

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Instituto de Fisiología

Maestría en ciencias fisiológicas

Laboratorio de neuromodulación



Modulación por aripiprazol sobre la corriente activada por NMDA en un modelo de accidente cerebrovascular en rata

Mayo del 2025

Tesis presentada para obtener el grado de Maestro en: Ciencias Fisiológicas

PRESENTA:

Lic. En Biomedicina Luis Angel Haro Santillan

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández

CO-DIRECTOR DE TESIS:

D.C. Oswaldo Torres Ramírez

ASESORES DE TESIS:

Dra. C. María Del Carmen Cortés Sánchez

D.C. Fabián Galindo Ramírez

Contenido

Resumen-----	5
Abstract-----	5
Introducción-----	6
Hipocampo-----	6
Generalidades-----	6
Función-----	10
Cornus Ammonis 1-----	14
Neurotransmisión glutamatérgica-----	17
Glutamato-----	17
Receptores a glutamato tipo NMDA-----	20
Modulación del hipocampo-----	23
Neuromodulación-----	23
Dopamina y su modulación en hipocampo-----	25
Serotonina y su modulación en hipocampo-----	28
Modelo de ACV-----	31
ACV isquémico.-----	31
Excitotoxicidad y el papel de NMDA-----	35
Modulación serotoninérgica y dopaminérgica por aripiprazol de la corriente iónica del NMDA-R en ACV-----	38
Pregunta de investigación-----	41
Hipótesis científica-----	41
Objetivo general-----	41
Objetivos específicos-----	41
Justificación-----	42
Materiales y métodos-----	46
Estrategia de trabajo-----	46
Muestreo-----	47
Definición de la unidad poblacional-----	47
Selección de la muestra-----	48
Criterios de selección de las unidades de muestreo-----	49
Tamaño de la muestra-----	50
Método de recolección de datos-----	51
Técnicas y procedimientos-----	53

Análisis de datos	58
Diseño estadístico	59
Hipótesis estadística	59
Pruebas estadísticas	59
Logística	60
Recursos humanos	60
Recursos materiales	60
Recursos financieros	61
Bioética	61
Resultados	62
Discusión	67
Conclusiones	71
Bibliografía.	72

Resumen

El hipocampo es una estructura subcortical encargada de funciones como la memoria y el aprendizaje. Histológicamente el hipocampo se subdivide por estratos. El estrato piramidal alberga los somas de las principales neuronas glutamatérgicas del hipocampo, las neuronas piramidales. Además, el hipocampo se encuentra altamente regulado por neuromoduladores como la dopamina y la serotonina debido a las proyecciones neuroanatómicas que llegan desde el área ventral tegmental y los núcleos del Rafe. Tanto en las enfermedades neurodegenerativas como en los accidentes cerebrovasculares, las neuronas glutamatérgicas del hipocampo son las primeras en sufrir muerte celular, modulada principalmente por el receptor a glutamato tipo NMDA. En este trabajo de investigación se demuestra como el aripiprazol un activador de los receptores 5-HT_{1A} y D₂ modula negativamente la corriente iónica de NMDA-R en neuronas piramidales de hipocampo de un modelo de accidente cerebrovascular en rata. Además, se demuestra que en la condición de isquemia se reduce el efecto máximo de la corriente iónica de NMDA-R. Sugiriendo un mecanismo adaptativo fisiológico en el hipocampo de las ratas.

Abstract

The hippocampus is a subcortical structure that participate in memory and learning. Histologically the hippocampus is subdivided into strata. The stratum pyramidale hold the somas of the main glutamatergic neurons of the hippocampus, the pyramidal neurons. Furthermore, the hippocampus is highly regulated by neuromodulators such as dopamine and serotonin due to neuroanatomical projections from the ventral tegmental area and the raphe nuclei. In both neurodegenerative diseases and strokes, glutamatergic neurons in the hippocampus are the first to undergo cell death, modulated mainly by the NMDA-type glutamate receptor. This research demonstrates how aripiprazole, an activator of 5-HT_{1A} and D₂ receptors, negatively modulates the NMDA-R ionic current in hippocampal pyramidal neurons in a rat stroke model. Furthermore, it is shown that under ischemic conditions, the maximal effect of the NMDA-R ionic current is reduced, suggesting a physiological adaptative mechanism in the rat hippocampus.

Introducción

Hipocampo

Generalidades

En el año de 1587 el anatomista Arantius, quien fue alumno de Andreas Vesalius, acuñó el término “*hipocampus*” a una estructura anatómica cerebral en forma de protrusión ubicada en la parte dorsal y septal del cerebro extendida longitudinalmente en el piso del cuarto ventrículo en forma de media luna, esto debido a que guarda similitud morfológica con el “caballo de mar” (Ahmed y Mehta, 2009; Schultz y Engelhardt, 2014). No fue hasta 1742, que se continuaron con los estudios anatómicos del hipocampo, cuando se identificó al “*Cornus Ammonis*” (cuerno de Ammon, aludiendo a la representación de un dios egipcio con la cabeza de un carnero), para referir a los subcampos del hipocampo, Cuerno de Ammon 1 (CA1), CA2 y CA3 (Schultz y Engelhardt, 2014). Siendo CA1 el subcampo de mayor extensión, flanqueado lateralmente por el presubículo y medialmente por el subcampo CA2, por su parte CA2 tiene una proyección hacia la circunvolución dentada, recibe aferencias de la región supramamilar del hipotálamo y se encuentra delimitado por CA1 y CA3. En paralelo, CA3 se sitúa en dirección al hilio de la circunvolución dentada (Ahmed y Mehta, 2009).

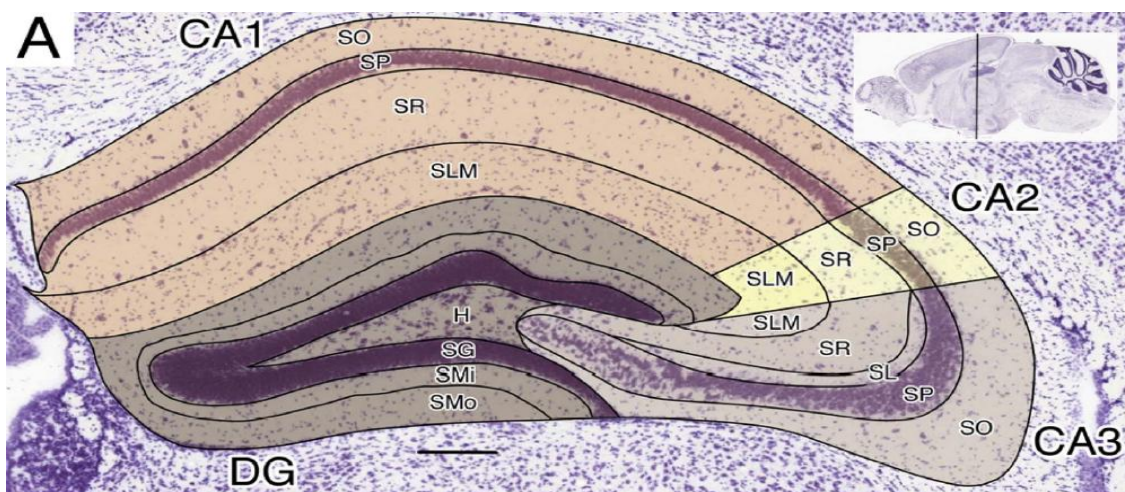


Figura 1. Corte histológico de cerebro de ratona donde se muestran el estrato oriens (SO), estrato piramidal (SP), estrato lucido (SL), estrato radiado (SR), estrato lacunoso-molecular (SLM), y giro dentado. Imagen extraída de Wheeler et al., 2015.

Teniendo en cuenta los estudios morfológicos precedentes, se describió a la formación hipocampal como una estructura ubicada dentro del sistema nervioso central integrada mediante cuatro regiones diferenciadas morfológica y celularmente, mismas que se denominan: giro dentado, hipocampo propiamente dicho, complejo subicular y corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989; Schultz y Engelhardt, 2014). De manera semejante, mediante estudios histológicos se determinó que el hipocampo presenta una citoarquitectura correspondiente a la arquicorteza, denotando que es una de las regiones más antigua dentro del sistema nervioso central. Está se compone de una lámina de células piramidales, una lámina molecular y una capa polimórfica (Schultz y Engelhardt, 2014). Continuando con el análisis histológico se precisaron los estratos en los cuales se divide el hipocampo, ubicando al **estrato oriens (SO)**, entre el *alveus* (fibras eferentes de neuronas piramidales) y la capa piramidal, caracterizado por albergar dendritas basales con sus respectivas ramificaciones de las neuronas piramidales e interneuronas. Por debajo del SO se posiciona el **estrato piramidal (SP)**, el cual contiene los somas de las neuronas piramidales de CA. De forma semejante, la región proximal a la fisura del hipocampo se divide en **estrato lúcido (SL)**, **estrato radiado (SR)** y **estrato lacunoso molecular (SLM)**, mismos que contienen fibras musgosas (ruta de comunicación entre giro dentado y CA3), dendritas apicales de las neuronas piramidales y ramas terminales de dichas dendritas, respectivamente (Schultz y Engelhardt, 2014; Wheeler *et al.*, 2015).

Por otro lado, es importante señalar que el principal neurotransmisor aferente al hipocampo es el glutamato, donde es capaz de unirse tanto a sus receptores ionotrópicos (iGluRs) como metabotrópicos (mGluRs), no obstante, existen múltiples vías de modulación extrínsecas que llegan al hipocampo (tabla 1), con efectos tanto excitadores como inhibidores sobre las neuronas de CA (Giap *et al.*, 2000; Benavides-Piccione *et al.*, 2019; Pohorecki & Domino, 1987). Además, es importante señalar que la corteza entorrinal (CE) provee el mayor grupo de aferencias al hipocampo (figura 1), formando de este modo 4 rutas de comunicación internas, la ruta perforante, la ruta temporoamónica, la vía de fibras musgosas y la vía de las colaterales de Shaffer (Coulter *et al.*, 2011). Para formar la ruta perforante, la capa II de la corteza entorrinal emite proyecciones hacia la capa molecular externa y media del giro dentado (GD),

mientras que la ruta temporoamónica proviene desde la capa III de CE y se comunica directamente con las dendritas distales de CA1 en el SLM (Knierim, 2015; Coulter *et al.*, 2011). Por otro lado, la vía de fibras musgosas inicia a partir de las neuronas granulosas del giro dentado, emitiendo axones hacia las neuronas piramidales de CA3. Finalmente, la vía de las colaterales de *Shaffer* se forma mediante la sinapsis de neuronas piramidales de CA3 y las dendritas en SR y el SO de CA1. Llegando la información a CA1 se proyectan axones de retorno hacia la corteza entorrinal capa IV y V mediante el subículo (Knierim, 2015; Coulter *et al.*, 2011). No obstante, el hipocampo también recibe información proveniente de: la circunvolución del cíngulo, el núcleo septal y el *indusium griseum* mediante el fórnix y el hipocampo contralateral a través de la comisura hipocámpal. En relación con las eferencias, el hipocampo se comunica mediante el fórnix con las áreas: gyrus fasciolaris, *indusium griseum*, giro cingulado, y núcleos septales mediante el fórnix dorsal, con el giro paraterminal, núcleos preópticos e hipotalámicos anteriores por el fórnix precomisural, con el núcleo anterior del tálamo, núcleos hipotalámicos, cuerpo mamilar mediante las fibras poscomisurales y con el núcleo habenular mediante la estría medullaris del tálamo (Pluta & Pluta, 2021).

Tabla 1. Neuromoduladores hipocámpales

Sistemas de neuromoduladores y neurotransmisores	Núcleos eferentes	Vías de entrada	Estrato receptor	Efecto en hipocampo
Acetilcolina	Núcleo septal medial y núcleo de la banda diagonal.	Fimbria	SO de CA3, hilus, fascia dentada, SP.	Excitación en CA1.
Dopamina	Área ventral tegmental y sustancia negra	Porción ventral del subiculum	Parte ventral y cuadal de la formación hipocámpal	Inhibición en CA1.
Norepinefrina	Locus coeruleus		Hilus del giro dentado, SLM en CA1 y SR en CA3	Excitación
Serotonina	Núcleo central superior y núcleo del rafe dorsal		SR de CA	Inhibición en CA1

Tabla 1. Neuromodulación hipocámpal a través de neuromoduladores como acetilcolina, dopamina, norepinefrina y serotonina. Información obtenida de Pohorecki & Domino, 1987

Para finalizar con las generalidades, los estudios de Leão *et al.*, en 2012 demostraron la existencia de interneuronas inmersas en el SO y SLM, mismas que son de naturaleza gabaérgica, encargadas de inhibir a las neuronas piramidales desde las dendritas apicales distales, permitiendo de este modo la regulación de las aferencias glutamatérgicas provenientes de la CE hacia CA1. Simultáneamente, este mismo grupo de interneuronas, inhiben a las células gabaérgicas dentro del SR, las cuales hacen sinapsis con los colaterales de Shaffer, por lo que permiten la activación de CA3 al inhibir la inhibición, facilitando de este modo la transmisión de información de CA3 a CA1.

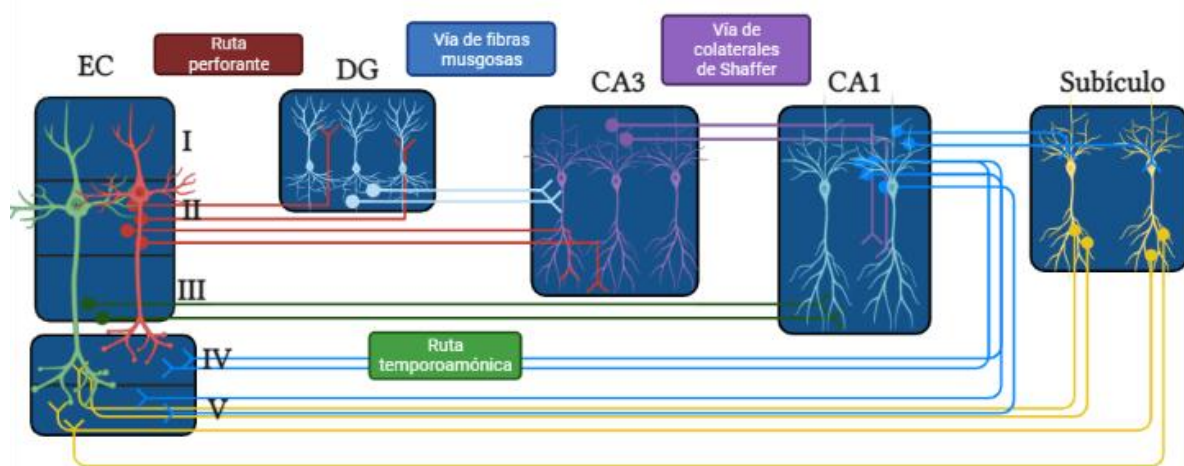


Figura 2. Estructura de los 4 microcircuitos dentro del hipocampo, la ruta perforante, la vía de fibras musgosas, vía de colaterales de Shaffer y ruta temporoamónica. Imagen modificada de Kandel *et al.*, 2021

Función

Desde 1950 que comenzaron los estudios acerca de la función del hipocampo, se demostró su participación activa en funciones cognitivas tales como la memoria, el aprendizaje, y la navegación espacial (Hongo *et al.*, 2015; Aly y Ranganath, 2018). Las investigaciones acerca de las lesiones en la misma área, lo relacionaron con la codificación de la memoria a largo plazo, memoria autobiográfica, memoria espacial, y memoria episódica, no obstante, el almacenamiento de la información a largo plazo le corresponde a regiones extra-hipocampales (Ólafsdóttir *et al.*, 2018). Paralelamente se asoció al hipocampo con el procesamiento de percepción temporal, espacial y sensorial, así como el valor de recompensa y la información lingüística (Kesner, *et al.*, 2004).

Estudios actuales demuestran que el hipocampo necesita comunicarse con la corteza sensorial, ejecutiva, emocional y de recompensa para participar en la adquisición y consolidación de nuevas memorias (Ólafsdóttir *et al.*, 2018). Además, la comunicación dentro de los microcircuitos de la formación hipocampal resulta tener una participación importante en el desarrollo de las funciones antes mencionada, dado que la manipulación y/o modificación de la actividad electrofisiológica provoca una disrupción del comportamiento (Ólafsdóttir *et al.*, 2018). De forma paralela, el hipocampo se ha visto implicado en funciones emocionales, regulación de estrés, cuyas lesiones son causa de trastornos afectivos (Fanselow & Dong, 2010). Se han estudiado las diferencias intrínsecas de acuerdo a subdivisiones dentro del hipocampo abarcando aspectos genéticos, y proyecciones anatómicas que lo hacen distinto en el eje dorsal-ventral, de este modo se ha relacionado a la región dorsal con las funciones cognitivas, mientras que la región ventral se asocia a funciones emocionales (Fanselow & Dong, 2010).

En lo que respecta a la función detallada del hipocampo dorsal, la memoria espacial ha sido ampliamente reconocida, debido al descubrimiento de poblaciones de neuronas piramidales que se activan solo en ciertas posiciones del área experimental, de forma que existe un correlato neurofisiológico con la ubicación en el ambiente externo, más aún se mantiene el patrón de disparo una vez eliminando los estímulos

espaciales (Moser & Moser, 1998). Paralelamente, en los estudios realizados en pacientes o modelos animales en los que se presenta lesión en el hipocampo, demostraron afectación en la navegación a causa del daño en los microcircuitos que codifican para la memoria espacial. Finalmente, las investigaciones en humanos denotan un aumento de la actividad hipocampal mientras se realizan tareas de navegación, demostrando que el hipocampo participa de forma determinante en la memoria espacial al formar una representación neuronal del ambiente externo (Moser & Moser, 1998).

Dada la diferenciación anatómica y electrofisiológica del hipocampo dorsal con el hipocampo ventral, a este último se le ha asociado también una función distinta a la memoria espacial, participando preferentemente en tareas cognitivas y emocionales. Las primeras investigaciones donde se extirpa el lóbulo temporal denotaron la aparición de trastornos emocionales, de forma similar se sugirió que el hipocampo ventral se encuentra involucrado en la decepción y frustración, así como en comportamientos ansiosos evaluado en el laberinto elevado en ratones (Hauser *et al.*, 2020; Fanselow & Dong, 2010). Por otro lado, se ha visto que la disminución de los volúmenes hipocampales se relaciona fuertemente a enfermedades como trastorno de estrés postraumático, trastorno bipolar y depresión, es decir patologías con afectación en el componente afectivo, similar a lo ocurrido en lesiones más extensas en ratones (Hauser *et al.*, 2020; Fanselow & Dong, 2010). Así mismo, las lesiones específicas en hipocampo ventral alteran la respuesta al estrés y el comportamiento emocional. Aunado a lo anterior, la aplicación de antagonistas del receptor a glutamato tipo NMDA infundido en el hipocampo ventral es capaz de bloquear la adquisición del miedo contextual, de manera que el desarrollo de funciones emocionales dentro del hipocampo parece depender de la transmisión glutamatérgica dentro del mismo (Giap *et al.*, 2000; Benavides-Piccione *et al.*, 2019; Fanselow & Dong, 2010). Dados los estudios anatómicos del hipocampo ventral, se han dilucidado proyecciones comunicantes con el bulbo olfatorio, núcleos amigdalinos, corteza infralímbica, prelímbica, insular e hipotálamo, regiones que tiene participación fundamental en procesos emocionales, así como la adquisición de memorias contextuales, dando de

este modo un sustento anatómico y diferencial de la función con respecto al hipocampo dorsal (Hauser *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2020; Fanselow & Dong, 2010).

En relación con los microcircuitos y la función hipocampal. La comunicación del giro dentado con CA3 mediante las fibras musgosas, resulta esencial en el aprendizaje y separación de patrones (definido como la diferenciación de memorias y separación de experiencias similares en recuerdos distintos). Esto se debe a la dispersión de información dentro de las redes neuronales en el sistema de fibras musgosas, disminuyendo la probabilidad de que dos neuronas en CA3 reciban información de un mismo subconjunto de neuronas provenientes del GD (Coulter *et al.*, 2011; Kesner *et al.*, 2004). Debido al sistema de fibras musgosas, GD permite influenciar de forma importante la actividad electrofisiológica de CA3, además esta ruta de comunicación se ha relacionado con la codificación de la información, mientras que la ruta perforante, donde la CE emite proyecciones directamente a CA3, se asocia preferentemente con la recuperación de recuerdos. Se ha demostrado también, que una lesión en GD impide una correcta ejecución del patrón de separación (Münster-Wandowski *et al.*, 2013), ocasionando déficits en tareas espaciales, así mismo se evidencian déficits similares a las lesiones completas de hipocampo, debido a que es una de las principales vías aferentes de información (Beer *et al.*, 2018; Kesner *et al.*, 2004).

En cuanto al subcampo CA3, este se caracteriza por participar en la obtención de nueva información, función conferida por su alta capacidad de plástica entre neuronas, dependiente de NMDA (Beer *et al.*, 2018; Kesner *et al.*, 2004), no obstante, se activa ante estímulos ambientales como lo son las modificaciones espaciales con el objetivo de incorporar lo novedoso a una representación preformada o generar una nueva si los cambios son significativos (Okada *et al.*, 2017; Kesner *et al.*, 2004). Además, CA3 parece ser responsable de la formación y almacenamiento de asociaciones arbitrarias de estímulos sensoriales, es decir integra la información sensorial proveniente de distintas regiones corticales permitiendo al organismo recordar tanto localización, como características del objeto, textura, color, etc. (Kesner *et al.*, 2004). En las investigaciones de Miller *et al.*, 2020 se demuestra que tras la afectación específica en humanos de CA3 se pierden detalles episódicos a corto plazo,

denotando su activación fisiológica del subcampo CA3 en la recuperación y almacenamiento de recuerdos episódicos recientes.

Para finalizar la descripción de las funciones hipocampales, se descubrieron células dentro de CA1 que se activan en respuesta a una ubicación específica del ambiente, de forma similar, las investigaciones demostraron la existencia de poblaciones neuronales que “disparan” en respuesta a texturas, olores, colores, formas, paso del tiempo y estados motivacionales, lo cual es concordante con la diferenciación entre poblaciones de células profundas/superficiales y diferenciación del eje dorsal/ventral (Whitlock y Derdikman, 2012; Igarashi *et al.*, 2014).

Estudios electrofisiológicos y genéticos evaluaron la diferencia entre las neuronas de CA1 proximal (adyacente a CA3) y CA1 distal (adyacente al subículo), encontrando que CA1 proximal juega un papel crucial en la distinción de ambientes espaciales y su almacenamiento, por el contrario, CA1 distal parece tener un rol crucial en la distinción de propiedades discretas de objetos (Beer *et al.*, 2018; Igarashi *et al.*, 2014). Análogamente, existen diferencias, dentro de CA1, en la ubicación de neuronas que responden a olores específicos. Se encontró la existencia de células que desarrollan cierta selectividad de disparo por un olor específico asociado a una ubicación, no obstante, no se encontraron neuronas con una activación similar en CA1 proximal (Whitlock y Derdikman, 2012; Moser *et al.*, 2015; Igarashi *et al.*, 2014). Finalmente, los estudios en humanos donde se presenta una lesión específica en CA1 se asocian a la aparición de amnesia global transitoria contrario a la lesión en CA3 donde se pierden los recuerdos episódicos a corto plazo (Miller *et al.*, 2020).

