



SIMUN_{av}P: Software interactivo para el estudio de los canales de sodio asociados al dolor

Marleni Reyes Monreal, Arturo Reyes Lazalde,
María Eugenia Pérez Bonilla, Jessica Quintero Pérez
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (México)



Fecha de recepción: 07/Jul/2020

Fecha de aceptación: 11/Sept/2021

Resumen:

Resumen: Los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC, por sus siglas en inglés) juegan un papel importante en la generación de potenciales de acción en las neuronas. Se han reportado nueve tipos (Na_v 1.1 a Na_v 1.9). Los canales de Na^+ con corriente persistente (Na_vP) son importantes en la fisiología de las vías de señalización del dolor; sus mutaciones ocasionan dolor neuropático crónico, difícil de tratar. No existen simuladores de Na_vP con fines de enseñanza. Se presenta un programa de cómputo, interactivo, desarrollado en Visual Basic 6.0. Consta de un simulador para realizar experimentos virtuales con las técnicas de fijación de corriente, y cuatro simuladores en fijación de voltaje: (I) corriente de Na^+ (I_{Na}) con inactivación rápida, (II) corriente de Na^+ persistente (I_{NaP}) sin inactivación, (III) I_{NaP} con inactivación lenta, y (IV) I_{NaP} con inactivación parcial. Los modelos

matemáticos utilizados fueron resueltos numéricamente. Con los simuladores, el alumno experimenta con los diferentes tipos de canales de Na^+ , descubre su electrofisiología básica y compara sus propiedades. Conocerá la participación de I_{NaP} en la generación del dolor debido a una entrada de Na^+ persistente que incrementa el disparo repetitivo en las neuronas nociceptivas.

Palabras clave: Software educativo; simuladores; prácticas virtuales; material didáctico; canales de Na^+

Abstract: Voltage-gated sodium channels (VGSC) play an important role in the generation of action potentials in neurons. Nine types have been reported (Nav 1.1 a Nav 1.9). Na^+ channels with persistent current (NavP) are important in the physiology of pain signaling pathways; its mutations cause chronic neuropathic pain that is difficult to treat. There are no NavP simulators for teaching purposes. An interactive computer program developed in Visual Basic 6.0 is presented. It consists of a simulator to carry out virtual experiments with current clamp techniques, and four simulators with voltage clamp techniques: (I) Na^+ current, (I_{Na}) with rapid inactivation, (II) Persistent sodium current (I_{NaP}) without inactivation, (III) I_{NaP} with slow inactivation, and (IV) I_{NaP} with partial inactivation. The mathematical models used were solved numerically. With the simulators, the student experiments with the different types of Na^+ channels, discovers their basic electrophysiology and compares their properties. The student will learn about the participation of I_{NaP} in the generation of pain due to a persistent Na^+ input that increases repetitive firing in nociceptive neurons.

Keywords: Educational software; simulators; virtual practices; didactic material; Na^+ channels

Introducción

Los canales de sodio dependientes de voltaje están relacionados con la

generación y propagación del potencial de acción (PA) (Hodgkin & Huxley, 1952). Son fundamentales en la génesis de los patrones de disparo, como lenguaje propio de las neuronas. Sin embargo, existen canales de sodio que presentan una corriente persistente y juegan un papel importante en la señalización del dolor (Bennett et al., 2019). El dolor (mecanismo altamente conservado) es un síndrome que indica alguna situación anómala, que alerta, y generalmente obliga al paciente a acudir al médico. Sin embargo, el dolor crónico, producto de una sensibilidad alterada, no es adaptativo (Bennett et al., 2019) y es causa de dolor difícilmente tratable. La generación del dolor suele comprenderse como multifactorial y es modulado por factores demográficos, estilo de vida y comportamiento, y factores clínicos (Mills et al., 2019).

Mutaciones de canales de sodio dependiente de voltaje (VGSC) presentan, como consecuencia, una corriente de Na^+ de gran persistencia, causante del dolor crónico anómalo (Wood et al., 2004). De ahí la importancia de estudiar y comprender la electrofisiología de los canales de sodio persistentes (NavP).

Estructura de los canales de sodio y su localización

Los canales de sodio dependientes de voltaje forman una familia de nueve tipos diferentes (Nav 1.1 a Nav 1.9). Seis son sensibles a tetrodo toxina (TTX): Nav 1.1, Nav 1.2, Nav 1.3, Nav 1.4, Nav 1.6, y Nav 1.7. Tres insensibles a TTX: Nav 1.5, Nav 1.8 y Nav 1.9 (Ma et al., 2019). Su estructura molecular presenta cuatro subunidades α (260 KDa) que forman el poro. Cada subunidad α tiene seis segmentos transmembranales (Catterall et al., 2005; Noda et al., 1984). Estas subunidades se asocian a subunidades auxiliares β (36 KDa) ($\beta 1$ a $\beta 4$) (Catterall et al., 2000).

En el sistema nervioso central se localizan principalmente Nav 1.1, Nav 1.2, y Nav 1.3, codificados por los genes SCN1A, SCN2A, y SCN3A, respectivamente. En el sistema nervioso periférico y en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) se localizan: Nav 1.7, Nav 1.8, y Nav 1.9, codificados por los genes SCN9A, SCN10A, y SCN11A, respectivamente. Los canales Nav 1.4 se localizan en el músculo esquelético, es codificado por SCN4A y los Nav 1.5 en el músculo cardíaco, codificado por SCN5A. Los Nav 1.6 son ubicuos y son codificados por SCN8A (Nau & Leipold, 2017) (Tabla 1).

TABLA 1. CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE (Nav)				
GEN	CANAL	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN	REFERENCIAS
SCN1A	Nav 1.1	SNC	Inicia los PA y los transmite. Mutaciones asociadas a dolor. Migraña hemipléjica familiar	(Barbieri et al., 2019; Cestèle et al., 2008)
SCN2A	Nav 1.2	SNC	Inicia los PA y los transmite	(Rush et al., 2005)
SCN3A	Nav 1.3	SNC Neuronas simpáticas. Expresión en SNC durante el desarrollo. Se expresa nuevamente en neuronas sensoriales dañadas	Inicia los PA y los transmite. Disparo ectópico en una lesión nerviosa. Dolor neuropático y fenómenos de dolor en miembro fantasma	(Kiss, 2008; Ma et al., 2019)
SCN4A	Nav 1.4	Músculo esquelético	Localizado en músculo esquelético Parálisis periódica	(Simkin & Bendahhou, 2011)
SCN5A	Nav 1.5*	Músculo cardíaco	Se le encuentra en músculo cardíaco Síndrome QT largo	(DeMarco & Clancy, 2016)
SCN8A	Nav 1.6	Ubicuo. Inicio del axón y nodos de Ranvier	Cambia patrones de disparo del PA. Ataxia en ratón. Su mutación produce neuralgia del trigémino.	(Dib-Hajj et al., 2017)
SCN9A	Nav 1.7	SNP, GRD	Mutación puntual produce síndrome de dolor crónico (autosómico dominante)	(Cummins et al., 2007)
SCN10A	Nav 1.8*	GRD	Disparos repetitivos, asociado a dolor. Neuropatía periférica dolorosa	(Sluka & Clauw, 2016; Wood et al., 2004)
SCN11A	Nav 1.9*	GRD	Produce corriente de Na ⁺ persistente en neuronas pequeñas del GRD	(Östman et al., 2008; Zhou et al., 2017)

