



# **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

## **Instituto de Fisiología Laboratorio de Neuromodulación**

***Efecto del tratamiento con el extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre la modulación serotoninérgica de las corrientes activadas por NMDA en neuronas piramidales de corteza prefrontal de rata***

**Tesis que presenta:**

***Q.F.B. Evelyn Alejandra Ruíz Luna***

**Para obtener el grado de:**

**Maestra en Ciencias Fisiológicas**

**Director de Tesis:**

***D.C. Jorge L. V. Flores-Hernández***

**Comité Tutorial:**

***D.C. Ma. del Rosario Vega y Sáenz de Miera***

***D.C. Gonzalo Flores Álvarez***

***D.C. Eduardo Salinas Stefanón***

**Junio 2018**



## Contenido

<b>Contenido</b>	<b>I</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>III</b>
<b>Índice de abreviaturas</b>	<b>V</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Alucinógenos</b>	<b>2</b>
1.1.1 Hongos	3
1.1.1.1 <i>Psilocybe cubensis</i>	4
1.1.1.1.1 Extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i>	5
1.1.1.1.1.1 Metabolitos del hongo	5
1.1.1.1.1.2 Farmaco-cinética de la psilocina	7
1.1.1.1.1.3 Farmaco-dinamia de la psilocina	8
1.1.2 Alucinógenos y activación cortical	9
<b>1.2 Corteza Prefrontal</b>	<b>9</b>
1.2.1 Citoarquitectura y composición celular de la CPF	11
1.2.2 Organización columnar de la CPF	12
1.2.3 Aferencias y eferencias de la CPF	13
<b>1.3 Neurotransmisión y neuromodulación</b>	<b>13</b>
1.3.1 Receptores y neurotransmisores en las neuronas de la CPF	14
1.3.1.1 Glutamato	14
1.3.1.1.1 Receptor de glutamato tipo NMDA	15
1.3.1.1.1.1 Subunidad GluN1	17
1.3.1.1.1.2 Subunidad GluN2	17
1.3.1.1.1.3 Subunidad GluN3	18
1.3.1.1.2 Serotonina	18
1.3.1.1.2.1 Receptores serotoninérgicos	20
1.3.1.1.2.2 Receptores serotoninérgicos en CPF	21
1.3.1.1.2.2.1 Receptor 5-HT <sub>1A</sub>	23
1.3.1.1.2.2.2 Receptor 5-HT <sub>2A/C</sub>	25
1.3.1.1.2.3 Modulación serotoninérgica de la CPF	28
1.3.2 Selectividad funcional	30
<b>1.4 Mecanismo de acción de los alucinógenos</b>	<b>32</b>
1.4.1 Modelos animales de alucinación: HTR y WDS	33
<b>1.5 Estudios con psilocina</b>	<b>34</b>
<b>2 Justificación</b>	<b>36</b>
<b>3 Hipótesis</b>	<b>37</b>
<b>4 Objetivos</b>	<b>38</b>
<b>4.1 General</b>	<b>38</b>

4.2	Particulares	38
<b>5</b>	<b>Metodología</b>	<b>39</b>
5.1	Obtención del extracto metanólico	39
5.1.1	Tratamiento del extracto metanólico	40
5.2	Evaluación de la respuesta WDS	40
5.3	Registro electrofisiológico	41
5.3.1	Disociación aguda	41
5.3.2	Técnica de célula completa en protocolos de fijación de voltaje ( <i>Whole-cell</i> )	42
5.3.2.1	Protocolos electrofisiológicos	43
5.4	Análisis estadístico	44
<b>6</b>	<b>Diagramas de trabajo</b>	<b>46</b>
6.1	Administración de extracto	46
6.2	Registro electrofisiológico	47
<b>7</b>	<b>Resultados</b>	<b>48</b>
7.1	Evaluación conductual mediante el conteo de respuesta WDS	48
7.2	Análisis electrofisiológico	49
7.2.1	Análisis de la corriente activada por glutamato tipo NMDA	50
7.2.2	Análisis de la modulación serotoninérgica de la $I_{NMDA}$	60
<b>8</b>	<b>Discusión</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>Referencias</b>	<b>i</b>
<b>11</b>	<b>Anexo I</b>	<b>xiv</b>
<b>12</b>	<b>Anexo II</b>	<b>xvi</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Fotografía de ejemplares de <i>Psilocybe cubensis</i> .....	5
Figura 2. Estructura química de la triptamina.....	5
Figura 3. Estructura química de las triptaminas presentes en <i>P. cubensis</i> .....	6
Figura 4. Estructura química de 5-HT y psilocina.....	6
Figura 5. Metabolismo de la psilocibina.....	8
Figura 6. Diagrama de la sección coronal unilateral de la CPF de rata.....	10
Figura 7. Las neuronas de la CPF, al igual que las demás cortezas, están dispuestas en capas características.....	11
Figura 8. Esquema de la clasificación de los receptores de glutamato.....	15
Figura 9. Receptor NMDA que muestra sus principales sitios de unión para agonistas y moduladores alostéricos.....	16
Figura 10. Biosíntesis y degradación de la 5-HT a partir de triptófano.....	19
Figura 11. Clasificación de los receptores serotoninérgicos.....	21
Figura 12. Representación esquemática de la modulación serotoninérgica de la CPF.....	23
Figura 13. Vías de señalización del receptor 5-HT <sub>1A</sub> .....	25
Figura 14. Vías de señalización del receptor 5-HT <sub>2A</sub> .....	27
Figura 15. Vías de señalización para el receptor 5-HT <sub>2C</sub> .....	28
Figura 16. . Esquema que representa la modulación de la I <sub>NMDA</sub> causada por 5-HT.....	29
Figura 17. Representación esquemática de los subtipos de receptores acoplados a proteínas G y los circuitos neuronales implicados en el mecanismo de acción de los alucinógenos.....	33
Figura 18. Corte coronal del cerebro de rata.....	47
Figura 19. Curva dosis-respuesta para la conducta WDS.....	48
Figura 20. Características de las células registradas.....	49
Figura 22. Histograma de capacitancia de las células registradas para la curva dosis-respuesta INMDA.....	50
Figura 23. Trazos representativos de la curva dosis-respuesta de NMDA.....	51
Figura 24. Curva dosis-respuesta para el pico de la I <sub>NMDA</sub> .....	52
Figura 25. Representación gráfica de los valores de CE50 para cada dosis del extracto administrado.....	53
Figura 26. Gráfica en tres dimensiones de la dosis-respuesta para la I <sub>NMDA</sub> para el Pico.....	54
Figura 27. Curva dosis-respuesta para la INMDA correspondiente al EE (a.I).....	55
Figura 28. Representación gráfica de los valores de CE50 obtenidos a partir de la curva dosis respuesta del EE de la I <sub>NMDA</sub> .....	56
Figura 29. Gráfico en tres dimensiones de las curvas dosis-respuesta de la I <sub>NMDA</sub> del EE.....	57
Figura 30. Gráfico de la relación EE/Pico de la I <sub>NMDA</sub> .....	58
Figura 31. Gráfico de la constante de tiempo de desensibilización (Tau).....	59
Figura 32. Histograma de capacitancia de las células registradas para la curva dosis-respuesta I <sub>NMDA</sub> .....	60
Figura 33. Trazo representativo del porcentaje de inhibición.....	61
Figura 34. Curva dosis-respuesta del porcentaje de reducción por 5-HT sobre la I <sub>NMDA</sub> , con respecto a la amplitud del pico.....	62
Figura 35. Gráficas donde se observa el comportamiento sobre la amplitud del Pico de la INMDA para cada concentración de 5-HT con respecto al aumento de dosis del extracto.....	63
Figura 36. Gráfica en tres dimensiones del efecto del porcentaje de reducción en la amplitud del pico causado por 5-HT sobre la I <sub>NMDA</sub> , en las dosis del extracto de <i>P. cubensis</i> probadas.....	64

Figura 37. Curva dosis-respuesta del porcentaje de reducción por 5-HT sobre la $I_{NMDA}$ , con respecto a la amplitud del EE.....	66
Figura 38. Gráficas del comportamiento para cada concentración de 5-HT con respecto al aumento de dosis del extracto correspondiente al EE. ....	67
Figura 39. Gráfica en tres dimensiones del efecto del porcentaje de reducción en el EE causado por 5-HT sobre la $I_{NMDA}$ , en las dosis del extracto de <i>P. cubensis</i> probadas. ....	69
Figura 41. Gráficas del comportamiento para cada concentración de 5-HT con respecto al aumento de dosis del extracto correspondiente a la relación EE/P.....	70
Figura 42. Gráfica en tres dimensiones del efecto del porcentaje de reducción en la relación EE/P causado por 5-HT sobre la $I_{NMDA}$ , en las dosis del extracto de <i>P. cubensis</i> probadas. ....	71
Figura 43. Gráfica para el porcentaje de reducción sobre la $I_{NMDA}$ causado por 5-HT en Tau. ....	72
Figura 44. Gráficas del comportamiento para cada concentración de 5-HT con respecto al aumento de dosis del extracto correspondiente a Tau.....	73
Figura 45. Gráfica en tres dimensiones del efecto del porcentaje de reducción con respecto a Tau causado por 5-HT sobre la $I_{NMDA}$ , en las dosis del extracto de <i>P. cubensis</i> probadas. ....	74

## Índice de abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
7TM	7 segmentos transmembranales
25I-NBMeO	4-yodo-2,5-dimetoxi-N-(2-metoxibenzil) feniletilamina
25NBOH	2-({[2-(4-cloro-2,5-dimetoxifenil)etil]amino}metil)fenol
AA	Ácido araquidónico
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato
AMPc	AMP cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CAMKII	Proteína kinasa dependiente del complejo $Ca^{2+}$ - Calmodulina
$Ca^{++}$	Ión calcio
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
Cg1	Cingulada anterior
CPF	Corteza Prefrontal
CPFm	Corteza Prefrontal medial
D0, D0.003, D0.01, D0.03, D0.1, D0.3	Dosis (0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 respectivamente)
DAG	Di-acil glicerol
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50
DL50	Dosis letal 50
DMT	N-N dimetilriptamina
EBSS	Solución salina balanceada de Earle
EE	Estado estacionario
EE/P	Estado Estacionario / Pico
EE/P	Relación Estado estacionario/Pico
ERK	Kinasa regulada por señal extracelular
GABA	Ácido $\gamma$ -Aminobutírico
GRK	Receptores acoplados a proteín kinasas

H <sup>+</sup>	Ión hidronio
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfónico
HTR	Respuesta <i>Head-twitch</i>
IL	Infralímbica
I <sub>NMDA</sub>	Corriente activada por glutamato tipo NMDA
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
K <sub>+</sub>	Ión potasio
LD <sub>50</sub>	Dosis letal 50
MAP2	Proteín cinasas activadas por mitógenos
Mg <sup>++</sup>	Ión magnesio
mGLU	Receptores metabotrópicos de Glutamato
NMDA	N-metil-D-aspartato
<i>P. cubensis</i>	<i>Psilocybe cubensis</i>
PET	Tomografía por emisión de positrones
Pico	Amplitud del pico
PKC	Proteín kinasa C
PL	Prelímbica
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A2
PLC-β	Fosfolipasa C tipo β
PoD	Núcleo del Rafé <i>Pontis dorsal</i>
PoM	Núcleo del Rafé <i>Pontis medial</i>
RD	Núcleo del Rafé Dorsal
RM	Núcleo del Rafé Medial
RMg	Nucleo del Rafé <i>Magnus</i>
ROb	Nucleo del Rafé <i>Obscurus</i>
RPa	Nucleo del Rafé <i>Pallidus</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
Tau	Constante de tiempo de desensibilización
TOC	Trastorno obsesivo compulsivo
WDS	<i>Wet-dog shake</i>

## Resumen

A lo largo de la historia el consumo de plantas y hongos alucinógenos ha estado presente, desde en el uso ceremonial y recreativo, hasta de forma terapéutica. Durante la década de los años 60 se elucidó la estructura química de los principios activos, entre ellos, las triptaminas que pertenecen a los hongos psicodélicos, como *Psilocybe cubensis*, dentro de las que destacan psilocina y psilocibina por ser las que se encuentran en mayor proporción.

A partir de los efectos reportados tras su consumo, como la alteración de procesos como cognición y percepción del tiempo, se tuvo indicio de que las principales áreas implicadas donde se generan estos efectos son las áreas corticales, de las que destaca la corteza prefrontal (CPF). Además, se han realizado múltiples investigaciones a partir de las cuales se ha descrito que el mecanismo de acción es a través de los receptores serotoninérgicos, principalmente por los subtipos 5-HT<sub>2A/C</sub> y 5-HT<sub>1A</sub>.

Sin embargo, poco se sabe acerca de la respuesta sobre las neuronas aisladas que genera una exposición a los compuestos alucinógenos contenidos en el extracto metanólico de *P. cubensis* como una aproximación para comprender mejor los mecanismos a nivel integrativo en el sistema nervioso central (SNC).

Con estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó si la administración única del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* produce respuestas a corto plazo en SNC a través de la evaluación conductual *Wet-Dog-Shake* (WDS), y, después de haber transcurrido 24 horas de la administración, se realizó el registro electrofisiológico de las corrientes activadas por NMDA ( $I_{NMDA}$ ), así como la modulación por serotonina sobre éstas mismas, en las neuronas piramidales agudamente disociadas de la capa V/VI de la CPF de rata.

El conteo de la respuesta WDS se utilizó como marcador del efecto del extracto metanólico de *P. cubensis* sobre los receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>. Y transcurridas 24 horas de la administración del extracto metanólico se encontró que la densidad de la corriente activada por NMDA ( $I_{NMDA}$ ) disminuyó con las dosis bajas (< 0.03 mg/kg), pero regresó a la densidad normal con las dosis altas (> 0.03 mg/kg) dando como resultado un efecto de campana invertida. Finalmente, en cuanto al porcentaje de inhibición causado por serotonina sobre dicha corriente ( $I_{NMDA}$ ) se encontró un efecto principal bifásico con máxima inhibición en 0.01 mg/kg.

Por lo que se concluyó que la administración única de diferentes dosis del extracto metanólico de *P. cubensis*, modifica la densidad de corriente de la  $I_{NMDA}$  y la modulación que la serotonina ejerce sobre ésta.

# 1 Introducción

## 1.1 Alucinógenos

Desde su aparición en el ámbito de la investigación, han sido propuestos diferentes términos para referirse a las plantas y hongos que, tras su consumo, son capaces de alterar las funciones mentales y cognitivas, tales como cambios en el estado de ánimo, alteración en la percepción de la realidad y el tiempo, ilusiones visuales y auditivas, así como sinestesia (Brailowsky, 2008; López Pavillard, 2003). Algunos ejemplos de esto son, psicomiméticos, psicodislépticos (sustancias que alteran la mente), psicodélicos (sustancias que inducen estados psicóticos), psicotrópicos, entre otros (Brailowsky, 2008). Sin embargo, de acuerdo a Ruck y su equipo (1979) estos términos no son muy adecuados, e incluso son de índole peyorativo, por lo que propusieron el término “enteógeno” (dios generado dentro) como uno más apropiado para referirse a estas plantas y hongos en función de sus efectos y del papel ceremonial que han tenido en las civilizaciones del mundo.

No obstante, dentro de la comunidad científica uno de los términos más utilizados y aceptados para referirse a los principios activos contenidos en las plantas y hongos es alucinógeno (David E. Nichols, 2004) y, recientemente se ha retomado el término “psikedélico” (David E. Nichols, 2016) acuñado por Osmond (1957) cuya definición se refiere a la capacidad de “manifestación de la mente” y que además podría tener un uso terapéutico.

Aunado a lo anterior, los alucinógenos o psikedélicos han sido definidos con más precisión por Nichols (2004, 2016), como aquellas sustancias que ejercen su efecto en el sistema nervioso central, mediante la activación (total o parcial) de receptores serotoninérgicos, particularmente el subtipo 5-HT<sub>2A</sub>. Por lo que serán los términos a utilizar en el presente trabajo.

La disyuntiva que se planteó al inicio de esta sección, surgió en función del papel que ha tenido, a lo largo de la historia del desarrollo de las civilizaciones del mundo, el uso ceremonial de los enteógenos. Tales como: los cactus *Lophopora williamsi* (conocido como *Peyotl*) y *Echinopsis pachanoi* (cactus de San Pedro) que tienen como principio activo a la mescalina, las semillas de la enredadera *Turbina corymbosa* (*Ololiuhqui*) que contienen ácido lisérgico, una mezcla con la que se prepara una bebida en la amazonia (*Ayahuasca*) con la corteza del árbol *Psychotria viridis* que contiene dimetiltriptamina

(DMT) y la liana *Baniisteriopsis cappi* que contiene harmalina, así como hongos, ya sean macroscópicos (macromicetos) o microscópicos (micromicetos).

Como parte de los micromicetos, se encuentra el *Claviceps purpurea* (cornezuelo o *ergot*) del centeno a partir del cual Albert Hofmann sintetizó el LSD (Ott, 1993; Schultes & Hofmann, 2000; R. G. Wasson *et al.*, 1978). Y dentro de los macromicetos se encuentran los denominados, por su contenido de psilocina y psilocibina, como “hongos psicocíbicos” grupo al que pertenecen las especies contenidas en los géneros *Psilocybe spp.* (conocido como *Teonanacatl*), *Panaeolus spp.*, *Conocybe spp.* e *Inocybe spp.* (Schultes, 1940; Stamets, 1996). Cabe aclarar que el género *Amanita spp.*, y en particular *A. muscaria* (conocido como matamoscas) no pertenece al grupo de los hongos psicocíbicos debido a que sus principios activos (ácido iboténico y muscimol; Ott, 1993; Schultes, 1977; Stebelska, 2013), pese a tener efectos sobre el SNC, no son alucinógenos serotoninérgicos clásicos de acuerdo a la definición de Nichols (2004, 2016) y, por lo tanto, tienen un mecanismo de acción diferente.

Finalmente, con respecto a las ceremonias rituales mediadas por el uso de enteógenos, cabe mencionar que, hasta la fecha estas se realizan de acuerdo a los usos y costumbres que a cada cultura y región corresponde, y se sabe, a partir de los registros más antiguos con los que se cuenta, que uno de los principales objetivos de llevarlas a cabo, eran principalmente fines religiosos y adivinatorios, ya que los registros refieren que durante las sesiones puede existir “comunicación con sus dioses”; y terapéuticos, porque se arguye “obtener el conocimiento para sanar”(Carod-Artal, 2011; Schultes, 1977).

### 1.1.1 Hongos

Los registros arqueológicos señalan a las ceremonias con hongos como las más antiguas que involucran el uso de enteógenos, esto a partir de registros en pinturas prehistóricas que datan de hace más de 7000 años, una de ellas es conocida como la abeja de Tassili descubierta en una zona montañosa del desierto del Sahara en Argelia (Samorini, 2001, 2017). Además, en América Central (Guatemala, Honduras y El Salvador), así como la Riviera Maya, se han encontrado pequeñas figuras de hombres-hongo esculpidas en piedra de más de 2200 años de antigüedad (Borhegyi, 1961; Heim & Wasson, 1958; Lowy, 1971; G. Wasson, 1983; V. P. Wasson & Wasson, 1957).

Por otra parte, en México, los primeros registros que reportan la ingesta de hongos alucinógenos, corresponden al año 1502 durante la ceremonia de coronación de Moctezuma II, por parte de un mexica culto llamado Tezozómoc:

“... los extranjeros les dieron a comer hongos montesinos  
que se embriagan con ello, y con esto entraron a la danza...”

(G. Wasson, 1983; V. P. Wasson & Wasson, 1957).

Debido al papel que han ocupado estas ceremonias rituales con hongos en las civilizaciones, han sido tema de interés para las ciencias sociales (arqueología, antropología, etnobotánica) desde principios del siglo XX, lo que abrió paso a su investigación por las ciencias naturales (química, biología, fisiología, medicina) teniendo gran auge durante la década de los 60, época en la que Hofmann (1958) describió por primera vez la estructura del principio activo y realizó su síntesis *de novo*. También dio inicio el uso recreacional de las plantas y hongos alucinógenos, motivo que tuvo como consecuencia su prohibición y posterior regulación; sin embargo, en los últimos 30 años los alucinógenos volvieron a captar la atención de la comunidad científica que, aunado a ciertos cambios en la regulación, han permitido la continuación de las investigaciones científicas (Carod-Artal, 2011; Glockner, 2016; C. Ruck, 2016; G. Wasson, 1983).

Dentro de los hongos alucinógenos pertenecientes al género *Psilocybe* se encuentra *P. cubensis* que es una de las especies de mayor distribución a nivel mundial, además de que su cultivo en laboratorio es el mejor caracterizado y uno de los menos exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales y condiciones de crecimiento (Oss & Oeric, 1992; Pollock, 1975).

#### **1.1.1.1 *Psilocybe cubensis***

Es un hongo coprófilo y de crecimiento gregario, con un estípote de superficie húmeda y lisa que oscila de 1.5-8 cm de ancho, con forma cónica-campanulada, inicialmente de forma umbonada o mamiliforme que con el transcurso del tiempo se abre hasta ser plano, de color marrón que se desvanece hacia los bordes hasta tornarse blanco. El velo universal después de romperse deja un anillo remanente en el píleo, el cual es blanco y ligeramente estriado, el píleo mide de 4-20cm x 0.5-1.5cm de ancho y las láminas están próximas entre sí y son de color pálido grisáceo que oscurecen cuando

envejece. Finalmente, las esporas son de color café-violáceo a púrpura oscuro y miden aproximadamente entre 11.5 y 17  $\mu\text{m}$  x 8 - 11  $\mu\text{m}$  (Figura 1). Una característica de los ejemplares de este género es que reaccionan a la manipulación con un cambio de su coloración adquiriendo una tonalidad azul-verdosa, como indicador del contenido de los principios activos que provocan el efecto alucinógeno (Guzmán, 1995; Stamets, 1996).

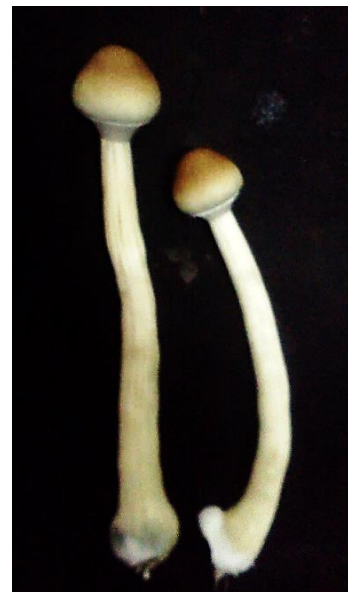


Figura 1. Fotografía de ejemplares de *Psilocybe cubensis*, donde se puede observar la forma mamilar del píleo a punto de abrirse y antes romper el velo universal.

#### 1.1.1.1.1 Extracto metanólico de *Psilocybe cubensis*

##### 1.1.1.1.1.1 Metabolitos del hongo

Los principios activos del hongo *P. cubensis* han sido clasificados como moléculas pertenecientes al grupo de las triptaminas. A saber, por su estructura, los alucinógenos pueden clasificarse en dos grupos:

las feniletilaminas (como la mescalina, el 2-([2-(4-cloro-2,5-dimetoxifenil)etil]amino)metil)fenol: 25CN-NBOH y 4-yodo-2,5-dimetoxi-N-(2-metoxibenzil) feniletilamina: 25I-NBMeO), y las triptaminas, que a su vez se pueden subdividir en dos grupos: las ergolíneas, (como la dietil-amida del ácido lisérgico: LSD), que son estructuras relativamente más rígidas, y las triptaminas simples que son ligeramente más flexibles (Figura 2). Dentro de esta subdivisión se encuentran: el DMT, la psilocibina y la psilocina (David E. Nichols, 2004, 2016).

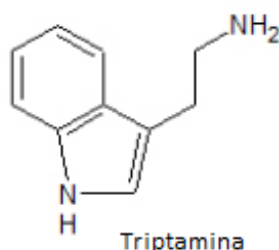


Figura 2. Estructura química de la triptamina. Está formada por un anillo indólico unido a una etanoamina.

Las triptaminas que se han descrito en el *P. cubensis* y en el extracto metanólico de éste y otras especies del género, son (Figura 3): norbaeocistina ( con un rango de 0.05-0.077% del peso del hongo), baecocistina ( 0-0.016% ), aeruginascina (0.011-0.022%), psilocibina (0.9-1.5%) y psilocina (0.17-0.24%).

De estas moléculas, destacan las últimas dos por ser las que se encuentra en mayor proporción. (Gartz, 1995; Matsushima, Eguchi, *et al.*, 2009; Stebelska, 2013; Zhuk *et al.*, 2015).

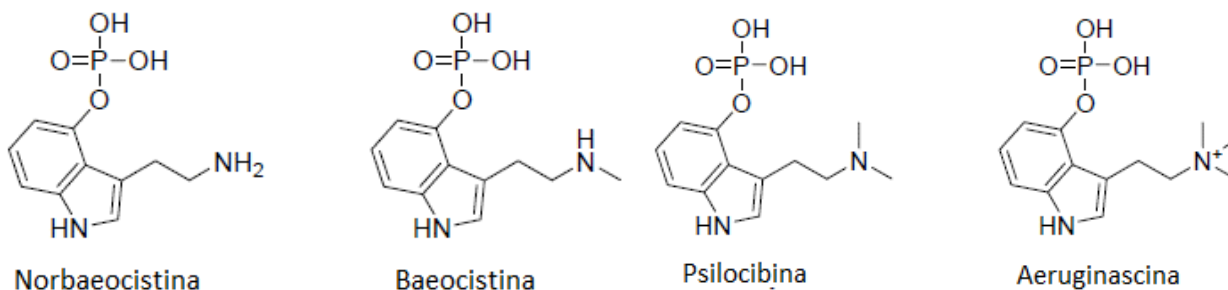


Figura 3. Estructura química de las triptaminas presentes en *P. cubensis*, ordenadas de acuerdo al número de grupos metilo que contienen. Norbaeocistina no tiene ningún grupo metilo unidos a la amina, baeocistina: tiene uno, psilocibina tiene dos grupos metilo y finalmente aeruginascina tiene tres grupos metilo.

Por su parte, la estructura química de la psilocibina (4-fosforiloxi- N, N-dimetiltriptamina) está formada por un esqueleto indólico con un grupo fosfato unido al anillo de benceno. Los grupos metilo del anillo de nitrógeno hacen la sustancia más lipofílica, lo que permite su paso a través de la barrera hematoencefálica, es decir, que es capaz de llegar al sistema nervioso central (Matsushima, Eguchi, *et al.*, 2009).

En el cuerpo, la psilocibina es rápidamente defosforilada a psilocina (4-hidroxi-N, N-dimetiltriptamina), el compuesto biológicamente activo. La psilocina es muy similar estructuralmente a la serotonina (5-hidroxitriptamina: 5-HT, Figura 4), lo que la hace capaz de unirse a los receptores 5-HT, aunque con diferentes afinidades (Passie *et al.*, 2002a).

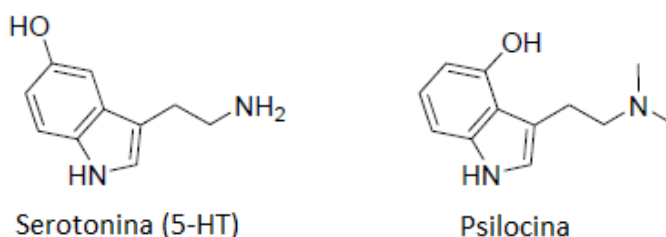


Figura 4. Estructura química de 5-HT y psilocina. Puede notarse que comparten el esqueleto de la triptamina, y difieren en la posición en la que se encuentra el grupo hidroxilo (para 5-HT en la posición 5 y para psilocina en la posición 4) y además, la psilocina, tiene dos grupos metilo unidos a la triptamina.

#### 1.1.1.1.1.2 Farmaco-cinética de la psilocina

La psilocibina, después de una administración intravenosa, cuenta con una biodistribución similar para todos los órganos, incluyendo el cerebro, en esta vía la psilocibina se somete rápidamente a defosforilación y desaparece rápidamente del sistema circulatorio (en comparación con la administración oral), los efectos inician después de 1 a 2 minutos, el pico es alcanzado a los 4-5 minutos y duran alrededor de 20 minutos (Robin L Carhart-Harris *et al.*, 2016; Passie *et al.*, 2002b; Tylš *et al.*, 2014).

El tiempo de vida media fisiológico de la psilocina en el cuerpo humano varía entre dos y tres horas. Dicha molécula se degrada por procesos de desaminación y desmetilación por enzimas hepáticas como la aldehído deshidrogenasa y la monoamino oxidasa (MAO), que también cataliza la oxidación de los neurotransmisores monoaminérgicos como la serotonina (Jerome, 2007).

Los efectos de la psilocina se pueden notar aproximadamente a partir de los primeros 20 - 30 minutos después de la administración oral, el pico es alcanzado alrededor de los 60 a 90 minutos, y tienen una duración total, generalmente, de 4 a 6 horas, aunque esto puede diferir dependiendo de la dosis ingerida, el metabolismo específico y la química cerebral del individuo, además los niveles individuales de MAO pueden también contribuir a las diferencias en el metabolismo de la psilocina (Hasler *et al.*, 1997; Passie *et al.*, 2002b). Finalmente, el metabolismo de la psilocibina y sus productos continúa, hasta que los niveles plasmáticos son suficientemente bajos como para no generar ningún efecto (Jerome, 2007).

Con respecto a la degradación, se ha propuesto que los grupos hidroxilo de la psilocina sufren procesos de glucuronidación y se excretan por los riñones; además como resultado de los procesos de desaminación y oxidación, se han identificado metabolitos (Figura 5), tales como, 4-hidroxi-indol-3-acetaldehído (4HIA), 4-hidroxi-indol-3-ácido acético (4HIAA) y 4-hidroxitriptofol (4HT). Y por otro lado, también se obtienen los derivados N-metilados: 1-metil-psilocibina y 1-metil-psilocina como resultado de una reacción de metilación, (Hasler *et al.*, 1997; Jerome, 2007).

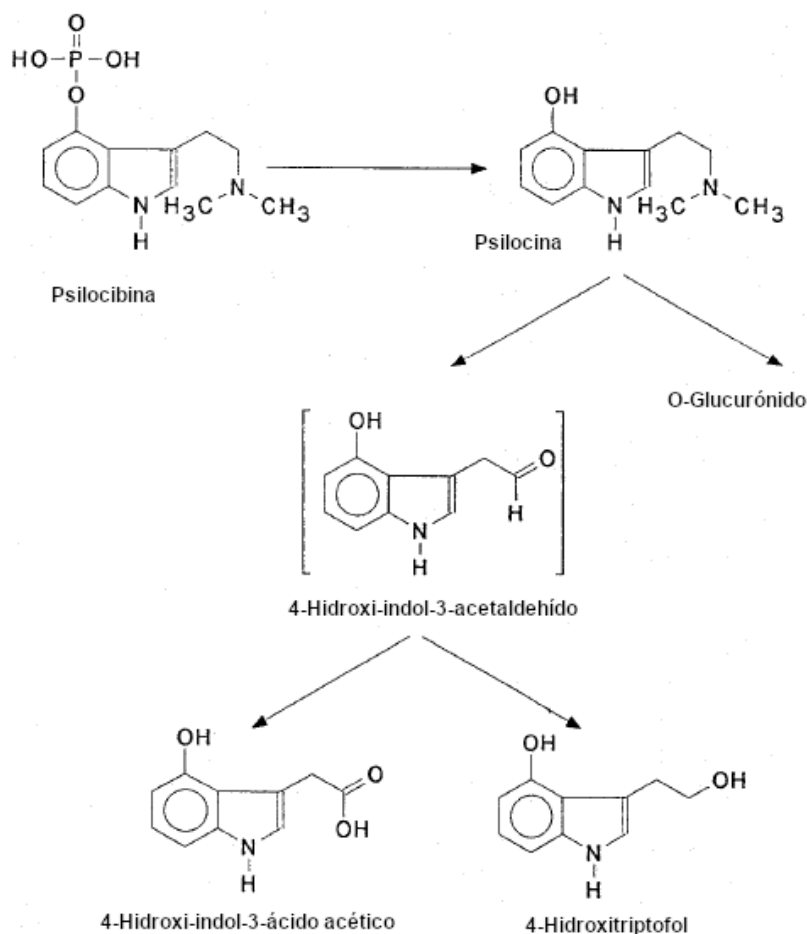


Figura 5. Metabolismo de la psilocibina. (Modificado de Passie et al., 2002).

#### 1.1.1.1.1.3 Farmaco-dinamia de la psilocina

La psilocibina tiene una toxicidad extremadamente baja, la dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>) en roedores es de 280mg/kg, sin embargo, la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) está alrededor de 0.1-0.2mg/kg de peso o 4-6ng/mL de plasma haciendo muy improbables los efectos adversos a la salud así como en la investigación científica aprobada por los comités de Ética (Hasler et al., 1997; Passie et al., 2002a). A lo largo de toda la historia de su uso, no ha habido un sólo caso documentado acerca de letalidad directamente asociado con el uso de psilocibina o psilocina, tampoco de enfermedad o daño de algún órgano. Por el contrario, muchas investigaciones han atribuido efectos terapéuticos a concentraciones alrededor de la DE<sub>50</sub>, sin embargo, los autores de éstos trabajos denotan que resta mucho por ser elucidado (Carter et al., 2007; Moreno et al., 2006).

En adición, se han realizado estudios de imagenología a personas bajo el efecto de psilocina mediante tomografía por emisión de positrones (PET; con  $[F_{18}]$  desoxiglucosa) en los que se ha demostrado que hay un aumento de la activación en la mayoría de las áreas del cerebro, y donde destacan por activarse en mayor proporción, las cortezas prefrontal y temporal, así como el tálamo, a lo que se denomina "hiperfrontalidad" (Hermle *et al.*, 1998; F. Vollenweider *et al.*, 1997).

### 1.1.2 Alucinógenos y activación cortical

El estudio de los alucinógenos en la activación cortical se ha centrado en la corteza prefrontal, esencialmente porque esta zona tiene la mayor densidad de receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Cornea-Hébert *et al.*, 1999).

## 1.2 Corteza Prefrontal

La corteza prefrontal (CPF) es la principal área de asociación cerebral, y constituye el nivel más elevado en la jerarquía cortical dedicada a la representación y ejecución de acciones; en primates es la región neocortical más evolucionada. Está involucrada en gran cantidad de procesos cognitivos, como: la atención ejecutiva, la memoria operativa o de trabajo, las funciones ejecutivas, la toma de decisiones y la planificación del comportamiento (Vázquez -Borsetti, 2008).

Además del control cognitivo, la CPF desempeña un papel crucial en gran número de funciones cerebrales superiores, como el control de la conducta y el procesamiento de señales emocionales (Fuster, 2008; M. Puig *et al.*, 2004; Vázquez-Borsetti *et al.*, 2011). Por lo que, se ha encontrado que en pacientes con enfermedades psiquiátricas graves, como la esquizofrenia o la depresión la función de la CPF y su metabolismo están alterados (M. Puig *et al.*, 2004).

Anatómicamente, la CPF es la parte más rostral del lóbulo frontal, la cual, en primates, constituye casi una tercera parte del neocortex y comprende las áreas 8-13, 24, 32, 46 y 47 del mapa de Brodmann. Sin embargo, en todas las especies de mamíferos las fronteras anatómicas son imprecisas, pero, de acuerdo al criterio conectivo-funcional, corresponde al área que tiene una conectividad recíproca con el núcleo medio-dorsal del tálamo (Fuster, 2008; Groenewegen & Uylings, 2000).

