



Benemérita Universidad Autónoma de  
Puebla

Instituto de Fisiología  
Maestría en Ciencias Fisiológicas



Estudio de la corriente activada por NMDA y su modulación por Acetilcolina  
y Glicina en neuronas piramidales de la corteza prefrontal de la rata.

## TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta:

I.BM. Stephany Altamirano Aguilar

Director de tesis:

D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Asesoras:

D. C. María del Rosario Vega y Sáenz de Miera

D.C. Amira del Rayo Flores Urbina

Puebla, Puebla.

Mayo, 2023

“Todo lo que hacemos, cada pensamiento que hemos tenido es producido por el cerebro humano. Pero exactamente cómo funciona sigue siendo uno de los mayores misterios sin resolver y parece que, cuanto más investigamos sus secretos, más sorpresas nos encontramos”.

Neil deGrasse Tyson en “How does the brain work?”, NOVA scienceNow  
septiembre, 2011

# AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por facilitar los medios para realizar este proyecto.

Este trabajo no habría sido posible sin las personas que estuvieron de primera mano apoyándome cada día en el instituto.

En primer lugar, quiero agradecer a mi asesor y maestro el Dr. Jorge L. V. Flores Hernández, por toda su dedicación y apoyo para que este trabajo se llevara a cabo; no solo me ha guiado y compartido su conocimiento si no también, me ha brindado grandes lecciones de vida.

Quiero agradecer también a la M. C. Lorena Arroyo, quien junto con el Dr. Oswaldo Torres me dedicaron tiempo y su ayuda fue la base para empezar esta travesía.

A sí mismo a la M. C. Evelyn A. Ruiz Luna por su valioso apoyo para desarrollar y culminar este trabajo, por su amistad, su asesoría, su compañía, por compartirme de su espacio y de sus xantinas para trabajar largas horas.

Gracias también al Dr. L. Gustavo Hernández Carballo, por compartirme de su preciado conocimiento, gracias por su tiempo, por su guía y sus consejos para realizar este trabajo.

Además, quiero agradecer a las personas que fueron parte fundamental de este proyecto:

A mis padres, Lorena Aguilar e Israel Altamirano por su apoyo incondicional y su gran amor, gracias por estar ahí siempre animándome a seguir aprendiendo y mejorando en todos los aspectos de la vida. Sin ustedes esto no habría sido posible.

A mi hermano, Héctor Altamirano quien ha sido mi más grande motivación para seguir adelante. Gracias por su paciencia y el tiempo concedido para estar fuera de casa.

A Víctor Valadez, que ha estado aquí para ver el inicio y el fin de este proyecto, gracias por su paciencia, por esperarme en casa, por las idas y venidas. Gracias por ser un gran soporte para mí todo este tiempo. Por más proyectos de vida juntos.

A Mily y a Conchi, por recargarme las pilas con su gran energía; y por esperarme y acompañarme fielmente en las noches de trabajo.

A mis amigas y amigos, por su apoyo moral y humano, que el tiempo permita seguirnos viendo crecer y alcanzar nuestros sueños.

A todos, ¡muchas gracias!

# CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| Índice de Figuras.....                                     | 6  |
| Lista de Abreviaturas.....                                 | 8  |
| Resumen.....   | 9  |
| 1. Introducción.....                                       | 10 |
| 1.1 Corteza prefrontal.....                                | 10 |
| 1.1.1 Definición.....                                      | 10 |
| 1.1.2 Función.....   | 11 |
| 1.1.3 Citoarquitectura.....                                | 11 |
| 1.1.4 Aferencias y eferencias de la CPF.....               | 14 |
| 1.2 Transmisión Glutamatérgica.....                        | 15 |
| 1.2.1 Glutamato.....                                       | 15 |
| 1.2.2 Receptor NMDA.....                                   | 17 |
| 1.2.3 Mecanismos de activación e inhibición de RNMDA.....  | 22 |
| 1.3 Neuromodulación de la corteza prefrontal.....          | 23 |
| 1.3.1 Glicina.....   | 23 |
| 1.3.2 Acetilcolina.....                                    | 24 |
| 1.3.3 Afinidad de los receptores colinérgicos por ACh..... | 32 |
| 2 Justificación.....                                       | 34 |
| 3 Pregunta de investigación.....                           | 35 |
| 4 Hipótesis.....   | 35 |
| 5 Objetivos.....   | 35 |
| 5.1 Objetivo General.....                                  | 35 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.2   | Objetivo específicos .....   | 35 |
| 6     | Metodología.....   | 36 |
| 6.1   | Disociación aguda de neuronas piramidales de corteza prefrontal de rata..... | 36 |
| 6.2   | Registro electrofisiológico.....   | 37 |
| 6.2.1 | Protocolos electrofisiológicos .....   | 38 |
| 6.3   | Análisis estadístico .....   | 45 |
| 7     | Resultados.....  | 48 |
| 7.1   | Efecto de la corriente activada por NMDA .....                               | 51 |
| 7.2   | Efecto de glicina sobre la corriente activada por NMDA .....                 | 55 |
| 7.3   | Efecto de la acetilcolina sobre corriente activada por NMDA.....             | 64 |
| 8     | Discusión .....  | 77 |
| 9     | Conclusiones .....   | 80 |
| 10    | Perspectivas.....  | 80 |
| 11    | Bibliografía .....   | 81 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Regiones de la corteza prefrontal.....  | 10 |
| <b>Figura 2</b> Laminación de la corteza prefrontal: Capas I a VI.....  | 12 |
| <b>Figura 3</b> Esquema de una neurona piramidal típica.....  | 14 |
| <b>Figura 4</b> Reacción química de la síntesis de glutamato.....   | 16 |
| <b>Figura 5</b> Clasificación de los receptores de glutamato.....   | 17 |
| <b>Figura 6</b> Esquema de la estructura del receptor NMDA.....   | 18 |
| <b>Figura 7</b> Cinética de las subunidades GluN2 del receptor NMDA.....  | 19 |
| <b>Figura 8</b> Esquema de la estructura del receptor de NMDA y sus dominios funcionales.....   | 20 |
| <b>Figura 9</b> Representación esquemática de los sitios de fosforilación en cada subunidad del receptor de NMDA.....   | 21 |
| <b>Figura 10</b> Representación gráfica del mecanismo de inhibición y activación del receptor de NMDA.....  | 22 |
| <b>Figura 11</b> Fórmula química de glicina.....  | 23 |
| <b>Figura 12</b> Reacción química de la síntesis de acetilcolina.....   | 25 |
| <b>Figura 13</b> Representación esquemática de la inervación colinérgica en el cerebro de la rata.....  | 26 |
| <b>Figura 14</b> Clasificación de los receptores muscarínicos y sus mecanismos efectores .....  | 27 |
| <b>Figura 15</b> Esquema representativo de la localización de los receptores muscarínicos en las neuronas de la CPF y su relación con la inervación colinérgica y glutamatergica..... | 28 |
| <b>Figura 16</b> Heterogeneidad de la familia de las subunidades de receptores nicotínicos.....   | 29 |
| <b>Figura 17</b> Ubicación de los receptores nicotínicos en la corteza prefrontal .....   | 31 |
| <b>Figura 18</b> Tabla de afinidades respecto a Ki de acetilcolina en receptores muscarínicos y nicotínicos.....  | 33 |
| <b>Figura 19</b> Esquema representativo de una rampa.....   | 38 |
| <b>Figura 20</b> Diagrama del protocolo de recuperación.....  | 39 |
| <b>Figura 21</b> Gráfica del tiempo de recuperación de la corriente activada por NMDA.....  | 40 |
| <b>Figura 22</b> Esquema de la aplicación de acetilcolina y NMDA.....   | 43 |
| <b>Figura 23</b> Representación de la aplicación de acetilcolina y NMDA mediante capilares.....   | 44 |
| <b>Figura 24</b> Diagrama de trabajo.....   | 47 |
| <b>Figura 25</b> Histograma de capacitancias.....   | 48 |
| <b>Figura 26</b> Trazo representativo de una rampa.....   | 49 |
| <b>Figura 27</b> Microfotografía de una neurona piramidal típica de la CPF.....   | 49 |
| <b>Figura 28</b> Diagrama representativo de la corriente activada por NMDA.....   | 50 |
| <b>Figura 29</b> Trazos representativos de la curva dosis respuesta de la corriente activada por NMDA sin glicina.....  | 51 |
| <b>Figura 30</b> Curva dosis respuesta correspondiente a la amplitud del pico de la corriente activada por NMDA.....  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 31</b> Curva dosis respuesta correspondiente a la amplitud del estado estacionario de la corriente activada por NMDA.....   | 53 |
| <b>Figura 32</b> Constante de desensibilización de la corriente activada por NMDA.....  | 54 |
| <b>Figura 33</b> Curva dosis respuesta del efecto de glicina sobre el pico de la corriente activada por NMDA (100µM).....   | 55 |
| <b>Figura 34</b> Curva dosis respuesta del efecto de glicina sobre el estado estacionario de la corriente activada por NMDA (100µM).....  | 56 |
| <b>Figura 35</b> Curva dosis respuesta del porcentaje de efecto de glicina sobre el pico de la corriente activada por NMDA(100µM).....  | 57 |
| <b>Figura 36</b> Curva dosis respuesta del porcentaje de efecto de glicina sobre el estado estacionario de la corriente activada por NMDA (100µM).....                            | 58 |
| <b>Figura 37</b> Trazo representativo del efecto de potenciación de glicina sobre la corriente activada por NMDA de una neurona piramidal disociada de la corteza prefrontal..... | 60 |
| <b>Figura 38</b> Curva dosis respuesta de la constante de desensibilización del efecto de glicina sobre la corriente activada por NMDA (100 µM).....                              | 61 |
| <b>Figura 39</b> Comparación de la constante de desensibilización del efecto de glicina y del control NMDA (100µM).....   | 62 |
| <b>Figura 40</b> Comparación del ratio del efecto de glicina y el ratio control NMDA (100Mm).....   | 63 |
| <b>Figura 41</b> Curva dosis respuesta del efecto de acetilcolina sobre el pico de la corriente activada por NMDA (100Mm).....  | 64 |
| <b>Figura 42</b> Curva dosis respuesta del efecto de acetilcolina sobre el estado estacionario de la corriente activada por NMDA (100µM).....                                     | 65 |
| <b>Figura 43</b> Porcentaje de efecto de acetilcolina sobre el pico de la corrient activada por NMDA (100µM).....   | 66 |
| <b>Figura 44</b> Trazo representativo del efecto de potenciación de acetilcolina (300fM).....   | 68 |
| <b>Figura 45</b> Trazo representativo del efecto de inhibición de acetilcolina (300fM).....   | 69 |
| <b>Figura 46</b> Porcentaje de efecto de acetilcolina sobre el estado estacionario de la corriente activada por NMDA (100µM).....   | 70 |
| <b>Figura 47</b> Constante de desensibilización del efecto de acetilcolina sobre la corriente activada por NMDA (100µM).....  | 72 |
| <b>Figura 48</b> Comparación de la constante de desensibilización del efecto de acetilcolina y del control, en el grupo de potenciación.....                                      | 73 |
| <b>Figura 49</b> Comparación de la constante de desensibilización del efecto de acetilcolina y del control, en el grupo de inhibición.....  | 74 |
| <b>Figura 50</b> Comparación del ratio del efecto de acetilcolina y el ratio control del grupo de potenciación.....   | 75 |
| <b>Figura 51</b> Comparación del ratio del efecto de acetilcolina y el ratio del control del grupo de inhibición.....   | 76 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                        |  |              |                               |
|------------------------|--|--------------|-------------------------------|
| <b>ACh</b>             | Acetilcolina   | <b>RnACh</b> | Receptores nicotínicos de ACh |
| <b>AID</b>             | Insular agranular dorsal                                     | <b>RNMDA</b> | Receptores de NMDA            |
| <b>AIV</b>             | Insular agranular ventral                                    | <b>SM</b>    | Núcleo septal medial          |
| <b>AMPA</b>            | Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato | <b>SNC</b>   | Sistema nervioso central      |
| <b>ATD</b>             | Dominio amino terminal                                       | <b>TMD</b>   | Dominio región transmembrana  |
| <b>BD</b>              | Banda diagonal   | <b>VLO</b>   | Lateral orbital               |
| <b>Cdk5</b>            | Quinasa-5 dependiente ciclina                                | <b>VO</b>    | Ventraorbital                 |
| <b>CE<sub>50</sub></b> | Concentración efectiva 50                                    |              |                               |
| <b>Cg1</b>             | Cingulada anterior   |              |                               |
| <b>Ch2</b>             | Brazo vertical de la banda diagonal de Broca                 |              |                               |
| <b>Ch3</b>             | Brazo horizontal de la banda diagonal de Broca               |              |                               |
| <b>Ch4</b>             | Núcleo basal de Meynert                                      |              |                               |
| <b>CKII</b>            | Caseína quinasa II   |              |                               |
| <b>CPF</b>             | Corteza prefrontal   |              |                               |
| <b>CTD</b>             | Dominio carboxilo terminal                                   |              |                               |
| <b>DR</b>              | Dosis respuesta  |              |                               |
| <b>EE</b>              | Estado estacionario  |              |                               |
| <b>ESM</b>             | Error estándar   |              |                               |
| <b>GABA</b>            | Ácido $\gamma$ -aminobutírico                                |              |                               |
| <b>Glu</b>             | Glutamato  |              |                               |
| <b>Gly</b>             | Glicina  |              |                               |
| <b>CI<sub>50</sub></b> | Concentración inhibitoria 50                                 |              |                               |
| <b>IL</b>              | Infralímbica   |              |                               |
| <b>iNMDA</b>           | Corriente activada por NMDA                                  |              |                               |
| <b>Kd</b>              | Constante de disociación                                     |              |                               |
| <b>Ki</b>              | Constante de inhibición                                      |              |                               |
| <b>LBD</b>             | Dominio de unión a ligando                                   |              |                               |
| <b>LO</b>              | Dorsolateral orbital   |              |                               |
| <b>M2</b>              | Área motora secundaria                                       |              |                               |
| <b>MO</b>              | Orbital medial   |              |                               |
| <b>NB</b>              | Núcleo Basal   |              |                               |
| <b>NMDA</b>            | N-Metil-D-Aspartato  |              |                               |
| <b>PKA</b>             | Proteína quinasa A   |              |                               |
| <b>PKB</b>             | Proteína quinasa B   |              |                               |
| <b>PKC</b>             | Proteína quinasa C   |              |                               |
| <b>PrL</b>             | Prelímbica   |              |                               |
| <b>RGly</b>            | Receptores de Glicina  |              |                               |



