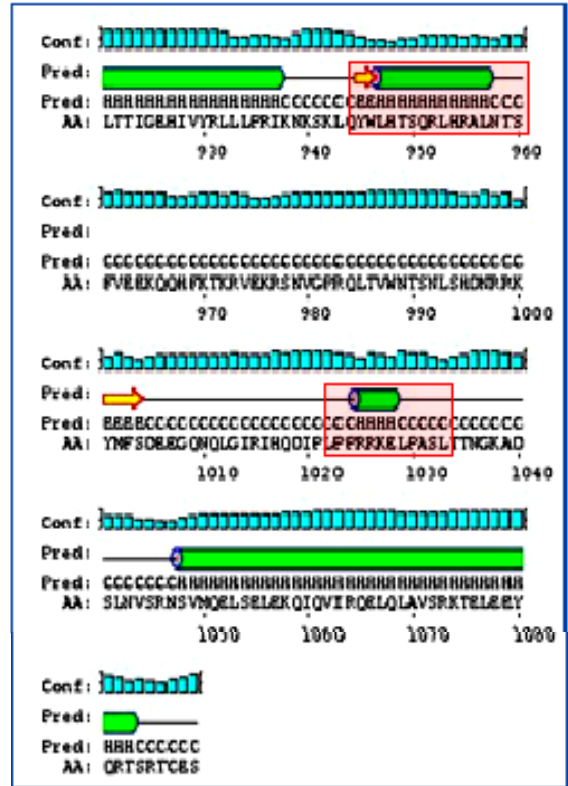
B) *Pan troglodytes* NR3A



C) *Pongo pygmaeus* NR3A



D) *Macaca mulata* NR3A



E) *Rattus norvegicus* NR3A

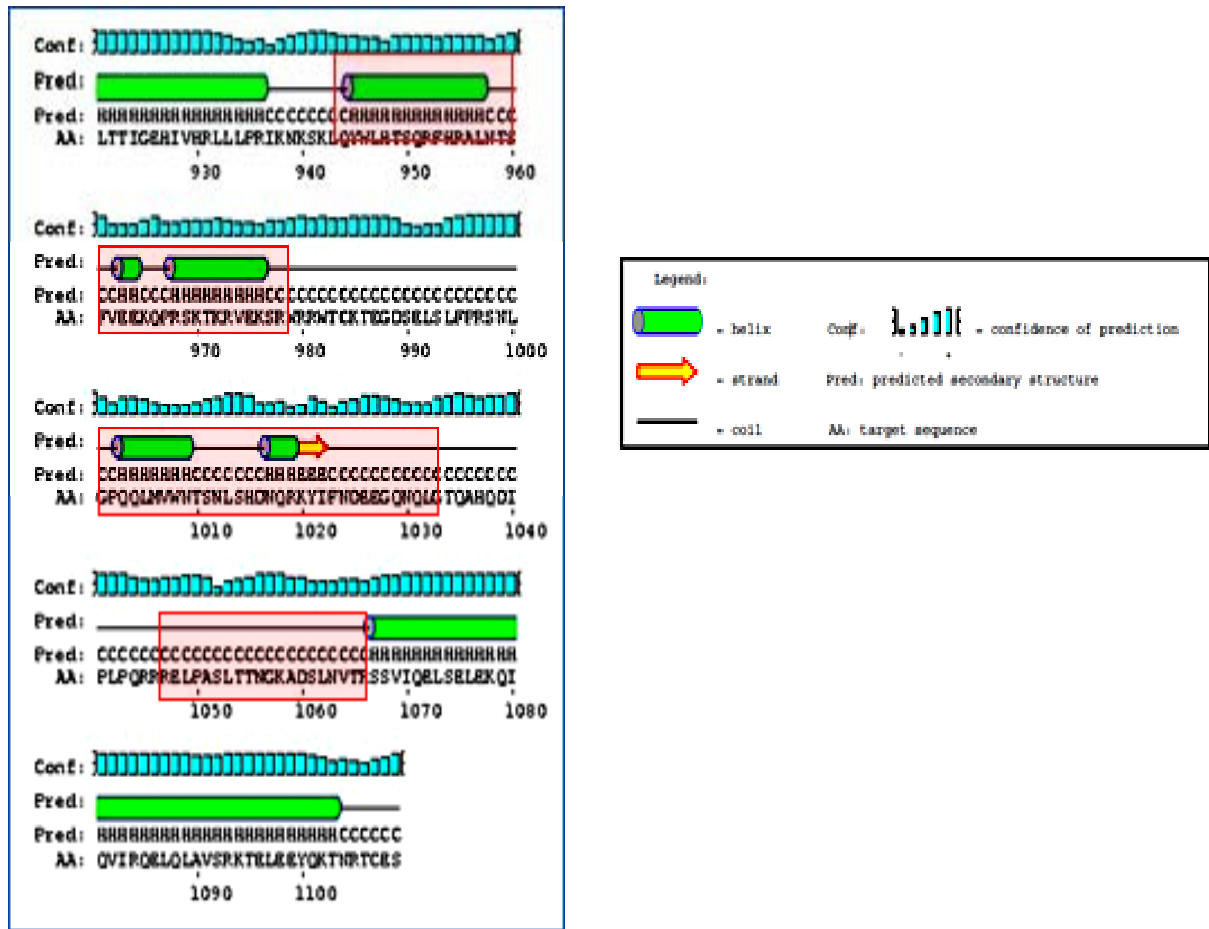


Figura 32. Predicción de Estructura Secundaria para el Dominio C-terminal en la Subunidad NR3A. A) *Homo sapiens*, B) *Pan troglodytes*, C) *Pongo Pigeus*, D) *Macaca mulata* y E) *Rattus norvegicus*. Los recuadros rojos resaltan las regiones de cambio. Los barriles verdes representan hélices α , las flechas amarillas hojas β y las líneas negras regiones de enrollamiento.

El dominio C-terminal de los iGluRs sirve como plataforma de importantes modificaciones postraduccionales, así como representar un buen dominio de anclaje para interacciones proteína-proteína con una variedad de proteínas intracelulares que están envueltas en el direccionamiento, tráfico y anclaje de estos receptores (Scannevin, R.; and Huganir, R.; 2000). Adicionalmente esta región presenta importantes sitios de fosforilación para serina, treonina y tirosina quinasas como es el caso de la proteína quinasa C, proteína quinasa A, entre

otras (MacDonald, J.; Kotecha, S.; *et al.* 2001).