En humanos la CPF puede dividirse en dos regiones principales: orbitomedial y dorsolateral. La región orbitomedial está implicada en el comportamiento emocional/motivacional, por otro lado, la dorsolateral (la más desarrollada en humanos) participa en la organización temporal del comportamiento, el lenguaje y el razonamiento; ésta área también controla la integración temporal y la memoria de trabajo. Aunado a esto, existe una interconectividad entre estas áreas de la CPF, que su vez envían y reciben proyecciones de todos los sistemas sensoriales corticales, sistemas motores y muchas estructuras subcorticales (Fuster, 2008).

Por su parte, en la rata la CPF se subdivide en tres áreas principales (Figura 6): lateral (áreas insular agranular dorsal y ventral), orbital (localizada ventralmente al cuerpo caloso) y medial. A su vez, la corteza prefrontal medial (CPFm) se divide en tres zonas (de dorsal a ventral): cingulada anterior (Cg1), prelímbica (PL) e infralímbica (IL). Aunque no está clara la función de estas subdivisiones en la rata, algunos estudios infieren del patrón de proyecciones de la zona PL e IL que la primera tendría mayor participación en las funciones límbico-cognitivas (homólogas a la CPF dorsolateral de primates), y la segunda (homóloga a la CPF orbitomedial de primates) controlaría actividades viscerales-autónomas (Vertes, 2004).

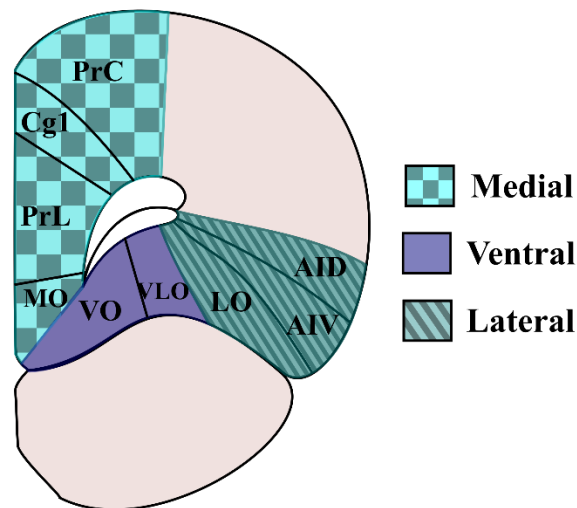


Figura 6. Diagrama de la sección coronal unilateral de la CPF de rata. Se resaltan en diferente color las tres subdivisiones de la CPF (medial, ventral y lateral); AIV y AIC corteza insular dorsal y ventral; AOM y AOV núcleo olfatorio anterior medial y ventral; ACG corteza cingulada anterior; MO, LO, VLO y VO corteza orbital medial, lateral, ventrolateral y ventral; M1 área motora primaria, PrC área motora secundaria, PL corteza prelímbica (modificado de Dalley et al., 2004).

### 1.2.1 Citoarquitectura y composición celular de la CPF

La caracterización de la CPF se ha realizado mediante la tinción de Nissl (*Figura 7*), a través de la cual se ha descrito que tiene una estructura laminada y se ha identificado la citoarquitectura de éstas capas (Nieuwenhuys & Voogd, 2008).

Comenzando en la superficie, las seis capas de la CPF en primates son las siguientes:

**Capa I. Molecular o capa plexiforme:** está

ocupada por algunas neuronas dispersas, y predominantemente células gliales, además consiste principalmente en fibras de las células localizadas en las capas más profundas de la corteza que transcurren, en general, de forma paralela a la superficie.

**Capa II. Granular externa:** está compuesta por

pequeños cuerpos celulares esféricos densamente empaquetados llamados células granulares. La mayor parte de los somas pertenecen a neuronas piramidales pequeñas que dirigen sus ápices hacia la superficie y que hacen conexión con otras áreas corticales del mismo hemisferio.

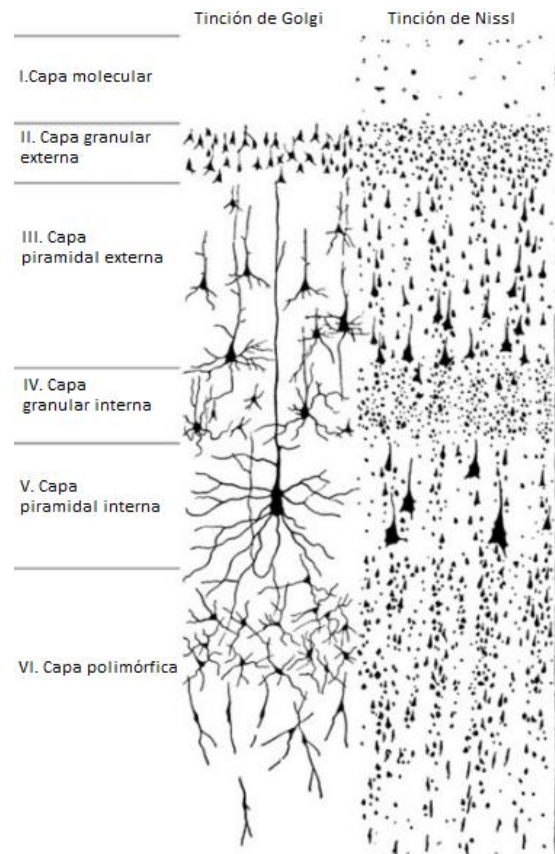
**Capa III. Piramidal externa:** es una capa gruesa

en la cual prevalecen los somas piramidales. Estos somas aumentan progresivamente de tamaño (principalmente de pequeños a medianos)

desde la superficie hacia la profundidad y establecen conexiones comisurales con el hemisferio opuesto así como con cortezas de asociación dentro del mismo hemisferio, siendo así la principal fuente de eferentes corticales.

**Capa IV. Granular interna:** consiste en pequeños somas piramidales (destacan por su forma de

estrella), no piramidales y en su mayoría: granulares, en este caso son principalmente



*Figura 7. Las neuronas de la CPF, al igual que las demás cortezas, están dispuestas en capas características. El aspecto de la corteza depende del tipo de tinción. La tinción de Golgi pone de manifiesto cuerpos neuronales y árboles dendríticos. El método de Nissl muestra cuerpos celulares y dendritas proximales (modificada de Kandel et al., 2000)*

interneuronas de circuito local. En ratas, esta capa es inexistente y las células que la componen se encuentran dispersas en el límite entre las capas III y V. A esta capa arriban las señales sensoriales y desde ésta se propagan hacia las capas más superficiales y hacia las profundas.

**Capa V. Piramidal interna:** consiste principalmente en somas piramidales de tamaño intermedio y grande, con una disposición laxa. Es la principal fuente de eferentes hacia gran número de zonas subcorticales. Tiene fibras más largas que la capa VI y alcanza los ganglios basales, tronco encefálico y llega hasta la médula espinal.

**Capa VI. Multiforme:** es bastante heterogénea en cuanto a composición celular, los somas son fusiformes con un empaquetamiento relativamente apretado. Se difumina dentro de la sustancia blanca que forma el límite inferior de la corteza y también es una capa de salida de la corteza. La mayoría de sus proyecciones son al tálamo (Fuster, 2008; Santana *et al.*, 2004; Tresguerres *et al.*, 2010).

Además, de acuerdo a su profundidad, las capas comparten funcionalidad en cuanto a proyecciones. De tal forma que, las capas I, II y III son las que se encargan de mantener las funciones intracorticales de asociación, en particular, las capas I y II son las que reciben aferencias difusas e inespecíficas de los centros cerebrales inferiores, mientras que las capas II y III proyectan a otras áreas de asociación cortical de regiones cercanas y, en otros casos, se cruzan al hemisferio opuesto a través del cuerpo calloso. Finalmente las capas V y VI, en general, envían fibras a regiones inferiores del sistema nervioso (Tresguerres *et al.*, 2010).

### 1.2.2 Organización columnar de la CPF

La corteza además de estar organizada en capas, también lo está por columnas y es cada una de estas la unidad cortical de operación (DeFelipe *et al.*, 2002). A su vez, las columnas están formadas por microcircuitos, como unidades funcionales, que consisten en un conjunto de conexiones muy selectivas entre las interneuronas GABAérgicas (que representan el 15-20% de la población neuronal) y proporcionan un control local inhibitorio y las neuronas piramidales glutamatérgicas, quienes son la población mayoritaria (~75-80%) y están constituidas por un soma de aproximadamente 25-50  $\mu\text{m}$  de diámetro, un conjunto de dendritas basales distribuidas cerca del soma y una dendrita apical que proyecta hacia las capas superficiales. Además, se ha sugerido que existe un circuito básico que se

adapta a cada neurona piramidal dependiendo de sus conexiones de entrada y de salida (Andrade, 2011; Nieuwenhuys & Voogd, 2008).

### 1.2.3 Aferencias y eferencias de la CPF

A nivel subcortical, la CPF, debido a que la mayoría de la conectividad es recíproca, recibe aferencias y proyecta preferentemente al tálamo, los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo (núcleos del *rafé*, *Locus coeruleus*, área tegmental ventral), el hipotálamo lateral, los ganglios basales (caudado-putamen, núcleo accumbens y partes estriatales del tubérculo olfatorio) y en el sistema límbico a regiones como la amígdala e hipocampo (Forbes, 2010). Por otra parte, existen aferencias que no cumplen reciprocidad, por ejemplo, los ganglios basales (núcleo accumbens) y la habénula lateral (Fuster, 2008; Gabbott *et al.*, 2005; Groenewegen & Uylings, 2000; Vertes, 2004).

### 1.3 Neurotransmisión y neuromodulación

Los procesos de neurotransmisión y neuromodulación son esenciales en el funcionamiento del SNC, por lo que es preciso explicarlos de forma general, para, de forma posterior abordar algunos de los que respectan a la CPF.

La neurotransmisión es el proceso de comunicación neuronal, la cual puede ser de dos tipos: eléctrico, que es mediado por el flujo de iones entre dos neuronas o químico, el cual se da a través de la liberación de moléculas neuroactivas al espacio sináptico. La propagación de estas señales químicas o eléctricas producen un cambio en el potencial de membrana, o que puede provocar una señal, ya sea excitatoria o inhibitoria (Sámano *et al.*, 2012; Von Bohlen & Dermietzel, 2006).

Por lo tanto, un neurotransmisor es una molécula que se produce en las neuronas, se libera al espacio sináptico y que tiene un receptor de tipo ionotrópico, entre otras características (Katz & Edwards, 1999; Purves *et al.*, 2001). Entre los principales neurotransmisores que existen se encuentran: serotonina, glutamato, GABA, acetilcolina, glicina y ATP (Von Bohlen & Dermietzel, 2006).

En contraste, la neuromodulación es todo proceso que genera una alteración en las propiedades de una neurona, causada por la previa liberación de una sustancia por parte de otra neurona (Katz &

Edwards, 1999; Nadim & Bucher, 2014), por ejemplo, al modificar la actividad neuronal a través de la liberación o estímulo específico.

En adición, un neuromodulador es una molécula liberada por las terminales nerviosas que puede actuar tanto presinápticamente, al modular la síntesis y/o liberación de un neurotransmisor, o de manera postsináptica, al modificar la unión del ligando a su receptor; también puede influir en los mecanismos de transducción del receptor involucrado, o bien pueden actuar a través de receptores propios, con afinidad y características equivalentes a las de los neurotransmisores clásicos (Nadim & Bucher, 2014). En resumen, los procesos de neuromodulación, como su nombre lo dice, ayudan a mantener la homeostasis, o el estado de activación/inhibición del sistema nervioso central (SNC), que a su vez regula a todo el organismo.

Finalmente, se sabe que la alteración neuroquímica del SNC, es decir, en los sistemas de neurotransmisión o de neuromodulación, es parte de la etiología de diversos trastornos psiquiátricos, tales como: esquizofrenia, depresión, ansiedad, trastorno obsesivo compulsivo (TOC), entre otros (Fernández & Velázquez, 2008; Kandel *et al.*, 2000; Purves *et al.*, 2001; Siegel *et al.*, 2006).

### **1.3.1 Receptores y neurotransmisores en las neuronas de la CPF**

#### **1.3.1.1 Glutamato**

El glutamato se encuentra en el cerebro en una concentración de 10-15  $\mu\text{mol} / 1 \text{ g}$  de tejido fresco; es el neurotransmisor excitador por excelencia del SNC siendo utilizado en por lo menos el 90% de las neuronas y juega un papel esencial en el desarrollo y los procesos de plasticidad neuronal, así como en la cognición (S. G. Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004; Siegel *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2015). Se trata de un amino ácido no esencial incapaz de cruzar la barrera hemato-encefálica, por lo que debe ser sintetizado en las neuronas a partir de glucosa a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos siendo  $\alpha$ -cetoglutarato el intermediario precursor, después la glutamina que es liberada por células gliales es transportada al medio extracelular para poder ser captada por las neuronas y convertirla en glutamato por medio de la glutaminasa (ciclo de la glutamina; Siegel *et al.*, 2006).

El glutamato sintetizado es ingresado a vesículas por medio de transportadores VGLUT donde es almacenado hasta su liberación a la hendidura sináptica mediante un proceso calcio-dependiente, como resultado de una despolarización (Purves *et al.*, 2001; Siegel *et al.*, 2006).

Se conocen dos familias de receptores a glutamato (Figura 8). Los metabotrópicos (mGlu), del tipo 7TM, acoplados a proteínas G, se agrupan en tres familias (I, II y III) y ocho subtipos. Por otro lado, la familia de receptores ionotrópicos, de los cuáles existen tres subtipos, son nombrados de acuerdo al ligando exógeno que los activa, siendo N-metil D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), y Kainato (Purves *et al.*, 2001; Siegel *et al.*, 2006).

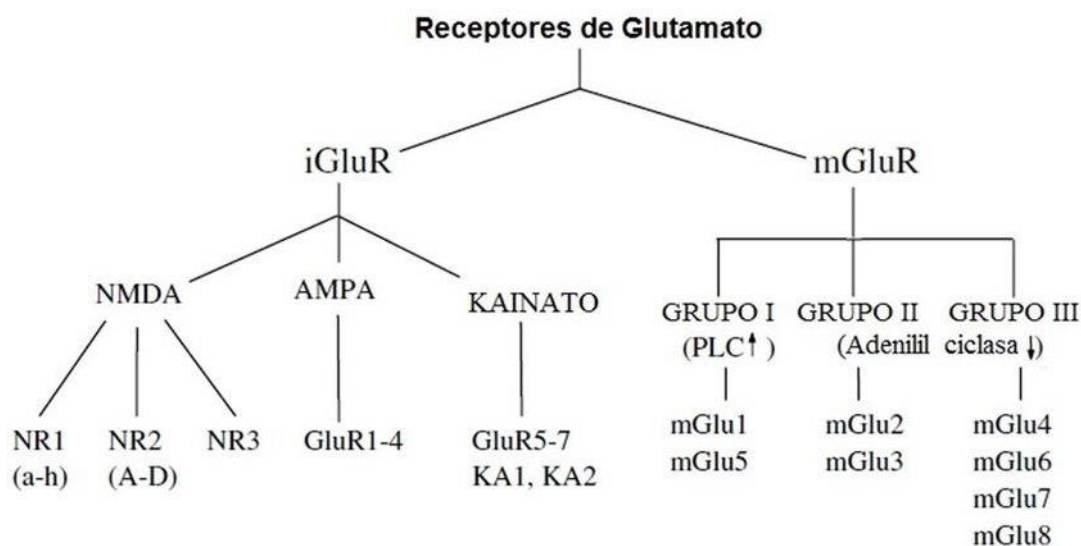


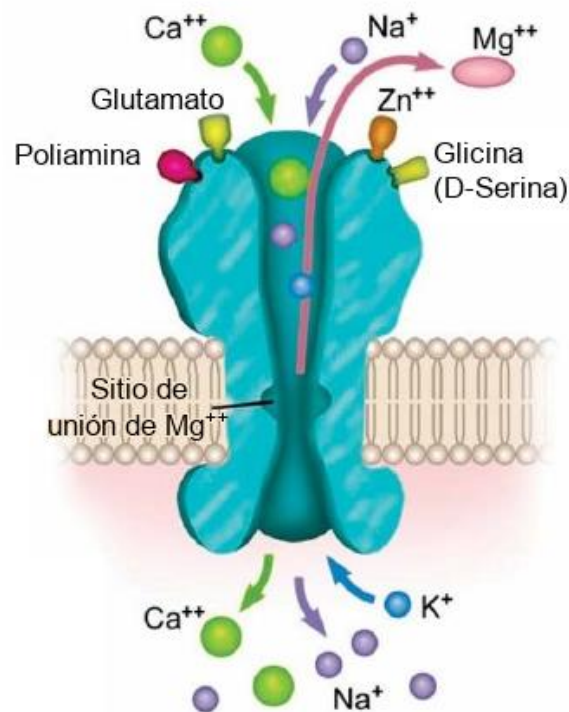
Figura 8. Esquema de la clasificación de los receptores de glutamato. Se dividen en dos grupos: ionotrópicos y metabotrópicos. Modificado de Watkins & Jane, 2006.

### 1.3.1.1.1 Receptor de glutamato tipo NMDA

El receptor NMDA, tiene un papel importante en los procesos de transmisión sináptica excitatoria, plasticidad y excitotoxicidad en el SNC (Cull-Candy *et al.*, 2001).

Este receptor es una proteína integral de membrana tetramérica, que puede formarse por diferentes combinaciones de las subunidades GluN1, GluN2 y GluN3, siendo necesarias dos GluN1 y por lo menos una GluN2 para formar un receptor funcional, es decir pueden ser, diheteroméricos o triheteroméricos (Groc *et al.*, 2006; Köhr, 2006; Paoletti, 2011; 2013).

Todas las subunidades del receptor NMDA, son estructuras modulares que están formadas por dominios semi-autónomos, entre los que se encuentran, dos dominios extracelulares de los cuales uno es el amino-terminal y el otro es el que forma el sitio de unión al ligando (S1 y S4), el dominio transmembrana (TM1, 3 y 4), un asa membranal (TM2) y por último, el dominio intracelular carboxilo-terminal, el cual, está unido a las proteínas de anclaje de los sistemas mensajeros (Traynelis *et al.*, 2010; Gleichman *et al.*, 2012).



*Figura 9. Receptor NMDA que muestra sus principales sitios de unión para agonistas y moduladores alostéricos. La despolarización previa, permite el desprendimiento de Mg<sup>2+</sup> de su sitio de unión, lo que da paso a la entrada de iones Ca<sup>2+</sup> Na<sup>+</sup> y salida de K<sup>+</sup> través del canal. Los diferentes sitios a moduladores alostéricos están representados en el lado extracelular. La conformación del receptor por diferentes subunidades se indica del lado intracelular. Modificada de Von Bohlen & Dermietzel, 2006*

Los receptores tipo NMDA funcionales tienen características generales. Dentro de estas destacan las siguientes: requieren la presencia de dos agonistas, glutamato y glicina o D-serina; son dependientes de voltaje, siendo Mg<sup>2+</sup> el ión que regula este proceso, ya que durante el potencial de membrana en reposo (-80mV), éste se sitúa al centro del canal, evitando el paso de iones, pero tras haber una despolarización (-40mV) éste ión se “desprende” permitiendo la activación del canal y por lo tanto el intercambio iónico. También es un canal con alta permeabilidad a iones Ca<sup>2+</sup> con respecto a los

receptores AMPA y kainato; aunado a esto, el receptor tiene una cinética de activación y desactivación relativamente lenta, en comparación con los receptores AMPA y kainato, debido a las propiedades particulares que le confieren las distintas subunidades GluN2 que lo conforman. Finalmente, su actividad está sujeta a múltiples modulaciones por compuestos, generalmente, pequeños, como iones  $H^+$  y  $Zn^{++}$ , que actúan de forma alostérica, regulando su activación (Cull-Candy *et al.*, 2001; Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004; Dingledine *et al.*, 1999; Paoletti, 2011; 2013; Paoletti & Neyton, 2007).

#### **1.3.1.1.1.1 Subunidad GluN1**

Como se mencionó previamente, éste receptor requiere un co-agonista para su completa activación, entre las moléculas que ejercen esta función se han identificado, hasta el momento, glicina y D-serina, encontrándose en la subunidad GluN1 el sitio de unión en el que estos aminoácidos pueden acoplarse, además de que existen 8 isoformas de ésta subunidad (de GluN1-1a a GluN1-4a y de GluN1-1b a GluN1-4b; Gleichman *et al.*, 2012; Piña-Crespo *et al.*, 2010).

#### **1.3.1.1.1.2 Subunidad GluN2**

Con respecto a la subunidad GluN2, existen 4 isoformas (de GluN2A a GluN2D), las cuales brindan al receptor el sitio de unión a glutamato o NMDA, así como las principales propiedades farmacológicas y biofísicas (Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004). Los diheterómeros de los receptores tipo NMDA más abundantes en las neuronas piramidales de la capa V son los formados por las subunidades GluN1/GluN2A y GluN1/GluN2B (Kumar & Huguenard, 2003). Además, la misma neurona puede expresar receptores NMDA con diferentes isoformas y subunidades. La composición de subunidades puede variar de acuerdo a la diferente localización subcelular (Köhr, 2006; Paoletti, 2011).

El tipo de subunidades GluN2 que forman el receptor se traducen en cambios en la inserción, internalización y/o difusión lateral, siendo los más estables los que contienen la subunidad GluN2A (Groc *et al.*, 2006; Köhr, 2006). Los receptores que contienen la subunidad GluN2A se desensibilizan más rápido en comparación con los que están formados por la subunidad GluN2B, a diferencia de los que contienen las subunidades GluN2C y GluN2D que experimentan poca o casi nula desensibilización (Cull-Candy *et al.*, 2001; Szczurowska & Mares, 2013; Traynelis *et al.*, 2010).

En adición, ha sido ampliamente descrito que sólo las vesículas que contienen a los receptores formados por la subunidad GluN2B son transportadas a la superficie celular exclusivamente por la proteína motora KIF17 (Ally *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2011).

#### 1.3.1.1.1.3 Subunidad GluN3

La última subunidad por mencionar es la GluN3, de la que existen 2 isoformas (GluN3A y GluN3B), las cuales también poseen sitio de unión a glicina y/o D-serina, por lo tanto, un receptor formado exclusivamente por subunidades GluN1/GluN3, sería un receptor de glicina y/o D-serina (Piña-Crespo *et al.*, 2010).

#### 1.3.1.1.2 Serotonina

Por otra parte, otro neurotransmisor que es de interés para el presente trabajo es la 5-HT, el cual es uno de los neurotransmisores más conservados filogenéticamente (Green, 2009) y está relacionado con funciones como: el ciclo sueño-vigilia, procesos de memoria y aprendizaje, así como la regulación del dolor y temperatura corporal, de actividades motora, sexual y neuroendócrina, entre otras (Celada *et al.*, 2001; Muller & Jacobs, 2009; Siegel *et al.*, 2006).

Debido a las funciones en la que está implicada, se han encontrado alteraciones serotoninérgicas en enfermedades psiquiátricas como depresión, esquizofrenia, ansiedad, trastorno obsesivo compulsivo (TOC), migraña y trastornos alimenticios como anorexia, bulimia y obesidad (Coccaro *et al.*, 1990).

De la concentración total de 5-HT en el cuerpo, la mayor parte de esta ejerce su acción de forma periférica y en el SNC sólo se encuentra del 1-2% (Fuster, 2008).

Ya que que no puede atravesar la barrera hemato-encefálica, ésta indolamina debe ser sintetizada en las neuronas del SNC a partir del precursor triptófano, un aminoácido esencial, por las enzimas triptófano hidroxilasa y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (Figura 10). La 5-HT es almacenada en vesículas, a las que es ingresada mediante un transportador vesicular de monoaminas en las neuronas serotoninérgicas. Una vez en el interior de la vesícula, permanece unida a una proteína específica denominada en inglés *serotonin binding protein* o SBP (Barnes & Neumaier, 2011; Jacobs & Azmitia, 1992).

Posteriormente, la 5-HT y otras sustancias contenidas en las vesículas se liberan al espacio sináptico mediante un proceso de exocitosis, tras la llegada de un impulso eléctrico a la neurona serotoninérgica (Barnes & Sharp, 1999a). Después de su liberación, la 5-HT puede ser recapturada por transportadores específicos (SERT, por sus siglas en inglés) o degradada por la MAO (principalmente la isoforma A) y la aldehído deshidrogenasa (Barnes & Neumaier, 2011; Green, 2009), dando como metabolito final el ácido 5-hidroxi-indólico (5-HIAA) que es eliminado vía renal (Figura 10) y su cuantificación se considera el principal marcador de la concentración de 5-HT en el cuerpo (Von Bohlen & Dermietzel, 2006).

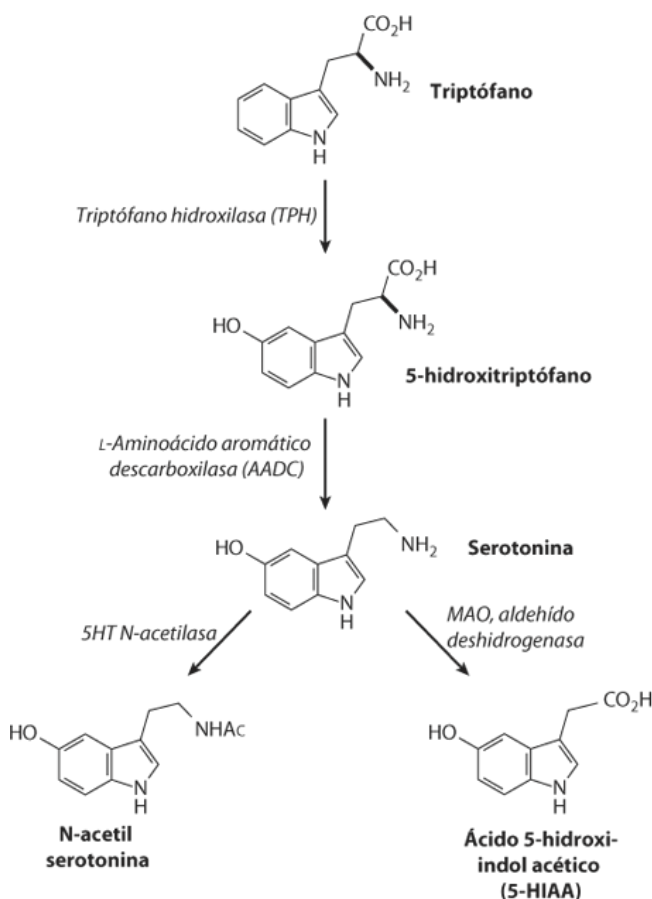


Figura 10. Biosíntesis y degradación de la 5-HT a partir de triptófano. Modificado de Trimble 2002.

Las neuronas serotoninérgicas fueron descritas por primera vez por Dahlström y Fuxe (1964), quienes las identificaron agrupadas en los núcleos del rafé, que son nueve núcleos de B1 a B9: *pallidus* (B1, RPa), *obscurus* (B2, ROb), *magnus* (B3, RMg), *gris central de la médula oblongata* (B4), *pontis medial* (B5, PoM), *pontis dorsal* (B6, PoD), *rafé dorsal* (B7, RD), *rafé medial* (B8, RM), y *lemniscus medial* (B9), ubicados en el tronco del encéfalo, cerca de la línea media (Törk, 1990). Siendo el más importante el

RD en cuanto a número de células. Los núcleos 5 al 9 (con respecto a su numeración) proyectan vías ascendentes dentro del encéfalo y los núcleos 1 a 4 lo hacen de manera descendente hacia la médula espinal. El RD y RM, pese a ser un número reducido de neuronas, son los que inervan en mayor medida casi la totalidad del cerebro, destacando áreas como la corteza Cg1, IL y orbital (Celada *et al.*, 2001; Gabbott *et al.*, 2005; Vázquez-Borsetti *et al.*, 2009, 2011).

Como se mencionó previamente, existe una conectividad estructural, funcional y recíproca de los núcleos del raquí con la CPF, y es así como la 5-HT llega a ésta área por el proceso de liberación por volumen desde las proyecciones de las neuronas serotoninérgicas (Celada *et al.*, 2001; M. Puig *et al.*, 2004; Von Bohlen & Dermietzel, 2006).

#### **1.3.1.1.2.1 Receptores serotoninérgicos**

Existen 15 subtipos de receptores a 5-HT (Figura 11) que están clasificados en siete familias (Barnes & Sharp, 1999a; Hoyer *et al.*, 1994; David E Nichols & Nichols, 2008). Con excepción del 5-HT<sub>3</sub>, el cual es un canal iónico, los receptores a 5-HT están acoplados a proteínas G, formados por siete dominios transmembranales, teniendo el extremo amino terminal al exterior de la membrana y el dominio carboxilo-terminal al interior de ésta. La activación de estos receptores desencadena diversas vías de señalización en función del tipo de proteína G al que se encuentran acoplados (M. V. Puig & Gullledge, 2011).

Figura 11. Clasificación de los receptores serotoninérgicos

Familias	Subtipos	Acople a proteína G	Mecanismo	Efecto principal
<b>5-HT<sub>1</sub></b>	5-HT <sub>1A</sub> , 5HT <sub>1B</sub> , 5-HT <sub>1D</sub> , 5-HT <sub>1E</sub> , 5-HT <sub>1F</sub>	PG <sub>i/o</sub>	Disminuye los niveles celulares de AMPc	Inhibidor
<b>5-HT<sub>2</sub></b>	5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2B</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>	PG <sub>q/11</sub>	Incrementa los niveles celulares de IP3 y DAG	Excitador
<b>5-HT<sub>4</sub></b>		PG <sub>s</sub>	Incrementa los niveles intracelulares de AMPc	Excitador
<b>5-HT<sub>5</sub></b>	5-HT <sub>5A</sub> , 5-HT <sub>5B</sub>	PG <sub>i/o</sub>	Disminuye los niveles celulares de AMPc	Inhibidor
<b>5-HT<sub>6</sub></b>		PG <sub>s</sub>	Incrementa los niveles intracelulares de AMPc.	Excitador
<b>5-HT<sub>7</sub></b>		PG <sub>s</sub>	Incrementa los niveles intracelulares de AMPc.	Excitador
<b>5-HT<sub>3</sub></b>		Ionotrópico de canales de Na <sup>+</sup> Ca <sup>++</sup> y K <sup>+</sup>	Despolarización de la membrana.	Excitador

Tabla de los receptores serotoninérgicos agrupados por familia, donde se muestra la principal proteína G a la que estos se acoplan así como el principal vía de señalización que desencadenan (Muller & Jacobs, 2009).

### 1.3.1.1.2.2 Receptores serotoninérgicos en CPF

Como ya se describió previamente, en la CPF existe una organización columnar formada por microcircuitos básicos, en el que las neuronas piramidales contienen distintos segmentos, muy especializados, que son funcionalmente controlados por distintas interneuronas GABAérgicas (Jakab & Goldman-Rakic, 1998).

Las neuronas piramidales de la CPFm expresan receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> (Figura 12), que son somatodendríticos y además tienen una distribución polarizada, es decir, los receptores 5-HT<sub>2A</sub> tienen una localización preferente hacia la dendrita apical y a lo largo de ésta (DeFelipe *et al.*, 2001; Jakab & Goldman-Rakic, 1998). Por otra parte, los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, están más extendidos hacia las dendritas basales y el cono axonal, una región esencialmente importante para el control de la excitabilidad piramidal (Aghajanian & Marek, 1999; Jacobs & Azmitia, 1992; Riad *et al.*, 2000). En adición, ambos receptores también se han descrito en las neuronas GABAérgicas (David E Nichols & Nichols, 2008; M. V. Puig & Gullledge, 2011; Roth *et al.*, 1997; Santana *et al.*, 2004).

Con respecto a la población de interneuronas, cabe mencionar que expresan el receptor 5-HT<sub>3</sub> en mayor proporción en las capas I a III, así como receptores 5-HT<sub>1A</sub> o 5-HT<sub>2A</sub>, sin embargo, una neurona sólo puede expresar uno de los últimos dos mencionados (M. Puig *et al.*, 2004; M. V. Puig & Gullledge, 2011).

En cuanto a la población celular mayoritaria, que corresponde a las neuronas piramidales, la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> predomina en las capas V y VI, y el receptor 5-HT<sub>2A/C</sub> en las capas III y V, entonces, dentro de la capa V, los receptores serotoninérgicos se expresan en alrededor del 60% de células piramidales y, en el 80% están co-localizados (Amargós-Bosch *et al.*, 2004). Por lo que su activación induce respuestas tanto inhibitorias como excitatorias mediante sus correspondientes mecanismos de acción (Celada *et al.*, 2001; M. V. Puig & Gullledge, 2011; Santana *et al.*, 2004).

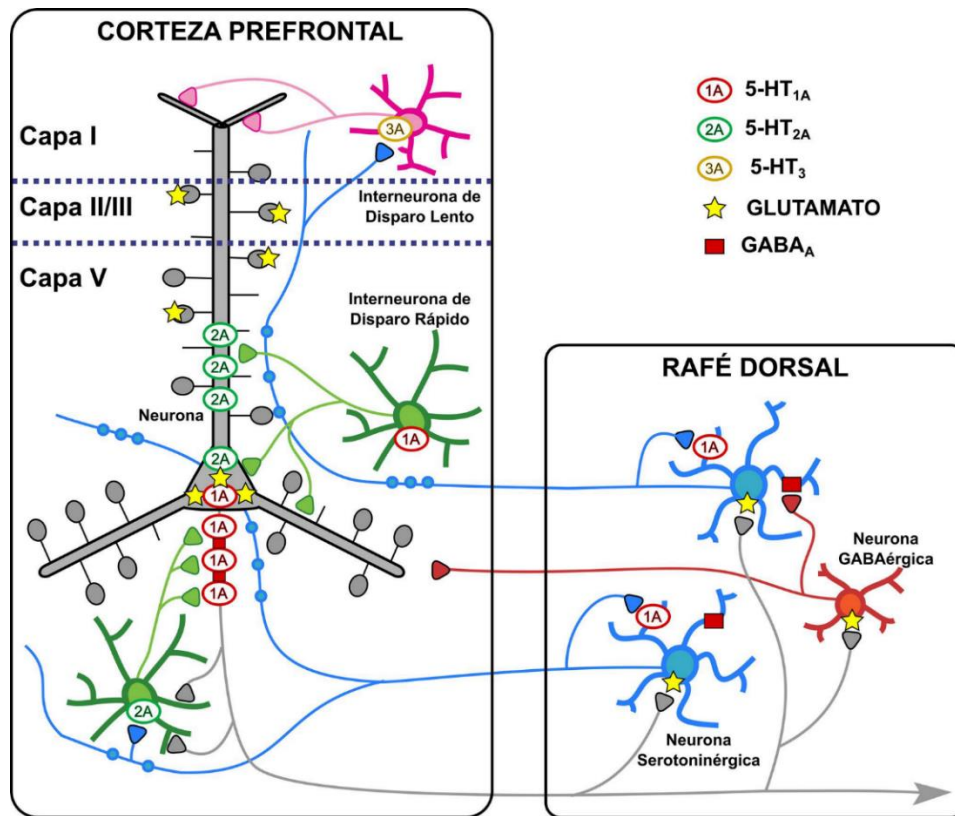


Figura 12. Representación esquemática de la modulación serotoninérgica de la CPF. Las neuronas piramidales de la CPF proyectan densamente a los núcleos del rafe, por lo que modulan la actividad de las neuronas serotoninérgicas tanto directa como indirectamente. En cambio, la 5-HT endógena modula la actividad de las células piramidales, a través de la activación de múltiples receptores serotoninérgicos expresados en la neocorteza, entre los que destacan los 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> por ser los que desempeñan el papel principal. Destaca la localización preferencial de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> hacia la dendrita apical y la de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> hacia el cono axonal (modificado de Celada et al., 2013).