*canales insensibles a TTX

Canales de Na⁺ persistentes y su papel en la generación de dolor

Los canales Nav 1.1, Nav 1.6, Nav 1.7, Nav 1.8 y Nav 1.9 están involucrados en la excitabilidad de las neuronas sensoriales asociadas con la sensación del dolor (Bennett et al., 2019). La función y la expresión de estos canales son regulados

en lesiones axonales o inflamación periférica (Cummins et al., 2007). Los canales Nav 1.1 están relacionados con la generación y propagación del PA (Hodgkin & Huxley, 1952). La mutación de este canal produce epilepsia (Marini & Mantegazza, 2010). Se ha reportado una mutación T1174S del canal Nav 1.1 en tres generaciones de una familia con migraña hemipléjica familiar (Cestèle et al., 2013). La mutación del canal Nav 1.6 produce neuralgia trigeminal idiopática, dolor a lo largo del nervio trigémino que no está asociado a otras comorbilidades (Tanaka et al., 2016). Los canales Nav 1.7 mutados ocasionan síndrome de dolor hereditario. Por ejemplo, trastorno paroxístico de dolor extremo y la eritromelalgia hereditaria (Theile & Cummins, 2011). Cuando el canal se expresa incompleto, los individuos son incapaces de experimentar dolor (Cox et al., 2006). El canal Nav 1.8 está relacionado con dolor producto de una lesión nerviosa (dolor neuropático crónico) y con dolor inflamatorio crónico (Coward et al., 2001; Joshi et al., 2006). El canal Nav 1.9 contribuye a la fisiología de las neuronas de diámetro pequeño del ganglio dorsal y es capaz de generar disparo repetitivo en fibras nerviosas nociceptivas durante la inflamación. En ratones knock-out del canal, la corriente persistente de sodio desaparece en estas neuronas (Östman et al., 2008).

Los canales Nav 1.3, normalmente presentes en el desarrollo en neuronas del GRD, disminuyen en la edad adulta. Se ha observado que en una lesión de médula espinal se expresan nuevamente. En estas condiciones, se amplifica la señal (hiperexcitabilidad) en las neuronas de la raíz dorsal y el tálamo y se presenta un dolor amplificado e incluso dolor en extremidad fantasma (Waxman & Hains, 2006).

Actualmente, los canales de Na⁺ de corriente persistente (NavP), son blanco para el desarrollo de nuevos medicamentos para tratar el dolor neuropático

crónico (Coward et al., 2001; Joshi et al., 2006).

Electrofisiología de NavP

Los canales de Na⁺ persistentes (NavP) presentan pequeñas diferencias electrofisiológicas entre ellos. En estudios de fijación de voltaje, la corriente de Na⁺ se caracteriza por una activación rápida (con duración de microsegundos). El voltaje de activación depende del canal, por ejemplo, Nav 1.9 se activa a potenciales muy negativos (~ -100 mV) y se le considera un canal umbral. En cambio Nav 1.8 se activa a potenciales más despolarizados (~ -70 mV) (Han et al., 2015). Los canales Nav 1.1 responsables de los PA, se activan (~ -45 mV). Después de la activación se presenta una inactivación muy rápida para los canales Nav 1.1 y deja de pasar Na⁺ (Marini & Mantegazza, 2010). En NavP, la inactivación es lenta (puede ser muy lenta dependiendo del canal) y finalmente queda una corriente de Na⁺ persistente (Rush et al., 2005). En fijación de corriente, el efecto general de NavP es un aumento en el número de PA y en la frecuencia de disparo (Han et al., 2015).

Planteamiento de problema

La importancia del dolor a nivel clínico ha motivado la apertura de áreas específicas para su tratamiento. En investigación, los canales de sodio persistentes son estudiados por múltiples disciplinas. La complejidad de los mecanismos del dolor requiere de diversos especialistas (electrofisiólogos, médicos, fisioterapeutas, físicos, matemáticos, biólogos, etc.). Por ejemplo, en farmacología para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del dolor. No se ha reportado un software educativo para la enseñanza del tema.

Objetivo principal

Desarrollar un software interactivo con simuladores para la enseñanza-aprendizaje de los canales de Na^+ , con énfasis en las corrientes de sodio persistentes.

Objetivos de enseñanza

Los simuladores permiten comprender la electrofisiología básica de las corrientes de Na^+ en neuronas, mediante la implementación de experimentos virtuales con las técnicas de fijación de voltaje y fijación de corriente.

Objetivos de aprendizaje

Los alumnos aprenderán a realizar experimentos virtuales para determinar las propiedades electrofisiológicas de los canales de Na^+ . Realizarán curvas corriente contra voltaje, determinarán el potencial de activación del canal, determinarán el voltaje en que se alcanza la máxima corriente, el potencial de inversión y la corriente de Na^+ persistente. Entenderán cómo los canales de Na_vP incrementan la frecuencia del disparo de PA a partir de los experimentos. Los alumnos aprenderán que los canales de Na^+ producen corrientes de Na^+ entrantes, con una fase de activación y una de inactivación. Comprenderán que los canales de Na^+ con inactivación rápida están involucrados en la generación de potenciales de acción. Distinguirán que existen canales de Na^+ con una inactivación lenta y estos canales se localizan y forman parte de los sistemas nociceptivos implicados en el dolor. Entenderán que existen canales de Na^+ que presentan, además de una inactivación lenta, una corriente de Na^+ persistente, relacionada con el dolor y en algunos casos asociada a mutaciones del canal que

conducen al dolor neuropático crónico anómalo y/o dolor inflamatorio.

Material y método

Se diseñó y desarrolló un programa computacional interactivo para el estudio electrofisiológico de las corrientes de Na⁺ persistentes, relacionadas con las vías nociceptivas y el dolor crónico neuropático e inflamatorio, generado por mutaciones del canal iónico. El software consta de cinco simuladores agrupados en dos módulos: (1) módulo para el estudio del efecto de la corriente de Na⁺ rápida y persistente en el tren de potenciales de acción, (2) módulo para el estudio de la corriente de Na⁺ rápida y persistente con técnica de fijación de voltaje.

