



Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla
Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Instituto de fisiología

Laboratorio de neuromodulación

Participación de los receptores 5-HT₇ en la
modulación de la corriente NMDA en
neuronas disociadas de modelo de rata con
neurotoxicidad inducida por trimetilestaño

Tesis para obtener el grado de licenciatura
en Biomedicina

Presenta: Luis Ángel Haro Santillán

Director de tesis:

D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Puebla-junio, 2022

Agradecimientos

A los miembros del jurado calificador.

Al laboratorio de neuromodulación encargado del
D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández.

A D.C. Luis Gustavo Hernández Carballo

A M.C. Evelyn Alejandra Ruiz Luna.

A M.C. Lorena Arroyo Ríos.

A D.C. Oswaldo Torres Ramírez.

A mi familia, a mis padres, mis hermanos, a mi
novia.

Tabla de contenido

1. Resumen	5
2. Antecedentes	6
2.1 Hipocampo	6
2.1.1 Generalidades y estructura del hipocampo.....	6
2.1.2 Función del hipocampo.....	8
2.1.3 Microcircuitos y tipos neuronales del hipocampo.....	11
2.2 Neurotransmisión glutamatérgica	14
2.2.1 El neurotransmisor glutamato	14
2.2.2 Receptor ionotrópico a glutamato de tipo NMDA.....	16
2.2.3 Participación de glutamato en excitotoxicidad.....	19
2.3 Modelo de neurodegeneración en edad adulta por trimetilestaño.....	22
3. Planteamiento del problema	27
4. Pregunta de investigación	29
5. Hipótesis	29
6. Objetivos	29
6.1 General.....	29
6.2 Específicos	29
7. Materiales y métodos	30
7.1 Norma.....	30
7.2 Tamaño de la muestra.....	30
7.3 Área de muestreo	30
7.4 Cepa de la rata	31
7.5 Modelo de daño neurotóxico	31
7.6 Registro electrofisiológico	32
7.7 Técnica de fijación de voltaje en célula completa	33
7.8 Agentes farmacológicos	34
7.9 Protocolos electrofisiológicos.....	34
7.9.1 Rampa	34
7.9.2 Aplicación de NMDA	35

Neuromodulación

8. Análisis estadístico.....	35
9. Diagrama de trabajo.....	38
10. Resultados.....	39
11. Discusión.....	43
12. Conclusiones.....	47
13. Bibliografía	48

1. Resumen

El hipocampo es una estructura localizada en la parte dorsal y septal del cerebro que se extiende a lo largo del piso del cuarto ventrículo. Se divide en diferentes estratos dentro de los cuales se encuentra la capa de células piramidales encargada del desarrollo de las funciones hipocampales, como memoria, aprendizaje y percepción del entorno. Para ello se necesita de la comunicación entre los subcampos CA1, CA2, CA3 y giro dentado mediante las sinapsis excitadoras por medio del neurotransmisor glutamato y la unión con sus receptores metabotrópicos o inotrópicos, no obstante el exceso de glutamato extracelular también puede provocar efectos negativos por conducir a la formación de un ambiente neurotóxico, dentro de este orden de ideas, el trimetilestaño, un fármaco que causa neurodegeneración hipocampal, induce la liberación de glutamato, modificando el comportamiento fisiológico de los receptores al mismo neurotransmisor, en el presente proyecto se demuestra, en el modelo de neurodegeneración en rata inducido por la administración de trimetilestaño, que aumenta la corriente iónica que permite el receptor inotrópico a glutamato tipo NMDA en células piramidales de los subcampos CA1 y CA3, evaluado a través de una curva dosis-respuesta de NMDA en registros voltage clamp modalidad célula completa.

2. Antecedentes

2.1 Hipocampo

2.1.1 Generalidades y estructura del hipocampo.

En 1587 el anatomista Arantius adoptó el término “hipocampo” (del griego “*hipocampus*” que significa “caballo de mar”) para referirse al giro dentado, debido a que su forma recuerda al animal del mismo nombre. Posteriormente, en 1742 Garengeot acuñó el término “*Cornus Ammonis*” que significa cuerno de Ammon (CA), para referirse a los subcampos del hipocampo CA1, CA2 y CA3, haciendo referencia a la representación, de un dios egipcio, con la cabeza de un carnero (Ahmed y Mehta, 2009; Schultz y Engelhardt, 2014).

La formación hipocampal es una estructura dentro del sistema nervioso central compuesta por cuatro regiones principales: el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho, el complejo subicular y la corteza entorrinal. De las anteriores, el hipocampo, como previamente se mencionó, se subdivide a su vez en CA1, CA2 y CA3. Por su parte, el complejo subicular se subdivide también, en subiculum, presubiculum y parasubiculum (Amaral y Witter, 1989; Schultz y Engelhardt, 2014).

El hipocampo comienza en la parte dorsal y septal del cerebro, extendiéndose a lo largo del piso del cuarto ventrículo en forma de media luna (Ahmed y Mehta, 2009). Durante el desarrollo embrionario se localiza a nivel dorsal del tálamo; posteriormente migra para ubicarse desde los núcleos septales rostródorsalmente hasta el lóbulo temporal caudoventralmente (Giap *et al.*, 2000; Amaral y Witter, 1989; Jung *et al.*, 2010).

Por otro lado, el hipocampo presenta una citoarquitectura correspondiente a la arquicorteza, por tal razón, se evidencia que es una de las regiones filogenéticas más antiguas del cerebro humano; se estructura mediante una capa de células piramidales, una capa molecular, y una capa polimórfica (Schultz y Engelhardt, 2014). La capa de células piramidales contiene los somas de dichas células. La capa molecular alberga las dendritas apicales de las células piramidales y axones de otras fuentes. Por su parte, la capa polimórfica se compone de interneuronas y células en cesta (Giap *et al.*, 2000; Benavides-Piccione *et al.*, 2019; Schultz y Engelhardt, 2014). Se han descrito mediante cortes histológicos en rata los estratos en los que se diferencia el hipocampo (figura 1).

Neuromodulación

De este modo se identificó el estrato oriens (SO) ubicado entre el *alveus* (fibras eferentes de neuronas piramidales) y la capa de células piramidales, caracterizado por contener las dendritas basales ramificadas de neuronas piramidales e interneuronas. De manera análoga, la región interna hacia la fisura del hipocampo se divide en estrato lúcido (SL), estrato radiado (SR) y estrato lacunoso molecular (SLM). Al respecto, las dendritas apicales de las células piramidales forman el SR; SLM alberga las ramas terminales de dichas dendritas, y el SL es una ruta de comunicación mediante fibras musgosas para formar sinapsis con células piramidales por encima de las neuronas de CA3. Es importante señalar que el SL no existe en CA2 y CA1 (Schultz y Engelhardt, 2014; Wheeler *et al.*, 2015).

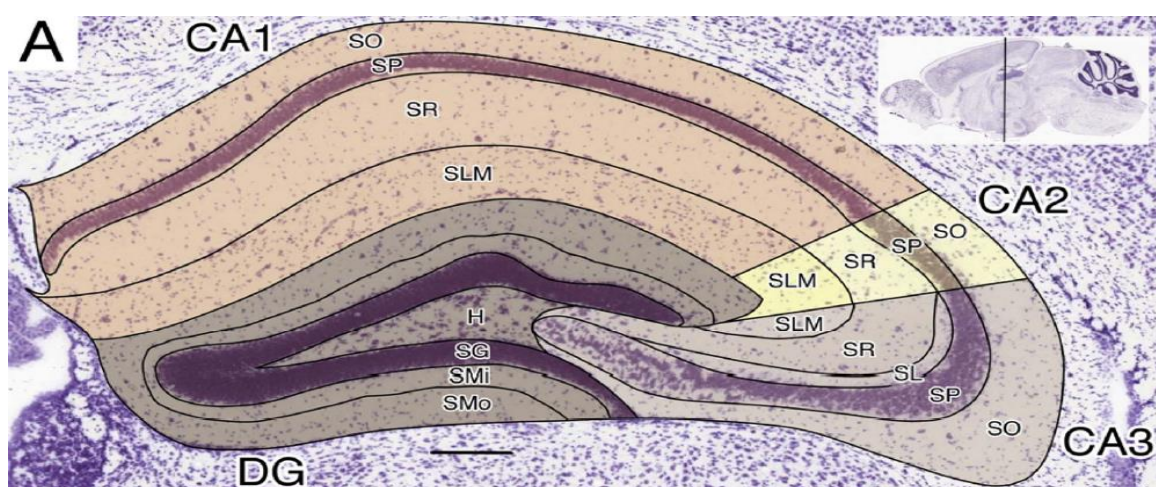


Figura 1. Corte histológico de cerebro de rata donde se muestran el estrato oriens (SO), estrato piramidal (SP), estrato lucido (SL), estrato radiado (SR), estrato lacunoso-molecular (SLM), y giro dentado. Imagen extraída de Wheeler *et al.*, 2015.

En relación con los subcampos del hipocampo, la capa de neuronas piramidales de CA1 (Figura 2) es más densa en monos y en humanos a comparación de roedores. Por consiguiente, se ha planteado una posible subdivisión en una capa de neuronas piramidales interna y otra capa externa en humanos. Desde una perspectiva general, se ha propuesto mediante estudios estereológicos que el número total de neuronas en CA1 es 14×10^6 (Schultz y Engelhardt, 2014).

Para finalizar las generalidades, el principal neurotransmisor aferente al hipocampo es el glutamato, donde se une tanto a receptores de glutamato ionotrópicos (iGluRs) como metabotrópicos (mGluRs). Además, se ha demostrado la entrada a la formación hipocampal de aferencias colinérgicas provenientes del *septum*. De tal manera que todas las aferencias

son excitadoras. No obstante, se han reconocido gran cantidad de interneuronas inhibitorias dentro del hipocampo para modular la actividad excitadora aferente (Giap *et al.*, 2000; Benavides-Piccione *et al.*, 2019).

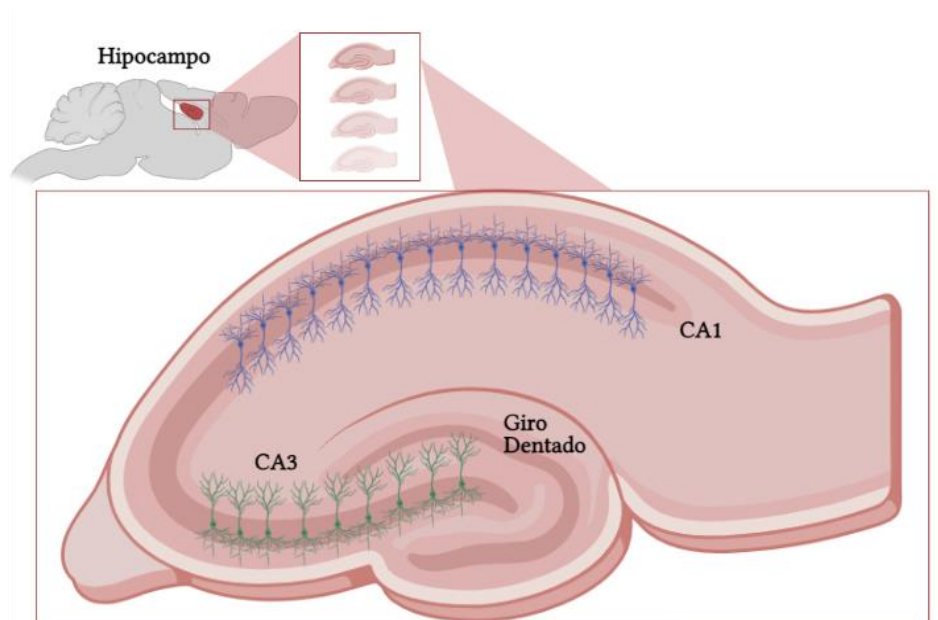


Figura 2. Cortes coronales de cerebro de rata junto con expansión de la imagen en hipocampo y capas de neuronas piramidales de los subcampos CA1 y CA3. Imagen modificada de Benavides-Piccione *et al.*, 2019.

2.1.2 Función del hipocampo

La función del hipocampo ha sido estudiada a lo largo de los años y no se ha esclarecido una contribución única de esta región del encéfalo, no obstante, múltiples investigaciones continúan aportando conocimiento e información acerca de las funciones en las cuales participa el hipocampo. Los estudios sobre la función de esta área se han centrado en su participación en funciones cognitivas como la memoria, la atención y la percepción (Hongo *et al.*, 2015; Aly y Ranganath, 2018). Asimismo, se ha relacionado con las fases iniciales de formación de la memoria semántica (Aly y Ranganath, 2018).

Desde las primeras evidencias de lesión en hipocampo se ha podido mostrar que el daño de esta área produce un déficit de memoria autobiográfica y deficiencias en la memoria espacial, además de pérdida de memoria en sucesos próximos con conservación de la memoria de sucesos distantes (Ólafsdóttir *et al.*, 2018). Del mismo modo, se ha relacionado al hipocampo y a la corteza del lóbulo temporal con la memoria declarativa (Aly y

Neuromodulación

Ranganath, 2018).

De manera análoga, Miller y colaboradores (2020) hacen la mención en sus investigaciones de que los subcampos CA1 y CA3, en roedores, almacenan y recuperan recuerdos de situaciones aversivas contextuales recientes; no obstante, los recuerdos a largo plazo dependen de CA1, pero no de CA3. De forma semejante, la lesión de CA1 en humanos se asocia con amnesia global transitoria, lo que limita la recuperación autobiográfica remota y próxima. En el mismo trabajo, Miller y colaboradores demostraron, también en humanos, que el daño específico en el subcampo CA3 de hipocampo muestran una pérdida de detalles internos episódicos recientes, mientras que los detalles semánticos personales no presentaban alteraciones en recuerdos recientes ni en recuerdos remotos. Para sintetizar la información anterior, es probable que CA3 participe en el almacenamiento y recuperación de recuerdos episódicos recientes.

Por otro lado, es importante mencionar que una característica diferencial del hipocampo, con respecto a otras regiones del encéfalo, es su maleabilidad, lo que le permite participar en funciones cognitivas diferentes entre sí, relacionadas mediante circuitos neuronales funcionales capaces de codificar la información e integrarla junto con otras regiones del sistema límbico, posteriormente dicha información se consolida en la corteza cerebral tras su reactivación en condiciones de mínimas entradas sensoriales (Aly y Ranganath, 2018; Ólafsdóttir *et al.*, 2018).