#### 1.3.1.1.2.2.1 Receptor 5-HT<sub>1A</sub>

Por su parte, el receptor 5-HT<sub>1A</sub> está acoplado a una proteína de tipo Gi, es decir, inhibe a la enzima adenilato ciclasa, con lo que, disminuye la concentración intracelular de AMP cíclico (AMPc), esto provoca una respuesta hiperpolarizante en la membrana al abrir canales de potasio rectificadores (Kir 3.x) También está implicado en otros mecanismos moleculares como: la regulación de la actividad de fosfolipasa C, la inhibición de la acumulación de CaM kinasa II, la disminución de las conductancias de Ca<sup>++</sup>, la activación de kinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAP) y las Src kinasas (Figura 13), entre otros (Raymond et al., 2001). Esta capacidad del receptor de regular vías alternas, se debe a sus propiedades de selectividad funcional (Chilmonczyk et al., 2015).

Aunado a lo anterior, el receptor 5-HT<sub>1A</sub> tiene función tanto de autorreceptor presináptico como de receptor post-sináptico (Barnes & Sharp, 1999a). Además la afinidad del receptor por 5-HT es la más alta de todos los receptores serotoninérgicos, está en el orden de picomolar (Barnes & Sharp, 1999a). En contraste, tiene menor afinidad por los alucinógenos (McKenna *et al.*, 1990; David E. Nichols, 2004).

Asimismo, existe una regulación del receptor en cuanto a expresión y relación entre auto/heterorreceptores, así como en las vías de señalización alternas que se activan. Esta regulación se modifica por la administración de fármacos agonistas o antagonistas (totales o parciales). Por ejemplo, la activación sostenida de estos receptores puede dar paso a procesos de desensibilización e internalización, con propiedades particulares que corresponden al tipo de receptor (auto- o heterorreceptor) y, en consecuencia, la modificación en la expresión de la contraparte afectada por desensibilización o internalización (Albert *et al.*, 1996; Chiltonczyk *et al.*, 2015).

La regulación previamente mencionada, es necesaria en función de que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> están implicados en trastornos de ansiedad, el comportamiento adictivo, déficits cognitivos y afectivos como depresión (Azmitia *et al.*, 1996; Kaufman *et al.*, 2016; Yukihiro, 2011).

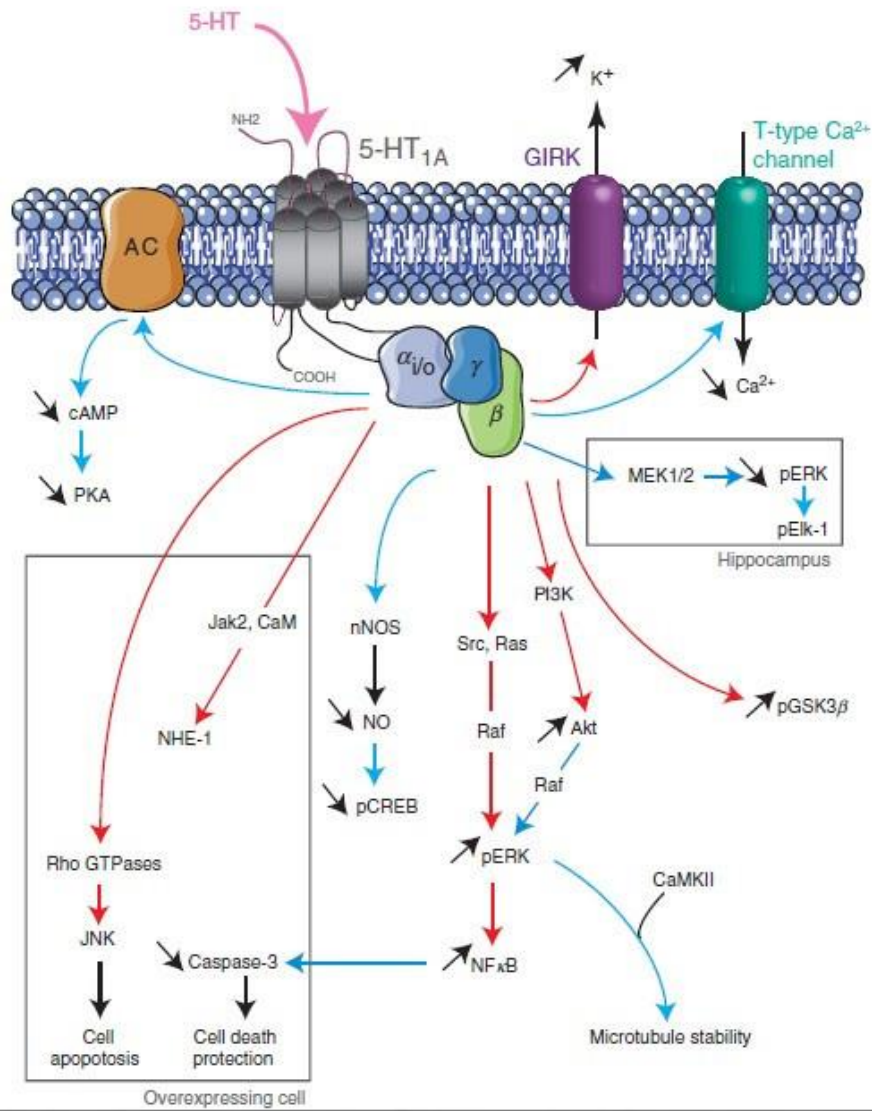


Figura 13. Vías de señalización del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. El receptor 5-HT<sub>1A</sub> está negativamente acoplado a la vía de señalización AC/PKA/AMPC a través de las proteínas Gi. Su activación disminuye la liberación de neurotransmisores en las neuronas mediante cambios en las conductancias de K<sup>+</sup> (incremento) y Ca<sup>2+</sup> (disminución). La estimulación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> también regula la fosforilación de la ERK. (Flechas rojas: estimulación; flechas azules: inhibición). Modificado de Masson et al., 2012.

### 1.3.1.1.2.2.2 Receptor 5-HT<sub>2A/C</sub>

Los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Figura 14) y 5-HT<sub>2C</sub> (Figura 15) al ser de la misma familia, comparten muchas características, además debido a que también coinciden en cuanto a localización, resulta complicado aislar sus efectos, motivo por el que es válido referirse a ellos como 5-HT<sub>2A/C</sub> (Rojas-Corrales *et al.*, 2007).

El receptor 5-HT<sub>2A/C</sub> está acoplado a una proteína del tipo Gq/11, cuyo principal mecanismo de acción es activar a la fosfolipasa C (PLC tipo β) resultando en una elevación de inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y en consecuencia, el aumento de la concentración de calcio intracelular. Además, estos efectos pueden resultar en la activación de canales de calcio tipo L y la estimulación de la proteína kinasa tipo C (PKC), generando despolarización de la membrana (Anji *et al.*, 2001). Sin embargo, este receptor también está implicado en la regulación de diversas cascadas de señalización, como la activación de otras fosfolipasas como la A<sub>2</sub> y D, generando segundos mensajeros como diacilglicerol (DAG) y ácido araquidónico (AA), entre otros, así como inducir la fosforilación de la kinasa regulada de manera extracelular (ERK) a través de un proceso mediado por β-arrestinas (Raymond *et al.*, 2001).

Aunado a lo anterior, este receptor, es altamente controlado mediante procesos de internalización y regulación negativa por mecanismos complejos activados tanto por agonistas como antagonistas (Anji *et al.*, 2001; Eison & Mullins, 1995; Gray & Roth, 2001; Raymond *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 1997).

En adición, este receptor tiene una afinidad relativamente baja por la 5-HT, que se encuentra en el orden de nanomolar, en comparación con el receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Barnes & Sharp, 1999a). En contraste, todos los alucinógenos tienen gran afinidad, en el orden de nanomolar, por este receptor, por lo que es el principal receptor implicado en el mecanismo de acción de éstas moléculas (Buckholtz *et al.*, 1988a; McKenna *et al.*, 1990; David E. Nichols, 2004, 2016). A su vez, se han encontrado alteraciones de este receptor en trastornos como depresión, esquizofrenia, TOC y ansiedad (Chagraoui *et al.*, 2016; Wirth *et al.*, 2017).



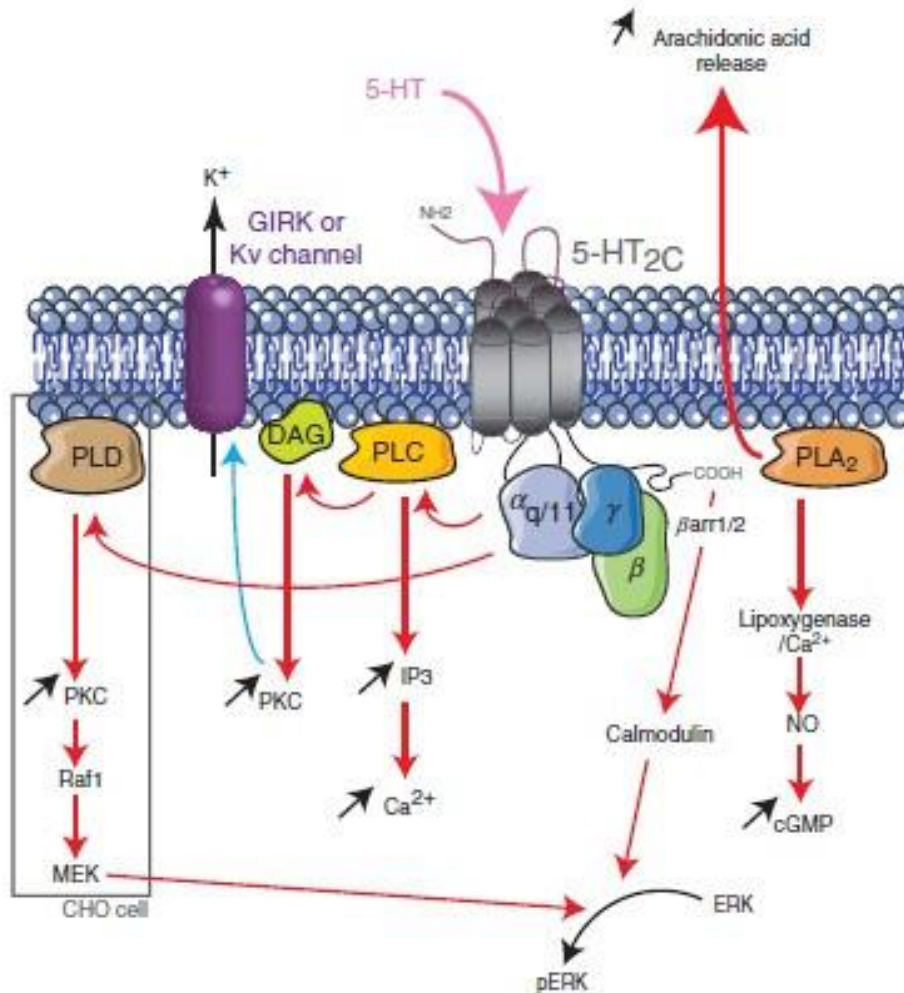


Figura 15. Vías de señalización para el receptor 5-HT<sub>2C</sub>. El receptor 5-HT<sub>2C</sub> está acoplado a PLC en neuronas y su activación da paso a la acumulación de IP<sub>3</sub>. Esto inhibe la conductancia de K<sup>+</sup>. Incluso puede estar acoplado a PLD en células transfectadas. (Flechas rojas: estimulación; flechas azules: inhibición). Modificado de Masson et al., 2012

### 1.3.1.1.2.3 Modulación serotoninérgica de la CPF

La 5-HT ejerce efectos complejos sobre la actividad de las neuronas piramidales de la CPF (**iError! No e encuentra el origen de la referencia.**), con un dominante papel inhibitorio, el mecanismo por el cuál predomina este efecto fue descrito por Yuen (2008; 2005) denotando con sus trabajos que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> modulan la corriente del receptor NMDA a través de la reducción de la actividad de la ERK1/2, que produce un decremento en la fosforilación de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP2) provocando una interferencia con las proteínas motoras mediadoras del tráfico vesicular al desestabilizar los microtúbulos en las dendritas, mediante la interacción con la proteína motora KIF17.

Lo anterior, entonces, genera una reducción en el número funcional de receptores NMDA formados por las subunidades GluN1 y GluN2B que se expresan en la superficie celular (Yuen *et al.*, 2008; 2005).

En contraparte, la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> induce la fosforilación de la ERK a través de un mecanismo dependiente de  $\beta$ -arrestinas/Src/dinamina, el cuál recluta y activa componentes de la cascada de las MAP kinasas, propiciando así la activación de la ERK, teniendo como resultado final la re-estabilización del transporte mediado por los microtúbulos, es decir, la contraposición al efecto de la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Figura 16, Yuen & Yan, 2007).

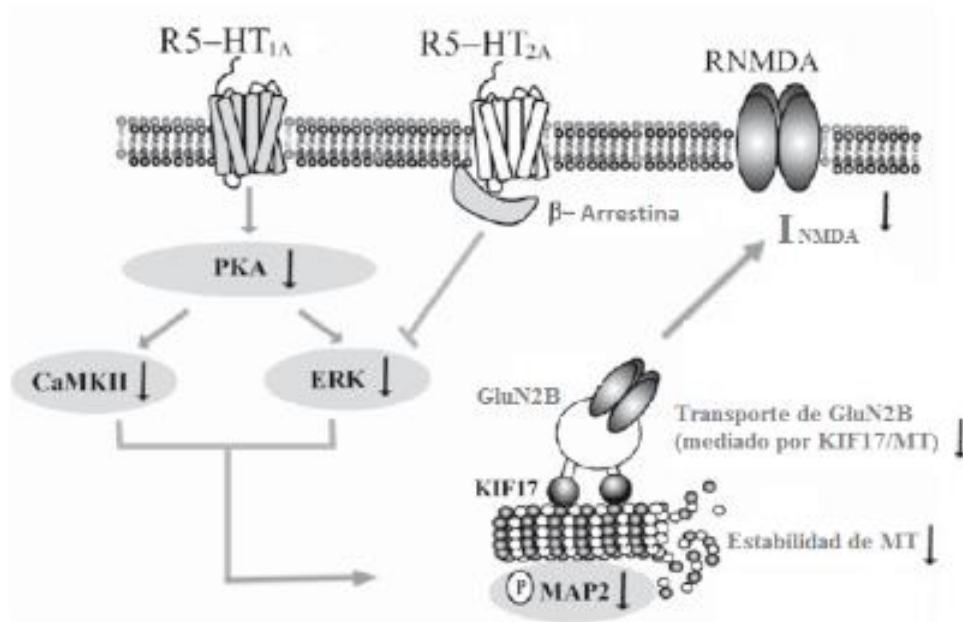


Figura 16. . Esquema que representa la modulación de la  $I_{NMDA}$  causada por 5-HT. La activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> produce una disminución de la  $I_{NMDA}$ , como resultado de la disminución de la actividad de la kinasa regulada por señal extracelular (ERK). Esto da paso a una desestabilización de los microtúbulos (MT) que provocan una alteración del transporte vesicular de los receptores tipo NMDA formados por la subunidad GluN2B. La activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> se puede contraponer a este efecto, al aumentar la actividad de ERK, a través de la vía de las  $\beta$ -arrestinas. Modificado de Yuen & Yan 2007.

Finalmente, la 5-HT inhibe la actividad piramidal a través de la activación de interneuronas GABAérgicas que expresan receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>3</sub> (Martín-Ruiz *et al.*, 2001).

En resumen, la 5-HT, a través de sus receptores, regula el grado de excitabilidad en la CPF, principalmente, por su acción sobre el receptor NMDA de las neuronas glutamatérgicas (Figura 12, Andrade, 2011).

### 1.3.2 Selectividad funcional

Por lo que se refiere a la selectividad funcional este es un proceso que se define como la capacidad de un receptor para modular las cascadas de transducción intracelular, dependiendo de su actividad intrínseca, es decir, su estado de activación (Berg *et al.*, 2005), así como del efecto pleiotrópico (fenómeno por el que un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados; He & Zhang, 2006; Raote *et al.*, 2013), además de la afinidad por el ligando (Kobilka, 2007; Wacker *et al.*, 2013).

En adición, ahora se sabe que un receptor puede desencadenar efectos de forma “espontánea”, es decir, sin la presencia de un agonista, este proceso es un evento probabilístico que está en función del estado de activación del receptor, el cual puede modificarse mediante procesos de isomerización en concordancia con la naturaleza proteica del receptor que se encuentra embebido en una membrana dinámica, y se define como actividad constitutiva (Berg *et al.*, 2005; Christopoulos & Kenakin, 2002; Kenakin, 2014; Kobilka, 2007; M. Teitler *et al.*, 2002).

Con base en estas premisas, se han desarrollado modelos matemáticos como aproximaciones simples del comportamiento de los receptores conocidos como modelos de “multi-estados”. De los cuales, el modelo más sencillo es también denominado como “modelo de dos-estados”, mismo que refiere que la población de receptores está compuesta por los receptores en equilibrio entre dos conformaciones, el estado activo y el inactivo (Berg *et al.*, 2005; Christopoulos & Kenakin, 2002; Hall, 2000).

Las propiedades de selectividad funcional corresponden, principalmente, a los receptores acoplados a proteínas G, como los mencionados receptores serotoninérgicos, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, y es así como

un ligando desencadena efectos heterogéneos a través del mismo receptor, ya sea desensibilización, regulación hacia abajo, internalización, reciclaje, etc. (Raote *et al.*, 2013; Milt Teitler *et al.*, 2002)

De forma adicional, la vía de señalización que se desencadena depende del estado de actividad intrínseca del receptor (Berg *et al.*, 2005; Urban *et al.*, 2007). Además, este puede tener múltiples variantes funcionales (Masson *et al.*, 2012 reporta 24 isoformas del receptor 5-HT<sub>2C</sub>) que se expresan mediante el proceso de edición de ARNm, el cual, es regulado por la misma 5-HT. La edición del ARNm tiene, por lo tanto, una implicación importante en los procesos de transducción serotoninérgica (Bockaert *et al.*, 2006).

Por ejemplo, la edición del receptor 5-HT<sub>2C</sub>, que se da, principalmente, por la desaminación de los residuos de adenosina (Werry *et al.*, 2008), tiene como resultado la disminución en la potencia del efecto agonista y/o la eficacia de la activación de la señalización mediada por proteínas G, así como la liberación de neurotransmisores mediada por éste receptor (Behm & Öhman, 2016; Masson *et al.*, 2012).

Aunado a lo anterior, el grado de edición es proporcional a la actividad constitutiva con que cuenta (completamente editado equivale a poca o nula actividad constitutiva) y está directamente correlacionada con la habilidad de las variantes para asociarse con las  $\beta$ -arrestinas. Un receptor no editado tiene gran actividad constitutiva y se une a las  $\beta$ -arrestinas de forma independiente a la unión al agonista (de forma espontánea), proceso que resulta en la internalización constitutiva del receptor y su predominancia de forma intracelular. Mientras que los receptores completamente editados se encuentran en gran medida anclados a la membrana. En correspondencia, los receptores con edición intermedia se encuentran de ambas formas (Behm & Öhman, 2016; Masson *et al.*, 2012; Werry *et al.*, 2008).

El mecanismo de unión a las  $\beta$ -arrestinas como proteínas de anclaje, es dependiente de la fosforilación del receptor por receptores acoplados a proteínas G kinasas (GRKs), y es el proceso que promueve su internalización (Bockaert *et al.*, 2006; Gray & Roth, 2001).

En suma, la actividad de los receptores metabotrópicos, depende, principalmente, de su localización, conformación alostérica, actividad intrínseca, nivel de fosforilación y grado de edición.

#### 1.4 Mecanismo de acción de los alucinógenos

Durante los últimos años se han propuesto teorías “globales” con respecto al mecanismo de acción de los alucinógenos, donde se considera al cerebro como un sistema complejo y con alto dinamismo que a su vez está formado por varias unidades interconectadas entre sí. Por ende, cuenta con las propiedades emergentes que corresponden a este tipo de sistemas, entre algunas que se pueden mencionar está la auto-organización, cuenta con un grado de entropía, es perturbable, posee estados transitorios de estabilidad y es propenso a respuestas en “cascada” que se propagan por todo el sistema. Por lo que, el efecto de los alucinógenos, corresponde a una perturbación del sistema que inicia en un punto y cuya respuesta dará paso a cascadas que transcurrirán hacia todo el sistema, dando paso a un aumento del nivel de entropía de éste (Robin Lester Carhart-Harris *et al.*, 2014; Lebedev *et al.*, 2016; David E. Nichols *et al.*, 2017; Tagliazucchi *et al.*, 2014, 2016).

Sin embargo, para dar paso a cualquier efecto sistémico, debe existir un primer blanco fisiológico, de tal modo que los alucinógenos actúan mediante la activación de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>1A</sub> (David E. Nichols, 2004, 2016), mencionados de acuerdo a su constante de afinidad (de mayor a menor, McKenna *et al.*, 1990).

Como se explicó previamente, el hecho de que exista una alta afinidad de los receptores 5-HT<sub>2</sub> por las triptaminas tiene como resultado una unión ligando-receptor de mayor duración, con respecto a la unión 5-HT-receptor. Ha sido descrita la vía de las  $\beta$ -arrestinas, como una de las vías alternas que desencadenan las triptaminas alucinógenas, proceso que promueve la desensibilización e internalización tardía del receptor y que pone de manifiesto su selectividad funcional (Masson *et al.*, 2012).

Aunado a lo anterior, los alucinógenos causan un incremento de los niveles extracelulares del principal neurotransmisor excitador, glutamato, en la corteza (Scruggs *et al.*, 2003). Así como también se ha descrito la participación de los autorreceptores mGluR II/III (Gewirtz & Marek, 2000) y de un heterodímero que se forma entre los receptores mGlu2 y 5-HT<sub>2A</sub> (González-Maeso *et al.*, 2008). Finalmente, se han sugerido mecanismos comunes para los efectos de compuestos alucinógenos y psicosis naturales, que implican una interrupción del procesamiento de la información tálamo-cortical (González-Maeso *et al.*, 2007; González-Maeso & Sealfon, 2009).

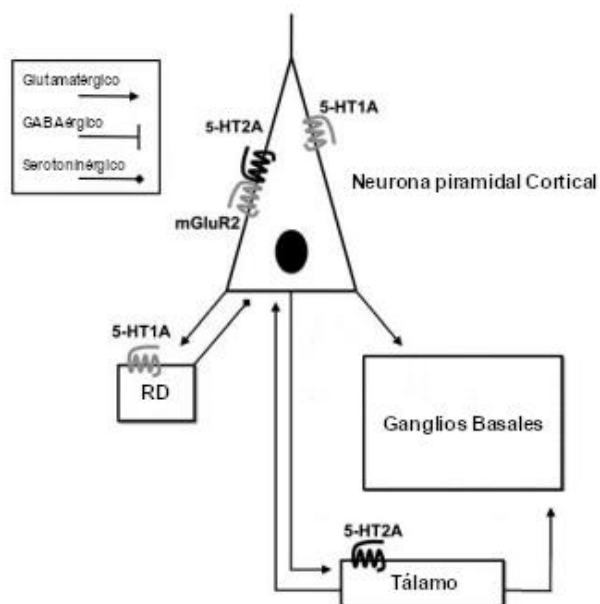


Figura 17. Representación esquemática de los subtipos de receptores acoplados a proteínas G y los circuitos neuronales implicados en el mecanismo de acción de los alucinógenos. Se ha sugerido, a través de diversas preparaciones experimentales, que los receptores 5-HT<sub>2A</sub> expresados en las neuronas piramidales corticales son necesarios para desencadenar los efectos específicos, tanto celulares como conductuales, que generan los alucinógenos. Estas investigaciones han sido independientes y se han explorado desde diversos enfoques, principalmente por registros electrofisiológicos en rebanadas corticales de rata y ratones modificados genéticamente para la expresión del receptor 5-HT<sub>2A</sub> (aumento de expresión o knock-out). En las neuronas piramidales de la CPF se expresan los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en alta densidad. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> están implicados en la inhibición del rafe dorsal (RD) lo que se traduce en disminución de la liberación de 5-HT. Aunado a esto, ya se ha descrito que el dímero que se forma entre los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y mGlu II tiene una implicación en los efectos conductuales causados por compuestos alucinógenos (modificada de González-Maeso & Sealfon, 2009)

#### 1.4.1 Modelos animales de alucinación: HTR y WDS

Los modelos animales no pueden representar las perturbaciones o alteraciones en los procesos de percepción de tiempo, cognición y estado de ánimo que se reportan en humanos como efectos que generan los alucinógenos. Sin embargo, los roedores reflejan ciertas conductas que pueden aproximarse a los efectos en humanos. La administración sistémica de compuestos alucinogénicos en ratas y primates no humanos provocan; cambios en la conducta exploratoria, acicalamiento, interrupción de respuestas operativas, sacudidas de cabeza (*Head-Twitch* y *Wet-Dog-Shake*), respuestas reflejas de rascado (*ear scratch response*) e hipertermia (L. M. Adams & Geyer, 1985; Bedard & Pycock, 1977; Corne & Pickering, 1967; Halberstadt & Geyer, 2011, 2013, 2016).

En roedores no podemos hablar del fenómeno de alucinación, sin embargo, si existe un marcador de la activación de los receptores serotoninérgicos que se genera exclusivamente por moléculas alucinógenas, por la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> a través de la vía de las  $\beta$ -arrestinas (Masson *et al.*, 2012). Esta respuesta en ratones es conocida como sacudida de cabeza o cabeceo (*head-twitch; HT*) y en ratas como “sacudida de perro mojado” abreviada como WDS por su nombre en inglés *wet-dog shake* (Green, 2009).

La respuesta HT es un movimiento de la cabeza de rotación rítmico y paroxístico (Canal & Morgan, 2012; Halberstadt & Geyer, 2011), por otra parte, la respuesta WDS, es un movimiento paroxístico de la cabeza, cuello y tronco (Bedard & Pycock, 1977). En suma, respuestas HT y WDS ocurren en roedores como marcador de la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub>.

## 1.5 Estudios con psilocina

A pesar de la existencia de modelos animales para el estudio del efecto de los compuestos alucinógenos, gran parte del efecto de estos fármacos requiere de la interpretación del sujeto que se somete a experimentación, información que no pueden brindar los modelos animales. Por esta razón, gran parte de la investigación se ha centrado en ensayos clínicos en humanos, los cuales en algunas ocasiones proporcionan información faltante de lo ya realizado en animales y en otras sientan las bases para nuevas investigaciones. Es decir, existe una dinámica de retroalimentación entre los ensayos clínicos en humanos y la experimentación animal.

Dicho lo anterior, y como al inicio de este trabajo se mencionaba, el estudio con alucinógenos, en particular con psilocina, fue retomado hace menos de dos décadas con un nuevo auge en su aplicación terapéutica. Por ejemplo, se ha propuesto a la psilocibina como tratamiento efectivo en estudios contra la adicción a la nicotina (Johnson, 2014), contra el alcoholismo (Bogenschutz *et al.*, 2015), en la disminución de ansiedad en pacientes con cáncer terminal (Griffiths *et al.*, 2016), TOC (Moreno *et al.*, 2006) y pacientes con depresión (Robin L Carhart-Harris *et al.*, 2016).

Aunado a la investigación acerca de los posibles usos terapéuticos de psilocina ha surgido la necesidad de encontrar las dosis más adecuadas para estos usos proponiéndose desde dosis muy bajas o sub-alucinogénicas, debido a que, como su nombre lo indica, no generan los efectos alucinatorios y de

alteración de las funciones mentales y cognitivas, hasta dosis altas, incluyendo dosis medianamente bajas, con poca intensidad de los efectos ya mencionados (Matsushima, Eguchi, *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2006).

En adición a lo anterior, los tratamientos han tenido una duración desde dosis únicas, hasta períodos semanales, e incluso usando un par de dosis separadas por una semana (Robin L Carhart-Harris *et al.*, 2016, 2017; Griffiths *et al.*, 2016; Matsushima, Shirota, *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2006).

Finalmente, a través del uso de alucinógenos en humanos se busca también contribuir a dilucidar la relación existente entre la mente y el cerebro, a través de estudios como los realizados por los equipos de Franz Vollenweider (1997) y Efi Gouzoulis-Mayfrank (1999; 1997), y recientemente el de Carhart-Harris (2017), quienes han realizado estudios de imagenología cerebral *in vivo* a personas bajo el efecto de psilocina, con los que se han propuesto correlatos entre las alteraciones en el estado de ánimo y pensamiento con la función cerebral, a su vez Carter (2007) reportó los efectos en la rivalidad binocular que también tiene correlato con procesos cognitivos.

## 2 Justificación

Desde la descripción de la estructura química de los compuestos alucinógenos, se han realizado investigaciones para dilucidar su principal mecanismo de acción, denotando que una de las áreas que contribuye a sus efectos es la CPF, relacionada en muchos procesos cognitivos y funciones cerebrales superiores, y la vía primaria por la que participa son los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/C</sub> y 5-HT<sub>1A</sub> ya que es donde se encuentra la mayor densidad de ellos (González-Maeso *et al.*, 2007; David E. Nichols, 2004, 2016; F. Vollenweider *et al.*, 1997).

Los trabajos mencionados en la introducción, se basan en el principal mecanismo de acción, sin embargo, hacen una exploración por estructuras o regiones completas, por ejemplo, la CPF (J. Adams, 2009), amígdala (Kraehenmann *et al.*, 2015), hipocampo (Moldavan *et al.*, 2001); o a nivel de SNC completo mediante estudios de imagenología (Robin L Carhart-Harris *et al.*, 2017; Gouzoulis-Mayfrank *et al.*, 1999; F. Vollenweider *et al.*, 1997). Así como la evaluación de efectos conductuales tanto en modelos animales de enfermedades (Matsushima, Shirota, *et al.*, 2009) y pacientes humanos enfermos (Carbonaro *et al.*, 2016; Carter *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2006).

Sin embargo, no existe hasta ahora en la literatura una caracterización de los efectos individuales de las neuronas piramidales aisladas de las capas V/VI de la CPF, que se generan como resultado de una exposición de las triptaminas contenidas en el hongo, así como de sus efectos neuromoduladores, como una aproximación para comprender mejor las respuestas globales del sistema que se generan después del efecto.

Por lo que en este trabajo se propone, evaluar electrofisiológicamente los cambios en las corrientes iónicas activadas por glutamato tipo NMDA, mediador de la excitabilidad neuronal, así como los efectos neuromoduladores serotoninérgicos sobre el receptor a NMDA, que se generan 24 horas después de una exposición a dosis bajas, medianamente bajas y altas del extracto del hongo *Psilocybe cubensis*, como una aproximación de la respuesta en el SNC que causan los alucinógenos.

### 3 Hipótesis

Si la administración única del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* produce respuestas a corto plazo en sistema nervioso central evaluadas por la actividad conductual WDS, dichos cambios modificarán las características de las corrientes activadas por NMDA, así como la modulación por serotonina sobre éstas corrientes al evaluarse 24 horas después en las neuronas piramidales agudamente disociadas de la capa V/VI de la corteza prefrontal.

## 4 Objetivos

### 4.1 General

Caracterizar el efecto de la administración del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis*, tras 24 horas, sobre las corrientes activadas por NMDA y la modulación serotoninérgica de dichas corrientes en neuronas piramidales agudamente disociadas de la capa V/VI de la corteza prefrontal de rata.

### 4.2 Particulares

1. Estudiar la respuesta WDS en rata a diferentes dosis del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* (0.003, 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 mg/kg de peso).
2. Caracterizar las corrientes iónicas activadas por NMDA en las neuronas piramidales agudamente disociadas de CPF de ratas, mediante el análisis de la amplitud del pico, del estado estacionario, la relación estado estacionario/pico y la constante de tiempo de desensibilización de la corriente en una curva dosis-respuesta a NMDA (0.3, 1, 3, 10, 30, 10 y 300  $\mu$ M) 24 horas después de ser administradas con las dosis 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3mg/kg de peso el extracto metanólico de *Psilocybe cubensis*.
3. Evaluar la modulación por serotonina de las corrientes activadas por NMDA en las neuronas de ratas mediante el análisis de la amplitud del pico, del estado estacionario, la relación estado estacionario/pico y la constante de tiempo de desensibilización 24 horas después de ser administradas con las dosis 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3mg/kg de peso el extracto metanólico de *Psilocybe cubensis*.

## 5 Metodología

Los procedimientos fueron llevados a cabo en animales procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y cumpliendo lo establecido en la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

De acuerdo a las bases de experimentación preclínicas y al criterio de elección de una especie pequeña, fue seleccionada la rata como sujeto de experimentación ya que, las dimensiones fisiológicas de esta especie, en comparación con el ratón, nos brindan mayor cantidad de material biológico disponible (rebanadas que incluyen la CPF de 350nm de grosor) reduciendo así la cantidad de animales requeridos. De esta especie se ha seleccionado la cepa Wistar ya que para extraer el área requerida para los registros electrofisiológicos se toma como referencia el libro *The Rat Brain* (Paxinos & Watson, 1986) que basa la información presentada en la cepa Wistar. Además, en el Laboratorio de Neuromodulación, así como en la literatura consultada sobre la descripción y evaluación de la respuesta WDS, dicha cepa es la mejor caracterizada y por lo tanto la que fue elegida para este proyecto.

La edad de los animales establecida para realizar los experimentos fue de 40 días (con un peso de entre 100-120g) debido a que a partir de tal edad la expresión de los receptores serotoninérgicos ya no sufre cambios significativos.

Todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos serán clasificados de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-200 para darles el manejo final correspondiente.

### 5.1 Obtención del extracto metanólico

Los hongos *Psilocybe cubensis* fueron obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología de hongos comestibles a cargo del Dr. Omar Romero Arenas que pertenece al Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Se utilizaron un total de 150 gramos de hongos frescos que fueron deshidratados y se obtuvieron 16.42 gramos en peso en seco.

Los hongos secos y pulverizados (en un lote único) se sometieron a una extracción metanólica durante 24 horas, en una proporción de 100mL de metanol /1 g de hongo seco, después se decantaron y dejaron

secar completamente (aproximadamente de 2 - 3 días) y se repitió el proceso dos veces más de acuerdo a la metodología descrita por Koike (1981). Al sobrenadante se le evaporó completamente el metanol mediante un rotavapor, proceso que se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica, a cargo de la Dra. Patricia Guevara Féfer en la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 5.1.1 Tratamiento del extracto metanólico

El extracto obtenido fue sometido a un análisis de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) mediante el cual se confirmó la presencia de las triptaminas psilocina y psilocibina. Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Fitoquímica, a cargo de la Dra. Patricia Guevara Féfer en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El extracto obtenido fue destinado únicamente para la administración en animales. El mismo no representó ningún riesgo para el personal, ni requiere ningún cuidado o manejo especial.

## 5.2 Evaluación de la respuesta WDS

Se realizó una curva dosis respuesta a WDS, administrando 5 dosis diferentes con una para cada una de ellas como sigue:

Se probaron las dosis 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 mg/kg de peso de la rata, cada una fue disuelta en un vehículo de solución salina isotónica con 1% de Tween 80, esto con el objetivo de aumentar la solubilidad, y se administró por vía intraperitoneal.

En cada rata se evaluó la respuesta WDS de acuerdo al siguiente protocolo publicado por Zhuk (2015):

1. Habitación durante 10 minutos en el campo abierto.
2. Administración por vía intraperitoneal de la dosis correspondiente.
3. Mantenimiento de la rata en la caja durante 10 minutos.
4. Videograbación de la rata en el campo abierto durante 20 minutos.
5. Regreso de la rata a la caja hasta su sacrificio (24 horas), con acceso a comida y agua *ad libitum*, para su registro electrofisiológico.

Los videos fueron analizados por un observador ajeno al experimento, de los que se obtuvo el conteo de respuesta WDS de los minutos 5 a 15 (Zhuk *et al.*, 2015).

Con los datos obtenidos se trazó la curva dosis-respuesta a WDS.