Cornus Ammonis 1

CA1 es un subcampo del hipocampo descrito inicialmente por Lorente de Nó. El alumno de Santiago Ramón y Cajal diferenció tres subregiones que denominó CA1, CA2 y CA3 de acuerdo al tamaño neuronal y la presencia o ausencia de fibras musgosas, siendo CA1 la región de menor tamaño celular y con ausencia de fibras musgosas, CA3 contenía, por su parte, neuronas piramidales de mayor tamaño y presencia de fibras musgosas, mientras que CA2 también contenía células similares a CA3 en ausencia de fibras musgosas (Schultz y Engelhardt, 2014; Ahmed y Mehta, 2009; Dong *et al.*, 2009). Un estudio realizado en ratones demuestra que CA1 se ubica transversalmente entre 2.7 y 2.9 mm caudal a bregma (Dong *et al.*, 2009). De acuerdo a marcadores de expresión genética CA1 se dividió en tres dominios a lo largo del eje longitudinal, CA1 dorsal (CA1-d), CA1 intermedio (CA1-i) y CA1 ventral (CA1-v).

Paralelamente se dividió al estrado piramidal dentro de CA1 en una subcapa superficial y una profunda, caracterizadas por una capa densamente empaquetada y una capa fina con menor cantidad de neuronas piramidales, respectivamente, no obstante, algunos autores consideran que esta diferenciación solo está presente en humanos (Schultz y Engelhardt, 2014; Dong *et al.*, 2009). Además, existe una diferencia electrofisiológica dentro de la población de neuronas piramidales en CA1 a lo largo del eje dorsoventral. De acuerdo a estudios de epilepsia se demostró que el hipocampo ventral tiene propiedades epileptogénicas más fuertes que el área dorsal, es decir el hipocampo ventral es más susceptible a iniciar una convulsión que el hipocampo dorsal, de modo que se investigaron las propiedades electrofisiológicas de ambas zonas, encontrando que el potencial de membrana en reposo en CA1 ventral, se encuentra relativamente despolarizado con respecto al potencial de membrana en reposo en CA1 dorsal, -65 mV y -75 mV, respectivamente (Soltesz & Losonczy, 2018; Dong *et al.*, 2009). Así mismo, se encontró que las neuronas de CA1 ventral tenían una resistencia de entrada mayor con respecto de las del hipocampo dorsal, esto probablemente debido a las diferencias morfológicas de las células, $89.4 \pm 3.9 \text{ M}\Omega$ y $43.0 \pm 2.1 \text{ M}\Omega$, respectivamente (Soltesz & Losonczy, 2018; Dong *et al.*, 2009).

En otro estudio donde se determinaron y se compararon las características de las neuronas piramidales de CA1, se demuestra que el potencial de membrana en reposo se encuentra en -61.70 ± 1.3 mV y una resistencia de entrada de 49.4 ± 3.6 M Ω , de forma que la variación entre valores del potencial de membrana en reposo se puede deber a las concentraciones iónicas de las soluciones utilizadas (Altemus *et al.*, 2005; Baraban & Schwartzkroin, 1995). Similarmente el valor del potencial de membrana en reposo reportado en hipocampome.org es de -62.4 mV y la resistencia de entrada 65 M Ω en ratas donde se considera una “n” mayor. Por esta razón el presente trabajo utilizó el valor de -60 mV como potencial de mantenimiento en la parte experimental para el registro de las neuronas hipocámpales de CA1 dorsal.

Por otra parte, dentro de CA1 se han identificado 3 tipos de neuronas excitadoras glutamatérgicas, células piramidales, células *Cajal-Retzius*, y células *Radiatum Giant*, contrario a los tipos neuronales inhibitorios pues se conocen hasta el momento 38 diferentes tipos celulares dentro de CA1 clasificados de acuerdo a marcadores moleculares (Wheeler *et al.*, 2015). Es importante señalar que los somas de las neuronas excitadoras tanto piramidales como las células *Radiatum Giant* se encuentran en el SP, mientras que los somas de las neuronas *Cajal-Retzius* se ubican en el SLM (Wheeler *et al.*, 2015). Con el objetivo de homogenizar y disminuir la variabilidad de los tipos celulares encontrados en hipocampo, en el presente trabajo se registraron neuronas piramidales caracterizadas por poseer una dendrita apical grande y dendritas basales de menor tamaño, con una capacitancia promedio de 13.6 ± 1.2 pF (Alshuaib *et al.*, 2001).

A pesar de que existe mayor variabilidad en las neuronas inhibitorias (gabaérgicas) dentro del hipocampo, se reconoce que el principal neurotransmisor es el glutamato, el cual permite la comunicación entre los microcircuitos tanto ipsilaterales como contralaterales (Wheeler *et al.*, 2015). Dada la existencia de una ruta de comunicación entre el hipocampo del hemisferio derecho con el hipocampo del hemisferio izquierdo mediante la comisura hipocámpal (Voneida *et al.*, 1981), se han propuesto mecanismos de regulación y transmisión de información contralateral, así como modificaciones en la neurotransmisión ante patologías como epilepsia del lóbulo

temporal, o enfermedades neurodegenerativas. Una de las principales rutas de comunicación inductoras de neuroplasticidad funcional (potenciación a largo plazo), es la vía de colaterales de Shaffer, tanto ipsilateral como contralateral (proveniente de las proyecciones comisurales de CA3 a CA1). En el estudio de Wheal en 1983 se demostró que ambas proyecciones son capaces de inducir potenciación a largo plazo de forma independiente, es decir se puede interrumpir la comunicación ipsilateral o contralateral de CA3 con CA1 y esta última mantiene intacta la capacidad de activar procesos de neuroplasticidad, en un modelo de administración de kainato en CA3 en ratas (Wheal *et al.*, 1983). No obstante, 3 días posteriores a la lesión inicia la muerte neuronal en CA1 contralateral (Maglóczy & Freund, 1995). De forma similar se demostró que la potenciación a largo plazo contralateral no se modifica en un modelo de accidente cerebrovascular en rata (Sopala *et al.*, 2000).

Aunado al estudio anterior, se evidenció que tanto el hipocampo del hemisferio izquierdo como derecho, poseen la misma capacidad para activar la potenciación a largo plazo, es decir no existe evidencia de lateralización inter-hemisférica (Martin *et al.*, 2019). Finalmente, se evidenció con respecto a la comisura hipocampal que participa en la formación de la memoria a corto plazo, dado que al seccionar este haz de fibras conduce a pérdida de la memoria reciente sin alteración de la memoria a largo plazo (Sakaguchi & Sakurai, 2021).

Para finalizar con la descripción del subcampo CA1, en el trabajo de Diehm *et al.*, 2003 se demuestran modificaciones en las propiedades electrofisiológicas en los canales de calcio de los subcampos de CA1 y CA3 posterior a un infarto cerebral. Existe una reducción del potencial de activación medio máximo para las corrientes de calcio dependientes de voltaje en el grupo lesionado versus el grupo control, mientras que en CA3 se observa una despolarización del potencial de activación medio máximo en el grupo lesionado versus el grupo control.

Neurotransmisión glutamatérgica

Glutamato

La transmisión de información dentro del sistema nervioso se lleva a cabo por mensajeros conocidos como neurotransmisores. Actualmente se reconoce que el principal neurotransmisor activador e inhibidor es el glutamato y el GABA (gamma-amino-ácido-butírico), respectivamente. El glutamato participa en funciones como transmisión sináptica, excitabilidad, plasticidad, potenciación a largo plazo (LTP), depresión a largo plazo (LTD), y en procesos patológicos como excitotoxicidad (Moretto *et al.*, 2018, Zhou y Danbolt, 2014). De acuerdo a diversos estudios se determinó que los efectos del mensajero, dependen de la programación de las células para responder a la molécula, de manera que se necesitan de receptores membranales que transmitan la señal hacia el interior celular (Zhou y Danbolt, 2014).

El glutamato es sintetizado en el medio intracelular por la enzima glutamato deshidrogenasa, a partir del alfa-cetoglutarato y degradado en glutamina mediante la glutamina sintetasa (Münster-Wandowski *et al.*, 2013; Hynd *et al.*, 2004). Una vez sintetizado, el glutamato se almacena en vesículas mediante los transportadores VGLUT (transportador de glutamato vesicular), posteriormente se puede liberar a la hendidura sináptica mediante el proceso de exocitosis (Münster-Wandowski *et al.*, 2013; Hynd *et al.*, 2004). De acuerdo al estudio de Münster-Wandowski *et al.*, 2013 se demostró que la concentración vesicular de glutamato es aproximadamente 100 mmol/L, por su parte la concentración extracelular *in vivo* en reposo ronda 0.6 μM , no obstante, durante la transmisión sináptica asciende a más de 10 μM en la región extracelular. Una vez liberado el neurotransmisor a la hendidura sináptica, se une a sus receptores postsinápticos, estos pueden ser de tipo ionotrópicos (iGluR) o metabotrópicos (mGluR), permitiendo la apertura de canales iónicos o activando rutas de señalización intracelular, respectivamente (Lussier *et al.*, 2015). Finalmente, terminada la acción del glutamato, se elimina de la hendidura mediante los transportadores de aminoácidos excitadores 4 y 5 (EAAT4 y EAAT5) presentes en la neurona presináptica y en células gliales, o por medio de inactivación enzimática (Münster-Wandowski *et al.*, 2013).

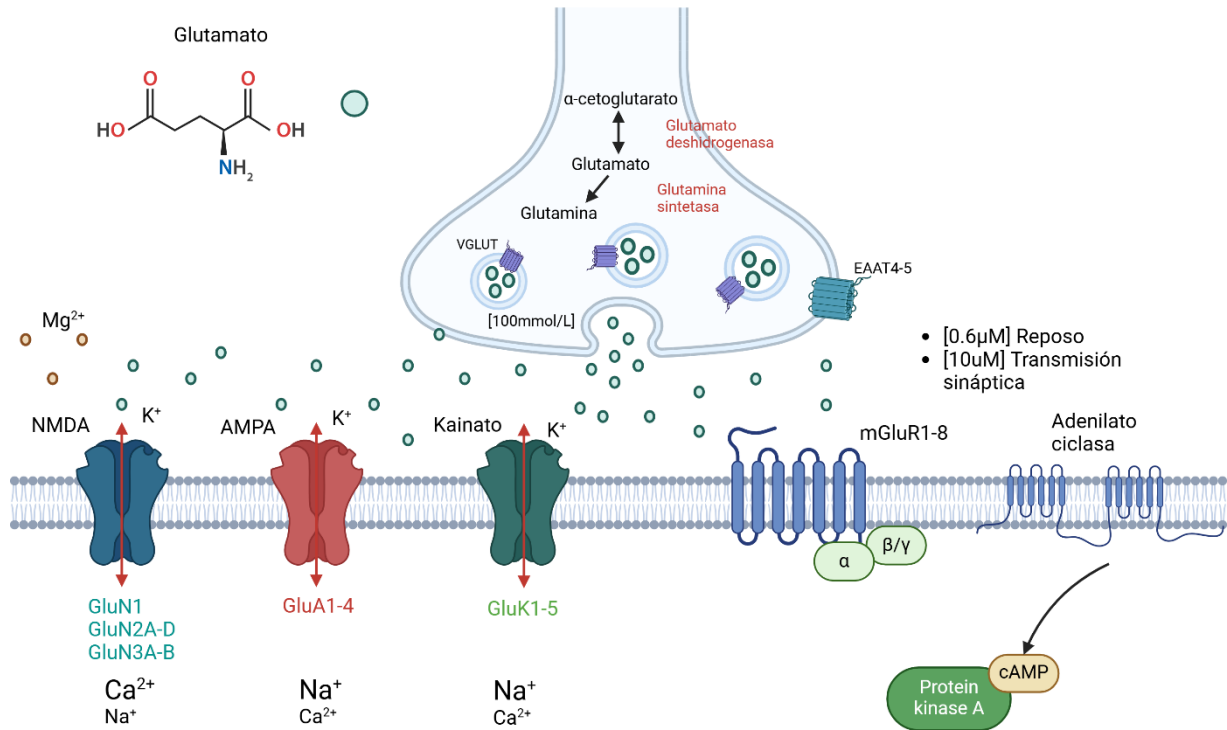


Figura 3. Sinapsis glutamatérgica. Síntesis, liberación, unión a sus receptores postsinápticos, y recaptura de glutamato. Imagen modificada de Hynd *et al.*, 2004; Salińska *et al.*, 2005

En relación a los iGluR, se reconocen tres clases diferenciales entre sí de acuerdo a sus características estructurales y farmacológicas, estos son los receptores a glutamato tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA-R), N-metil-D-aspartato (NMDA-R), y kainato (kainato-R). De forma similar, se reconocen ocho tipos mGluR (mGluR1-8), subdivididos en tres grupos de acuerdo a los mecanismos de transducción de señales, sensibilidad farmacológica y secuencia de aminoácidos (Hynd *et al.*, 2004; Salińska *et al.*, 2005). El grupo I se conforma por los receptores mGluR1 y mGluR5, estos caracterizan por su acople a la hidrólisis de fosfoinositido mediado por fosfolipasa C; el grupo II que agrupa a los receptores mGluR2 y mGluR3 junto con el grupo III conformado por los receptores mGluR 4, 6, 7 y 8, son receptores acoplados a proteínas G_i , es decir inhiben la acción de la proteína membranal adenilato ciclase o se encuentran vinculados a canales iónicos (Hynd *et al.*, 2004; Salińska *et al.*, 2005).

Retomando la participación del glutamato en funciones fisiológicas tanto corticales como subcorticales, se ha postulado que funge como un factor activo en el desarrollo de la LTP y LTD evocada principalmente dentro del hipocampo, permitiendo de este modo que el hipocampo sea una región fuertemente asociada a la memoria y el aprendizaje (Münster-Wandowski *et al.*, 2013). No obstante, el efecto de la liberación del glutamato, debe ser regulado para la correcta neurotransmisión, ya que la liberación continua de este mensajero o la inhibición de su recaptura conduciría a un aumento de 350 la concentración extracelular fisiológica, es decir aproximadamente 3500 μM en la hendidura sináptica, provocando una hiperexcitabilidad celular llevando a su vez al daño en el tejido nervioso (Zhou y Danbolt, 2014).

Teniendo en cuenta la acción dual del glutamato, se ha observado que las lesiones cerebrales inician de forma tardía la hiperexcitabilidad, involucrando signos y síntomas como epilepsia postraumática, síndrome de dolor central y espasticidad (Cai *et al.*, 2007). Además, dentro de los accidentes cerebrovasculares, se presenta en la zona de penumbra daño neuronal a causa de la excitotoxicidad, definida como el proceso en el que se desencadena muerte neuronal por la acción tóxica de los aminoácidos excitadores. Donde el glutamato encabeza la lista de los mensajeros activadores (Dong *et al.*, 2009; Wang y Reddy, 2017).

Para puntualizar los mecanismos de afectación del glutamato, se han reconocido en la actualidad dos importantes, el primero consiste en un efecto osmótico tras la activación continua del receptor AMPA-R, generando un flujo excesivo de cationes que posteriormente acarrearán agua, llevando a estrés hiperosmótico en la célula y a la muerte neuronal (Portera-Cailliau *et al.*, 1997). El segundo mecanismo queda a cargo de los receptores NMDA-R. La continua activación de NMDA-R conduce al aumento de la concentración de calcio intracelular, activando rutas de señalización como la activación de caspasas, despolarización de la membrana mitocondrial, producción de radicales libres, y producción de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno, eventualmente la activación de dichas cascadas intracelulares conduciría a la muerte celular programada (apoptosis) o a la necrosis (Portera-Cailliau *et al.*, 1997). De manera que el estudio electrofisiológico de los NMDA-R resulta

fundamental en la búsqueda de alternativas que disminuyan el daño neuronal debido a la excitotoxicidad en los accidentes cerebrovasculares y en enfermedades neurodegenerativas donde también hay evidencia de activación de apoptosis por la hiperexcitabilidad (Dong *et al.*, 2009; Wang y Reddy, 2017).

Receptores a glutamato tipo NMDA

Los receptores ionotrópicos son proteínas ancladas a la membrana integradas como complejos tetraméricos de poco más de 900 aminoácidos. Estos receptores se caracterizan por formar un poro central que permite el paso diferencial de iones al medio intracelular o extracelular (Traynelis *et al.*, 2010). Los NMDA-R permiten el flujo intracelular de Ca^{2+} preferencialmente y en menor medida de Na^+ y K^+ , contrario a los AMPA-R y Kainato-R, ya que estos permiten el paso preferencial de Na^+ y K^+ (Greger y Mayer, 2019).

Dada la similitud en la secuencia de aminoácidos en las tres clases de receptores, se sugiere que comparten una arquitectura similar, a pesar de tener características electrofisiológicas distintas, tales como la probabilidad máxima de apertura, tasa de activación y desensibilización (Mayer, 2017). Para todos los iGluR se han identificado cuatro dominios: el amino terminal extracelular con 380 residuos (ATD), dominio de unión a ligando extracelular con 250 residuos (LBD), dominio transmembranal (TMD), y el dominio carboxilo terminal intracelular (CTD). De forma paralela se reconoció que el poro central se encuentra formado por tres α -hélices transmembrana (M1, M2 y M3), con M2 de menor longitud (Traynelis *et al.*, 2010). A pesar de la similitud en la secuencia de los iGluR, se han reconocido subunidades formadores de los canales distintas para cada receptor. NMDA-R se puede formar mediante las subunidades GluN1, GluN2A-GluN2D, GluN3A y GluN3B. Para el caso de AMPA-R se puede formar mediante GluA1-GluA4 y para Kainato-R se encuentran las subunidades GluK1-GluK5 (Traynelis *et al.*, 2010; Mayer, 2017).

Es importante resaltar que solo el NMDA-R posee dependencia de voltaje y de co-activador para la completa apertura del canal. Hasta el momento, se reconocen como posibles coactivadores a la glicina y a la D-serina. Además existe la propuesta de que acetilcolina pueda funcionar como coactivador endógeno de NMDA-R (Flores-

Hernández et al., 2009; Islas et al., 2022). De manera particular los NMDA-R funcionales requieren el acople de dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2 (conformación típica), no obstante se puede intercambiar una subunidad GluN2 con una subunidad GluN3. Además GluN1 y GluN3 proporcionan el sitio de unión a glicina y GluN2 para el glutamato (Traynelis *et al.*, 2010). Con respecto a la dependencia de voltaje, GluN1 y GluN2 en conjunto forman un sitio de unión de magnesio el cual bloquea el canal a menos que la membrana se encuentre despolarizada, es decir existe un bloqueo voltaje dependiente (Köhr, 2006).

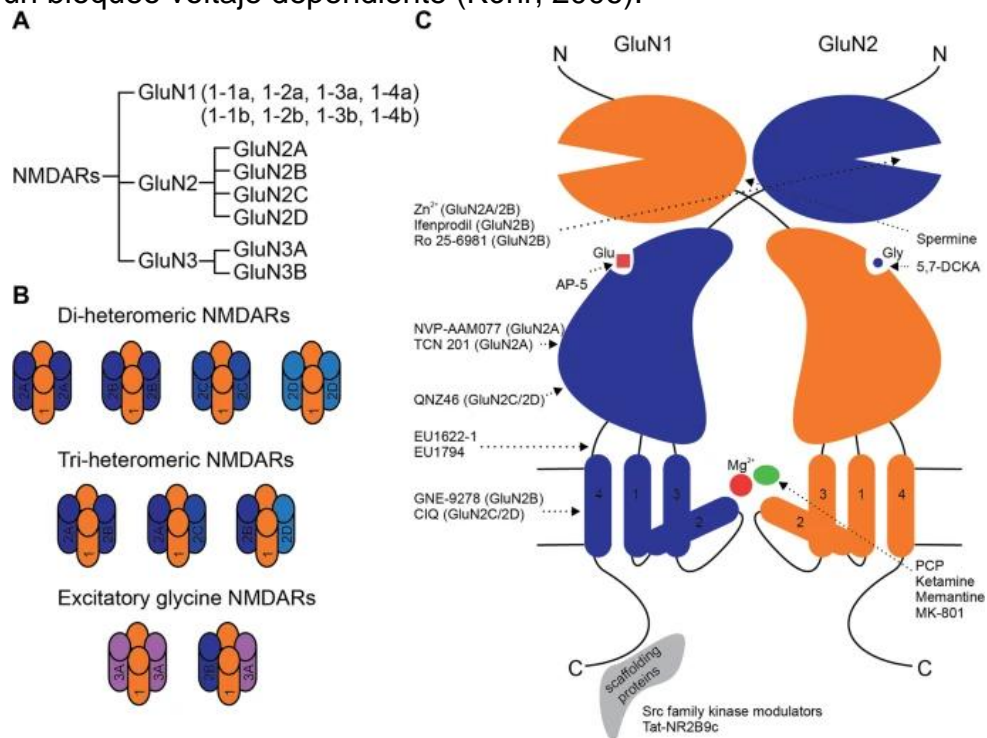


Figura 4. Estructura general de los receptores inotrópicos a glutamato donde se muestra el dominio amino terminal ATD, el dominio de unión a ligandos extracelulares LBD, el dominio transmembrana TMD y los residuos de unión entre dominios. Imagen extraída de Mayer, 2017.

Teniendo las cuatro subunidades acopladas, se puede considerar que NMDA-R en la membrana se encuentra en estado funcional, sin embargo, su expresión en la bicapa sufre regulaciones postraduccionales, lo cual se ha sugerido es crucial para el desarrollo del sistema nervioso, la memoria y el aprendizaje, de forma análoga, las regulaciones postraduccionales participan también en procesos patológicos como la excitotoxicidad. En particular la fosforilación es el principal mecanismo que regula la actividad y expresión en membrana de NMDA-R (Greger y Mayer, 2019; Wang *et al.*,

2003). Por ejemplo, la proteína serina-treonina cinasa (Cdk5), activada previamente por su asociación con p35 o p25, puede fosforilar a GluN2A en la serina 1232 (Ser1232) en neuronas piramidales de CA1, aumentando la amplitud del pico de la corriente iónica en un modelo de isquemia cerebral transitoria en rata, como consecuencia se evoca la muerte neuronal (Wang *et al.*, 2003). En contraste Lussier *et al.*, 2015 demostraron que Cdk5 también puede fosforilar a GluN2B en Ser1116, dado el acople del fosfato disminuye la expresión de NMDA-R de forma dependiente de la actividad.

Por otro lado, la fosforilación de GluN2B mediante la cinasa Fyn/Src en la Tyr-1472 impide el acople de la proteína AP-2, un mecanismo que permite la internalización de la subunidad, de forma que aumenta la expresión membranal de NMDA-R al interrumpir los mecanismos de endocitosis, en cambio la fosforilación en Ser-1480 por la caseína cinasa-2 (CK2), promueve la disminución de la fosforilación en Tyr-1472, de forma que se promueve la internalización de NMDA-R (Lussier *et al.*, 2015). Por último, es conveniente señalar que la fosforilación mediante CaMKII/PKC en la Ser-1303 promueve el acople de GluN2B con CK2, facilitando la fosforilación en Ser-1480, y a su vez promoviendo la internalización de NMDA-R (Lussier *et al.*, 2015). Para finalizar con la descripción de NMDA-R, la fosforilación dependiente de PKC (en sitio de Ser-896) y PKA (Ser-897) en la subunidad GluN1 moviliza al receptor desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática. Regulando de esta manera el tráfico y la expresión en la membrana de las subunidades del NMDA-R, mecanismo que se puede alterar ante patologías como los accidentes cerebrovasculares en la zona de penumbra, produciendo excitotoxicidad y muerte neuronal (Lussier *et al.*, 2015).