Con base en lo anterior, los cambios de estructura que muestran las predicciones nos proponen que la interacción de los dominios C-terminal con otras proteínas puede ser diferente en las especies en estudio para las subunidades Glur5, NR2A, NR2C y NR3A, por lo tanto resulta importante reconocer sitios de fosforilación que estén variando en estas subunidades y que brinden una mayor información en relación cuales son los sitios de interacción que están cambiando.

4.9 Estimación de Sitios de Fosforilación

Este procedimiento se llevó a cabo empleando el servidor NetPhos que emplea un método de redes neuronales artificiales para predecir los sitios de fosforilación en secuencias independientes, con un rango de sensibilidad del 69% al 96% (Blom, N.; Gammeltoft, S.; and Brunak, S.; 1999). El programa resalta secuencias de 9 aminoácidos que involucran un residuo de fosforilación (motivos), seguida de una puntuación de 0.000-1.000, donde los valores cercanos a 1 representan una alta probabilidad de que la secuencia sea reconocida como motivo de fosforilación. Los resultados de la predicción de sitios de fosforilación en las secuencias de las subunidades Glur5, NR2A, NR2C y NR3A se encuentran en el anexo 3, a continuación se presentan los resultados de los sitios de fosforilación que se encuentran dentro de los cambios identificados a partir de los alineamientos con sus respectivos valores de puntuación. (Véase tabla 12).

Tabla 12. Sitios de Fosforilación que hacen Parte de los Cambios.