## RESUMEN

El estudio de la función y caracterización del receptor NMDA (RNMDA) ha sido estudiado ampliamente por su participación en múltiples procesos fisiológicos relacionados con el aprendizaje y la memoria, además de sus implicaciones en enfermedades como el Alzheimer y la esquizofrenia. Sin embargo, a pesar de los múltiples avances aún quedan interrogantes por resolver. Una de las características principales del RNMDA es la necesaria participación de glicina (Gly) para su activación, recientes estudios de modelado computacional y estudios en el laboratorio experimental proponen que el sitio de Gly en el RNMDA también tiene afinidad para acetilcolina (ACh).

A partir de lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto de ACh en las corrientes activadas por NMDA (iNMDA) en ausencia de Gly en neuronas piramidales agudamente dissociadas de la corteza prefrontal (CPF) de la rata, mediante la técnica de fijación de voltaje en célula completa. Por lo que se realizaron curvas dosis respuesta para analizar tres efectos: la iNMDA en ausencia de Gly, el efecto de la Gly sobre la iNMDA y el efecto de ACh sobre la iNMDA en ausencia de Gly.

Se encontró que existen iNMDA (0.3-300 $\mu$ M) con características definidas de pico y estado estacionario (EE) en ausencia de Gly, además la aplicación de Gly (0.1-100 $\mu$ M) potencia la corriente y modifica de manera significativa su constante de desensibilización, así mismo, el análisis de esta curva dosis respuesta sugiere que existen dos probables sitios de unión de Gly al RNMDA. En cuanto al efecto de ACh (0.3 – 1000 pM) se encontró que modula la iNMDA en ambos sentidos, es decir la potencia y la inhibe, además de modificar significativamente la relación Pico/EE.

En conclusión, tanto la caracterización de Gly y ACh sobre la iNMDA junto con los antecedentes de modelado computacional, sugieren que el efecto de ambos neuromoduladores está relacionado inicialmente con la subunidad GluN1 y adicionalmente con las subunidades GluN2A-GluN2B del RNMDA, las cuales están presentes en la CPF.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CORTEZA PREFRONTAL

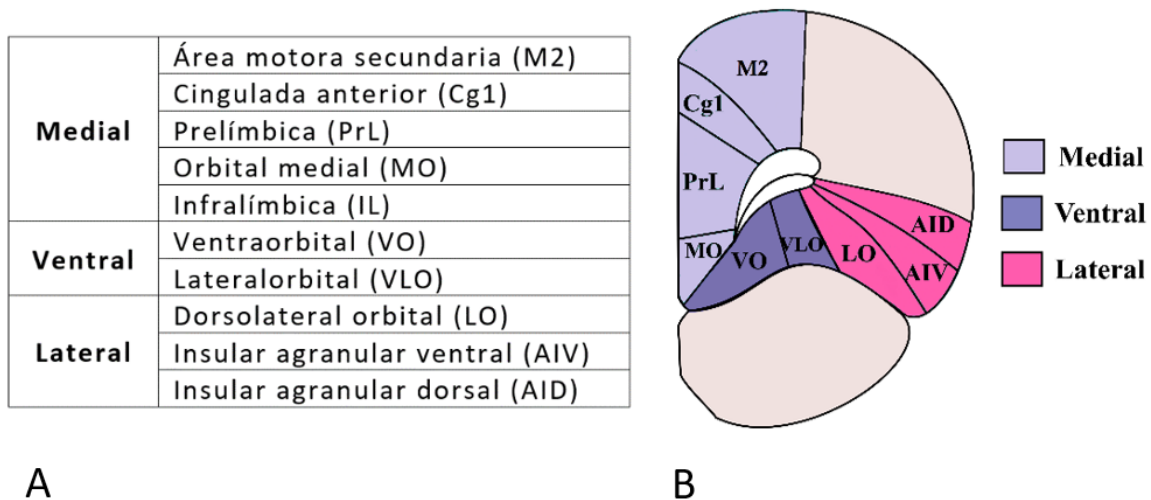
### 1.1.1 Definición

La corteza del polo anterior del cerebro de los mamíferos se denomina comúnmente corteza prefrontal (CPF) y de acuerdo con *National Center for Biotechnology Information* se define como la parte rostral del lóbulo frontal que recibe proyecciones del núcleo mediodorsal del tálamo, además recibe fibras aferentes de numerosas estructuras del diencefalo, mesencéfalo y sistema límbico, así como aferentes de origen visual, auditivo y somático. La CPF del primate está dividida en una región dorsolateral, una medial y una orbital (Preuss & Wine, 2022).

La CPF de la rata se divide principalmente en tres regiones (Fig. 1) medial, ventral y lateral, cada una de estas regiones con sus propias subdivisiones

**Figura 1**

*Regiones de la corteza prefrontal*



La CPF de la rata se divide en tres regiones principales Medial, Ventral y Lateral. A) Tabla descriptiva de cada una de las regiones de la CPF de la rata. B) Diagrama unilaterial de un corte coronal de CPF de rata, se muestran las divisiones principales con diferente color, que a su vez se subdividen en regiones más pequeñas. Medial: PrC, Cg1, PrL, MO, Ventral: VO, VLO y Lateral: LO, AIV, AID (Modificado de Paxinos & Watson, 2013).

### 1.1.2 Función

Diversos estudios en mamíferos como las ratas, los monos y los humanos concluyen que la CPF participa principalmente en las funciones ejecutivas, las cuales se definen como el conjunto de procesos cognitivos necesarios para realizar comportamientos complejos, que incluyen la atención, formación de conceptos, la memoria de trabajo, la inhibición del comportamiento, planificación y toma de decisiones, el deterioro de la función ejecutiva se ve reflejada en una variedad de trastornos como la esquizofrenia y el TDAH (Baddeley, 1996; Brown & Bowman, 2002).

### 1.1.3 Citoarquitectura

La corteza en general está constituida por VI capas, sin embargo, las subregiones de la corteza prefrontal medial y ventral de la rata se distinguen por la ausencia de una capa granular (capa IV), por lo cual se diferencia la CPF de todo el resto del neocórtex (Van Eden & Uylings, 1985; Heidbreder & Groenewegen, 2003; Uylings *et al.*, 2003).

La corteza cerebral es una estructura con arreglo columnar (Fig. 2), cuyas capas se numeran desde la más superficial en el siguiente orden (Nieuwenhuys & Voogd, 2008):

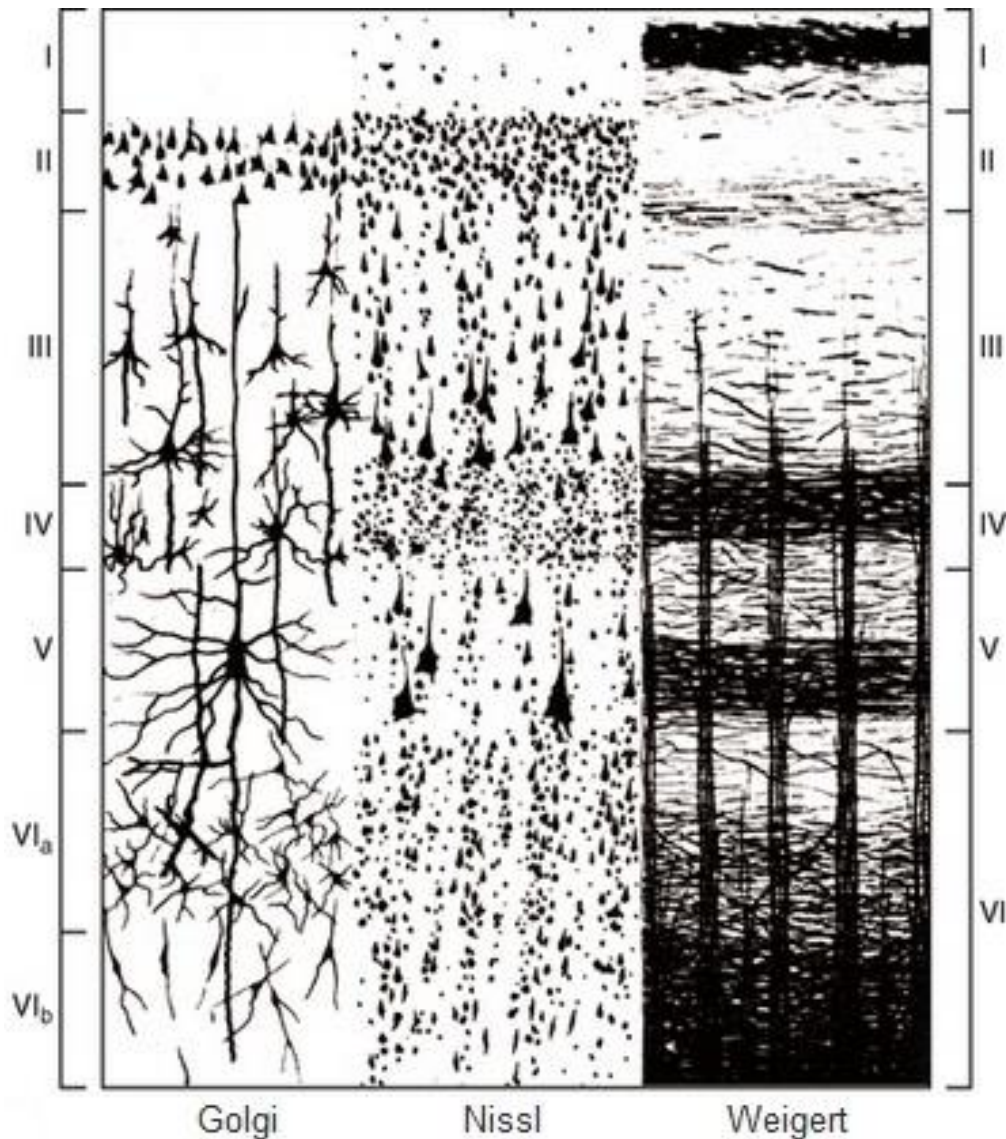
- Capa I (Molecular o plexiforme): Contiene muy pocos cuerpos celulares y se considera como la capa de eferencia principal.
- Capa II (Granular externa): En esta capa las células tienen las dendritas apicales más cortas y somas piramidales pequeños. Tiene una apariencia “granular”, lo cual le dio el nombre de capa granular externa. Contiene también muchas interneuronas pequeñas.
- Capa III (Piramidal externa): Se trata de una capa gruesa donde predominan los somas piramidales. Dichos somas aumentan gradualmente de tamaño desde lo superficial a lo profundo.
- Capa IV (Granular interna): Constituida básicamente por células granulares, contiene pequeños cuerpos piramidales.
- Capa V (Piramidal interna o ganglionar): Incluye en su mayoría somas piramidales de tamaño medio y grande dispuestos de forma suelta. Es una de las principales capas de