### 5.3 Registro electrofisiológico

Se realizó en células piramidales agudamente disociadas provenientes de las capas V/VI de corteza prefrontal.

#### 5.3.1 Disociación aguda

El protocolo de disociación empleado ya ha sido previamente descrito por Flores-Hernández, *et al.* (2000, 2002), el cual se describe a continuación con algunas modificaciones:

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg con el fin de evitarle a los animales dolor previo a la decapitación.

Los cerebros se extrajeron y se colocaron en solución fría de isetionato con bajo calcio (en mM): 140 isetionato de sodio, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 23 glucosa, 15 HEPES, pH = 7.4, 300-310 mOsm/L y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N-G-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, y gaseada con O<sub>2</sub>. Posteriormente se obtuvieron rebanadas coronales de 350 µm con ayuda de un vibratomo (Campden) mientras estaban sumergidas en la misma solución. De las rebanadas obtenidas, se diseccionaron las capas V – VI de la corteza prefrontal.

Posteriormente las rebanadas disecadas se mantuvieron en incubación a una temperatura de 30°C en solución salina balanceada de Earle (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N-G -nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico; burbujeada con 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>, pH = 7.4 ajustado con NaOH y 300-310 mOsm/L.

Después de al menos 1 hora de incubación se tomó una rebanada de corteza prefrontal para su tratamiento enzimático, el cual se realizó en una cámara de cultivo de 40 mL con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES burbujeada con O<sub>2</sub>, conteniendo 0.8 mg/ml de papaína (Calbiochem) a 33°C ± 1, durante 10 minutos y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG –nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico.

Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido se lavó con solución de isetionato y posteriormente fue disociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al

fuego). La suspensión de células se sembró en cajas Petri de 35 mm (Nunc Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. Después de 10 minutos de incubación la suspensión fue lavada con una solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> y 1% rojo fenol, burbujeada con O<sub>2</sub>, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300-310 mOsm/L; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa.

### 5.3.2 Técnica de célula completa en protocolos de fijación de voltaje (*Whole-cell*)

Se empleó la técnica de célula completa con fijación de voltaje (Bargas *et al.*, 1994). Los electrodos de registro fueron estirados de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI 1B120F4, Sarasota FL) utilizando un Micropipette Puller Modelo p-97, (Sutter Instrument Co).

La solución interna para los registros de corriente estuvo compuesta de (en mM): 175 N-metil-D-glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 ácido etilen glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na<sub>2</sub>ATP, 0.35 Na<sub>3</sub>GTP, 0.1 leupeptina; pH = 7.3 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 265 – 270 mOsm/L.

Por otra parte la solución externa estuvo compuesta de (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 12 glucosa, 10 HEPES, pH = 7.3 con NaOH, 300-305 mOsm/L.

Los registros se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje “voltage clamp” Multiclamp 700 A (Axon instruments) y un digitalizador Digidata 1440A (Axon instruments), controlados con el programa pClamp Versión 9 (Axon instruments) ejecutándose en una computadora con procesador tipo Pentium IV (1.5GHz), 1 GB de memoria RAM y sistema operativo Windows XP SP3.

La resistencia de los electrodos fue típicamente de 6-10 M $\Omega$  en el baño. Después de la ruptura del sello, la resistencia serial fue menor a 25 M $\Omega$ . Cuando el cambio de la resistencia serial resultó mayor al 50% el experimento fue suspendido. El potencial de membrana se mantuvo en -80mV, mientras no hubo protocolo activo.

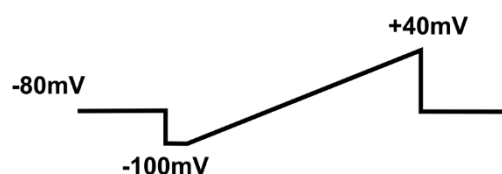
Para su registro, se disecó la capa V – VI (Figura 18), como anteriormente se mencionó, se eligieron para su registro las neuronas piramidales de mayor capacitancia, la menor longitud y número de

dendritas, y que mantuviera sus características morfológicas (forma de pirámide o pera y dendrita apical visible).

### 5.3.2.1 Protocolos electrofisiológicos

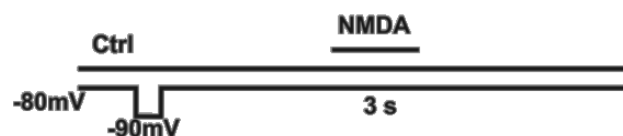
Los protocolos empleados para el registro electrofisiológico fueron:

**Rampa** (-100 mV a +40 mV) con una duración de 100 ms para generar las corrientes de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup>.



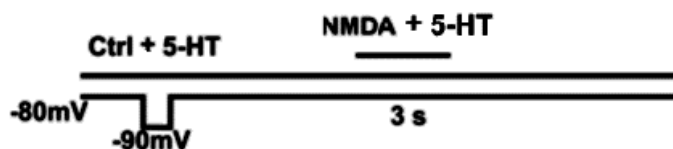
**Aplicación de Neurotransmisor o Neuromodulador:** se fija a la neurona a un potencial de mantenimiento de -80 mV y se aplica el neurotransmisor o neuromodulador durante 3s posterior a un pulso de prueba de -10mV. El protocolo dura 6s y se repite cada 15s. Mediante éste protocolo se generan las corrientes activadas por NMDA y también se utilizó para estudiar el efecto de la serotonina.

**Condición NMDA:** en esta condición experimental la célula fue perfundida con la solución externa conducida por el capilar A, manteniéndose el baño con esta solución en todo el protocolo interrumpiéndose 3s para bañar a la célula con una concentración 100  $\mu$ M de NMDA conducida por el capilar B. El protocolo se dejó correr hasta obtener 3 o 4 trazos de corriente estable. Esta condición experimental se tomó como control. Posteriormente de este control, se perfundió por el capilar B, NMDA en diferentes concentraciones (0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300  $\mu$ M), teniendo siempre como control la concentración de 100  $\mu$ M de NMDA, obteniéndose así la curva dosis-respuesta a NMDA. Todo esto en presencia de glicina 10 $\mu$ M.



**Condición co-aplicación de NMDA + Serotonina:** en esta condición experimental la célula fue perfundida con la solución externa conducida por el capilar A, manteniéndose el baño con esta solución en todo el protocolo interrumpiéndose 3s para bañar a la célula con 100  $\mu$ M de NMDA y Serotonina Hidroclorada a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 30  $\mu$ M). El protocolo se dejó correr hasta obtener 3 o 4 trazos de corriente estable.

Después de obtener los trazos de la condición NMDA + Serotonina se regresó a la condición control que también sirvió como lavado. Todo lo anterior se realizó en presencia de glicina 10 $\mu$ M.



#### 5.4 Análisis estadístico

Los valores en tablas, gráficas o texto, representan el valor de la media de los resultados obtenidos  $\pm$  su error estándar de la media (ESM). Los ajustes y gráficas fueron realizados en el programa Origin 9.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Para el análisis estadístico se utilizó el programa R, en el que los datos fueron sometidos primero con una prueba Kolmogorov- Smirnov ( $p < 0.05$ ) para determinar el comportamiento de una distribución normal. Las diferencias entre las medias de grupos experimentales fueron analizadas mediante una ANOVA de dos vías de tipo II para la curva de NMDA y de tipo III para la curva de 5-HT con una post-prueba t de Student con corrección de Welch entre el grupo control y cada dosis del extracto ( $p < 0.05$ ), esto debido a la diferencia en el número de datos para cada celda.

Para el análisis de la curva dosis efecto de NMDA, se empleó un ajuste logístico tipo sigmoidal con el programa de Origin 9.1 La fórmula que se utilizó para este ajuste fue la siguiente:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

Dónde:

$A_1$  = Tamaño total del pico

$A_2$  = Estado Estacionario

$x$  = Valor de la concentración

$x_0$  = CE50

Finalmente, para el análisis de la constante de tiempo de desensibilización de la corriente activada por NMDA, se utilizó un ajuste logístico de exponencial de decaimiento con el programa de Origin 9.1 La fórmula que se empleó para este ajuste fue la siguiente:

$$y = A_1 * \exp \frac{-T}{\tau}$$

Dónde:

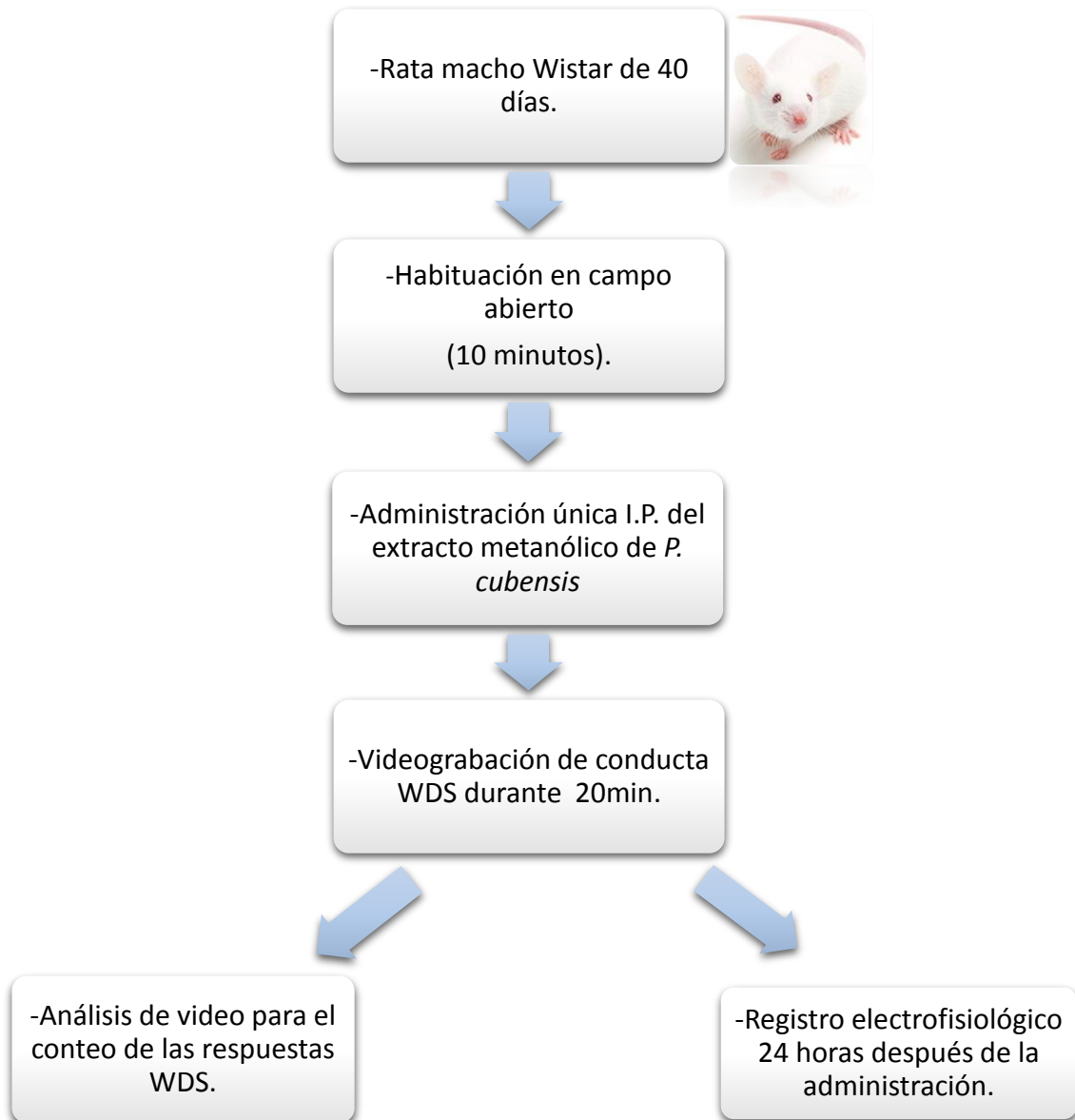
$A_1$  = 100 % de la respuesta

$T$  = Valor del tiempo

$\tau$  = Valor de  $\tau$

## 6 Diagramas de trabajo

### 6.1 Administración de extracto



## 6.2 Registro electrofisiológico

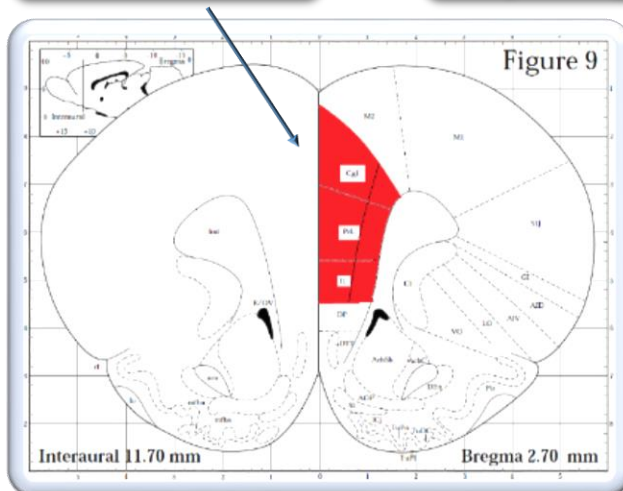
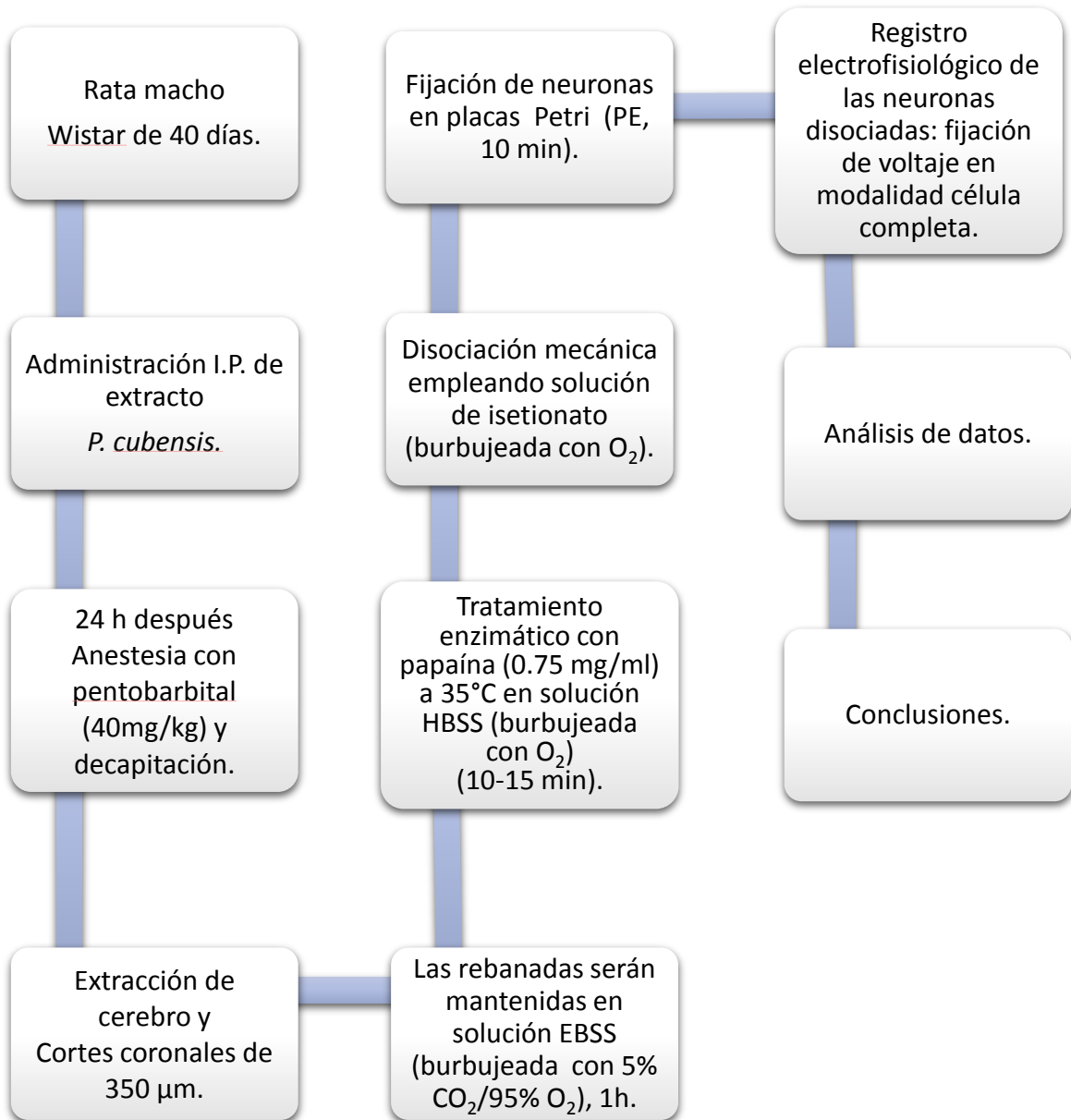


Figura 18. Corte coronal del cerebro de rata. Se resalta en rojo la CPF unilateral y la línea aproximada donde se hace el corte para separar las capas V/VI, (modificada de Paxinos & Watson, 1998).

## 7 Resultados

### 7.1 Evaluación conductual mediante el conteo de respuesta WDS

Para cumplir el primer objetivo, se realizó una curva dosis-respuesta de las dosis del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* (D0.003, D0.01, D0.03 y D0.3 mg/kg de peso) con respecto al conteo de la respuesta WDS durante la habituación en el campo abierto, como después de la administración (Figura 19).

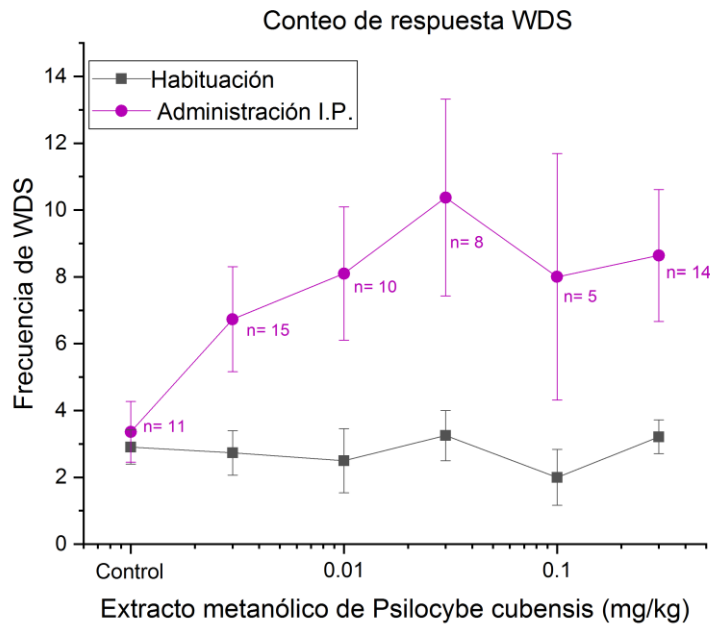


Figura 19. Curva dosis-respuesta para la conducta WDS, donde se observa la diferencia en el número de respuesta WDS entre la habituación y la administración del extracto metanólico de *P.cubensis* así como una tendencia a un comportamiento de campana, siendo el punto más alto de la campana el correspondiente a la D0.03. Se obtuvo diferencia significativa contra el control para las dosis D0.03 y D0.3.

## 7.2 Análisis electrofisiológico

Para llevar a cabo los objetivos 2 y 3 se reporta el análisis de un total de 134 neuronas provenientes de la capa V/VI de la CPF, con la morfología clásica que corresponde a este tipo celular, es decir, con un soma triangular o piramidal, una dendrita apical y sus dendritas basales (Figura 20). Con respecto al tamaño, el cual se estimó en función a la relación entre la capacitancia y el área de superficie ( $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Se analizó la capacitancia de todas células utilizadas para cada dosis mediante una ANOVA de una vía, con valor de  $F = 1.90182$  y  $p = 0.09781$ , la cual denota que no hubo diferencia significativa entre ninguna de las dosis utilizadas.

a)

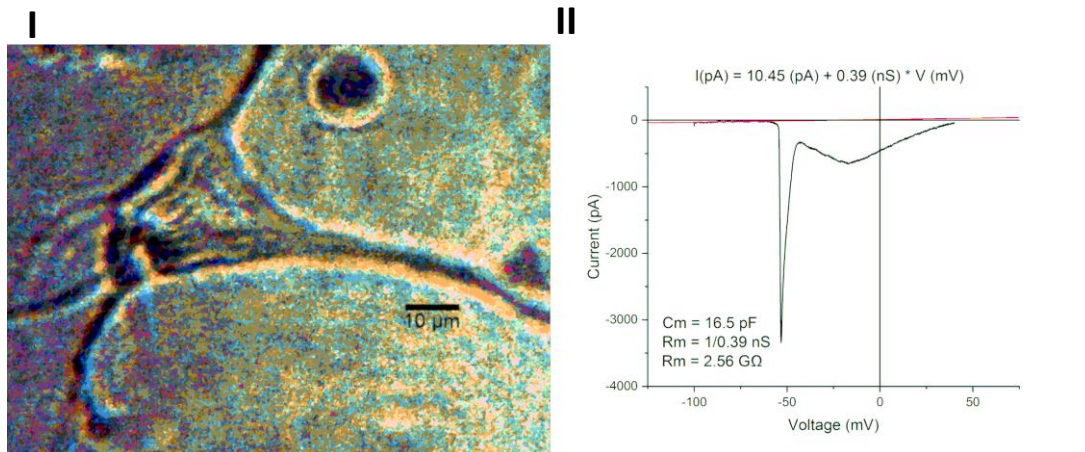


Figura 20. Características de las células registradas. I) Microfotografía de una neurona piramidal característica de la capa V/VI de rata, II) Trazo representativo del gráfico corriente-voltaje obtenido con el protocolo de rampa, donde se observa la presencia de la corriente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ , el cual se utiliza para determinar la viabilidad de la célula.

### 7.2.1 Análisis de la corriente activada por glutamato tipo NMDA

Para el caso del objetivo 2, se registraron un total de 48 células piramidales con capacitancias comprendidas entre 8 y 30 pF (Figura 21), a las que se les realizó una curva dosis-respuesta de las corrientes activadas por glutamato de tipo NMDA ( $I_{NMDA}$ ), abarcando las concentraciones de 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300  $\mu$ M para cada dosis administrada del extracto, es decir, 0.01 (D0.01), 0.03 (D0.03), 0.1 (D0.1), 0.3 (D0.3) mg/kg, así como la dosis correspondiente al grupo control denominada D0 (Figura 22). En cada concentración de NMDA probada para cada dosis del extracto, se analizaron las características principales (amplitud del pico: Pico, estado estacionario: EE, la relación estado estacionario/pico: EE/P y la constante de tiempo de desensibilización: Tau). Con los resultados obtenidos para cada característica se realizó una ANOVA tipo II de dos vías, y se realizó una comparación por pares mediante una prueba t de Student con corrección de Welch, contra una probabilidad (p) menor a 0.05 en ambos casos. Finalmente, los datos de Pico y EE se ajustaron a una función logística (a partir de su valor absoluto), obteniéndose de este modo la concentración efectiva 50 (CE50) para cada dosis.

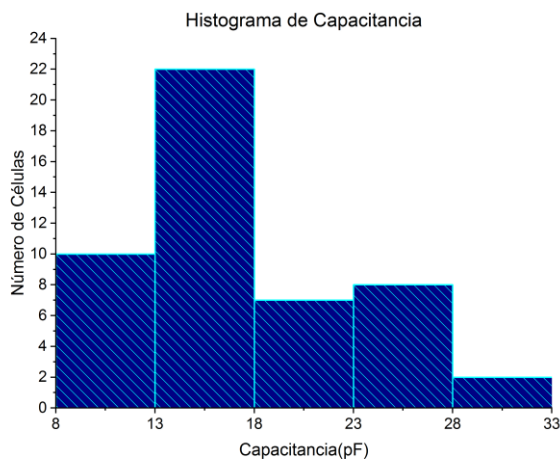


Figura 21. Histograma de capacitancia de las células registradas para la curva dosis-respuesta  $I_{NMDA}$ . Se analizaron 48 células con capacitancias comprendidas entre 8 y 30 pF, donde la mayor cantidad de las neuronas estuvo en rango de 13 a 18 pF.

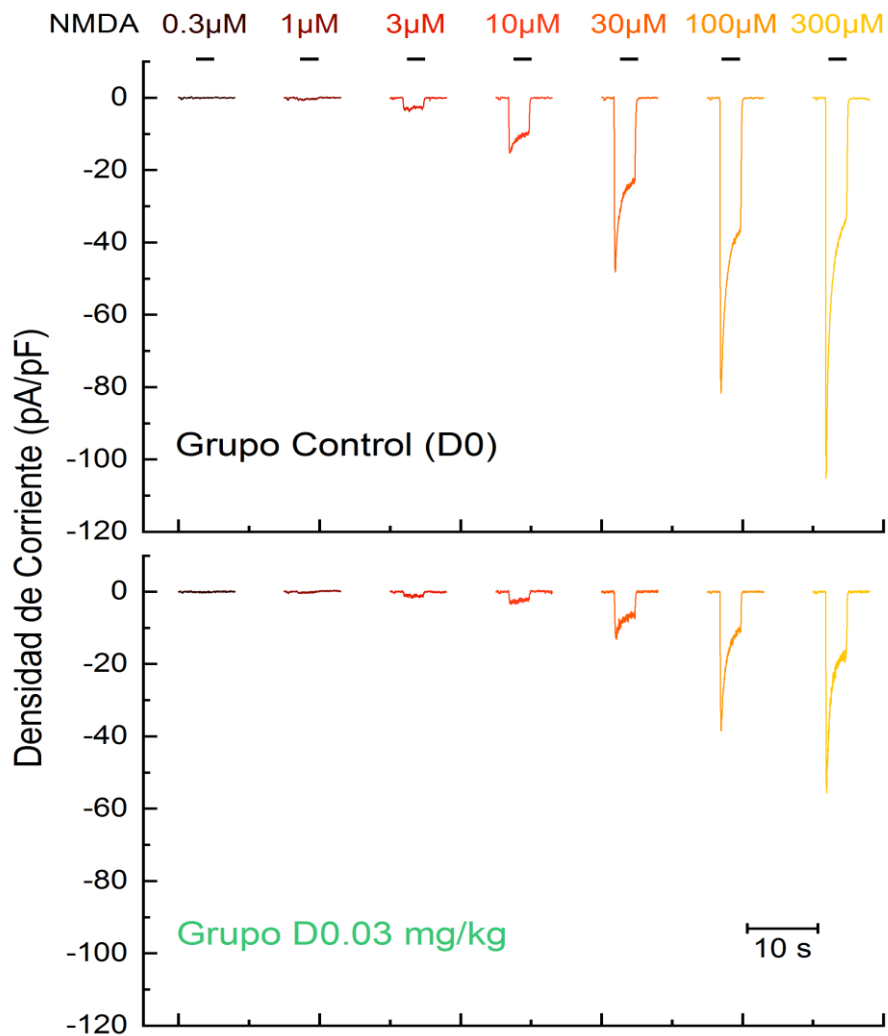


Figura 22. Trazos representativos de la curva dosis-respuesta de NMDA. En la parte superior se muestran los trazos promedio obtenidos de una neurona del grupo control y en la parte inferior trazos que corresponden al grupo administrado con la D0.03. En ambos casos los trazos se presentan en orden creciente de concentración para su mejor visualización. Cada trazo representa el promedio de cuatro a cinco trazos estables. Las concentraciones se pasaron en orden aleatorio. La concentración 100μM de NMDA se utilizó como control, para lo cual se aplicó al inicio y después de cada tres concentraciones del protocolo de registro.

Con respecto al pico, se obtuvo una ANOVA, con  $p < 0.001$  con significancia tanto para el factor de las dosis del extracto ( $F = 9.2703$ ,  $p = 4.674e-07$ ) y el factor de las concentraciones de NMDA ( $F = 149.5631$ ,  $p < 2.2e-16$ ) así como la interacción entre éstos factores ( $F = 2.0185$ ,  $p = 0.00392$ ). Y cuyo análisis t con corrección de Welch denota como interacciones significativas con respecto al control (D0) las D0.03 y D0.1 en las concentraciones de 100 ( $t = -3.0587$ ,  $t = -3.4919$ , respectivamente) y 300  $\mu\text{M}$  ( $t = -2.8934$ ,  $t = -3.5008$ , respectivamente) de NMDA (Figura 24).

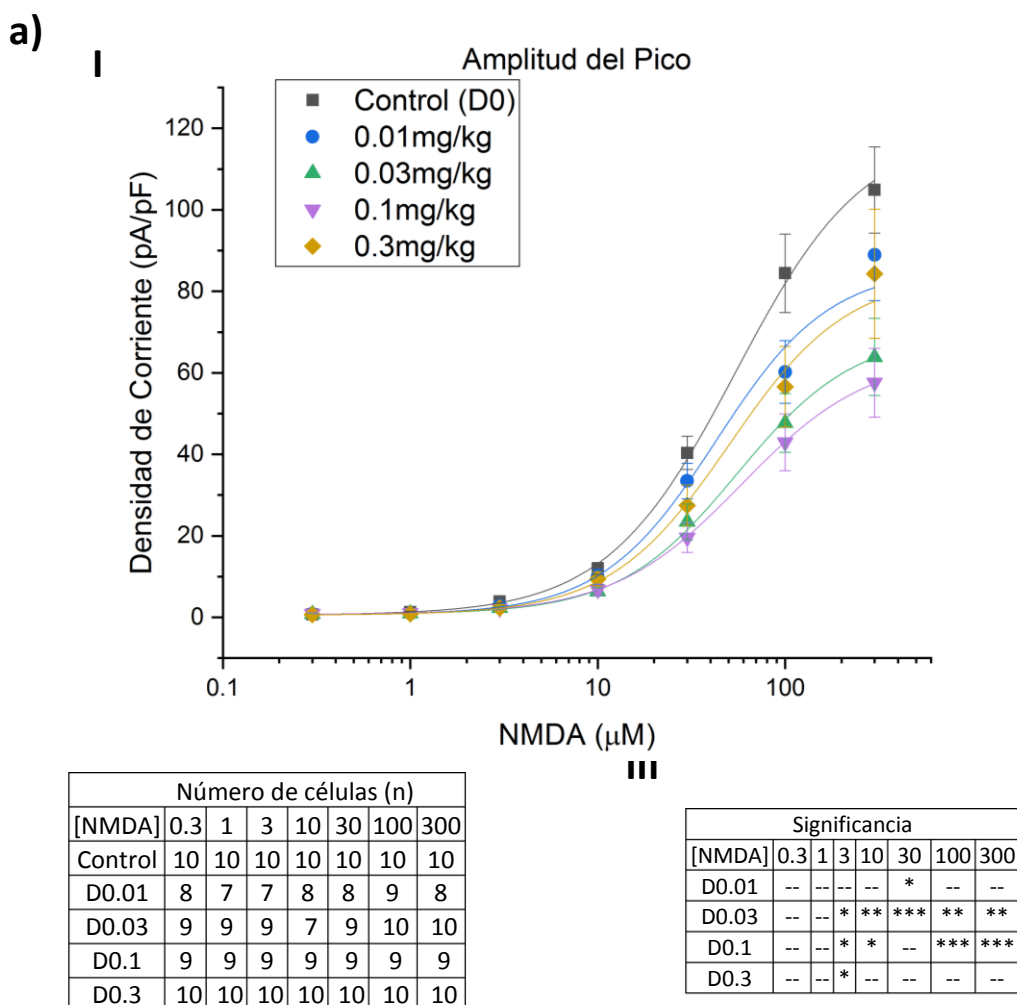


Figura 23. Curva dosis-respuesta para el pico de la  $I_{\text{NMDA}}$ . I) Gráfico de la curva dosis-respuesta de la  $I_{\text{NMDA}}$  para cada dosis probada del extracto de *P. cubensis*, se encontraron diferencias significativas con respecto al control (D0) para las D0.03 a partir de la concentración 3  $\mu\text{M}$  de NMDA, y altamente significativas para la D0.1 en las concentraciones 100 y 300  $\mu\text{M}$  de NMDA (tabla III, (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$ ). II) Tabla de n para cada punto de las curvas.

A partir del ajuste logístico realizado a las curvas dosis-respuesta de  $I_{NMDA}$  para cada dosis del extracto probada se obtuvieron los valores de CE50 (Figura 24; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), los cuales fueron comparados con respecto al control (D0) mediante una prueba t, con corrección de Welch ( $p < 0.001$ ), con la que no se encontró diferencia significativa entre ninguna de ellas (para D0.01  $p = 0.06146$ ; D0.03  $p = 0.77118$ ; D0.1  $p = 0.29831$ ; D0.3  $p = 0.35151$ ).

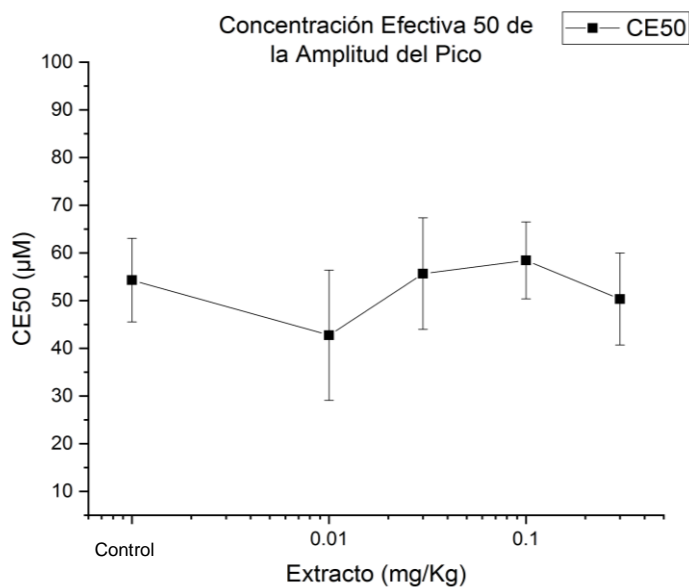


Figura 24. Representación gráfica de los valores de CE50 para cada dosis del extracto administrado, obtenidos a partir de la curva dosis respuesta de la amplitud del pico de la  $I_{NMDA}$ . No se encontró diferencia significativa para ninguna de las dosis.

Por último, para el pico se realizó una gráfica en tres dimensiones, que permite observar la curva dosis-respuesta de cada dosis del extracto de *P.cubensis*, así como el comportamiento para cada concentración de NMDA, se observa que a partir de la concentración de 30 $\mu$ M de NMDA se forman curvas con forma de campana invertida (Figura 26) con respecto al eje de la dosis del extracto.