Subunidad	Especie	Sitios de fosforilación que aparecen			Sitios de fosforilación que se pierden		
		Posición	Cambio	Score	Posición	Cambio	Score
GLUR5	<i>Homo sapiens</i>	853	K por S	0.965	844	S por Q	0.979
		879	T por S	0.962	862	S por D	0.938
					874	T por G	0.984
	<i>Pan troglodytes</i>	853	K por S	0.965	844	S por Q	0.979
		879	T por S	0.962	862	S por D	0.938
					874	T por G	0.984
NR2A	<i>Macaca mulata</i>				1152	S por P	0.903
	<i>Rattus norvegicus</i>	1393	N por S	0.973	1152	S por P	0.903
					1260	S por N	0.716
				1343	S por T	0.985	

NR2C	<i>Pan troglodytes</i>				827	S por T	0.957
	<i>Rattus norvegicus</i>	1107	T por S	0.993			
NR3A	<i>Rattus norvegicus</i>	969	F por S	0.781	1006	T por M	0.917
					1024	S por N	0.974

Las subunidades de los receptores Kainato interactúan con numerosas proteínas que afectan su función y distribución subcelular, investigaciones en esta área se han centrado en la influencia de las proteínas con dominios PDZ, como es el caso de las proteínas PSD-95, GRIP y PICK1 que interactúan en diferentes grados con los motivos que se ubican en el C-terminal de las subunidades e involucran aminoácidos como serina y treonina, lo que sugiere una interacción proteína-proteína por fosforilación (Gereau, R.; and Swanson, G.; 2008).

Para las subunidades del receptor NMDA también existe una variedad de proteínas que actúan directamente con el dominio C-terminal como es el caso de las proteínas MAGUK (PSD-95, PSD-93, SAP97 y SAP102), estas proteínas presentan tres dominios PDZ que se unen a los dominios PDZ de las subunidades NMDA y actúan como complejo molecular que se puede asociar a otras proteínas alrededor de la densidad postsináptica (PDS), favoreciendo la unión de los receptores NMDA a otros receptores de glutamato o canales iónicos.(Cull-Candy, S.; Brickley, S.; and Farrant, M.; 2001.; Lim, I.; Merrill, M.; *et al.* 2003.; Kim, E.; and Sheng, M.; 2004).

La presencia de nuevos sitios de fosforilación y la ausencia de otros en las secuencias de la subunidad GluR5 para las especies *Homo sapiens* y *Pan troglodytes*, así como en *Macaca mulata* y *Rattus norvegicus* para la subunidad NR2A, en *Pan troglodytes* y *Rattus norvegicus* para la subunidad NR2C y *Rattus norvegicus* en la subunidad NR3A (Véase tabla 12), nos sugieren que los procesos de direccionamiento, tráfico o anclaje de estas subunidades puede estar variando en estas especies. Por lo tanto sería interesante comprobar experimentalmente de qué forma estos cambios en estructura y sitios de fosforilación alteran la afinidad por las proteínas que se unen a motivos en el C-terminal de las subunidades mencionadas.

Por otra parte resulta importante la relación que se puede establecer los resultados obtenido en las inferencias filogenéticas y las predicciones de estructura secundaria, en el caso de la subunidad GluR5 las especies *Homo sapiens* y *Pan troglodytes* se presentan como ramas no resueltas en comparación a las otras tres especies que comparten un nodo ancestral, presentaron los mismo cambios en el C-terminal el cual se ve reflejado en un mismo patrón de estructura

secundaria a diferencia de las especies ***Pongo Pigmeus***, ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus***.

Para la subunidad NR2A se observa que las especies ***Homo sapiens*** y ***Pan troglodytes*** que se encuentran más estrechamente relacionadas presentan estructuras secundarias más semejantes seguidas por la estructura de la especie ***Pongo Pigmeus***, lo cual también se ve reflejado en el árbol. En el caso de la subunidad NR2C ***Pan troglodytes*** se destacó por presentar la secuencia C-terminal más corta y aparece en el árbol como una rama independiente, sin embargo las relaciones de parentesco en el árbol no se pueden relacionar con la estructura secundaria dado que en esta región C-terminal para esta subunidad priman la estructura de los enrollamientos al azar.

Por último para la subunidad NR3A las especies ***Homo sapiens*** y ***Pan troglodytes*** que presentan estructuras secundarias muy semejantes, se presentan en el árbol como ramas sin resolver, mientras que para las especies ***Pongo Pigmeus*** y ***Macaca mulata*** que también presentan estructuras similares se presenta una relación evolutiva porque comparten un ancestro común y la relación estrecha entre ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus*** no se ve reflejada en sus estructuras secundarias.