aferencia de la corteza, sus células piramidales proyectan tanto cortical como subcorticalmente.

- Capa VI (Polimórfica o multiforme): Compuesta de somas en forma de huso la mayoría pertenecientes a células piramidales modificadas.

**Figura 2**

*Laminación de la corteza prefrontal: Capas I a VI*



*La corteza cerebral está constituida por VI capas, en la imagen se muestran las capas del I al VI (arriba hacia abajo) y la representación esquemática de la citoarquitectura y la mieloarquitectura de las seis capas de la CPF con diferentes tinciones. De izquierda a derecha: la tinción de Golgi muestra el tamaño y ubicación de las células en cada capa, la tinción de Nissl muestra los cuerpos celulares, y la tinción de Weigert muestra las fibras nerviosas mielinizadas (Modificado de Carpenter & Sutin, 1983).*

### *1.1.3.1 Neuronas piramidales*

Las neuronas de proyección piramidal y que tienen una neurotransmisión glutamatérgica; son el tipo que predomina en la corteza, forman parte del 75 al 85% de la población neuronal total en varias especies de mamíferos. El resto que representa el 15 a 25% son interneuronas corticales que usan Ácido  $\gamma$ -Aminobutírico (GABA) como neurotransmisor (Havner, 2011).

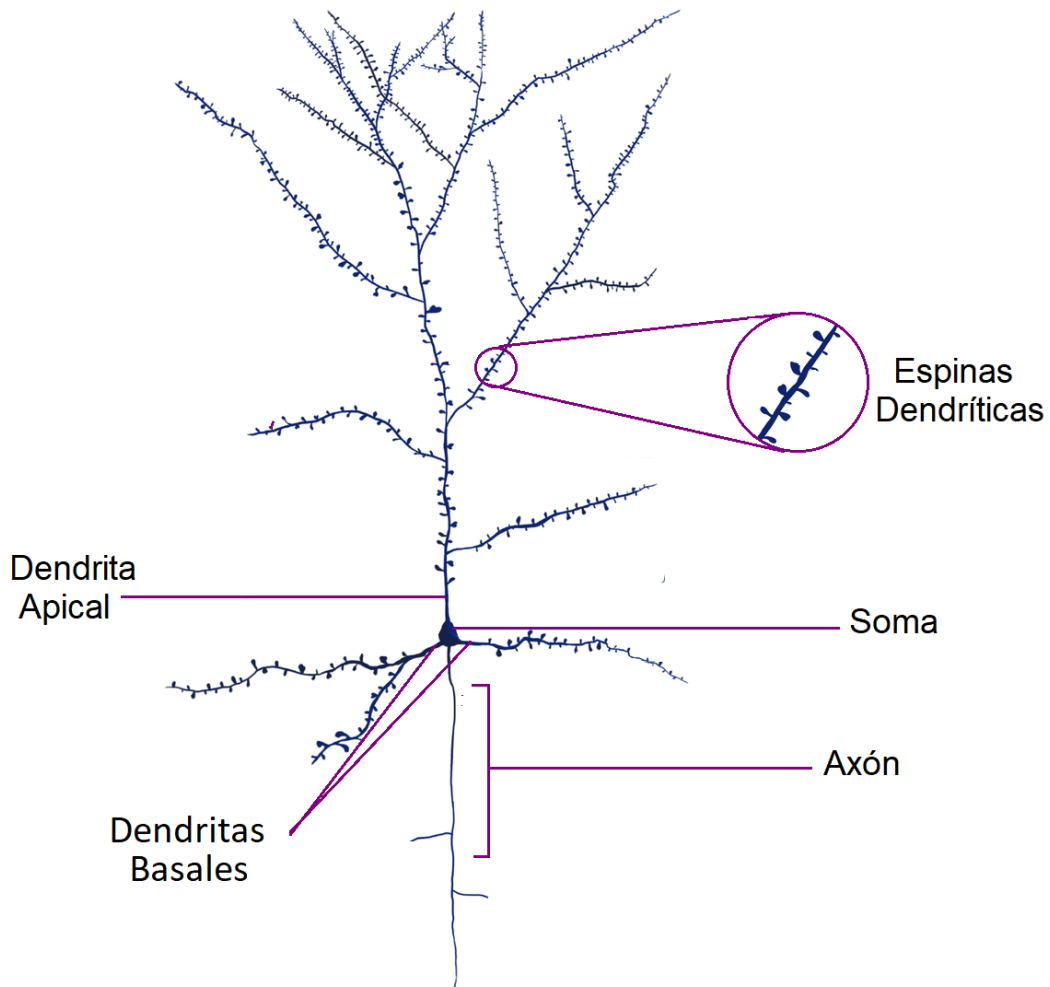
De acuerdo con Defelipe & Fariñas (1992), las neuronas piramidales son células de proyección que se dividen en atípicas y típicas. Las neuronas piramidales típicas tienen 3 características principales (Fig. 3):

- 1) Tienen un soma piramidal u ovoide, en su ápice presenta una dendrita apical que lleva una dirección hacia la pía madre; y en su base se forma un sistema de dendritas basales largas que se dirigen lateralmente o hacia abajo.
- 2) De la base de la célula o del origen de una dendrita basal sale el axón que se dirige hacia abajo y sale de la corteza para terminar en otras regiones corticales o áreas subcorticales.
- 3) Las superficies dendríticas están cubiertas por espinas, excepto los segmentos proximales que surgen directamente del soma celular que generalmente no tienen espinas.

En cuanto a las células piramidales atípicas, se consideran así por sus características especiales, por ejemplo: carecen o tienen una dendrita apical muy corta, o contrariamente pueden tener múltiples dendritas; somas generalmente grandes, con forma fusiforme u orientados de forma horizontal; carecen o tienen pocas dendritas; sus axones no proyectan intracorticalmente (Defelipe & Fariñas, 1992).

**Figura 3**

*Esquema de una neurona piramidal típica*



*La neurona piramidal es la neurona excitadora primaria de la corteza cerebral, su estructura está compuesta principalmente de un soma de forma triangular o piramidal, un axón y dendritas basales que surgen de la base, una dendrita apical unida al ápice y espinas dendríticas que se encuentran distribuidas en las dendritas (Modificado de Sterling & Gamba, 2018).*

#### 1.1.4 Aferencias y eferencias de la CPF

Casi todas las conexiones de la CPF son recíprocas, principalmente la del tálamo donde la CPF se conecta de manera bilateral con el núcleo mediodorsal, los núcleos interlaminares y de la línea media; el núcleo medial anterior y las partes rostrales del complejo ventral (Uylings *et al.*, 2003).

Así mismo otras áreas que comparten esta característica de comunicación recíproca es el sistema límbico, tanto la amígdala como el hipocampo emiten un gran número de proyecciones a la CPF, principalmente a la zona medial (Krettek & Price, 1977).

La CPF recibe y envía proyecciones a otras cortezas, algunas como la corteza entorrinal y piriforme vinculadas con la memoria (Fuster, 1997). Además, recibe información visual, somatosensorial y auditiva por parte de los lóbulos occipital, parietal y temporal respectivamente. Por su parte la corteza motora frontal también envía proyecciones a la CPF (Ongur & Price, 2000). Proyecciones de los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo y del hipotálamo también llegan a la CPF.

Los ganglios basales (núcleo accumbens) y la habénula lateral son únicamente una vía eferente de la CPF (Groenewegen & Uylings, 2000; Fuster, 2015).

## 1.2 TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

---

### 1.2.1 Glutamato

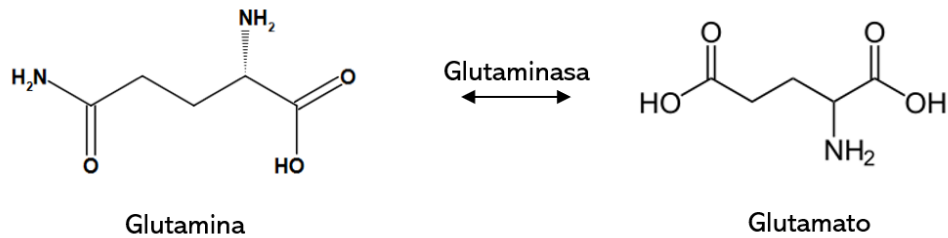
El ácido glutámico o glutamato (Glu) es un aminoácido no esencial y en el sistema nervioso central (SNC) es el principal neurotransmisor excitador, también está implicado en la plasticidad neuronal, así como en procesos de excitotoxicidad (Nakanishi, 1992).

Debido a que el Glu no atraviesa la barrera hematoencefálica, debe sintetizarse en el SNC, proceso que se lleva a cabo principalmente en la mitocondria de las neuronas a partir del aminoácido L-glutamina (Fig. 4) por acción de la glutaminasa (Flores-Soto *et al.*, 2012), se libera por exocitosis y es recapturado por un transportador de aminoácidos excitadores que está localizado en las neuronas y las células gliales (Flores-Soto *et al.*, 2012; Rojas & Neri, 2016). Así la regulación y disponibilidad del glutamato se encuentra separado en dos compartimentos celulares: por un lado, las terminaciones nerviosas y por otro las células gliales.

Las neuronas glutamatérgicas, así como sus receptores están distribuidos ampliamente en todo el SNC, principalmente en el telencéfalo donde podemos destacar la CPF debido a los procesos en los que dicha región está implicada (Cotman *et al.*, 1987).