Así mismo, estudios experimentales en modelos animales propuestos desde 1971, demostraron la presencia de neuronas piramidales dentro de hipocampo, que aumentan su activación cuando la rata se sitúa en lugares específicos. Estas neuronas, presentes en corteza entorrinal y CA1, fueron nombradas “células de lugar” (Moser *et al.*, 2015; Whitlock y Derdikman, 2012). Posteriormente, se realizaron estudios que sugieren la presencia de neuronas que responden a direcciones específicas independientemente de la ubicación (células de dirección de la cabeza), a los bordes dentro de un plano (células de borde), a la posición dentro de un mapa espacial cuadrangular (células de rejilla), a estímulos olfativos, a entradas táctiles y de sincronización. Estos tipos celulares se activan en conjunto con las células de lugar en un determinado ambiente, lo cual sugiere que la codificación de la información del lugar se presenta en combinación con otras entradas sensoriales y converge

Neuromodulación

la información en hipocampo, formando un mapa cognitivo junto con otras regiones del sistema límbico (Moser *et al.*, 2015; Okada *et al.*, 2017; Whitlock y Derdikman, 2012; Poucet *et al.*, 2015). Además, la evidencia sugiere que las células de lugar son capaces de codificar y reestructurar las representaciones espaciales de un lugar específico por una situación aversiva, es decir, la conectividad entre microcircuitos de hipocampo se puede modificar ante información proveniente del exterior (Okada *et al.*, 2017). Por tanto, con estas evidencias, se demuestra que la función principal de CA1, la localización espacial, es un sistema plástico sujeto a modificaciones en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de CA1 y corteza entorrinal, razón por la cual las lesiones en los subcampos del hipocampo pueden conducir a reestructuraciones y mostrar signos clínicos característicos y diferenciales entre sí, como amnesia retrograda o anterógrada, ante patologías o traumatismos en el hipocampo (Whitlock y Derdikman, 2012).

Lo anterior se evidencia en el modelo de neurodegeneración inducido por la administración de trimetilestaño, ya que se ha reportado que provoca degeneración neuronal selectiva en sistema límbico, particularmente en las neuronas piramidales del hipocampo, desencadenando desorientación, confusión, déficits de memoria, agresividad y convulsiones, observado en roedores tras la administración experimental y en humanos intoxicados con estos compuestos (Mignini *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior, se han reportado problemas en la retención de memoria (evaluada en el laberinto acuático de Morris) en ratas expuestas a una dosis de 9 mg/kg, administrado vía oral, de trimetilestaño (Ishida *et al.*, 1997). Además, en el laberinto radial y la prueba de evitación pasiva, se ve afectada la creación de memorias de trabajo y de referencia, aumenta la actividad locomotora y se ve interrumpido el autoaseo (Mignini *et al.*, 2012; Ishida *et al.*, 1997). De manera similar, se reportó que la obesidad en un modelo en rata disminuye el número promedio de neuronas en CA1 y CA3, lo cual se correlaciona con un mayor número de errores en la prueba de laberinto radial, es decir, se evidencia deterioro cognitivo en la obesidad tras la muerte neuronal (Prabhu *et al.*, 2020).

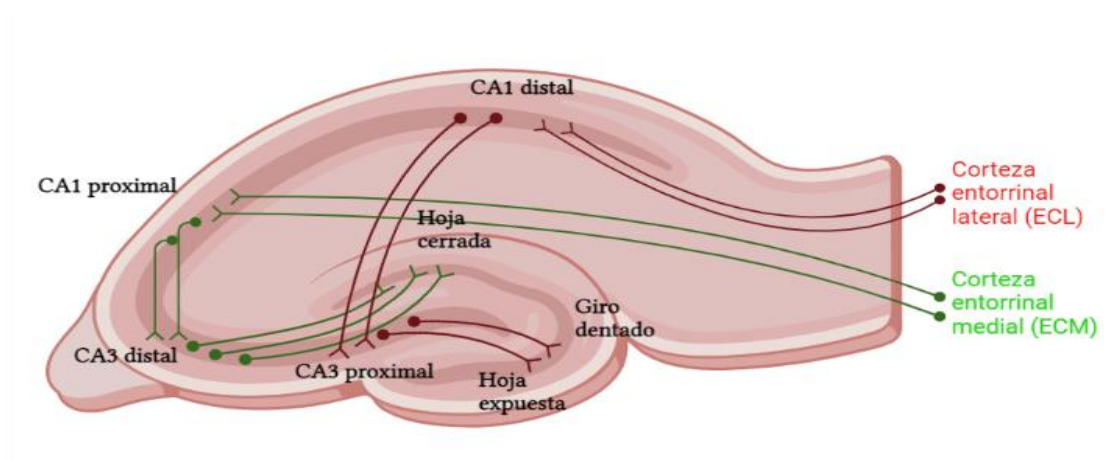
Como conclusión de este apartado, el desempeño de conductas dependientes de hipocampo se ve afectado por la muerte de neuronas piramidales de los subcampos de la misma área provocando déficits cognitivos, particularmente en pruebas de memoria y

Neuromodulación

aprendizaje evaluadas en roedores (Mignini *et al.*, 2012; Ishida *et al.*, 1997; Prabhu *et al.*, 2020).

2.1.3 Microcircuitos y tipos neuronales del hipocampo

Estudiar la comunicación entre regiones del sistema nervioso central permite entender cómo se procesa la información, además de proponer soluciones alternativas a las lesiones mediante reconexión entre los subcampos perilesionados y fomentar la recuperación funcional (Liang *et al.*, 2020). Por lo que se refiere al hipocampo, este se encuentra interconectado por cuatro rutas principales, la ruta perforante, la ruta temporoamónica, la vía de fibras musgosas y la vía de las colaterales de Shaffer. Para entender la dos primeras rutas es necesario puntualizar que la corteza entorrinal (EC) emite la principal ruta de aferencias al hipocampo. De este modo la capa II de la corteza entorrinal hace sinapsis con la capa molecular externa y media del giro dentado (GD), formando así la ruta perforante. De manera análoga, la ruta temporoamónica se origina en la capa III de la corteza entorrinal y llega a las dendritas distales de CA1 en el estrato lacunoso molecular (Coulter *et al.*, 2011). Por otra parte, la vía de fibras musgosas se origina en las proyecciones de las neuronas granulosas del giro dentado dirigiéndose hacia las neuronas piramidales del subcampo CA3.



*Figura 3. Proyecciones neuronales de la EC hacia los subcampos CA1 y CA3. La ECM manda aferencias hacia CA1 proximal, esta a su vez se comunica con CA3 distal para después hacer sinapsis en la "hoja cerrada" de GD (líneas verdes). Por parte, la ECL se proyecta a CA1 distal, el flujo anatómico sigue con la sinapsis entre CA1 distal y CA3 proximal, culmina con la comunicación de CA3 proximal con la "hoja expuesta" de GD (líneas rojas). Imagen modificada de Beer *et al.*, 2018.*

Neuromodulación

Finalmente, la vía de las “colaterales de Schaffer” se refiere a la comunicación entre las neuronas piramidales de CA3 y las espinas dendríticas de CA1 en el estrato radiado y el estrato oriens. Es importante destacar que CA3 representa la mayor fuente de excitación glutamatérgica en CA1, formando alrededor de 30,000 sinapsis (Amaral y Witter, 1989; Coulter *et al.*, 2011; Münster-Wandowski *et al.*, 2013).

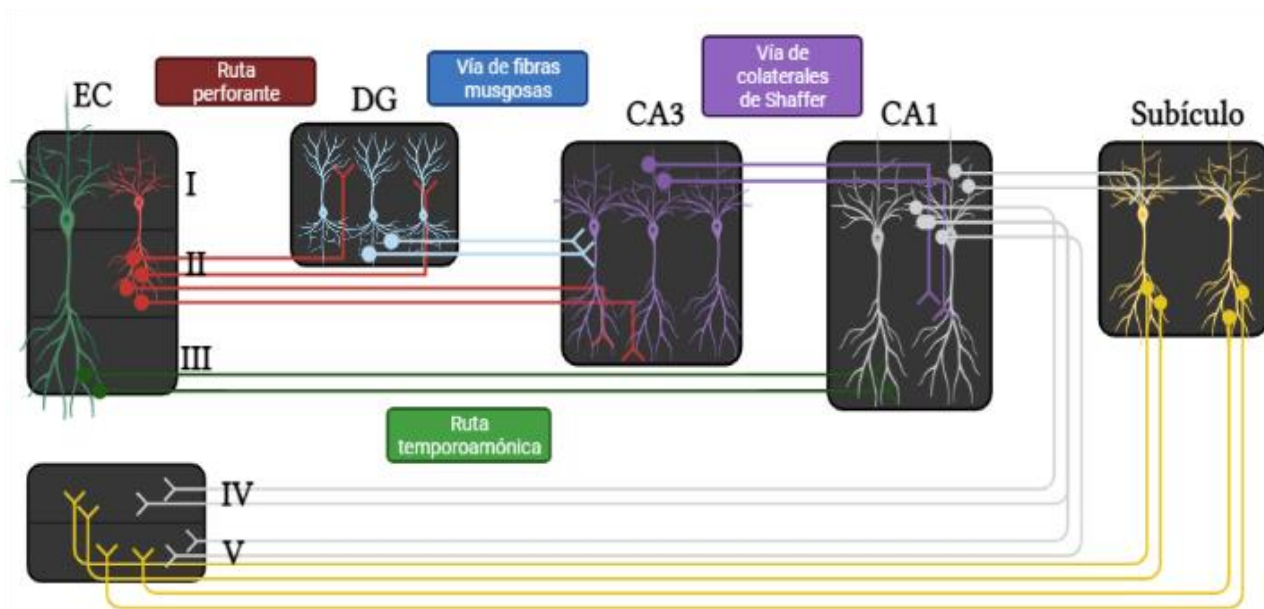


Figura 4. Rutas de comunicación de la formación hipocámpica: La ruta perforante (líneas rojas) que corresponde a la comunicación entre EC con DG y CA3. La ruta temporoamónica (líneas verdes) se origina en la EC y termina en CA1. El DG a través de la vía de las fibras musgosas (línea azul) se comunica a su vez con CA3, la cual posteriormente se dirige hacia CA1 por la vía de los colaterales de Shaffer (líneas rosas). Por su parte CA1 se dirige tanto al subículo como a la EC capa IV y V (líneas negras) la cual de manera alterna recibe información del subículo mismo (líneas amarillas). Imagen modificada de Coulter *et al.*,

Con respecto a la corteza entorrinal, está se divide en corteza entorrinal medial (ECM) y corteza entorrinal lateral (ECL) encargadas de procesar información espacial y no espacial, respectivamente (Ahmed y Mehta, 2009). La parte distal de CA1 recibe aferencias tanto de ECL como de la región proximal de CA3. Mientras que la parte proximal de CA1 hace sinapsis con neuronas de ECM, así como de CA3 distal. Por otro lado, la parte distal de CA3 recibe aferencias de diferentes regiones del giro dentado relacionada con la codificación de información espacial (Figura 3). En cambio, la región proximal de CA3 recibe menor cantidad

Neuromodulación

de aferencias de giro dentado y de la ECL encargado del procesamiento de información no espacial (Beer *et al.*, 2018; Hongo *et al.*, 2015). Esta información permite concluir que existen circuitos dentro de hipocampo que codifican información espacial y no espacial mediante diferentes subredes neuronales, de manera que la alteración en los subcampos de CA1 y CA3 mostrara signos y síntomas diferentes dependiendo el área puntual de la lesión, es decir una lesión en la región distal de CA1 y CA3 proximal (hipocampo anterior) afecta el procesamiento de información preferentemente no espacial, mientras la lesión en la región proximal de CA1 y CA3 distal (hipocampo posterior) afecta el procesamiento de información preferentemente espacial (Beer *et al.*, 2018; Hongo *et al.*, 2015). Por otra parte, en la formación hipocampal se han reconocido tres asas de retroalimentación excitatorias primarias (figura 4), debido a que la misma corteza entorrinal funciona como diana para las eferencias que emite el subículo (Coulter *et al.*, 2011).

En primer lugar, el asa larga, que involucra el flujo de información de EC a GD por la vía perforante, de allí a CA3 (con flujo de información por las fibras musgosas); mediante los colaterales de Shaffer llega a CA1, éste emite eferencias por el subículo y regresa la información a EC. En segundo lugar, el asa de longitud intermedia se compone de proyecciones de EC a CA2, luego la información llega al subcampo CA1, emite eferencias por subículo y de nuevo va a EC. Por último, el asa más corta corresponde a la comunicación directa entre EC a CA1 por la vía temporoamónica, se proyecta desde el subículo y regresa a EC (Coulter *et al.*, 2011).

Aunado a lo anterior, se demostró que ciertos tipos de interneuronas dentro del estrato oriens-lacunososo molecular (células gabaérgicas en la capa más externa del hipocampo, con proyecciones perpendiculares al SLM), inhiben a las células piramidales en las dendritas apicales distales, lo que permite el control de las aferencias excitadoras de la EC a CA1 (Leño *et al.*, 2012). Así mismo, las interneuronas del estrato oriens-lacunososo molecular inhiben a las interneuronas en el SR que hacen sinapsis en los colaterales de Schaffer, de este modo permite la excitabilidad de CA3 (Leño *et al.*, 2012).

Por otro lado, los estudios de Liang y colaboradores (2020), demuestran que los subcampos CA3 y CA1 en ratas, se conectan con tálamo dorsal, corteza parietal posterior, corteza retrosplenial, corteza prefrontal, orbitofrontal, prelímbica e infralímbica, así como corteza

Neuromodulación

del cíngulo anterior, y cortezas de asociación temporal y auditiva. De manera semejante, reportaron que las ratas envejecidas presentan una conectividad similar, aunque menos extensa, principalmente se modifica la conectividad funcional de CA3 y CA1 en dichas ratas. Además, evidenciaron que la degeneración tanto en la comunicación entre CA3 del hemisferio izquierdo con el hipocampo ventral y dorsal, la corteza de asociación temporal izquierda y áreas parietales posteriores, como el microcircuito CA1-corteza prefrontal infralímbica, se asocia con un deterioro en la memoria relacionado con la edad. De manera similar, la eliminación de las aferencias desde CA3 a CA1 en ratas, muestra una memoria espacial deteriorada, aunque no se perdió en su totalidad, lo que sugiere la necesidad de aferencias de CA3 y EC hacia CA1 para el aprendizaje espacial y la memoria (Ahmed y Mehta, 2009).

2.2 Neurotransmisión glutamatérgica

2.2.1 El neurotransmisor glutamato

El funcionamiento cerebral depende principalmente de la comunicación neuronal, donde el glutamato es el principal mediador de las señales excitadoras del sistema nervioso central con participación en funciones como la transmisión sináptica, migración neuronal, excitabilidad, plasticidad, potenciación a largo plazo, depresión a largo plazo, e incluso en procesos como la excitotoxicidad (Moretto *et al.*, 2018; Zhou y Danbolt, 2014). Cabe señalar que, los efectos que tiene en la célula no dependen de la naturaleza química del glutamato, por el contrario, depende de cómo las células están programadas para responder al estar expuestas a él, es decir, el efecto que se observa en las células se determina por la activación del receptor al que se une, modulando una respuesta celular específica a consecuencia del cambio conformacional observado en la proteína receptora (Zhou y Danbolt, 2014).

El glutamato citoplasmático es sintetizado a partir de los precursores glutamina y α -cetoglutarato, dicho neurotransmisor se empaqueta en vesículas, a través de los transportadores VGLUT (transportador de glutamato vesicular), para su posterior liberación hacia la hendidura sináptica mediante exocitosis. Se ha determinado que la concentración vesicular de glutamato es aproximadamente 100 mmol/L, mientras que la concentración extracelular *in vivo* en reposo es de 0.6 μ M, la cual aumenta durante la transmisión sináptica a más de 10 μ M en sitios extracelulares (Münster-Wandowski *et al.*, 2013; Hynd *et al.*,

Neuromodulación

2004). Una vez en la hendidura sináptica se une a sus receptores postsinápticos induciendo cambios conformacionales que resultan en la apertura de canales iónicos, en el caso de los iGluR o la activación de rutas de señalización intracelular mediante la activación de mGluR (Lussier *et al.*, 2015). Posteriormente se elimina de la hendidura por recaptura mediante transporte activo hacia la neurona presináptica, por transportadores transportador de aminoácidos excitadores 4 y 5 (EAAT4 y EAAT5), y células gliales, o por medio de inactivación enzimática (Münster-Wandowski *et al.*, 2013).