De acuerdo con lo que se podría pensar la relación filogenética que se establece a partir de los cambios en las secuencias de las proteínas debería verse reflejada en la estructura secundaria, sin embargo los resultados obtenidos nos muestran que no necesariamente una relación evolutiva entre dos secuencias implica estructuras secundarias semejantes.

5. CONCLUSIONES

- Los alineamientos múltiples permitieron identificar los cambios que se presentan en las diferentes subunidades de los receptores NMDA, AMPA y Kainato, dentro de los que se destacan los cambios que involucran los dominios de unión aligando S1 y/o S2, porque proponen variaciones en la interacción con el glutamato o en la estabilización del bolsillo o pocket de unión al ligando, en la especie ***Rattus norvegicus*** para las subunidades GluR5, GluR6 y NR2A, y en la subunidad NR3A para las cinco especies dada la variación de los residuos en la posición 596 y posiciones adicionales en las especies ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus***.
- La predicción de dominios transmembranales nos mostró que las subunidades NR2 A-D y NR3A-B de NMDA y la subunidad KA1 de Kainato a diferencia del resto de subunidades presentaron cuatro dominios transmembranales; En las subunidades NR2B-D, NR3A-B y KA1 el segundo dominio transmembranal podría corresponder al bucle reentrante en la membrana M2, mientras que en la subunidad NR2A el tercer dominio transmembranal puede estar representando un bucle similar a M2 ubicado entre los dominios M3 y M4.
- Las subunidades GLUR5, NR2A, NR2C y NR3A se destacaron por presentar una mayor proporción de cambios en la región C-terminal, mostraron cambios en la predicción de estructura secundaria los cuales sugieren variaciones en las interacciones con las proteínas que se unen a dominios ubicados en esta región y que están involucradas en los procesos de direccionamiento, tráfico y anclaje de los receptores en las posiciones intracelulares.
- La identificación por predicción de sitios de fosforilación que aparecen o se pierden en la región C-terminal a través de los cambios que presentan las subunidades GluR5 en las especies ***Homo sapiens*** y ***Pan troglodytes***, NR2A en las especies ***Macaca mulata*** y ***Rattus norvegicus***, ***Pan troglodytes*** y ***Rattus norvegicus*** en la subunidad NR2C y ***Rattus norvegicus*** en la subunidad NR3A, nos plantean la existencia de variaciones en la interacción de estas subunidades en las especies correspondientes con proteínas quinasas y con proteínas con dominios PDZ como PSD-95, PSD-93 que se unen a los dominios PDZ en la región C-terminal de los iGluRs y actúan como complejos moleculares que se puede asociar a otras proteínas alrededor de la densidad postsináptica (PDS).
- La comparación entre las inferencias filogenéticas y la estructura secundaria para las subunidades GLUR5, NR2A, NR2C y NR3A nos

permitió observar que no siempre una relación evolutiva entre proteínas implica la adopción de estructuras secundarias semejantes, o que proteínas que presenten estructura secundaria provengan de un mismo linaje ancestral.

6. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron identificar cambios en algunas subunidades de los iGluRs que sugieren variaciones en las interacciones con el glutamato o con las proteínas que se unen a motivos en la región C-terminal, estos hallazgos requieren de acciones experimentales como:

- Identificar la influencia que tienen en la afinidad con el glutamato las siguientes sustituciones I459L, T696S y R700K en la subunidad GLUR5, A463V en la subunidad GLUR6, K680R y K684R en la subunidad NR2A, y 596R-N-S, H600N E804Q en la subunidad NR3A.
- Identificar como afecta o favorece la interacción con proteínas con dominios PDZ como PSD-95, PSD-93 y proteínas quinasas la presencia de nuevos sitios de fosforilación y la ausencia de otros, en las secuencias de la subunidad GluR5 en las especies *Homo sapiens* y *Pan troglodytes*, NR2A en las especies *Macaca mulata* y *Rattus norvegicus*, *Pan troglodytes* y *Rattus norvegicus* en la subunidad NR2C y *Rattus norvegicus* en la subunidad NR3A.

BIBLIOGRAFÍA

AL-HALLAQ, R.; JARABEK, B.; *et al.* Association of NR3A with the N-Methyl-D-aspartate Receptor NR1 and NR2 Subunits. En: Molecular Pharmacology. Vol. 62 (2002) p.1119–1127.