Modulación del hipocampo

Neuromodulación

El efecto de los neuromoduladores en la actividad electrofisiológica de las neuronas hipocampales juega un papel clave en la eficiencia con la que se evoca la neurotransmisión, misma que puede manifestarse como potenciación a largo plazo (LTP) o depresión a largo plazo (LTD), y formar las bases para el aprendizaje y la memoria (Sil'kis, 2003). En la literatura se ha sugerido un mecanismo postsináptico unificado que predice como se ve afectada la neurotransmisión debido a la activación de receptores a neuromoduladores como serotonina, acetilcolina, dopamina, noradrenalina, entre otros, en distintos tipos celulares. De acuerdo a esto, la activación de receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ facilitan la LTD de las entradas excitatorias, en paralelo se facilita la LTP de las entradas inhibitorias. No obstante, la activación de receptores acoplados a proteínas G_s o $G_{q/11}$ facilitan la LTP en entradas excitatorias y LTD en entradas inhibitorias (Sil'kis, 2003).

De acuerdo a diversos estudios se han demostrado los múltiples efectos que tienen los neuromoduladores en distintos tipos de neuronas diana dentro de los microcircuitos hipocampales, brevemente se discutirán los efectos globales de neuromoduladores como, acetilcolina, dopamina, noradrenalina y serotonina.

Efecto de la acetilcolina

La acetilcolina en el hipocampo participa en la ejecución del aprendizaje y la memoria, dado que el bloqueo de receptores colinérgicos con antagonistas resulta en déficits de memoria. Las fibras colinérgicas se proyectan hacia el hipocampo desde el núcleo septal medial y la parte tanto ventral como horizontal del núcleo de la banda diagonal. Ingresan al hipocampo a través de la fimbria y se dirigen al SO de CA3, el giro dentado y el SP (Pohorecki & Domino, 1987; Palacios-Filardo & Mellor, 2019). La acetilcolina se puede unir a distintos tipos de receptores, en general se dividen en ionotrópicos o nicotínicos y metabotrópicos o muscarínicos (M; tabla 2). Actuando a través de NMDA-R pueden facilitar LTP o LTD. En general se reconoce que los efectos postsinápticos globales de las proyecciones colinérgicas son excitatorios, ya que tras la estimulación del septum medial aumenta el número de potenciales de acción en el

SP, no obstante, también se encuentra presenta un componente colinérgico inhibitor a cargo de la acción de la acetilcolina sobre las dendritas de las neuronas piramidales (Pohorecki & Domino, 1987).

Ejemplificando la acción colinérgica, la activación del receptor M1 aumenta la actividad de NMDA-R por segundos mensajeros como IP3 e inhibe a canales de potasio voltaje dependientes. Además, la acetilcolina es capaz de aumentar la actividad del receptor a glutamato mediante la acción directa de los receptores nicotínicos y NMDA-R (Sil'kis, 2003). Se debe agregar que la función asociada a los receptores M2 y M3 es facilitar la LTP en células granulares del giro dentado, no obstante, la muscarina también provoca LTD, debido a un mecanismo de desinhibición, donde la acetilcolina aumenta la amplitud de los potenciales postsinápticos inhibitorios en las interneuronas, facilitando la activación de las neuronas piramidales (Sil'kis, 2003).

Tabla 2. Efectos celulares de los neuromoduladores hipocampales

Neuromodulador	Nombre de receptor	Tipo de proteína G o canal	Efecto en neuronas excitadoras
Acetilcolina	M1, M3	G _{q/11}	↓ LTP y ↑ LTD
	M2, M4	G _{i/o}	↑ LTP y ↓ LTD
	Nicotínicos	Canal catiónico	
Dopamina	D1, D5	G _s	↓ LTP y ↑ LTD
	D2, D4	G _{i/o}	↑ LTP y ↓ LTD
Noradrenalina	α1	G _{q/11}	↓ LTP y ↑ LTD
	α2	G _{i/o}	↑ LTP y ↓ LTD
	β	G _s	↓ LTP y ↑ LTD
Serotonina	5-HT1	G _{i/o}	↑ LTP y ↓ LTD
	5-HT2	G _{q/11}	↓ LTP y ↑ LTD
	5-HT4,6,7	G _s	↓ LTP y ↑ LTD
	5-HT3	Canal catiónico	↓ LTP y ↑ LTD

Tabla 2. Efectos celulares tras la activación de receptores a neurotransmisores como acetilcolina, dopamina, noradrenalina y serotonina. Información extraída de Sil'kis, 2003

Efecto de la noradrenalina

El hipocampo recibe proyecciones noradrenérgicas provenientes del locus coeruleus. Llegan directamente al *hilus* del giro dentado, al SLM de CA1 y al SR de CA3 (Pohorecki & Domino, 1987). La noradrenalina participa activamente en la memoria, ya que el bloqueo o destrucción de estas fibras causa deterioro de la memoria (Palacios-Filardo & Mellor, 2019). Los efectos celulares de este neurotransmisor se producen tras la activación de los distintos receptores, por ejemplo, la activación del receptor β facilita la inducción de LTP en la ruta perforante medial, y en CA1 contrario a la generación de LTD en la ruta perforante lateral, debido a la activación de interneuronas y el desarrollo de un mecanismo similar de desinhibición (Sil'kis, 2003). Similar a lo que ocurre por la neurotransmisión colinérgica, la noradrenalina aumenta la actividad de los NMDA-R por fosforilación directa mediada por la protein-cinasa A (PKA; Palacios-Filardo & Mellor, 2019).

Por otra parte, se ha determinado el efecto neuroprotector de la clonidina (agonista de receptores α_2) en un modelo de accidente cerebrovascular en rata, tanto en hipocampo como en corteza y estriado, debido a sus acciones en el sistema nervioso simpático y a la reducción de la liberación de glutamato (Jellish *et al.*, 2005). No obstante, el receptor noradrenérgico α_2 expresado en hipocampo se encuentra acoplado a una proteína $G_{i/o}$ de manera que puede estar modulando la actividad directa en NMDA-R, disminuyendo de este modo el daño neuronal.

Dopamina y su modulación en hipocampo

Las catecolaminas dentro del sistema nervioso central, son moléculas que actúan como neuromoduladores en las neuronas. Comparten cuatro características diferenciales, son moléculas pequeñas cargadas, no cruzan la barrera hematoencefálica, se sintetizan por medio de rutas bioquímicas cortas a partir de aminoácidos (tirosina) y su síntesis se encuentra limitada por una reacción enzimática (Castillo Díaz *et al.*, 2021; Klein *et al.*, 2018). Se reconocen tres catecolaminas distintas, la norepinefrina, epinefrina y la dopamina. Esta última participa en la regulación de motoneuronas, en la memoria espacial, en la motivación, placer y

recompensa, comportamiento sexual, lactancia, y en el despertar (Speranza *et al.*, 2021; Klein *et al.*, 2018; Castillo Díaz *et al.*, 2021).

La síntesis de dopamina inicia a partir de la hidroxilación de la tirosina por la tirosina hidroxilasa (enzima limitante de su síntesis), convirtiéndola en levodopa (L-DOPA). Posteriormente la L-DOPA se convierte a dopamina por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (DOPA descarboxilasa). Una vez sintetizada la dopamina se almacena en vesículas sinápticas por el transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2; Klein *et al.*, 2018; Speranza *et al.*, 2021). Una vez la dopamina almacenada, se libera por dos mecanismos distintos, la transmisión fásica y la tónica. La primera se lleva a cabo llegado un potencial de acción y liberando el contenido vesicular por exocitosis, aumentando la concentración cerca de la terminal presináptica (1.6mM), de forma rápida y transitoria. La transmisión tónica, se lleva a cabo independientemente de la llegada de un potencial de acción, genera aumentos en la concentración extracelular lentos (en rango nanomolar) y no restringidos a la terminal presináptica (Klein *et al.*, 2018).

Liberada la dopamina al espacio extracelular, se une a sus receptores en la neurona postsináptica o a los autoreceptores en la neurona presináptica. Los receptores a dopamina son receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Se clasifican en dos familias, la familia D1 que agrupa a los receptores D₁ y D₅ y la familia D2 agrupa a los subtipos D₂, D₃ y D₄. En general el efecto de la activación de la familia D1 es el aumento de la concentración de AMPc intracelular tras la activación de la adenilato ciclasa, mientras que la familia D2 tiene el efecto opuesto (Klein *et al.*, 2018; Castillo Díaz *et al.*, 2021). Por otro lado, la familia D1 se expresa ampliamente en el estriado, núcleo accumbens, amígdala, sustancia negra parte reticulada, bulbo olfatorio y corteza frontal (se ubican generalmente en la neurona postsináptica). Mientras que la familia D2 se expresan principalmente en el estriado, globo pálido, área ventral tegmental, hipotálamo, amígdala, glándula pituitaria y el hipocampo, ubicados en la parte pre y postsináptica (Klein *et al.*, 2018; Speranza *et al.*, 2021). Otro aspecto importante a señalar es que la familia D2 tiene de 10 a 100 veces mayor afinidad por la dopamina que la familia D1. La acción de la dopamina finaliza con su recaptura por

el transportador dopaminérgico (DAT) en la neurona presináptica o se metaboliza en 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) por la monoaminoxidasa B (MAO-B), para luego convertirse en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). Posteriormente DOPAC se puede degradar a ácido homovanílico (HVA) por la catecol-O-metiltransferasa o puede convertir la dopamina directamente a 3-metoxitirosina (Klein *et al.*, 2018).

En relación a las fibras dopaminérgicas estas se proyectan a distintas regiones corticales y subcorticales por medio proyecciones axónicas, una de las zonas en las que modula la actividad neuronal es el hipocampo, de esta forma se ve implicada en la memoria espacial (Speranza *et al.*, 2021). Así mismo, las fibras dopaminérgicas ingresan al hipocampo provenientes del área ventral tegmental y de la sustancia negra, entra predominantemente a través del subiculum y en menor proporción por el *hilus* del giro dentado, de forma similar, se han identificado fibras dopaminérgicas en el SO de CA1 del hipocampo ventral (Pohorecki & Domino, 1987). En términos generales la dopamina provoca hiperpolarización neuronal, lo cual se determinó con precisión sobre las neuronas piramidales de CA1. Además, es capaz de reducir la liberación de la acetilcolina, sin embargo, el bloqueó de la transmisión dopaminérgica no aumenta la liberación de la acetilcolina (Pohorecki & Domino, 1987).

Por otro lado, la activación de los receptores D1 activa el mecanismo de desinhibición y modula la actividad de NMDA-R, facilitando de este modo la LTP y LTD (Sil'kis, 2003). En este sentido se reconoce que la activación de los receptores D1 junto con NMDA-R ejerce un efecto modulador en forma de potenciación, mientras que la activación de los receptores D2 con NMDA-R tiene un efecto opuesto probablemente debido a la acción de segundos mensajeros y modificaciones postraduccionales de NMDA-R, este último mecanismo resulta ser un mecanismo de protección contra la sobrecarga de calcio mediada por los receptores D1, de forma que puede tener un efecto benéfico en patologías que produzcan un ambiente excitotóxico como los ACV (Cepeda & Levine, 1998; Speranza *et al.*, 2021).

Serotonina y su modulación en hipocampo

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina es una molécula descrita desde hace 60 años, presente tanto en el sistema nervioso central (5% del total de 5-HT en el humano), como en el sistema nervioso periférico (95%; Berger *et al.*, 2009). Desde hace dos décadas su función se ha dilucidado en mayor medida. Actualmente se reconoce que participa en la función del sistema endocrino, cardiovascular, pulmonar, gastrointestinal y en el sistema nervioso. En este último, regula la mayor parte de los procesos de comportamiento en el humano. Su acción queda a cargo de los 15 receptores clonados hasta la fecha actual (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}; 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}; 5-HT₃; 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}; 5-HT₆ y 5-HT₇), agrupados a su vez en siete familias (5-HT₁-5-HT₇; tabla 2) de los cuales todos son receptores acoplados de proteínas G excepto el receptor 5-HT₃ (Berger *et al.*, 2009; Berumen *et al.*, 2012).

Poco menos de un millón de neuronas en sistema nervioso central producen serotonina; molécula que se sintetiza a partir del triptófano, el cual cruza la barrera hematoencefálica y se hidroxila en 5-hidroxitriptofano (5-HTP) mediante la enzima triptófano hidroxilasa tipo 2 (TPH2) dentro del sistema nervioso central, posteriormente se descarboxila para producir la 5-HT principalmente en el núcleo central superior y el núcleo del rafe dorsal, mediante la enzima ácido aromático descarboxilasa (AADC; Berger *et al.*, 2009; Berumen *et al.*, 2012).

Una vez sintetizada la molécula se almacena en vesículas por el transportador monoamina vesicular isoforma 2 (VMAT2). Con el estímulo adecuado, se libera hacia la hendidura sináptica y actúa en sus receptores tanto postsinápticos como presinápticos, en el soma comúnmente se encuentra 5-HT_{1A} o en el axón terminal 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}, (Berumen *et al.*, 2012; Pourhamzeh *et al.*, 2021). Finalizada su acción se metaboliza en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por las enzimas monoamino oxidasa-A (MAO-A) y el aldehído deshidrogenasa. Se debe agregar que la síntesis de la 5-HT es regulable, mediante la enzima degradadora de triptófano (indolamina 2,3-dioxigenasa), y por el cofactor de la enzima triptófano hidroxilasa (tetrahidrobiopterin) (Pourhamzeh *et al.*, 2021).

Por otro lado, desde los núcleos liberadores de serotonina emergen proyecciones hacia mesencéfalo, corteza cerebral, y principalmente hacia regiones límbicas (Berger *et al.*, 2009). El hipocampo ventral recibe aferencias del núcleo del rafe caudal dorsal, mientras que el núcleo del rafe mediano, inerva el SLM de CA1 y CA3 (Berumen *et al.*, 2012).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la serotonina tiene efectos duales, tanto excitadores como inhibidores, dependiendo de los receptores que contenga la célula "diana", en general se reconoce que los efectos presinápticos son de tipo inhibitor, y se encuentran mediados por el receptor 5-HT_{1A}. Se ha demostrado que la serotonina en CA1 produce hiperpolarización y disminución de la resistencia de membrana (Sil'kis, 2003). No obstante, los efectos postsinápticos son de tipo excitador. Se ha reportado en la literatura que la estimulación de los colaterales de Shaffer evoca la activación de potenciales postsinápticos excitatorios en las neuronas piramidales de CA1, promoviendo de este modo la activación neuronal (Schmitz *et al.*, 1998), en

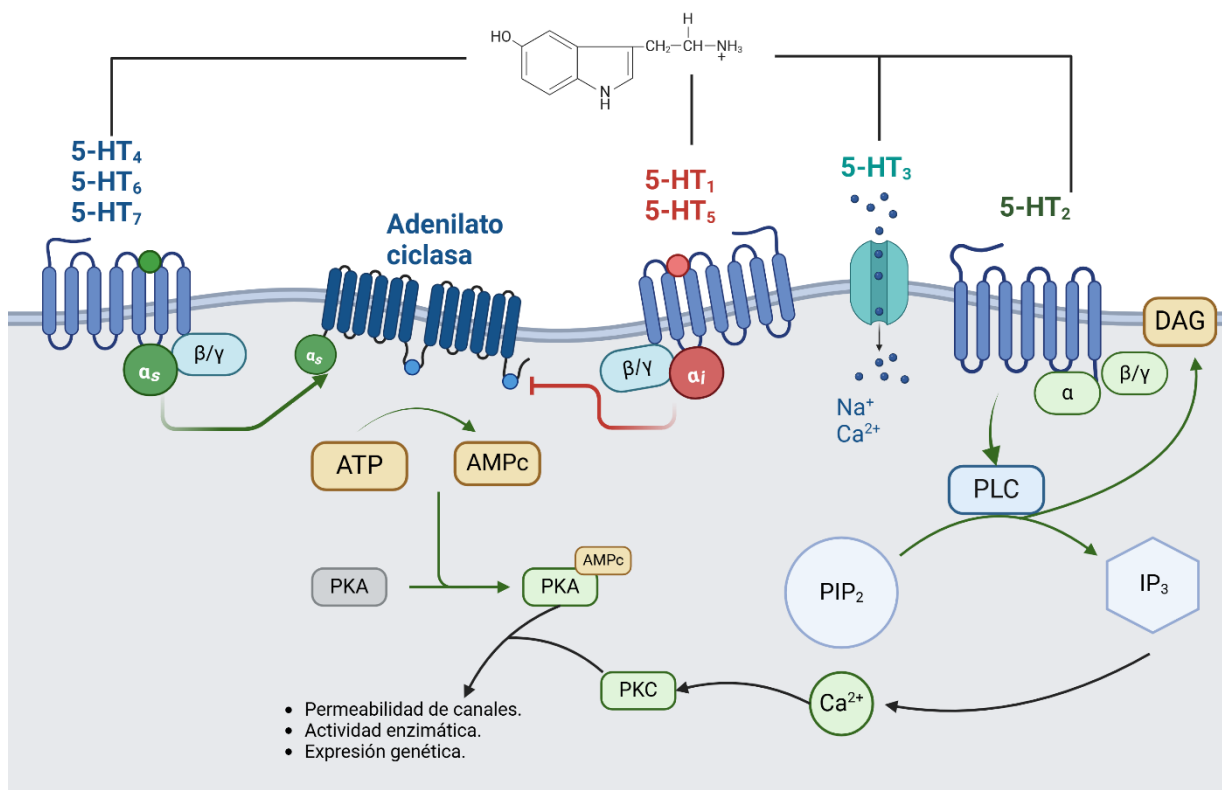


Figura 5. Cascadas de señalización intracelular evocadas tras la activación de los receptores a serotonina.

Imagen modificada de Berumen *et al.*, 2012.

paralelo, al inhibir a interneuronas gabaérgicas se pueden llegar a potenciar los microcircuitos hipocampales. Una característica más a resaltar en la expresión de los receptores serotoninérgicos en hipocampo, es que, tras la destrucción de las fibras aferentes, no existe una regulación al alza de su síntesis, de manera que la modificación en la modulación neuronal de las células diana es debido a la ausencia de 5-HT y no por efectos en la regulación de sus receptores (Pohorecki & Domino, 1987; Berumen *et al.*, 2012; Dale *et al.*, 2015).

Dado que una de las principales regiones blanco de las aferencias serotoninérgicas es el sistema límbico, específicamente el hipocampo, resulta relevante el estudio de la modulación del comportamiento electrofisiológico de las neuronas piramidales a cargo de la serotonina, debido a que la implantación de condiciones fisiopatológicas puede modificar el efecto neuromodulador a cargo de la 5-HT (Berumen *et al.*, 2012; Pohorecki & Domino, 1987). Además, entender la modulación fisiológica permitiría proponer mecanismos de regulación tras la activación de receptores específicos para modular distintos procesos fisiopatológicos, tales como los ACV.

Para finalizar con el apartado, la mayor parte de los receptores a serotonina se expresan en el hipocampo. Esta diversidad de expresión refleja la variedad de funciones asociadas al mismo neurotransmisor. La serotonina bajo los efectos metabotrópicos se ha nombrado como un factor trófico durante el desarrollo, ya que participa en proliferación, migración y diferenciación neuronal (Berumen *et al.*, 2012; Pohorecki & Domino, 1987). En la etapa adulta, la disminución de la serotonina decreta la neurogénesis en giro dentado, no obstante mantiene un rol organizacional en el hipocampo, paralelamente participa en la formación de la memoria (Berumen *et al.*, 2012).

Modelo de ACV

ACV isquémico.

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) son la segunda causa de muerte a nivel mundial. Se presentan alrededor de 12.2 millones de nuevos casos anualmente. De los cuales el 62% ocurre en personas por debajo de los 70 años y 16% entre los 15 y 49 años (Feigin *et al.*, 2022). Los ACV se caracterizan por una pérdida súbita del riego sanguíneo en el tejido cerebral afectando de forma focal o globalmente. Se clasifican de acuerdo a su etiología en isquémicos o hemorrágicos, de los cuales los de tipo isquémicos representan el 62% del total de accidentes cerebrovascular, y el 28% le corresponden a los de tipo hemorrágico (Feigin *et al.*, 2022).

Los ACV de tipo isquémico focales se presentan con mayor frecuencia, estos son causados por la oclusión de una arteria cerebral de forma local o distal (López-Valdés *et al.*, 2021; Hermann *et al.*, 2019). La causa local es debido a la formación de un trombo o una placa aterosclerótica, mientras que la causa distal es debido a la formación de un embolo en una arteria por fuera del encéfalo que viaja y ocluye una arteria cerebral (Hermann *et al.*, 2019; López-Valdés *et al.*, 2021). Dado que el cerebro requiere de un continuo riego sanguíneo para mantener la integridad funcional. El cese o la reducción del mismo produce distintos niveles de daño neuronal dependiendo del tiempo transcurrido (López-Valdés *et al.*, 2021). La isquemia inicialmente provoca la formación de dos zonas bien definidas, el núcleo isquémico y la zona de penumbra, sitios donde se activan cascadas de señalización y ocurren eventos moleculares desfavorables para las células (López-Valdés *et al.*, 2021). El núcleo isquémico se caracteriza por muerte neuronal permanente debido al cese del flujo cerebral provocando necrosis en la región, es importante señalar que el tamaño del ACV depende de la duración, la magnitud y la localización de la isquemia. Por su parte, la zona de penumbra se encuentra adyacente al núcleo isquémico (López-Valdés *et al.*, 2021). En esta región hay reducción (no cese) del flujo sanguíneo de manera que la estructura neuronal no se ve afectada, no obstante, se encuentran ocurriendo cambios fisiológicos en las células que promueven la disminución en la viabilidad celular, en contraste, se ha reportado la activación de mecanismos plásticos que promueven la recuperación espontanea en esta misma región (López-Valdés *et al.*, 2021).

Dado que los ACV isquémicos son afecciones heterogéneas, es importante la búsqueda de modelos animales que reflejen tal fisiopatología en humanos (López-Valdés *et al.*, 2021). Con respecto a los modelos animales isquémicos se clasifican en dos tipos: globales y locales. Mismos que se pueden reproducir en distintas especies, tales como primates, animales domésticos y roedores. Sin embargo, el fácil manejo de los roedores, los ha convertido en la especie ideal para modelar la isquemia (Li & Zhang, 2021).

En primer lugar, los modelos animales globales isquémicos permiten simular la condición de arresto cardiaco y resucitación en los humanos, así mismo ofrece la ventaja de probar la efectividad e identificar el mecanismo de acción de fármacos neuroprotectores. Además, son relativamente más sencillos de reproducir en los laboratorios de investigación (Furlow, 1982; Li & Zhang, 2021). Los modelos más usados de isquemia global incompleta son, el modelo de oclusión de 4 vasos sanguíneos (4-VO-model) y el modelo de oclusión de 2 vasos sanguíneos (2-VO-model; Sun *et al.*, 2021; Li & Zhang, 2021). En relación con el 4-VO-model, se lleva a cabo en dos etapas, en la primera fase se realiza electrocauterización de las arterias vertebrales de forma bilateral, posteriormente, en el día dos (o segunda fase), se lleva a cabo la oclusión temporal de las arterias carótidas comunes mediante clips quirúrgicos.