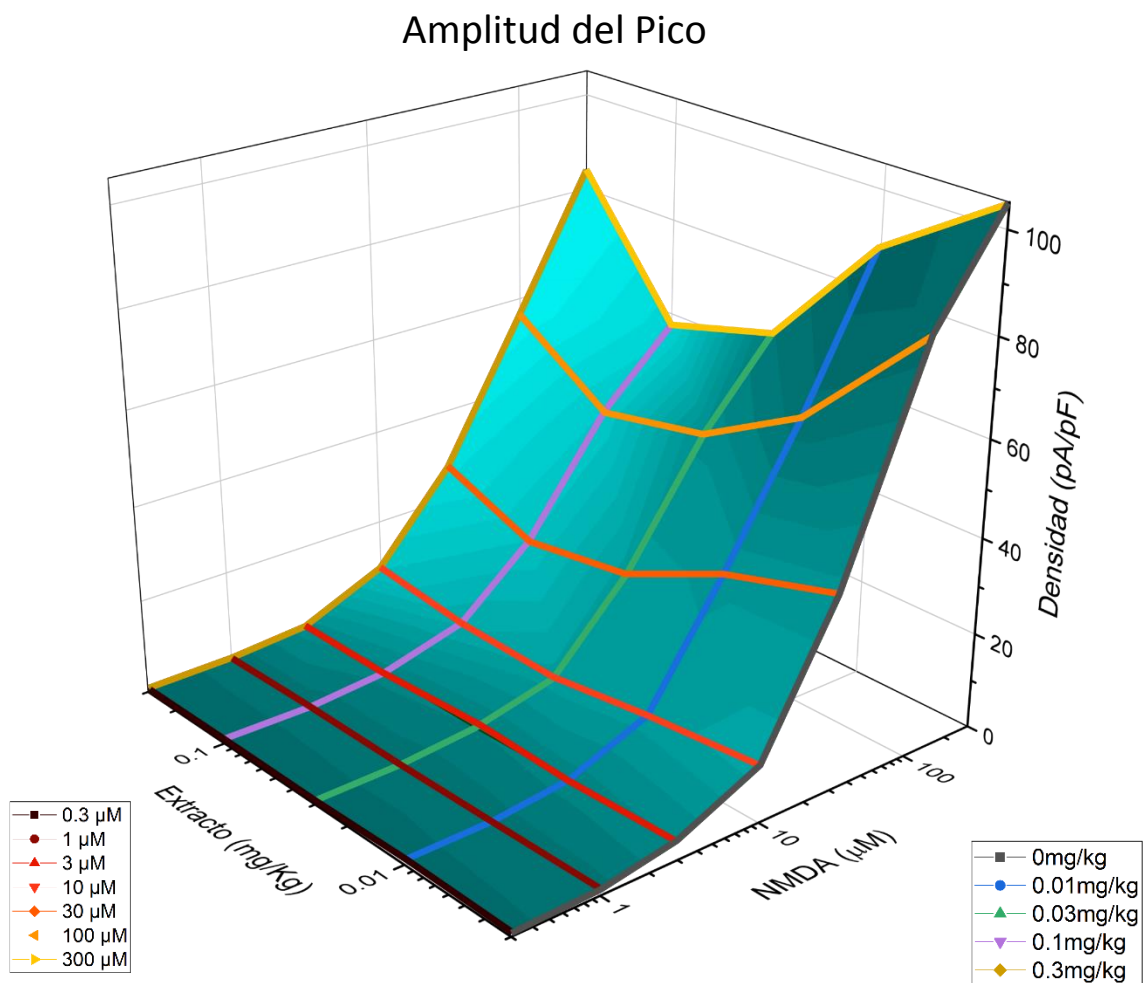


Figura 25. Gráfica en tres dimensiones de la dosis-respuesta para la  $I_{NMDA}$  para el Pico. Se puede observar la forma sigmoidal de la curva correspondiente a cada dosis, así como el comportamiento para cada concentración de NMDA, donde a partir de 30 $\mu$ M se aprecia una forma de campana invertida.

De forma posterior, se realizó la evaluación del EE, los resultados de la ANOVA con una  $p < 0.05$  arrojaron diferencias significativas entre el factor de las dosis del extracto ( $F = 7.2468$ ,  $p = 1.433e-05$ ) y el factor NMDA ( $F = 75.5330$ ,  $p < 2.2e-16$ ), no así para la interacción entre ellas ( $F = 1.4333$ ,  $p = 0.09$ ) y cuyo análisis t de Student mostró diferencias significativas al compararlas contra la D0 únicamente con la D0.1 para las concentraciones 30 ( $t = 0.02478$ ), 100 ( $t = 0.01233$ ) y  $300\mu\text{M}$  ( $t = 0.02833$ ) de NMDA (Figura 27).

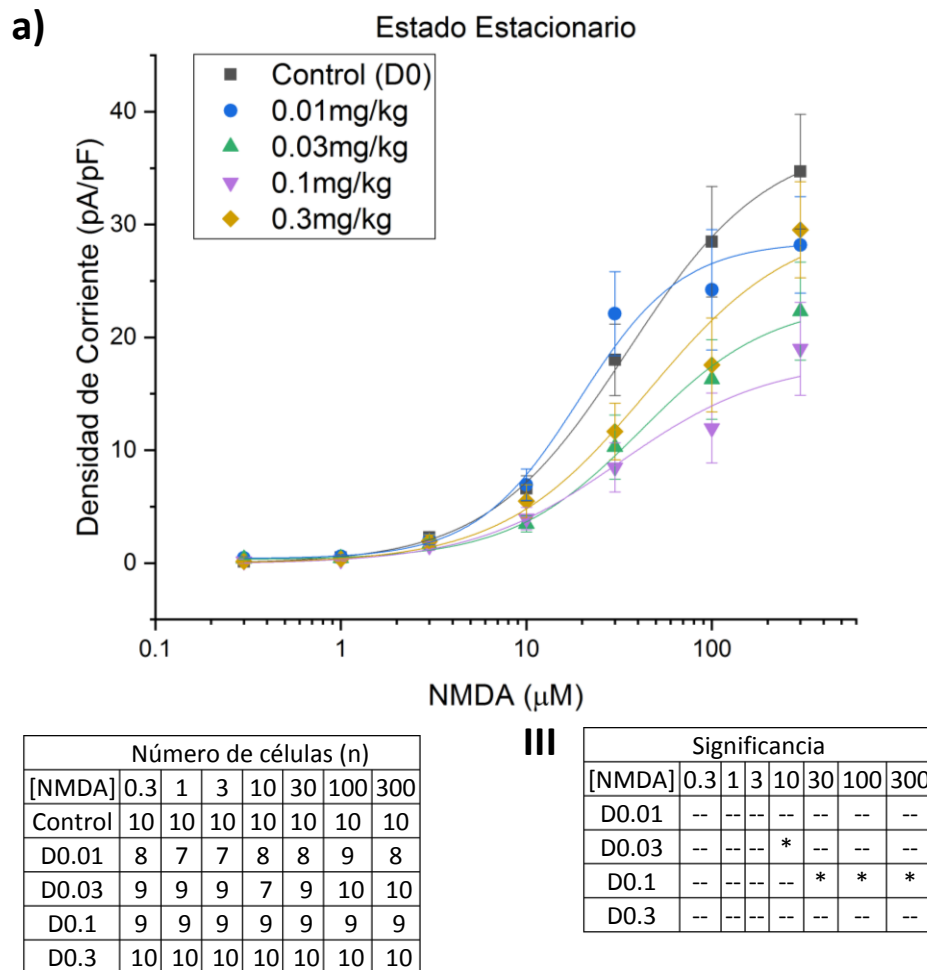


Figura 26. Curva dosis-respuesta para la INMDA correspondiente al EE (a.I). II) Tabla que contiene el valor de n para cada punto de la curva. III) Tabla de significancia, refleja diferencia significativa únicamente para la D0.1, en las concentraciones 30, 100 y  $300\mu\text{M}$ .

A partir de la curva dosis-respuesta del EE se calculó el valor de CE50 para cada dosis del extracto (Figura 28), mismo que se comparó con la D0, a través de una prueba t con corrección de Welch, y se obtuvo diferencia significativa para la D0.01 ( $p = 7.30662E-5$ ), mientras que para las tres dosis restantes no hubo tal (D0.03  $p = 0.3405$ ; D0.1  $p = 0.66337$ ; D0.3  $p = 0.23106$ ).

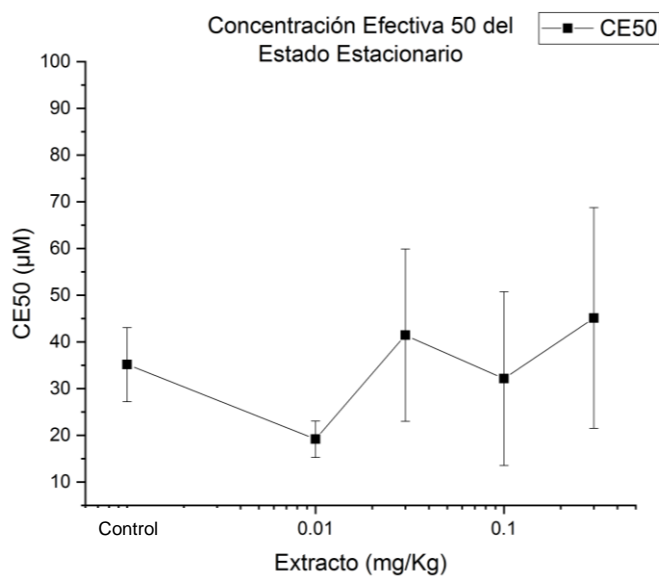


Figura 27. Representación gráfica de los valores de CE50 obtenidos a partir de la curva dosis respuesta del EE de la INMDA. Solo se obtuvo diferencia significativa para la D0.01.

De forma adicional, se realizó la gráfica en tres dimensiones para el EE, donde en similitud con el pico, se observa tanto la curva dosis-respuesta de la amplitud del EE para cada dosis utilizada del extracto, como la forma que sigue cada concentración de NMDA (Figura 29) mostrando, de manera similar al caso del Pico, una forma de “U” o campana invertida a partir de 30  $\mu\text{M}$ .

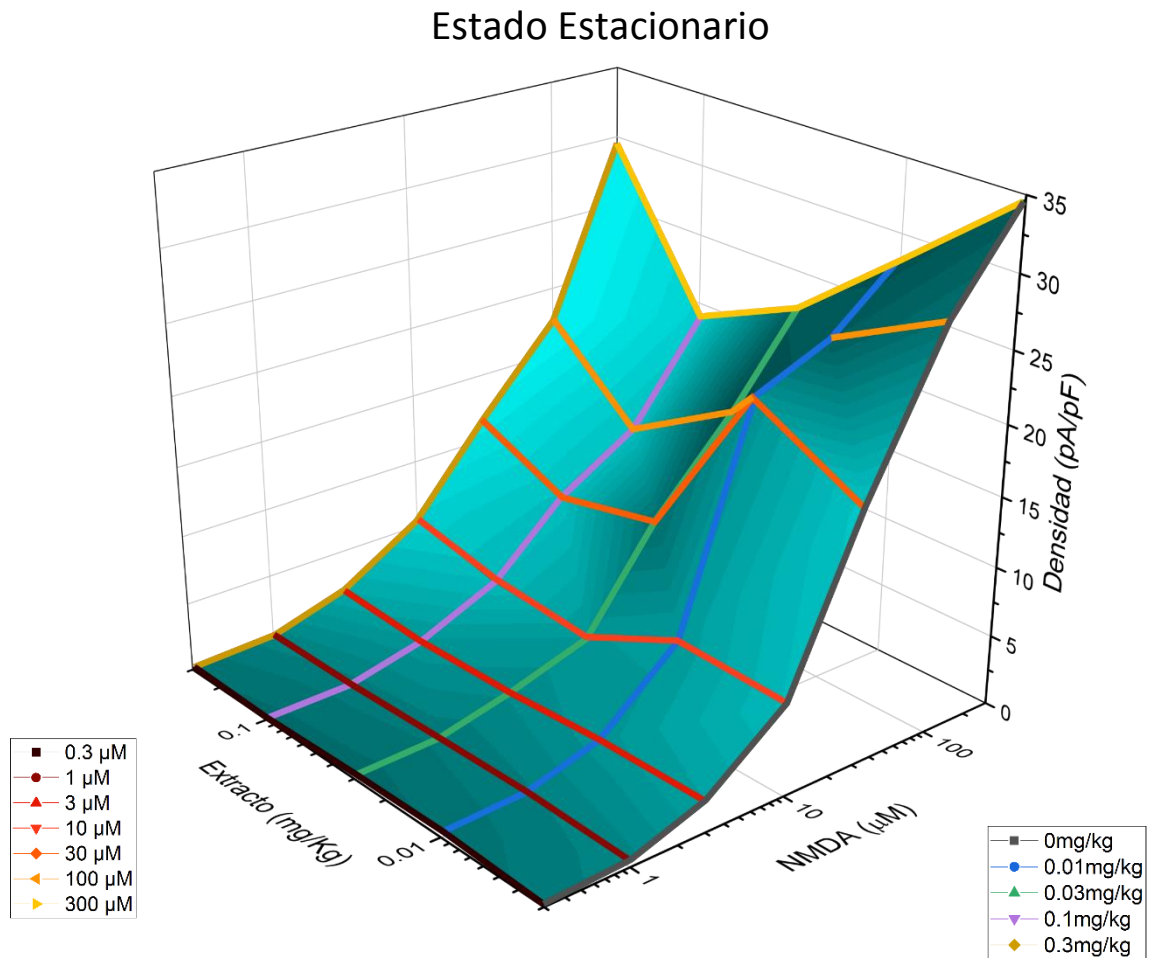


Figura 28. Gráfico en tres dimensiones de las curvas dosis-respuesta de la  $I_{\text{NMDA}}$  del EE. Donde se puede apreciar una forma de “U” con respecto a las dosis del extracto, principalmente a partir de la concentración de 30  $\mu\text{M}$  de NMDA.

La tercera característica que se analizó fue la relación EE/P (Figura 30) que se analizó mediante una ANOVA de dos vías contra una  $p < 0.05$ , el cual, no mostró diferencia significativa para ninguno de los factores (Extracto con  $F = 0.866$ ,  $p = 0.48475$ ; NMDA  $F = 2.0184$  y  $p = 0.06327$ ) ni su respectiva interacción ( $F = 0.2477$  y  $p = 0.99992$ ).

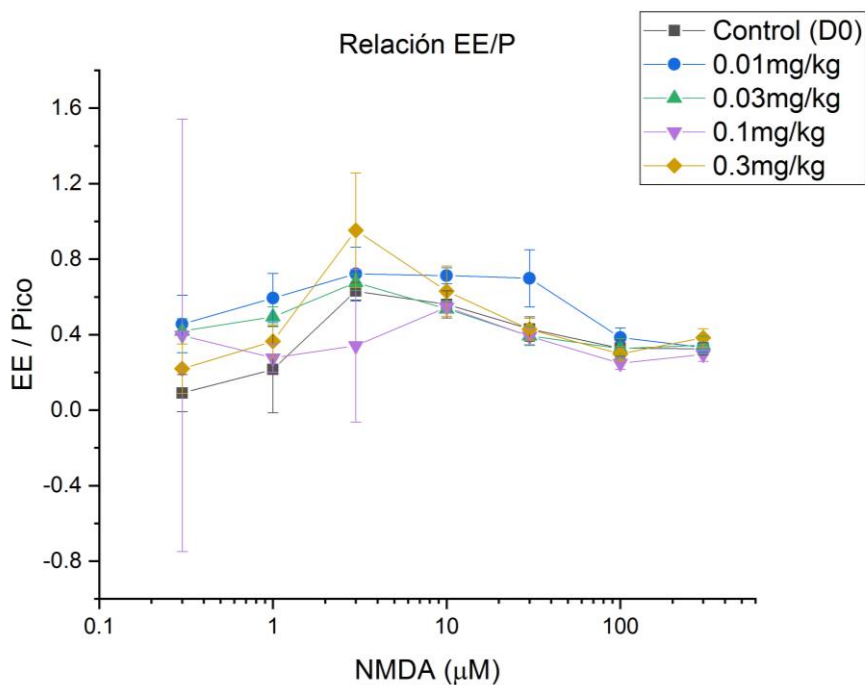


Figura 29. Gráfico de la relación EE/Pico de la  $I_{NMDA}$ . No muestra valores significativos para ninguno de los factores.

Finalmente se realizó el análisis de Tau (Figura 31), cuyo ANOVA ( $p < 0.05$ ), señaló que hay diferencias significativas entre los dos factores, es decir, entre las dosis del extracto de *P. cubensis* ( $F = 3.4878$ ,  $p = 0.008531$ ), así como entre las concentraciones de NMDA ( $F = 8.2157$ ,  $p = 3.76E-08$ ) pero no para las interacciones entre ambos ( $F = 1.0245$ ,  $p = 0.43485$ ).

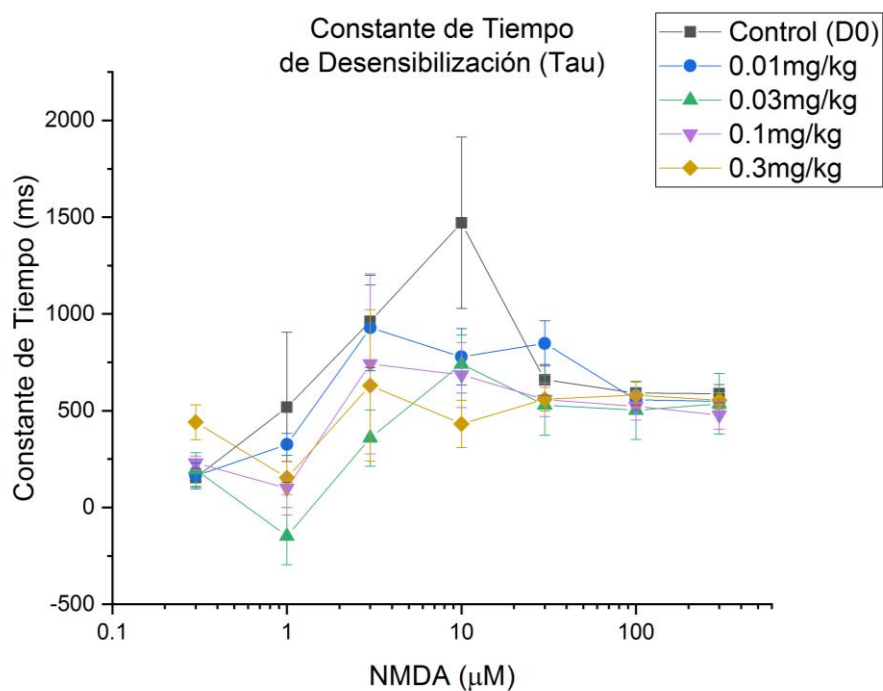


Figura 30. Gráfico de la constante de tiempo de desensibilización (Tau). Donde se muestra un comportamiento similar en todas las curvas sin ninguna diferencia significativa ni a nivel de las dosis administradas del extracto, ni entre las concentraciones de NMDA utilizadas. Se encontró diferencia significativa para el factor dosis del extracto y para el factor concentración de NMDA, pero no para la interacción entre ambos.

### 7.2.2 Análisis de la modulación serotoninérgica de la $I_{NMDA}$

Para cumplir el objetivo 3, fueron registradas un total de 86 neuronas piramidales, con un rango de capacitancia entre 8 y 28 pF (Figura 31), obtenidas de la capa V/VI de la CPF de ratas administradas 24 horas antes con las dosis 0.003, 0.01, 0.03 y 0.3mg/kg del extracto metanólico de *P.cubensis* a las que se les realizó una curva dosis-respuesta a 5-HT con las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 30 $\mu$ M sobre la  $I_{NMDA}$  para la concentración de 100 $\mu$ M. Para cada concentración de 5-HT utilizada con las dosis del extracto se evaluó el porcentaje de reducción sobre la  $I_{NMDA}$  a las características de Pico, EE, EE/P y Tau (Figura 32). A los resultados obtenidos de cada característica se les realizó una ANOVA tipo III de dos vías y de forma posterior se realizó una comparación por pares mediante una prueba t de Student con corrección de Welch, contra una probabilidad ( $p$ ) menor a 0.05 en ambos casos.

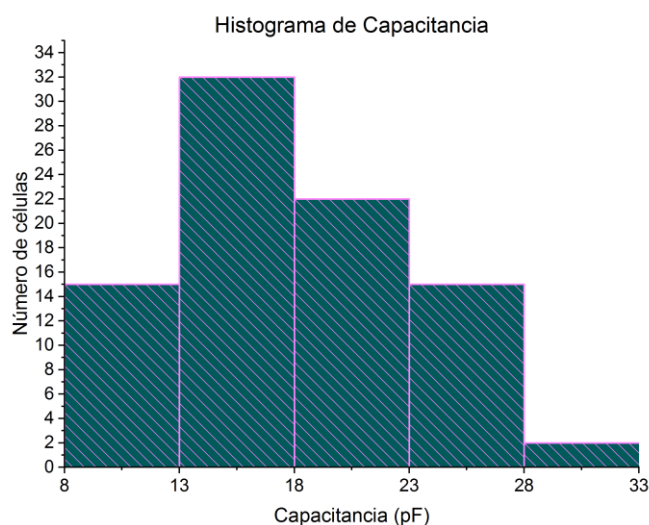


Figura 31. Histograma de capacitancia de las células registradas para la curva dosis-respuesta  $I_{NMDA}$ . Se analizaron 86 neuronas, donde la mayor cantidad de las neuronas tuvo un valor de capacitancia entre el rango de 13 a 23 pF.

### Grupo Control (D0)

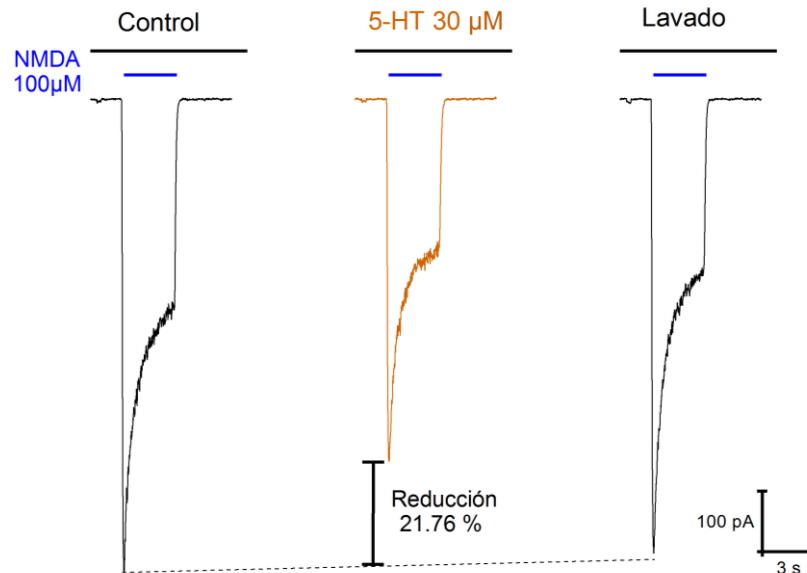


Figura 32. Trazo representativo del porcentaje de inhibición (21.76) causado por 5-HT 30  $\mu\text{M}$  sobre la  $I_{\text{NMDA}}$  (100  $\mu\text{M}$ ). La aplicación de NMDA (100  $\mu\text{M}$ ) se utilizó como control y lavado de la co-aplicación de 5-HT. Para obtener el porcentaje de reducción primero se calculó el promedio de las amplitudes de Pico o EE del control y lavado, este valor se consideró como el 100% y a partir de éste se obtuvo el porcentaje de inhibición sobre la  $I_{\text{NMDA}}$  para cada concentración de 5-HT (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 o 30  $\mu\text{M}$ , según fue el caso) utilizada. Cada trazo corresponde al promedio obtenido de cuatro a cinco trazos estables de la pre-, co- y post-aplicación de 5-HT a una neurona que pertenece al grupo control

Con respecto al pico, se analizó el porcentaje de reducción sobre la corriente de NMDA 100  $\mu\text{M}$  para cada concentración de 5-HT (Figura 34). A estos resultados se les realizó una prueba ANOVA tipo III de dos vías, con valor de  $p < 0.001$ , encontrando significancia para el factor de las dosis del extracto ( $F = 7.452$ ,  $p = 1.231\text{e-}05$ ), para el factor de las concentraciones de 5-HT ( $F = 10.5793$ ,  $p = 4.342\text{e-}09$ ) tanto como para la interacción entre estos dos ( $F = 4.6705$ ,  $p = 3.104\text{e-}09$ ). Además, debido a que el tamaño de las muestras fue diferente se realizó una prueba t con corrección de Welch para comparar las dosis con respecto al control, encontrando diferencias estadísticamente significativas para todas las dosis del extracto, aunque no en todas las concentraciones de 5-HT (Figura 34a.III). De manera adicional, se realizó una división entre las D0.003 y D0.01 (Figura 34a) y las D0.03 y D0.3 (Figura 34b), para lograr una mejor visualización de los efectos, mismos que se retomarán más adelante.

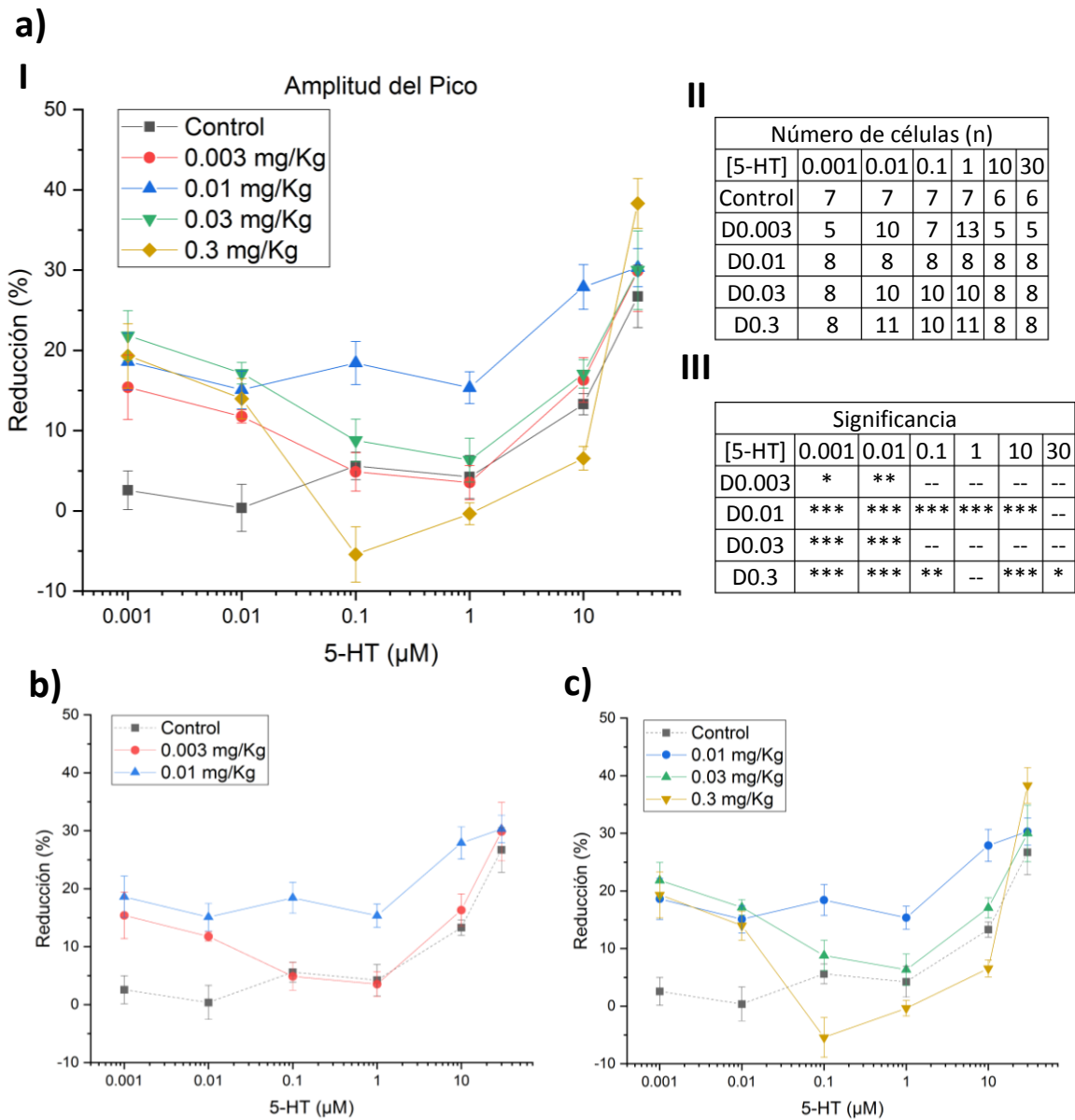


Figura 33. Curva dosis-respuesta del porcentaje de reducción por 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$ , con respecto a la amplitud del pico. a.I) Se muestran las curvas dosis-respuesta de 5-HT para todas las dosis del extracto probadas, donde se observa un cambio en el porcentaje de reducción por 5-HT causado por la administración de la dosis del extracto. a.II) Tabla donde se indica el número de células utilizadas para cada punto de las curvas. a.III) Tabla donde se muestra la significancia de cada punto con respecto a la curva D0 (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$ ). b) Gráfico donde sólo se trazaron las curvas D0.003 y D0.01 con respecto al control, para la D0.003 hubo diferencias significativas en las concentraciones 0.001 y 0.01  $\mu\text{M}$  de 5-HT; en cuanto a la D0.01 hubo diferencias altamente significativas desde la concentración de 0.001 hasta 10  $\mu\text{M}$ . c) Gráfico donde se refleja que las D0.03 y D0.3 con respecto a la D0.01 tuvieron un “regreso” hacia la curva control con diferencias significativas para las concentraciones de 0.001 y 0.1  $\mu\text{M}$  y que, además la curva de la D0.3 tuvo un efecto con tendencia hacia la potenciación para las concentraciones 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$  con respecto al control.

Además, se graficó el efecto para cada concentración de 5-HT, con respecto a las dosis del extracto utilizada (Figura 35), y se pudo seccionar en tres comportamientos (Figura 35 a y b), los cuales serán expuestos en la discusión con nuestras conjeturas acerca de ellos.

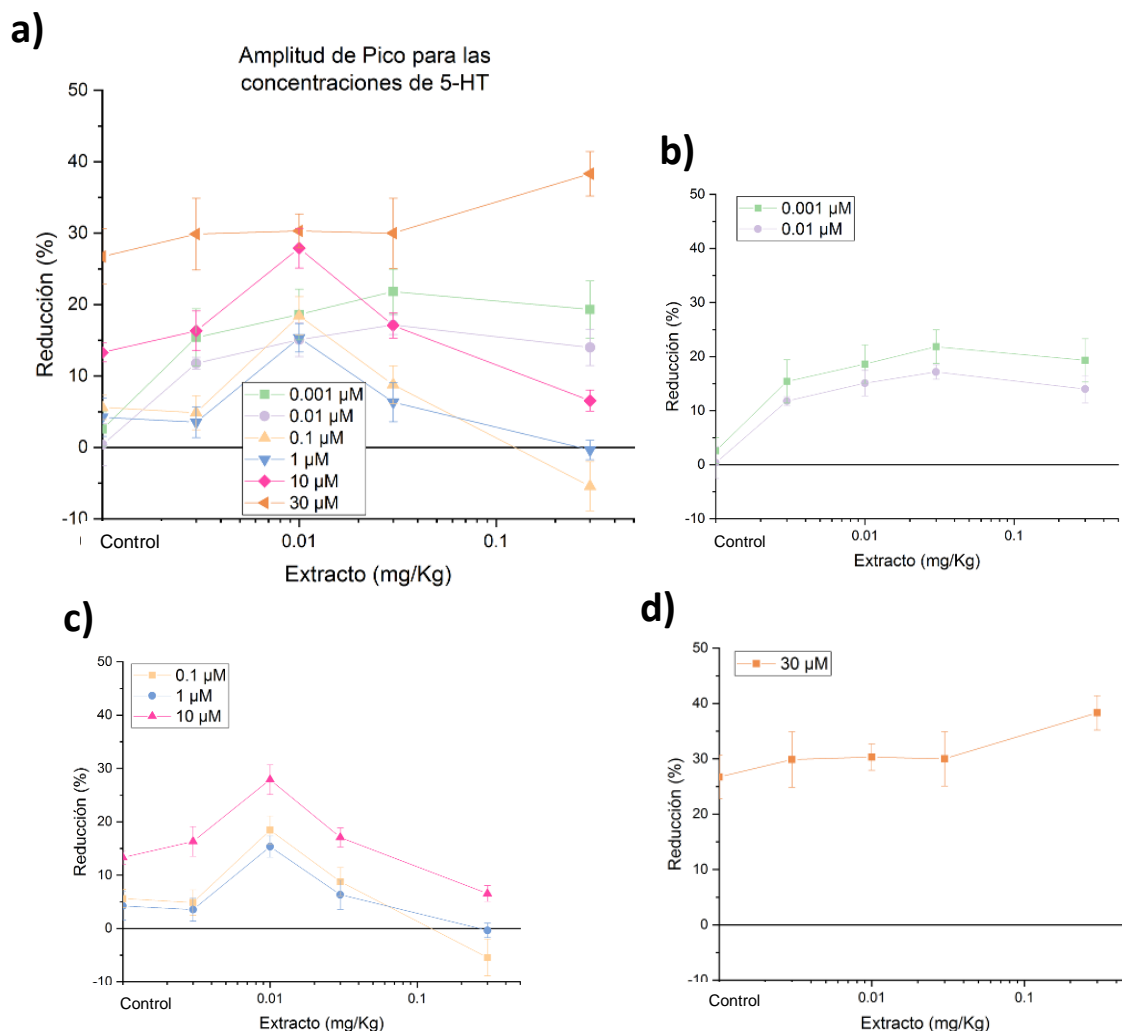


Figura 34. Gráficas donde se observa el comportamiento sobre la amplitud del Pico de la INMDA para cada concentración de 5-HT con respecto al aumento de dosis del extracto, donde, en a) se representan las curvas correspondientes a todas las concentraciones de 5-HT, a partir de la cual se identificaron tres efectos mostrados en (b), (c) y (d). b) Curvas correspondientes a las concentraciones de 0.001 y 0.01 μM de 5-HT que refleja un efecto creciente de forma dosis-dependiente que se estabiliza a partir de la D0.03. c) Curvas que representan a las concentraciones 0.1, 1 y 10 μM de 5-HT las cuales reflejan un comportamiento similar, sin embargo, en el caso de 10 μM la curva está desplazada hacia arriba. Además, resalta un cambio abrupto para las tres concentraciones en los puntos que corresponden a la D0.01, y finalmente hay un “regreso” hacia el efecto inicial con ligera tendencia hacia la potenciación para dosis mayores (D0.1 y D0.3) del extracto. d) Se representa el comportamiento para 30 μM de 5-HT donde, de modo general, el efecto es estable para casi todas las dosis y existe un ligero aumento para la D0.3.

Finalmente, para esta característica, se realizó una gráfica en tres dimensiones (Figura 36), donde se pueden observar ambos efectos, la curva dosis-respuesta a 5-HT sobre la corriente activada por glutamato tipo NMDA en la concentración de 100  $\mu\text{M}$  tanto como el comportamiento que mostraron las dosis del extracto utilizadas sobre cada concentración de 5-HT (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 30  $\mu\text{M}$ ), además de la interacción que entre ellas ocurre. Sin embargo, debido a que son diversos efectos tanto entre dosis, como entre concentraciones, y como se mencionó previamente para las gráficas en dos dimensiones, se realizó también una partición de la gráfica global (Anexo I).