**Figura 4**

*Reacción química de la síntesis del glutamato*



*El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, sus receptores están distribuidos sobre todo en la CPF. Se sintetiza en el SNC a partir de la glutamina por acción de la enzima glutaminasa (Hassel & Digledine, 2012).*

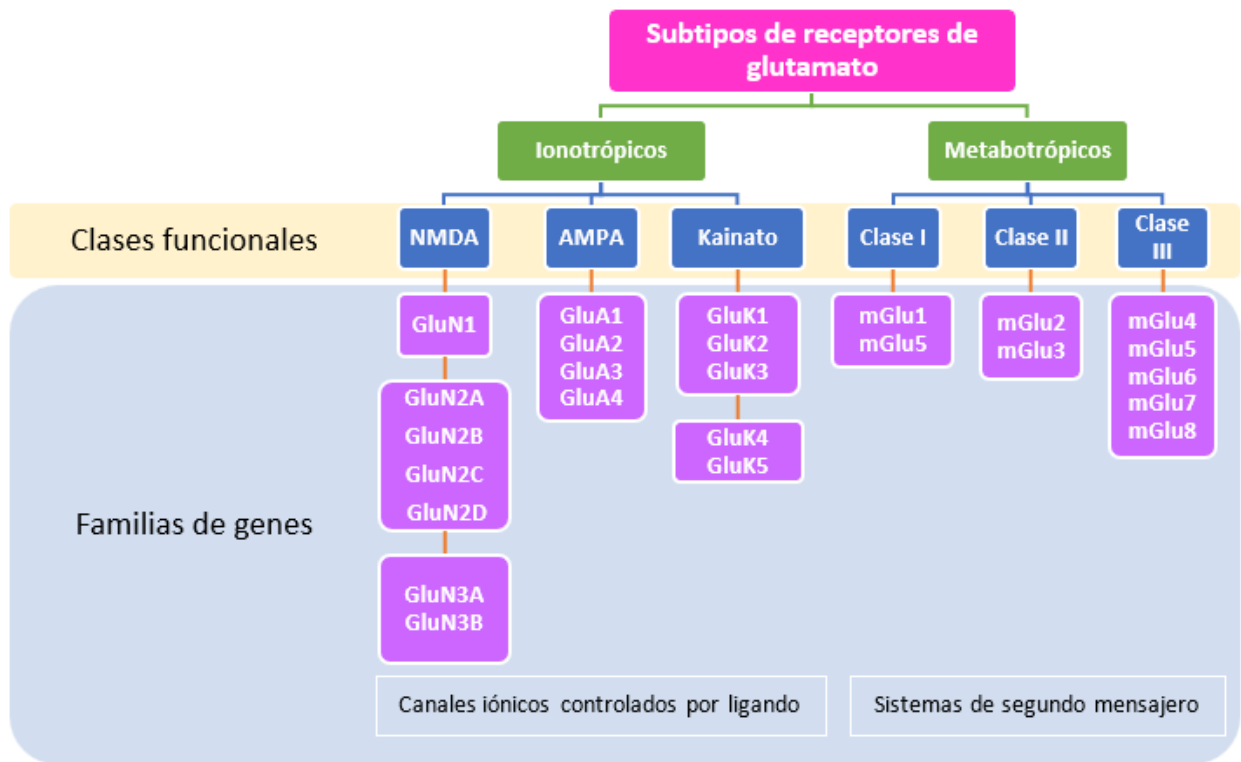
Los receptores para Glu se clasifican en dos tipos: los ionotrópicos, que forman un canal iónico y su activación permite el movimiento a través de la membrana celular de iones como el  $\text{Na}^+$ , el  $\text{K}^+$ , y el  $\text{Ca}^{2+}$ ; y los metabotrópicos, que están acoplados a proteínas G y activan vías de segundos mensajeros.

Los receptores ionotrópicos de Glu se dividen en NMDA (N-Metil-D-Aspartato), AMPA (Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) y Kainato, llamados así de acuerdo con la molécula que los activa. En cuanto a los receptores metabotrópicos de Glu (Fig. 5), existen ocho y se clasifican en tres grupos o clases con base en criterios funcionales, estructurales y transduccionales (Brady *et al.*, 2012; Flores-Soto *et al.*, 2012; Rojas & Neri, 2016).



**Figura 5**

*Clasificación de los receptores de glutamato*



*La imagen muestra la división de los tipos de receptor a Glu, el primer tipo corresponde a los receptores ionotrópicos (activados por ligando) que a su vez se dividen en NMDA, AMPA y Kainato; y el segundo tipo corresponde a los receptores metabotrópicos (sistemas de segundos mensajeros), los cuales se dividen en Clase I, Clase II y Clase III (Modificado de Brady et al., 2012).*

### 1.2.2 Receptor NMDA

Los receptores NMDA (RNMDA) modulan procesos cerebrales importantes como la plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo, el aprendizaje y la memoria (Llansola *et al.*, 2005; Cull-Candy *et al.*, 2001). El RNMDA (Fig. 6) es altamente permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  seguido del  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ; y presenta un bloqueo de  $\text{Mg}^{2+}$  sensible al voltaje (Lynch & Guttman, 2001; Llansola *et al.*, 2005; Flores-Soto *et al.*, 2012).

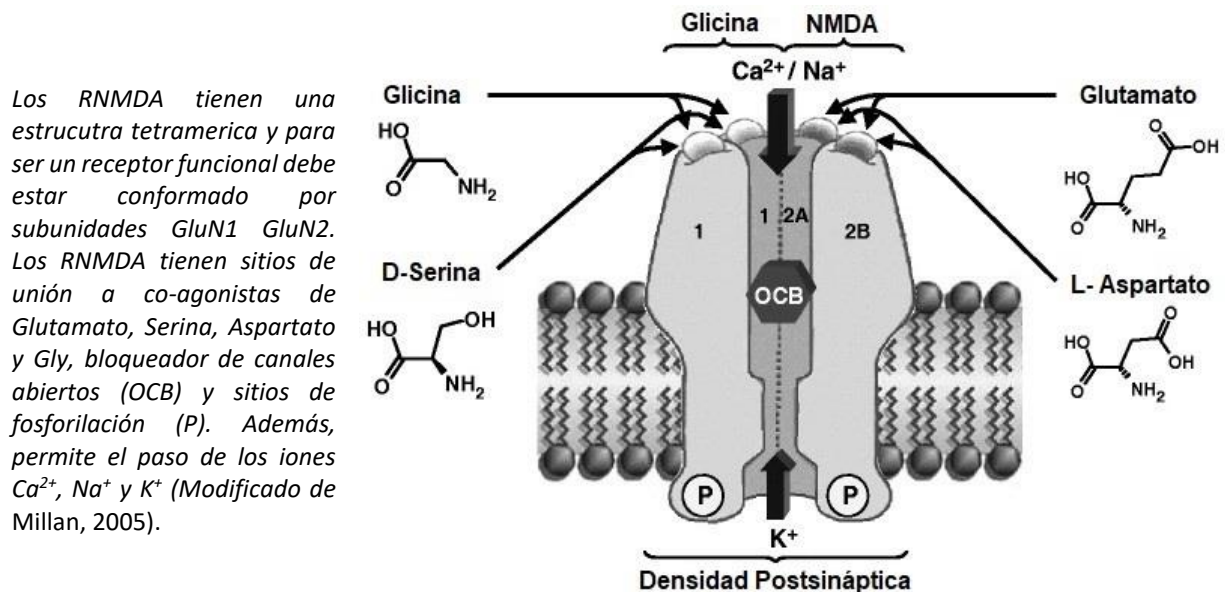
Se ha propuesto que para la activación del RNMDA es necesaria la unión simultánea de Glu y Glicina (Gly), por ello se le refiere como a la Gly como co-agonista de dicho receptor. Además, otros ligandos endógenos y exógenos como las poliaminas y el  $\text{Zn}^{2+}$  pueden modificar

las propiedades del canal (Cull-Candy *et al.*, 2001; Cepeda & Levine, 2006.; Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004; Mori & Mishina, 1995).

La estructura del RNMDA es tetramérica y se han identificado tres subunidades de las cuales puede estar conformado: GluN1, GluN2 y GluN3. Para que un RNMDA sea funcional debe ser un heterotetrámero integrado por dos dímeros, que deben ser al menos dos GluN1 y una GluN2 (Brady *et al.*, 2012; Michaelis, 1998).

**Figura 6**

*Esquema de la estructura del receptor NMDA*



Los RNMDA tienen una estructura tetramérica y para ser un receptor funcional debe estar conformado por subunidades GluN1 GluN2. Los RNMDA tienen sitios de unión a co-agonistas de Glutamato, Serina, Aspartato y Gly, bloqueador de canales abiertos (OCB) y sitios de fosforilación (P). Además, permite el paso de los iones  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  y  $K^{+}$  (Modificado de Millan, 2005).

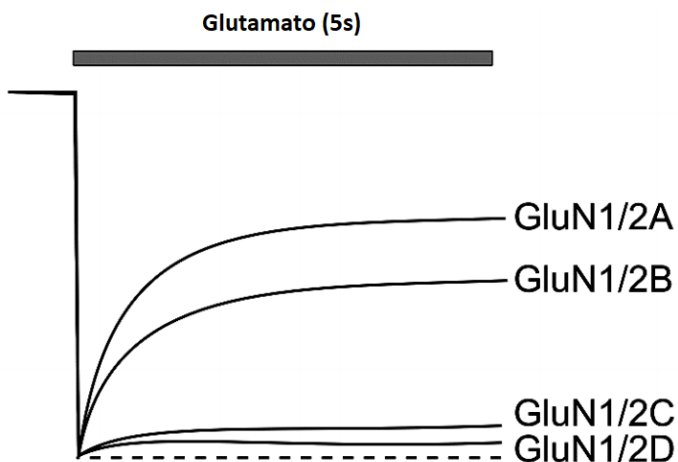
**1.2.2.1 Subunidad GluN1.** La subunidad GluN1 tiene un sitio de unión que, tradicionalmente se ha definido para Gly, sin embargo, como se mencionó anteriormente, otros ligandos como la D-serina o la D-alanina pueden unirse al RNMDA y actuar como co-agonistas. Existen 8 isoformas de esta subunidad (GluN1-1a, GluN1-2a, GluN1-3a, GluN1-4a, GluN1-1b, GluN1-2b, GluN1-3b, GluN2-4b) (Hirai *et al.*, 1996; Schüler *et al.*, 2008; Traynelis *et al.*, 2010).

**1.2.2.2 Subunidad GluN2.** La subunidad GluN2 contiene el sitio de unión a Glu o NMDA y es fundamental para la variedad funcional del receptor en propiedades como la conductancia, la cinética de desactivación y la desensibilización del receptor (Paoletti *et al.*, 2013; Papadakis *et al.*, 2004; Schorge & Colquhoun, 2003). De GluN2 existen 4 isoformas, las cuales son: GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D. Los RNMDA que contienen las subunidades GluN2A o GluN2B generan aperturas de canal de alta conductancia con una alta sensibilidad al bloqueo por  $Mg^{2+}$  y se desensibilizan más rápido (Fig. 7), mientras que los receptores que contienen GluN2C o GluN2D dan lugar a aperturas de baja conductancia con una sensibilidad más baja al  $Mg^{2+}$  y confieren al RNMDA una desensibilización más lenta o casi nula (Cull-Candy *et al.*, 2001; Sibarov & Antonov, 2018).

Por lo tanto, debido a que en el dímero GluN1-GluN2 se encuentran los sitios de unión y reconocimiento para diferentes ligandos, este se considera la base funcional del RNMDA.