El 4-VO-model tiene como ventajas una preparación relativamente sencilla, alta tasa de daño neuronal predecible y baja incidencia de convulsiones. Sin embargo, la desventaja se encuentra en el amplio periodo de tiempo que se requiere para finalizar la cirugía sumando las dos etapas a seguir (Sun *et al.*, 2021; Li & Zhang, 2021). Por otro lado, el modelo 2-VO-model consiste en la oclusión permanente de las arterias carótidas comunes de forma bilateral, disminuyendo a la mitad el flujo sanguíneo cerebral sin modificar el estado energético del tejido en ningún momento (Li & Zhang, 2021). Este modelo se utiliza de forma común para estudiar la hipoperfusión cerebral crónica relacionada a las enfermedades neurodegenerativas, ya que produce alteraciones en la actividad electrofisiológica, aumento de estrés oxidativo y cambios neuropatológicos y morfológicos en el tejido (Li & Zhang, 2021). La tasa de mortalidad

del 2-VO-model va de 0 a 100% dependiendo la especie, sin embargo, una alternativa viable es la modificación del intervalo de tiempo de clipaje de las arterias carótidas. De acuerdo a Cho *et al.*, 2019 la variación en el tiempo de clipaje modifica la viabilidad celular con el paso del tiempo. 15 minutos de clipaje disminuyen en mayor medida la viabilidad celular 5 días después de la cirugía, mientras que 5 y 15 minutos de clipaje un día después de la cirugía no provocan cambios significativos en el número de neuronas piramidales de CA1-3 en jerbos.

Otro rasgo de los modelos globales recae en si el modelo representa una isquemia completa o incompleta, de forma que el único modelo animal de isquemia completa es donde se realiza arresto cardiaco y oclusión de la aorta/vena cava, esto con el objetivo de simular el arresto cardiaco en humanos y la resucitación (Lu *et al.*, 2016; Li & Zhang, 2021). No es común realizar el procedimiento en perros y ganado porcino, debido a la alta tasa de mortalidad. Además, genera complicaciones extracerebrales que conducen a altas tasas de coma y baja supervivencia, de manera que se necesitan cuidados posquirúrgicos costosos. A pesar de las complicaciones en el desarrollo del modelo se han utilizado ampliamente para el estudio de fármacos que actúen como neuroprotectores (Li & Zhang, 2021).

Por otra parte, con respecto a la fisiopatología de la isquemia ya sea global o focal, completa o incompleta, se reconoce que el principal desencadenante de la cascada isquémica es la privación de oxígeno y de glucosa en el tejido cerebral, rompiendo la homeostasis neuronal tras la pérdida de moléculas energéticas (Lu *et al.*, 2016). Activándose procesos como desbalance iónico, sobre carga de calcio, excitotoxicidad, edema vasogénico, producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, disrupción de la barrera hematoencefálica, neuroinflamación, apoptosis y necrosis (López-Valdés *et al.*, 2021).

Los procesos nombrados anteriormente se encuentran ligados uno a otro, sin embargo, existe cierto grado de diferenciación espacial donde ocurren. Por un lado, en el núcleo isquémico, la privación de oxígeno y glucosa lleva a la disminución en los niveles de ATP, provocando disfunción de la bomba ATPasa y la consecuente despolarización neuronal, posteriormente ocurre desbalance iónico evidenciado como

flujo de sodio, cloro y calcio hacia el interior celular, estas corrientes iónicas provocan cambios osmóticos en las células y lisis neuronal (Zhao *et al.*, 2021; López-Valdés *et al.*, 2021). Consecuentemente inicia la formación del edema vasogénico debido a la extravasación y acumulación de fluido en el medio extracelular aumentando el volumen cerebral y la presión intracraneal, lo que lleva a su vez a la reducción del flujo sanguíneo causando hipoxia en sitios distantes a la lesión original (Feske, 2021; Zhao *et al.*, 2021). De forma paralela, el flujo sanguíneo no continuo lleva a la liberación de citocinas proinflamatorias y activación de leucocitos intravasculares provocando de esta manera disrupción de la barrera hematoencefálica e invasión de leucocitos al tejido isquémico dañando la integridad neuronal (Lu *et al.*, 2016). A consecuencia las células dañadas exponen patrones moleculares asociados a la lesión, mismos que son reconocidos por la microglía y astrocitos, activando la respuesta inmune dentro del tejido nervioso (Zhao *et al.*, 2021). Dado que la barrera hematoencefálica ya se dañó previamente se permite la infiltración de una mayor cantidad de células del sistema inmune activando un ciclo de retroalimentación positiva, que permite la liberación continua de citocinas proinflamatorias. Finalmente, estas propician el daño neuronal y contribuyen al tamaño del núcleo isquémico. Cabe señalar que la respuesta neuroinflamatoria más fuerte se encuentra alrededor de los siete días posterior al accidente cerebrovascular (Dong *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2021; Feske, 2021).

Por otro lado, en la zona de penumbra se activan mecanismos distintos a los evocados en el núcleo isquémico, debido a que aún existe riego sanguíneo adyacente. De manera que no existe una completa privación de oxígeno y glucosa, reconocidos como los desencadenantes de la cascada fisiopatológica tras un ACV isquémico en la en núcleo de la lesión (Dong *et al.*, 2009). Naturalmente, en el núcleo isquémico se desarrolla una sobreactivación inicial como consecuencia de la falta de moléculas energéticas, formando un ambiente de alta concentración de glutamato en la penumbra, pasando de una concentración extracelular de 10 μM durante la transmisión sináptica a 350 veces más (Patterson, 1996). Generándose las condiciones necesarias para la implantación de la excitotoxicidad donde el principal elemento de estudio es el NMDA-R.

Excitotoxicidad y el papel de NMDA

La excitotoxicidad es un tipo de toxicidad dentro del sistema nervioso mediado por el neurotransmisor glutamato. Se ha estudiado ampliamente en la muerte neuronal desarrollada en las enfermedades neurodegenerativas y en los accidentes cerebrovasculares (Dong *et al.*, 2009; Wang y Reddy, 2017). Mediante estudios electrofisiológicos y de biología molecular se determinó que la activación de los receptores a glutamato participa tanto en la neurofisiología como en la fisiopatología de los organismos dependiendo del tiempo de exposición a la molécula. Estudiar las cascadas moleculares intracelulares luego de la activación de los receptores a glutamato permite proponer dianas terapéuticas ante condiciones como la isquemia (Dong *et al.*, 2009; Wang y Reddy, 2017; Salinska *et al.*, 2005). Modular la activación del receptor NMDA ha sido objeto de estudio continuo ya que su función dentro del organismo va desde la neuroplasticidad hasta la contribución en la apoptosis. Cabe señalar que los efectos excitotóxicos a cargo del glutamato dependen de dos procesos bien establecidos: por un lado, el flujo continuo y poco regulado de iones como el sodio o el cloro ejercen efectos osmóticos sobre las células, conduciendo a la lisis celular y la formación de una zona necrótica (Salinska *et al.*, 2005).

Por otro lado, la activación continua y prolongada de los NMDA-R (con subunidades GluN2B), aumentan la concentración de calcio intracelular activando a su vez cascadas de señalización (como la activación de caspasas, despolarización de la membrana mitocondrial y producción de radicales libres) que conducen a la apoptosis (Dong *et al.*, 2009; Salinska *et al.*, 2005). Las evidencias en la bibliografía reportan que la hiperexcitabilidad que produce un ambiente excitotóxico, no es producto de la muerte de neuronas GABAérgicas, no obstante, se debe a la acción directa de los receptores a glutamato, en particular NMDA-R (Dinocourt *et al.*, 2011). De igual forma, se sabe que la alteración en los niveles de glutamato, la regulación positiva de canales de calcio, sodio y potasio, y los cambios en la resistencia de entrada se relacionan directamente con la excitotoxicidad (Cai *et al.*, 2007). Por otra parte, la hiperexcitabilidad provoca reorganizaciones plásticas en los microcircuitos adyacentes, modificando la comunicación neuronal (Cai *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, la desafuerenciación parcial crónica, prolonga los potenciales postsinápticos

excitatorios provocados por estimulación eléctrica, como consecuencia de una hipofunción del canal de potasio activado por calcio y por el aumento en el tiempo de apertura NMDA-R (Cai *et al.*, 2007).

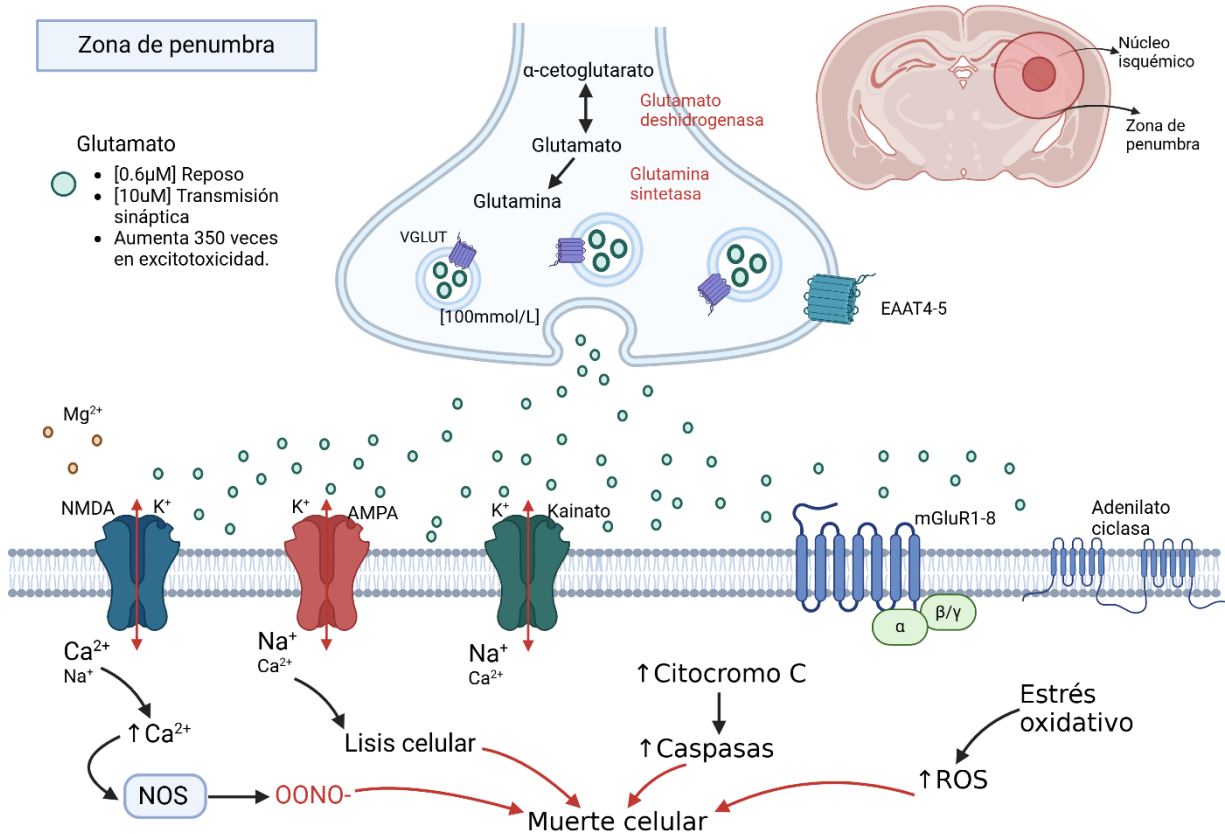


Figura 6. Mecanismos de muerte celular debido a excitotoxicidad por aumento de la concentración de glutamato extracelular. Imagen modificada de Cai *et al.*, 2007

Resumiendo, los mecanismos de excitotoxicidad previamente mencionados, el proceso inicia con el aumento en la concentración del glutamato extracelular alrededor de 350 veces el valor fisiológico, debido a su excesiva liberación y reducida recaptura. El glutamato aumentado permite la activación prolongada de los iGluR y mGluR, provocando a su vez flujo de calcio al medio intracelular y liberando calcio del retículo endoplásmico, respectivamente. El aumento de calcio es censado por la mitocondria y activa proteasas apoptóticas como la calpaína y calcineurina (Mahmoud *et al.*, 2019; Fricker *et al.*, 2018). Por otro lado, la estimulación excesiva de NMDA-R puede conducir a la continua entrada de iones, y ejercer efectos osmóticos, provocando ruptura de la membrana y muerte neuronal (Mahmoud *et al.*, 2019). Finalmente, el estrés oxidativo actúa también como resultado de la excitotoxicidad, ya que se ve

aumentada la producción de especies reactivas de oxígeno, (radicales superóxidos O_2^- e hidroxilo OH^\cdot). Además, el calcio también es capaz de activar a la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), que produce óxido nítrico (NO). El NO se puede combinar con O_2^- y producir peroxinitrito ($OONO^-$). Estas moléculas causan daño en las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos intracelulares que conducen a la activación de apoptosis (Mahmoud *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2006).

Modulación serotoninérgica y dopaminérgica por aripiprazol de la corriente iónica del NMDA-R en ACV

Dada la importancia del NMDA-R en el desarrollo de patologías como los ACV, es imperante la búsqueda de alternativas que modulen su comportamiento electrofisiológico. Las corrientes iónicas de calcio que permite NMDA-R en la zona de penumbra de los ACV, fungen como el desencadenante de una compleja cascada de señalizaciones intracelulares que finalmente conducen a la muerte neuronal. De manera que la reducción del flujo de calcio limitaría la activación de las rutas que llevan a la apoptosis (Mahmoud *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2006). Tanto la serotonina como la dopamina poseen receptores acoplados a proteínas G_i en neuronas piramidales del hipocampo. Tras la activación de sus respectivos receptores, la proteína G inhibe a la adenilato ciclasa, a su vez limita la producción del AMPc, de esta forma, se interrumpe la activación posterior de la PKA (Salazar-Colocho *et al.*, 2008). Como resultado, la activación de receptores acoplados a proteínas G_i limita la fosforilación que recibe el NMDA-R por parte de PKA en la subunidad GluN1 (en Ser897), la cual esta fuertemente relacionada al aumento de la corriente de calcio, de hecho es parte del mecanismo involucrado en la potenciación a largo plazo, no obstante, en una condición de excitotoxicidad, donde la concentración de glutamato extracelular se eleva 350 veces por encima del valor basal, la reducción de la actividad de NMDA-R es crucial para disminuir el daño celular (Zhou y Danbolt, 2014).

Los receptores a serotonina 5-HT_{1A} junto con los receptores de dopamina D2 y D4 se expresan en neuronas piramidales de CA1 hipocampal, ambos activan a la proteína G_i participando en funciones como la memoria y la atención. Específicamente la activación de 5-HT_{1A} se ha visto implicada en la inhibición de PKA y activación de la proteína serina/treonina fosfatasa 1 (PP1), así mismo el agonista (8-OH-DPAT) al receptor 5-HT_{1A} es capaz de aumentar la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), implicado en la neuroplasticidad (Etievant, 2010). Como resultado, la administración del 8-OH-DPAT de forma sistémica previno la muerte neuronal en CA1 de hipocampo en un modelo de isquemia cerebral global transitoria en Jerbos, al regular la entrada de calcio proveniente de NMDA-R (Salazar-Colocho *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha implicado a la dopamina como un mediador de la transmisión sináptica en CA1, ya que es capaz de deprimir la potenciación a largo plazo al modular negativamente la función de NMDA-R (Etievant, 2010). De forma concreta se ha reportado en la literatura que los receptores D2/D4 en neuronas piramidales de CA1 inhiben las corrientes que permite NMDA-R, se demostró también mayor participación de los receptores D4 en dicho bloqueo (Kotecha *et al.*, 2002). No obstante, los mecanismos intracelulares propuestos para la inhibición de la corriente iónica de NMDA-R por parte de los receptores D2 son ajenos a PKA. Por el contrario, se sugiere una transactivación de los receptores al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R), llevando a una inhibición de NMDA-R dependiente del aumento de la concentración de calcio intracelular. De esta forma D4 modula negativamente el comportamiento electrofisiológico de NMDA-R (Kotecha *et al.*, 2002).

En otro estudio se evaluó el efecto de la administración sistémica de agonistas a D2 en un modelo animal de isquemia global en jerbos, demostrando neuroprotección en las neuronas piramidales de CA1 hipocampal (O'Neill *et al.*, 1998). En paralelo, se evidenció en un modelo de isquemia focal en ratones, que la concentración de dopamina en el hemisferio contralateral al afectado aumento significativamente 1 semana después de la cirugía, participando de manera activa en la remodelación de los circuitos, como un mecanismo compensatorio de neuroplasticidad, de forma similar, la administración de un agonista parcial dopaminérgico (D2) y serotoninérgico (5-HT_{1A}), el aripiprazol, mejora la remodelación de los circuitos neuronales en la fase crónica del modelo de isquemia, ayudando a la activación de mecanismos plásticos (Obi *et al.*, 2018). Aunado a esto, el aripiprazol es capaz de aumentar la liberación de dopamina en hipocampo, solo en las concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/kg en ratas administrado vía subcutánea, teniendo un pico máximo 60 min posterior a la administración (Li *et al.*, 2004).

Además, el aripiprazol (1 y 3 mg/kg) es capaz de prevenir el aumento de la liberación de glutamato en la corteza prefrontal en un modelo en rata de déficit cognitivo, provocado mediante la administración del antagonista a NMDA, ácido 3-(R)-2-carboxipiperacina-4-propil-1-fosfónico (CPP; Carli *et al.*, 2010).

Paralelamente Gil *et al.*, 2017 demuestra en un modelo de isquémica focal en ratones, que la administración sistémica de aripiprazol (por 5 días en una dosis de 3 mg/kg) inmediatamente después de la cirugía revierte la disfunción motora, contrarresta la atrofia neuronal en el estriado, disminuye la activación microglial, y aumenta la expresión de la proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina δ (CamKII δ) promotora de la supervivencia neuronal (Zhang *et al.*, 2021). Además, en un modelo de excitotoxicidad por ácido kainico en ratones se evidenció que la administración sistémica de un agonista del receptor 5-HT_{1A} así como del aripiprazol disminuyó el volumen de lesión en un 61% y 73% respectivamente (Cosi *et al.*, 2005). Finalmente, en un modelo de isquemia focal junto con procedimientos adicionales de estrés crónico leve en ratón se demostró que el tratamiento con aripiprazol reduce los comportamientos depresivos, revierte el daño en neuronas dopaminérgicas en mesencéfalo y aumenta la neurogénesis en hipocampo (Kim *et al.*, 2015).

Pregunta de investigación

- ¿Cuál es el efecto de la modulación del aripiprazol sobre la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de hipocampo en un modelo de accidente cerebrovascular en rata?

Hipótesis científica

La modulación con aripiprazol disminuye la corriente que permite el receptor a glutamato tipo NMDA en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo de rata tanto en un modelo de isquemia global como en un modelo sin alteraciones.

Objetivo general

- Evaluar el efecto de la modulación del aripiprazol sobre la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de hipocampo en modelo de accidente cerebrovascular en rata.

Objetivos específicos

- Caracterizar la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de CA1 en hipocampo en rata.
- Caracterizar la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de CA1 en hipocampo en modelo de accidente cerebrovascular en rata.
- Evaluar el efecto mediante una curva dosis respuesta de aripiprazol sobre la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de hipocampo en CA1.
- Evaluar el efecto mediante una curva dosis respuesta de aripiprazol sobre la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de hipocampo en CA1 en modelo de accidente cerebrovascular en rata.
- Evaluar el efecto de la cirugía sobre el número de neuronas mediante la tinción de Nissl, en las células piramidales de CA1 en hipocampo.
- Evaluar el daño neuronal provocado por la isquemia mediante la tinción de Nissl, en las células piramidales de CA1 en hipocampo.

Justificación

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) son una condición patológica en donde se interrumpe la irrigación sanguínea en el tejido nervioso, causando daño cerebral con la consecuente pérdida de funciones dependiente de la zona afectada. En términos generales se clasifican en dos tipos, los ACV isquémicos y los ACV hemorrágicos (Qin *et al.*, 2022).

A nivel global se presentan 12.2 millones de nuevos eventos cerebrovasculares por año, de acuerdo a esta cifra, 1 de cada 4 adultos mayores de 25 años tendrá un ACV a lo largo de su vida, siendo la segunda principal causa de muerte a nivel mundial. Además, el 62% del total de ACVs ocurre en personas por debajo de los 70 años, mientras que el 16% se presenta entre los 15 y 49 años. Es importante señalar que ha aumentado ligeramente la incidencia global en mujeres ya que el 53% de los casos se presentan dentro del sexo femenino y el 47% en el sexo masculino. Teniendo una cifra de mortandad de 6.5 millones de personas al año, debido a un evento cerebrovascular (Feigin *et al.*, 2022).

En relación con la clasificación de ACVs, el 62% de los casos son de tipo isquémico, presentándose 7.6 millones de nuevos casos anualmente. De los cuales 55% son en mujeres y 45% en hombres. Por otro lado, el 58% de los ACV isquémicos ocurren en personas por debajo de los 70 años y el 11% en personas de 15 a 49 años. Se debe agregar que, 77 millones de personas que actualmente viven, han experimentado un ACV isquémico. En sumatoria, 3.3 millones de personas fallecen por un ACV isquémico por año (Feigin *et al.*, 2022).

Finalmente, se estima que se han perdido alrededor de 63 millones de años de vida saludable debido a la discapacidad y la muerte provocada por los ACV de tipo isquémico (Feigin *et al.*, 2022). Dentro de este marco contextual los ACV de tipo isquémico son una de las principales causas de discapacidad y mortalidad a nivel global por año, por lo que el estudio de la patogénesis neuronal se hace relevante. En este respecto, distintos tipos celulares se ven afectados tras un ACV isquémico. Dentro del inicio fisiopatológico isquémico se forman 2 zonas bien delimitadas un “núcleo isquémico” y una zona de penumbra (Qin *et al.*, 2022). En el núcleo isquémico los somas neuronales y gliales desaparecen debido a la privación de oxígeno y glucosa

inicial dado que el tejido nervioso es un pobre reservorio de energía, de manera que necesita de la constante exposición a ambas moléculas, llevando a la pérdida de funciones dependientes de energía (Koh & Park, 2016; Qin *et al.*, 2022; López-Valdés *et al.*, 2021). Mientras que en la penumbra el tejido nervioso permanece relativamente viable, no obstante, se activan modificaciones celulares y morfológicas tales como activación microglial, incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, infiltración de células del sistema inmune, edema cerebral, neuroinflamación y liberación de factores neurotróficos y neurotóxicos (Qin *et al.*, 2022; López-Valdés *et al.*, 2021).

Cabe señalar que la condición fisiopatológica inicial ocurre debido a la deficiencia de glucosa y oxígeno en el tejido como previamente se mencionó. Posteriormente se genera despolarización neuronal y liberación del principal neurotransmisor excitador (glutamato) al medio extracelular, conduciendo a la estimulación constante de sus respectivos receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos (Koh & Park, 2016; Qin *et al.*, 2022; López-Valdés *et al.*, 2021). De acuerdo a Wang *et al.*, 2007 el principal receptor implicado en la neurotoxicidad causada por la isquemia es el receptor a glutamato tipo N-metil, D-aspartato (NMDAR), el cual promueve el aumento en el flujo de calcio hacia el interior de la neurona, activando los mecanismos de muerte celular programada o apoptosis (Qin *et al.*, 2022), por lo que el estudio del comportamiento electrofisiológico de NMDAR en la isquemia y la forma de modular a este receptor puede ser un mecanismo limitante dentro de la fisiopatología de la isquemia.