Con referencia a sus receptores, se ha identificado que el glutamato actúa a través de dos clases de receptores, los iGluR que corresponden a receptores inotrópicos activados por ligando los cuales permiten el flujo de iones a través de la membrana plasmática. Se reconocen tres receptores específicos AMPA, NMDA y kainato (Zhou y Danbolt, 2014; Salińska *et al.*, 2005) y los mGluR, receptores con siete dominios transmembranales que tienen como función desencadenar cascadas de señalización para regular el metabolismo intracelular. Los mGluR son ocho tipos diferentes (mGluR1-8) que se subdividen en tres grupos de acuerdo a los mecanismos de transducción de señales, sensibilidad farmacológica y secuencia de aminoácidos. Los receptores que conforman el grupo I (mGluR1 y mGluR5), se encuentran acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítido mediado por fosfolipasa C y el grupo II (mGluR2 y mGluR3) junto con el grupo III (mGluR4, 6, 7 y 8) se encuentran acoplados a la inhibición de la adenilato ciclasa o vinculados a canales iónicos (Hynd *et al.*, 2004; Salińska *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, el glutamato juega un papel importante en procesos de plasticidad como la potenciación a largo plazo y la depresión a largo plazo. Procesos de particular importancia en hipocampo para el cumplimiento de funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje. Dentro del hipocampo, las neuronas piramidales se comunican por sinapsis glutamatérgicas formando la “vía trisináptica”, que involucra a la vía perforante, las fibras musgosas, y los colaterales de Shaffer antes descritas (Münster-Wandowski *et al.*, 2013).

Con respecto a las sinapsis de los subcampos hipocampales, se han reconocido dos tipos de sinapsis glutamatérgicas en CA1: perforadas y no perforadas. Donde las sinapsis perforadas tienen mayor número de receptores AMPA, alcanzando una expresión máxima en SR, y una

Neuromodulación

expresión mínima en el SLM. Para que la activación proveniente de la EC llegue al soma de las neuronas en CA1 se necesita de la coactivación de las entradas de CA3, esto permite desencadenar un potencial de acción somático proveniente de las aferencias de EC. De manera que una lesión en CA3 se esperaría que provoque una disminución en la frecuencia de disparo de CA1, modificando su comportamiento electrofisiológico, sin embargo, se ha demostrado que la desaferenciación desencadena hiperexcitación (Ahmed y Mehta, 2009; Cai *et al.*, 2007).

Se debe agregar que, la excitabilidad y liberación de glutamato en hipocampo, así como en otras sinapsis glutamatérgicas, debe ser regulada y controlada para el correcto funcionamiento neuronal debido a la continua liberación del neurotransmisor en las sinapsis, por lo que, si se inhibe la recaptura de este neurotransmisor se conducirá a su acumulación en cuestión de segundos, provocando un ambiente de sobreactividad de las neuronas a causa de éste neurotransmisor que puede llevar a el daño celular o incluso la muerte (Zhou y Danbolt, 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior, se ha observado que las lesiones cerebrales inician tardíamente un periodo de hiperexcitabilidad aberrante simultáneamente con la primera evidencia de recuperación, dicho aumento de la actividad neuronal involucra epilepsia postraumática, síndrome de dolor central y espasticidad (Cai *et al.*, 2007). Dicho proceso se encuentra mediado tanto por la modificación en el tiempo de apertura del receptor a glutamato tipo NMDA, como por el aumento en la liberación de glutamato alrededor de 350 veces, en hipocampo y la corteza cerebral (Patterson, 1996).

2.2.2 Receptor ionotrópico a glutamato de tipo NMDA

Los receptores ionotrópicos de glutamato son proteínas de la membrana plasmática ancladas mediante complejos tetraméricos, de más de 900 aminoácidos, dichas subunidades forman un poro central que va a permitir el paso de los iones. Los receptores ionotrópicos de glutamato se agrupan en tres clases de acuerdo a la farmacología y sus diferencias estructurales, incluye los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y receptores a kainato (Zhou y Danbolt, 2014; Traynelis *et al.*, 2010; Giap *et al.*, 2000; Benavides-Piccione *et al.*, 2019). Los receptores NMDA

Neuromodulación

permiten el flujo de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ , mientras que los receptores AMPA y kainato permiten preferencialmente la entrada de Na^+ y K^+ , cabe aclarar que los receptores AMPA pueden permitir la entrada de Ca^{2+} dependiendo de las subunidades que lo conformen (Greger y Mayer, 2019). La similitud en la secuencia de los cuatro tipos de receptores sugiere que comparten una arquitectura similar a pesar de sus diferencias en la probabilidad máxima de apertura, tasas de activación y desensibilización (Mayer, 2017). En términos generales se han identificado cuatro dominios compartidos (Figura 5): dominio amino terminal de 380 residuos (ATD), dominio de unión a ligando extracelular de 250 residuos (LBD), dominio transmembrana (TMD) y el dominio carboxilo terminal intracelular (CTD). Además, se ha reconocido que el poro central se forma por tres α -hélices que atraviesan la membrana (M1, M2 y M3), con una hélice corta (M2; Traynelis *et al.*, 2010).

En lo que respecta a las subunidades de cada receptor, para el caso del receptor NMDA GluN1, GluN2A-GluN2D, GluN3A y GluN3B; para el receptor AMPA GluA1-GluA4, y finalmente GluK1-GluK5 como subunidades para el receptor de kainato (Traynelis *et al.*, 2010; Mayer, 2017).

Una característica más del receptor de glutamato activado por NMDA, es su dependencia de un co-activador para la completa apertura del canal. Hasta el momento sus posibles co-activadores identificados son la glicina y la D-serina. De manera particular, los receptores NMDA funcionales necesitan el ensamblaje de dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2 o mediante la integración de dos subunidades GluN1, una subunidad GluN2 y una GluN3. Donde la subunidad GluN1 y GluN3 proporcionan el sitio de unión a glicina, mientras que las subunidades GluN2 lo hacen para glutamato (Traynelis *et al.*, 2010). Además, la unión de las subunidades GluN1 y GluN2 forman un sitio de unión a magnesio, el cual bloquea el canal de manera voltaje dependiente (Köhr, 2006).

Con respecto a la regulación postraducciona de los receptores inotrópicos a glutamato tipo NMDA, se ha sugerido que es crítica para el desarrollo del sistema nervioso, la memoria y el aprendizaje, así como para la regulación de procesos patológicos como la excitotoxicidad, siendo la fosforilación uno de los mecanismos principales para regular su actividad y expresión en la membrana (Greger y Mayer, 2019; Wang *et al.*, 2003). En este sentido la proteína serina-treonina cinasa (Cdk5), activada previamente por su asociación con la

Neuromodulación

proteína p35 o su forma truncada p25 (nociva para el cerebro), es capaz de fosforilar a la subunidad GluN2A del receptor NMDA en la serina 1232 (Ser1232), en las neuronas piramidales de CA1, aumentando la amplitud del pico de la corriente iónica, en un modelo en rata sometidas a isquemia cerebral transitoria, resultando en muerte de las neuronas piramidales de CA1 después de la isquemia (Wang *et al.*, 2003). De manera análoga, se ha mostrado que Cdk5 fosforila la serina-1116 ubicada en el carboxilo terminal de GluN2B para disminuir la expresión en la superficie de NMDA de manera dependiente de la actividad (Lussier *et al.*, 2015).

Por su parte, la fosforilación de la Tyr-1472 de la subunidad GluN2B, por la cinasa Fyn/Src, impide la unión de AP-2, un paso requerido para la internalización de GluN2B, de modo que aumenta la expresión superficial de NMDA al interrumpir la endocitosis. Contrario a lo que ocurre con la fosforilación de Ser-1480, por la caseína cinasa-2 (CK2), la cual promueve la disminución de la fosforilación en Tyr-1472, por ende, promueve la internalización del receptor. Finalmente, la fosforilación en Ser-1303 por CaMKII/PKC promueve el acople de GluN2B con CK2 y esto conduce a la fosforilación de Ser-1480 y la consecuente internalización del receptor (Lussier *et al.*, 2015).

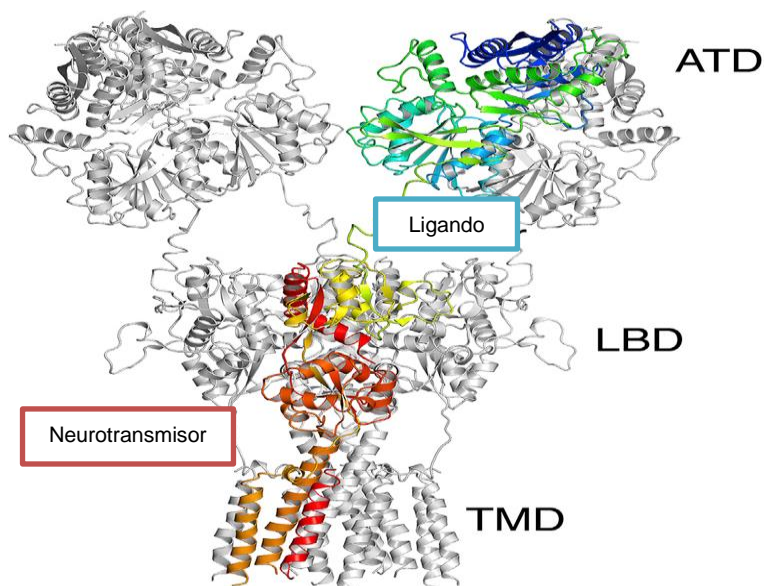


Figura 5. Estructura general de los receptores inotrópicos a glutamato donde se muestra el dominio amino terminal ATD, el dominio de unión a ligandos extracelulares LBD, el dominio transmembrana TMD y los residuos de unión entre dominios. Imagen extraída de Mayer, 2017.

Neuromodulación

Por otro lado, la fosforilación dependiente de PKC (en Ser-896) y PKA (Ser-897) de GluN1 promueve la movilización del receptor del retículo endoplásmico a la membrana plasmática. Por tanto, las modificaciones postraduccionales, principalmente la fosforilación, regulan el tráfico y la expresión en la membrana de las subunidades del receptor NMDA, dicha coordinación se puede alterar ante patologías como la isquemia donde se produce un ambiente excitotóxico que modifica la actividad de ciertas cinasas y puede conducir a la muerte neuronal (Lussier *et al.*, 2015).

2.2.3 Participación de glutamato en excitotoxicidad

La excitotoxicidad es el proceso por el cual se desencadena muerte neuronal a causa de las acciones tóxicas de los aminoácidos excitadores. Se ha sugerido que la excitotoxicidad tiene un papel importante en la muerte neuronal desarrollada en las enfermedades neurodegenerativas, un grupo heterogéneo de patologías diferentes en la clínica y en su etiología genética (incluye esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otras más), afectando funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje (Dong *et al.*, 2009; Wang y Reddy, 2017). Se ha asociado particularmente al glutamato con estos procesos patológicos, ya que es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central en condiciones fisiológicas. Sus acciones tóxicas provienen de la exposición prolongada de las neuronas al neurotransmisor y las corrientes iónicas que desencadena o por el aumento en la concentración del glutamato, lo cual conduce a la hiperactividad y al daño neuronal (Dong *et al.*, 2009; Wang y Reddy, 2017; Salińska *et al.*, 2005). Los efectos excitotóxicos del glutamato dependen de dos procesos principales: el primero consiste en el flujo excesivo de los iones sodio y cloro que acarrearán agua, como resultado de la sobreactivación de los receptores inotrópicos a glutamato AMPA, kainato y por los receptores de sodio voltaje dependientes, conduciendo a la hinchazón de la neurona y posteriormente a la muerte celular (Salińska *et al.*, 2005), sin embargo los cambios morfológicos en las neuronas expuestas a agonistas de receptores AMPA/kainato muestran un pericario reducido y oscuro, junto con grupos de cromatina redonda correspondientes a reminiscencias de cambios apoptóticos (Portera-Cailliau *et al.*, 1997). El segundo mecanismo consiste en la activación continua y prolongada de los

Neuromodulación

receptores inotrópicos de glutamato tipo NMDA (NMDAR), particularmente los que se componen de las subunidades GluN1 y GluN2B, provocando aumentos en la concentración de calcio intracelular, consecuentemente se desencadena la actividad enzimática que eventualmente conduce a apoptosis o necrosis, mediante procesos como activación de caspasas, despolarización de la membrana mitocondrial, producción de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y producción de especies reactivas de nitrógeno (Dong *et al.*, 2009; Salińska *et al.*, 2005). En otro estudio se demostró que al sobreactivar los receptores NMDA los cambios morfológicos neuronales fueron inflamación y lisis, lo que corresponde con el desarrollo de un proceso necrótico (Portera-Cailliau *et al.*, 1997).

Dado que el exceso de glutamato extracelular es una de las causas principales de la excitotoxicidad, conviene señalar que uno de los mecanismos importantes para el aumento de su concentración es la hiperactividad neuronal. Las evidencias en la bibliografía reportan que la transección en los colaterales de Shaffer causa hiperexcitabilidad, dos semanas después de la lesión en CA1, condición dependiente del medio extracelular para la visualización de efecto, observado en tres ambientes diferentes: aumentando la concentración extracelular de potasio de 4 mM a 8 mM, eliminando el magnesio de la solución extracelular, y aplicando 1 μ M de metocloruro de bicucullina (un antagonista de los receptores GABA_A). Así mismo, se ha evidenciado que la hiperexcitabilidad no es producto de la muerte selectiva de neuronas GABAérgicas, pues la denervación no provocó efectos importantes sobre la inhibición GABAérgica (Dinocourt *et al.*, 2011). Por lo que la alteración en los niveles de glutamato, la regulación positiva de canales de sodio, calcio y potasio junto con cambios en la resistencia de entrada, se relacionan directamente con la hiperexcitabilidad (Cai *et al.*, 2007). De manera semejante se han observado reorganizaciones en los microcircuitos y alteraciones en la comunicación neuronal como resultado de la hiperexcitabilidad (Cai *et al.*, 2007). Estos resultados se respaldan en el modelo de neurodegeneración por la administración de trimetilestaño, donde un signo característico del proceso de intoxicación son las convulsiones, probablemente mediadas por la hiperexcitabilidad de las neuronas sobrevivientes a la muerte neuronal crónica que provoca el fármaco en los subcampos CA3 y CA1 en rata (Mignini *et al.*, 2012).

Además, hay que mencionar que, la desaferenciación parcial crónica conduce a una

Neuromodulación

prolongación de los potenciales postsinápticos excitatorios provocados por fuerte estimulación eléctrica, esto a consecuencia de una regulación a la baja de la función del canal de K^+ activado por Ca^{2+} tipo SK y por el aumento en el tiempo que permanecen abiertos los receptores de glutamato tipo NMDA, lo cual promueve un aumento en la entrada de Ca^{2+} (Cai *et al.*, 2007).