Simulador generador de PA

Este simulador está basado en el formalismo de Hodgkin y Huxley (1952), donde la corriente total es determinada por la ecuación 1.

$$-C_m \frac{dV}{dt} = I_K + I_{Na(rápida)} + I_L + I_{NaP} \quad (1)$$

Donde: C_m es la capacitancia de membrana, V es el voltaje de membrana, I_K es la corriente de K⁺, I_{Na(rápida)} es la corriente de Na⁺, I_L es la corriente de fuga, y I_{NaP} es la corriente de Na⁺ persistente. Las ecuaciones utilizadas para determinar las corrientes de Na⁺, K⁺, y de fuga son las propuestas por Hodgkin y Huxley (1952) (Hodgkin & Huxley, 1952; Johnston & Wu, 1995; Reyes-Lazalde et al., 2016).

Simuladores para las corrientes de Na⁺

El módulo para el estudio de la corriente de Na^+ con la técnica de fijación de voltaje, está formado por cuatro simuladores. Estos simuladores están basados en la adecuación de cuatro modelos matemáticos (Delord et al., 1997; Hodgkin & Huxley, 1952; Rybak et al., 2003; Shirahata, 2014) (Ecuación 2).

$$I_{NaP} = \bar{g}_{NaP(\max)} \cdot m_{NaP}^3 \cdot h_{NaP} \cdot (V - E_{NaP}) \quad (2)$$

Donde I_{NaP} es la corriente de Na^+ persistente, $\bar{g}_{NaP(\max)}$ es la conductancia máxima de Na^+ persistente, m_{NaP} es la compuerta de activación, h_{NaP} es la compuerta de inactivación, V es el voltaje de membrana, E_{NaP} es el potencial de inversión para la corriente de Na^+ persistente.

Para poder comparar y observar las diferencias entre al corriente de Na^+ rápida y persistente, los parámetros se adecuaron para tener cinco simuladores: (I) Simulador de corriente de Na^+ rápida con parámetros formulados por Hodgkin y Huxley (Hodgkin & Huxley, 1952): $g_{Na} = 36 \text{ mS/cm}^2$, $E_{Na} = 50 \text{ mV}$, las ecuaciones diferenciales para su solución pueden verse en (Ermentrout & Terman, 2010), (II) Simulador de corriente de Na^+ sin inactivación, donde se consideró el trabajo de French et al., en neuronas de hipocampo de mamífero y de Zhou et al., en $\text{Nav} 1.9$ (French et al., 1990; Zhou et al., 2017), (III) Simulador con inactivación lenta, en este simulador se consideraron dos constantes de tiempo para la inactivación (Cestèle et al., 2008), y (IV) Simulador con inactivación parcial; en este caso, la solución de la ecuación se partió en un segmento con activación rápida y un segmento con inactivación lenta que nunca inactiva completamente. Se utilizó un algoritmo computacional para conjuntar los segmentos y evitar la inactivación total y reproducir resultados de Nau y Leipold para $\text{Nav} 1.7$, $\text{Nav} 1.8$, $\text{Nav} 1.9$ y de Han et al., para $\text{Nav} 1.8$ (Han et al., 2015; Nau & Leipold, 2017).

La solución general utilizada para la conductancia de Na^+ (g_{Na}) (Ecuación 3) es (Johnston & Wu, 1995):

$$g_{\text{Na}} = \bar{g}_{\text{Na}(\text{max})} m^3 h \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right)\right)^3 \exp\left(-\frac{t}{\tau_h}\right) \quad (3)$$

Donde: g_{Na} es la conductancia de Na^+ , $g_{\text{Na}(\text{max})}$ es la conductancia máxima de Na^+ , m es la compuerta de activación, h es la compuerta de inactivación, τ_m es la constante de tiempo para la activación y τ_h es la constante de tiempo para la inactivación, m es la compuerta de activación y h es la compuerta de inactivación.

Los modelos matemáticos utilizados se implementaron en Visual Basic 6.0 y fueron resueltos numéricamente.

Resultados

Se desarrolló un programa de cómputo interactivo que permite realizar experimentos virtuales para el estudio de los canales de Na^+ en neuronas relacionadas con vías nociceptivas. Se incursionó principalmente en los canales de Na^+ persistentes. Al iniciarse el programa se abre una interfaz con el menú principal donde se observan cinco botones que llevan a los simuladores correspondientes: (1) tren de potenciales de acción, (2) I_{Na} rápida, (3) I_{NaP} sin inactivación, (4) I_{NaP} con inactivación lenta, y (5) I_{NaP} con inactivación parcial (Figura 1).

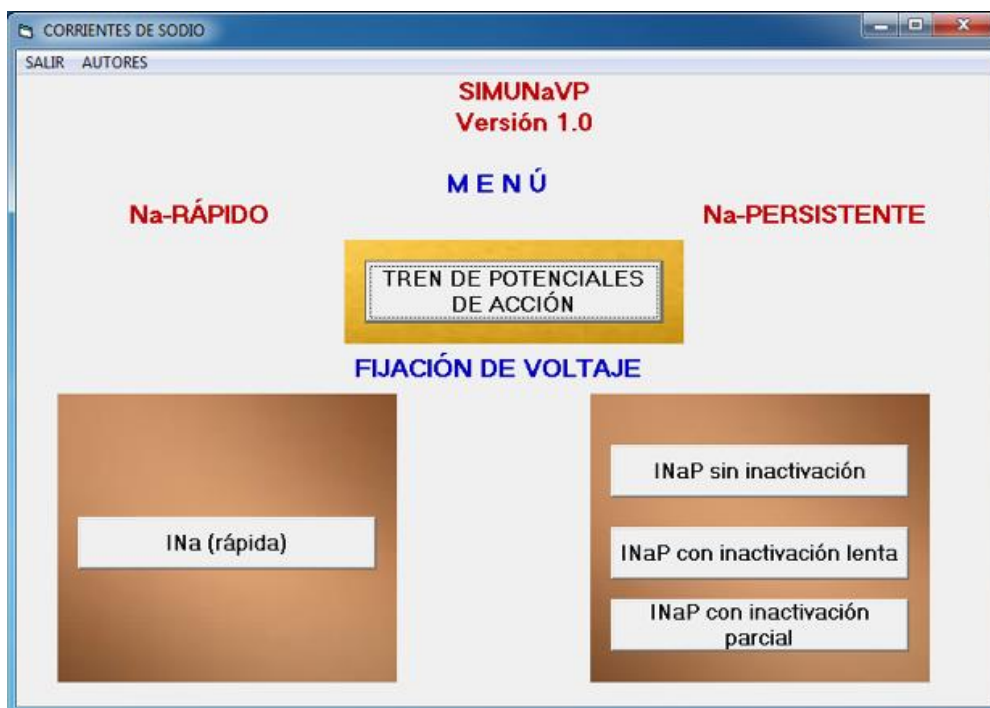


Figura 1. Menú principal del programa SIMUNaVP, versión 1.0.