Con respecto a las interacciones de NMDAR con otros sistemas de neurotransmisión, estos podrían tener un papel relevante en la neuromodulación de la excitotoxicidad. En este respecto se han identificado 13 subtipos de receptores a serotonina acoplados a proteínas G (GPCRs) y 1 canal activado por ligando, agrupados a su vez en 7 clases (5-HT₁₋₇). Así mismo se han identificado 5 subtipos de receptores a dopamina agrupados en dos familias (D1 y D2) que contienen a los receptores, D1, y D5 por un lado y D2, D3 y D4 por el otro, respectivamente. Tanto los receptores de serotonina GPCRS como los de dopamina se encuentran asociados a las vías canónicas G_i, G_s y G_q permitiendo la señalización de cascadas

intracelulares bioquímicas. De este modo, los receptores 5-HT₁, 5-HT₅, D2, D3 y D4 se acoplan a GPCR-G_i, conduciendo a la inhibición de la adenilato ciclasa y a su vez disminución de la concentración intracelular de AMPc. Por su parte, los receptores 5-HT₂ son GPCR asociados a G_q, proteína que activa a la fosfolipasa C generando fosfatidil-inositol (IP₃) y diacilglicerol (DAG), llevando a un aumento de la concentración de calcio intracelular. Finalmente, los receptores 5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT₇, D1, y D5 son GPCR-G_s (McCorvy & Roth, 2015), que tras la unión de su ligando activa a la proteína adenilato ciclasa (AC) aumentando la concentración intracelular de AMPc (Baker *et al.*, 1998), continuando con la cascada de señalización, AMPc podría activar a la proteína-quinasa A (PKA), misma que puede modificar postraduccionalmente a NMDAR mediante una fosforilación en la serina 897 (Ser-897), aumentando de esta manera la corriente de calcio hacia el medio intracelular llevando a distintas respuesta celulares (Raman *et al.*, 1996; Tingley *et al.*, 1997). Por otro parte, se demostró el papel de la AC en la neurodegeneración, específicamente el subtipo 1 (proteína expresada en hipocampo). Al generar un modelo con delección del gen que codifica para la proteína AC1 los investigadores observaron un aumento significativo de la supervivencia neuronal, resaltando la participación de AC1 como un promotor de neurodegeneración (Wang *et al.*, 2007).

Dada la cascada de señalización intracelular que provocan los receptores a serotonina, se sabe que existe una relación entre el aumento de la concentración de AMPc intracelular con el aumento de la corriente que permite NMDAR, por lo que el bloqueo de AC1 mediante agonistas a 5-HT₁, D2 y antagonistas a 5-HT_{2A/C} podría modular la corriente que permite NMDAR y disminuir la participación activa de NMDAR en la neurotoxicidad (Baker *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2007).

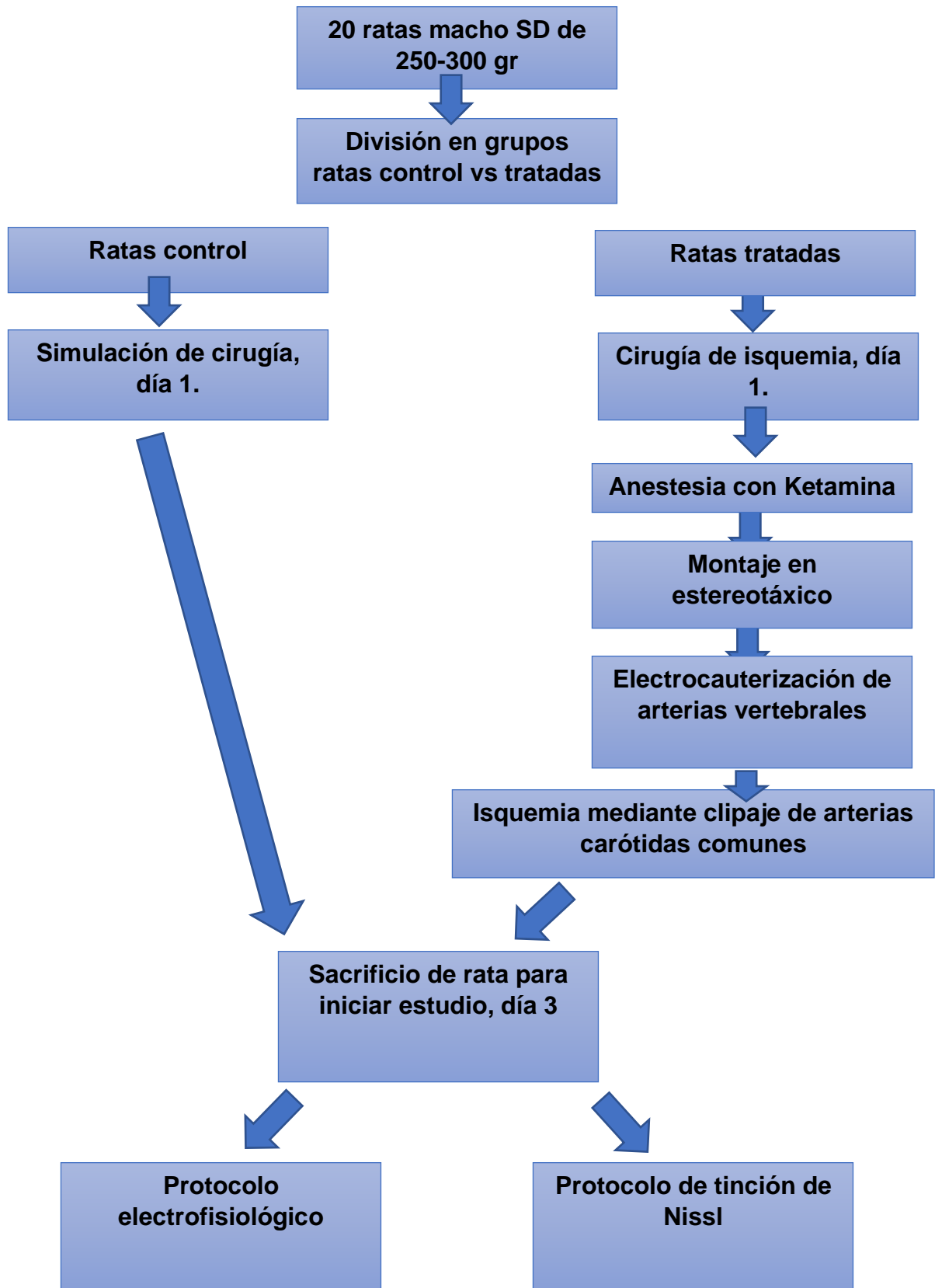
Por consiguiente, el propósito de esta serie de experimentos fue vincular el efecto de la excitotoxicidad evocada por el modelo de isquemia en rata, sobre la corriente de calcio que permite el receptor a glutamato tipo NMDA, con la modulación serotoninérgica y dopaminérgica tras la activación de los receptores 5-HT_{1A} y D2 con aripiprazol (Markstein *et al.*, 1999), sobre la posible alteración del comportamiento electrofisiológico que sufre NMDAR debido al ACV, dando información acerca tanto del papel neurofisiológico del receptor 5-HT_{1A}, y D2, así como de su participación como

posible limitador de los mecanismos de excitotoxicidad que se generan en un modelo de isquemia. El estudio experimental se llevó a cabo mediante registros de voltage clamp, modalidad whole cell, en neuronas piramidales de hipocampo de CA1, además se realizó un conteo del número de neuronas dentro de la misma región evidenciando el daño neuronal. Comparando el grupo de ratas a las que se les realizó la cirugía de isquemia contra el grupo control. Esto se llevó a cabo en el laboratorio de neuromodulación dentro del instituto de fisiología a cargo del D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández en el periodo comprendido entre enero del 2023 y diciembre del 2024.

En la actualidad no existe un solo tratamiento disponible para modular la excitotoxicidad a causa de un ACV isquémico, de manera que, el presente trabajo fungió como una propuesta de estudio inicial en la búsqueda de neuromoduladores de procesos fisiopatológicos tales como la excitotoxicidad provocada por un ACV isquémico, no obstante, es conveniente aclarar que los resultados reflejarán el comportamiento en neuronas piramidales aisladas de hipocampo, por lo que se tendrán que continuar los estudios aumentando los niveles de organización para poder ser considerado como un posible tratamiento en un futuro.

Materiales y métodos

Estrategia de trabajo



Muestreo

Definición de la unidad poblacional

Área de muestreo

El área de muestreo se definió con base en lo reportado por Ordy *et al.*, 1993 en donde se demuestra que el modelo de 4-VO produce un daño sobre las neuronas piramidales en CA1 hipocampal dependiente del tiempo postquirúrgico transcurrido. De esta manera se procedió a la evaluación electrofisiológica e histológica 3 días post-lesión debido a que el porcentaje de neuronas viables en este periodo disminuye hasta el 25%, manteniendo células relativamente viables que fungen como “diana terapéutica”. Paralelamente las neuronas piramidales de CA1 hipocampal poseen tanto receptores a serotonina 5-HT_{1A} como receptores a dopamina D2, de esta manera se evaluó el efecto de la aplicación del aripiprazol sobre la corriente de NMDA (Salazar-Colocho *et al.*, 2008). Motivo por el cual tanto la evaluación electrofisiológica como histológica se llevó a cabo en las neuronas piramidales de CA1.

Modelo de daño isquémico

Para llevar a cabo el modelo isquémico las ratas se anestesiaron con ketamina/xilazina (ketamina 7mg/100 gr de peso de la rata, 30mg de xilazina en 10 ml de ketamina), posteriormente se procedió a evaluar reflejos nociceptivos y sensibilidad en la rata para luego eliminar el pelo y desinfectar el área circundante a la incisión. Paralelamente, se separaron las glándulas salivales mediante manipulación desde la línea media del cuello hacia los laterales. La rata se colocó en una plancha reguladora de temperatura, mantenido está variable constante en un valor de $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, además los procedimientos se realizaron sobre un campo estéril con el objetivo de eliminar estímulos infecciosos. De forma similar se evitaron corrientes de aire durante la cirugía. Después se montó a la rata en el sistema estereotáxico para mantener fija la parte craneal y cervical. Se procedió a infiltrar en la piel 0.1 ml de lidocaína adyacente al sitio de la incisión (aplicando la mitad de dicho volumen en cada lado), para luego seccionar en la línea media del cuello dorsal junto con los músculos cervicales hasta la unión atalanto-occipital mediante un bisturí con punta estéril, teniendo una longitud

aproximada de lesión de 3.5 cm. Se colocó el blefaróstató para mantener el campo de incisión abierto y se procedió a la identificación del foramen alar de la primera cervical (Atlas), por debajo de esta estructura se encuentra la arteria vertebral, de manera que se procedió a su electrocauterización mediante la introducción del cautín a 90 grados de forma bilateral. Terminado la primera parte quirúrgica se procedió a realizar la sutura punto simple continuo en la piel. Además, en el sitio de sutura se aplicó solución salina y yodopovidona para evitar cuadros infecciosos y olor a sangre, de esta manera se evitó que la rata manipule la herida.

Pasando a la segunda parte quirúrgica se desmontó la rata del sistema estereotáxico y se colocó en posición decúbito supino, para luego realizar una incisión en la línea media del cuello anterior con una extensión de 3.5 cm, desde el manubrio esternal hasta la región intermandibular, se expusieron las arterias carótidas de forma bilateral y se colocó por debajo de estas, hilo de sutura del número 1, de 8 cm de largo para realizar la oclusión inmediatamente después, se colocaron dos clips quirúrgicos sobre las carótidas comunes durante 15 minutos, pasado el tiempo establecido se retiraron los clips restableciendo el flujo sanguíneo cerebral. Se mantuvo a la rata durante 20 minutos sin suturar, y se realizó un análisis visual durante este tiempo, verificando que no estuviera presente el reflejo de enderezamiento, y que si estuvieran presentes los signos patognomónicos (que funcionaron como una confirmación visual de que el proceso isquémico se completó). Terminados los 20 min la piel de la bisección del cuello ventral se suturó con un punto simple continuo, así mismo se aplicó yodopovidona. Terminadas las dos fases quirúrgicas se mantuvo a las ratas con libre acceso a alimento y agua, alojados individualmente con un ciclo de 12hrs de luz/oscuridad y una temperatura de 22°C. Tres días posteriores al proceso quirúrgico se realizó el registro electrofisiológico e histológico de las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo.

Selección de la muestra

El estudio se llevó a cabo en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 2-3 meses de edad, con un peso de 250 a 300 gr, debido a que los efectos evaluados sobre la viabilidad neuronal se llevaron a cabo en la cepa mencionada en el estudio de Ordy *et*

al., 1993, además el efecto entre cepas es probable que varíe dado ligeras modificaciones en el sistema vascular dentro del sistema nervioso central de las ratas. Por otro lado, la edad posnatal y el peso de la rata sugerido es necesario debido a que facilita la identificación de las estructuras vasculares, así mismo existe una disminución de la mortalidad dependiente de ambas variables.

Criterios de selección de las unidades de muestreo

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión en la muestra se basaron en la presencia de al menos tres aspectos presentes en la escala Neurological disability Status Scale (NDSS).

Tabla 3. Escala del estado de discapacidad neurológica

Grado de Déficit	Alteraciones Neuroconductuales
0	Ninguno
2	Hipoalgesia Piloerección Ptosis
4	Decremento de fuerza muscular Decremento de tono muscular Espalda encorvado Hipomovilidad ligera Hiperalgesia Hiperreactividad Pasividad Poliuria
6	Agresividad Circling/ rotación corporal Flexión de miembros posteriores Hemorragia (nasal y/o Ocular) Postura lateralizada Temblores/ sacudimientos/ convulsiones
8	Hipomovilidad severa Respiración dolorosa Postura aplanada
10	Muerte

Tabla 3. Aspectos de la escala NDSS considerados como criterios de inclusión. Tabla extraída de Rodríguez et al., 2005

Las alteraciones neuroconductuales no se cuantificaron en este trabajo de investigación, no obstante, el factor común presente en todas las ratas incluidas en la evaluación electrofisiológica y en la tinción de Nissl, presentaban ptosis, piloerección, hipomovilidad y pasividad. Los cuales fungieron como signos patognomónicos mínimos de la presencia de lesión isquémica.

Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión en el desarrollo de este proyecto de investigación fue la presencia de dos o menos aspectos presentes en la escala NDSS, debido a que indicaría una afectación ausente causada por la cirugía isquémica. Además, se consideró como otro criterio de exclusión a la recuperación espontánea completa o parcial del déficit neurológico causado por la cirugía isquémica antes de la evaluación electrofisiológica/tinción de Nissl.

Criterios de eliminación

Los criterios de muestreo se definieron de acuerdo a las características (enlistadas a continuación) que manifestó la rata postcirugía. Es decir, no se consideraron las ratas para las evaluaciones tanto histológica como electrofisiológica que presenten las siguientes características:

- Presencia de reflejo de enderezamiento dentro de 20 min posteriores a la isquemia.
- Ausencia de reflejos patognomónicos posterior a la isquemia.

Tamaño de la muestra

Se utilizaron 20 ratas Sprague-Dawley machos de 2-3 meses de edad posnatal, con un peso de 250 a 300 gr, procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El número de ratas se calculó de acuerdo a los requerimientos de la n representativa para los estudios de electrofisiología siguiendo la ecuación:

$$X = N / (A/100)$$

Donde:

- “X” es el número de animales necesarios o número de animales del cual se tiene que partir.
- “N” es el número mínimo estadístico que permite concluir los objetivos propuestos en el proyecto.
- “A” = 100 - % de incidencia de tratamiento.

Método de recolección de datos

Registro electrofisiológico

Para llevar a cabo el procedimiento de registro electrofisiológico se replicó lo determinado por Surmeier *et al.*, (1991) y reproducido por Flores-Hernández *et al.*, (2000); Cai *et al.*, (2002); no obstante, se realizaron modificaciones para ajustarlo al protocolo.

En primera instancia, se anestesiaron a las ratas mediante la administración de pentobarbital sódico en una dosis de 40 mg/kg vía intraperitoneal. Posteriormente se verificó la ausencia de sensibilidad mediante un análisis visual para después proceder a la decapitación con instrumentos de disección. A continuación, el cerebro se retiró de la cavidad craneal en un lapso de 1-2 minutos y se colocó en solución de isetionato a baja temperatura. La solución de isetionato contenía: 140 mM isetionato de sodio, 2mM KCL, 2mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 23mM glucosa, 15mM Hepes, a un pH = 7.400 y 300 a 305 mOsm/L, además se le agregaron los siguientes suplementos: 1mM ácido pirúvico, 0.005mM glutatión, 0.1mM NG-nitro-L-arginina, 1mM ácido kinurénico, por último, esta solución fue oxigenada. Continuando con el desarrollo experimental se realizó un corte coronal desde 2.56 mm hasta 6.3 mm con respecto a Bregma, de acuerdo al atlas Paxinos, dado que esta zona contiene al hipocampo. En seguida se posicionó esta región aislada del resto del cerebro sobre una placa en el vibratomo, y se vertió isetionato. El siguiente paso fue el seccionamiento mediante cortes coronales de 350 µm de grosor y finalmente bajo un estereoscopio se aisló el estrato piramidal de CA1.

Una vez teniendo los fragmentos del estrato piramidal de CA1 se mantuvieron durante 60 minutos a 30°C en la solución balanceada de Earle (EBSS) la cual es amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO₃), a esta solución también se le agregaron los mismos suplementos que fueron adicionados al isetionato (1mM ácido pirúvico, 0.005mM glutatión, 0.1mM NG-nitro-L-arginina, 1mM ácido kinurénico), además fue burbujeada con O₂ al 95% y CO₂ al 5%, manteniendo un pH de 7.400 y 300 a 305 mOsm/L.

Pasados los 60 minutos los cortes se transfirieron a la solución balanceada de Hanks (HBSS) para iniciar con el proceso de disociación enzimático por 10 minutos. Al HBSS se le agregaron 0.75mg/ml de papaína (Calbiochem), manteniendo una temperatura de 35°C, amortiguada con HEPES y burbujeada con O₂, agregando de manera similar los suplementos del isetionato y de la solución EBSS (1mM ácido pirúvico, 0.005mM glutatión, 0.1mM NG-nitro-L-arginina, 1mM ácido kinurénico). Terminados los 10 minutos se lavó el tejido con isetionato para luego seguir con la disociación mecánica mediante pipetas Pasteur de 3 calibres distintos pulidas al fuego. Finalmente, las células suspendidas se vertieron en cajas de Petri de 35mm que fueron colocadas en el microscopio donde se registraron. Es importante señalar que se tomaron 5 minutos posteriores a la colocación de las células suspendidas en la caja de Petri para que estas se adhieran al fondo de la caja, terminado ese tiempo se lavó con solución de fondo (*background*), la cual contiene: 140mM NaCl, 2mM KCL, 2mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 23mM glucosa, 15mM HEPES, y rojo fenol, a un pH de 7.400, con 300-305 mOsm/L, burbujeada con O₂.

Técnicas y procedimientos

Técnica de fijación de voltaje en célula completa

Una vez realizado el procedimiento antes descrito se procedió a la ejecución del registro por técnica de fijación de voltaje en célula completa. Previamente se separaron los electrodos de registro mediante el estiramiento de tubos de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI 1B120F4) con un Micropipette Puller Modelo p-97 (Sutter Instrument Co). Mismos que llenaron con solución interna, la cual contiene: 175mM N-metil-D-glutamina (NMDG), 40mM Hepes, 2mM $MgCl_2$, 10mM ácido etilen glicol-bis (β -aminoetil éter) -N, N, N',N'- tetraacético (EGTA), 12mM fosfocreatina, 3mM Na_2ATP , 0.35mM Na_3GTP , 0.1mM leupeptina, a un pH=7.3 amortiguado con H_2SO_4 y 265-270 mOsm/L, por su parte la solución externa contiene 127mM NaCl, 20mM CsCl, 5mM $BaCl_2$, 2mM $CaCl_2$, 12mM glucosa, 10mM Hepes a un pH de 7.3 amortiguado con NaOH y osmolaridad de 300-305mOsm/L.

Para realizar el registro electrofisiológico se necesitó el amplificador "voltage clamp" Axopatch 1-D (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), además de un digitalizador Digidata 1322A (Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA), controlados mediante el programa pClamp versión 9 (Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA) ejecutado por una computadora con procesador Pentium IV (1.5GHz), 1 GB de memoria RAM y sistema operativo Windows XP SP3.

Una vez teniendo los electrodos, se midió su resistencia en el baño, la cual se mantuvo en el rango de 5-10 $M\Omega$ para poder ejecutar el sello de membrana. Posterior a la ruptura del sello la resistencia serial se mantuvo por debajo de 25 $M\Omega$. Suspendiendo el registro en caso de cambios en la resistencia serial mayor al 50%. Ya con el sello de membrana establecido (1 $G\Omega$ de resistencia de acceso), el potencial de membrana se mantuvo en -60mV en las neuronas piramidales. Como criterio de inclusión se registraron las neuronas con forma piramidal, un número reducido de dendritas, características morfológicas estables y con una capacitancia de alrededor de 13pF.

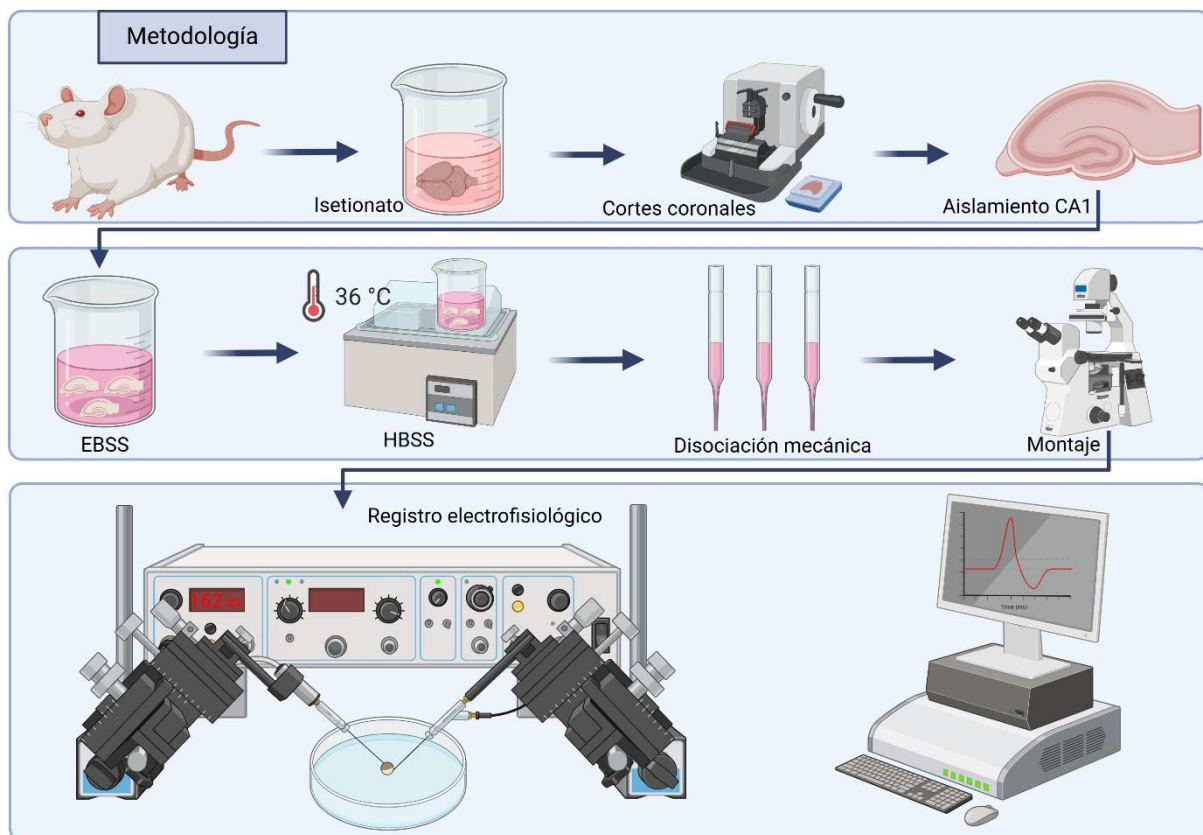


Figura 7. Metodología de extracción del tejido cerebral y aislamiento del estrato piramidal del subcampo CA1 de hipocampo.