De manera que, lo reportado en la bibliografía demuestra la participación importante del glutamato en procesos de hiperexcitabilidad como resultado de la lesión y/o desaferenciación en los subcampos CA1 y CA3. Para finalizar la idea, las evidencias anteriores llevan a pensar en una posible modificación de las corrientes iónicas que permite el receptor de glutamato tipo NMDA y cambios en la concentración de calcio intracelular en el modelo de neurodegeneración inducido por la administración de trimetilestaño, ya que dicho fármaco promueve la muerte neuronal en CA1 y CA3 (Cai *et al.*, 2007; Dinocourt *et al.*, 2011; Mignini *et al.*, 2012).

Con el fin de resumir los mecanismos de excitotoxicidad antes mencionados, el proceso inicia con el aumento de la concentración de glutamato extracelular por su excesiva liberación o por su reducida recaptura, conduciendo a la activación de los receptores iGluR y mGluR, provocando el aumento en el flujo de calcio y liberando calcio del retículo endoplásmico (a través del aumento de la concentración de IP3), respectivamente. Como resultado la mitocondria censa dicho aumento en la concentración de calcio intracelular y se desencadenan los mecanismos de apoptosis, además se activan proteasas apoptóticas como la calpaína y/o calcineurina (Mahmoud *et al.*, 2019; Fricker *et al.*, 2018).

Por otro lado, la estimulación excesiva del receptor inotrópico a glutamato NMDA desencadena la entrada de iones y agua a las neuronas por osmosis lo que provoca la ruptura de la membrana, este mecanismo causa daño neuronal de manera aguda, es decir ocurre en instantes después de la causa del ambiente excitotóxico (Mahmoud *et al.*, 2019). Finalmente, el estrés oxidativo es otro mecanismo que participa en la muerte neuronal inducida por la excitotoxicidad, debido al aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, particularmente los radicales superóxidos (O_2^-) e hidroxilo (OH^-), lo cual se asocia con mecanismos antioxidantes reducidos en enfermedades neurodegenerativas. Por su parte, el calcio también es capaz de activar a la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), que

produce óxido nítrico, este a su vez puede combinarse con O_2^- y produce peroxinitrito ($OONO^-$). Estas moléculas provocan daño en las proteínas intracelulares, lípidos y ácidos nucleicos que llevan a desencadenar mecanismos apoptóticos (Mahmoud *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2006).

2.3 Modelo de neurodegeneración en edad adulta por trimetilestaño

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por producir pérdida progresiva crónica de materia gris, afectando las funciones neuronales, con la consecuente disfunción cognitiva y motora, esto se debe a la acumulación de proteínas con características fisicoquímicas alteradas, desregulación energética, pérdida de homeostasis iónica, cambios metabólicos y neuroinflamación (Kovacs, 2018). Dentro de las enfermedades neurodegenerativas se encuentra la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica (Wajda *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). Una de las causas principales de la pérdida de homeostasis iónica, es el glutamato ya que juega el papel principal para desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, mediante desbalance de calcio intracelular, aumento del estrés oxidativo, por neuroinflamación y por aumento de expresión de receptores a glutamato activados por NMDA (Bambrick *et al.*, 1995; Yuksel *et al.*, 2019).

Uno de los principales mecanismos de los efectos tóxicos del glutamato se da mediante los receptores ionotrópicos NMDA. Sin embargo, inhibir la apertura de los receptores tipo NMDA con antagonistas provoca efectos secundarios mortales, además, se limita la participación de los mismos receptores en los mecanismos de plasticidad neuronal. Es necesario resaltar que, la participación de los receptores NMDA en la neuroplasticidad y en excitotoxicidad, es causa de la localización extrasináptica y sináptica de los receptores NMDA, siendo los receptores sinápticos preferentemente conformados por GluN2A los que promueven la neuroplasticidad, mientras que los receptores extrasinápticos conformados por GluN2B promueven la muerte neuronal en la excitotoxicidad, lo cual se observa en enfermedades neurodegenerativas, así como en isquemia, traumatismos y epilepsia (Parsons y Raymond, 2014; Bambrick *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1991).

Neuromodulación

Similar a lo ocurrido en las diferentes enfermedades antes mencionadas, el compuesto trimetilestaño (TME), utilizado en la industria para inhibir la degradación del PVC, como pesticida, encontrado en productos domésticos y en las bebidas que almacenan (Baciak *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2006), provoca neurodegeneración además de neurotoxicidad, induciendo muerte neuronal selectiva, neuroinflamación y cambios en el comportamiento por deterioro cognitivo, además, los síntomas que produce en humano son similares que los producidos en roedores (Baciak *et al.*, 2017; Trabucco *et al.*, 2009; Geloso *et al.*, 2011). Así mismo, se considera un modelo de neurodegeneración en rata confiable debido a que se ha mostrado, mediante técnicas de neuroimagen, una disminución del volumen del hipocampo, contracción de tejido cerebral y agrandamiento ventricular, a consecuencia de la muerte neuronal selectiva en sistema límbico, particularmente en los subcampos CA1 y CA3 del hipocampo, corteza piriforme, corteza entorrinal, amígdala además del tubérculo olfatorio en ratas (Baciak *et al.*, 2017). Contrario a lo que ocurre en ratones, donde la lesión se evidencia principalmente en giro dentado. Las manifestaciones conductuales también son diferenciales entre roedores. En ratones se han mostrado convulsiones máximas al día dos después de la administración de trimetilestaño y cese de síntomas seis días después (Lee *et al.*, 2016; Geloso *et al.*, 2011). Mientras que en ratas provoca síntomas como hiperactividad, irritación, agresividad, convulsiones, alteraciones en actividad locomotora, déficit de aprendizaje, interrupción en aseo personal, ansiedad y síntomas similares a la depresión; dichos síntomas inician en el día dos después de la administración intraperitoneal de trimetilestaño con afección progresiva hasta la semana tres (Park *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016; Geloso *et al.*, 2011). Por otra parte, el trimetilestaño es capaz de modificar el comportamiento electrofisiológico de los receptores a glutamato tipo AMPA y NMDA, reduciendo la corriente entre 4-35% dependiendo de la concentración de trimetilestaño, siendo las más significativas 1, 10 y 100 $\mu\text{mol/L}$ (Krüger *et al.*, 2005). Considerando lo anterior, cabe señalar que trimetilestaño causa efectos irreversibles en el receptor inotrópico de glutamato activado por AMPA, pero reversibles en el receptor activado por NMDA (Krüger *et al.*, 2005). Asimismo, el trimetilestaño puede aumentar la liberación de glutamato de los sinaptosomas en rebanadas corticales e hipocampales de ratas Sprague-Dawley, de manera dependiente de la concentración, parcialmente del calcio

Neuromodulación

(<35%) y dicho efecto no se inhibe totalmente con bloqueadores de calcio tipo L-, N-, y T-, ni con antagonistas del receptor NMDA, sin embargo, si hay una reducción del efecto de trimetilestaño con la aplicación de diltiazem, un bloqueador de canales de calcio. Simultáneamente puede inhibir la recaptación de glutamato tanto en los sinaptosomas como en las vesículas sinápticas. Aparentemente el efecto de aumento de la liberación de glutamato tiene un componente independiente de calcio pues el tratamiento con inhibidores del transporte de aniones, inhibe el flujo de glutamato inducido por TME (Patterson, 1996).

En otro estudio se corrobora la liberación de glutamato inducida por trimetilestaño en rebanadas corticales, en mayor medida en presencia de calcio que en la ausencia del mismo ion, sin una diferencia de tal efecto en grupos separados por la edad. Además, se evidencia aumento de la liberación de aspartato, GABA, taurina solo en presencia de calcio y un incremento de la liberación de glicina y alanina, demostrando también que el aumento de la liberación de glutamato es dependiente de la concentración de trimetilestaño, siendo la concentración más efectiva 1mM (Dawson *et al.*, 1995).

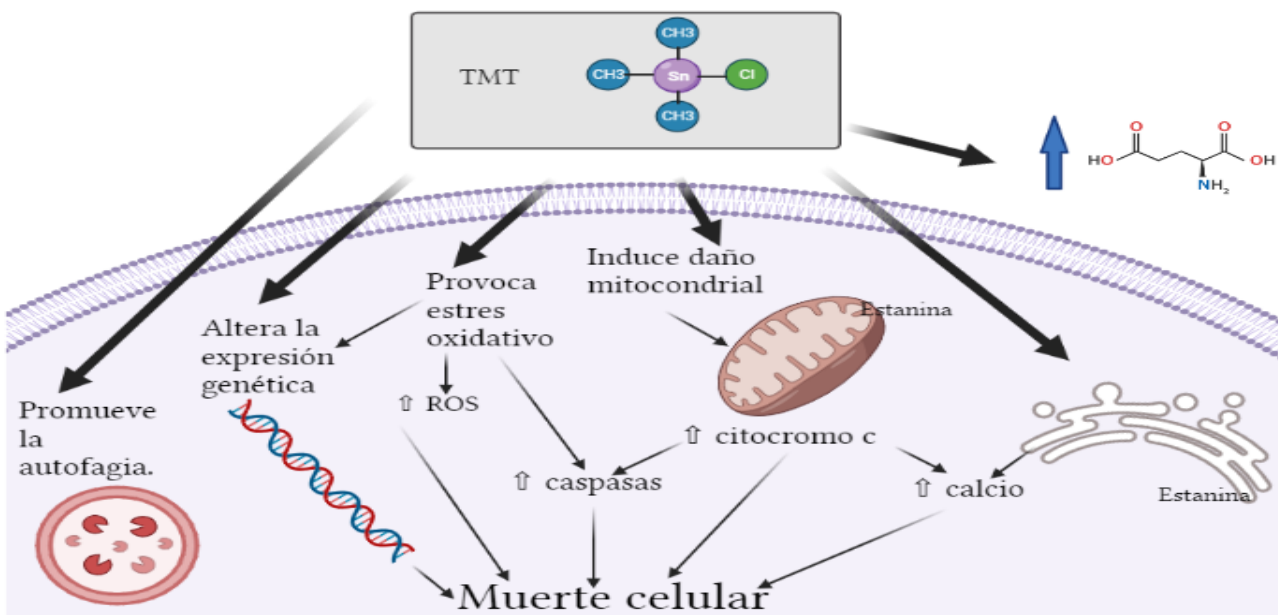


Figura 6. Mecanismos de TME para generar daño celular: Modifica la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia como LC3-II, beclin-1 y SQSTM1/P62; aumenta la expresión de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno; induce daño mitocondrial y promueve la liberación de calcio de las reservas intracelulares.

Neuromodulación

En relación con los efectos a nivel celular, se sugiere que el trimetilestaño afecta mediante: la sobrecarga de calcio, genera especies reactivas de oxígeno/nitrógeno, fragmenta el ADN, produce daño mitocondrial (figura 6), disminuye los niveles de glutamato, acetilcolina, GABA y noradrenalina en roedores, además activa la microglía y astrocitos (Baciak *et al.*, 2017; Geloso *et al.*, 2011). Por el contrario, se ha observado en *Sebastiscus marmoratus* que la exposición a trimetilestaño provoca aumento en niveles del glutamato, el aspartato y el GABA, influjo de calcio y alteraciones en la expresión de los receptores NMDA, aumentando su expresión con bajas dosis 5g/kg de trimetilestaño, pero reduciendo su expresión con altas dosis 50-500g/kg de trimetilestaño (Zuo *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado en el modelo de neurodegeneración por la administración de trimetilestaño en rata, que se modifica la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia (Atg) en el hipocampo. Aumenta la expresión de LC3-II, la cual tiene como función regular la formación y elongación del autofagosoma, con un efecto máximo a los cinco días después de la administración de trimetilestaño y reduce la expresión tanto de beclin-1 como de SQSTM1/P62 (secuestrosoma-1 o proteína de unión a ubiquitina P62), que participan en la formación de un complejo promotor de la nucleación de la membrana autofagosomal (Ceccariglia *et al.*, 2019). Así mismo, se evidenció un aumento en la apoptosis a partir del quinto día después de la administración de trimetilestaño en CA1 y CA3, junto con un aumento en la expresión de la caspasa-3 escindida y del citocromo c citoplasmático, aumento el cual corresponde a un evento crucial en la activación de la vía apoptótica intrínseca (Ceccariglia *et al.*, 2019; Fricker *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2006). Otra evidencia más de la activación de procesos apoptóticos como resultado de la aplicación de trimetilestaño, surge al evaluar su aplicación en cultivos celulares, donde se demuestra que las concentraciones 0.5-5 μM de trimetilestaño causan cambios apoptóticos como condensación de cromatina, contracción de la membrana celular y marginación dentro del núcleo. Sin embargo, concentraciones entre 10-40 μM provocan muerte celular por necrosis, determinado por la ruptura de la membrana plasmática (Ceccariglia *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2006). Simultáneamente, se comprobó que aumentan los niveles de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno intracelulares de manera dependiente de la concentración de trimetilestaño, mediado por el aumento en la expresión de la enzima

Neuromodulación

óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), un proceso asociado con la apoptosis debido a la activación de proteínas pro-apoptóticas (Bax, y activación de caspasa-3), posteriormente ocurre disfunción mitocondrial y culmina el proceso con muerte celular (Zhang *et al.*, 2006). De manera análoga, se dio a conocer, mediante estudios en cultivos celulares que la exposición directa de las células a trimetilestaño en concentraciones 4.0 μM , 6.0 μM , y 8.0 μM , disminuye el crecimiento de neuritas y aumenta la fragmentación de ADN de forma dependiente de la concentración, en presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF). De forma paralela, en los cultivos antes mencionados, las concentraciones 6.0 μM , y 8.0 μM de trimetilestaño disminuyen también el tamaño del cuerpo celular, lo cual se relaciona con un aumento en el porcentaje de células no viables, de un 7% en condiciones fisiológicas a 16% y 18%, respectivamente (Jenkins y Barone, 2004). Por último, se encontró que aumenta el porcentaje tanto de la forma activa de la caspasa-9 del 3% al 44% en presencia de 6.0 μM de trimetilestaño 18 horas después del tratamiento, como de poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), una familia de proteínas implicadas en la activación de la apoptosis, del 4% en condiciones fisiológicas, al 23% (Jenkins y Barone, 2004).

En cuanto a la dosis administrada de trimetilestaño, en la literatura se ha reportado que la administración de 5mg/kg por 4 días en ratas adultas (P45-P60) Long-Evans por intubación gástrica, causa pérdida de peso y mutilación de la cola posterior a la segunda dosis, agresividad a partir de la tercera dosis y convulsiones fatales después de la cuarta dosis. Adicional a lo anterior, 24 horas después de la tercera dosis hubo muerte neuronal en el giro dentado y en menor medida en *cornu ammonis*. Además, para el momento de la cuarta dosis la muerte neuronal alcanzó su punto máximo en ambas zonas del hipocampo (Bouldin *et al.*, 1981).