**Figura 7**

*Cinética de las subunidades GluN2 del receptor NMDA*



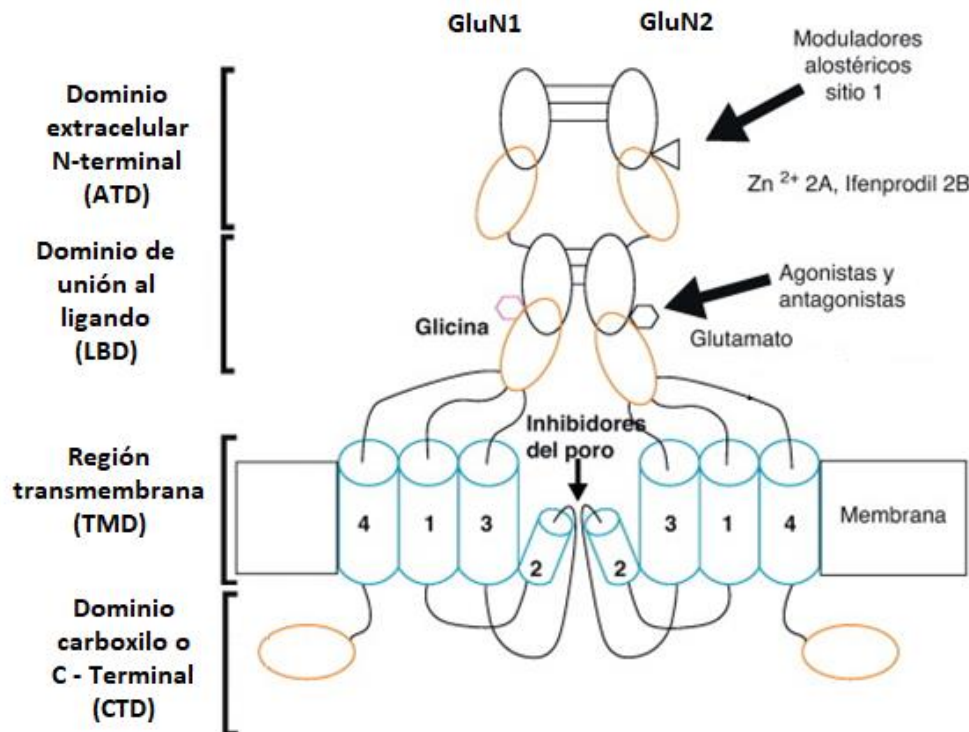
*Los receptores de NMDA que contienen las subunidades GluN2A/2B se desensibilizan más rápido, mientras que los que contienen GluN2C/2D tienen una desensibilización más lenta (Modificado de Sibarov & Antonov, 2018)*

**1.2.2.3 Subunidad GluN3.** Por último, la subunidad GluN3 debe unirse al complejo GluN1/GluN2 para ser funcional ya que no forma receptores funcionales por sí misma (Cull-Candy *et al.*, 2001). Esta subunidad también tiene un sitio para Gly y/o D-serina, por lo que, un receptor formado solo por subunidades GluN1 y GluN3 sería un receptor de glicina o de serina. Al igual que las anteriores también tiene distintas isoformas: GluN3A y GluN3B (Piña-Crespo *et al.*, 2010). Cada subunidad posee cuatro dominios funcionales (Fig. 8):

- 1) Dominio extracelular con un amino terminal N (ATD).
- 2) Dominio de unión a ligando (LBD).
- 3) Región transmembrana (TMD) formado por cuatro segmentos hidrófobos (M1 a M4) en donde el segmento M2 entra parcialmente a la membrana y forma el canal iónico.
- 4) Dominio carboxilo o C-Terminal (CTD) en la región intracelular (Traynelis *et al.*, 2010).

**Figura 8**

*Esquema de la estructura del receptor de NMDA y sus dominios funcionales*



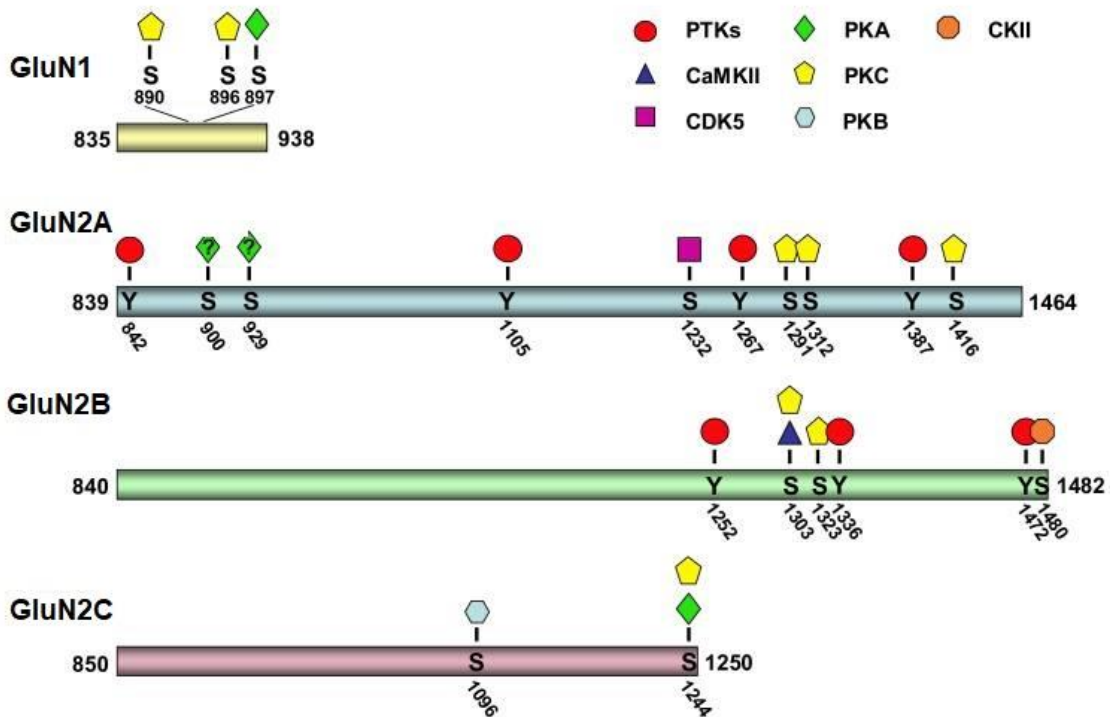
*Las subunidades del RNMDA se organizan en cuatro dominios funcionales: un dominio extracelular (ATD), un dominio de unión para el ligando (LBD), una región transmembrana (TMD) y un domio C-Terminal (CTD). (Modificado de Flores-Soto *et al.*, 2012).*

Los dominios CTD de las subunidades del RNMDA son sustratos para modificaciones como la fosforilación, la cual es un mecanismo clave para la función del canal y la localización del receptor en la sinapsis (Chen & Roche, 2007; Lee, 2006; Tingley *et al.*, 1993).

Aunado a lo anterior los sitios de fosforilación (Fig. 9) que se han identificado en el RNMDA se encuentran en los aminoácidos serina y treonina, estos sitios son sustratos para la proteína quinasa A (PKA) dependiente de cAMP, proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa B (PKB), CaMKII, quinasa-5 dependiente de ciclina (Cdk5) y caseína quinasa II (CKII) (Chen & Roche, 2007).

**Figura 9**

*Representación esquemática de los sitios de fosforilación en cada subunidad del receptor de NMDA*



Las subunidades GluN1, GluN2A, GluN2B y GluN2C del receptor NMDA contienen alrededor de 100, 630, 640 y 400 aminoácidos, respectivamente. Cada cola es fosforilada en residuos de serina/treonina y/o tirosina por una variedad de quinasas. Entre los sitios de fosforilación identificados: NR2A está fosforilado únicamente por Cdk5; NR2B es fosforilado únicamente por CKII; y NR2C es fosforilado únicamente por PKB (Modificado de Chen & Roche, 2007).

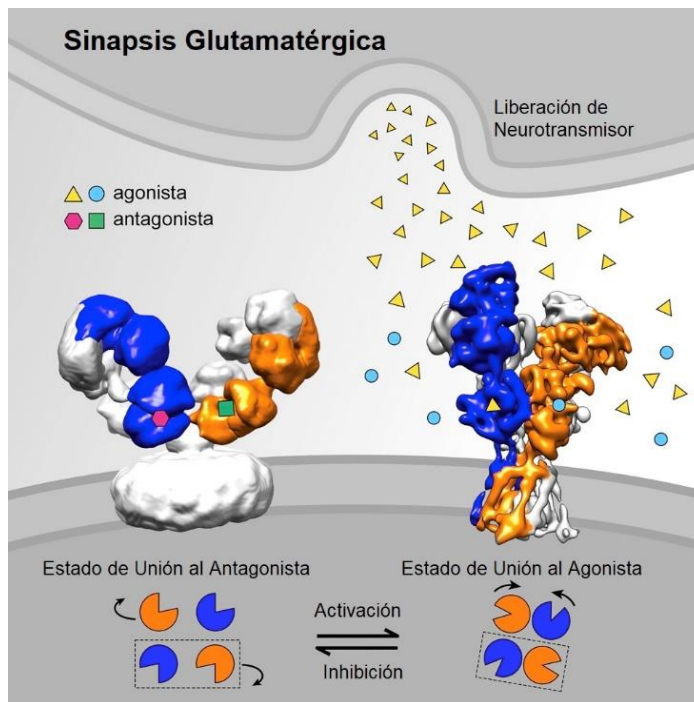
### 1.2.3 Mecanismos de activación e inhibición de RNMDA

Los dominios terminales de las subunidades también juegan un papel importante en los mecanismos de activación e inhibición del RNMDA, sobre todo los dominios extracelulares: el dominio de unión a ligando (LBD) y el dominio amino terminal (ATD) (Yu & Lau, 2018).

Mediante estudios de crio-microscopía electrónica y experimentos de resonancia de doble electrón, se ha propuesto que LBD y ATD sufren cambios conformacionales (Fig. 10) de rotación mientras el ligando o ligandos se unen a LBD. Dichos estudios muestran que el anillo de activación de LBD (formado por la unión entre LBD y ATD) es esencial para la transducción de señales y activación en RNMDA (Armstrong *et al.*, 2006; Cheriyan *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016).

**Figura 10**

*Representación gráfica del mecanismo de inhibición y activación del receptor de NMDA*



*El RNMDA cambia conformacionalmente entre un estado activo e inactivo para su apertura o cierre. Cuando los antagonistas se unen en el LBD provocan un estado abierto (inactivo) mientras que cuando los agonistas se unen en LBD provocan un estado cerrado (activo) (Modificado de Zhu *et al.*, 2016).*

La forma del anillo de activación es modificada de acuerdo con la unión de antagonistas competitivos, agonistas o inhibidores alostéricos. La unión en el RNMDA de Glu y Gly a GluN2A y GluN1 respectivamente, desencadena un cambio conformacional en el LBD lo que hace que el anillo se cierre alrededor del ligando y provoque la apertura del poro del canal, que junto con un

desbloqueo de Mg<sup>2+</sup> (dependiente de voltaje) provoca la entrada de calcio en la célula postsináptica y la despolarización del potencial de membrana (Yu & Lau, 2018).

Así mismo, por escaneo de acoplamiento molecular, se han identificado dos sitios de unión de la ACh (Acetilcolina) en RNMDA: El primero es el mismo sitio de unión de Gly en el LBD, en estado “apo” (abierto) y el segundo coincide con el sitio de unión de un regulador alostérico negativo ubicado en la interfaz entre GluN1 y GluN2 en estado “holo” (cerrado) (Islas *et al.*, 2022).

## 1.3 NEUROMODULACIÓN DE LA CORTEZA PREFRONTAL

---

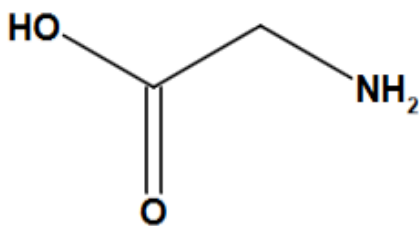
### 1.3.1 Glicina

La glicina (Gly) es un aminoácido no esencial y está formado por una molécula de carbono unido a un amino y un grupo carboxilo (Fig. 11). Puede formarse a partir de serina mediante una reacción reversible (Hall, 2015).

Desde finales de la década de 1970, la Gly se ha considerado un importante neurotransmisor inhibitorio en el tronco encefálico y la médula espinal (Hernandes & Troncone, 2009).

#### Figura 11

*Fórmula química de glicina*



*La Gly es el aminoácido más pequeño, es considerado también un importante neurotransmisor inhibitorio, está compuesto de un grupo amino, un grupo carboxilo y su cadena R está compuesta de un solo H (Hernandes & Troncone, 2009).*

La transmisión inhibitoria mediada por Gly es esencial para el control motor voluntario, así como para el procesamiento de entradas sensoriales y la generación de respuestas reflejas (Hernandes

& Troncone, 2009). Aunado a esto en algunas áreas del SNC, se ha reportado por López-Corcuera et al., 2001 la Gly puede ser co-liberada con GABA, el principal neurotransmisor inhibitorio.