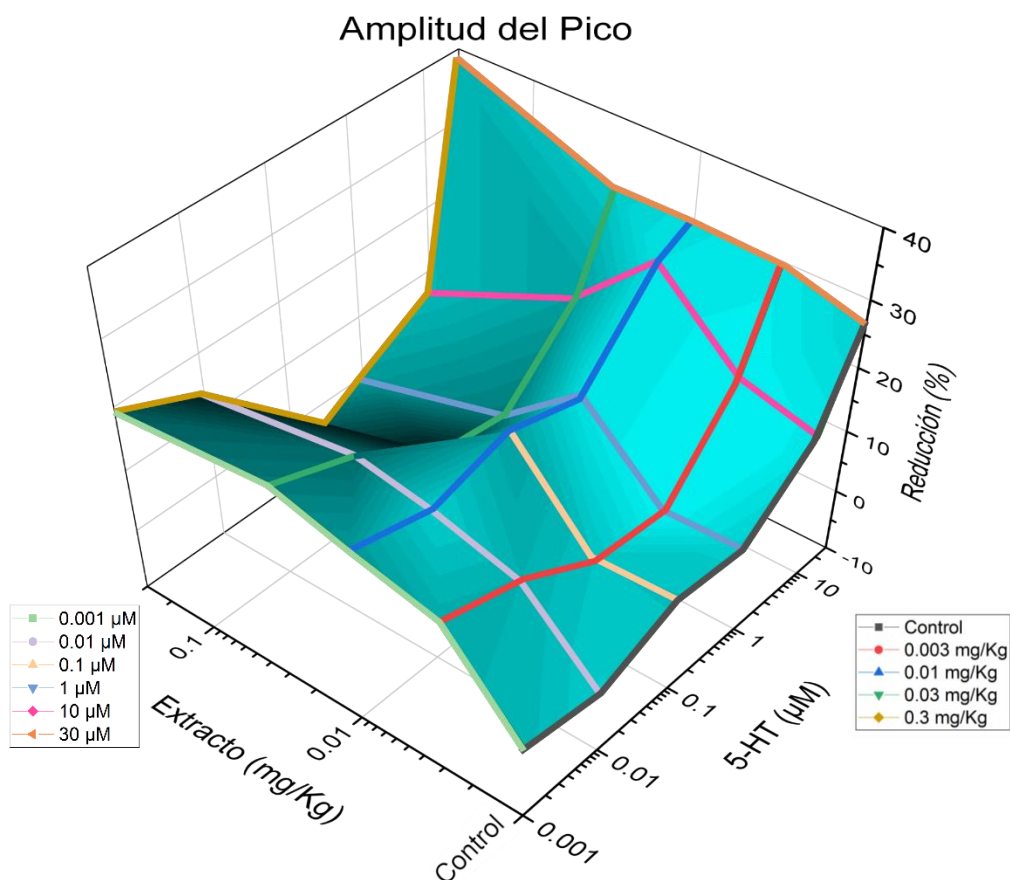


Figura 35. Gráfica en tres dimensiones del efecto del porcentaje de reducción en la amplitud del pico causado por 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$ , en las dosis del extracto de *P. cubensis* probadas, es decir, el porcentaje de reducción con respecto a la concentración de 5-HT y con respecto a la dosis del extracto.

Para el caso del EE de la  $I_{NMDA}$ , también se analizó el porcentaje de reducción causado por cada concentración de 5-HT (Figura 37), de forma posterior se realizó una ANOVA tipo III de dos vías, contra una  $p < 0.05$ , la cual mostró significancia para los dos factores (factor dosis del extracto:  $F = 3.8460$  y  $p = 0.004863$  y factor concentración de 5-HT:  $F = 5.7396$  y  $p = 5.43e-05$ ) así como entre su interacción ( $F = 1.8522$  y  $p = 0.017294$ ). Aunado a esto se realizó una prueba t con corrección de Welch para comparar cada dosis contra el control (D0), se obtuvo significancia para todas las dosis en las concentraciones de 0.001, 0.01 y 30 $\mu$ M de 5-HT. Además, en el caso de su representación gráfica, se dividió mostrando por separado las dosis bajas D0.0003 y D0.01 (Figura 37b), las dosis altas D0.03 y D0.3 (Figura 37c), así como las dosis centrales D0.01 y D0.03 (Figura 37d) y las dosis de los extremos D0.003 y D0.3 (Figura 37e) con el objetivo de mostrar los efectos que a cada una corresponden y cómo su forma puede relacionarse con las demás dosis.

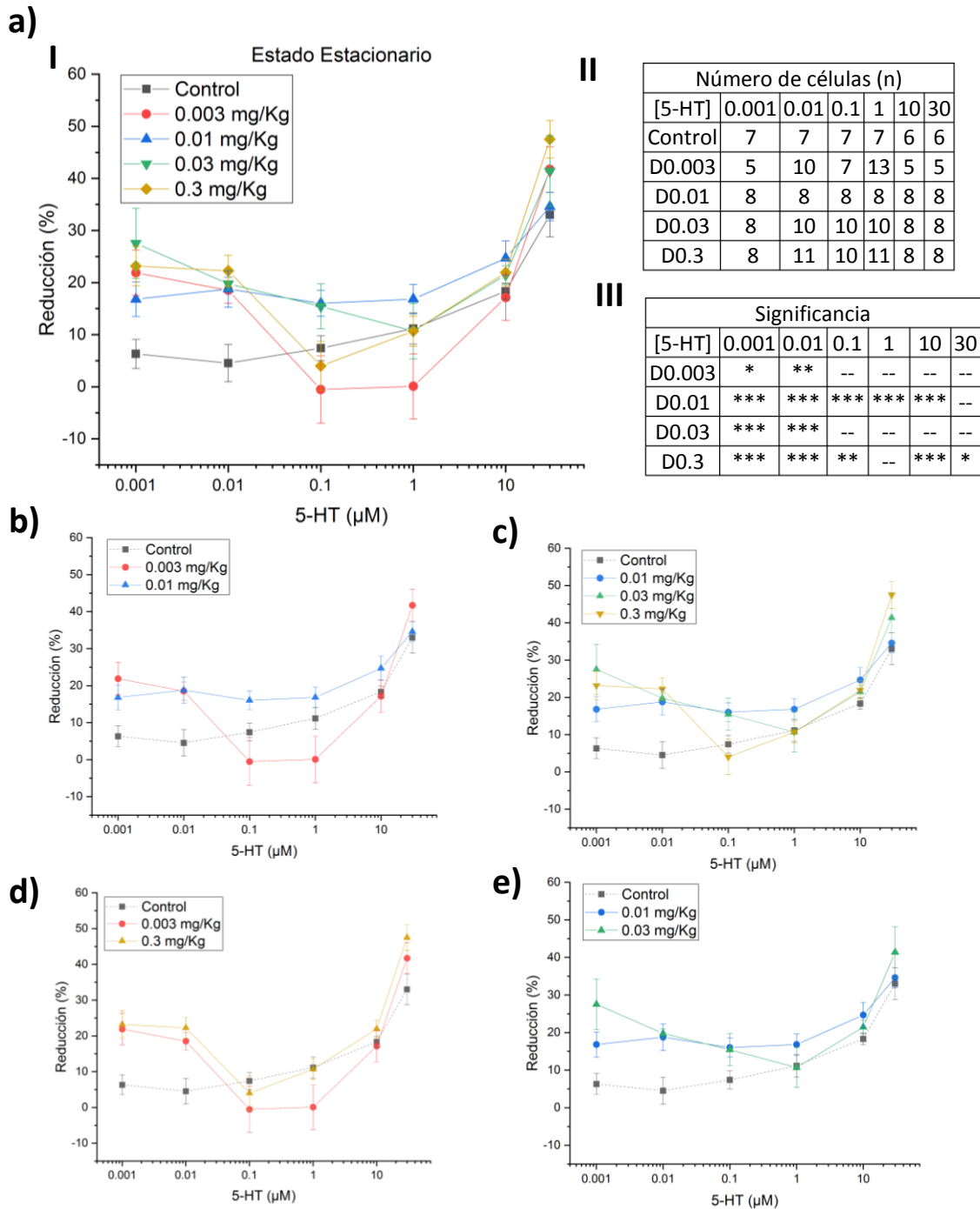


Figura 36. Curva dosis-respuesta del porcentaje de reducción por 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$ , con respecto a la amplitud del EE. a.I) Representación de las curvas dosis-respuesta de 5-HT para todas las dosis del extracto, donde se observa un cambio en cuanto al porcentaje de reducción por 5-HT generado por la administración del extracto para todas las dosis en las concentraciones 0.001 y 0.01  $\mu$ M. a.II) Tabla donde se indica el número de células para cada punto de las curvas. a.III) Tabla donde se muestra la significancia de cada punto con respecto a la curva D0 (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$ ). b) Gráfica donde se muestran las dosis más bajas del extracto, D0.003 que tuvo un aumento significativo del porcentaje de inhibición con las concentraciones 0.001 y 0.01  $\mu$ M de 5-HT y D0.01 cuya diferencia significativa con respecto al porcentaje de reducción de la D0 fue para las concentraciones 0.001, 0.01 y 0.1 y con tendencia a ser mayor también para las concentraciones restantes. c) Se trazan las curvas dosis-respuesta de 5-HT para las mayores dosis del extracto D0.03 y D0.3 con diferencias significativas para las concentraciones 0.001 y 0.01  $\mu$ M de 5-HT y también se denota que el efecto sobre el porcentaje de reducción tiene un “retorno” hacia el efecto control si se toma como referencia la D0.01. d) Curvas dosis-respuesta que corresponden a la dosis menor D0.003 y mayor D0.3 con respecto a D0, con tendencia a ser similares en cuanto a efectos. e) Tendencia de efectos similares en las dosis centrales D0.01 y D0.03.

Para el caso del EE también se observaron efectos para cada concentración de 5-HT, los cuales se muestran en la (Figura 38), éstos se dividieron para su mejor visualización en tres grupos de acuerdo a su comportamiento (Figura 38 b, c y d).

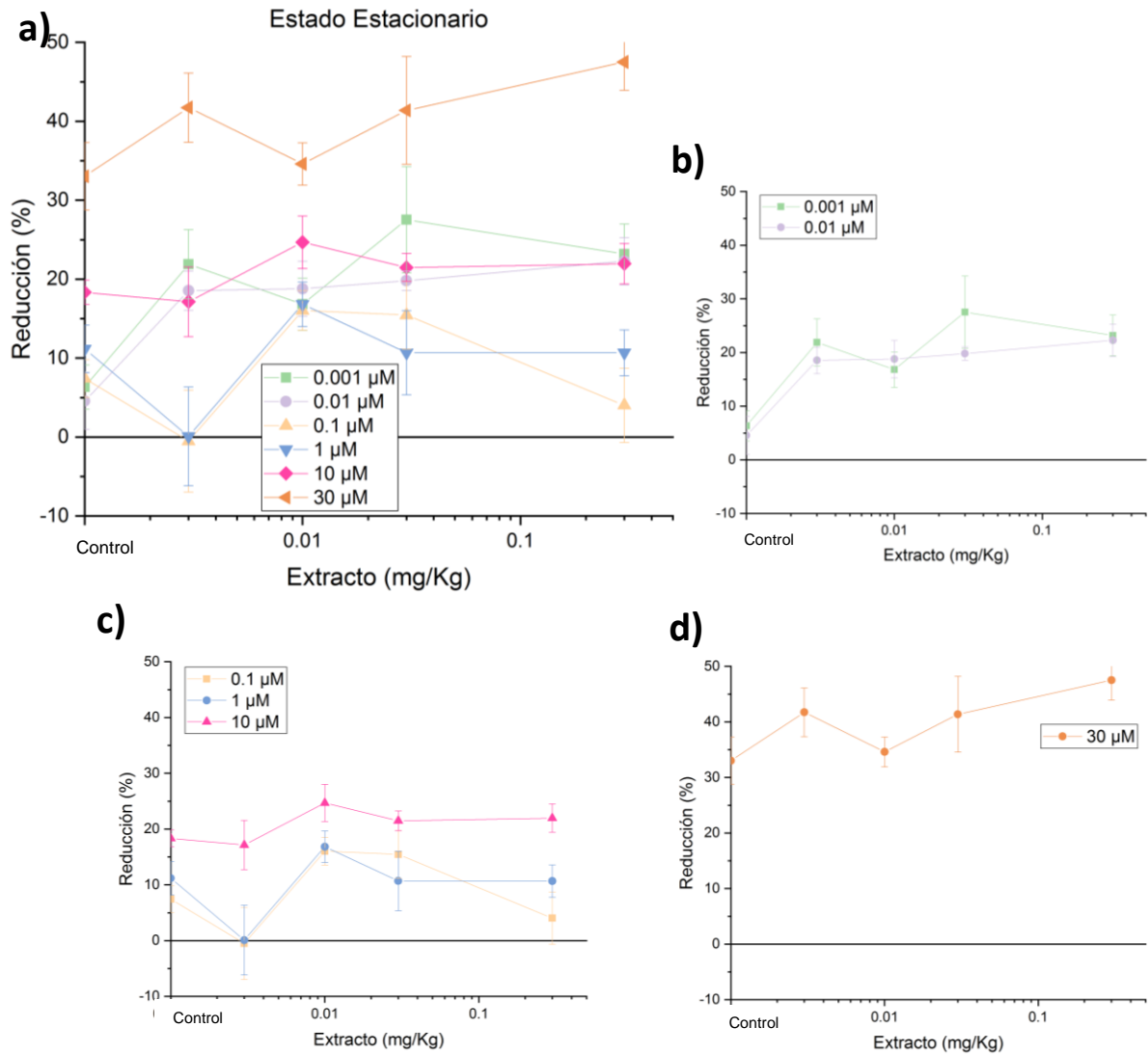


Figura 37. Gráficas del comportamiento para cada concentración de 5-HT con respecto al aumento de dosis del extracto correspondiente al EE, donde, en a) se representan las curvas correspondientes a todas las concentraciones, a partir de la cual se identificaron tres efectos. (b) Trazado de las concentraciones menores de 5-HT 0.001 y 0.01μM que reflejan una ligera tendencia de incremento en el efecto en la primera dosis D0.003 con respecto al D0 y que se estabiliza para las dosis mayores. c) Curvas de las concentraciones 0.1, 1 y 10 μM de 5-HT donde se denota que las tres concentraciones mantienen la misma forma, con una inflexión que corresponde a la D0.003 y en las curvas de 0.1 y 1μM de 5-HT. Finalmente, en (d) se representa el comportamiento para 30μM de 5-HT donde, en general, el efecto es estable con una ligera inflexión para la D0.01.

A su vez, se unificaron los dos efectos mencionados previamente, es decir, tanto la dosis-respuesta a 5-HT para cada dosis, así como el comportamiento que mostró cada concentración, en una gráfica de tres dimensiones (Figura 39) y a la cual se le realizaron particiones de las dos “vistas” de forma similar a las realizadas en las gráficas de dos dimensiones (anexo II).

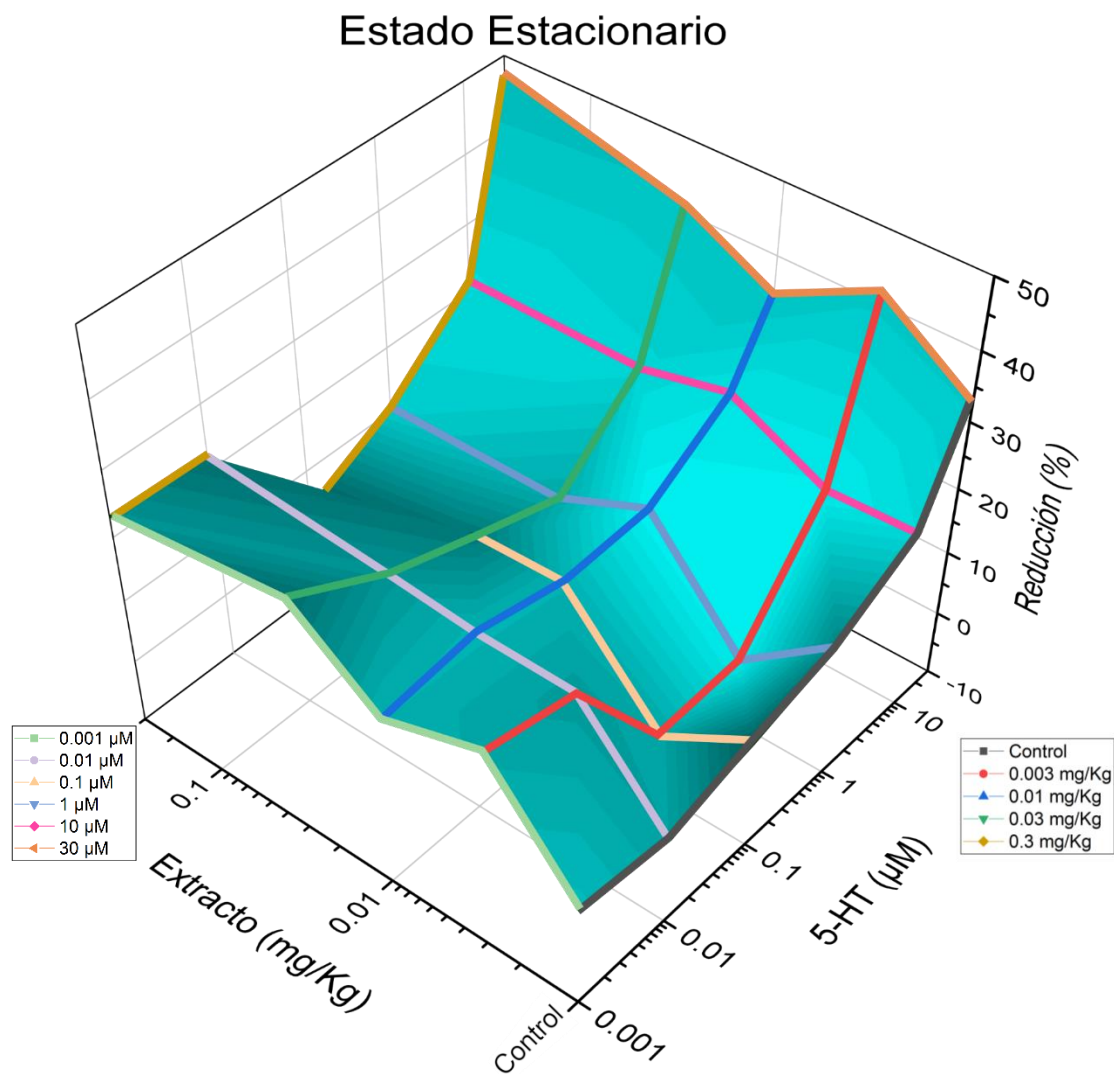


Figura 38. Gráfica en tres dimensiones del efecto del porcentaje de reducción en el EE causado por 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$ , en las dosis del extracto de *P. cubensis* probadas, es decir, el porcentaje de reducción con respecto a la concentración de 5-HT y con respecto a la dosis del extracto.

Asimismo, se analizó la relación EE/P (Figura 40), que se muestra gráficamente en la figura, evaluado mediante una ANOVA tipo III de dos vías contra  $p < 0.05$ , la que sólo arrojó diferencias significativas para el factor dosis del extracto ( $F = 4.0549$ ,  $p = 0.003442$ ) no así entre las concentraciones de 5-HT ( $F = 0.2588$  y  $p = 0.934997$ ) ni para la interacción entre estos factores ( $F = 1.2506$  y  $p = 0.215939$ ), en correspondencia a las dos características anteriores, también se realizó la gráfica con respecto a cada concentración de 5-HT (Figura 40) así como su división por concentraciones (Figura 41 b, c y d).

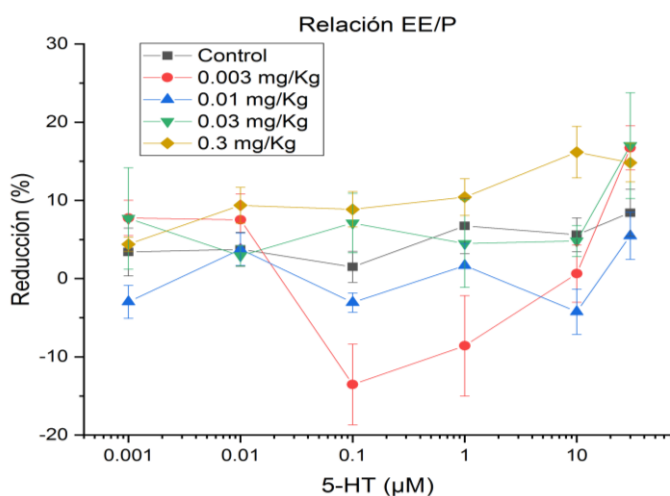
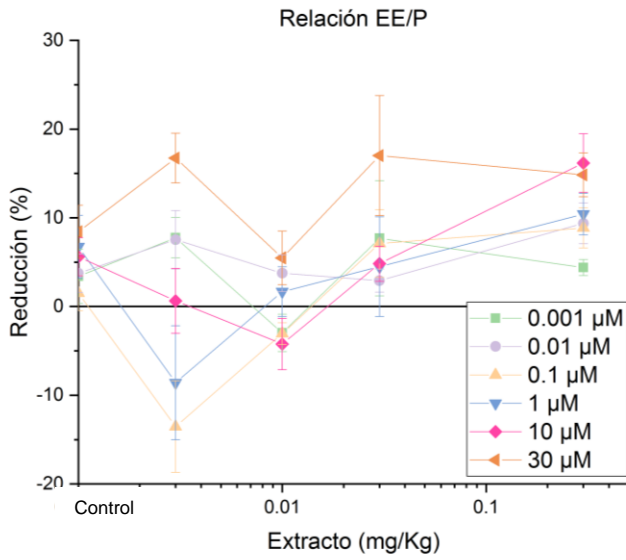
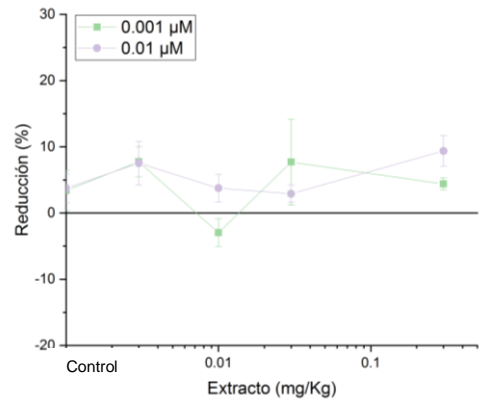


Figura 39. Gráfica del porcentaje de reducción para la relación EE/P. Sólo se obtuvieron diferencias significativas para los puntos de  $0.1\mu\text{M}$  de 5-HT en la D0.3 y para la concentración de  $10\mu\text{M}$  de 5-HT para las D0.01 y D0.3 con respecto al control D0.

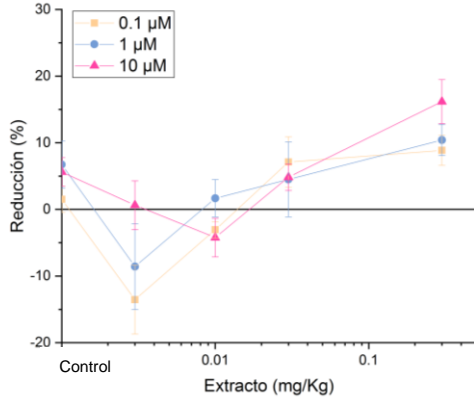
a)



b)



c)



d)

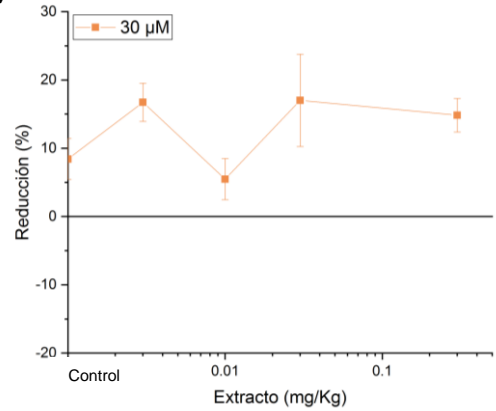


Figura 40. Gráficas del comportamiento para cada concentración de 5-HT con respecto al aumento de dosis del extracto correspondiente a la relación EE/P, donde, en a) se representan las curvas correspondientes a todas las concentraciones, a partir de la cual se identificó una tendencia a tres efectos, primero para las concentraciones 0.001 y 0.01 μM de 5-HT(b), a continuación, para 0.1, 1 y 10 μM (c) y finalmente para la concentración de 30 μM de 5-HT (d).

Aunado a lo anterior, se muestra la gráfica en tres dimensiones de la relación EE/P (Figura 42), donde se muestra de forma global el comportamiento de esta característica para sus dos factores (dosis del extracto y concentraciones de 5-HT).

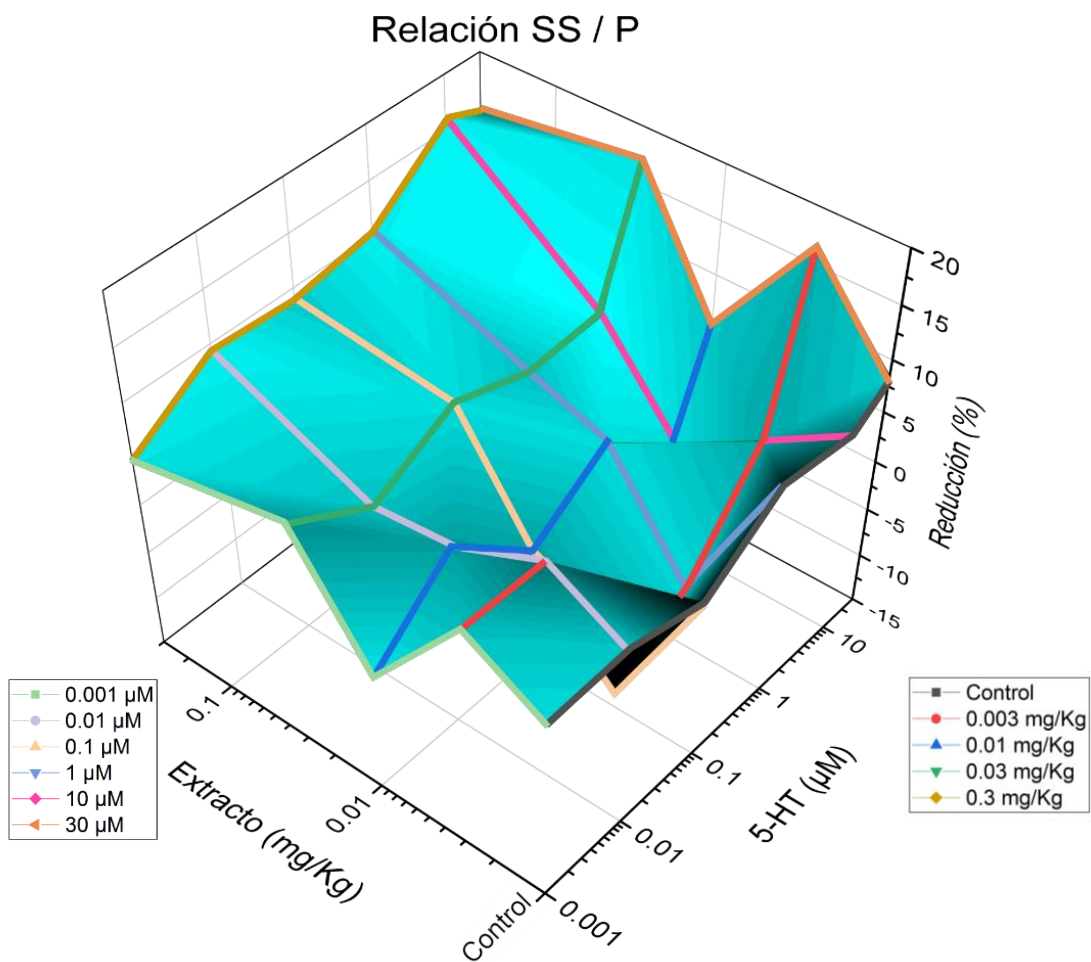


Figura 41. Gráfica en tres dimensiones del efecto del porcentaje de reducción en la relación EE/P causado por 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$ , en las dosis del extracto de *P. cubensis* probadas, que representa de forma simultánea los resultados obtenidos sobre el porcentaje de inhibición con respecto a la concentración de 5-HT y con respecto a la dosis del extracto. No se obtuvo diferencia significativa para ninguno de los factores.

Finalmente, se analizó la Tau con respecto a su porcentaje de reducción para cada concentración de 5-HT en las dosis probadas (Figura 43), a la que, como en los casos anteriores, se le realizó una ANOVA tipo III de dos vías ( $p < 0.05$ ), la que denotó diferencias significativas para el factor dosis del extracto ( $F = 4.1241$ ,  $p = 0.0030698$ ) no así entre las concentraciones de 5-HT ( $F = 0.8452$  y  $p = 0.5190651$ ), sin embargo, sí lo fue para la interacción entre estos factores ( $F = 2.5757$  y  $p = 0.0004206$ ).

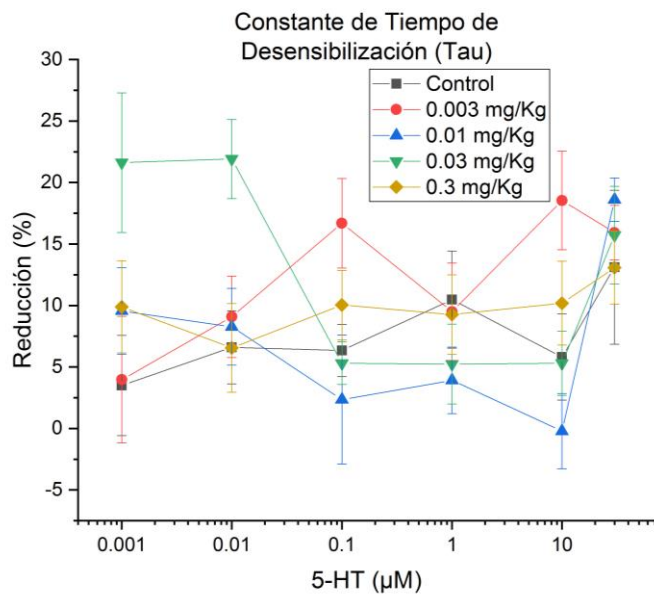


Figura 42. Gráfica para el porcentaje de reducción sobre la  $I_{NMDA}$  causado por 5-HT en Tau. Sólo se obtuvo diferencia significativa para D0.003 en las concentraciones 0.1 y 10 de 5-HT y para para D0.03 en las concentraciones 0.001 y 0.01 de 5-HT.

Aunado a lo anterior, se muestra la representación gráfica con respecto a cada concentración de 5-HT y su división correspondiente (Figura 44).

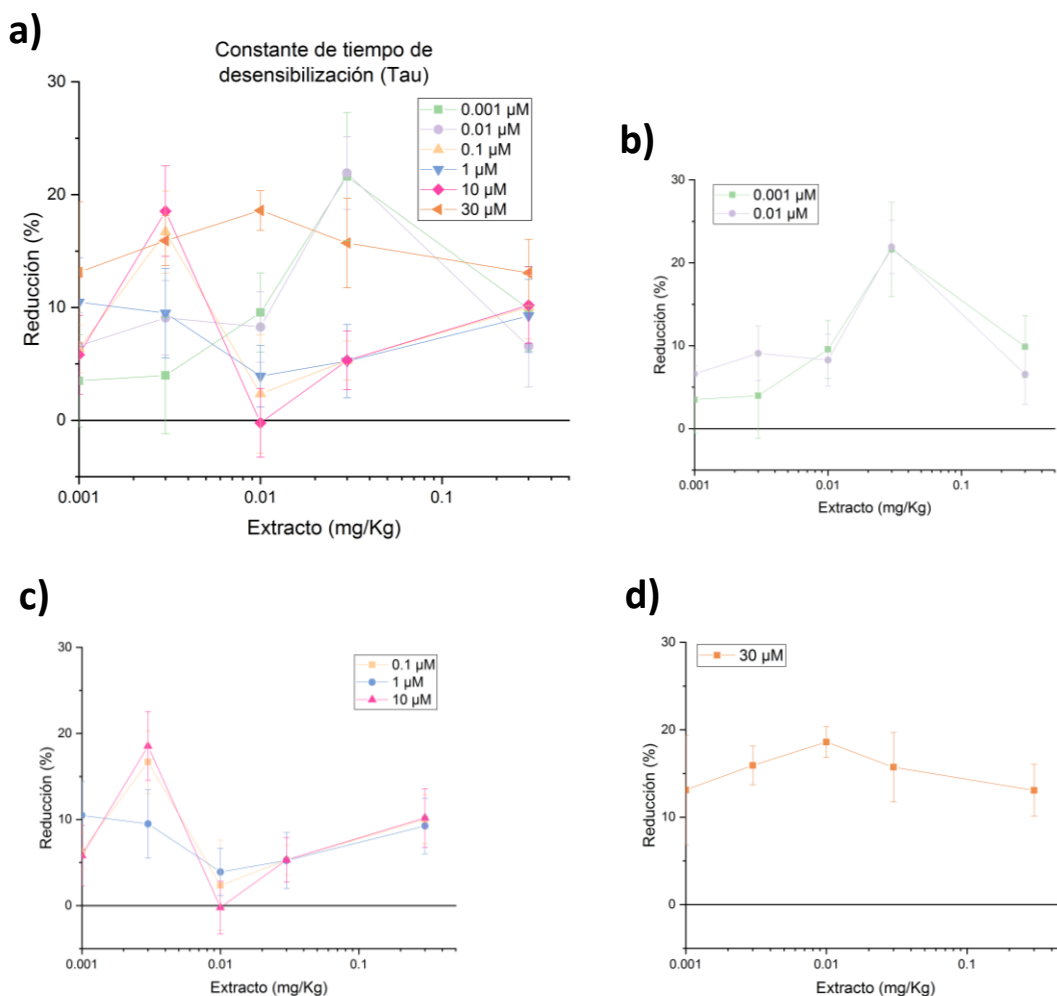


Figura 43. Gráficas del comportamiento para cada concentración de 5-HT con respecto al aumento de dosis del extracto correspondiente a Tau, donde, en a) se representan las curvas correspondientes a todas las concentraciones de 5-HT utilizadas, a partir de la cual se identificó una tendencia a tres efectos, primero para las concentraciones 0.001 y 0.01 μM de 5-HT (b), a continuación, para 0.1, 1 y 10 μM de 5-HT (c) y finalmente para la concentración de 30 μM de 5-HT (d).

Y como última parte, se realizó la gráfica correspondiente en tres dimensiones para Tau (Figura 45; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) donde, como en los casos anteriores, se pueden visualizar de forma global los efectos mostrados previamente, no resalta algún efecto ya que no se obtuvieron diferencias significativas.

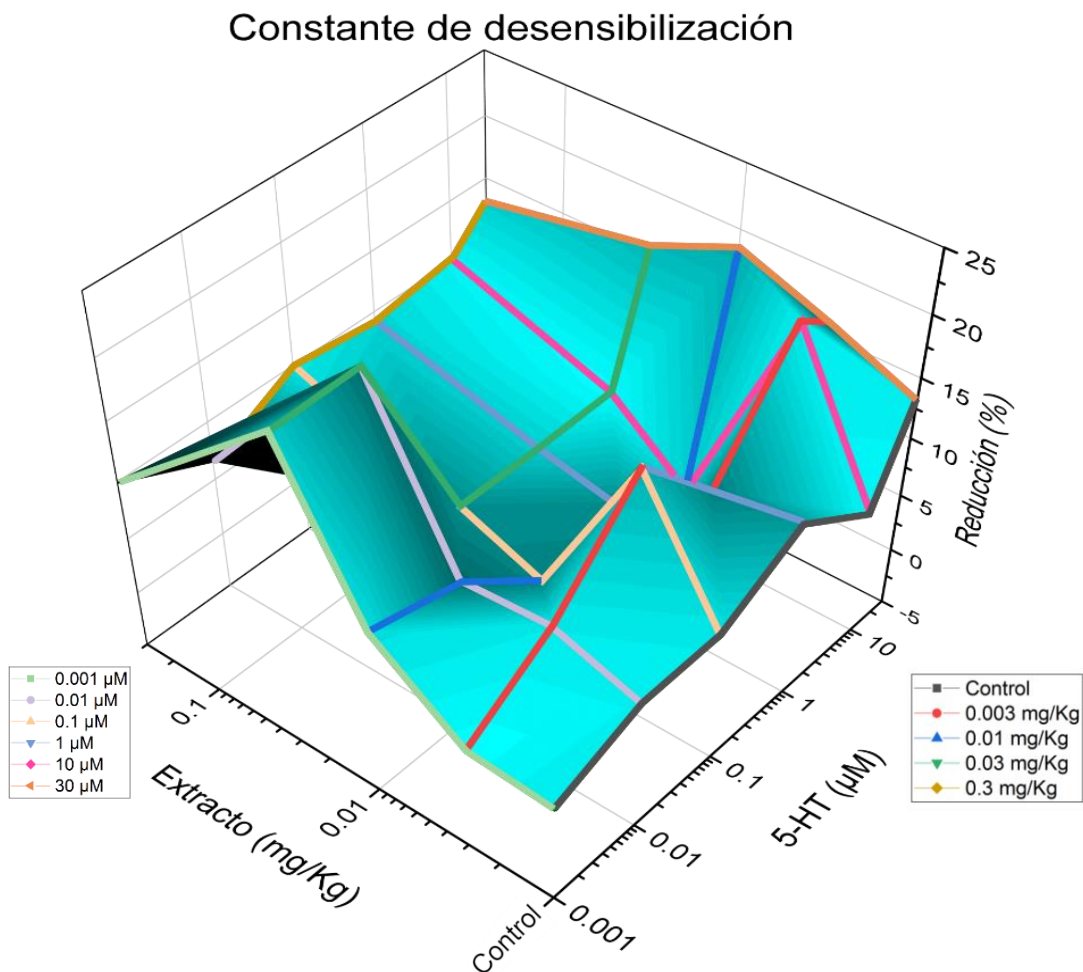


Figura 44. Gráfica en tres dimensiones del efecto del porcentaje de reducción con respecto a Tau causado por 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$ , en las dosis del extracto de *P. cubensis* probadas, que representa de forma simultánea los resultados obtenidos sobre el porcentaje de inhibición con respecto a la concentración de 5-HT y con respecto a la dosis del extracto. No se obtuvo diferencia significativa para ninguno de los factores.