Habría que decir también que el efecto de trimetilestaño en relación con su análogo trietilestaño es totalmente diferente en ratas. El daño neuronal en ratas expuestas a trimetilestaño se manifiesta, como se mencionó anteriormente, en hipocampo, amígdala, corteza piriforme y neocorteza. Mientras que los efectos de trietilestaño son: edema intersticial en la materia blanca del cerebro y la médula espinal, resultado de la vacuolización de la vaina de mielina (Cook, *et al.*, 1984).

Neuromodulación

Además, después de la administración intraperitoneal de 6mg/kg de trimetilestaño y trietilestaño, se evidencia una mayor concentración de trietilestaño en el cerebro, hígado y riñones que de trimetilestaño, después de 24 horas. Por su parte, los niveles de estaño fueron los mismos en corazón y la sangre después de la administración de trimetilestaño y trietilestaño. Además, trietilestaño tiene un tiempo de degradación más corto y mayor tasa de eliminación a comparación con trimetilestaño. Finalmente, no encontraron diferencias significativas en la concentración de trimetilestaño en cerebelo, hipotálamo, hipocampo y el tronco cerebral (Cook, *et al.*, 1984).

3. Planteamiento del problema

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por producir pérdida progresiva crónica de materia gris afectando las funciones neuronales, con la consecuente disfunción cognitiva y motora, estas enfermedades incluyen el Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrofica. Además, los mecanismos moleculares de la neuroinflamación son probablemente los mismos que en las enfermedades neurodegenerativas, los accidentes cerebrovasculares, el envejecimiento y las enfermedades metabólicas (Wajda *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016).

Se debe agregar que, el 30% de los pacientes con Parkinson presentan demencia, el 50% de los pacientes con esclerosis múltiple presenta deficiencias cognitivas, y la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por un progresivo deterioro cognitivo. También se ha demostrado que las tareas cognitivas disminuyen el rendimiento motor, por lo tanto, se habla de una relación patológica entre ambas (Wajda *et al.*, 2016).

Por lo que respecta a la disfunción en hipocampo en edades tempranas, hay que mencionar que provoca trastornos neuropsiquiátricos, acompañados con deterioro cognitivo progresivo y patologías comórbidas. Generalmente la propia vulnerabilidad del hipocampo conduce a una lesión permanente y selectiva, por ello es un modelo útil para estudiar la neurodegeneración que afectan la fisiología neuronal (Marchese *et al.*, 2018).

Por lo que se refiere a trimetilestaño, es un compuesto utilizado en la industria de plásticos capaz de causar neurodegeneración tras su exposición accidental o por la administración de

Neuromodulación

manera experimental en roedores, afectando principalmente a hipocampo (Baciak *et al.*, 2017; Trabucco *et al.*, 2009). El trimetilestaño ha sido estudiado desde las primeras intoxicaciones en humanos, producto de altas concentraciones en embaces o por ingestión de los trabajadores que lo manipulan, afectando las funciones cognitivas de los humanos. Recientemente se ha propuesto que la administración experimental de trimetilestaño en roedores genere un modelo de neurodegeneración, se ha vinculado con Alzheimer (Geloso *et al.*, 2011).

En la literatura se reporta que la administración de 5mg/kg por 4 días de trimetilestaño en ratas adultas (P45-P60) Long-Evans por intubación gástrica, causa pérdida de peso y mutilación de la cola a la segunda dosis, agresividad a la tercera dosis y convulsiones fatales después de la cuarta dosis. Reportaron también que 24 horas después de la tercera dosis existe muerte neuronal en el giro dentado y en menor medida en *cornu ammonis*; para la cuarta dosis la muerte neuronal fue mayor en ambas zonas del hipocampo (Bouldin *et al.*, 1981). Así mismo, trimetilestaño reduce la corriente que generan los receptores NMDA y AMPA entre 4-35% dependiendo de su concentración, tras su aplicación directa en las neuronas (Krüger *et al.*, 2005).

Por lo cual el presente proyecto evaluó el efecto de la administración sistémica de trimetilestaño sobre la corriente activada por NMDA en neuronas disociadas de los subcampos CA1 y CA3.

Es importante mencionar que la limitante de esta investigación es que no da información suficiente para considerar un posible tratamiento ante enfermedades neurodegenerativas por el análisis en célula agudamente disociada; por lo cual las investigaciones futuras deberán evaluar el papel del receptor en grupos de neuronas, aumentando los niveles de organización, debido a que es probable que varíe el comportamiento electrofisiológico del receptor NMDA.

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de Neuromodulación a cargo del D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández y con el asesoramiento del D.C. Luis Gustavo Hernández Carballo en un periodo de tiempo de agosto de 2019 con la presentación de la propuesta

de investigación hasta enero 2021 con la conclusión del proyecto.

4. Pregunta de investigación

¿Qué cambios se producen sobre la corriente que genera el receptor de glutamato activado por NMDA, en un modelo en rata de neurodegeneración inducido por la administración de trimetilestaño, en neuronas agudamente disociadas de los subcampos CA1 y CA3 de hipocampo?

5. Hipótesis

El modelo de neurodegeneración inducido por la administración de trimetilestaño en rata modifica el tamaño de las corrientes iónicas activadas por NMDA en neuronas agudamente disociadas de los subcampos CA1 y CA3.

6. Objetivos

6.1 General

Determinar el efecto sobre la corriente iónica activada por NMDA, de la neurodegeneración inducida por la administración de trimetilestaño en neuronas agudamente disociadas de los subcampos CA1 y CA3 de hipocampo.

6.2 Específicos

- 1.** Caracterizar y evaluar la corriente activada por NMDA mediante una curva dosis respuesta en neuronas piramidales de los subcampos CA1 y CA3 en hipocampo, tras la administración del vehículo del trimetilestaño en rata.
- 2.** Evaluar la corriente activada por NMDA en neuronas piramidales de hipocampo en CA1 y CA3, en modelo de neurotoxicidad inducido por la administración trimetilestaño en rata.

7. Materiales y métodos

7.1 Norma.

Los procedimientos realizados en el presente protocolo serán llevados a cabo bajo la NOM-062-ZOO-1999.

7.2 Tamaño de la muestra

Se utilizaron 24 ratas Long-Evans machos de 45 días de edad, procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Doce de ellas fueron para el cumplimiento del objetivo uno, es decir, para caracterizar y evaluar la corriente que permite el receptor de glutamato activado por NMDA en neuronas piramidales de CA1 y CA3; previo al registro a las ratas se les administró solución salina (vehículo) durante tres días, al cuarto día se realizó el registro electrofisiológico *voltage clamp* en célula completa aplicando diferentes concentraciones del agonista NMDA directamente en la célula.

Para el cumplimiento del objetivo dos, se ocuparon 12 ratas, a las cuales se les administró trimetilestaño por tres días, posteriormente se realizó el registro electrofisiológico *voltage clamp* en célula completa diferentes concentraciones de aplicando NMDA.

Para generar una muestra representativa de los diferentes efectos que se evaluaron se consideró una $n=12$, por lo tanto, en cada objetivo se necesitó un mínimo de 12 ratas, ya que en promedio se obtiene 1 célula por rata.

7.3 Área de muestreo

En la literatura se reporta que la administración por intubación gástrica de trimetilestaño por cuatro días en ratas adultas Long-Evans (P45-P60) de 5mg/kg (dosis altas a corto plazo), provoca, 24 horas después de la tercera dosis, muerte neuronal en el giro dentado y en menor medida en *cornus ammonis*; para la cuarta dosis la muerte neuronal es mayor en ambas zonas del hipocampo (Bouldin *et al.*, 1981). De ahí que el estudio se realizó en hipocampo con registro en CA1 y CA3; no se consideró la región CA2 y giro dentado debido a que se evaluaron los efectos en la zona perilesión, es decir en la zona de penumbra que contiene la mayor afectación por excitotoxicidad.

7.4 Cepa de la rata

La elección de la cepa Long-Evans se determinó de acuerdo con lo reportado por Boulding *et al.*, 1981, debido a que la administración de 5mg/kg en esta cepa asegura el daño en giro dentado, lo cual fue benéfico para la investigación pues el registro se debe hacer en zonas aledañas a la lesión real, por la misma razón el registro se hizo 24 horas después de la tercera dosis y no se esperó hasta la cuarta dosis de trimetilestaño, además se consideró que la muerte neuronal es progresiva.

7.5 Modelo de daño neurotóxico

Trimetilestaño se aplicó en dosis de 5mg/kg/día durante tres días, vía intubación gástrica. 24 horas después de la tercera dosis se procedió al registro electrofisiológico debido a que la muerte neuronal en giro dentado se comprobó en dicho tiempo mediante el estudio de Boulding *et al.*, 1981.

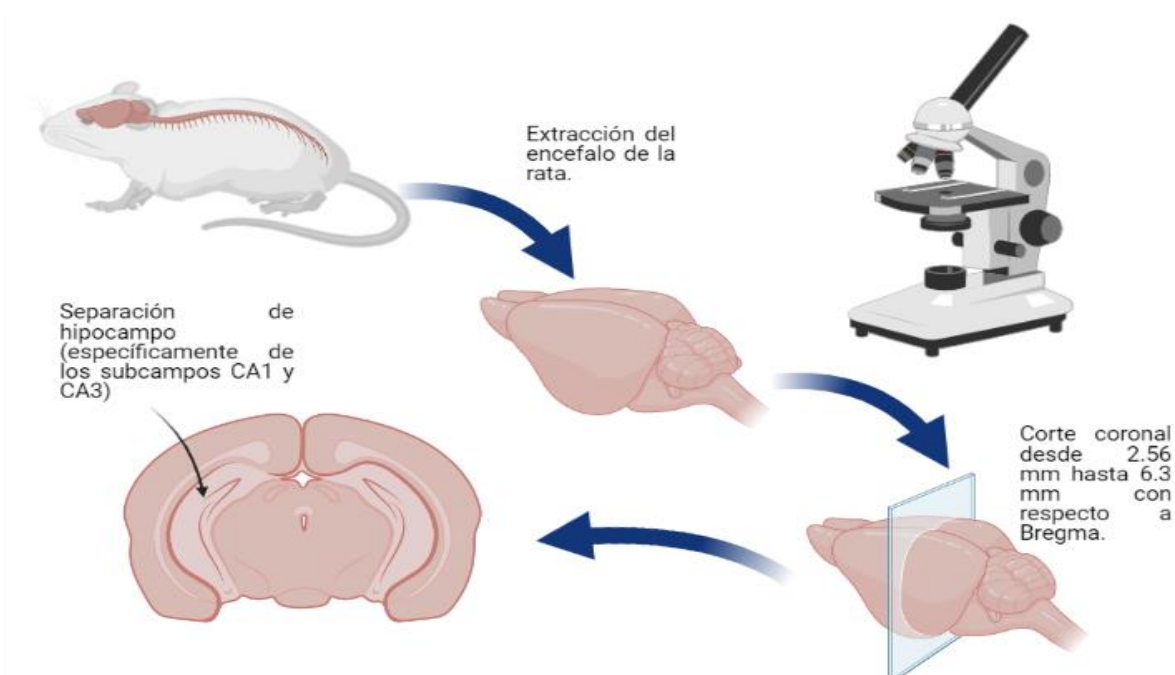


Figura 7. Esquema del proceso de extracción del encéfalo y realización de cortes coronales para la separación de los subcampos del hipocampo CA1 y CA3.

Neuromodulación

Se eligió trimetilestaño por causar neurodegeneración específica en hipocampo, mediante mecanismos de necrosis y excitotoxicidad en las neuronas de las zonas centrales de afección y zonas aledañas.

7.6 Registro electrofisiológico

El registro electrofisiológico se realizó de acuerdo con lo reportado por Surmeier *et al.* (1991) y reproducido por Flores-Hernandez *et al.*, (2000); Cai *et al.*, (2002); al cual se le hicieron modificaciones para acoplarlo al presente protocolo.

En primer lugar se anestesiaron a los ratas con la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico 40mg/kg para después decapitarlas con instrumentos de disección, en seguida el cerebro se retiró rápidamente y se colocó en solución de isetionato a baja temperatura la cual contiene: 140mM isetionato de sodio, 2mM KCL, 2mM MgCl₂, 0.1mM CaCl₂, 23mM glucosa, 15mM HEPES, pH= 7.4, 300 a 310mOsm/L, además, se le agregaron los siguientes suplementos: 1mM ácido pirúvico, 0.005mM glutatión, 0.1mM NG-nitro-L-arginina, 1mM ácido kinurénico y se oxigenó. Posteriormente se separó desde el polo medio hasta el posterior del cerebro, que contienen al hipocampo, luego se posicionó sobre una placa en vibratomo y se agregó isetionato, finalmente se seccionó de manera coronal a 350µm, desde 2.56mm hasta 6.3mm, con respecto a Bregma, de acuerdo con el atlas Paxinos, y se aislaron las zonas CA1 y CA3 de hipocampo mediante instrumentos de disección (Figura 7).

Después, los fragmentos se mantuvieron 45 minutos a 30°C en solución salina balanceada de Earle (EBSS) la cual es amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) más los suplementos 1mM ácido pirúvico, 0.005Mm glutatión, 0.1mM NG-nitro-L-arginina, 1mM ácido kinurénico, burbujeada con O₂ al 95% y CO₂ al 5%, pH= 7.4 y 300 a 310 mOsm/L.

Se transfirieron los cortes a la solución balanceada de Hanks (HBSS) para iniciar el proceso de disociación enzimática por 10 minutos, esta solución contiene 0.75mg/ml de papaína (Calbiochem) a 33°C amortiguada con HEPES y burbujeada con O₂, suplementada con: 1mM ácido pirúvico, 0.005mM glutatión, 0.1mM NG-nitro-Larginina, 1mM ácido kinurénico.

Neuromodulación

Pasando los 10 minutos se lavó el tejido con isetionato para proseguir con la disociación mecánica mediante pipetas Pasteur de diferentes calibres pulidas por fuego; finalmente las células suspendidas se agregaron en cajas de Petri de 35mm que fueron montadas al microscopio donde se registraron, se esperó un tiempo de 10 minutos para que las células se adhieran a la caja de Petri y se lavó con solución externa: 140mM NaCl, 2mM KCL, 2mM MgCl₂, 0.1mM CaCl₂, 23mM glucosa, 15mM HEPES y rojo fenol, pH= 7.4, 300 a 310mOsm/L, burbujeada con O₂.

7.7 Técnica de fijación de voltaje en célula completa

Una vez realizado el procedimiento anteriormente descrito se procedió al registro por técnica de fijación de voltaje en célula completa. Se prepararon los electrodos de registro mediante el estiramiento de tubos de capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI 1B120F4) con un Micropipette Puller Modelo p-97 (Sutter Instrument Co). La solución interna contiene: 175mM N-metil-D- glutamina (NMDG), 40mM HEPES, 2mM MgCl₂, 10mM ácido etilen glicol-bis (β- aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), 12mM fosfocreatina, 3mM Na₂ATP, 0.35mM Na₃GTP, 0.1mM leupeptina, pH = 7.3 con H₂SO₄, 265 – 270 mOsm/L; mientras que la solución externa: 127mM NaCl, 20mM CsCl, 5mM BaCl₂, 2mM CaCl₂, 12mM glucosa, 10mM HEPES, pH = 7.3 con NaOH, 300-305 mOsm/L.