Simulador del tren de potenciales de acción

Dentro de las hipótesis para explicar el dolor crónico neuropático anormal está la presencia de canales de Na^+ con una corriente persistente debida a una canalopatía (Dib-Hajj et al., 2017; Nau & Leipold, 2017). Varios de los canales Na_vP se abren a potenciales negativos: ~ -70 mV (potenciales umbrales). La persistencia de la corriente entrante de Na^+ a la neurona, ocasiona un incremento en la frecuencia de disparo de PA. Las neuronas nociceptivas, en consecuencia, son hiperexcitables ocasionando el dolor crónico persistente. Canales como Na_v 1.8 y Na_v 1.9 además son resistentes a tetrodotoxina (TTX) y el tratamiento farmacológico puede ser difícil (Rice & Hill, 2006).

Con este simulador el usuario puede observar el efecto que tiene la presencia de canales de Na^+ persistente en el tren de PA en la neurona. En la interfaz de

usuario (Figura 2), del lado derecho, se muestran tres módulos: (1) entrada de datos para el estímulo de corriente, (2) la entrada de datos de la neurona (g_{NaP} , conductancia máxima para el canal, y tres constantes de tiempo: τ_p , τ_h , τ_s (constante de tiempo del proceso de activación, constante de tiempo de inactivación inicial y constante de tiempo de inactivación retardada, respectivamente), y (3) módulo para navegar en el programa. Del lado izquierdo, se encuentran dos osciloscopios: el superior despliega los trazos de los PA, y el inferior, el pulso de corriente. Cuando se abre la interfaz del simulador aparecen datos iniciales para el pulso de estímulo (300 ms y 8 nA, de duración y amplitud, respectivamente). La conductancia g_{NaP} se encuentra en cero (equivale a una neurona sin canales Na_vP). En estas condiciones, la simulación muestra el tren de PA producto de canales de Na^+ rápido y K^+ dependientes de voltaje y una corriente de fuga (Hodgkin & Huxley, 1952) (Figura 2, trazo en negro). La presencia de canales de Na^+ persistentes implica un incremento en la frecuencia de disparo. Al ingresarse $g_{NaP} = 1 \text{ mS/cm}^2$, y se ejecuta la simulación (con $\tau_p = 1 \text{ ms}$, $\tau_h = 50 \text{ ms}$, $\tau_s = 400 \text{ ms}$), se presenta una corriente de Na^+ persistente y aumenta la frecuencia de PA (Figura 2, trazo en rojo), resultado que concuerda con lo reportado en neuronas del ganglio de la raíz dorsal con $Na_v 1.8$ humano (Han et al., 2015).

El usuario puede modificar los valores de entrada y adecuar la I_{NaP} según sus datos experimentales y probar el efecto en el tren de PA. Una corriente de Na^+ persistente de gran duración ($>400 \text{ ms}$) incrementa más la frecuencia de disparo de PA. Un valor específico de g_{NaP} corresponden a un canal Na_vP particular. Se han reportado valores de 17 nS/cm^2 (French et al., 1990) a 125 nS/cm^2 (Han et al., 2015). En el simulador, un incremento en g_{NaP} equivale a un mayor número de canales de Na_vP presentes en la neurona.

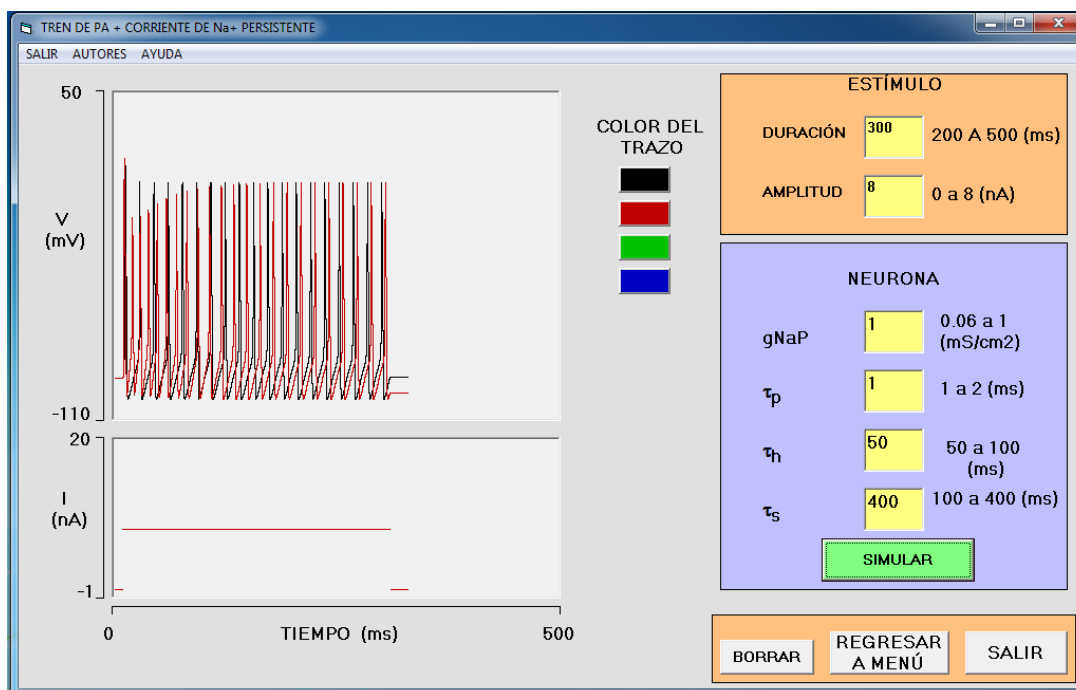


Figura 2. Interfaz del simulador de tren de PA. El trazo en negro corresponde al tren de PA en neurona tipo Hodgkin y Huxley. En presencia de Na_vP la frecuencia de disparo aumenta (trazo en rojo).

Simuladores de las corrientes de Na^+ en fijación de voltaje

I. Simulador de I_{Na} con inactivación rápida

La generación de PA en neuronas se debe a la presencia de canales de Na^+ de inactivación rápida. En el programa se puede acceder a la interfaz que permite reproducir experimentos con este tipo de canales. La Figura 3, muestra los trazos de la corriente macroscópica de Na^+ simulada. El experimento inicia con un pulso de voltaje con una duración de 30 ms y se estimula consecutivamente con amplitudes de voltajes desde -60 mV a +40 mV, con pasos de 10 mV. En el osciloscopio superior, se muestran los trazos de las corrientes en respuesta a los estímulos; son corrientes con una activación e inactivación rápida. El

osciloscopio inferior muestra la relación corriente –vs- voltaje (curva I-V) (Figura 3).