ARMSTRONG, N.; SUN, Y.; *et al.* Structure of a glutamate receptor ligand-binding core in complex with kainate. En: Nature. Vol. 395 (1998) p.913-917. Nombrado en KISTLER, T.; AND FLECK, M.; Functional Consequences of Natural Substitutions in the GluR6 Kainate Receptor Subunit Ligand-Binding Site. En: Channels. Vol1. 6 (2007) p. e1-e12.

ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; AND POSADA, D.; ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. En: Bioinformatics. Vol. 21 (2005) p 2104-2105.

BENDTSEN, J.; NIELSEN, H.; HEIJNE, H.; and BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides - SignalP 3.0. En: J. Mol. Biol. (2004) p. 1-22.

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; AND BRUNAK, S.; Sequence and Structure-Based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites. En: J. Mol. Biol. Vol. 294 (1999) p. 1351-1362.

BOYD, R. AND SILK, J. Cómo Evolucionaron Los Humanos. Ed Ariel, S.A. Barcelona, España. (2001) p 11-35, 132-153.

CHEN, S., SU, S.; *et. al.* PALM: A Paralleled and Integrated Framework for Phylogenetic Inference with Automatic Likelihood Model Selectors. En: PLoS ONE .Vol 4(2009) p. 1-6.

CHIU, J.; DESALLE, R.; *et al.* Molecular Evolution of Glutamate Receptors: A Primitive Signaling Mechanism that Existed Befote Plants and Animals Diverged. En: Molecular Biology Evolution. Vol. 16 (1999) p. 826-838.

COCKRUM. E. and McCAULEY, W.; Zoología. Ed: Interamericana. México. (1967) p. 608-609.

CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; AND FARRANT, M.; NMDA Receptor Subunits: Diversity, Development and Disease. En: Curr Opin Neurobiol. Vol. 11 (2001) p. 327-335. Nombrado en GEREAU, R.; AND SWANSON, G.; The Glutamate Receptor. Ed: Human Press (2008) p. 68-69.

De VORE, I. and EIMERL, S.; Los Primates. Ed: Time-Life Internacional. (1969) p. 7-11.

DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; **et al.** The Glutamate Receptor Ion Channels. En: The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. 51 (1999) p. 7-61.

DORUS, S.; Vallender, E. J.; **et al.** Accelerated Evolution of Nervous System Genes in the Origin of *Homo sapiens*. En: Cell. Vol. 119 (2004) p.1027–1040.

ERREGER, K.; GEBALLE, M.; **et al.** Subunit-Specific Agonist Activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D- Containing *N*-Methyl-D-aspartate Glutamate Receptors. En: Molecular Pharmacology. Vol 72 (2007) p. 907-920.

ESTRADA, A.; Comportamiento Animal el Caso de los Primates. Ed: La Ciencia. México. (1996) p. 19-21.

GEIGER, J.; MELCHER, T.; **et al.** Relative Abundance of Subunit mRNAs Determines Gating and Ca²⁺ Permeability of AMPA Receptors in Principal Neurons and Interneurons in Rat CNS. En: Neuron. Vol 15 (1995) p. 193-204. Nombrado en OPTIZ, T.; GROOMS, S.; **et al.** Remodeling of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor Subunit Composition In Hippocampal Neurons After Global Ischemia. En: PNAS. Vol. 97 (2000) p. 13360–13365.

GEREAU, R.; AND SWANSON, G.; The Glutamate Receptor. Ed: Human Press (2008) p. 68-69, 130-131, 262-265.

GUINDON, S.; and GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood En: Syst. Biol. Vol.52 (2003) p.696–704.

HALL, B.; Phylogenetic Trees Made Easy. Ed: Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts (2001) p. 37, 44, 48, 49, 58, 73-100.

HENIKOFF, S.; and HENIKOFF, J. Amino acid substitution matrices from protein blocks. En: Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 89, (1992) p. 10915-10919, 1992

HERB, A.; BURNASHEV, N.; **et al.** The KA-2 Subunit of Excitatory Amino Acid Receptors Shows Widespread Expression in Brain and Forms Ion Channels with Distantly Related Subunits. En: Neuron. Vol 8 (1992) p.775-785. Nombrado en WENTHOLDS, R.; TRUMPY, V.; **et al.** Biochemical and Assembly Properties of GluR6 and KA2, Two Members of the Kainate Receptor Family, Determined with Subunit-specific Antibodies En: The Journal of Biological Chemistry. Vol. 269(1994) p. 1332-1339.