Para realizar el registro se usó el amplificador “voltaje 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.

La resistencia del electrodo en promedio fue de 6-10MΩ en el baño. Después de la ruptura del sello la resistencia serial fue menor a 25MΩ. No se consideraron los registros con un cambio en la resistencia serial mayor al 50%. Una vez obtenido el sello, el potencial de membrana se mantuvo en -60mV en las neuronas piramidales. Se registraron las células con menor cantidad de dendritas y con características morfológicas estables.

7.8 Agentes farmacológicos

N-metil-D aspartato (NMDA), glicina y trimetilestaño, fueron obtenidos de SIGMA-Aldrich Company.

Para generar las corrientes activadas por ligando se aplicó solución externa y solución externa + NMDA mediante dos capilares formando ángulo de 45° y a una distancia de $300 \pm 100 \mu\text{m}$ de la célula que se registró. En los capilares uno contuvo solución externa o control y el otro se cargó con solución externa + ligando a usar. Se controló el intercambio de soluciones por válvulas solenoides 98302-00 (Cole-Parmer) reguladas por el sistema Digidata 1322A y una herramienta de control fabricado en laboratorio.

En primer lugar, a la célula se le aplicó la solución control para después aplicarle la solución control + el ligando durante 2s a 6s, regresando a la solución control.

7.9 Protocolos electrofisiológicos

7.9.1 Rampa

Con el objetivo de evaluar la viabilidad neuronal, al inicio del registro de cada célula se realizó una rampa de voltaje con los siguientes cambios de voltaje -100mV a $+40\text{mV}$ en 100ms tiempo necesario para generar corrientes de Na^+ y Ca^{2+} , a una frecuencia de muestreo de $100\mu\text{s}$ - 10kHz , las neuronas que se consideraron viables presentan corrientes de sodio y de calcio (Figura 8).

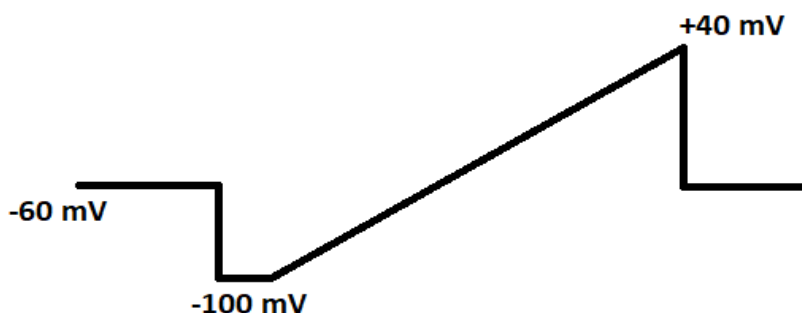


Figura 8. Protocolo de cambios de voltaje durante el registro inicial de una neurona, inicia desde un potencial de membrana en reposo en -60mV , disminuye a -100mV y aumenta progresivamente hasta $+40\text{mV}$

7.9.2 Aplicación de NMDA

Se mantuvo el potencial de membrana en -60mV , y cada 3 segundos se aplicó NMDA en una de las concentraciones comprendidas entre $0.3\mu\text{M}$ hasta $300\mu\text{M}$ ($0.3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, y $300\mu\text{M}$), una a la vez de manera aleatoria. Se registró la actividad de la corriente iónica a una frecuencia de 500Hz , un punto cada 2 milisegundos. Al inicio de cada barrido se aplicó un pulso cuadrado de -70mV durante 200ms para llevar un seguimiento de los cambios en la resistencia de membrana, no obstante, no se consideraron los registros con un cambio del 10%. Esta condición se mantuvo hasta completar 3 o 4 trazos de corriente estable, se tomó como control y lavado el efecto de $100\mu\text{M}$ de NMDA (Figura 9).

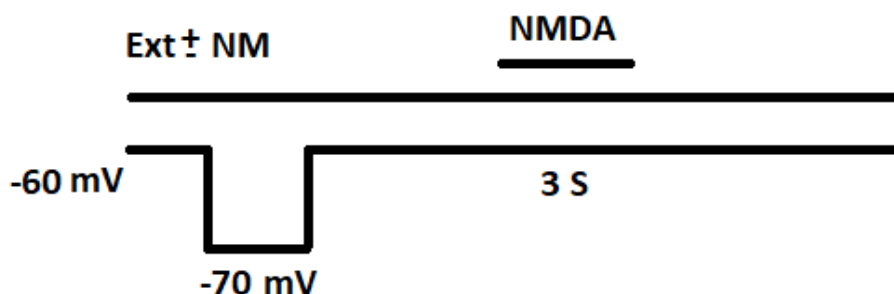


Figura 9. Protocolo de aplicación de NMDA y mantenimiento del potencial de membrana en reposo.

8. Análisis estadístico

Los valores en tablas, gráficas o texto representan el valor de la media de los resultados obtenidos \pm su error estándar de la media (ESM). Los ajustes y gráficas se realizaron en el programa Origin 9.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). En el análisis estadístico, los datos fueron analizados primero con una prueba Shapiro ($p < 0.05$) para determinar el comportamiento de una distribución normal. Las diferencias entre las medias de grupos experimentales serán analizadas mediante la prueba "t" apropiada o un análisis de varianza correspondiente.

Para el análisis de la curva dosis efecto, se eligió la función matemática que mejor describió los datos obtenidos. Se consideró una función sigmoidea simétrica (Ecuación 1), una función sigmoidea asimétrica (Ecuación 2), un modelo de crecimiento exponencial (Ecuación 3) y una fusión lineal, eligiéndose como mejor ajuste la que tuviera el valor numérico menor en

Neuromodulación

el criterio de Akaike (AIC), la cual fue la función sigmoidea simétrica. La fórmula que se utilizará para este ajuste es la siguiente:

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

$$y = A1 + \frac{A2-A1}{1+e^{-K(x-xc)}} \quad (2)$$

$$y = A1 + (A2 - A1)(1 - e^{-\frac{x}{t}}) \quad (3)$$

A1 = Límite inferior de la curva (Min).

A2 = Límite superior (Max).

K = Valor de la pendiente (Pndte).

Xc = valor de la dosis efectiva 50 (EC50)

t = valor de la constante de crecimiento de la curva.

El cálculo del AIC se realizó con base en la formula

$$AIC = -2\log(L(\hat{\theta})) + 2K \quad (4)$$

Donde K es el número de parámetros estimados, n corresponde al número de datos utilizados para el ajuste y $\log(L(\hat{\theta}))$ es calculado a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\left(L(\hat{\theta})\right) = -\frac{1}{2}n\log(\delta^2) - \frac{n}{2}\log(2\pi) - \frac{n}{2} \quad (5)$$

$$\delta^2 = \frac{RSS}{n} \quad (6)$$

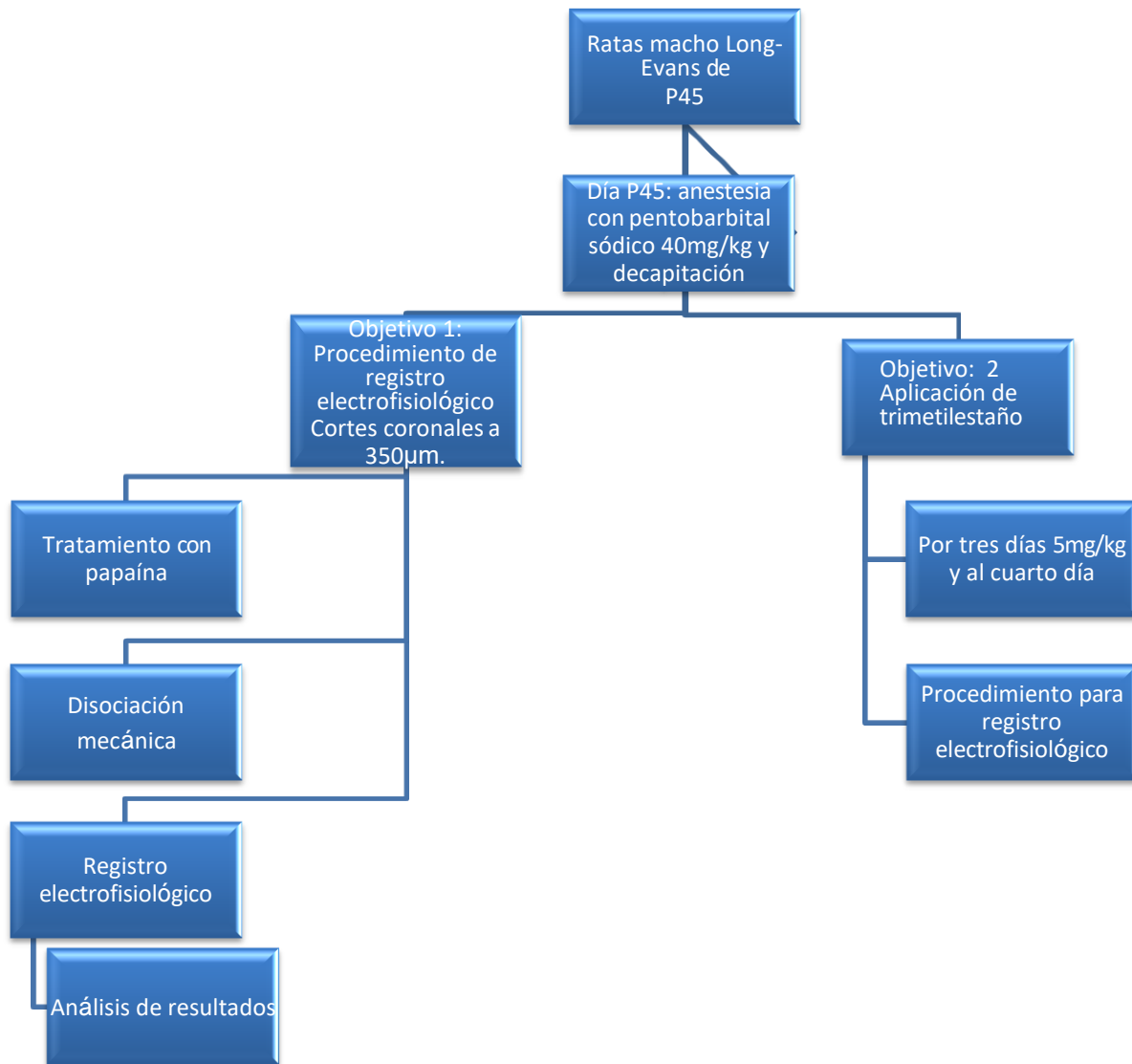
Finalmente, una vez determinado el modelo que mejor describe los datos (función sigmoidea), se obtuvo el ajuste de la misma función para los datos del grupo control y para los del grupo tratado, posteriormente se realizó una comparación estadística de las curvas a través de la siguiente formula:

Neuromodulación

$$F = \frac{((SM-(SC+ST))/k)}{\left(\frac{SC+ST}{NC+NT-2k}\right)} \quad (7)$$

Donde SM corresponde a la 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 y NT son el número de observaciones para el grupo control y tratados, respectivamente, por último, k es el 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, fue realizada en el entorno de programación R con ayuda del paquete *drc* (Hernández-Carballo et al., 2020).

9. Diagrama de trabajo



10. Resultados

Para analizar si el fármaco trimetilestaño causa alteraciones en la vía glutamatérgica, se evaluaron los efectos de la administración de trimetilestaño vía intubación gástrica de 5 mg/kg durante tres días, tanto en el pico de la corriente iónica que permite el receptor a glutamato tipo NMDA, como de su estado estacionario, en una curva dosis-respuesta de NMDA desde 0.3 μM hasta 300 μM en los subcampos CA1 y CA3 de ratas Long-Evans. Los resultados en el pico de la corriente se ajustaron a una curva sigmoidea y se compararon con una prueba F, evidencian un efecto significativo en la corriente que permite el receptor NMDA entre el grupo tratado con trimetilestaño (TME) y las ratas control para ambos subcampos (CA1 $F_{4,139}=2.4726$, $p=0.04759^*$; CA3 $F_{482}=2.8129$, $p=0.03128^*$). Mientras que el análisis en el estado estacionario ajustado a una curva sigmoidea refleja una diferencia estadísticamente significativa en la prueba F en el subcampo CA3 (CA3 $F_{499}=3.2778$, $p=0.01473^*$), sin embargo, no se observa el mismo efecto en el subcampo CA1 (CA1 $F_{4,131}=0.27475$, $p=0.8938$).

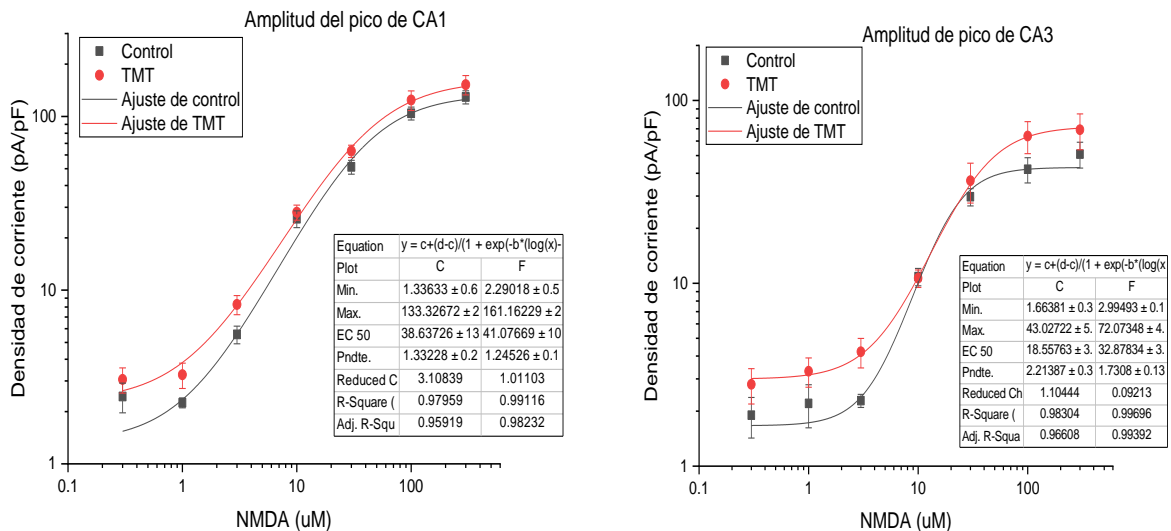


Figura 8. Curva dosis respuesta de NMDA desde 0.3 μM hasta 300 μM para ambos grupos y para ambas áreas. Se analizó la amplitud del pico de las corrientes para cada concentración. Posteriormente los datos se ajustaron a una función logística (línea continua). Finalmente se compararon los ajustes con una prueba F. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos para cada área (CA1 $F_{4,139}=2.4726$, $p=0.04759^$; CA3 $F_{482}=2.8129$, $p=0.03128^*$).*