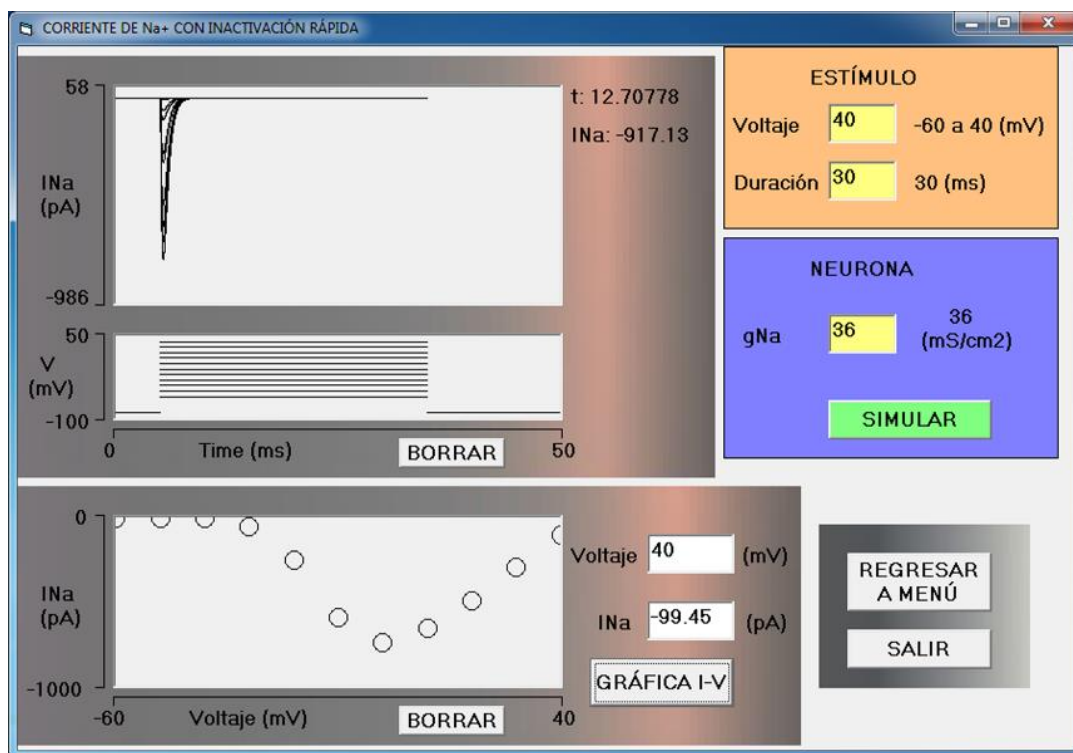


Figura 3. Interfaz del simulador para I_{Na} con inactivación rápida. La conductancia del canal es de 36 mS/cm^2 (Hodgkin & Huxley, 1952). En el osciloscopio superior se observa la corriente de Na^+ . La curva I-V muestra como la corriente de Na^+ se inicia a -30 mV y tiene un máximo a los 0 mV , para disminuir en potenciales positivos.

II. Simulador I_{Na} persistente sin inactivación

Existen canales de Na^+ que no inactivan, se han encontrado en amibas, algas y anfibios (Schlichter, 1989). Los canales de Na^+ de inactivación rápida dan origen a potenciales de acción de corta duración (2-3 ms); en cambio, los Na_v que no inactivan producen PA de ultra larga duración (segundos a minutos); aún no queda clara su función (Cang et al., 2014). En el programa se agregó un simulador de estas corrientes de Na^+ para que el alumno conozca su cinética.

La Figura 4, muestra simulaciones en fijación de voltaje. Se estimuló con un pulso de 50 ms de duración y con amplitudes de -80 mV a +40 mV, con pasos de 10 mV. En el osciloscopio superior se muestra cómo la I_{Na} se activa rápidamente; sin embargo nunca se inactiva (simulación a 50 ms). Su efecto en el PA de anfibios precisa de otro programa para abordarlo particularmente.

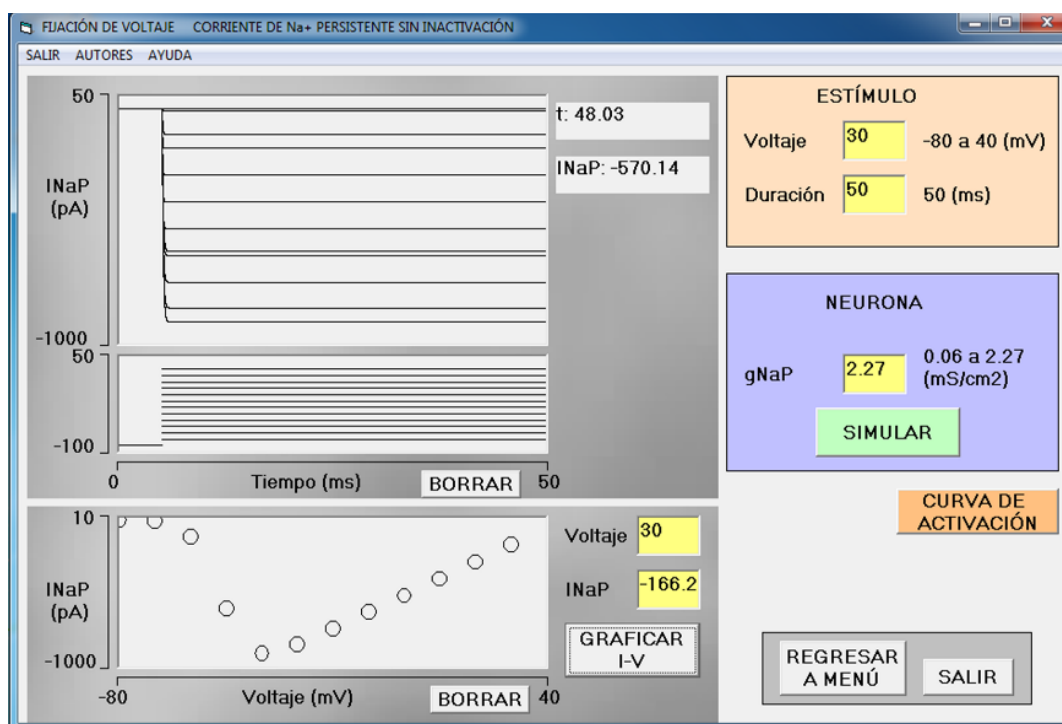


Figura 4. Simulador de I_{Na} que no inactiva. Se realizaron una serie de simulaciones para construir la curva I-V. Se estimuló con amplitudes desde -80 mV a +40 mV con pasos de 10 mV. Su activación se inicia a potenciales más negativos (~ -60 mV), su máximo se encuentra en -40 mV. Las corrientes registradas no muestran inactivación.