Agentes farmacológicos

N-metil-D-aspartato (NMDA) y 7-[4-[4-(2,3-diclorofenil) piperazin-1-il] butoxi]-3,4-dihidro-1H-quinolin-2-ona (aripiprazol), ifenprodil y cloruro de magnesio serán obtenidos de SIGMA-Aldrich Company. Para generar las corrientes activadas por ligando se aplicó solución externa sola y solución externa + NMDA a través de dos capilares, formando un ángulo de 45° a una distancia de $300 \pm 100 \mu\text{m}$ de la célula que se registró. Es importante mencionar que en los capilares uno de ellos contuvo la solución externa o control y el otro con solución externa + ligando a usar. El intercambio de soluciones se controló mediante válvulas solenoides 98302-00 (Cole-Parmer) reguladas por el sistema Digidata 1322A y una herramienta de control fabricada en el laboratorio. En cuanto a la aplicación de soluciones, se expuso a la célula con la solución control, posteriormente se aplicó solución control + el ligando a usar (NMDA o NMDA + aripiprazol) durante 3 segundos, para luego regresar a la solución control.

Protocolos electrofisiológicos

Rampa

Una vez realizado tanto el sello como la ruptura de membrana se activó el protocolo de rampa, el cual consistió en cambios de voltaje desde -100 mV hasta +40mV en un tiempo de 100 ms, esto permitió la apertura de canales dependientes de voltaje de sodio y calcio. Durante este protocolo se registraron las corrientes iónicas a una frecuencia de muestreo de 100µs/10kHz. El protocolo se mantuvo hasta que se obtuvieron al menos 12 sweeps estables.

El protocolo de rampa tiene la siguiente representación gráfica.

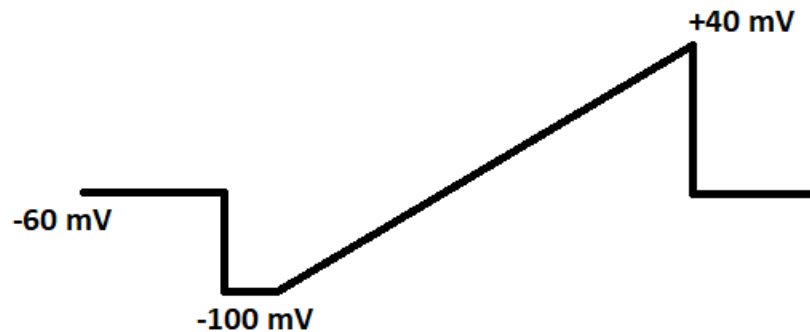


Figura 8. Cambios de voltaje realizados durante el protocolo de rampa, evidenciando mantenimiento de voltaje en -60mV, posteriormente cambios desde -100mV a +40mV en 100ms.

Aplicación de NMDA

Posterior a la activación de la rampa, el potencial de membrana se mantuvo en un valor de -60mV debido a que es el potencial de membrana en reposo en las neuronas piramidales de hipocampo de CA1. El protocolo inició en el tiempo 0, con una duración entre cada barrido de 15 segundos, se expusieron a las neuronas al ligando durante 3 segundos, en el caso de NMDA se aplicaron las concentraciones 0.3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM y 300 µM, una a la vez, asignadas de forma aleatoria. Se registró la actividad de la corriente iónica a una frecuencia de 500Hz, es decir un punto cada 2 milisegundos. Al inicio de cada barrido se aplicó un pulso cuadrado de -70mV durante 200ms con el objetivo de llevar un seguimiento de los cambios en la resistencia de membrana. En caso de un cambio del 10% el protocolo fue suspendido. Esta

condición se dejó seguir durante 3 o 4 trazos estables, tomando como control y lavado el efecto de 100 μ M de NMDA.

El protocolo de aplicación de NMDA tiene la siguiente representación gráfica.

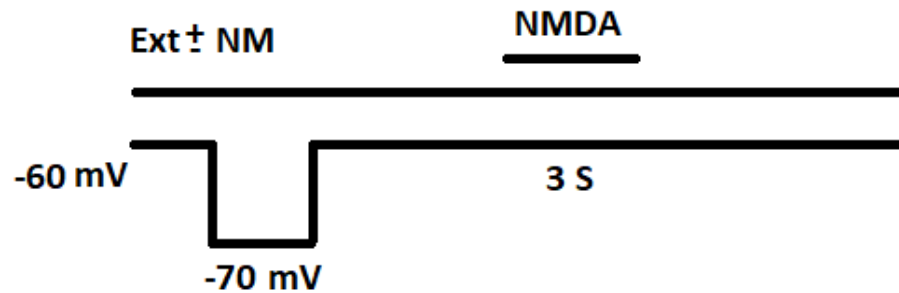


Figura 9. Protocolo de aplicación de NMDA, demostrando un voltaje de mantenimiento de -60mV, un pulso cuadrado de -10mV que evalúa cambios en la resistencia de membrana, tiempo de aplicación de NMDA durante 3 segundos y una duración del protocolo de 15 segundos en cada trazo

Protocolo NMDA + Aripiprazol

Las neuronas registradas fueron bañadas con solución externa + aripiprazol con interrupción de 3 segundos en los cuales se administró NMDA (solo en la concentración de 100 μ M) + aripiprazol, la cual fue disuelta en solución externa. Esta condición se mantuvo durante 3-5 trazos de corrientes estable. Para este protocolo de aplicación se tomó como control y lavado de cada concentración de aripiprazol la corriente provocada por 100 μ M de NMDA. Es importante aclarar que se realizó una curva dosis respuesta de aripiprazol tomando como referencia el valor EC_{50} reportado por Brust *et al.*, 2015, el cual es 4.1 nM, de forma que se inició con 10 nM buscando la concentración con mayor efecto y la concentración con menor efecto.

Protocolo NMDA + Ifenprodil y/o magnesio

Con el objetivo de determinar la participación de las distintas subunidades debido al efecto de la condición isquémica sobre NMDA-R y de acuerdo a lo reportado por Xie *et al.*, 2022 se procedió a realizar evaluar el efecto de ifenprodil sobre NMDA-R. Para este protocolo las neuronas fueron bañadas con solución externa + ifenprodil 1 μ M y/o solución externa + magnesio 50 μ M con interrupción de 3 segundos en los cuales se

expusieron a NMDA (100 μ M) + Ifenprodil 1 μ M y/o magnesio 50 μ M. Fármacos que fueron disueltos en solución externa. Esta condición se mantuvo durante 3-5 trazos de corriente estable. Se tomo como condición control la corriente evocada por NMDA 100 μ M.

Protocolo de tinción de Nissl

Método de violeta de cresilo de Vogt para sustancia de Nissl, modificada para cerebro de rata. Cabe señalar que previo a la realización del procedimiento, se dividieron a las ratas en 2 grupos de acuerdo a los objetivos 5 y 6, además, todos los procedimientos se realizaron pasados 3 días de la cirugía.

Procedimiento

Se anestesió a la rata con pentobarbital sódico en una dosis de 40mg/kg, en ausencia de reflejos y sensibilidad se procedió a realizar la perfusión con paraformaldehído al 4%. Con instrumentos de disección se realizó una incisión por debajo del esternón y se separó del pericardio. Posteriormente se diseccionó la aurícula derecha y se introdujo la cánula en el ápice del ventrículo izquierdo, permitiendo el flujo de la solución. Comenzada la perfusión se dejó pasar un volumen de 30 ml. Finalizado el proceso se continuó con la decapitación y extracción del tejido cerebral. Colocando el cerebro en solución de PFA al 4%.

Pasados 3 días se realizaron secciones de tejido coronales de 80 μ m de grosor, desde 2.56mm - 4.52mm con respecto a bregma, y se fijaron a las laminillas gelatinizadas al 2%, obteniendo de 12 secciones coronales. Se cubrieron los cortes con la misma solución de gelatina para evitar la contracción y se dejaron secar. Una vez secos y montados en las laminillas se colocaron en la solución de violeta de cresilo "ECTH" durante 2.5 minutos. Posteriormente se lavaron en alcohol al 75% durante 1 minuto. Seguidamente se deshidrataron con alcohol al 90% (2) y al 100% (2), y se aclararon con xileno durante 2 minutos. Finalmente se montaron usando resina sintética o bálsamo de Canadá.

Soluciones

- Solución stock de violeta de cresilo al 2% "ECTH".

- Violeta de cresilo – 2mg
- Agua destilada – 100ml
- Solución stock estabilizadora de acetato de sodio
 - Acetato de sodio – 2mg
 - Agua destilada – 1000ml
 - Ácido acético glacial – 3ml
- Con las soluciones stock antes mencionadas se preparará la solución de trabajo.
 - Solución stock de violeta de cresilo al 2% - 85ml
 - Solución estabilizadora – 165ml
 - Volumen total – 250ml

Posteriormente se procedió al conteo de neuronas mediante una muestra en cada uno de los 12 cortes coronales de 80 μ m de grosor cada 200 μ m con el programa ImageJ, para lo cual se tomaron fotografías en 20x y se convirtieron en fotografías de 8bits. Posteriormente se dividió la imagen en dos clases de pixeles (modificando la imagen original a rojo y gris) mediante “thresholding”, luego se convirtió la imagen a formato binario y se enmascaró el fondo, finalmente se marcaron los bordes para discriminar el límite de las neuronas y se procedió al conteo en el estrato piramidal del subcampo CA1 de hipocampo.

Análisis de datos

Los valores en las tablas presentadas, gráficas o texto, representaron el valor de la media de los resultados obtenidos \pm su error estándar de la media (ESM). Los ajustes y gráficas se realizaron en el programa Origin 9.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Para el análisis estadístico, los datos se analizaron mediante una prueba Shapiro ($p < 0.05$) para determinar el comportamiento de una distribución normal. Mientras que las diferencias entre las medias de grupos experimentales se analizaron mediante la prueba “t” apropiada o un análisis de varianza correspondiente.

En cuestión del análisis de la curva dosis efecto, se empleó un ajuste logístico tipo sigmoidal con el programa Origin 9.1. La ecuación que se utilizó en dicho ajuste es la siguiente:

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

- A_1 – tamaño total del pico
- A_2 – Estado estacionario
- X – Valor de la concentración
- X_0 – EC50

Diseño estadístico

Hipótesis estadística

H0 – La aplicación de aripiprazol no inhibe la corriente que permite NMDA-R en neuronas piramidales agudamente disociadas de CA1 de hipocampo, tanto en el modelo de accidente cerebrovascular como en el grupo de ratas control.

H1 – La aplicación de aripiprazol inhibe la corriente que permite NMDA-R en neuronas piramidales agudamente disociadas de CA1 de hipocampo, tanto en el modelo de accidente cerebrovascular como en el grupo de ratas control.

Pruebas estadísticas

El análisis estadístico de los resultados obtenidos inició con una prueba Shapiro Wilk ($p < 0.05$) para determinar la distribución de los datos. La hipótesis nula (H_0) de la prueba de normalidad es la siguiente: los datos provienen de una distribución normal. En caso de que se cumpla la H_0 se continuó con el análisis estadístico descrito a continuación.

En cuanto el ajuste logístico sigmoideal se empleó la ecuación por el cual está definido.

$$y = \frac{A1 + (A2 - A1)}{(1 + e^{-k(\log(x) - \log(xc))})}$$

Finalmente, determinado el modelo que mejor describe los datos, se obtuvo el ajuste de la misma función para la información del grupo control y para el grupo tratado, posteriormente se realizó una comparación estadística de las curvas a través de la siguiente ecuación.

$$F = \frac{\frac{SM - (SC + ST)}{k}}{\frac{SC + ST}{NC + NT - 2k}}$$

- SM – Suma de residuos al cuadrado (RSS) del ajuste de los datos combinados de ambos grupos.
- SC – Es la RSS del ajuste de los datos del grupo control.
- ST – Es la RSS del ajuste de los datos del grupo tratado.
- NC – Número de observaciones para el grupo control.
- NT – Número de observaciones para el grupo tratado.
- k – Número de parámetros utilizados para el ajuste.

Cabe señalar que esta prueba estadística sigue a una distribución F con k y NC + NT – 2k grados de libertad. La elección del ajuste y la comparación estadística entre grupos se realizará en el entorno de programación R con ayuda del paquete drc (Hernández-Carballo *et al.*, 2020).

Logística

Recursos humanos

La presente tesis de investigación fue redactada y llevado a cabo por el LBM. Luis Angel Haro Santillan, en el laboratorio de neuromodulación del instituto de fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo del D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández.

Recursos materiales

Para la ejecución de la presente tesis se necesitó el fármaco ketamina/xilazina (7mg de ketamina por cada 100 gr de peso de la rata, 30 mg de xilazina en 10 ml de ketamina) para anestesiarse a las ratas. Se utilizaron instrumentos de disección para la cirugía y extracción del tejido cerebral, como pinzas Kelly recta de 14cm, pinzas de disección sin dientes, bisturí, blefaróstato, clips quirúrgicos, hilo de sutura del número 1, aguja de sutura, campos estériles y estereotáxico. Un equipo de vibratomo para realizar los cortes finos del tejido, pipetas Pasteur de diferentes calibres para la

disociación mecánica, cajas de Petri de 35mm donde se colocó la suspensión de células, un microscopio para la identificación y registro electrofisiológico, tubos de capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI 1B120F4), Micropipette Puller Modelo p-97 (Sutter instrument Co), solución interna que se colocó dentro de los capilares, solución externa, amplificador “voltaje clamp” Axopatch 1-D (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), digitalizador Digidata 1322A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), equipo de software como pClamp versión 9 y Windows XP SP3, equipo de hardware como computadora con procesador Pentium IV (1.5GHz), 1 GB de memoria RAM, válvulas solenoides 98302-00 (Cole-Parmer) y herramienta de control fabricado en el laboratorio. Fármacos como ligandos NMDA, aripiprazol.

Recursos financieros

La fuente de financiamiento principal para la ejecución del protocolo de investigación fue el monto asignado por vicerrectoría de investigación y estudios de posgrado (VIEP) y por el laboratorio de neuromodulación de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, así como la beca CONAHCYT asignada al estudiante de posgrado LBM. Luis Angel Haro Santillan.

Bioética

Norma

Los procedimientos realizados en el presente protocolo serán llevados a cabo bajo la norma oficial mexicana (NOM)-062-ZOO-1999.

Resultados

Los resultados presentados en este proyecto se obtuvieron de un total de 77 neuronas registradas mediante la técnica de *voltage clamp* modalidad *whole cell* provenientes de 20 ratas macho Sprague Dawley de 2-3 meses de 250 – 300 gramos. Se registro la capacitancia con la finalidad de homogenizar la población de neuronas evaluadas de acuerdo a su tamaño, siguiendo la constante: $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Encontrando que la capacitancia media fue 11.21 pF grupo sham y 12.41 grupo ACV con una SD de 2.92 y 3.58, respectivamente (Figura 9) lo cual corresponde a la capacitancia reportada por Alshuaib *et al.*, 2001 con un valor promedio de 13.45 pF (n=82) para neuronas piramidales de CA1. Dentro de la muestra se consideraron solamente neuronas con un sello de membrana $>1\text{G}\Omega$ y una resistencia de acceso del electrodo $<25\text{M}\Omega$. Con el objetivo de asegurar que los efectos observados fueron por los fármacos evaluados y no por cambios en la resistencia de membrana.

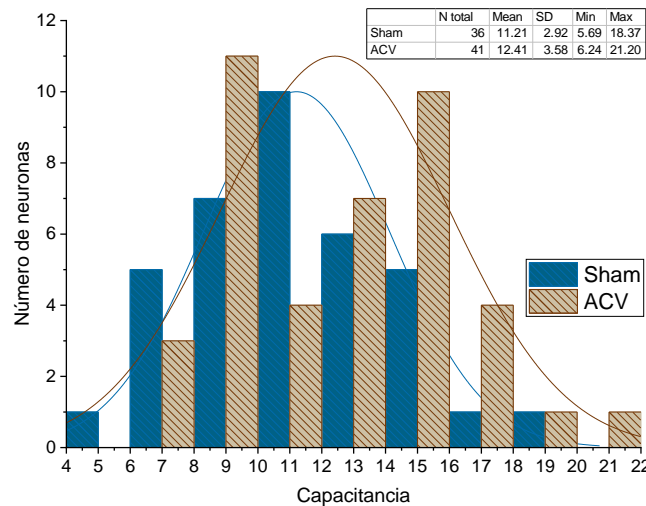


Figura 10. Histograma de capacitancias de neuronas piramidales del subcampo CA1 del hipocampo dorsal registradas mediante la técnica de *voltage clamp*.

Además, se realizó un conteo de neuronas piramidales de CA1 de hipocampo bajo los siguientes criterios, se realizaron 12 coronales de $80\mu\text{m}$ de grosor cada $200\mu\text{m}$ y se capturaron fotografías en $20\times$, para una muestra de 1 rata stroke y 1 rata sham, posteriormente cada fotografía se analizó en imageJ. Al realizar el test *t-Student*

para muestras independientes no se obtuvieron diferencias significativas $t = -0.3693$, $p > 0.05$.

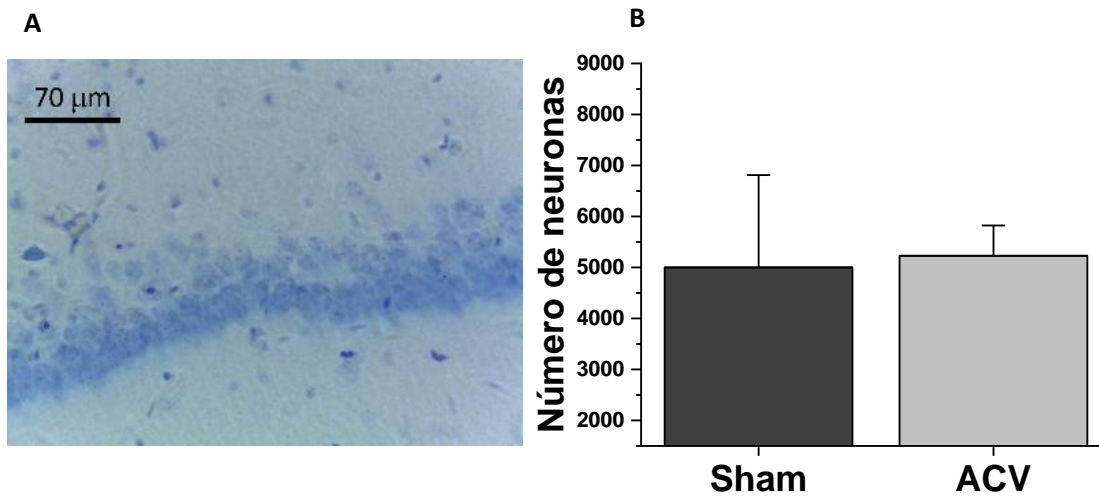


Figura 11. A) Imágenes representativas de la tinción de Nissl en CA1 de hipocampo. B) Cuento de somas de neuronas del estrato piramidal del subcampo CA1 de hipocampo en grupo sham y grupo control no muestra diferencias estadísticamente significativas tras realizar el test t-student $t = -0.3693$, $p > 0.05$

Ilustró la viabilidad celular a través del protocolo de rampa, el cual consistió en cambios de voltaje desde -80mV hasta $+40\text{mV}$ en 100ms . Generando corrientes de Na^+ ($I_{\text{Na}} \geq 1000\text{pA}$) y corrientes de Ca^{2+} ($I_{\text{Ca}} \geq 200\text{pA}$). En relación a la problemática expuesta, Wang *et al.*, 2007 sugiere que uno de los elementos principales en la fisiopatología de los ACV es NMDA-R, en consecuencia, se estudió la neurotransmisión glutamatérgica

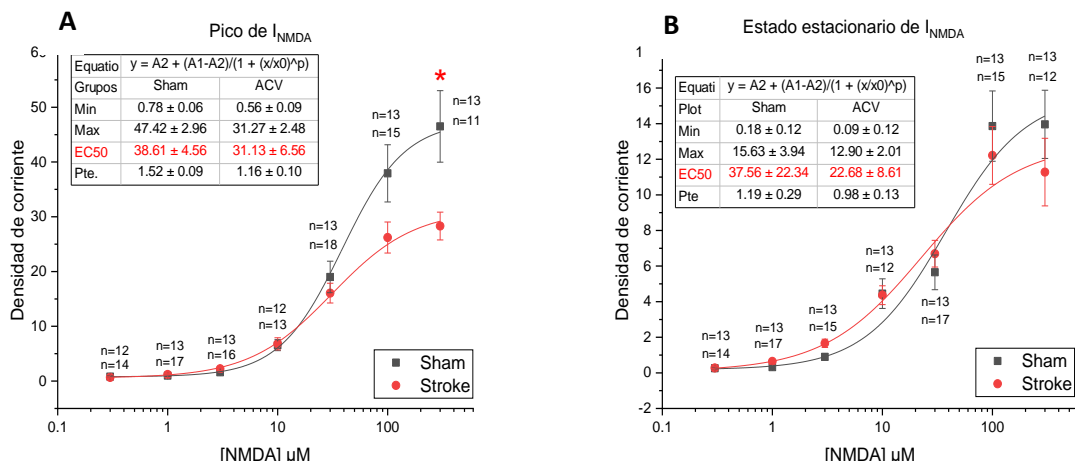


Figura 12. Curvas dosis-respuesta de la corriente iónica evocada por NMDA-R a) Pico de I_{NMDA} para el grupo sham y el grupo ACV, $F = 11.025$, $p = 0.001$, el test post-hoc Tukey demuestra $p < 0.05$ en la concentración de $300\mu\text{M}$. b) Estado estacionario de I_{NMDA} , $F = 1.406$, $p > 0.05$.

mediante la evaluación electrofisiológica de NMDA-R en las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo. Se realizó una curva dosis-respuesta desde 0.3 μM hasta 300 μM abstrayendo los datos del pico, el estado estacionario y la tau, estos valores se ajustaron a una función sigmoideal obteniendo una EC_{50} para el pico de 38.61 ± 4.56 pA/pF y una pendiente de 1.52 ± 0.09 . A fin de comparar las alteraciones en la cinética de la corriente de NMDA-R con la condición de isquemia, se procedió a caracterizar la neurotransmisión glutamatergica a cargo de NMDA-R en el grupo de ratas a las cuales se les realizó el procedimiento quirúrgico completo de ACV mediante el modelo de 4-VO; ajustando los datos a una función sigmoidea se obtuvo una EC_{50} para el pico de 31.13 ± 6.56 pA/pF y una pendiente de 1.16 ± 0.1 . A consecuencia de esta serie de experimentos se realizó una prueba estadística ANOVA ($p < 0.05$) de dos vías para cuantificar la diferencia entre grupos obteniendo $F = 11.025$, $p = 0.001$, es decir se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El análisis post-hoc mediante el test Tukey ($p < 0.05$) demostró que la concentración con diferencia estadística entre grupos fue la de 300 μM . Estos resultados sugieren que el pico de I_{NMDA} se reduce significativamente en el grupo de ACV con respecto al grupo sham. Por otro lado, en la evaluación del estado estacionario (SS), definido como el estado de la I_{NMDA} donde el número de receptores abiertos y cerrados se mantiene relativamente “constante” en las neuronas registradas, se obtuvo una EC_{50} para el grupo sham de 34.23 ± 12.75 pA/pF y una pendiente de 1.23 ± 0.2 , en el caso del grupo ACV la EC_{50} fue 22.68 ± 8.61 pA/pF y una pendiente de 0.98 ± 0.13 . El análisis

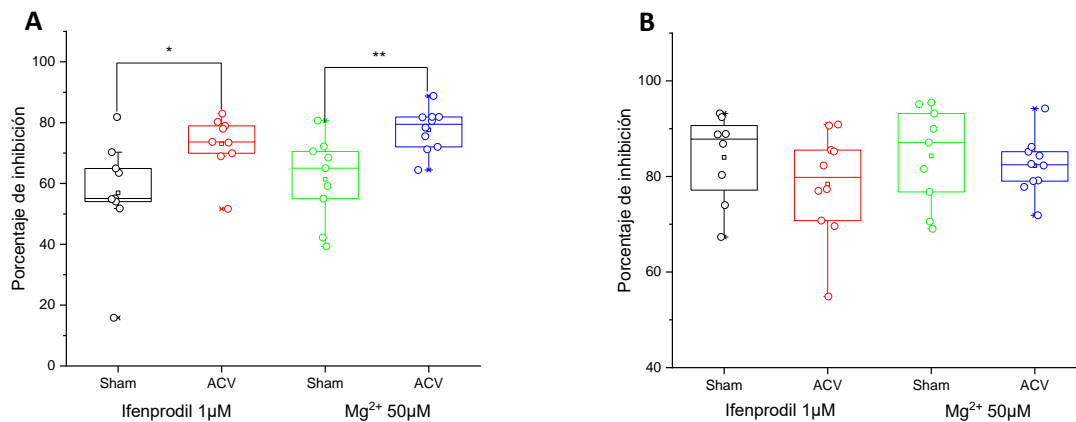


Figura 13. Efecto de 1 μM de ifenprodil y de 50 μM de Mg^{2+} sobre I_{NMDA} en el grupo sham y en el grupo ACV a) Efecto de ifenprodil sobre el pico de I_{NMDA} , $t=2.38$, $p=0.03$, efecto de Mg^{2+} sobre el pico de I_{NMDA} , $t=-3.28$, $p=0.0004$ b) Efecto de ifenprodil sobre el ss de I_{NMDA} , $t=1.13$, $p=0.027$ y efecto de Mg^{2+} sobre el SS de I_{NMDA} , $t=-0.53$, $p=0.06$

estadístico ANOVA de dos vías refleja que no hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos $F = 1.406$, $p > .05$. Sugiriendo que el efecto del tratamiento se aplica exclusivamente en el pico de I_{NMDA} , no así en el SS.