HOLLMANN, M.; HARTLEY, M.; AND HEINEMANN, S.; Ca²⁺ Permeability of KA-

AMPA-gated Glutamate Receptor Channels Depends on Subunit Composition. En: Science. Vol. 252 (1991) p. 851-853. Nombrado en OPTIZ, T.; GROOMS, S.; **et al.** Remodeling of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit Composition In Hippocampal Neurons After Global Ischemia. En: PNAS. Vol. 97 (2000) p. 13360–13365.

HOLLMANN, M. ; BOULTER, J.; **et al.** Zinc Potentiates Agonist-Induced Currents at Certain Splice Variants of the NMDA Receptor. En: Neuron. Vol. 10 (1993) p. 943-954. Nombrado en DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; **et al.** The Glutamate Receptor Ion Channels. En: The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. 51 (1999) p. 7-61.

HUELSENBECK, J. and RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. En: Bioinformatics. Vol. 17 (2001) p. 754-755.

KIM, E.; AND SHENG, M.; PDZ Domain Proteins of Synapses. En: Nat Rev Neurosci. Vol. 5 (2004) p. 771-781. Nombrado en GEREAU, R.; AND SWANSON, G.; The Glutamate Receptor. Ed: Human Press (2008) p. 68-69.

KISTLER, T.; AND FLECK, M.; Functional Consequences of Natural Substitutions in the GluR6 Kainate Receptor Subunit Ligand-Binding Site. En: Channels. Vol1:6 (2007) p. e1-e12.

KURYATOV, A.; LAUBE, B.; **et al.** Mutational Análisis of the Glycine-Binding Site of the NMDA Receptor: Structural Similarity with Bacterial Aminoacid-Binding Proteins. En: Neuron. Vol 12 (1994) p. 1291-1300. Nombrado en DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; **et al.** The Glutamate Receptor Ion Channels. En: The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. 51 (1999) p. 7-61.

LIM, I.; MERRILL, M.; **et al.** Disruption of the NMDA Receptor-PSD-95 Interaction in Hippocampal Neurons with no Obvious Physiological Short-Term Effect. En: Neuropharmacology. Vol. 45 (2003) p. 738-754. Nombrado en GEREAU, R.; AND SWANSON, G.; The Glutamate Receptor. Ed: Human Press (2008) p. 68-69.

LOUBE, B.; HIRAI, H.; **et al.** Molecular Determinants of Agonist Discrimination by NMDA Receptor Subunits: Analysis of the Glutamate Binding Site on the NR2B Subunit. En: Neuron. Vol. 18 (1997) p. 493-503.

MACDONALD, J.; KOTECHA, S.; **et al.** Convergence of PKC-Dependent Kinase Signal Cascades on NMDA Receptors. En: Curr Drug Targets. Vol. 2 (2001) p. 299-312. Nombrado en GEREAU, R.; AND SWANSON, G.; The Glutamate Receptor. Ed: Human Press (2008) p. 262-265.

MAREN, S AND BAUDRY, M. Properties and Mechanisms of Long-Term Synaptic Plasticity in The Mammalian Brain Relationships to Learning and Memory. En: Neurobiology of Learning and Memory. Vol. 6 (1995) p. 1-18.

MASU, M.; NAKAJIMA, Y.; *et al.* Molecular Characterization of NMDA and Metabotropic Glutamate Receptors. En: Annals New York Academy of Sciences Vol. 707 (1993) p. 153-164.

MAYER, M.; AND ARMSTRONG, N.; Structure and Function of Glutamates Receptor Ion Channels. En: Annu. Rev. Physiol. Vol. 66 (2004) p. 161-181.

MAYER, M.; Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand-binding cores: Molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity. En: Neuron. Vol 45 (2005) p.5539-5552. Nombrado en KISTLER, T.; AND FLECK, M.; Functional Consequences of Natural Substitutions in the GluR6 Kainate Receptor Subunit Ligand-Binding Site. En: Channels. Vol1:6 (2007) p. e1-e12.