III. Simulador de I_{Na} persistente con inactivación lenta

En las neuronas del sistema nervioso somatosensorial; por ejemplo en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD), se localizan canales de Na^+ persistentes: Nav 1.1, Nav 1.6, Nav 1.7, Nav 1.8 y Nav 1.9. Su función está relacionada con

la señalización del dolor (Bennett et al., 2019; Wood et al., 2004). Electrofisiológicamente, la cinética de la corriente de Na^+ de estos canales, se caracteriza por una activación rápida y una inactivación lenta que mantiene la corriente persistente por decenas de ms hasta que finalmente inactiva. La Figura 5, muestra el simulador para este tipo de corriente de Na^+ . En el osciloscopio superior, se muestran los trazos de la corriente de varias simulaciones modificando la amplitud del pulso de voltaje (-60 mV a +60 mV, con pasos de 10 mV). Se observa cómo la corriente de Na^+ persiste por más de 10 ms y esto la diferencia de la corriente de Na^+ con inactivación rápida (comparar con los registros de la corriente de Na^+ en la Figura 2). En la curva I-V (osciloscopio inferior), se observa una activación a los -40 mV y una amplitud máxima a los -20 mV. El simulador cuenta con tres constantes de tiempo (τ_m , τ_h , y τ_s) que el usuario puede modificar para reproducir alguna corriente de Na^+ experimental en particular.

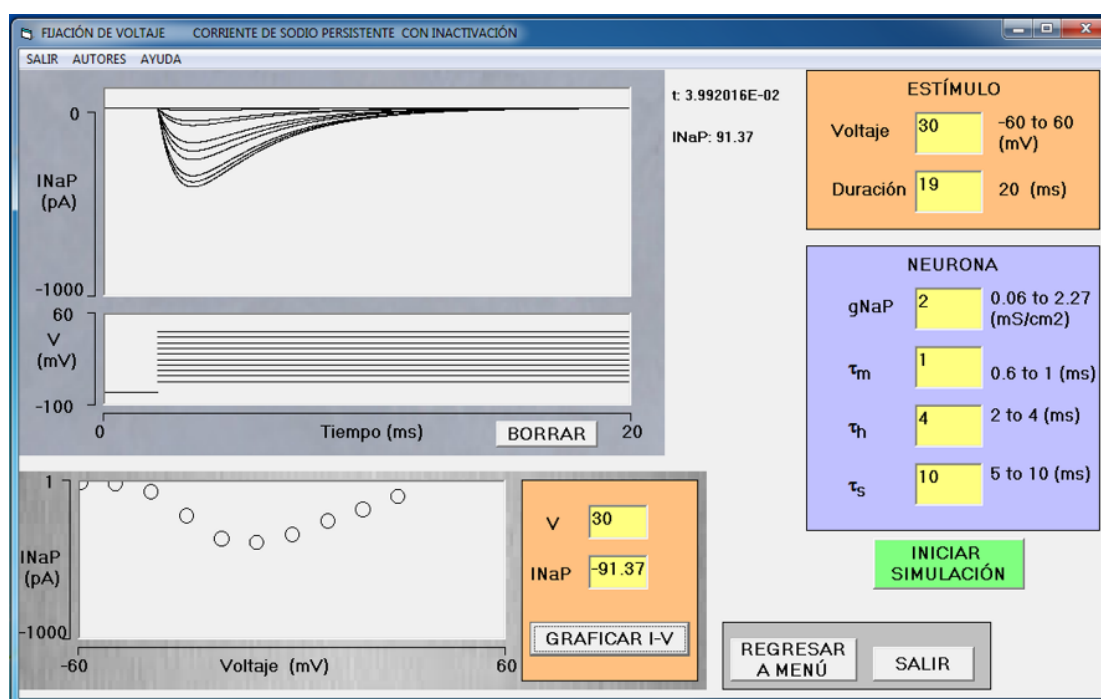


Figura 5. Simulador de I_{NaP} con inactivación lenta. Se presenta una serie de simulaciones para determinar la curva I-V. Se observa que la corriente inactiva lentamente (osciloscopio

superior). Esta cinética en la corriente se observa en neuronas relacionadas con las vías del dolor.

IV Simulador de I_{Na} persistente con inactivación parcial

Mutaciones en los canales Nav 1.7, Nav 1.8 y Nav 1.9 se han asociado a síndromes de dolor crónico severo (ver Tabla 1) (Cummins et al., 2007). Estas mutaciones inducen cambios en las propiedades electrofisiológicas del canal: cambios en la dependencia del voltaje de activación (desplazándolo a potenciales más negativos), velocidad lenta de deactivación, y altera la inactivación rápida y lenta (Dib-Hajj et al., 2005). En neuronas humanas del GRD, los canales Nav 1.8 juegan un papel importante en la excitabilidad de la neurona debida a una corriente de Na^+ persistente (I_{NaP}). Este tipo de I_{NaP} es bien conocida en condiciones de neuropatías dolorosas (Wood et al., 2004). La Figura 6, muestra la interfaz del simulador para el estudio de I_{NaP} en neuronas del GRD con canales Nav 1.9. Aquí se muestran varias simulaciones para generar la curva I-V. Se observa una activación a potenciales muy negativos (~ -60 mV). Esto ocasiona una amplificación de estímulos subumbrales que conducen a disparos repetitivos de PA (Figura 2). Las I_{NaP} registradas muestran una inactivación lenta e inconclusa; esta cinética propicia una corriente persistente de Na^+ , asociada con mecanismos del dolor y observada en las vías de señalización del dolor. Estos resultados son semejante a los reportados (Zhou et al., 2017). Las mutaciones de los canales de NavP generan este tipo de cinética y provocan dolor crónico e inflamatorio (Han et al., 2015; Zhou et al., 2017).