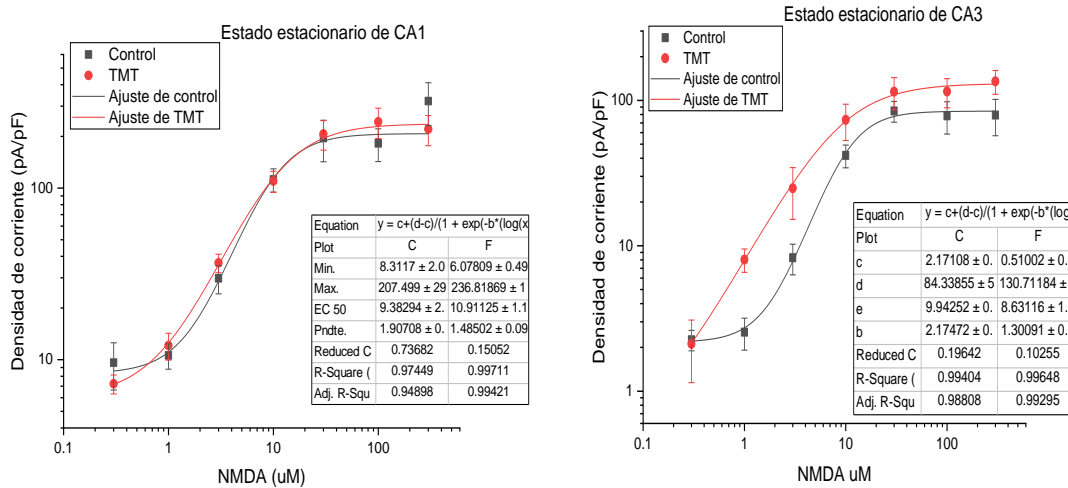


Figura 9. Curva dosis respuesta de NMDA desde 0.3 μ M hasta 300 μ M para ambos grupos y para ambas áreas. Se analizó el estado estacionario de las corrientes para cada concentración. Posteriormente los datos se ajustaron a una función logística (línea continua). Finalmente se compararon los ajustes con una prueba F. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos para CA3, no obstante, no fue así para CA1 (CA1 $F_{4,131}=0.27475$, $p=0.8938$; CA3 $F_{499}=3.2778$, $p=0.01473^$).*

Para demostrar que el efecto del trimetilestaño sobre la corriente que permite el receptor NMDA, no es por cambios en la resistencia de membrana, se registró dicho parámetro a lo largo de las curvas dosis respuesta antes mostradas. Se realizaron pruebas ANOVA de dos vías tipo III ocupando como factores la concentración de NMDA aplicados en la curva dosis-respuesta y el grupo (control o TME), mostrando diferencia significativa entre grupos (CA1 $F_1=4.9914$, $p=0.02706^*$; CA3 $F_1=20.8554$, $p=1.5e-05^*$), contrario a los valores por concentración (CA1 $F_6=0.4384$, $p=0.8521$; CA3 $F_6=0.8957$, $p=0.5015$). Además, los resultados indican que las células analizadas tienen una resistencia de membrana por encima de 1 G Ω para ambas áreas en todos los grupos y concentraciones, lo cual adquiere relevancia para asegurar un sello de membrana adecuado.

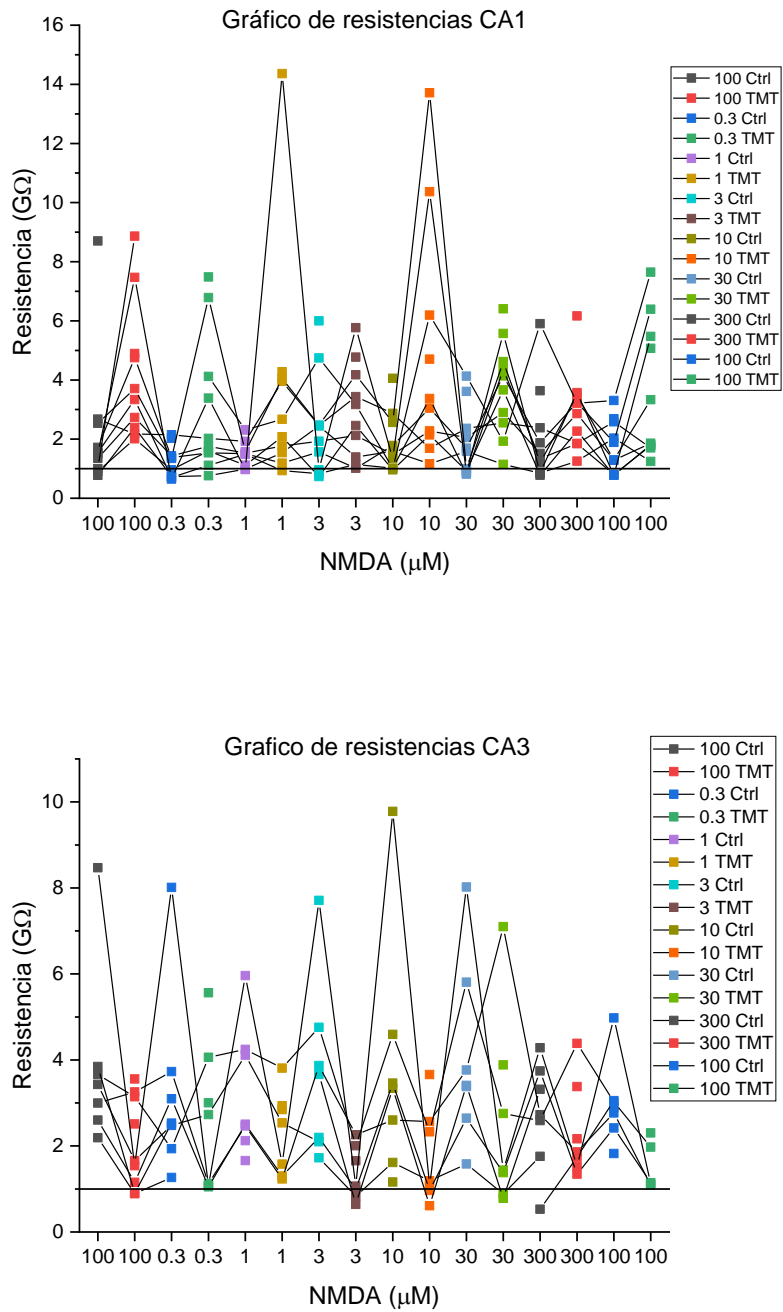


Figura 10. Gráficos de resistencias por área que muestra a los valores de la resistencia de membrana por encima de 1 GΩ, relevante para determinar la viabilidad del sello de membrana y asegurar que las corrientes iónicas observadas son debido a los canales y no a una fuga de corriente, en cada concentración de la curva dosis-respuesta de NMDA y para cada grupo.

Neuromodulación

Se obtuvieron los resultados de un total de 17 ratas y 37 neuronas. En promedio se registraron 2 neuronas por rata. Durante los registros electrofisiológicos se extrajo la capacitancia de las neuronas como una medida del tamaño celular, con el fin de evaluar si la población de células registradas sigue una distribución normal. La capacitancia celular promedio fue 14.92 pF para CA1 control (n=10), 10.29 pF para CA1 TME (n=10), 9.46 pF para CA3 control (n=8) y 13.71 pF para CA3 TME (n=9). Valores que corresponden con los reportados por Yan et al., 2007, al señalar una media de 12.3 pF (n=48) para CA3, mientras que para CA1 se reporta una media de 13.45 pF (n=82) de acuerdo con Alshuaib *et al.*, 2001. Cabe señalar que la moda en todos los grupos evaluados fue de 8 a 12 pF.

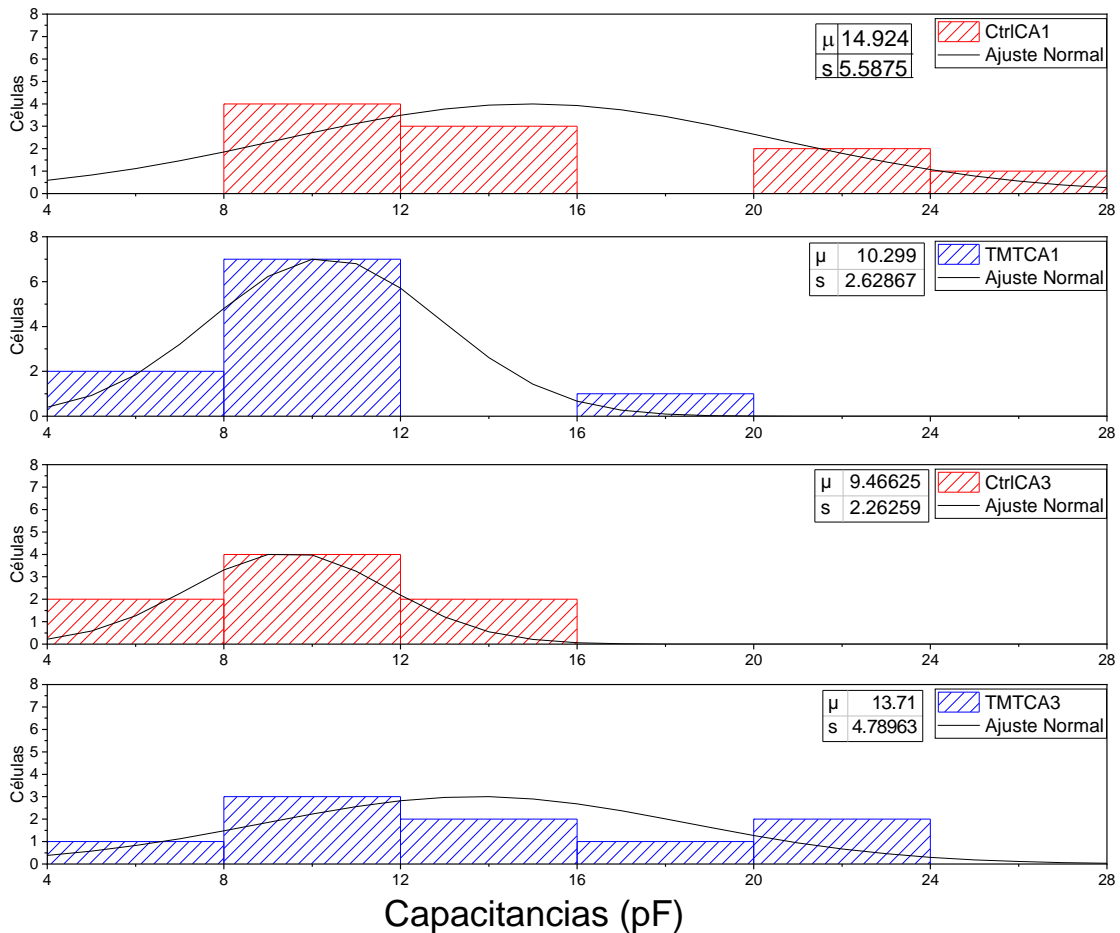


Figura 11. Gráficas de capacitancias por grupo con ajuste de distribución normal, donde se evidencia una moda de 8 a 12 pF para todos los grupos. Cabe señalar que son datos preliminares del estudio por lo que se deben agregar un mayor número de registros de células y completar las gráficas antes mostradas.

11. Discusión

Los efectos a cargo del trimetilestaño en las neuronas del hipocampo son variados y dependen de la forma en que se exponen las células al fármaco, de la concentración, y del tiempo de exposición (Dawson *et al.*, 1995; Patterson, 1996; Piacentini *et al.*, 2008), además el daño neuronal ocurre en distintos tipos celulares dentro del hipocampo dependiendo de la especie, la vía de administración y la dosis (Park *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016; Piacentini *et al.*, 2008). El trimetilestaño es una molécula capaz de generar neurodegeneración a través de la muerte neuronal selectiva en los subcampos CA1 y CA3 en ratas (Geloso *et al.*, 2011), lo cual se logra, por un lado al promover la expresión y activación de los componentes de la ruta apoptótica, específicamente activa la caspasa-3, la caspasa-9, aumenta la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible, promueve la fragmentación del ADN, aumenta la presencia de citocromo C en citoplasma y aumenta el porcentaje de la poli ADP ribosa polimerasa (Jenkins y Barone, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Ceccariglia *et al.*, 2019; Fricker *et al.*, 2018). Por otro lado, promueve un ambiente neurotóxico al aumentar la liberación de glutamato alrededor de 350 veces, en hipocampo y la corteza cerebral, efecto dependiente tanto de calcio extracelular como del transporte de aniones (Patterson, 1996). Además, se ha señalado que la exposición de cultivos celulares a trimetilestaño presentan elevaciones de calcio intracelulares dependientes de la concentración del fármaco (Piacentini *et al.*, 2008; Florea *et al.*, 2005), simultáneamente se ha evidenciado que tales efectos no dependen del calcio extracelular, ya que se ha observado un cambio del nivel de fluorescencia del $109 \pm 6.5\%$ (en ausencia de calcio), a $117 \pm 7.3\%$ (en presencia de calcio) después de la aplicación de $0.5 \mu\text{M}$ de trimetilestaño, por lo que la elevación de calcio intracelular es principalmente por su liberación del retículo endoplásmico y la mitocondria, se añadió que aumenta el nivel de fluorescencia en el núcleo de la célula, lo cual sugiere que parte del calcio liberado por los almacenes intracelulares se dirige al núcleo, dicho evento se relaciona con la activación de mecanismos apoptóticos (Florea *et al.*, 2005; Piacentini *et al.*, 2008). Con estas evidencias en las modificaciones de los niveles de calcio intracelular y la liberación de glutamato al medio extracelular, evaluar los efectos en las modificaciones de las corrientes que permiten los receptores inotrópicos de glutamato es prudente, por lo que en el presente proyecto se analizó el comportamiento electrofisiológico del receptor a glutamato tipo

Neuromodulación

NMDA mediante una curva dosis-respuesta de 0.3 μM a 300 μM de NMDA, un receptor que promueve la entrada de calcio a la célula y es fundamental su papel en la neurotoxicidad, en un modelo de neurodegeneración mediante la administración a las ratas de 5mg/kg durante tres días de trimetilestaño vía intubación gástrica, con lo cual en el presente proyecto se evidenciaron modificaciones en el pico de la corriente para los subcampos CA1 y CA3, así como también en el estado estacionario de la corriente iónica para el subcampo CA3, pero no así para el subcampo CA1. Cabe señalar que los resultados obtenidos son contrarios a lo reportado por Krüger *et al* en 2005, debido a que señala una reducción de la corriente de NMDA del 4 al 35% después de aplicar 1, 10 y 100 $\mu\text{mol/L}$ de trimetilestaño a ovocitos de *Xenopus*. Tal divergencia puede deberse al tiempo de evaluación de los efectos del trimetilestaño en las células, ya que la aplicación directa a las células estaría evidenciando un efecto agudo e inmediato, donde aumente rápidamente la concentración de calcio intracelular como se señaló anteriormente, sin embargo, en la administración a un rata se evidencian cambios sistémicos, y la interacción con otros factores, por ejemplo se ha mostrado que tanto las neuronas como los astrocitos son capaces de aumentar la liberación de glutamato, glutamina, aspartato, GABA, taurina, glicina y alanina, después del tratamiento con trimetilestaño a rebanadas de la corteza cerebral y rebanadas de hipocampo (Dawson *et al.*, 1995; Patterson, 1996). De manera que el aumento de glutamato extracelular como se muestra en la excitotoxicidad corresponde con un aumento de calcio intracelular mediado por el receptor inotrópico de glutamato tipo NMDA, entonces existen eventos secundarios a la administración sistémica de trimetilestaño que no ocurren con la aplicación directa del mismo a las células. No obstante, Dawson *et al* en 1995 indica que el bloqueo con antagonistas no competitivos del receptor NMDA no atenúa la liberación de glutamato inducida por trimetilestaño. Este evento sugiere que la entrada de calcio por el receptor NMDA puede no ser significativa, sin embargo, los estudios de Piacentini *et al.* en 2008 señalan que la entrada de calcio extracelular a través del canal Ca_v1 promueven el aumento de calcio intracelular en las fases tempranas de la exposición a trimetilestaño (20 a 25 minutos de tratamiento), mientras que la liberación de calcio de las reservas intracelulares corresponde a etapas tardías (40 minutos). A este respecto parece ser que la participación de los canales iónicos es temprana, mientras que la liberación de calcio por las reservas intracelulares es relativamente tardía (Piacentini *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha relacionado la activación excesiva de la proteína cinasa C (PKC) con procesos

Neuromodulación

neurodegenerativos, ya que la inhibición con antagonistas de la PKC antes de la exposición al exceso un de glutamato es neuroprotectora (Pavlovic *et al.*, 2002). Asimismo, se demostró que la aplicación de 5 a 20 μ M de trimetilestaño en un cultivo de células PC12 resulta en la traslocación de PKC del citoplasma a la membrana y activación en 30 minutos, proceso dependiente de la concentración de trimetilestaño. Simultáneamente la inhibición con antagonistas de PKC tiene un efecto neuroprotector (Pavlovic *et al.*, 2002).