MCGUFFIN, L.; BRYSON, K.; AND JONES, D.; The PSIPRED protein structure prediction server. En: Bioinformatics. Vol. 16 (2000) p. 404-405.

MÖLLER, S.; CRONING, M.; AND APWEILER, R.; Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. En: Bioinformatics. Vol. 17 (2001) p. 646-653.

MONAGHAN, D.; BRIDGES, R.; AND COTMAN, C.; The Excitatory Amino Acid Receptors: Their Classes, Pharmacology, and Distinct Properties in the Function of the Central Nervous System. Annu. Rev. En: Pharmacol Toxicol. Vol. 29 (1989) p. 365-402. Nombrado en MASU, M.; NAKAJIMA, Y.; *et al.* Molecular Characterization of NMDA and Metabotropic Glutamate Receptors. En: Annals New York Academy of Sciences (1993) p. 153-164.

MOORE, B. R.; The Evolution of Learning. En: *Biol Rev Camb Philos Soc.* Vol. 9 (2004) p. 301-335.

MORENO, G.; y ZARAIN, A.; Papel de los Receptores de Glutamato Durante la Diferenciación Neuronal. En: Salud Mental. Vol 29 (2006) p. 38-48.

MORRONE, J.; Lenguaje de la Cladística. Ed: Dirección General de Publicaciones y Fomento UNAM. México (2000) p. 19-27.

NAKANISHI, S.; Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. En: Science. Vol. 258 (1992) p.597-603. Nombrado en MASU, M.; NAKAJIMA, Y.; *et al.* Molecular Characterization of NMDA and Metabotropic Glutamate Receptors. En: Annals New York Academy of Sciences (1993) p. 153-164.

NANAO M, GREEN T, *et al.* Structure of the kainate receptor subunit GluR6 agonist-binding domain complexed with domoic acid. En: PNAS. Vol 102 (2005) p.1708-1713. Nombrado en KISTLER, T.; AND FLECK, M.; Functional Consequences of Natural Substitutions in the GluR6 Kainate Receptor Subunit Ligand-Binding Site. En: Channels. Vol1:6 (2007) p. e1-e12.

Nickle, D.; Heath, H. et al. HIV-Specific Probabilistic Models of Protein Evolution. En: PLOS ONE. Vol. 2 (2007) p. 1-11.

OPTIZ, T.; GROOMS, S.; *et al.* Remodeling of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor Subunit Composition In Hippocampal Neurons After Global Ischemia. En: PNAS. Vol. 97 (2000) p. 13360–13365.

PEI, W.; RITZ, M.; *et al.* Receptor Occupancy and Channel-opening Kinetics. En: The Journal of Biological Chemistry. Vol. 282 (2007) p. 22731–22736.

ROSENMUND, C.; STERN-BACH, Y.; AND STEVENS, C.; The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel. En: Science. Vol. 280 (1998) p. 1596-1599.

RYAN, T.; EMES, R.; *et al.* Evolution of NMDA Receptor Cytoplasmic Interaction Domains: Implications for Organisation of Synaptic Signalling Complexes. En: BMC Neuroscience. Vol. 9 (2008) p. 1-14.

SAKIMURA, K.; MORITA, T.; *et al.* Primary structure and expression of the gamma 2 subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate. En: Neuron Vol. 8 (1992) p. 267-274. Nombrado en WENTHOLDS, R.; TRUMPY, V.; *et al.* Biochemical and Assembly Properties of GluR6 and KA2, Two Members of the Kainate Receptor Family, Determined with Subunit-specific Antibodies En: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 269(1994) p. 1332-1339.

SABATER, P.; El Chimpancé y los Orígenes de la Cultura. Tercera edición. Ed: Anthropos. Barcelona España. (1992) p. 23-25.

SCANNEVIN, R.; AND HUGANIR, R.; Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. En: Nature Reviews Neuroscience. Vol. 1 (2000) p. 133-141. Nombrado en GEREAU, R.; AND SWANSON, G.; The Glutamate Receptor. Ed: Human Press (2008) p. 262-265.

SCORTCCI, G.; Los Animales. Ed: Vergara. Barcelona España. Vol. 1 (1960) p.53, 60-61.

SCORTCCI, G.; Los Animales. Ed: Vergara. Barcelona España. Vol. 2 (1960) p.73-

75.