Los receptores de Gly (RGly) están compuestos por combinaciones de cinco proteínas de membrana distintas que se derivan de dos familias de genes separadas, denominadas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Existen cuatro genes que codifican las subunidades  $\alpha$  ( $\alpha1$ ,  $\alpha2$ ,  $\alpha3$  y  $\alpha4$ ) y una subunidad  $\beta$  (Lu & Ye, 2011).

Los RGly son de tipo ionotrópico, es decir un canal iónico activado por ligando y que permite el paso de los iones de  $\text{Cl}^-$ . Cuando la Gly se une al receptor, el poro se abre permitiendo que el  $\text{Cl}^-$  se difunda pasivamente a través de la membrana. La conductancia de  $\text{Cl}^-$  por lo tanto, lleva a la hiperpolarización de las neuronas, además de prevenir la despolarización y el disparo neuronal inducido por neurotransmisores excitatorios (Stein & Nicoll, 2003).

En cuanto a la acción de Gly en el RNMDA, se sabe que Johnson & Ascher (1987) emplearon cultivos de neuronas corticales para demostrar primero, que la Gly puede facilitar la transmisión excitatoria en el cerebro a través de la co-activación del RNMDA, estas células mostraron que las corrientes activas por Glu o NMDA son potenciadas en presencia de Gly, por ello y por la caracterización del sitio de unión de Gly en el RNMDA desde entonces se ha catalogado a la Gly como co-agonista del RNMDA. Sin embargo, estudios computacionales recientes han revelado que la ACh se une al RNMDA en el mismo sitio de unión a Gly en la subunidad GluN1 (Islas *et al.*, 2022).

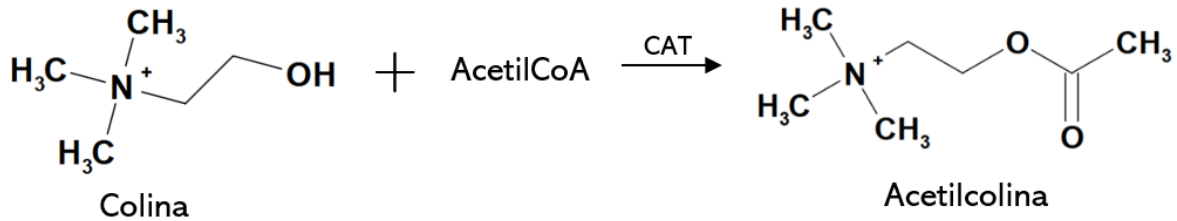
### 1.3.2 Acetilcolina

La acetilcolina (ACh) fue el primer neurotransmisor descubierto en los mamíferos tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico. La ACh se sintetiza (Fig. 12) a partir de la colina y del AcetilCoA en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa y se elimina del SNC y de las sinapsis periféricas mediante hidrólisis enzimática por acetilcolinesterasa (Brady *et al.*, 2012; Flores & Segura, 2005).



**Figura 12**

*Reacción química de la síntesis de acetilcolina*



*La ACh fue el primer neurotransmisor descubierto, se sintetiza a partir de la colina y del AcetilCoA en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (CAT) (Brady *et al.*, 2012).*

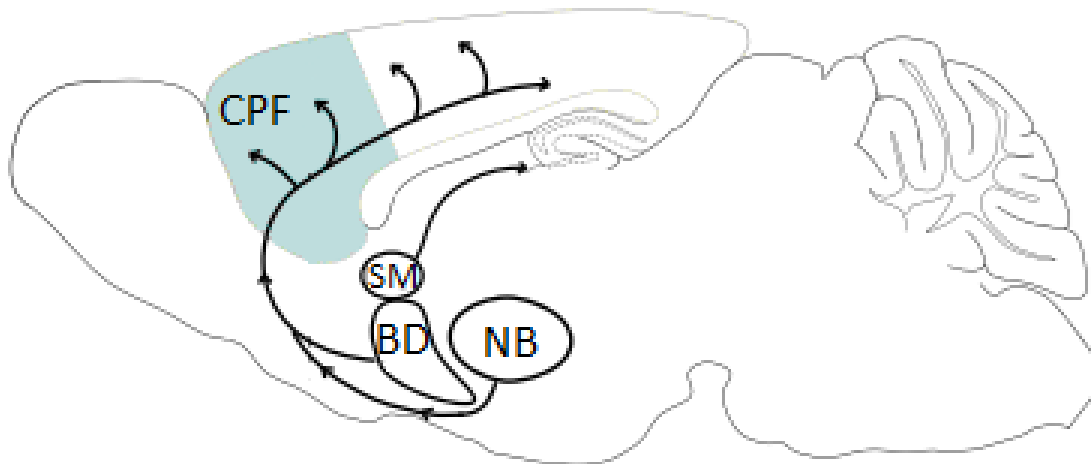
En la CPF la ACh se ha descrito desde la década de los años 70's y es conocida por ser un importante y complejo participante en la cognición, la memoria y el mantenimiento de la consciencia (Deutsch, 1971; Conner *et al.*, 2003; Luchicchi *et al.*, 2014). Dada su proyección importante en la CPF, la ACh es esencial en las funciones ejecutivas (Miller & Cohen, 2001) y su modulación es indispensable también para la atención (Proulx *et al.*, 2014).

La ACh existente en la CPF llega desde las proyecciones del telencéfalo basal, principalmente del núcleo basal de Meynert (Ch4) seguido del brazo vertical (Ch2) y el brazo horizontal (Ch3) de la banda diagonal de Broca (Mesulam & Geula, 1988; Mesulam *et al.*, 1983; Paul *et al.*, 2015). Las terminaciones colinérgicas son particularmente abundantes en las capas corticales (III-IV) (Lysakowski *et al.*, 1989; Mora & Ferrer, 1986).

La inervación colinérgica (Fig. 13) está presente en todas las capas de la CPF (Woolf, 1991), pero está polarizada hacia la activación de las capas más profundas (Tian *et al.*, 2011).

**Figura 13**

*Representación esquemática de la innervación colinérgica en el cerebro de rata*



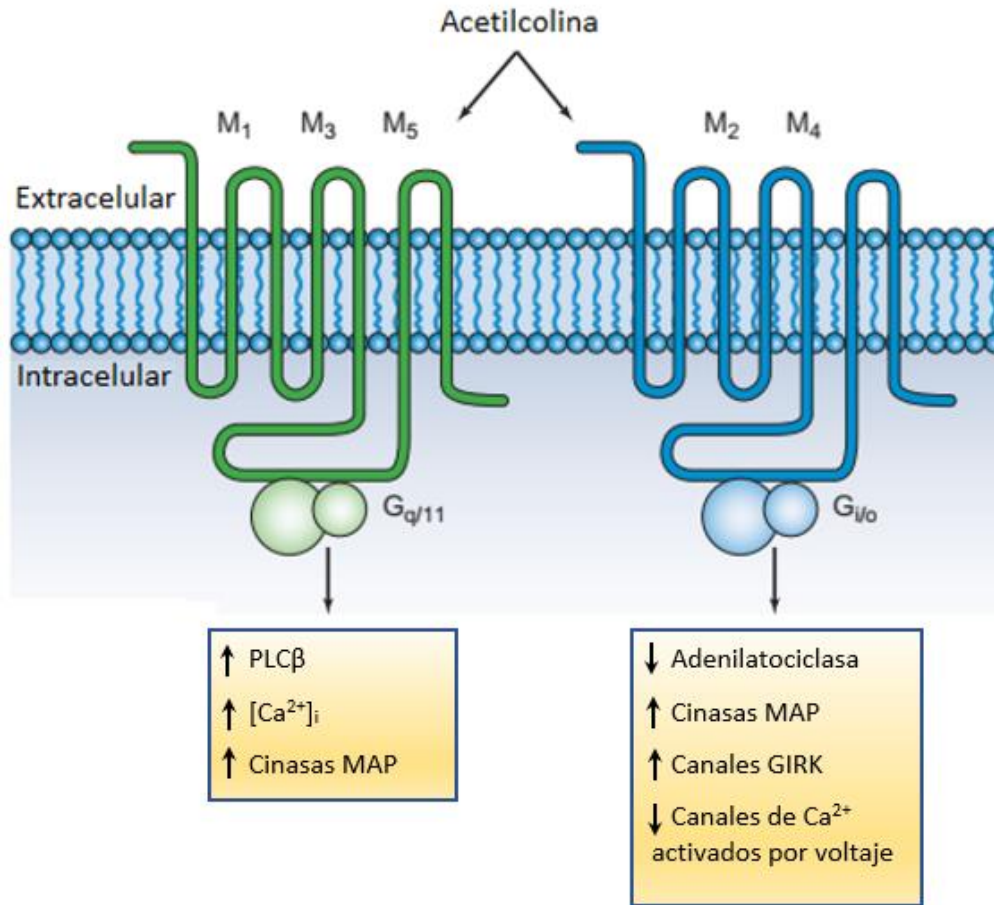
*La ACh es conocida por ser un importante y complejo participante en la cognición, memoria y mantenimiento de la consciencia. La CPF de la ratona (parte sombreada) recibe innervación colinérgica del telencéfalo: SM (Núcleo septal medial), BD (Banda diagonal) y NB (Núcleo basal) (Modificado de Proulx et al., 2014).*

Se han identificado dos clases de receptores colinérgicos en el SNC, los de tipo ionotrópico llamados nicotínicos (RnACh), nombrados así por su agonista nicotina; y los de tipo metabotrópicos denominados muscarínicos (RmACh) por su alta afinidad a la muscarina (Flores & Segura, 2005).

Los RmACh están acoplados a proteínas G y se subdividen de acuerdo con sus mecanismos efectores y el tipo de proteínas G al que están unidos (Fig. 14): M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> (Brady et al., 2012).

**Figura 14**

*Clasificación de los receptores muscarínicos y sus mecanismos efectores*



*Los receptores colinérgicos muscarínicos se pueden subdividir según sus características de acoplamiento a proteína G y sus mecanismos efectores. Los mAChR M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> se acoplan preferentemente a la familia G<sub>q/11</sub>, mientras que los receptores M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub> normalmente activan las proteínas de la familia G<sub>i/o</sub>. La activación de los mAChR da como resultado la activación de diferentes proteínas efectoras, la dirección de la flecha indica un aumento o una disminución de la actividad del mecanismo efector. Por ejemplo, la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP) son activadas por ambos grupos de receptores. GIRK, canal de K<sup>+</sup> rectificador interno activado por proteína G y PLCβ (fosfolipasa Cβ) (Modificado de Wess et al., 2007).*