## 8 Discusión

Ya que el objetivo de este proyecto fue caracterizar el efecto de la administración del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre la  $I_{NMDA}$  y su modulación serotoninérgica en la CPF, primero era necesario saber que nuestro extracto estaba llegando al SNC y era capaz de generar una respuesta en él. Por tal motivo, se utilizó la respuesta WDS, ya que en concordancia con lo descrito según por Bedard & Pycock (1977), Canal & Morgan (2012) y Halberstadt & Geyer (2011, 2013) esta respuesta sólo se presenta por la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en SNC por agonistas alucinógenos por la vía de las  $\beta$ -arrestinas (González-Maeso *et al.*, 2003; Gonzalez-Maeso & Sealton, 2009), por lo que todos los equipos de trabajo mencionados la utilizan como marcador de la respuesta en los roedores a la administración de alucinógenos.

Se han realizado algunas investigaciones para identificar el contenido de triptaminas alucinógenas en extractos metanólicos de algunos ejemplares de hongos psicodélicos, entre las que destacan Zhuk (2015) y Matsushima (2009) quienes describieron y cuantificaron mediante cromatografía la presencia de las triptaminas alucinógenas baeocistina, norbaeocistina, aeruginascina, psilocibina y psilocina (descritas en la sección 1.1.1.1.1.1).

Además, Zhuk (2015) realizó un estudio toxicológico, donde comparó el extracto metanólico de *Ph. cyanopus* y *P. semilanceata* contra psilocina pura y obtuvo resultados similares para la respuesta HT, DE<sub>50</sub> y DL<sub>50</sub> (*Ph. cyanopus*:  $316.87 \pm 1.63$ ; *P. semilanceata*  $324.37 \pm 2.04$ ; y psilocina  $293.07 \pm 1.02$ ), ya que pese a que puede haber una cantidad menor de psilocina en el extracto, ella reporta que las otras triptaminas alucinógenas pueden tener un efecto sinérgico y, por lo tanto, contribuir a que los efectos del fármaco puro contra los extractos sean similares, sin embargo, no podemos descartar algún efecto completamente alternativo que pueda ser generado por algún otro compuesto presente en el extracto metanólico de *P. cubensis* utilizado.

Con base en lo anterior, se eligió el rango desde la D0.003 hasta la D0.3 de acuerdo a las dosis consideradas en la literatura como baja y alta. Es preciso mencionar que Zhuk (2015), Fantegrossi (2010; 2008), Pranzatelli (1990) y Wettstein (1999), denotan un comportamiento con forma de campana o bifásico dosis-dependiente para el conteo de respuesta WDS. Con respecto a nuestros resultados, se observó una tendencia hacia esta forma, a pesar de no existir diferencias

estadísticamente significativas. Cabe aclarar que los estudios mencionados han utilizado tanto extracto metanólico de *Psilocybe spp*, psilocina, DOI y 25CN-NBOH, es decir, diferentes compuestos alucinógenos.

Una vez obtenido el rango adecuado de dosis del extracto, y bajo la consideración de que la respuesta WDS se correlaciona con la acción de las triptaminas alucinógenas contenidas en el extracto metanólico en el SNC, se procedió a evaluar si el efecto del extracto era capaz de afectar la  $I_{NMDA}$  de una manera detectable 24 horas después de la administración de este.

Es sabido, a través de estudios de imagenología realizados por los equipos de Vollenweider (1997; 1998), Gouzouliz-Mayfrank (1999) y Carhart-Harris (2017), que el efecto generado por psilocina produce “hiperfrontalidad”, es decir, un aumento de la actividad en regiones frontales del SNC entre las que destaca la CPF. Además, se ha reportado también que los alucinógenos aumentan la liberación de glutamato en la misma área antes resaltada (Andrade, 2011; Béique *et al.*, 2004, 2007). Traduciéndose la relación de ambos fenómenos en un aumento de la excitabilidad del área (D. E. Nichols *et al.*, 2017; Stein *et al.*, 2005; Tagliazucchi *et al.*, 2014). No obstante, estos estudios se han realizado siempre durante el efecto de los fármacos, por lo cual en este estudio se planteó analizar cómo estos afectaban la excitabilidad tras alcanzar el extracto concentraciones suficientemente bajas para ya no provocar efectos perceptibles (Hasler *et al.*, 1997; Passie *et al.*, 2002b) es decir, cuáles efectos compensatorios o perturbaciones prevalecen tras este lapso (Arora & Meltzer, 1991; Vogelgesang *et al.*, 2017).

Con estos antecedentes, se eligió la  $I_{NMDA}$  debido a su participación en los procesos de excitabilidad de una célula nerviosa y a las neuronas piramidales de la CPF dada la alta expresión del receptor NMDA y por ser las principales protagonistas en los procesos antes mencionados.

Por tanto, a modo de caracterizar la  $I_{NMDA}$  se realizó una curva dosis-respuesta a NMDA para cada una de las dosis del extracto elegidas, analizándose Pico, EE, EE/P y Tau. Cabe recordar que, tanto para el Pico como para el EE, se utilizó como unidad la relación entre la amplitud de la corriente y la capacitancia de la célula (densidad de corriente), lo cual permite que un cambio en este valor nos dé una idea de los cambios en el nivel de expresión o sensibilidad de los receptores en la superficie de la

célula (Cottrell *et al.*, 2000), si consideramos semejante la cantidad de corriente que atraviesa por cada uno de estos.

No obstante, no debemos perder de vista que otra posibilidad de estos cambios es justamente una alteración en el flujo de la corriente. De tal modo, al analizar la batería de curvas dosis-respuesta para las dosis probadas del extracto metanólico, tanto en el ámbito del Pico como del EE se observó una disminución de la densidad de corriente, la cual era cada vez más notoria con respecto al aumento en la concentración de NMDA, estando esta disminución presente en las curvas dosis-respuesta para todas las dosis del extracto, en diferente proporción.

Como previamente se dijo, el cambio en la densidad de corriente nos da una idea de la expresión del receptor, por lo cual la disminución en la densidad de corriente observada, pueden estar relacionada con fenómenos de autorregulación en respuesta al alto grado de excitabilidad de la CPF que sucedió 24 horas antes, fenómenos similares a los postulados por Meyer (2012) quién menciona, que el receptor NMDA, una vez que el nivel de excitabilidad supera otros medios de regulación, responde autorregulándose. Dentro de este estudio, los resultados para las características de EE/P y Tau no mostraron cambios significativos, lo cual sugiere, que a pesar de la disminución de la amplitud del Pico y EE de la  $I_{NMDA}$ , la proporción de los subtipos de receptores de NMDA en la población total, así como su participación en la cinética de la corriente no fueron alteradas (Groc *et al.*, 2006).

Por otra parte, al graficar estos datos en relación a las dosis del extracto metanólico se pudo observar una respuesta en forma de campana invertida con la menor densidad de corriente encontrada entre las D0.03 y D0.1 que concuerda con la dosis en que se presenta el mayor número de WDS (D0.03), lo cual nos habla, con base en lo anteriormente expuesto, de la posibilidad de que la excitabilidad de la CPF empiece a disminuir una vez superada un pico de efecto máximo de manera dosis-dependiente, disminuyendo a su vez, las respuestas compensatorias a esta excitabilidad. Este hecho también podría tener una correlación con los efectos conductuales ya descritos anteriormente por Zhuk (2015), Fantegrossi (2010; 2008), Pranzatelli (1990) y Wettstein(1999) donde hay una disminución del número de respuestas WDS con respecto la dosis aumenta.

Con respecto al último objetivo, se evaluó la modulación por 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$  para las dosis del extracto de *P.cubensis* probadas, con el fin de saber si los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/C</sub> y 5-HT<sub>1A</sub>

fueron alterados, debido a que, como ya ha sido ampliamente descrito por (Aghajanian & Marek, 1999; González-Maeso *et al.*, 2007; David E Nichols, 1994; 2004, 2016), son el principal mecanismo de acción de los alucinógenos y que de acuerdo a lo descrito por Yuen (2008; 2005), ejercen un papel modulador en la excitabilidad de las neuronas piramidales al tener efectos reguladores sobre la  $I_{NMDA}$  en la CPF.

Además, existen diversos reportes que señalan que estos receptores serotoninérgicos, tras la activación por agonistas alucinógenos pueden verse modificados por mecanismos de desensibilización e internalización descrito (Albert *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 2001, 2005; Buckholtz *et al.*, 1988b; Eison & Mullins, 1995; Halberstadt, 2015).

Para lograr el último objetivo mencionado primero se necesitó tomar en cuenta que hubo un cambio en la densidad de corriente de los receptores NMDA y dado que ya es sabido que el efecto predominante de 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$  es inhibitorio, se decidió evaluar sólo el porcentaje de reducción de la corriente como una forma de controlar esta variable. Una vez establecido el modo de controlar ésta variable se procedió a realizar una curva dosis-respuesta de 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$  para cada dosis del extracto probada.

Por otra parte, dado que hasta ahora no existe un reporte en la literatura, de una curva dosis-respuesta de la modulación serotoninérgica sobre la  $I_{NMDA}$ , por lo que primero era necesario caracterizar este efecto en la dosis control D0 para tener un punto de comparación inicial.

Considerando que la concentración de 1nM sólo sería capaz de activar los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, de acuerdo a los valores de afinidad reportados en la bibliografía (Barnes & Sharp, 1999b), este fue el punto de partida para el trazado de esta curva, para el cual se encontraron porcentajes de reducción de ~3%. Posteriormente, se continuó con un aumento de un orden de magnitud hasta 10µM ya que para cada punto se encontraron diferentes efectos, y después de esto sólo se aumentó hasta 30 µM ya que, con base en lo reportado en la literatura esta es una concentración saturante (Yuen, Jiang, Chen, *et al.*, 2005), además de que hasta este punto se cubría el rango de valores de afinidad reportados para el receptor 5-HT<sub>2A/C</sub>, dado que, hasta la actualidad, no hay un consenso de este dato (Barnes & Sharp, 1999b; McKenna *et al.*, 1990).

La curva obtenida de este modo, mostró diferentes componentes, lo que pudiera reflejar la participación de diferentes receptores serotoninérgicos que, aunque en menor densidad, están presentes en las neuronas piramidales de la CPF (Robin L Carhart-Harris *et al.*, 2016, 2017; Griffiths *et al.*, 2016; Matsushima, Shirota, *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2006) y pudieran estar participando en la modulación de la  $I_{NMDA}$ . Es decir, a pesar de que sólo se ha reportado la participación de dos receptores (5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A/C</sub>) en la modulación de la  $I_{NMDA}$ , nuestros datos en condiciones control denotan, la posible participación de, al menos, un receptor serotoninérgico más en dicha modulación, sin embargo, se requieren más estudios para confirmar e identificar la identidad de éste.

Una vez obtenida la curva para las condiciones control (D0), las neuronas de las ratas administradas fueron expuestas a las mismas concentraciones de 5-HT utilizadas para la curva control, analizando a cada corriente las mismas características que para el objetivo anterior (Pico, EE, EE/P y Tau).

Con estos datos, tras haber sido analizados, se pudieron observar tres comportamientos distintos de la reducción de la  $I_{NMDA}$  causadas por 5-HT, los cuales son discernibles y agrupables por grupos de concentración de 5-HT.

En las concentraciones de 1 y 10nM se puede observar un aumento del porcentaje de inhibición en la  $I_{NMDA}$  causada por 5-HT de forma dosis-dependiente del extracto, aumento de la inhibición que alcanza su máximo con la D0.03, efecto que se mantiene para las dosis mayores. Ya que este incremento en el porcentaje de reducción puede ser observado desde la dosis menor (D0.003), y las triptaminas tienen la mayor afinidad por el receptor 5-HT<sub>2A/C</sub>, el cual cuenta con una  $CE_{50}$  de ~3nM a 5-HT, concentración en la cual se está presentando este fenómeno descrito, postulamos la posibilidad de que el mismo se deba a una desensibilización del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en respuesta a la administración del extracto realizada 24 horas antes.

Por otro lado, al analizar los efectos encontrados en el rango de 0.1 a 10  $\mu$ M de 5-HT se puede observar un aumento abrupto del porcentaje de inhibición de la  $I_{NMDA}$  para la D0.01 con respecto al control, seguido de un decremento gradual hasta la “recuperación” del porcentaje normal de inhibición, con una leve tendencia a valores menores de los originales. Cabe resaltar que, aunque este fenómeno aplica a las tres concentraciones de 5-HT mencionadas, se observa en una mayor proporción para la concentración de 10  $\mu$ M.

Este mismo rango (0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ) de 5-HT, probablemente involucre la acción de, por lo menos, otro receptor serotoninérgico como se mencionó previamente al abordar la descripción de la curva control, además como consecuencia de la desensibilización del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, también ya mencionada, pudieron ocurrir mecanismos compensatorios en los niveles de expresión de estos receptores (Goodfellow *et al.*, 2012) en proporción a las dosis del extracto, motivo por el cuál su participación en la modulación de la I<sub>NMDA</sub> es notoriamente más abrupta.

Por otro lado, se ha reportado que los receptores 5-HT<sub>4</sub> tienen efectos duales en las neuronas GABAérgicas de la CPF, es decir, pueden mejorar o disminuir la respuesta inhibitoria de éstas células en correspondencia a su estado funcional basal (Cai *et al.*, 2002), por lo que es posible aventurarse a conjeturar que podría estar ocurriendo en este caso un proceso similar en las neuronas piramidales, que produzcan el fenómeno observado.

Por último, se observó un tercer comportamiento para la última la última fase de la curva (30  $\mu\text{M}$ ) el cual difiere de los dos efectos explicados previamente. Esta concentración se mantiene prácticamente sin cambio ante el aumento de las dosis del extracto, por excepción de la dosis más alta (D0.3), lo cual puede ser producto de la sumación de los fenómenos antes citados, ya que, como se mencionó al inicio esta es una concentración de 5-HT considerada como saturante.

Catlow (2013, 2016) evaluó la neurogénesis utilizando psilocina y la feniletilamina 25I-NBMeO donde encontró un efecto bifásico con psilocina, es decir, a dosis bajas hubo aumento de neurogénesis y dosis altas de psilocina encontró disminución de ésta. Nuestros resultados, de alguna forma también reflejaron este efecto bifásico donde con dosis bajas encontramos un aumento en el porcentaje de inhibición causado por 5-HT sobre la I<sub>NMDA</sub> y con la dosis más alta (D0.3) encontramos incluso una ligera potenciación de la I<sub>NMDA</sub> al co-aplicar serotonina,

En cuanto a las curvas-dosis respuesta en forma de campana, se ha descrito por Kasai (1998) y Szomolay & Shahrezaei (2012) que esta morfología se debe a la participación de diversos receptores, hecho que da soporte a lo previamente expuesto. De forma adicional, es preciso recordar que utilizamos un extracto metanólico del hongo en el que aunado a las triptaminas alucinógenas (psilocina y psilocibina) que se confirmaron (apartado 5.1.1) pueden estar presentes diversos compuestos polares alucinogénicos o no alucinogénicos y estar ejerciendo algún papel en nuestros resultados globales.

Y, en relación a estas investigaciones, particularmente 5-HT<sub>2A/C</sub> tienen efectos contrarios al subtipo 5-HT<sub>1A</sub>, por lo que es más factible aún encontrar estos efectos bifásicos o contrarios.

En resumen, proponemos que el nivel de excitabilidad de las células piramidales corresponde a la proporción de la activación de los receptores 5-HT<sub>2A/C</sub> y 5-HT<sub>1A</sub>, cuyo papel principal es regular este aumento de excitabilidad. La respuesta WDS fue el marcador de la proporción de activación de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/C</sub>, es decir, ya que los primeros receptores en activarse, debido a la alta afinidad que tienen por las triptaminas alucinógenas contenidas en el extracto, son los 5-HT<sub>2A/C</sub>, la proporción de la población de estos receptores que se activan tiene correspondencia al aumento de dosis del extracto, hasta que se alcanza una dosis que es capaz de activar toda la población de receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>, en función de que la activación de estos receptores por compuestos alucinógenos descritos por Andrade (2011) y Halberstadt (2015) es facilitar la excitabilidad de las neuronas piramidales y entonces esto podría correlacionarse, con el máximo aumento de excitabilidad de las neuronas (Zhong *et al.*, 2008) causado por las triptaminas contenidas en el extracto.

La I<sub>NMDA</sub> a las 24 horas disminuyó para las dosis bajas del extracto, asimismo encontramos que la modulación por 5-HT de la I<sub>NMDA</sub> reflejó un aumento significativo del porcentaje de inhibición de la corriente. Es notorio el efecto que se alcanza a este punto de efecto máximo, tanto para el conteo de WDS, el cambio en la densidad de corriente de NMDA y el porcentaje de reducción por 5-HT de I<sub>NMDA</sub>.

Es posible que a este nivel se aumente la proporción de activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, los cuales necesitan una concentración mayor de extracto debido a la menor afinidad que tienen por las triptaminas, esto les permite regular el aumento de excitabilidad causada por la activación de los receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>, que, como resultado de su activación sostenida experimentan cambios en su estado basal de activación y/o expresión (por procesos de desensibilización e internalización), por lo que después de llegar a un punto máximo ésta tiende a disminuir conforme la dosis administrada es aún mayor. Este hecho se denotó con la curva dosis-respuesta WDS que mostró una tendencia no significativa a la disminución del conteo (forma de campana), y cuya respuesta neuronal 24 horas después mostró una menor disminución de la excitabilidad, que se denota con una decremento de la densidad de I<sub>NMDA</sub> para la dosis mayor del extracto, similar al encontrado en la dosis más baja (forma de campana invertida de la curva dosis respuesta NMDA) y también con un menor porcentaje de inhibición causado por 5-HT de la I<sub>NMDA</sub> con respecto al resultante para las dosis centrales del extracto.

Además, hay que tener en cuenta que puede haber (M. V. Puig & Gullledge, 2011) otros receptores serotoninérgicos que se expresan en las neuronas piramidales que, aunque en baja densidad, también participan en la modulación de la  $I_{NMDA}$  y que proponemos pueden compensar la acción de los principales receptores tras su alteración.

Como último punto, queremos resaltar el hecho de que nuestros resultados son una primera aproximación general a los efectos que se generan 24 horas después de la administración del extracto metanólico de *P. cubensis*, que contiene, entre diversos compuestos más, psilocina y psilocibina. Además de que no existen en la literatura, hasta ahora, trabajos que hayan realizado algún análisis cercano. Después de esta primera aproximación, es necesario caracterizar de forma específica los efectos que proponemos se deben a los diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos.

Finalmente, nos aventuramos a proponer una correlación de nuestros resultados con las teorías que se han propuesto de forma reciente (Robin Lester Carhart-Harris *et al.*, 2014; Lebedev *et al.*, 2016; David E. Nichols *et al.*, 2017; Tagliazucchi *et al.*, 2014, 2016)), las cuales hacen referencia a que después de perturbaciones que alteran el estado funcional basal del sistema, éste tiende a re-establecerse e incluso “re-iniciarse”. Ya que en algunos trastornos mentales podría considerarse que el estado funcional basal del sistema está alterado (con respecto a los estados funcionales de las neuronas, como *up* y *down* (Cai *et al.*, 2002) y/o las relaciones intra e inter-estructurales), esto podría dar indicios de la vía por la que los compuestos alucinógenos efectúen sus acciones terapéuticas, aunado a los cambios tanto en los niveles de expresión de los receptores como la liberación de neurotransmisores.

## 9 Conclusiones

Se pudo observar y realizar un conteo de la respuesta WDS en función de la administración intraperitoneal de las dosis 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 mg/kg de peso del extracto metanólico de *P. cubensis*.

La curva dosis-respuesta NMDA mostró cambios en la densidad de corriente sin manifestar cambios significativos en la  $CE_{50}$ , constante de desensibilización y la proporción de estado estacionario con el pico de la corriente. Proponemos que se debe a una posible disminución de la cantidad de receptores a NMDA pero sin alterar las subunidades que los componen.

La modulación por serotonina sobre la  $I_{NMDA}$  mostró variabilidad en el porcentaje de reducción, proponemos que pudo haber una alteración (desensibilización o internalización) de los subtipos de receptores serotoninérgicos, principalmente los 5-HT<sub>2A/C</sub> y 5-HT<sub>1A</sub>.

Después de 24 horas de la administración intraperitoneal del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* produce un cambio en la corriente activada por NMDA y en el porcentaje de inhibición modulada por serotonina sobre dicha corriente ( $I_{NMDA}$ ) en neuronas piramidales agudamente dissociadas de la corteza prefrontal de la rata.

## 10 Referencias

- Adams, J. (2009). Chemical interactions with pyramidal neurons in layer 5 of the cerebral cortex: Control of pain and anxiety. *Current medicinal chemistry*, 16(27), 3476-3479.
- Adams, L. M., & Geyer, M. A. (1985). A proposed animal model for hallucinogens based on LSD's effects on patterns of exploration in rats. *Behavioral neuroscience*, 99(5), 881.
- Aghajanian, G. K., & Marek, G. J. (1999). Serotonin and Hallucinogens. *Neuropsychopharmacology*, 21(2, Supplement 1), 16S-23S.
- Albert, P. R., Lembo, P., Storrington, J. M., Charest, A., & Saucier, C. (1996). The 5-HT<sub>1A</sub> receptor: signaling, desensitization, and gene transcription. *Neuropsychopharmacology*, 14(1), 19.
- Ally, S., Jolly, A. L., & Gelfand, V. I. (2008). Motor-cargo release: CaMKII as a traffic cop. *Nature cell biology*, 10(1), 3.
- Amargós-Bosch, M., Bortolozzi, A., Puig, M. V., Serrats, J., Adell, A., Celada, P., ... Artigas, F. (2004). Co-expression and in vivo interaction of serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 14(3), 281-299.
- Andrade, R. (2011). Serotonergic regulation of neuronal excitability in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, 61(3), 382-386.
- Anji, A., Hanley Nicole R. Sullivan, Kumari Meena, & Hensler Julie G. (2001). The role of protein kinase C in the regulation of serotonin-2A receptor expression. *Journal of Neurochemistry*, 77(2), 589-597.
- Arora, R., & Meltzer, H. (1991). Serotonin 2 (5-HT<sub>2</sub>) receptor binding in the frontal cortex of schizophrenic patients. *Journal of Neural Transmission/General Section JNT*, 85(1), 19-29.
- Azmitia, E. C., Gannon, P. J., Kheck, N. M., & Whitaker-Azmitia, P. M. (1996). Cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology*, 14(1), 35.
- Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y., & Surmeier, D. J. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca<sup>2+</sup> currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *Journal of Neuroscience*, 14(11), 6667-6686.
- Barnes, N. M., & Neumaier, J. F. (2011). Neuronal 5-HT receptors and SERT. *Tocris Biosci Sci Rev Ser*, 34, 1-16.
- Barnes, N. M., & Sharp, T. (1999a). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8), 1083-1152.
- Barnes, N. M., & Sharp, T. (1999b). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8), 1083-1152.
- Bedard, P., & Pycock, C. (1977). The 'wet dog shake' behaviour in the rat and 5-hydroxytryptamine [proceedings]. *British Journal of Pharmacology*, 59(3), 450P-451P.
- Behm, M., & Öhman, M. (2016). RNA Editing: A Contributor to Neuronal Dynamics in the Mammalian Brain. *Trends in Genetics*, 32(3), 165-175.
- Béïque, J.-C., Campbell, B., Perring, P., Hamblin, M. W., Walker, P., Mladenovic, L., & Andrade, R. (2004). Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex: coordinated

- expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT) 1A, 5-HT<sub>2A</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4807-4817.
- Béïque, J.-C., Imad, M., Mladenovic, L., Gingrich, J. A., & Andrade, R. (2007). Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9870-9875.
- Berg, K. A., Harvey, J. A., Spampinato, U., & Clarke, W. P. (2005). Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(12), 625-630.
- Berg, K. A., Stout, B. D., Maayani, S., & Clarke, W. P. (2001). Differences in Rapid Desensitization of 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> and 5-Hydroxytryptamine<sub>2C</sub> Receptor-Mediated Phospholipase C Activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(2), 593-602.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Bécamel, C., Dumuis, A., & Marin, P. (2006). Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 553-572.
- Bogenschutz, M. P., Forcehimes, A. A., Pommy, J. A., Wilcox, C. E., Barbosa, P. C. R., & Strassman, R. J. (2015). Psilocybin-assisted treatment for alcohol dependence: a proof-of-concept study. *Journal of psychopharmacology*, 29(3), 289-299.
- Borhegyi, S. F. de. (1961). Miniature Mushroom Stones from Guatemala. *American Antiquity*, 26(4), 498-504.
- Brailowsky, S. (2008). *Sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología*. Fondo de cultura Económica.
- Buckholtz, N. S., Zhou, D., & Freedman, D. X. (1988a). Serotonin<sub>2</sub> agonist administration down-regulates rat brain serotonin<sub>2</sub> receptors. *Life Sciences*, 42(24), 2439-2445.
- Buckholtz, N. S., Zhou, D., & Freedman, D. X. (1988b). Serotonin<sub>2</sub> agonist administration down-regulates rat brain serotonin<sub>2</sub> receptors. *Life sciences*, 42(24), 2439-2445.
- Cai, X., Flores-Hernandez, J., Feng, J., & Yan, Z. (2002). Activity-dependent bidirectional regulation of GABA<sub>A</sub> receptor channels by the 5-HT<sub>4</sub> receptor-mediated signalling in rat prefrontal cortical pyramidal neurons. *The Journal of physiology*, 540(3), 743-759.
- Canal, C. E., & Morgan, D. (2012). Head-twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2, 5-dimethoxy-4-iodoamphetamine: a comprehensive history, a re-evaluation of mechanisms, and its utility as a model. *Drug testing and analysis*, 4(7-8), 556-576.
- Carbonaro, T. M., Bradstreet, M. P., Barrett, F. S., MacLean, K. A., Jesse, R., Johnson, M. W., & Griffiths, R. R. (2016). Survey study of challenging experiences after ingesting psilocybin mushrooms: Acute and enduring positive and negative consequences. *Journal of Psychopharmacology*, 30(12), 1268-1278.
- Carhart-Harris, Robin L, Bolstridge, M., Rucker, J., Day, C. M., Erritzoe, D., Kaelen, M., ... Feilding, A. (2016). Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: an open-label feasibility study. *The Lancet Psychiatry*, 3(7), 619-627.
- Carhart-Harris, Robin L, Roseman, L., Bolstridge, M., Demetriou, L., Pannekoek, J. N., Wall, M. B., ... Murphy, K. (2017). Psilocybin for treatment-resistant depression: fMRI-measured brain mechanisms. *Scientific reports*, 7(1), 13187.

- Carhart-Harris, Robin Lester, Leech, R., Hellyer, P. J., Shanahan, M., Feilding, A., Tagliazucchi, E., ... Nutt, D. (2014). The entropic brain: a theory of conscious states informed by neuroimaging research with psychedelic drugs. *Frontiers in human neuroscience*, *8*, 20.
- Carod-Artal, F. J. (2011). Alucinógenos en las culturas precolombinas mesoamericanas. *Neurología*, 42-49.
- Carter, O. L., Hasler, F., Pettigrew, J. D., Wallis, G. M., Liu, G. B., & Vollenweider, F. X. (2007). Psilocybin links binocular rivalry switch rate to attention and subjective arousal levels in humans. *Psychopharmacology*, *195*(3), 415-424.
- Catlow, B. J., Jalloh, A., & Sanchez-Ramos, J. (2016). Hippocampal Neurogenesis: Effects of Psychedelic Drugs. En *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse* (pp. 821-831). Elsevier.
- Catlow, B. J., Song, S., Paredes, D. A., Kirstein, C. L., & Sanchez-Ramos, J. (2013). Effects of psilocybin on hippocampal neurogenesis and extinction of trace fear conditioning. *Experimental brain research*, *228*(4), 481-491.
- Celada, P., Puig, M. V., Casanovas, J. M., Guillazo, G., & Artigas, F. (2001). Control of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons by the Medial Prefrontal Cortex: Involvement of Serotonin-1A, GABAA, and Glutamate Receptors. *Journal of Neuroscience*, *21*(24), 9917-9929.
- Chagraoui, A., Thibaut, F., Skiba, M., Thuillez, C., & Bourin, M. (2016). 5-HT<sub>2C</sub> receptors in psychiatric disorders: A review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *66*, 120-135.
- Chilmonczyk, Z., Bojarski, A. J., Pilc, A., & Sylte, I. (2015). Functional selectivity and antidepressant activity of serotonin 1A receptor ligands. *International journal of molecular sciences*, *16*(8), 18474-18506.
- Christopoulos, A., & Kenakin, T. (2002). G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacological reviews*, *54*(2), 323-374.
- Coccaro, E. F., Astill, J. L., Herbert, J. L., & Schut, A. G. (1990). Fluoxetine Treatment of Impulsive Aggression in DSM-III-R: Personality Disorder Patients. *Journal of clinical psychopharmacology*, *10*(5), 373-374.
- Corne, S., & Pickering, R. (1967). A possible correlation between drug-induced hallucinations in man and a behavioural response in mice. *Psychopharmacologia*, *11*(1), 65-78.
- Cornea-Hébert, V., Riad, M., Wu, C., Singh, S. K., & Descarries, L. (1999). Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, *409*(2), 187-209.
- Cottrell, J. R., Dubé, G. R., Egles, C., & Liu, G. (2000). Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology*, *84*(3), 1573-1587.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(3), 327-335.
- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. *Sci. STKE*, *2004*(255), re16-re16.

- Dahlström, A., & Fuxe, K. (1964). A Method for the Demonstration of Monoamine-Containing Nerve Fibres in the Central Nervous System. *Acta Physiologica Scandinavica*, 60(3), 293-294.
- DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L., & Arellano, J. I. (2002). Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *Journal of Neurocytology*, 31(3-5), 299-316.
- DeFelipe, J., Arellano, J. I., Gómez, A., Azmitia, E. C., & Muñoz, A. (2001). Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 433(1), 148-155.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 7-62.
- Eison, A. S., & Mullins, U. L. (1995). Regulation of central 5-HT<sub>2A</sub> receptors: a review of in vivo studies. *Behavioural Brain Research*, 73(1), 177-181.
- Fantegrossi, W. E., Murnane, K. S., & Reissig, C. J. (2008). The behavioral pharmacology of hallucinogens. *Biochemical pharmacology*, 75(1), 17-33.
- Fantegrossi, W., Simoneau, J., Cohen, M., Zimmerman, S., Henson, C., Rice, K., & Woods, J. (2010). Interaction of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in R (-)-2, 5-dimethoxy-4-iodoamphetamine-elicited head twitch behavior in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(3), 728-734.
- Fernández, P., & Velázquez, P. (2008). Farmacología: Básica y Clínica. Madrid: Panamericana.
- Flores-Hernandez, J., Cepeda, C., Hernandez-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., ... Levine, M. S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of neurophysiology*, 88(6), 3010-3020.
- Flores-Hernandez, J., Hernandez, S., Snyder, G. L., Yan, Z., Fienberg, A. A., Moss, S. J., ... Surmeier, D. J. (2000). D1 dopamine receptor activation reduces GABA<sub>A</sub> receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *Journal of Neurophysiology*, 83(5), 2996-3004.
- Fuster, J. (2008). *The Prefrontal Cortex*. Elsevier.
- Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P., & Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *Journal of Comparative Neurology*, 492(2), 145-177.
- Gartz, J. (1995). Cultivation and analysis of Psilocybe species and an investigation of Galerina steglichii. *Ann. Mus. Civ. Rov*, 10, 297.
- Gewirtz, J. C., & Marek, G. J. (2000). Behavioral evidence for interactions between a hallucinogenic drug and group II metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology*, 23(5), 569.
- Gleichman, A. J., Spruce, L. A., Dalmau, J., Seeholzer, S. H., & Lynch, D. R. (2012). Anti-NMDA Receptor Encephalitis Antibody Binding Is Dependent on Amino Acid Identity of a Small Region within the GluN1 Amino Terminal Domain. *Journal of Neuroscience*, 32(32), 11082-11094.
- Glockner, J. (2016). *La mirada interior: Plantas sagradas del mundo amerindio*. Debate.

- González-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., López-Giménez, J. F., ... Milligan, G. (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*, *452*(7183), 93.
- Gonzalez-Maeso, J., & Sealfon, S. C. (2009). Agonist-trafficking and hallucinogens. *Current medicinal chemistry*, *16*(8), 1017-1027.
- González-Maeso, J., & Sealfon, S. C. (2009). Psychedelics and schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, *32*(4), 225-232.
- González-Maeso, J., Weisstaub, N. V., Zhou, M., Chan, P., Ivic, L., Ang, R., ... Gingrich, J. A. (2007). Hallucinogens Recruit Specific Cortical 5-HT<sub>2A</sub> Receptor-Mediated Signaling Pathways to Affect Behavior. *Neuron*, *53*(3), 439-452.
- González-Maeso, J., Yuen, T., Ebersole, B. J., Wurmbach, E., Lira, A., Zhou, M., ... Sealfon, S. C. (2003). Transcriptome fingerprints distinguish hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(26), 8836-8843.
- Goodfellow, N. M., Bailey, C. D., & Lambe, E. K. (2012). The native serotonin 5-HT<sub>5A</sub> receptor: electrophysiological characterization in rodent cortex and 5-HT<sub>1A</sub>-mediated compensatory plasticity in the knock-out mouse. *Journal of Neuroscience*, *32*(17), 5804-5809.
- Gouzoulis-Mayfrank, E., Schreckenberger, M., Sabri, O., Arning, C., Thelen, B., Spitzer, M., ... Sass, H. (1999). Neurometabolic effects of psilocybin, 3, 4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE) and d-methamphetamine in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled PET study with [<sup>18</sup>F] FDG. *Neuropsychopharmacology*, *20*(6), 565-581.
- Gray, J. A., & Roth, B. L. (2001). Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors by agonists and antagonists. *Brain Research Bulletin*, *56*(5), 441-451.
- Green, R. A. (2009). Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *British Journal of Pharmacology*, *147*(S1), S145-S152.
- Griffiths, R. R., Johnson, M. W., Carducci, M. A., Umbricht, A., Richards, W. A., Richards, B. D., ... Klinedinst, M. A. (2016). Psilocybin produces substantial and sustained decreases in depression and anxiety in patients with life-threatening cancer: A randomized double-blind trial. *Journal of psychopharmacology*, *30*(12), 1181-1197.
- Groc, L., Heine, M., Cousins, S. L., Stephenson, F. A., Lounis, B., Cognet, L., & Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(49), 18769-18774.
- Groenewegen, H. J., & Uylings, H. B. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progress in Brain Research*, *126*, 3-28.
- Guzmán, G. (1995). Supplement to the monograph of the genus Psilocybe. *Taxonomic monographs of Agaricales. Bibliotheca Mycologica*, *159*, 91-141.