SEEBURG, P. H. The TINS/TIPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels Trends. En: Neurosci. Vol 16 (1993) p.359–365. Nombrado en OPTIZ, T.; GROOMS, S.; **et al.** Remodeling of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid Receptor Subunit Composition In Hippocampal Neurons After Global Ischemia. En: PNAS. Vol. 97 (2000) p. 13360–13365.

SOBOLEVSKY, A.; ROSCONI, M.; and GOUAUX, E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. En: Nature. Vol. 462 (2009) p. 9745-756.

SUN, Y.; OLSON, R.; **et al.** Mechanism of Glutamate Receptor Desensitization. En: Nature. Vol 417 (2002) p. 245–253. Nombrado en PEI, W.; RITZ, M.; **et al.** Receptor Occupancy and Channel-opening Kinetics. En: The Journal of Biological Chemistry. Vol. 282 (2007) p. 22731–22736.

TALAVERA, D.; and CASTRESANA, J.; Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. En: Systematic Biology. Vol. 56 (2007) p.564-577.

VERDOORN, T.; BURNASHEV, N.; **et al.** Structural Determinants Of Ion Flow Through Recombinant Glutamate Receptor Channels. En: Science. Vol. 252 (1991) p. 1715–1718. Nombrado en OPTIZ, T.; GROOMS, S.; **et al.** Remodeling of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor Subunit Composition In Hippocampal Neurons After Global Ischemia. En: PNAS. Vol. 97 (2000) p. 13360-13365.

WANG, H.; LI, K.; **et al.** A class frequency mixture model that adjusts for site-specific amino acid frequencies and improves inference of protein phylogeny. En: BMC Evolutionary Biology. Vol 8 (2008) p. 1-13.

WENTHOLDS, R.; TRUMPY, V.; **et al.** Biochemical and Assembly Properties of GluR6 and KA2, Two Members of the Kainate Receptor Family, Determined with Subunit-specific Antibodies En: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 269(1994) p. 1332-1339.

WERNER, P.; VOIGHT, M.; **et al.** Cloning Of A Putative High-Affinity Kainate Receptor Expressed Predominantly In Hippocampal CA3 Cells. En: Nature. Vol. 351 (1991) p. 742-744. Nombrado en WENTHOLDS, R.; TRUMPY, V.; **et al.** Biochemical and Assembly Properties of GluR6 and KA2, Two Members of the Kainate Receptor Family, Determined with Subunit-specific Antibodies En: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 269(1994) p. 1332-1339.

WYLLIE, D.; JOHNSTON, A.; *et al.* Single-channel analysis of a point mutation of a conserved serine residue in the S2 ligand-binding domain of the NR2A NMDA receptor subunit. En: *J Physiol.* Vol 574.2 (2006) p. 477–489.

ZUKIN, R.; and BENNETT, M.; Alternatively spliced isoforms of the NMDAR I receptor subunit. En: *Trends Neurosci.* Vol. 18 (1995) p. 306-313.

6. RECURSOS ELECTRÓNICOS

NCBI **[en línea]**. National Center for Biotechnology Information. También disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>> [Consulta: Enero de 2009].

Ensembl **[en línea]**. Base de datos. También disponible en: <<http://www.ensembl.org/index.html>> [Consulta: Enero de 2009].

Expasy **[en línea]**. **Expert Protein Analysis System**. También disponible en: <<http://www.expasy.ch/tools/>> [Consulta: Noviembre de 2009].

PROTTEST **[en línea]**. Selection of best-fit models of protein evolution. También disponible en: < http://darwin.uvigo.es/software/prottest_server.html> [Consulta: Junio de 2009].

PALM **[en línea]**. Phylogenetic Reconstruction by Automatic Likelihood Model Selector. También disponible en: < <http://palm.iis.sinica.edu.tw/index.html>> [Consulta: Noviembre de 2009].

PhyML 3.0 **[en línea]**. New Algorithms, Methods and Utilities. También disponible en: < <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>> [Consulta: Diciembre de 2009].

Phylogeny.fr **[en línea]**. Robust Phylogenetic Analysis for the Non-Specialist. También disponible en: < http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/index.cgi/> [Consulta: Diciembre de 2009].

PHYML A **[en línea]**. Simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. También disponible en: <<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=phyml>> [Consulta: Diciembre de 2009].