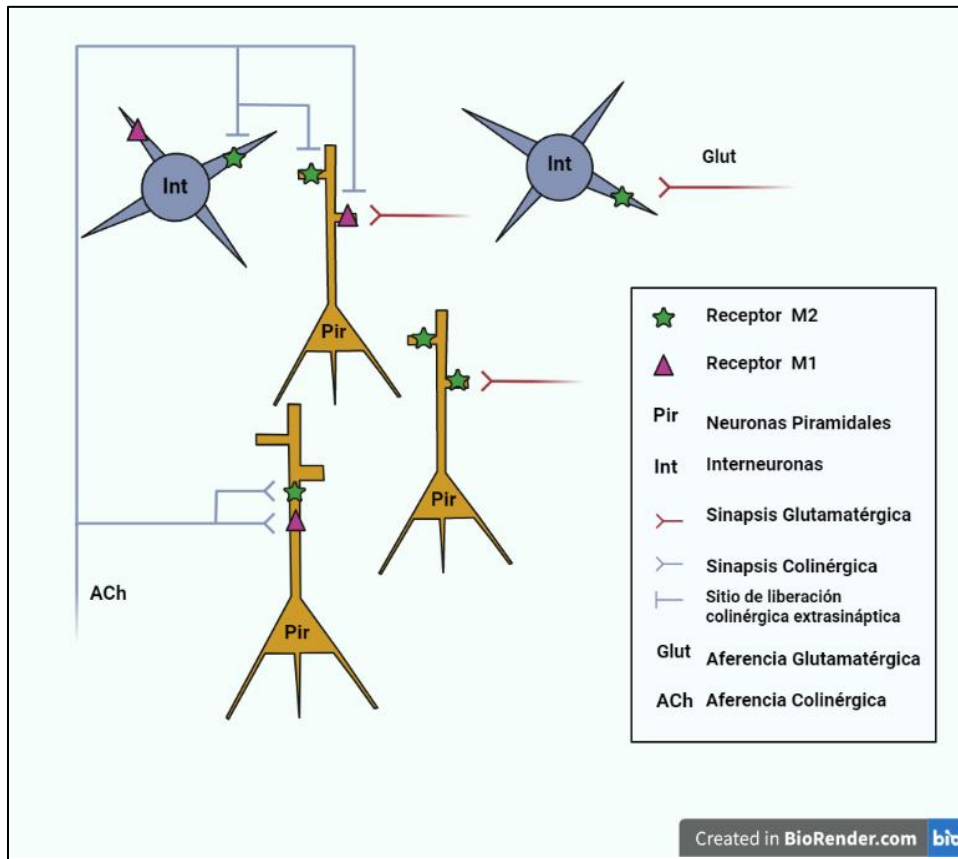
Los receptores impares M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> se encuentran acoplados a la familia de proteínas G<sub>q/11</sub> y producen una actividad excitatoria. En cuanto a los receptores pares M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub> están acoplados a la familia de proteínas G<sub>i/o</sub> y producen actividad inhibitoria (Ishii & Kurachi, 2006).

En la corteza, tanto en primates, humanos y roedores, predominan los receptores M1 y M2 (Vijayraghavan & Everling, 2021), en la corteza de rata el porcentaje de disposición se describió de la siguiente manera M1 (34-40%), M2(19-37%) M3(15%) y M4(10%) (Levey, 1993).

Con referencia a su localización en la CPF (Fig. 15), se ha informado que los M1 se hallan en los ejes dendríticos de las neuronas piramidales e interneuronas, y en las espinas de las neuronas piramidales. Los M2 se encuentran en las espinas dendríticas postsinápticas de las neuronas piramidales y en los ejes dendríticos de las interneuronas, también se encuentran en terminales presinápticos de aferentes glutamatergicos en CPF y como autorreceptores en terminales colinérgicos (Medalla & Barbas, 2012; Mrzljak *et al.*, 1993).

**Figura 15**

*Esquema representativo de la localización de los receptores muscarínicos en las neuronas de la CPF y su relación con la invasión colinérgica y glutamatergica*



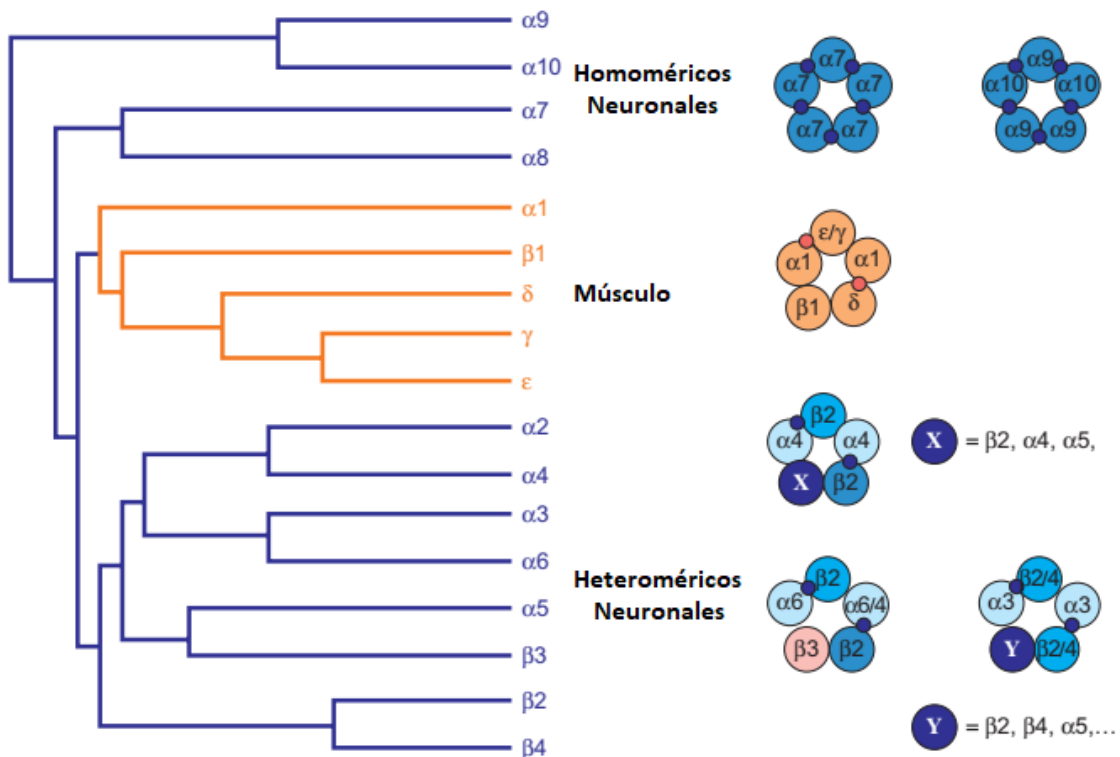
*Los receptores M1 se localizan en los ejes dendríticos de las neuronas piramidales e interneuronas, y en las espinas de las neuronas piramidales, donde se yuxtaponen a las sinapsis glutamatergicas. Las sinapsis colinérgicas se encuentran principalmente en los ejes*

dendríticos, mientras que los sitios de liberación colinérgica extrasináptica en los axones colinérgicos dan como resultado una transmisión de volumen difusa para influir en los receptores muscarínicos en las neuronas de la CPF. Los receptores M2 se encuentran en las espinas dendríticas postsinápticas de las neuronas piramidales y en los ejes dendríticos de las interneuronas. Los M2 también se encuentran en terminales presinápticos de aferentes glutamatérgicos en CPF y como autorreceptores en terminales colinérgicos (Modificado de Vijayraghavan & Everling, 2021).

Por otro lado, los RnACh se forman a partir de cinco familias de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  (Fig. 16), de las cuales  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  sólo están presentes en el músculo esquelético y los 12 restantes,  $\alpha_2$  –  $\alpha_{10}$  y  $\beta_2$  –  $\beta_4$  en el SNC (Dani, 2001; Gotti & Clementi, 2004), en función de esto se han definido subfamilias de receptores.

**Figura 16**

*Heterogeneidad de la familia de las subunidades de los receptores nicotínicos*



*Relación filogenética de las subunidades RnACh de vertebrados, adaptada de Le Novère & Changeux (1995). La composición de subunidades de los RnACh nativos se ilustra a la derecha. Los sitios de unión putativos de agonistas se indican mediante círculos oscuros entre las subunidades adyacentes principales y complementarias.*

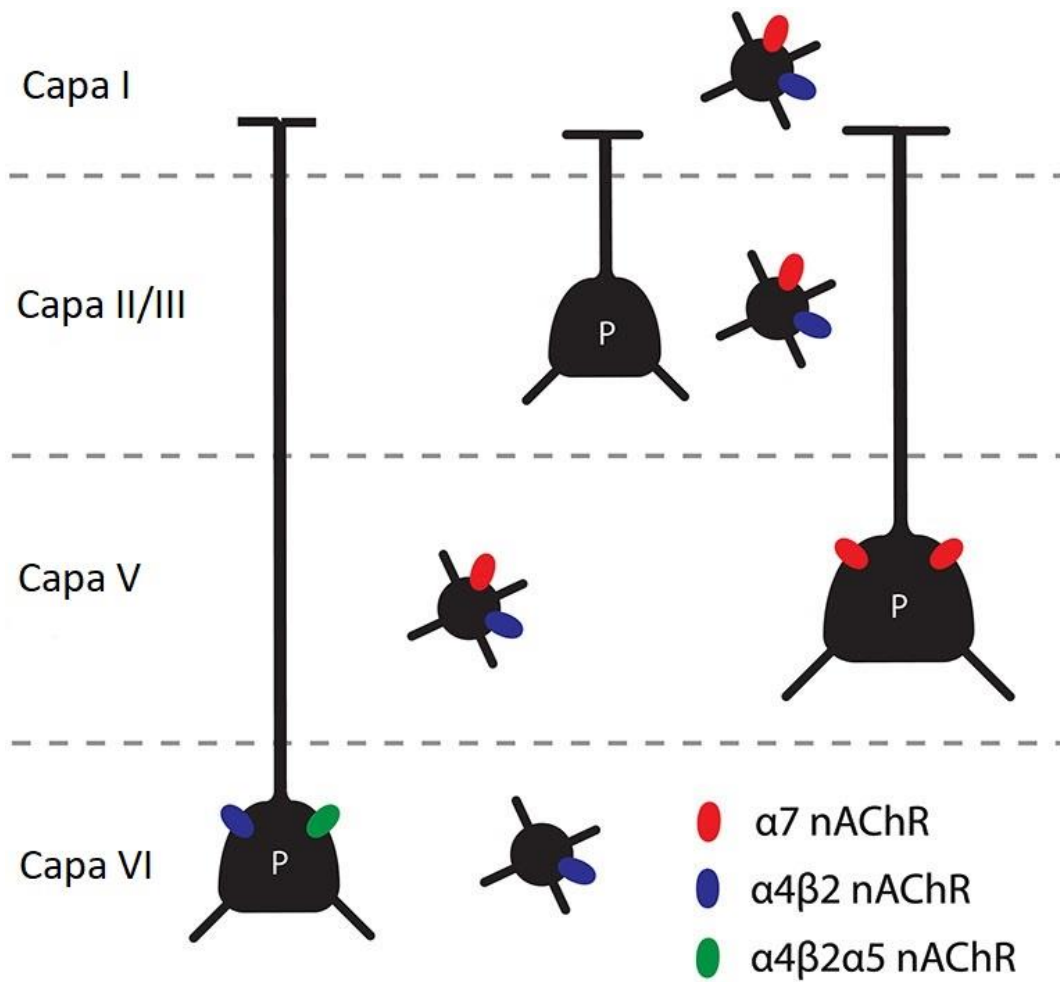
En relación con lo anterior se han descrito dos subfamilias principales de RnACh, la primera conformada por receptores homopentaméricos que contienen únicamente cinco subunidades  $\alpha$  y se reconocen también por su sensibilidad a la  $\alpha$ -bungarotoxina (componente presente en el veneno de serpiente de Taiwán) (Chu, 2005). La segunda subfamilia incluye a receptores heteropentaméricos los cuales están formados por dos subunidades  $\alpha$ , que llevan el sitio principal de unión al ligando y dos subunidades  $\beta$  que tienen un sitio de unión complementario (Gotti *et al.*, 2006).

La distribución de los RnACh ha sido reportada de acuerdo con las subunidades, en la corteza de la rata las subunidades  $\alpha_4$  y  $\beta_2$  están entre un 90 y 98%. Ambas subunidades forman un receptor que generalmente tienen a la subunidad  $\alpha_5$  para completarlo. (Gotti & Clementi, 2004).