Dado la reducción de la sensibilidad a NMDA en la condición de isquemia se llevó a cabo una serie de experimentos, no incluidos en los objetivos, para evaluar la participación de las subunidades del NMDA-R, que la literatura reporta se puede afectar después de un proceso isquémico. Esto con el objetivo de explicar los resultados previos y demostrar que el efecto observado en la condición isquémica es por alteraciones en las subunidades de NMDA-R. Similar a lo reportado por Xie et al., 2022 mediante estudio *in vitro*.

Se evaluó la participación de GluN2B mediante su bloqueo con ifenprodil $1\mu\text{M}$, además, con el objetivo de comparar los efectos analizados con el ifenprodil también se registró el efecto de Mg^{2+} $50\mu\text{M}$ un bloqueador del poro de NMDA-R. En la evaluación del pico de la corriente iónica con ifenprodil $1\mu\text{M}$ se obtuvo un porcentaje medio de reducción de la corriente de $56.89 \pm 18.15\%$ para el grupo sham, mientras que el porcentaje de reducción de la corriente para el grupo de ratas isquémicas fue de $73.08 \pm 9.32\%$, tras el análisis estadístico mediante el test *t-Student* para muestras independientes se obtuvo $t = 2.38$, $p = 0.03^*$. De manera similar se procedió al análisis del estado estacionario en los mismos registros electrofisiológicos con una media de $83.97 \pm 9.27\%$ para el grupo sham y $78.41 \pm 11.11\%$ para el grupo de isquemia, sin

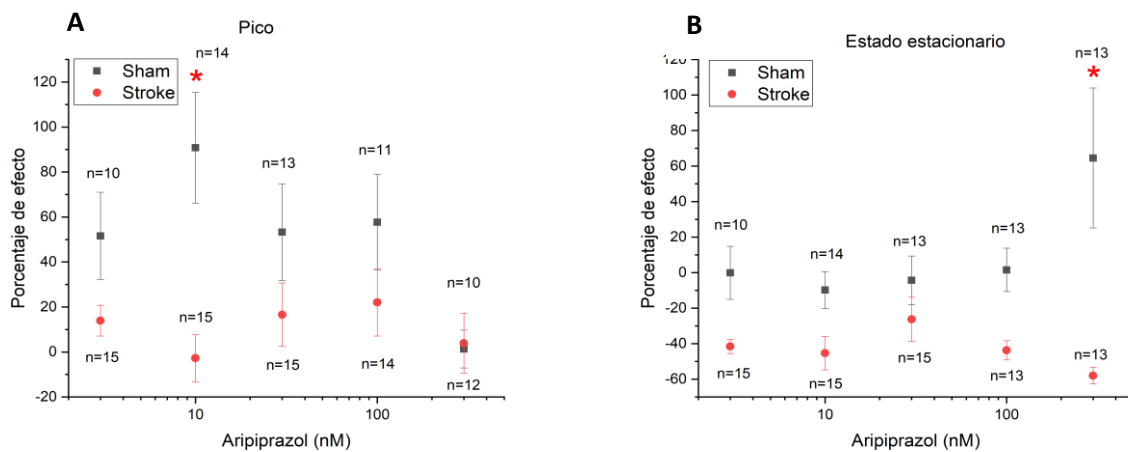


Figura 14. Curvas dosis-respuesta de la corriente iónica modulada por aripiprazol desde 3nM hasta 300nM a) Pico de I_{NMDA} para el grupo sham y el grupo ACV, $F=11.025$, $p=0.001$, el test post hoc Tukey demuestra $p<0.05$ en la concentración de $300\mu\text{M}$. b) Estado estacionario de I_{NMDA} , $F=1.406$, $p>0.05$.

embargo, el test *t-Student* para muestras independientes no demuestra diferencias estadísticamente significativas $t = 1.13$, $p = 0.27$. Por otro lado, se procedió a la evaluación del efecto de Mg^{2+} $50\mu M$ sobre el pico de la corriente iónica de NMDA, obteniendo un porcentaje de reducción medio de $61.39 \pm 13.85\%$ para el grupo sham, mientras que el grupo de ratas isquémicas tiene una media de $77.64 \pm 6.97\%$, tras el análisis estadístico con la prueba *t-student* para muestras independientes se obtuvo $t = -3.28$, $p = 0.004^{***}$. No obstante, en el análisis del estado estacionario la media fue de $84.3 \pm 10.28\%$ para el grupo sham y $82.27 \pm 5.96\%$ para el grupo de ratas isquémicas, sin cambios estadísticamente significativos al realizar la prueba *t-Student* $t = -0.53$, $p = 0.60$.

En relación a la problemática expuesta en los antecedentes, dado el efecto del ACV y los cambios generados sobre la corriente iónica de NMDA, se procedió a la evaluación del efecto del aripiprazol debido a que puede ser un modulador de I_{NMDA} mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G_i y con el objetivo de revertir los efectos evocados por la isquemia, se realizó una curva dosis respuesta desde 3 nM hasta 300 nM, de aripiprazol en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo abstrayendo los datos de pico, estado estacionario y tau. Los datos del pico se compararon mediante una prueba de varianza ANOVA obteniendo $F = 14.71$, $p < 0.01$, el test *post-hoc* Tukey evidenció una diferencia entre grupos en la concentración de 10 nM de aripiprazol al evaluar el pico, lo que sugiere una reducción significativa del efecto de aripiprazol en el grupo ACV (-2.73%), no obstante, el grupo sham denota una potenciación del 90.82%. Por otro lado, el estudio del estado estacionario evidenció diferencias significativas entre grupos tras realizar una prueba ANOVA ($F = 29.45$, $p < 0.01$) y un análisis Tukey *post-hoc* que demuestra diferencias entre grupos en la concentración de 300nM, dado que en el grupo sham el porcentaje de efecto fue 64.57%, contrario a lo denotado por el grupo ACV con un porcentaje de efecto de -58.03%. Consecuentemente se valuó el efecto sobre la constante de desensibilización tau y no se encontraron diferencias significativas luego de realizar una prueba estadística ANOVA de dos vías $p > 0.05$

Discusión

Dada la importancia del receptor NMDA-R tanto en el sistema glutamatérgico como en la fisiopatología de los accidentes cerebrovasculares, en este estudio se evaluó la participación del receptor en la fisiopatología de la isquemia en el modelo de oclusión 4-VO demostrando una disminución en la conductancia de NMDA-R en el grupo isquémico concordante con lo reportado por Xie et al., 2022 en donde demostraron una reducción del pico y del estado estacionario bajo condiciones de estrés isquémico en cultivo de neuronas corticales de ratas de 1 día posnatal. Además, evidenciaron que la reducción en la conductancia de NMDA-R en condiciones de bajo oxígeno y glucosa es debido a una disminución en la expresión en membrana de la subunidad GluN2B, debido a esto evaluamos el efecto de ifenprodil $1\mu\text{M}$ un bloqueador de la subunidad GluN2B y Mg^{2+} $50\mu\text{M}$ un bloqueador del poro de NMDA-R. En estos experimentos demostramos un aumento del efecto de ifenprodil en el pico de la corriente iónica de NMDA $100\mu\text{M}$ en el grupo de ratas isquémicas, además evidenciamos un aumento del efecto de Mg^{2+} también en el pico del grupo de ratas isquémicas, no obstante, en el estado estacionario no se encontraron diferencias significativas entre grupos. Estos resultados en conjunto denotan una disminución de la conductancia de NMDA-R evaluado en la curva dosis respuesta y un aumento en el bloqueo por ifenprodil, sugiriendo mayor participación de la subunidad GluN2B de las corrientes iónicas evaluadas, contrario a lo reportado por Xie et al., 2022. Lo cual se puede deber a cambios en el ratio de las subunidades GluN2B/GluN2A, mismas que son los subtipos predominantemente expresados en CA1 de hipocampo de ratas adultas (Gray et al., 2011), además, la expresión de las distintas subunidades de NMDA-R cambia con la edad posnatal, aumentando la expresión de GluN2B en etapas tempranas del desarrollo, en cambio la subunidad GluN2A se expresa en mayor medida durante la adultez, por lo que los resultados obtenidos en este proyecto pueden ser el reflejo de la expresión diferencial de las subunidades de NMDA-R de acuerdo a la edad posnatal evaluada (Corbel et al., 2015).

Por su parte Chen et al., 1999 reporta que el pico de la corriente iónica mediada por las subunidades GluN1/GluN2A es cuatro veces mayor que el pico de la corriente

iónica mediada por GluN1/GluN2B debido a que la probabilidad de apertura es de dos a cinco veces mayor. En conjunto, las corrientes iónicas de menor amplitud de NMDA-R evaluado en la curva dosis respuesta y el aumento de la sensibilidad a ifenprodil sugieren una posible reducción de la expresión de GluN2A en la condición isquémica en las neuronas piramidales de CA1 y un aumento en la expresión de GluN2B, cambiando el fenotipo neuronal maduro que expresa predominantemente GluN2A a un fenotipo inmaduro que expresa predominantemente GluN2B (Acutain et al., 2021).

En paralelo, se evaluó si los efectos evidenciados fueron debido al resultado de la muerte neuronal propia de la cirugía isquémica, no obstante, no se encontraron diferencias en la cuantificación del número de neuronas en el subcampo CA1 de hipocampo entre grupos a diferencia de lo reportado por Ordy et al., 1993, donde evidencian reducción del número de células viables a partir del tercer día postquirúrgico en ratas SD, probablemente las diferencias radiquen en la variante metodológica quirúrgica realizada en el presente proyecto de investigación, dado que la cirugía se llevó a cabo en el mismo día a diferencia del proceso quirúrgico expuesto en la bibliografía, donde se involucran 2 fases. Además, la tinción se realizó mediante la técnica de hematoxilina y eosina a diferencia de la tinción de Nissl que se utilizó en este proyecto, por último, no se discrimino entre células viables y no viables durante la cuantificación en este trabajo de investigación.

Por otro lado, hasta el momento actual no existen reportes de la interacción de aripiprazol sobre la corriente iónica de NMDA-R, sin embargo, se ha demostrado su efecto neuroprotector aumentando los niveles intracelulares del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), de la proteína glucógeno sintetasa cinasa 3 beta (GSK-3 β) y de la proteína de linfoma de células B2 (Bcl-2; Park et al., 2009). Además, inhibe la neurotoxicidad inducida por glutamato en un 40% en cultivos de neuronas corticales embrionarias de ratas (Koprivica et al., 2011). Así mismo se ha reportado que el aripiprazol mejora la coordinación y el balance en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratones, tiene un efecto neuroprotector evaluado en las neuronas dopaminérgicas del estriado y disminuye la activación microglial (Gil et al., 2017). Paralelamente, aripiprazol evoca la activación de receptores acoplados a proteínas G

tales como 5-HT_{1A} y la familia de D₂ de dopamina (predominantemente D₄ en las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo; Kotecha *et al.*, 2002), ambos receptores acoplados a proteína G_i. La evidencia indica que reduciría la corriente iónica de NMDA-R dado un bloqueo de la activación de la proteína cinasa A (Raman *et al.*, 1996; Tingley *et al.*, 1997), no obstante en el presente proyecto de investigación demostramos que en la condición sham, aumento el pico de la corriente iónica y solo provocho aumento en el estado estacionario en la mayor concentración evaluada, por el contrario en la condición isquémica no provocho cambios en el pico de la corriente y en el estado estacionario disminuyo la corriente.

En el trabajo de investigación de Segnitz *et al.*, 2011 se demostró que la administración crónica de aripiprazol durante 4 semanas y 4 meses aumenta la expresión relativa del ratio GluN2A/GluN2B en neuronas del hipocampo dorsal dentro del subcampo de CA1, es decir, aripiprazol promueve la expresión de la subunidad GluN2A. De manera que una posible explicación en el aumento de la corriente iónica observada en el grupo sham puede ser por mayor disponibilidad de NMDA-R, mismo que puede estar regulado a través de la activación de los receptores D₂, ya que conducen a la modulación de la vía Akt-GSK3 β (glicógeno sintetasa cinasa -3 β ; Pan y Deng, 2019). Pan y Deng, 2019 demostraron que ratio de Akt fosforilada (pAkt) y GSK3 β fosforilada (pGSK3 β) incrementan en el área ventral tegmental y en la sustancia negra tras la administración de aripiprazol durante 7 y 10 días, por lo que sugieren un aumento de su actividad. Además, Barr y Unterwald, 2020 sugieren que la activación de los receptores D₂ promueve al acople de PP2A y β -arrestina2 junto con Akt, disminuyendo su actividad basal, lo que permite a GSK3 β encontrarse en su forma activa. Dentro de las funciones de GSK3 β se encuentra la modulación de la localización y de la función de NMDA, especialmente los receptores conformados por las subunidades GluN1 y GluN2B (Barr y Unterwald, 2020).

Por otro lado, se ha propuesto que la inhibición tanto de mTOR como de GSK3 β previene el daño neuronal inducido por la sobreactivación de NMDA-R (Swiatkowski *et al.*, 2017). En sumatoria, el aripiprazol tras la activación de D₂-R promueve la disminución de la actividad de Akt, permitiendo la activación de GSK3 β y este a su vez

es capaz de externalizar a NMDA-R, lo que podría explicar el aumento de la corriente iónica del receptor en los experimentos electrofisiológicos realizados. No obstante, aripiprazol no ejerce efectos de potenciación ante una lesión isquémica, es este trabajo demostramos que su efecto es nulo en el pico de la corriente iónica o incluso inhibe la corriente en el estado estacionario. Efecto que puede ser activado por el aripiprazol a través de los receptores 5-HT1A, dado que su activación promueve el acople de PI3K/Akt, fosforilando a su vez a GSK3 β inhibiendo de esta manera su actividad. A consecuencia, aripiprazol puede estar activando preferentemente a los receptores D2 en la condición sham y estos a su vez mediante la actividad de GSK3 β , aumentan la disponibilidad de NMDA-R, aumentando la conductancia de la corriente iónica por un mayor número de receptores en la membrana. A diferencia de la condición de ACV donde se puede estar activando preferentemente 5-HT1A mismo que acopla PI3K/Akt inhibiendo la actividad de GSK3 β disminuyendo la conductancia en el estado estacionario.

En la investigación de Tarazi et al., 1998 se demuestra que tras una lesión con ácido kainico en hipocampo de forma unilateral, provoca la disminución de la expresión en membrana de los receptores de dopamina D1 (75%), D2 (77%) y D4(79%). Lo que explicaría la baja activación de los receptores D4 por parte del aripiprazol en la condición isquémica, mientras que el receptor 5-HT1A ha sido considerado como un receptor “diana” ante los accidentes cerebrovasculares capaz de reducir el área de infarto en un modelo de oclusión de arteria cerebral media y aumentar marcadores moleculares como BDNF importantes para activar mecanismos de neuroplasticidad (Mauler y Horváth, 2005; Aguiar et al., 2020).

Conclusiones

1. En el modelo de oclusión de 4 vasos sanguíneos se redujo significativamente el efecto máximo de la corriente en la curva dosis respuesta a NMDA.
2. Aripiprazol potencia la corriente iónica de NMDA-R en la condición *sham*, mientras que en la condición isquémica disminuye la corriente iónica en el estado estacionario.
3. En la condición de ACV aumenta la sensibilidad a 1 μ M de ifenprodil y 50 μ M a Mg²⁺.
4. No se encontraron diferencias en el número de neuronas piramidales en el estrato piramidal del subcampo CA1 de hipocampo.

Bibliografía.

Acutain, M. F., Luft, J. G., Vazquez, C. A., Popik, B., Cercato, M. C., Epstein, A., Salvetti, A., Jerusalinsky, D. A., Alvares, L. O., Baez, M. V. (2021). Reduced expression of hippocampal glun2a-NMDAR increases seizure susceptibility and causes deficits in contextual memory. *Frontiers in Neuroscience*, 15. doi:10.3389/fnins.2021.644100.

Aguiar, R. P., Soares, L. M., Meyer, E., da Silveira, F. C., Milani, H., Newman-Tancredi, A., Varney, M., Prickaerts, J., & Oliveira, R. M. W. (2020). Activation of 5-HT1A postsynaptic receptors by NLX-101 results in functional recovery and an increase in neuroplasticity in mice with brain ischemia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 99, 109832. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109832>

Ahmed, O., y Mehta, M. (2009). The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends In Neurosciences*, 32(6), 329-338. doi: 10.1016/j.tins.2009.01.009

Alshuaib, W. B., Hasan, S. M., Cherian, S. P., Mathew, M. V., Hasan, M. Y., & Fahim, M. A. (2001). Reduced potassium currents in old rat CA1 hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 63(2), 176–184. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20010115\)63:2<176::aid-jnr1009>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20010115)63:2<176::aid-jnr1009>3.0.co;2-h)

Altemus, K. L., Lavenex, P., Ishizuka, N., & Amaral, D. G. (2005). Morphological characteristics and electrophysiological properties of CA1 pyramidal neurons in macaque monkeys. *Neuroscience*, 136(3), 741–756. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.001>

Aly, M., y Ranganath, C. (2018). New perspectives on the hippocampus and memory. *Neuroscience Letters*, 680, 1-3. doi: 10.1016/j.neulet.2018.05.047

Amaral, D., y Witter, M. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591. doi: 10.1016/0306-4522(89)90424-7

Baker, L. P., Nielsen, M. D., Impey, S., Metcalf, M. A., Poser, S. W., Chan, G., Obrietan, K., Hamblin, M. W., & Storm, D. R. (1998). Stimulation of type 1 and type 8 ca²⁺/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the GS-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-ht₇areceptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17469–17476. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.28.17469>

Baraban, S. C., & Schwartzkroin, P. A. (1995). Electrophysiology of CA1 pyramidal neurons in an animal model of neuronal migration disorders: Prenatal methylazoxymethanol treatment. *Epilepsy Research*, 22(2), 145–156. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(95\)00045-3](https://doi.org/10.1016/0920-1211(95)00045-3)

Barr, J. L., & Unterwald, E. M. (2020). Glycogen synthase kinase-3 signaling in cellular and behavioral responses to psychostimulant drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(9), 118746. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118746>

Beer, Z., Vavra, P., Atucha, E., Rentzing, K., Heinze, H., y Sauvage, M. (2018). The memory for time and space differentially engages the proximal and distal parts of the hippocampal subfields CA1 and CA3. *PLOS Biology*, 16(8), e2006100. doi: 10.1371/journal.pbio.2006100

Benavides-Piccione, R., Regalado-Reyes, M., Fernaud-Espinosa, I., Kastanauskaite, A., Tapia-González, S., León-Espinosa, G., Rojo, C., Insausti, R., Segev, I., y DeFelipe, J. (2019). Differential Structure of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in the Human and Mouse. *Cerebral Cortex*. doi: 10.1093/cercor/bhz122

Berger, M., Gray, J.A. and Roth, B.L. (2009) "The expanded biology of Serotonin," *Annual Review of Medicine*, 60(1), pp. 355–366. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>.

Berumen, L. C., Rodríguez, A., Miledi, R., & García-Alcocer, G. (2012). Serotonin receptors in Hippocampus. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1100/2012/823493>

Brust, T. F., Hayes, M. P., Roman, D. L., & Watts, V. J. (2015). New functional activity of aripiprazole revealed: Robust antagonism of D2 dopamine receptor-stimulated $g\beta\gamma$ signaling. *Biochemical Pharmacology*, 93(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.10.014>

Cai, X., Gu, Z., Zhong, P., Ren, Y., y Yan, Z. (2002). Serotonin 5-HT_{1A}Receptors Regulate AMPA Receptor Channels through Inhibiting Ca²⁺/Calmodulin- dependent Kinase II in Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(39), 36553-36562. doi: 10.1074/jbc.m203752200.

Cai, X., Wei, D., Gallagher, S., Bagal, A., Mei, Y., Kao, J., Thompson, S. y Tang, C. (2007). Hyperexcitability of Distal Dendrites in Hippocampal Pyramidal Cells after Chronic Partial Deafferentation. *Journal of Neuroscience*, 27(1), pp.59-68.

Carli, M., Calcagno, E., Mainolfi, P., Mainini, E., & Invernizzi, R. W. (2010). Effects of aripiprazole, olanzapine, and haloperidol in a model of cognitive deficit of schizophrenia in rats: Relationship with glutamate release in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 214(3), 639–652. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2065-7>

Castillo Díaz, F., Caffino, L., & Fumagalli, F. (2021). Bidirectional role of dopamine in learning and memory-active forgetting. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 131, 953–963. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.011>

Cepeda, C. and Levine, M.S. (1998) “Dopamine and N-methyl-D- aspartate receptor interactions in the Neostriatum,” *Developmental Neuroscience*, 20(1), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1159/000017294>.