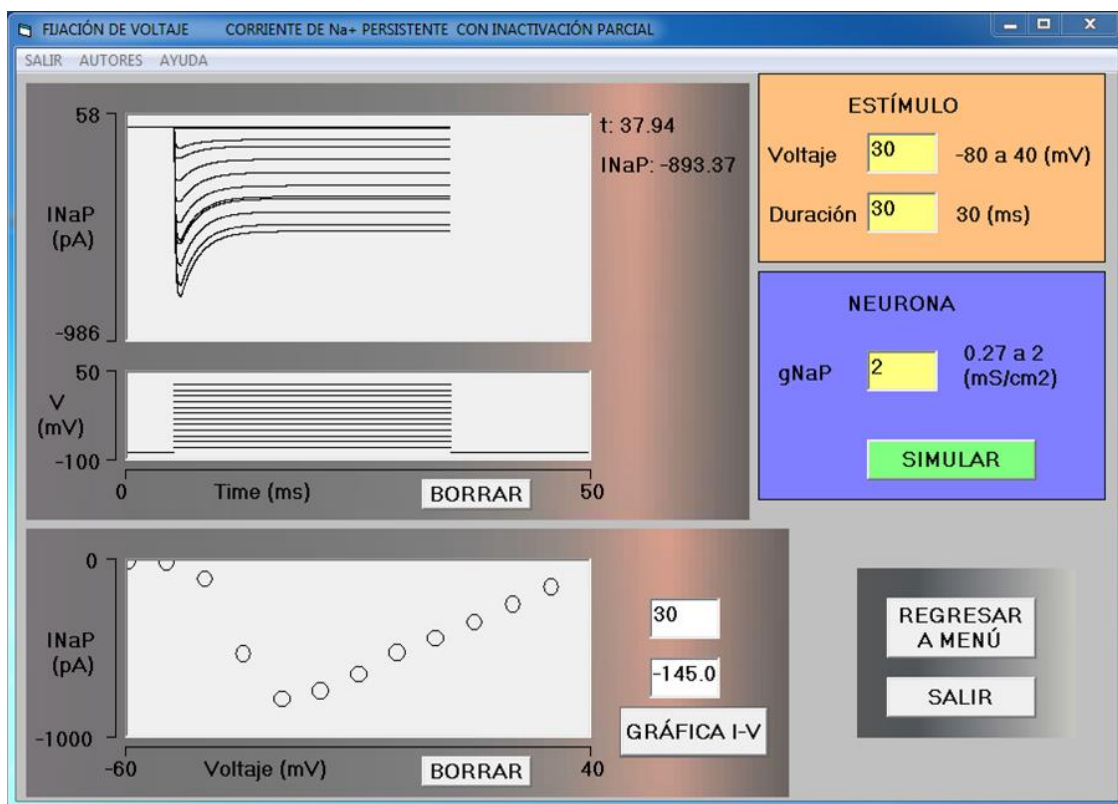


Figura 6. Interfaz del simulador de I_{NaP} con inactivación lenta e incompleta. Se muestran las simulaciones de un experimento virtual en fijación de voltaje. Se estimuló con un pulso de 30 ms de duración y la amplitud del voltaje se modificó consecutivamente desde -80 mV a +40 mV, con pasos de 10 mV. En el osciloscopio superior, se muestran las I_{NaP} generadas. Se observa una inactivación lenta e inconclusa. La entrada de Na^+ a la neurona de manera continua se asocia a los mecanismos de dolor.

Discusión

No se han reportado simuladores de I_{NaP} con fines de enseñanza. En este trabajo se diseñó y desarrolló un programa de cómputo interactivo que permite la enseñanza-aprendizaje de la electrofisiología básica de los canales de Na^+ con énfasis en los canales relacionados con las vías de señalización del dolor y con el dolor crónico neuropático ocasionado por sus mutaciones. Las limitaciones de los simuladores, consisten en que en esta versión, no se puede realizar el

protocolo de prepulsos para determinar el tiempo de inactivación. Sin embargo, se puede apreciar una inactivación lenta e incluso parcial en la cinética de la corriente de Na^+ .

Tradicionalmente a nivel de licenciatura, los cursos se imparten de manera teórico- práctica. En el área biomédica, las prácticas de laboratorio son costosas (animales de experimentación, reactivos, equipo especializado, etc.), por esta razón, su implementación es restringida (Diwakar et al., 2014). Una alternativa viable son los simuladores, cuya eficacia en el aprendizaje de los alumnos se ha comprobado con un efecto facilitador del aprendizaje (Reyes-Lazalde et al., 2016; Bish & Schleidt, 2008; Diwakar et al., 2014).

El acceso al software depende de la gestión institucional correspondiente. El protocolo para seguir prevalentemente es: desarrollo y validación del software, trámite de derecho de autor, prueba piloto con un grupo de alumnos, retroalimentación y corrección del software, implementación formal para enseñanza-aprendizaje en el aula. Una vez que se cumplen todos los requisitos el software es de libre acceso a nivel institucional.

Conclusión

Los simuladores que integran el programa de cómputo interactivo SIMUNavP, permiten realizar una serie de experimentos virtuales para determinar las propiedades electrofisiológicas de los canales de Na^+ , y observar la diferencia entre los canales de Na^+ de inactivación rápida que generan los PA y los canales de Na^+ de inactivación lenta y persistente relacionados con el dolor crónico neuropático de difícil tratamiento. Con los experimentos se confirma la hipótesis que I_{NaP} produce un incremento en la frecuencia de PA, mecanismo

propuesto como generador del dolor crónico neuropático cuando están presentes mutaciones en el canal NavP. Este programa de cómputo debe considerarse como un material didáctico de apoyo y no sustituye al profesor.

Referencias

Barbieri, R., Bertelli, S., Pusch, M., & Gavazzo, P. (2019). "Late sodium current blocker GS967 inhibits persistent currents induced by familial hemiplegic migraine type 3 mutations of the SCN1A gene". *Journal of Headache and Pain*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-1056-2>

Bennett, D. L., Clark, X. A. J., Huang, J., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2019). "The role of voltage-gated sodium channels in pain signaling". *Physiological Reviews*, 99(2), 1079–1151. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2017>

Bish J. P., & Schleidt S. (2008) Effective use of computer simulations in an introductory neuroscience laboratory. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*, 6(2):64–7. [PMC3592658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19352658/)

Cang, C., Aranda, K., & Ren, D. (2014). "A non-inactivating high-voltage-activated two-pore Na⁺ channel that supports ultra-long action potentials and membrane bistability". *Nature Communications*, 5, 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms6015>

Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2005). "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels". *Pharmacological Reviews*, 57(4), 397–409.

<https://doi.org/10.1124/pr.57.4.6>.

Cestèle, S., Labate, A., Rusconi, R., Tarantino, P., Mumoli, L., Franceschetti, S., Annesi, G., Mantegazza, M., & Gambardella, A. (2013). "Divergent effects of the T1174S SCN1A mutation associated with seizures and hemiplegic migraine". *Epilepsia*, 54(5), 927–935. <https://doi.org/10.1111/epi.12123>

Cestèle, S., Scalmani, P., Rusconi, R., Terragni, B., Franceschetti, S., & Mantegazza, M. (2008). "Self-limited hyperexcitability: Functional effect of a familial hemiplegic migraine mutation of the Nav1.1 (SCN1A) Na⁺ channel". *Journal of Neuroscience*, 28(29), 7273–7283. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4453-07.2008>

Coward, K., Jowett, A., Plumpton, C., Powell, A., Birch, R., Tate, S., Bountra, C., & Anand, P. (2001). "Sodium channel β 1 and β 2 subunits parallel SNS/PN3 α -subunit changes in injured human sensory neurons". *NeuroReport*, 12(3), 483–488. <https://doi.org/10.1097/00001756-200103050-00012>

Cox, J. J., Reimann, F., Nicholas, A. K., Thornton, G., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., & Mannan, J. (2006). "Europe PMC Funders Group An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain". *Nature*, 444(7121), 894–898. <https://doi.org/10.1038/nature05413>.An

Cummins, T. R., Sheets, P. L., & Waxman, S. G. (2007). "The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of pain". *Pain*, 13(3), 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.07.026>

Delord, B., Klaassen, A. J., Burnod, Y., Costalat, R., & Guigon, E. (1997).