De forma análoga se ha evaluado la interacción de PKC con el receptor a glutamato tipo NMDA en neuronas hipocampales, donde se ha visto implicada en la potenciación a largo plazo dependiente de NMDA, lo cual se logra con el aumento de las corrientes del receptor a glutamato tipo NMDA y aumento de la tasa de apertura de los canales, por la activación de PKC (Lan *et al.*, 2001). Cabe señalar que los principales cambios en el receptor NMDA por PKC, contrario a lo que se creería no son las fosforilaciones, ya que no modifica la conductancia de un solo canal ni el promedio de duración de apertura, no obstante, aumenta el número de receptores NMDA activos en la membrana mediado por exocitosis y promueven la internalización de receptores GABA_A y GABA_C (Lan *et al.*, 2001).

De manera similar a la excitotoxicidad, las neuronas que tienen mayor expresión de proteínas de unión a calcio como la calbindina, calretinina o parvalbumina tienen mayor resistencia a los efectos de la aplicación de trimetilestaño de forma que se eleva el porcentaje de neuronas viables (Piacentini *et al.*, 2008). Lo que sugiere que el efecto observado en los resultados del presente proyecto puede ser por la disminución en la viabilidad celular del tipo neuronal que no contiene suficientes proteínas de unión a calcio, y que el comportamiento electrofisiológico sea distinto entre las neuronas que expresan calretinina y las que no la expresan. El trabajo de Celio en 1990 demuestra, mediante una inmunotinción con anticuerpos para proteínas de unión a calcio (CaBP), que las neuronas piramidales de CA1 y CA2 tienen su soma y dendritas moderadamente teñidas, reflejando la presencia de CaBP en dichas neuronas, sin embargo, es menor en comparación con la capa molecular de giro dentado. Además, señala que los subcampos CA3 y CA4 se mantienen muy poco teñidas. Simultáneamente se evidenció la existencia de células intensamente teñidas dispersas en varias capas de CA1, y en el borde de CA3 con CA2. De manera semejante Beck *et al* en 1994 señala que las células que expresan calretinina en hipocampo no son neuronas piramidales y se encuentran mayormente distribuidas en giro dentado, mientras que las células

Neuromodulación

que expresan parvalbumina son interneuronas GABAérgicas en CA y giro dentado principalmente. Sin embargo, hay un pequeño grupo de neuronas piramidales con calbindina D-28k en CA1 y CA2. Demostraron también que el número de células que expresan calretinina no se altera, en la desafereñación de las proyecciones colinérgicas al hipocampo y de la transección de la fimbria/fórnix. Cabe señalar que los histogramas de capacitancias reflejan dos poblaciones de células, para el caso de CA1 sobrevivieron al tratamiento con trimetilestaño en mayor medida neuronas con capacitancias pequeñas, sin embargo, para CA3 se evidenciaron capacitancias más altas en el grupo tratado que en el control. No obstante, se deben continuar las investigaciones para demostrar que el tamaño neuronal se correlaciona directamente con la expresión de proteínas de unión a calcio y su comportamiento electrofisiológico del receptor a glutamato tipo NMDA.

12. Conclusiones

- La administración de trimetilestaño en ratas, en una dosis de 5mg/kg durante tres días por intubación gástrica, causa un aumento en el pico de la corriente iónica que permite el receptor a glutamato tipo NMDA, en neuronas piramidales de los subcampos CA1 y CA3 de hipocampo. Lo cual se evaluó mediante una curva dosis respuesta con las concentraciones 0.3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM y 300 μM , en registros voltage clamp en célula completa.
- La administración de trimetilestaño provocó el aumento del estado estacionario de la corriente iónica que permite el receptor a glutamato tipo NMDA en neuronas piramidales del subcampo CA3, no fue así para el subcampo CA1.
- El rango de densidad de corriente (pA/pF) en la amplitud del pico de la corriente iónica que permite el receptor a glutamato tipo NMDA para CA1 se mantuvo en valores de $1.336 \pm 0.6 - 133.3267 \pm 2$, mientras que para CA3 fue de $1.6638 \pm 0.3 - 43.02722 \pm 5$

13. Bibliografía

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., y Fahim, M. A. (2001). Reduced potassium currents in old rat CA1 hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 63(2), 176–184. doi:10.1002/1097-4547(20010115)63:2<176::aid-jnr1009>3.0.co;2-h

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

Baciak, L., Gasparova, Z., Liptaj, T., y Juranek, I. (2017). In vivo magnetic resonance approach to trimethyltin induced neurodegeneration in rats. *Brain Research*, 1673, 111–116. doi:10.1016/j.brainres.2017.07.012

Bambrick, L., Yarowsky, P., y Krueger, B. (1995). Glutamate as a hippocampal neuron survival factor: an inherited defect in the trisomy 16 mouse. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 92(21), 9692-9696. doi: 10.1073/pnas.92.21.9692

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-

Neuromodulación

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

Bouldin T.W., Goines N.D., Bagnell C.R., y Krigman M.R. (1981). Pathogenesis of trimethyltin neuronal toxicity. *American Association Of Pathologists*, 104(3), 237- 249.

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.

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

Celio, M. R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35(2), 375–475. doi:10.1016/0306-4522(90)90091-h

Ceccariglia, S., Alvino, A., Del Fà, A., Parolini, O., Michetti, F., y Gangitano, C. (2019). Autophagy is Activated In Vivo during Trimethyltin-Induced Apoptotic Neurodegeneration: A Study in the Rat Hippocampus. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(1), 175. doi: 10.3390/ijms21010175

Cook, L. L., Stine, K. E., y Reiter, L. W. (1984). Tin distribution in adult rat tissues after exposure to trimethyltin and triethyltin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 76(2), 344–348. doi:10.1016/0041-008x(84)90015-2

Neuromodulación

Chen, W., Zhang, X., y Huang, W. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, 13(4), 3391- 3396. doi: 10.3892/mmr.2016.4948

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

Collins, F., Schmidt, M., Guthrie, P., y Kater, S. (1991). Sustained increase in intracellular calcium promotes neuronal survival. *The Journal Of Neuroscience*, 11(8), 2582-2587. doi: 10.1523/jneurosci.11-08-02582.1991

Dawson, R., Patterson, T. A., y Eppler, B. (1995). Endogenous excitatory amino acid release from brain slices and astrocyte cultures evoked by trimethyltin and other neurotoxic agents. *Neurochemical Research*, 20(7), 847–858. doi:10.1007/bf00969697

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, X., Wang, Y., y Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379-387. doi: 10.1038/aps.2009.24

Florea, A., Splettstoesser, S., Sopp, S., Rettenmeier, A., y Busselberg, D. (2005). Modulation of intracellular calcium homeostasis by trimethyltin chloride in human tumour cells: Neuroblastoma SY5Y and cervix adenocarcinoma HeLa S3. *Toxicology*, 216(1), 1–8. doi:10.1016/j.tox.2005.05.029

Neuromodulación

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

Fricker, M., Tolkovsky, A., Borutaite, V., Coleman, M., y Brown, G. (2018). Neuronal Cell Death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813-880. doi: 10.1152/physrev.00011.2017

Geloso, M. C., Corvino, V., y Michetti, F. (2011). Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. *Neurochemistry International*, 58(7), 729–738. doi:10.1016/j.neuint.2011.03.009

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

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

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

Neuromodulación

neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 45(5), 583-595. doi: 10.1016/j.neuint.2004.03.007

Jenkins, S. M., y Barone, S. (2004). The neurotoxicant trimethyltin induces apoptosis via caspase activation, p38 protein kinase, and oxidative stress in PC12 cells. *Toxicology Letters*, 147(1), 63–72. doi:10.1016/j.toxlet.2003.10.023

Jung, M., Nahm, S., Lee, M., Lee, I., Lee, A., y Jang, D., Kim, Y., Cho, Z., y Eom, K. (2010). Canine Hippocampal Formation Composited into Three-Dimensional Structure Using MPRAGE. *Journal Of Veterinary Medical Science*, 72(7), 853-860. doi: 10.1292/jvms.09-0506

Kovacs, G. (2018). Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handbook Of Clinical Neurology*, 301-307. doi: 10.1016/b978-0-12-802395-2.00021-3

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

Krüger, K., Diepgrond, V., Ahnefeld, M., Wackerbeck, C., Madeja, M., Binding, N., y Musshoff, U. (2005). Blockade of glutamatergic and GABAergic receptor channels by trimethyltin chloride. *British Journal Of Pharmacology*, 144(2), 283- 292. doi: 10.1038/sj.bjp.0706083

Ishida, N., Akaike, M., Tsutsumi, S., Kanai, H., Masui, A., Sadamatsu, M., Kuroda, Y., Watanabe, Y., McEwen, B., y Kato, N. (1997). Trimethyltin syndrome as a hippocampal degeneration model: temporal changes and neurochemical features of seizure susceptibility and learning impairment. *Neuroscience*, 81(4), 1183-1191. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00220-0

Lan, J., Skeberdis, V., Jover, T., Grooms, S., Lin, Y., Araneda, R., Zheng, X., Bennett, M., y Suzanne, R. (2001). Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and

gating. *Nature Neuroscience*, 4(4), 382-390. doi: 10.1038/86028

Lee, S., Yang, M., Kim, J., Kang, S., Kim, J., Kim, J., Jung, C., Shin, T., Kim, S., y Moon, C. (2016). Trimethyltin- induced hippocampal neurodegeneration: A mechanism-based review. *Brain Research Bulletin*, 125, 187-199. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.07.010

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

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

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

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

Marchese, E., Corvino, V., Di Maria, V., Furno, A., Giannetti, S., Cesari, E., Lulli, P., Michetti, F., y Geloso, M. (2018). The Neuroprotective Effects of 17 β -Estradiol Pretreatment in a Model of Neonatal Hippocampal Injury Induced by Trimethyltin. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00385

Mayer, M. (2017). The Challenge of Interpreting Glutamate-Receptor Ion-Channel

Neuromodulación

Structures. *Biophysical Journal*, 113(10), 2143-2151. doi: 10.1016/j.bpj.2017.07.028

Mignini, F., Nasuti, C., Artico, M., Giovannetti, F., Fabrizi, C., Fumagalli, L., Lannetti, G., y Pompili, E. (2012). Effects and Trimethyltin on Hippocampal Dopaminergic Markers and Cognitive Behaviour. *International Journal Of Immunopathology And Pharmacology*, 25(4), 1107-1119. doi: 10.1177/039463201202500428

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

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

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

Neuromodulación

Park, H., Shim, H., Choi, W., Kim, K., y Shim, I. (2011). Neuroprotective Effect of Lucium chinense Fruit on Trimethyltin-Induced Learning and Memory Deficits in the Rats. *Experimental Neurobiology*, 20(3), 137. doi: 10.5607/en.2011.20.3.137

Parsons, M., y Raymond, L. (2014). Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders. *Neuron*, 82(2), 279-293. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.030

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

Pavlaković, G., Kane, M. D., Eyer, C. L., Kanthasamy, A., y Isom, G. E. (2002). Activation of Protein Kinase C by Trimethyltin: Relevance to Neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 65(5), 2338-2343. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.65052338.x

Piacentini, R., Gangitano, C., Ceccariglia, S., Fà, A., Azzena, G., Michetti, F., y Grassi, C. (2008). Dysregulation of intracellular calcium homeostasis is responsible for neuronal death in an experimental model of selective hippocampal degeneration induced by trimethyltin. *Journal Of Neurochemistry*, 105(6), 2109-2121. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05297.x

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

Poucet, B., Chaillan, F., Truchet, B., Save, E., Sargolini, F., y Hok, V. (2015). Is there a pilot in the brain? Contribution of the self-positioning system to spatial navigation. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, 9. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00292

Prabhu, G., K. G. Rao, M., y Rai, K. (2020). Hippocampal neural cell degeneration and

Neuromodulación

memory deficit in high-fat diet-induced postnatal obese rats– exploring the comparable benefits of choline and DHA or environmental enrichment. *International Journal Of Neuroscience*, 1-12. doi: 10.1080/00207454.2020.1773819

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

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

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

Trabucco, A., Di Pietro, P., Nori, S. L., Fulceri, F., Fumagalli, L., Paparelli, A., y Fornai, F. (2009). Methylated tin toxicity a reappraisal using rodents models. *Archives Italiennes de Biologie*, 147, 141-153

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

Yan, H., Ishihara, K., Hanaya, R., Kurisu, K., Serikawa, T., y Sasa, M. (2007). Voltage-dependent Calcium Channel Abnormalities in Hippocampal CA3 Neurons of Spontaneously Epileptic Rats. *Epilepsia*, 48(4), 758-764. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.00957.x

Yuksel, T., Yayla, M., Halici, Z., Cadirci, E., Polat, B., y Kose, D. (2019). Protective effect of 5-HT7 receptor activation against glutamate-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells via antioxidative and antiapoptotic pathways. *Neurotoxicology And Teratology*, 72, 22-28. doi:

10.1016/j.ntt.2019.01.002

Wajda, D. A., Mirelman, A., Hausdorff, J. M., y Sosnoff, J. J. (2016). Intervention modalities for targeting cognitive-motor interference in individuals with neurodegenerative disease: a systematic review. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 17(3), 251–261. doi:10.1080/14737175.2016.1227704

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

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

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

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

Neuromodulación

Zuo, Z., Cai, J., Wang, X., Li, B., Wang, C., y Chen, Y. (2009). Acute administration of tributyltin and trimethyltin modulate glutamate and N-methyl-d- aspartate receptor signaling pathway in *Sebastiscus marmoratus*. *Aquatic Toxicology*, 92(1), 44–49. doi:10.1016/j.aquatox.2009.01.008