- Halberstadt, A. L. (2015). Recent advances in the neuropsychopharmacology of serotonergic hallucinogens. *Behavioural Brain Research*, 277, 99-120.
- Halberstadt, A. L., & Geyer, M. A. (2011). Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens. *Neuropharmacology*, 61(3), 364-381.
- Halberstadt, A. L., & Geyer, M. A. (2013). Characterization of the head-twitch response induced by hallucinogens in mice. *Psychopharmacology*, 227(4), 727-739.
- Halberstadt, A. L., & Geyer, M. A. (2016). Effect of Hallucinogens on Unconditioned Behavior. En *Behavioral Neurobiology of Psychedelic Drugs* (pp. 159-199). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hall, D. A. (2000). Modeling the functional effects of allosteric modulators at pharmacological receptors: an extension of the two-state model of receptor activation. *Molecular pharmacology*, 58(6), 1412-1423.
- Hasler, F., Bourquin, D., Brenneisen, R., Bär, T., & Vollenweider, F. X. (1997). Determination of psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid in plasma by HPLC-ECD and pharmacokinetic profiles of oral and intravenous psilocybin in man. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 72(3), 175-184.
- He, X., & Zhang, J. (2006). Toward a molecular understanding of pleiotropy. *Genetics*, 173(4), 1885-1891.
- Heim, R., & Hofmann, A. (1958). *Isolement de la psilocybine à partir du Stropharia cubensis Earle et d'autres espèces de champignons hallucinogènes mexicains appartenant au genre Psilocybe*. Gauthier-Villars]. [Paris.
- Heim, R., & Wasson, R. G. (1958). *Les Champignons hallucinogènes du Mexique, études ethnologiques, taxinomiques, biologiques, physiologiques et chimiques*,. Éditions du Muséum national d'histoire naturelle.
- Hermle, L., Gouzoulis-Mayfrank, E., & Spitzer, M. (1998). Blood flow and cerebral laterality in the mescaline model of psychosis. *Pharmacopsychiatry*, 31(S 2), 85-91.
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., ... Humphrey, P. P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*, 46(2), 157-203.
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72(1), 165-229.
- Jakab, R. L., & Goldman-Rakic, P. S. (1998). 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), 735-740.
- Jerome, L. (2007). Psilocybin Investigator's Brochure.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4). McGraw-hill New York.
- Kasai, M. (1998). A comment on the analysis of bell-shaped dose-response curves. *The Japanese journal of physiology*, 48(1), 91-93.

- Katz, P. S., & Edwards, D. (1999). *Beyond neurotransmission*.
- Kaufman, J., DeLorenzo, C., Choudhury, S., & Parsey, R. V. (2016). The 5-HT<sub>1A</sub> receptor in Major Depressive Disorder. *European Neuropsychopharmacology*, 26(3), 397-410.
- Kenakin, T. P. (2014). Chapter 3 - Drug-Receptor Theory. En *A Pharmacology Primer (Fourth Edition)* (pp. 45-62). San Diego: Academic Press.
- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1768(4), 794-807.
- Köhr, G. (2006). NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 439-446.
- Koike, Y., Wada, K., Kusano, G., Nozoe, S., & Yokoyama, K. (1981). Isolation of psilocybin from *Psilocybe argentipes* and its determination in specimens of some mushrooms. *Journal of Natural Products*, 44(3), 362-365.
- Kraehenmann, R., Preller, K. H., Scheidegger, M., Pokorny, T., Bosch, O. G., Seifritz, E., & Vollenweider, F. X. (2015). Psilocybin-induced decrease in amygdala reactivity correlates with enhanced positive mood in healthy volunteers. *Biological psychiatry*, 78(8), 572-581.
- Kumar, S. S., & Huguenard, J. R. (2003). Pathway-Specific Differences in Subunit Composition of Synaptic NMDA Receptors on Pyramidal Neurons in Neocortex. *Journal of Neuroscience*, 23(31), 10074-10083.
- Lebedev, A. V., Kaelen, M., Lövdén, M., Nilsson, J., Feilding, A., Nutt, D. J., & Carhart-Harris, R. L. (2016). LSD-induced entropic brain activity predicts subsequent personality change. *Human brain mapping*, 37(9), 3203-3213.
- López Pavillard, S. (2003). Los enteógenos y la ciencia. *Rediris.[En línea]*.
- Lowy, B. (1971). New records of mushroom stones from Guatemala. *Mycologia*, 983-993.
- Martín-Ruiz, R., Puig, M. V., Celada, P., Shapiro, D. A., Roth, B. L., Mengod, G., & Artigas, F. (2001). Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, 21(24), 9856-9866.
- Masson, J., Emerit, M. B., Hamon, M., & Darmon, M. (2012). Serotonergic signaling: multiple effectors and pleiotropic effects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(6), 685-713.
- Matsushima, Y., Eguchi, F., Kikukawa, T., & Matsuda, T. (2009). Historical overview of psychoactive mushrooms. *Inflammation and Regeneration*, 29(1), 47-58.
- Matsushima, Y., Shirota, O., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., & Eguchi, F. (2009). Effects of *Psilocybe argentipes* on marble-burying behavior in mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(8), 1866-1868.
- McKenna, D. J., Repke, D. B., Lo, L., & Peroutka, S. J. (1990). Differential interactions of indolealkylamines with 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuropharmacology*, 29(3), 193-198.
- Meyer, D. K., Lindemeyer, A. K., Wilmes, T., Sobottka, H., & Nörenberg, W. (2012). GluA and GluN receptors regulate the surface density of GluN receptor subunits in cultured neocortical interneurons. *Journal of neurochemistry*, 121(4), 597-606.

- Moldavan, M., Grodzinskaya, A., Solomko, E., Lomberh, M., Wasser, S., & Storozhuk, V. (2001). The effect of *Psilocybe cubensis* extract on hippocampal neurons in vitro. *Fiziol Zh*, 47(6), 15-23.
- Moreno, F. A., Wiegand, C. B., Taitano, E. K., & Delgado, P. L. (2006). Safety, tolerability, and efficacy of psilocybin in 9 patients with obsessive-compulsive disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 67(11), 1735-1740.
- Muller, C. P., & Jacobs, B. (2009). *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin* (Vol. 21). Academic Press.
- Nadim, F., & Bucher, D. (2014). Neuromodulation of neurons and synapses. *Current opinion in neurobiology*, 29, 48-56.
- Nichols, D. E., Johnson, M. W., & Nichols, C. D. (2017). Psychedelics as Medicines: An Emerging New Paradigm. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 101(2), 209-219.
- Nichols, David E. (1994). Medicinal chemistry and structure-activity relationships. *Amphetamine and its analogs*, 3-41.
- Nichols, David E. (2004). Hallucinogens. *Pharmacology & Therapeutics*, 101(2), 131-181.
- Nichols, David E. (2016). Psychedelics. *Pharmacological Reviews*, 68(2), 264-355.
- Nichols, David E., Johnson, M. W., & Nichols, C. D. (2017). Psychedelics as Medicines: An Emerging New Paradigm. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 101(2), 209-219.
- Nichols, David E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin receptors. *Chemical reviews*, 108(5), 1614-1641.
- Nieuwenhuys, R., & Voogd, J. (2008). van Huijzen. *The Human Central Nervous System, a Synopsis and Atlas*.
- Osmond, H. (1957). A review of the clinical effects of psychotomimetic agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 66(3), 418-434.
- Oss, O., & Oeric, O. (1992). *Psilocybin, Magic Mushroom Grower's Guide: A Handbook for Psilocybin Enthusiasts*. Ed Rosenthal.
- Ott, J. (1993). *Pharmactheon: Entheogenic Drugs, Their Plant Sources and History* (2nd Edition edition). Kennewick: Natural Products Co.
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European Journal of Neuroscience*, 33(8), 1351-1365.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383-400.
- Paoletti, P., & Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 39-47.
- Passie, T., Seifert, J., Schneider, U., & Emrich, H. M. (2002a). The pharmacology of psilocybin. *Addiction biology*, 7(4), 357-364.

- Passie, T., Seifert, J., Schneider, U., & Emrich, H. M. (2002b). The pharmacology of psilocybin. *Addiction biology*, 7(4), 357-364.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat in stereotaxic coordinates*.
- Piña-Crespo, J. C., Talantova, M., Micu, I., States, B., Chen, H.-S. V., Tu, S., ... Lipton, S. A. (2010). Excitatory glycine responses of CNS myelin mediated by NR1/NR3 «NMDA» receptor subunits. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(34), 11501-11505.
- Pollock, S. H. (1975). The psilocybin mushroom pandemic. *Journal of Psychedelic Drugs*, 7(1), 73-84.
- Pranzatelli, M. R. (1990). Evidence for involvement of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> receptors in the behavioral effects of the 5-HT agonist 1-(2, 5-dimethoxy-4-iodophenyl aminopropane)-2 (DOI). *Neuroscience letters*, 115(1), 74-80.
- Puig, M., Celada, P., & Artigas, F. (2004). Serotonergic control of prefrontal cortex. *Revista de neurologia*, 39(6), 539-547.
- Puig, M. V., & Gullledge, A. T. (2011). Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits. *Molecular Neurobiology*, 44(3), 449-464.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2001). *Neuroscience*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Raote, I., Bhattacharyya, S., & Panicker, M. M. (2013). Functional Selectivity in Serotonin Receptor 2A (5-HT<sub>2A</sub>) Endocytosis, Recycling, and Phosphorylation. *Molecular Pharmacology*, 83(1), 42-50.
- Raymond, J. R., Mukhin, Y. V., Gelasco, A., Turner, J., Collinsworth, G., Gettys, T. W., ... Garnovskaya, M. N. (2001). Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics*, 92(2), 179-212.
- Riad, M., Garcia, S., Watkins, K. C., Jodoin, N., Doucet, É., Langlois, X., ... Descarries, L. (2000). Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 417(2), 181-194.
- Rojas-Corrales, M. O., Gibert-Rahola, J., & Mico, J. A. (2007). Role of atypical opiates in OCD. Experimental approach through the study of 5-HT<sub>2A/C</sub> receptor-mediated behavior. *Psychopharmacology*, 190(2), 221-231.
- Roth, B. L., Shoham, M., Choudhary, M. S., & Khan, N. (1997). Identification of Conserved Aromatic Residues Essential for Agonist Binding and Second Messenger Production at 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> Receptors. *Molecular Pharmacology*, 52(2), 259-266.

- Ruck, C. (2016). Mushroom Sacraments in the Cults of Early Europe. *NeuroQuantology*, 14.
- Ruck, C. A. P., Bigwood, J., Staples, D., Ott, J., & Wasson, R. G. (1979). Entheogens. *Journal of Psychedelic Drugs*, 11(1-2), 145-146.
- Sámano, C., Cifuentes, F., & Morales, M. A. (2012). Neurotransmitter segregation: Functional and plastic implications. *Progress in Neurobiology*, 97(3), 277-287.
- Samorini, G. (2001). New data on the ethnomycology of psychoactive mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3(2-3), 257-278.
- Samorini, G. (2017). Las fechas más antiguas de la relación humana con las drogas. *Cultura y Droga*, 21, 91-113.
- Santana, N., Bortolozzi, A., Serrats, J., Mengod, G., & Artigas, F. (2004). Expression of Serotonin1A and Serotonin2A Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of the Rat Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, 14(10), 1100-1109.
- Schultes, R. E. (1940). Teonanácatl: The narcotic mushroom of the Aztecs. *American Anthropologist*, 42(3), 429-443.
- Schultes, R. E. (1977). *Hallucinogenic Plants* (1st edition). New York: Golden Press.
- Schultes, R. E., & Hofmann, A. (2000). *Plantas de los dioses : orígenes del uso de los alucinógenos*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Scruggs, J. L., Schmidt, D., & Deutch, A. Y. (2003). The hallucinogen 1-[2, 5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2-aminopropane (DOI) increases cortical extracellular glutamate levels in rats. *Neuroscience letters*, 346(3), 137-140.
- Siegel, G. J., Albers, R., Brady, S., & Price, D. (2006). Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects. (with CD-ROM). *AMERICAN JOURNAL OF NEURORADIOLOGY*, 27(2), 465.
- Stamets, P. (1996). *Psilocybin Mushrooms of the World: An Identification Guide* (1 edition). Berkeley, Calif: Ten Speed Press.
- Stebelska, K. (2013). Fungal hallucinogens psilocin, ibotenic acid, and muscimol: analytical methods and biologic activities. *Therapeutic drug monitoring*, 35(4), 420-442.
- Stein, R. B., Gossen, E. R., & Jones, K. E. (2005). Neuronal variability: noise or part of the signal? *Nature Reviews Neuroscience*, 6(5), 389.

- Szczurowska, E., & Mares, P. (2013). NMDA and AMPA Receptors: Development and Status Epilepticus - ProQuest.
- Szomolay, B., & Shahrezaei, V. (2012). Bell-shaped and ultrasensitive dose-response in phosphorylation-dephosphorylation cycles: the role of kinase-phosphatase complex formation. *BMC systems biology*, 6(1), 26.
- Tagliazucchi, E., Carhart-Harris, R., Leech, R., Nutt, D., & Chialvo, D. R. (2014). Enhanced repertoire of brain dynamical states during the psychedelic experience. *Human Brain Mapping*, 35(11), 5442-5456.
- Tagliazucchi, E., Roseman, L., Kaelen, M., Orban, C., Muthukumaraswamy, S. D., Murphy, K., ... Carhart-Harris, R. (2016). Increased Global Functional Connectivity Correlates with LSD-Induced Ego Dissolution. *Current Biology*, 26(8), 1043-1050.
- Teitler, M., Herrick-Davis, K., & Purohit, A. (2002). Constitutive Activity of G-Protein Coupled Receptors: Emphasis on Serotonin Receptors.
- Teitler, M., Herrick-Davis, K., & Purohit, A. (2002). Constitutive activity of G-protein coupled receptors: emphasis on serotonin receptors. *Current topics in medicinal chemistry*, 2(6), 529-538.
- Törk, I. (1990). Anatomy of the Serotonergic Systema. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 600(1), 9-34.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405-496.
- Tresguerres, J. A. F., Aguilar Benítez de Lugo, E., Cachofeiro Ramos, V., Cardinali, D. P., Gil-Loyzaga, P., Lahera Juliá, V., ... Romano Pardo, M. (2010). *Fisiología humana* (Cuarta). McGraw-Hill Interamericana,.
- Tylš, F., Páleníček, T., & Horáček, J. (2014). Psilocybin—summary of knowledge and new perspectives. *European Neuropsychopharmacology*, 24(3), 342-356.
- Urban, J. D., Clarke, W. P., Zastrow, M. von, Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., ... Mailman, R. B. (2007). Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(1), 1-13.
- Vázquez -Borsetti, P. E. (2008, octubre 3). *Proyecciones de la corteza prefrontal a los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo: vías y receptores implicados* (Ph.D. Thesis). Universitat de Barcelona.
- Vázquez-Borsetti, P., Celada, P., Cortés, R., & Artigas, F. (2011). Simultaneous projections from prefrontal cortex to dopaminergic and serotonergic nuclei. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(3), 289-302.

- Vázquez-Borsetti, P., Cortés, R., & Artigas, F. (2009). Pyramidal Neurons in Rat Prefrontal Cortex Projecting to Ventral Tegmental Area and Dorsal Raphe Nucleus Express 5-HT<sub>2A</sub> Receptors. *Cerebral Cortex*, *19*(7), 1678-1686.
- Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse (New York, N.Y.)*, *51*(1), 32-58.
- Vogelgesang, S., Niebert, S., Renner, U., Möbius, W., Hülsmann, S., Manzke, T., & Niebert, M. (2017). Analysis of the Serotonergic System in a Mouse Model of Rett Syndrome Reveals Unusual Upregulation of Serotonin Receptor 5b. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*.
- Vollenweider, F., Leenders, K., Scharfetter, C., Maguire, P., Stadelmann, O., & Angst, J. (1997). Positron emission tomography and fluorodeoxyglucose studies of metabolic hyperfrontality and psychopathology in the psilocybin model of psychosis. *Neuropsychopharmacology*, *16*(5), 357.
- Vollenweider, F. X., Vollenweider-Scherpenhuyzen, M. F., Bäbler, A., Vogel, H., & Hell, D. (1998). Psilocybin induces schizophrenia-like psychosis in humans via a serotonin-2 agonist action. *Neuroreport*, *9*(17), 3897-3902.
- Von Bohlen, O., & Dermietzel, R. (2006). *Neurotransmitters and neuromodulators: handbook of receptors and biological effects*. Wiley-VCH.
- Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X.-P., Vardy, E., ... Siu, F. Y. (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, *340*(6132), 615-619.
- Wasson, G. (1983). *Teonanacatl, el hongo maravilloso*.
- Wasson, R. G., Hofmann, A., & Ruck, C. A. (1978). *The road to Eleusis: Unveiling the secret of the mysteries*. North Atlantic Books.
- Wasson, V. P., & Wasson, R. G. (1957). *Mushrooms, Russia, and History* (Vol. 2). Pantheon Books.
- Werry, T. D., Loiacono, R., Sexton, P. M., & Christopoulos, A. (2008). RNA editing of the serotonin 5HT<sub>2C</sub> receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function. *Pharmacology & Therapeutics*, *119*(1), 7-23.
- Wettstein, J. G., Host, M., & Hitchcock, J. M. (1999). Selectivity of action of typical and atypical antipsychotic drugs as antagonists of the behavioral effects of 1-[2, 5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2-aminopropane (DOI). *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *23*(3), 533-544.
- Wirth, A., Holst, K., & Ponimaskin, E. (2017). How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons. *Progress in Neurobiology*, *151*, 35-56.

- Yin, X., Takei, Y., Kido, M. A., & Hirokawa, N. (2011). Molecular Motor KIF17 Is Fundamental for Memory and Learning via Differential Support of Synaptic NR2A/2B Levels. *Neuron*, *70*(2), 310-325.
- Yu, G., Wu, F., & Wang, E. (2015). BQ-869 , a novel NMDA receptor antagonist , protects against excitotoxicity and attenuates cerebral ischemic injury in stroke, *8*(2), 1213-1225.
- Yuen, E. Y., Jiang, Q., Chen, P., Feng, J., & Yan, Z. (2008). Activation of 5-HT<sub>2A/C</sub> Receptors Counteracts 5-HT<sub>1A</sub> Regulation of N-Methyl-D-aspartate Receptor Channels in Pyramidal Neurons of Prefrontal Cortex. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(25), 17194-17204.
- Yuen, E. Y., Jiang, Q., Chen, P., Gu, Z., Feng, J., & Yan, Z. (2005). Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, *25*(23), 5488-5501.
- Yuen, E. Y., Jiang, Q., Feng, J., & Yan, Z. (2005). Microtubule Regulation of N-Methyl-D-aspartate Receptor Channels in Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(33), 29420-29427.
- Yuen, E. Y., & Yan, Z. (2007). Serotonergic Regulation of NMDA Receptor Trafficking and Function in Prefrontal Cortex. En *Monoaminergic Modulation of Cortical Excitability* (pp. 91-101). Springer.
- Yukihiro, O. (2011). Therapeutic Role of 5-HT<sub>1A</sub> Receptors in The Treatment of Schizophrenia and Parkinson's Disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *17*(1), 58-65.
- Zhong, P., Yuen, E. Y., & Yan, Z. (2008). Modulation of neuronal excitability by serotonin-NMDA interactions in prefrontal cortex. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *38*(2), 290-299.
- Zhuk, O., Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Kazakova, A., Godovan, V. V., Halama, M., & Wiczorek, P. P. (2015). Research on Acute Toxicity and the Behavioral Effects of Methanolic Extract from Psilocybin Mushrooms and Psilocin in Mice. *Toxins*, *7*(4), 1018-1029.

11 Anexo I

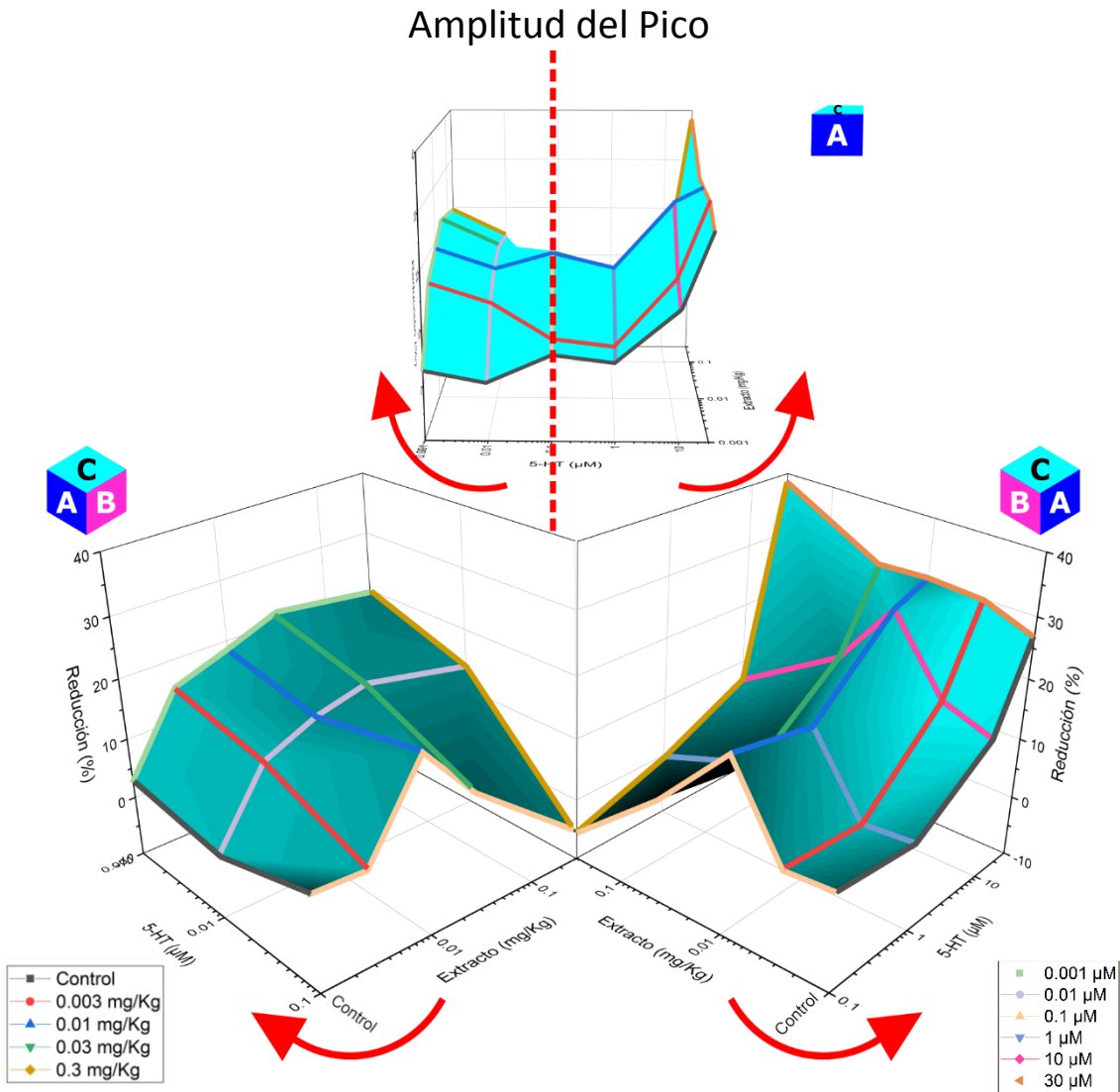


Ilustración 1. Partición de gráfica global en tres dimensiones de la amplitud del Pico, con respecto a la concentración de 5-HT.

## Amplitud del Pico

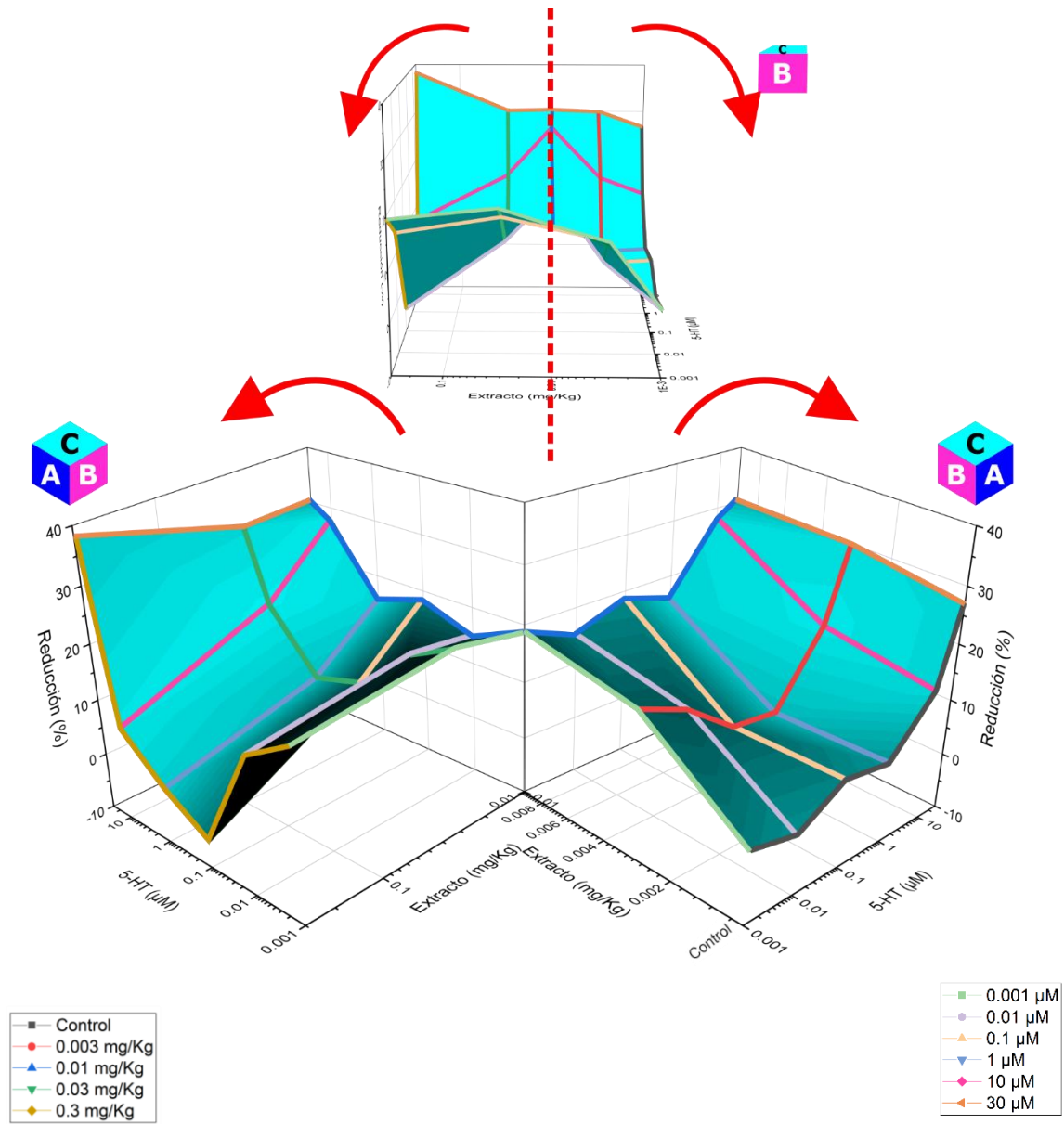


Ilustración 2. Partición de gráfica global en tres dimensiones de la amplitud del Pico, con respecto a las dosis del extracto de *P.cubensis* probadas.

### Amplitud del Estado Estacionario

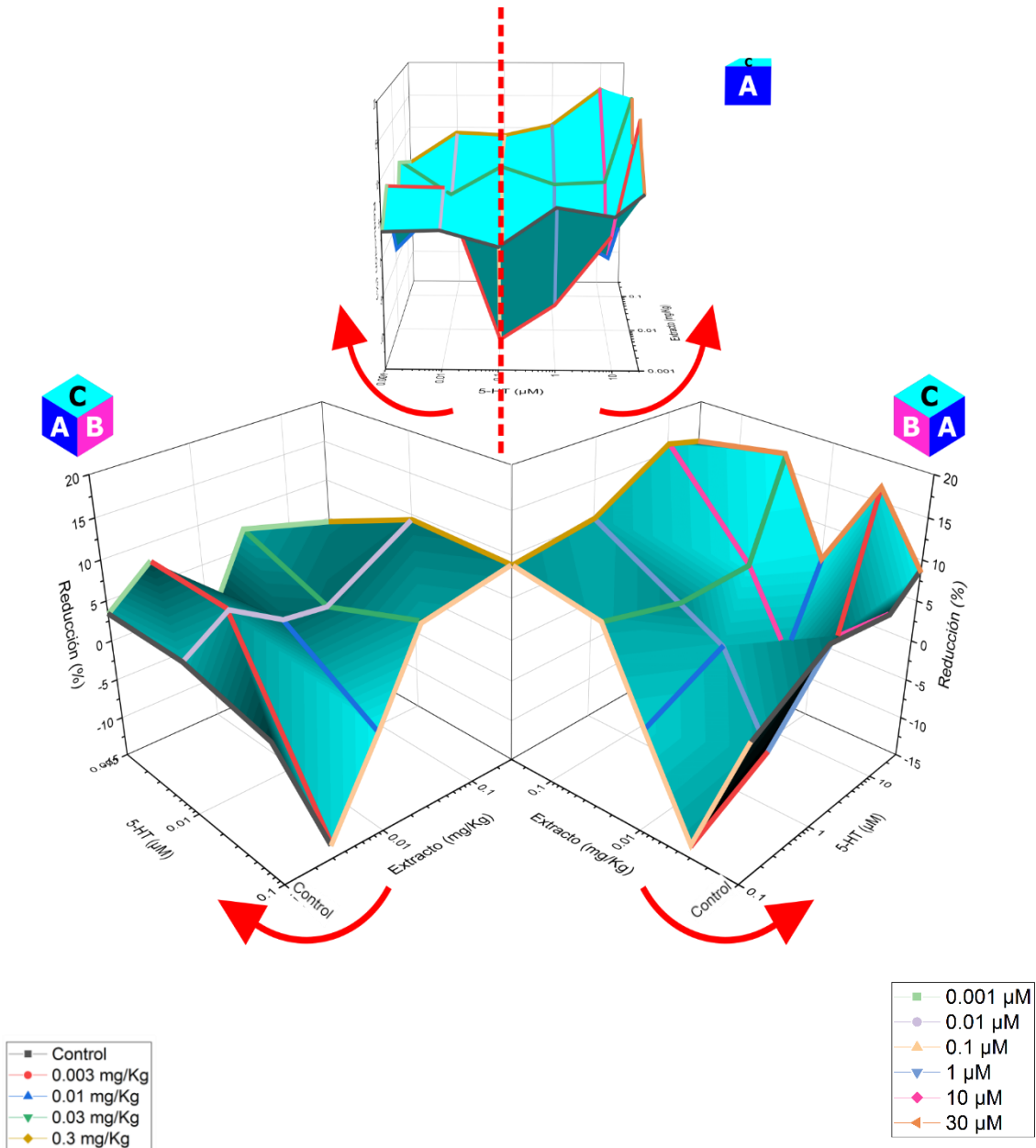


Ilustración 3. Partición de gráfica global en tres dimensiones de la amplitud del Pico, con respecto a la concentración de 5-HT.

## Amplitud del Estado Estacionario

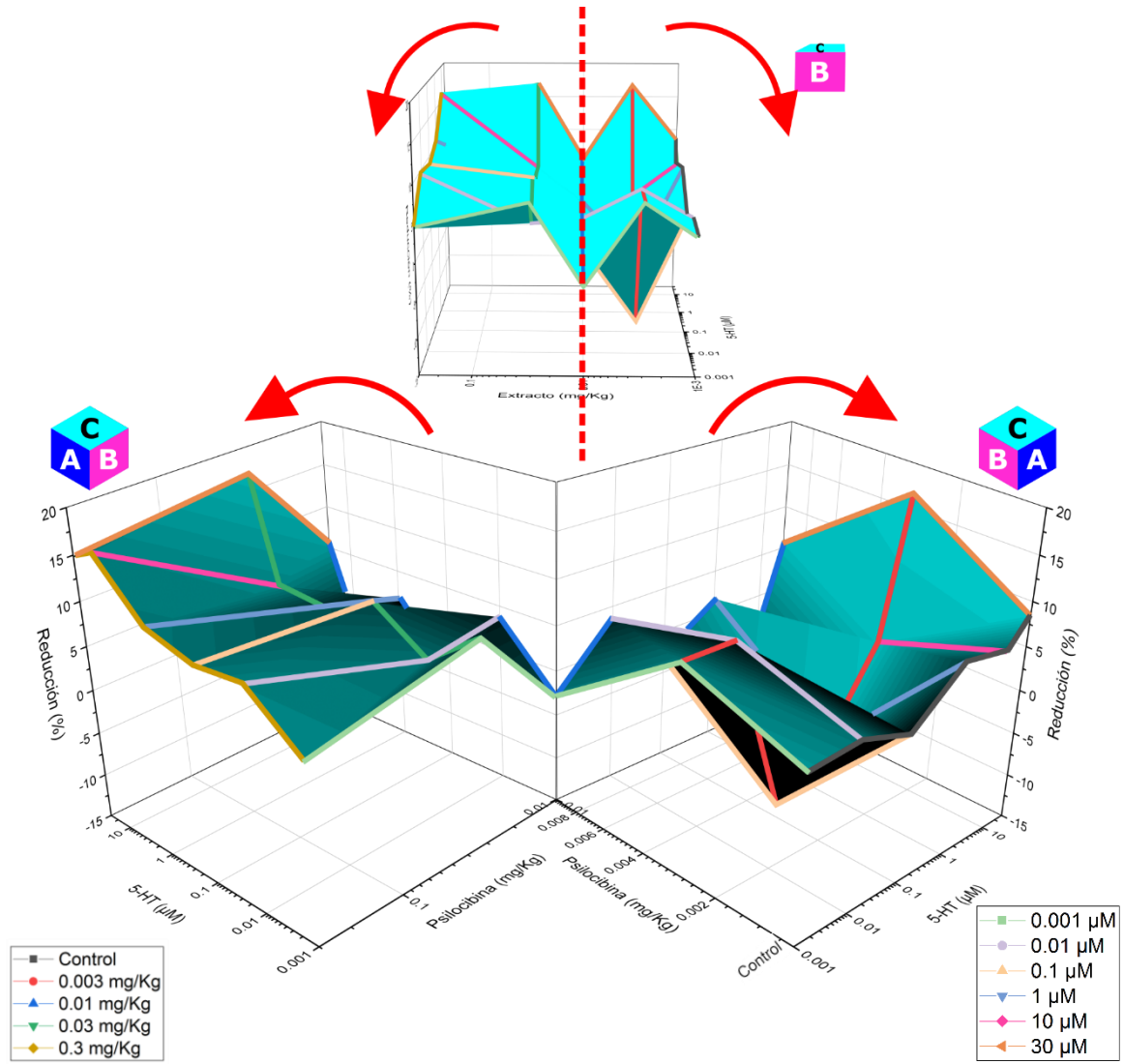


Ilustración 4. Partición de gráfica global en tres dimensiones de la amplitud del EE, con respecto a las dosis del extracto de *P.cubensis* probadas.