Chen, N., Luo, T., & Raymond, L. A. (1999). Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *The Journal of Neuroscience*, 19(16), 6844–6854. doi:10.1523/jneurosci.19-16-06844.1999

Cho, J. H., Won, M.-H., Lee, T.-K., Kim, H., Song, M., Lee, J.-C., Park, J. H., Ahn, J. H., Yang, G. E., Kim, H., Ohk, T. G., & Shin, M. C. (2019). Time-course pattern of neuronal loss and gliosis in gerbil hippocampi following mild, severe, or lethal transient global cerebral ischemia. *Neural Regeneration Research*, 14(8), 1394. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.253524>

Cosi, C., Waget, A., Rollet, K., Tesori, V., & Newman-Tancredi, A. (2005). Clozapine, ziprasidone and Aripiprazole but not haloperidol protect against kainic acid-induced lesion of the striatum in mice, in vivo: Role of 5-HT1A receptor activation. *Brain Research*, 1043(1–2), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.02.072>

Corbel, C., Hernandez, I., Wu, Bian., Kosik, k. S. (2015). Developmental attenuation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression by micrnas. *Neural Development*, 10(1). doi:10.1186/s13064-015-0047-5.

Coulter, D., Yue, C., Ang, C., Weissinger, F., Goldberg, E., Hsu, F., Carlson, G., y Takano, H. (2011). Hippocampal microcircuit dynamics probed using optical imaging approaches. *The Journal Of Physiology*, 589(8), 1893-1903. doi: 10.1113/jphysiol.2010.202184

Dale, E., Pehrson, A. L., Jeyarajah, T., Li, Y., Leiser, S. C., Smagin, G., Olsen, C. K., & Sanchez, C. (2015). Effects of serotonin in the hippocampus: How ssris and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS Spectrums*, 21(2), 143–161. <https://doi.org/10.1017/s1092852915000425>

Diehm, S.M., Witte, O.W. and Bruehl, C. (2003) “Differential alterations of the inactivation properties of high voltage activated calcium currents in area CA1 and Ca3 of the rat following photothrombotic lesion,” *Neuroscience Letters*, 341(2), pp. 147–150. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(03\)00192-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(03)00192-7).

Dinocourt, C., Aungst, S., Yang, K., y Thompson, S. (2011). Homeostatic increase in excitability in area CA1 after Schaffer collateral transection in vivo. *Epilepsia*, 52(9), 1656-1665. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03113.x

Dong, H.-W., Swanson, L. W., Chen, L., Fanselow, M. S., & Toga, A. W. (2009). Genomic–anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(28), 11794–11799.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0812608106>

Etievant, A. (2010). Partial dopamine D2/serotonin 5-HT1A receptor agonists as new therapeutic agents. *The Open Neuropsychopharmacology Journal*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.2174/1876523801003010001>

Fanselow, M. S., & Dong, H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>

Feigin, V. L., Brainin, M., Norrving, B., Martins, S., Sacco, R. L., Hacke, W., Fisher, M., Pandian, J., & Lindsay, P. (2022). World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *International Journal of Stroke*, 17(1), 18–29. <https://doi.org/10.1177/17474930211065917>

Feske, S. K. (2021). Ischemic stroke. *The American Journal of Medicine*, 134(12), 1457–1464. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2021.07.027>

Flores-Hernandez, J., Hernandez, S., Snyder, G., Yan, Z., Fienberg, A., Moss, S., Greengard, P., y Surmeier, D. (2000). D1 Dopamine Receptor Activation Reduces GABAA Receptor Currents in Neostriatal Neurons Through a PKA/DARPP-32/PP1 Signaling Cascade. *Journal Of Neurophysiology*, 83(5), 2996-3004. doi: 10.1152/jn.2000.83.5.2996

Flores-Hernandez, J., Salgado, H., de La Rosa, V., Avila-Ruiz, T., Torres-Ramirez, O., Lopez-Lopez, G., & Atzori, M. (2009). Cholinergic direct inhibition of N-methyl- <scp>D</scp> aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. *Synapse*, 63(4), 308–318. <https://doi.org/10.1002/syn.20609>

Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., & Brown, G. C. (2018). Neuronal Cell Death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813–880. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>

Furlow, T. W. (1982). Cerebral ischemia produced by four-vessel occlusion in the rat: A quantitative evaluation of cerebral blood flow. *Stroke*, 13(6), 852–855. <https://doi.org/10.1161/01.str.13.6.852>

Giap, B., Jong, C., Ricker, J., Cullen, N., y Zafonte, R. (2000). The Hippocampus: Anatomy, Pathophysiology, and Regenerative Capacity. *Journal Of Head Trauma Rehabilitation*, 15(3), 875-894. doi: 10.1097/00001199-200006000-00003

Gil, C., Kim, Y., Lee, H., Jung, D., Shin, H., & Choi, B. (2017). Aripiprazole exerts a neuroprotective effect in mouse focal cerebral ischemia. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5443>

Gray, J.A., Shi, Y., Usui, H., During, M.J., Sakimura, K., Nicoll, R.A. (2011). Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by glun2a and Glun2b: Single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron*, 71(6), pp. 1085–1101. doi:10.1016/j.neuron.2011.08.007.

Greger, I. H., y Mayer, M. L. (2019). Structural biology of glutamate receptor ion channels: towards an understanding of mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 57, 185–195. doi:10.1016/j.sbi.2019.05.004

Hauser, J., Llano López, L. H., Feldon, J., Gargiulo, P. A., & Yee, B. K. (2020). Small lesions of the dorsal or ventral hippocampus subregions are associated with distinct impairments in working memory and reference memory retrieval, and combining them attenuates the acquisition rate of Spatial Reference Memory. *Hippocampus*, 30(9), 938–957. <https://doi.org/10.1002/hipo.23207>

Hermann, D. M., Popa-Wagner, A., Kleinschnitz, C., & Doepfner, T. R. (2019). Animal models of ischemic stroke and their impact on Drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(3), 315–326. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1573984>

Hernández-Carballo, G., Ruíz-Luna, E., López-López, G., Manjarrez, E., y Flores-Hernández, J. (2020). Changes in Serotonin Modulation of Glutamate Currents in Pyramidal Offspring Cells of Rats Treated With 5-MT during Gestation. *Brain Sciences*, 10(4), 221. doi: 10.3390/brainsci10040221

Hongo, Y., Ogawa, K., Takahara, Y., Takasu, K., Royer, S., Hasegawa, M., Sakaguchi, G., y Ikegaya, Y. (2015). Topological organization of CA3-to-CA1 excitation. *European Journal Of Neuroscience*, 42(5), 2135-2143. doi: 10.1111/ejn.12969

Hynd, M., Scott, H., y Dodd, P. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer’s disease. *Neurochemistry International*, 45(5), 583-595. doi: 10.1016/j.neuint.2004.03.007

Igarashi, K. M., Ito, H. T., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2014). Functional diversity along the transverse axis of hippocampal area CA1. *FEBS Letters*, 588(15), 2470–2476. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.004>

Islas, Á. A., Scior, T., Torres-Ramirez, O., Salinas-Stefanon, E. M., Lopez-Lopez, G., & Flores-Hernandez, J. (2022). Computational Molecular Characterization of the Interaction of Acetylcholine and the NMDA Receptor to Explain the Direct Glycine-Competitive Potentiation of NMDA-Mediated Neuronal Currents. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(2), 229–244. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.1c00639>

Jellish, W.S. *et al.* (2005) “The effect of clonidine on cell survival, glutamate, and aspartate release in NORMO- and hyperglycemic rats after near complete forebrain

ischemia,” *Experimental Brain Research*, 167(4), pp. 526–534. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00221-005-0064-4>.

Kandel, E., Koester, J., Mack, S., & Siegelbaum, S. (2021). *PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE* (Sixth).

Kesner, R. P., Lee, I., & Gilbert, P. (2004). A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Reviews in the Neurosciences*, 15(5), 333–351. <https://doi.org/10.1515/revneuro.2004.15.5.333>

Kim, Y. R., Kim, H. N., Pak, M. E., Ahn, S. M., Hong, K. H., Shin, H. K., & Choi, B. T. (2015). Studies on the animal model of post-stroke depression and application of antipsychotic aripiprazole. *Behavioural Brain Research*, 287, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.062>

Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2018). Dopamine: Functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(1), 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>

Knierim, J.J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>.

Koh, S.-H., & Park, H.-H. (2016). Neurogenesis in stroke recovery. *Translational Stroke Research*, 8(1), 3–13. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0460-z>

Koprivica, V., REGARDIE, K., Wolff, C., FERNALD, R., Murphy, J.J., Kambayashi, J., Kikuchi, T., Jordan, S. (2011). Aripiprazole protects cortical neurons from glutamate toxicity, *European Journal of Pharmacology*, 651(1–3), pp. 73–76. doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.064.

Köhr, G. (2006). NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 439–446. doi:10.1007/s00441-006-0273-6

Kotecha, S. A., Oak, J. N., Jackson, M. F., Perez, Y., Orser, B. A., Van Tol, H. H. M., & MacDonald, J. F. (2002). A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission. *Neuron*, 35(6), 1111–1122. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00859-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00859-0)

Leão, R., Mikulovic, S., Leão, K., Munguba, H., Gezelius, H., Enjin, A., Patra, K., Eriksson, A., Loew, L., Tort, A., y Kullander, K. (2012). OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. *Nature Neuroscience*, 15(11), 1524–1530. doi: 10.1038/nn.3235

Li, Y., & Zhang, J. (2021). Animal models of stroke. *Animal Models and Experimental Medicine*, 4(3), 204–219. <https://doi.org/10.1002/ame2.12179>

Li, Z., Ichikawa, J., Dai, J., & Meltzer, H. Y. (2004). Aripiprazole, a novel antipsychotic drug, preferentially increases dopamine release in the prefrontal cortex and hippocampus in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 493(1–3), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.04.028>

Liang, X., Hsu, L., Lu, H., Ash, J., Rapp, P., y Yang, Y. (2020). Functional Connectivity of Hippocampal CA3 Predicts Neurocognitive Aging via CA1–Frontal Circuit. *Cerebral Cortex*, 30(8), 4297-4305. doi: 10.1093/cercor/bhaa008

López-Valdés, H. E., Martínez-Coria, H., Arrieta-Cruz, I., & Cruz, M.-E. (2021). Physiopathology of ischemic stroke and its modulation using memantine: Evidence from preclinical stroke. *Neural Regeneration Research*, 16(3), 433. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.293129>

Lu, D., Wu, Y., Qu, Y., Shi, F., Hu, J., Gao, B., Wang, B., Gao, G., He, S., & Zhao, T. (2016). A modified method to reduce variable outcomes in a rat model of four-vessel arterial occlusion. *Neurological Research*, 38(12), 1102–1110. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1249996>

Lussier, M., Sanz-Clemente, A., y Roche, K. (2015). Dynamic Regulation of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) and α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Posttranslational Modifications. *Journal Of Biological Chemistry*, 290(48), 28596-28603. doi: 10.1074/jbc.r115.652750

Maglóczy, Z. and Freund, T.F. (1995) "Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield," *Neuroscience*, 66(4), pp. 847–860. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00613-a](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00613-a).

Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., y Gris, D. (2019). Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*, 8(2), 184. doi: 10.3390/cells8020184

Markstein, R., Matsumoto, M., Kohler, C., Togashi, H., Yoshioka, M., & Hoyer, D. (1999). Pharmacological characterisation of 5-HT receptors positively coupled to adenylyl cyclase in the rat hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 359(6), 454–459. <https://doi.org/10.1007/pl00005375>

Martin, S.J., Shires, K.L. and da Silva, B.M. (2019) "Hippocampal lateralization and synaptic plasticity in the intact rat: No left–right asymmetry in electrically induced CA3-CA1 long-term potentiation," *Neuroscience*, 397, pp. 147–158. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.044>.

Mayer, M. (2017). The Challenge of Interpreting Glutamate-Receptor Ion-Channel Structures. *Biophysical Journal*, 113(10), 2143-2151. doi: 10.1016/j.bpj.2017.07.028

Mauler, F., & Horváth, E. (2005). Neuroprotective Efficacy of Repinotan HCl, a 5-HT_{1A} Receptor Agonist, in Animal Models of Stroke and Traumatic Brain Injury.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 25(4), 451–459. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600038>

McCorvy, J. D., & Roth, B. L. (2015). Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 150, 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.009>

Miller, T., Chong, T., Aimola Davies, A., Johnson, M., Irani, S., Husain, M., WC, T., Jacob, S., Maddison, P., Kennard, C., Gowland, P., y Rosenthal, C. (2020). Human hippocampal CA3 damage disrupts both recent and remote episodic memories. *Elife*, 9. doi: 10.7554/elife.41836

Moretto, E., Murru, L., Martano, G., Sassone, J., y Passafaro, M. (2018). Glutamatergic synapses in neurodevelopmental disorders. *Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry*, 84, 328-342. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.09.014

Moser, M., Rowland, D., y Moser, E. (2015). Place Cells, Grid Cells, and Memory. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 7(2), a021808. doi: 10.1101/cshperspect.a021808

Moser, M.-B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608–619. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1063\(1998\)8:6<608::aid-hipo3>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1063(1998)8:6<608::aid-hipo3>3.0.co;2-7)

Münster-Wandowski, A., Gómez-Lira, G., y Gutiérrez, R. (2013). Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00210

O'Neill, M. J., Hicks, C. A., Ward, M. A., Cardwell, G. P., Reymann, J.-M., Allain, H., & Bentué-Ferrer, D. (1998). Dopamine D2 receptor agonists protect against ischaemia-induced hippocampal neurodegeneration in global cerebral ischaemia. *European Journal of Pharmacology*, 352(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00333-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00333-1)

Obi, K., Amano, I., & Takatsuru, Y. (2018). Role of dopamine on functional recovery in the contralateral hemisphere after focal stroke in the somatosensory cortex. *Brain Research*, 1678, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.10.022>

Okada, S., Igata, H., Sasaki, T., y Ikegaya, Y. (2017). Spatial Representation of Hippocampal Place Cells in a T-Maze with an Aversive Stimulation. *Frontiers In Neural Circuits*, 11. doi: 10.3389/fncir.2017.00101

Ólafsdóttir, H., Bush, D., y Barry, C. (2018). The Role of Hippocampal Replay in Memory and Planning. *Current Biology*, 28(1), R37-R50. doi: 10.1016/j.cub.2017.10.073

Ordy, J. M., Wengenack, T. M., Bialobok, P., Coleman, P. D., Rodier, P., Baggs, R. B., Dunlap, W. P., & Kates, B. (1993). Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. *Experimental Neurology*, 119(1), 128–139. <https://doi.org/10.1006/exnr.1993.1014>

Park, S.W., Lee, J.G., Ha, E.K., Choi, S.M., Cho, H.Y., Seo, M.K., Kim, Y.H. (2009). Differential effects of Aripiprazole and haloperidol on BDNF-mediated signal changes in SH-SY5Y cells, *European Neuropsychopharmacology*, 19(5), pp. 356–362. doi:10.1016/j.euroneuro.2008.12.012.

Palacios-Filardo, J. and Mellor, J.R. (2019) “Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity,” *Current Opinion in Neurobiology*, 54, pp. 37–43. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.009>.

Pan, B., & Deng, C. (2019). Modulation by chronic antipsychotic administration of PKA- and GSK3 β -mediated pathways and the NMDA receptor in rat ventral midbrain. *Psychopharmacology*. doi:10.1007/s00213-019-05243-x

Patterson, T. (1996). Attenuation of trimethyltin-evoked glutamate (GLU) efflux from rat cortical and hippocampal slices. *Neurotoxicology and Teratology*, 18(6), 697–702. doi:10.1016/s0892-0362(96)00132-8

Pluta, R., & Pluta, R. (2021). *Cerebral ischemia*. Exon Publications.

Pohorecki, R. and Domino, E.F. (1987) “Synaptic pharmacology of the hippocampus,” *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 6(3), pp. 189–211. Available at: <https://doi.org/10.1515/jbcpp.1987.6.3.189>.

Portera-Cailliau, C., Price, D., y Martin, L. (1997). Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: Further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *The Journal Of Comparative Neurology*, 378(1), 88-104. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19970203)378:1<88::aid-cne5>3.0.co;2-g

Pourhamzeh, M. *et al.* (2021) “The roles of serotonin in neuropsychiatric disorders,” *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(6), pp. 1671–1692. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01064-9>.

Qin, C., Yang, S., Chu, Y.-H., Zhang, H., Pang, X.-W., Chen, L., Zhou, L.-Q., Chen, M., Tian, D.-S., & Wang, W. (2022). Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01064-1>

Raman, I. M., Tong, G., & Jahr, C. E. (1996). B-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by camp-dependent protein kinase. *Neuron*, 16(2), 415–421. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80059-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80059-8)

Rodriguez, R., Santiago-Mejia, J., Gomez, C., & San-Juan, E. R. (2005). A simplified procedure for the quantitative measurement of neurological deficits after forebrain ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 147(1), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.02.013>

Sakaguchi, Y., & Sakurai, Y. (2021). Disconnection between rat's left and right hemisphere impairs short-term memory but not long-term memory. *Symmetry*, 13(10), 1872. <https://doi.org/10.3390/sym13101872>

Salazar-Colocho, P., Del Río, J., & Frechilla, D. (2008). Neuroprotective effects of serotonin 5-HT_{1A} receptor activation against ischemic cell damage in gerbil hippocampus: Involvement of NMDA receptor NR1 subunit and BDNF. *Brain Research*, 1199, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.032>

Salińska, E., Danysz, W., y Łazarewicz, J. (2005). The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathologica*, 43(4), 322-339

Segnitz, N., Ferbert, T., Schmitt, A., Gass, P., Gebicke-Haerter, P. J., & Zink, M. (2011). Effects of chronic oral treatment with aripiprazole on the expression of NMDA receptor subunits and binding sites in rat brain. *Psychopharmacology*, 217(1), 127–142. doi:10.1007/s00213-011-2262-z

Schmitz, D., Gloveli, T., Empson, R. M., & Heinemann, U. (1998). Comparison of the effects of serotonin in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Molecular Neurobiology*, 17(1-3), 59–72. <https://doi.org/10.1007/bf02802024>

Schultz, C., y Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the Hippocampal Formation. *Frontiers Of Neurology And Neuroscience*, 6-17. doi: 10.1159/000360925

Sil'kis, I.G. (2003) "A Possible Mechanism for the Effect of Neuromodulators and Modifiable Inhibition on Long-Term Potentiation and Depression of the Excitatory Inputs to Hippocampal Principal Cells," *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33(6), pp. 529–541. Available at: <https://doi.org/10.1023/a:1023960402109>.

Soltész, I., & Losonczy, A. (2018). CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information processing in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 21(4), 484–493. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0118-0>

Sopala, M. *et al.* (2000) "Middle cerebral artery occlusion produces secondary, remote impairment in hippocampal plasticity of rats – involvement of N-methyl-D-aspartate receptors?," *Neuroscience Letters*, 281(2-3), pp. 143–146. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)00829-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)00829-6).

Speranza, L., di Porzio, U., Viggiano, D., de Donato, A., & Volpicelli, F. (2021). Dopamine: The neuromodulator of long-term synaptic plasticity, reward and movement control. *Cells*, 10(4), 735. <https://doi.org/10.3390/cells10040735>

Sun, W., Chen, Y., Zhang, Y., Geng, Y., Tang, X., Guo, R., Zhang, Z., Xu, H., & Tian, X. (2021). A modified four vessel occlusion model of global cerebral ischemia in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 352, 109090. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109090>

Surmeier, D., Stefani, A., Foehring, R., y Kitai, S. (1991). Developmental regulation of a slowly-inactivating potassium conductance in rat neostriatal neurons. *Neuroscience Letters*, 122(1), 41-46. doi: 10.1016/0304-3940(91)90188- y

Swiatkowski, P., Nikolaeva, I., Kumar, G., Zucco, A., Akum, B. F., Patel, M. v., D'Arcangelo, G., & Firestein, B. L. (2017). Role of Akt-independent mTORC1 and GSK3 β signaling in sublethal NMDA-induced injury and the recovery of neuronal electrophysiology and survival. *Scientific Reports*, 7(1), 1539. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01826-w>

Tarazi, F., Campbell, A., & Baldessarini, R. (1998). Effects of hippocampal kainic acid lesions on striatolimbic dopamine D1-, D2-, and D4-like receptors. *Neuroscience*, 87(1), 1–4. doi:10.1016/s0306-4522(98)00220-6

Tingley, W. G., Ehlers, M. D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J. B., Riley, C. T., & Huganir, R. L. (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 5157–5166. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.5157>

Traynelis, S., Wollmuth, L., McBain, C., Menniti, F., Vance, K., Ogden, K., Hansen, K., Yuan, H., Myers, S., y Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405-496. doi: 10.1124/pr.109.002451

Voneida, T.J. *et al.* (1981) "The origin of the hippocampal commissure in the rat," *The Anatomical Record*, 201(1), pp. 91–103. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.1092010112>.

Wang, H., Gong, B., Vadakkan, K. I., Toyoda, H., Kaang, B.-K., & Zhuo, M. (2007). Genetic evidence for adenylyl cyclase 1 as a target for preventing neuronal excitotoxicity mediated by N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1507–1517. <https://doi.org/10.1074/jbc.m607291200>

Wang, J., Liu, S., Fu, Y., Wang, J. H., y Lu, Y. (2003). Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nature Neuroscience*, 6(10), 1039–1047. doi:10.1038/nn1119

Wang, R., y Reddy, P. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1041-1048. doi: 10.3233/jad-160763

Wheal, H. V., Lancaster, B., & Bliss, T. V. P. (1983). Long-term potentiation in Schaffer collateral and commissural systems of the hippocampus: In vitro study in rats pretreated with Kainic acid. *Brain Research*, 272(2), 247–253. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90570-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90570-x)

Wheeler, D., White, C., Rees, C., Komendantov, A., Hamilton, D., y Ascoli, G. (2015). Hippocampome.org: a knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. *Elife*, 4. doi: 10.7554/elife.09960

Whitlock, J., y Derdikman, D. (2012). Head direction maps remain stable despite grid map fragmentation. *Frontiers In Neural Circuits*, 6. doi: 10.3389/fncir.2012.00009

Xie, M., Leng, T., Maysami, S., Pearson, A., Simon, R., Xiong, Z.-G., & Meller, R. (2022). Changes in NMDA Receptor Function in Rapid Ischemic Tolerance: A Potential Role for Tri-Heteromeric NMDA Receptors. *Biomolecules*, 12(9), 1214. <https://doi.org/10.3390/biom12091214>

Zhang, L., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J., y Isom, G. (2006). Trimethyltin induced apoptosis is associated with upregulation of inducible nitric oxide synthase and Bax in a hippocampal cell line. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 216(1), 34-43. doi: 10.1016/j.taap.2006.05.004

Zhang, X., Connelly, J., Levitan, E. S., Sun, D., & Wang, J. Q. (2021). Calcium/calmodulin–dependent protein kinase II in cerebrovascular diseases. *Translational Stroke Research*, 12(4), 513–529. <https://doi.org/10.1007/s12975-021-00901-9>

Zhao, Y., Zhang, X., Chen, X., & Wei, Y. (2021). Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (review). *International Journal of Molecular Medicine*, 49(2). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070>

Zhou, Y., y Danbolt, N. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal Of Neural Transmission*, 121(8), 799-817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8