"Bistable behaviour in a neocortical neurone model". *NeuroReport*, 8(4), 1019–1023. <https://doi.org/10.1097/00001756-199703030-00040>

DeMarco, K. R., & Clancy, C. E. (2016). "Cardiac Na⁺ Channels: Structure to Function". *Current Topics in Membranes*, 78, 287–311. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2016.05.001>

Dib-Hajj, S. D., R.Geha, & Waxman, S. G. (2017). "Sodium channels in pain disorders: Pathophysiology and prospects for treatment". *Pain*, 158(4), S97–S107. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000854>

Dib-Hajj, S. D., Rush, A. M., Cummins, T. R., Hisama, F. M., Novella, S., Tyrrell, L., Marshall, L., & Waxman, S. G. (2005). "Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelalgia induces bursting of sensory neurons". *Brain*, 128(8), 1847–1854. <https://doi.org/10.1093/brain/awh514>

Diwakar S, Parasuram H, Medini C, Raman R, Nedungadi P, Wiertelak E, et al. (2014). Complementing neurophysiology education for developing countries via cost-effective virtual labs: Case studies and classroom scenarios. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*, 12(2):130–9.

Ermentrout, G. B., & Terman, D. H. (2010). *Mathematical Foundations of Neuroscience*. New York, Springer.

French, C. R., Sah, P., Bucketr, K. J., & Gage, P. W. (1990). "A Voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons". *Journal of General Physiology*, 95(6), 1139–1157. <https://doi.org/10.1085/jgp.95.6.1139>

Han, C., Estacion, M., Huang, J., Vasylyev, D., Zhao, P., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2015). "Human Nav1.8: Enhanced persistent and ramp currents contribute to distinct firing properties of human DRG neurons". *Journal of Neurophysiology*, 113(9), 3172–3185. <https://doi.org/10.1152/jn.00113.2015>

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

Johnston, D., & Wu, S. M.-S. (1995). *Foundations of Cellular Neurophysiology*. In Cambridge, The MIT Press. MIT Press. <https://doi.org/10.1086/419625>

Joshi, S. K., Mikusa, J. P., Hernandez, G., Baker, S., Shieh, C. C., Neelands, T., Zhang, X. F., Niforatos, W., Kage, K., Han, P., Krafte, D., Faltynek, C., Sullivan, J. P., Jarvis, M. F., & Honore, P. (2006). "Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states". *Pain*, 123(1–2), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.02.011>

Kiss, T. (2008). "Persistent Na-channels: Origin and function: A review János Salánki memory lecture". *Acta Biologica Hungarica*, 59(SUPPL.), 1–12. <https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.Suppl.1>

Ma, R. S. Y., Kayani, K., Whyte-Oshodi, D., Whyte-Oshodi, A., Nachiappan, N., Gnanarajah, S., & Mohammed, R. (2019). "Voltage gated sodium channels as therapeutic targets for chronic pain". *Journal of Pain Research*, 12, 2709–2722.

<https://doi.org/10.2147/JPR.S207610>

Marini, C., & Mantegazza, M. (2010). "Na⁺ channelopathies and epilepsy: Recent advances and new perspectives". *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 3(3), 371–384. <https://doi.org/10.1586/ecp.10.20>

Mills, S. E. E., Nicolson, K. P., & Smith, B. H. (2019). "Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies". *British Journal of Anaesthesia*, 123(2), e273–e283.

<https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>

Nau, C., & Leipold, E. (2017). "Voltage-gated sodium channels and pain". *Neuroforum*, 23(3), 123–130. <https://doi.org/10.1515/nf-2017-A017>

Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M. A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T., & Numa, S. (1984). "Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence". *Nature*, 312(5990), 121–127. <https://doi.org/10.1038/312121a0>

Östman, J. A. R., Nassar, M. A., Wood, J. N., & Baker, M. D. (2008). "GTP up-regulated persistent Na⁺ current and enhanced nociceptor excitability require Nav1.9". *Journal of Physiology*, 586(4), 1077–1087.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.147942>

Reyes-Lazalde, A., Reyes-Monreal, M., & Pérez-Bonilla, M. E. (2016). "Developing a simulation program for classic and updated Hodgkin and

Huxley's voltage clamp experiments". *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 37(2), 135-148.

<https://doi.org/10.17488/RMIB.37.2.1>

Rice, A. S. C., & Hill, R. G. (2006). "New treatments for neuropathic pain". *Annual Review of Medicine*, 57, 535–551.

<https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131324>

Rush, A. M., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2005). "Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Nav1.2 and Nav1.6, expressed in mouse spinal sensory neurones". *Journal of Physiology*, 564(3), 803–815.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.083089>

Rybak, I. A., Ptak, K., Shevtsova, N. A., & McCrimmon, D. R. (2003). "Sodium currents in neurons from the rostroventrolateral medulla of the rat". *Journal of Neurophysiology*, 90(3), 1635–1642. <https://doi.org/10.1152/jn.00150.2003>

Schlichter, yanne C. (1989). "Ionic currents underlying the action potential of *Rana pipiens* oocytes". *Developmental Biology*, 134(1), 59–71.

[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(89\)90078-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(89)90078-X)

Shirahata, T. (2014). "Effect of sodium conductance variations on electrical behavior of a neocortical neuron model". *Acta Biologica Hungarica*, 65(4), 379–384. <https://doi.org/10.1556/ABiol.65.2014.4.2>

Simkin, D., & Bendahhou, S. (2011). "Skeletal muscle Na⁺ channel disorders". *Frontiers in Pharmacology*, OCT(October) 5, 1–9.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00063>

Sluka, K. A., & Clauw, D. J. (2016). "Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain". *Neuroscience*, 338(5), 114–129.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.006>

Tanaka, B. S., Zhao, P., Dib-Hajj, F. B., Morisset, V., Tate, S., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2016). "A gain-of-function mutation in Nav1.6 in a case of trigeminal neuralgia". *Molecular Medicine*, 22(13), 338–348.

<https://doi.org/10.2119/molmed.2016.00131>

Theile, J. W., & Cummins, T. R. (2011). "Recent developments regarding voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of inherited and acquired neuropathic pain syndromes". *Frontiers in Pharmacology*, OCT(October), 1–14.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00054>

Waxman, S. G., & Hains, B. C. (2006). "Fire and phantoms after spinal cord injury: Na⁺ channels and central pain". *Trends in Neurosciences*, 29(4), 207–215.

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.02.003>

Wood, J. N., Boorman, J. P., Okuse, K., & Baker, M. D. (2004). "Voltage-gated sodium channels and pain pathways". *Journal of Neurobiology*, 61(1), 55–71.

<https://doi.org/10.1002/neu.20094>

Zhou, X., Xiao, Z., Xu, Y., Zhang, Y., Tang, D., Wu, X., Tang, C., Chen, M., Shi, X., Chen, P., Liang, S., & Liu, Z. (2017). "Electrophysiological and pharmacological analyses of Nav1.9 voltage-gated sodium channel by establishing a heterologous expression system". *Frontiers in Pharmacology*, 8(NOV), 1–12.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00852>