De forma particular, en la CPF, se han descrito la distribución de los nAChR por capas (Fig. 17). En las neuronas piramidales de la capa V y capa VI se encuentran los receptores  $\alpha_7$  y  $\alpha_4\beta_2 - \alpha_4\beta_2\alpha_5$  respectivamente; en las interneuronas de las capas I, II, III, V y VI se encuentran también los receptores  $\alpha_7$  y los receptores  $\alpha_4\beta_2$  (Poorthuis *et al.*, 2013; Wada *et al.*, 1990; Tian *et al.*, 2011).

**Figura 17**

*Ubicación de los receptores nicotínicos en la corteza prefrontal*



*Las neuronas piramidales de la CPF en la capa V y VI son moduladas directamente por los RnACh, a través de las subunidades  $\alpha 7$  y  $\beta 2$  respectivamente. Además, la entrada talámica a la capa V está fuertemente modulada la subunidad  $\beta 2$ . Las interneuronas en todas las capas contienen RnACh, sin embargo, la distribución de receptores homoméricos y heteroméricos es variada para los diferentes tipos de interneuronas y las diferentes capas de la corteza (Modificado de Bloem et al., 2014).*

### 1.3.3 Afinidad de los receptores colinérgicos por ACh

En bioquímica y farmacología se utilizan varios parámetros de afinidad de unión entre ligando y receptor. La afinidad entre el receptor y su ligando normalmente se define mediante valores de afinidad de unión, estos valores se describen como: concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ), constante de disociación ( $Kd$ ) y la constante de inhibición ( $Ki$ ) principalmente (Shim *et al.*, 2021).

$CI_{50}$  significa concentración inhibitoria al 50%, es decir, la concentración de un inhibidor requerida para reducir la actividad biológica de interés a la mitad del valor no inhibido (Srinivasan, 2020).

La  $Kd$  cuantifica el equilibrio entre un ligando unido a un sitio en una proteína de manera más general, también se define como la constante de disociación para un ligando radiomarcado determinado por análisis de unión por saturación y se mide en molares (Ma *et al.*, 2018).

Igual que la  $Kd$ , la  $Ki$  o constante de inhibición, se refiere a una constante de disociación, pero de una forma más reducida para la unión del ligando al receptor; es decir representa la afinidad de unión que tiene el ligando al receptor, pero en presencia de un inhibidor (Murphy, 2004). Los valores de  $Ki$  se determinan a través de una serie de experimentos con cantidades variables de dicho inhibidor. El equilibrio de unión descrito por el valor de  $Ki$  depende del mecanismo cinético de la inhibición, los cuales incluyen inhibición competitiva, incompetitiva, no competitiva y mixta (Srinivasan *et al.*, 2020).

Valores bajos de  $CI_{50}$  significan una alta afinidad de unión. De manera similar, los valores bajos de  $Ki$  significan una alta afinidad de unión. En general, los valores de  $Kd$  y  $Ki$  se expresan en términos de  $pKd$  y  $pKi$  respectivamente, los cuales representan su logaritmo negativo (Shim *et al.*, 2021).

En este trabajo hemos utilizado los datos correspondientes a los valores de  $Ki$  de los receptores muscarínicos y nicotínicos respecto a la acetilcolina (Fig. 18), con el fin de tenerlos como referencia para utilizar concentraciones de ACh por debajo de dichos valores de  $Ki$ .



### Figura 18

*Tabla de afinidades respecto a  $K_i$  de acetilcolina en receptores muscarínicos y nicotínicos*

| <b>Receptor<br/>Colinérgico</b>     | <b><math>K_i</math> (nM ACh)<br/>Rata</b> | <b>Referencia</b>      |
|-------------------------------------|---|------------------------|
| <b>M1, M2 y M4</b>                  | 85  | (Charton et al., 2008) |
| <b><math>\alpha 7</math></b>        | 3509                                      |                        |
| <b><math>\alpha 4\beta 2</math></b> | 7.60                                      | (Bisson et al., 2005)  |

*Los valores de  $K_i$  representan la afinidad de unión que tiene el ligando a un receptor en presencia de un inhibidor. Los receptores M1, M2 y M4 tienen un valor de 85nM; y las subunidades  $\alpha 7$  3509nM y  $\alpha 4\beta 2$  7.6nM.*

## 2 JUSTIFICACIÓN

Desde la caracterización de la corriente activada por NMDA (iNMDA) junto con la descripción de Gly como co-agonista necesario de dicha corriente (Kleckner & Dingledine, 1988; Johnson & Ascher, 1987), se han propuesto múltiples sustancias que modulan la iNMDA.

Una de estas sustancias que modulan la iNMDA es la ACh, la cual también está involucrada en funciones importantes en la CPF como la cognición, memoria y atención (Conner *et al.*, 2003; Miller & Cohen, 2001; Proulx *et al.*, 2014).

En el trabajo de Flores-Hernández *et al.*, (2009) se describe que la ACh, el agonista muscarínico oxotremorina y el antagonista nicotínico D-tubocurarina, inhiben la iNMDA (en presencia de Gly). Además, la atropina (antagonista clásico muscarínico) no reducen el efecto inhibitorio de la ACh en neuronas de la corteza auditiva. Así mismo, sugieren que dicha acción colinérgica opera compitiendo por la unión en el sitio de Gly en el RNMDA.

Aunado a esto, en el laboratorio de Neuromodulación se ha estudiado la modulación de la iNMDA por D-tubocurarina en neuronas espinosas medianas del núcleo estriado (Luna, 2016), en dicho trabajo se demostró que la D-tubocurarina reduce la corriente activada por NMDA, confirmando el trabajo de Flores *et al.*, (2009); con lo cual sugirieron que la D-tubocurarina podría competir por el sitio de unión a Gly en el RNMDA. Así moléculas colinérgicas podrían funcionar como co-agonistas en el RNMDA en ausencia de Gly.

Además, en un estudio realizado en ovocitos que expresan únicamente RNMDA con subunidades GluN1/GluN2B, se encontró que la oxotremorina co-aplicada con NMDA en presencia de Gly (30µM) tuvo un efecto de potenciación sobre las iNMDA, lo cual demuestra que el efecto de la oxotremorina es por la interacción directa en el RNMDA y no por receptores muscarínicos (Zwart *et al.*, 2018).

Por lo que, con los antecedentes previamente descritos, en este trabajo se propone describir la modulación de ACh en la iNMDA en las neuronas piramidales de la CPF debido al rol que ejerce la ACh en los procesos mediados por esta área.

### 3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de ACh sobre la corriente activada por NMDA en ausencia de Gly en neuronas piramidales agudamente disociadas de CPF de rata?

### 4 HIPÓTESIS

La ACh potencia la corriente activada por NMDA en ausencia de Gly en neuronas piramidales agudamente disociadas de CPF de rata.

### 5 OBJETIVOS

#### 5.1 OBJETIVO GENERAL

---

Caracterizar el efecto de la modulación por ACh en las corrientes activadas por NMDA en ausencia de Gly en neuronas piramidales de la corteza prefrontal de la rata.

#### 5.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

---

Los siguientes objetivos se realizarán en neuronas piramidales de la CPF de la rata:

- Caracterizar la iNMDA en ausencia de Gly.
- Describir el efecto de Gly sobre la iNMDA.
- Determinar el efecto de ACh sobre la iNMDA en ausencia de Gly.
- Comparar la modulación de ACh y Gly en las iNMDA.

## 6 METODOLOGÍA

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los experimentos se realizaron en ratas macho Wistar de 30 días de edad, provenientes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El registro electrofisiológico se realizó en neuronas piramidales agudamente disociadas provenientes de la corteza prefrontal en el Laboratorio de Neuromodulación del Instituto de Fisiología.

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos fueron manejados de acuerdo con la norma NOM-087-ECOL-SSA1-200.

### 6.1 DISOCIACIÓN AGUDA DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CORTEZA PREFRONTAL DE RATA

---

El protocolo de disociación que se empleo ha sido previamente descrito por Flores-Hernández *et al.*, (2002, 2009) y se describe a continuación con algunas modificaciones:

Las ratas fueron anestesiadas con halotano y posteriormente decapitadas, los cerebros se extrajeron para después colocarse en una solución fría de isetionato con bajo calcio (en mM): 140 de isetionato de sodio, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 23 glucosa, 15 HEPES, pH=7.4, 300-310mOsm/L y suplementado con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico; y burbujeada con O<sub>2</sub>.

Posteriormente, se obtuvieron rebanadas coronales de 350µm con ayuda de un vibratomo (Campden, UK) mientras están sumergidas en la misma solución. De las rebanas obtenidas, se diseccionó la parte correspondiente a la CPF de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas Bregma 3.70mm-2.70mm de Paxinos & Watson, (2013).

Las rebanadas de CPF obtenidas, se mantuvieron mínimo 1 hora a una temperatura de 30°C en solución salina balanceada de Earle (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio

(NaHCO<sub>3</sub>) y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico; burbujeada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, pH=7.4, 300-310 mOsm/L. Seguido de esto, se tomó una rebanada de CPF para su tratamiento enzimático con una duración de 10min., el cual se realizó en una cámara de cultivo de 40ml con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES y burbujeada con O<sub>2</sub>, conteniendo 0.75mg/ml de papaína (Calbiochem-5125) a 35°C y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico.

Después de la digestión enzimática, el tejido se lavó con la solución de isetionato y posteriormente fue disociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al fuego). La suspensión de células se colocó en cajas de Petri de 35mm (Nunclon Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. Después de 10 minutos de incubación la suspensión fue lavada y perfundida con una solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, burbujeada con O<sub>2</sub>, pH =7.4 y 300-310mOsm/L; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje en célula completa.

## 6.2 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

---

Se usó la técnica de fijación de voltaje en célula completa (Whole Cell), para ello los electrodos de registro fueron estirados de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI 1B120F4, Sarasota FL) utilizando un Micropipette Puller Modelo P-97 (Sutter Instrument Co).

La solución interna para los registros de corriente estuvo compuesta por (en mM): 175 N-Metil-D-Glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter) - N, N, N', N' - tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na<sub>2</sub>ATP, 0.35 Na<sub>3</sub>GTP, 0.1 leupeptina, pH=7.25 ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 265-270mOsm/L.

La solución externa estuvo compuesta de (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 12 glucosa, 10 HEPES, pH=7.4 ajustado con NaOH, 300-310mOsm/L.

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

La resistencia de los electrodos fue típicamente de 4-10M $\Omega$  en el baño. Después de la ruptura del sello la resistencia fue menor a 20M $\Omega$ . Cuando el cambio de la resistencia serial era mayor al 50% el experimento fue suspendido. El potencial de mantenimiento de membrana será de -80mV mientras no haya protocolo activo.

Para su registro se elegirán las neuronas piramidales de mayor capacitancia, de menor longitud, menor número de dendritas y que mantenga sus características morfológicas (forma de pirámide o pera y dendrita apical visible).

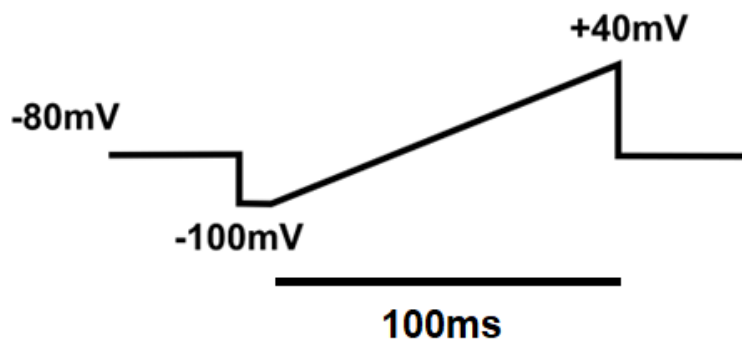
## 6.2.1 Protocolos electrofisiológicos

### 6.2.1.1 Rampa

El protocolo de rampa (Fig. 19) se utilizó para evaluar la viabilidad neuronal, dicha rampa va de -100mV a +40mV con una duración de 100ms para generar las corrientes de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>.

**Figura 19**

*Esquema representativo de una rampa*



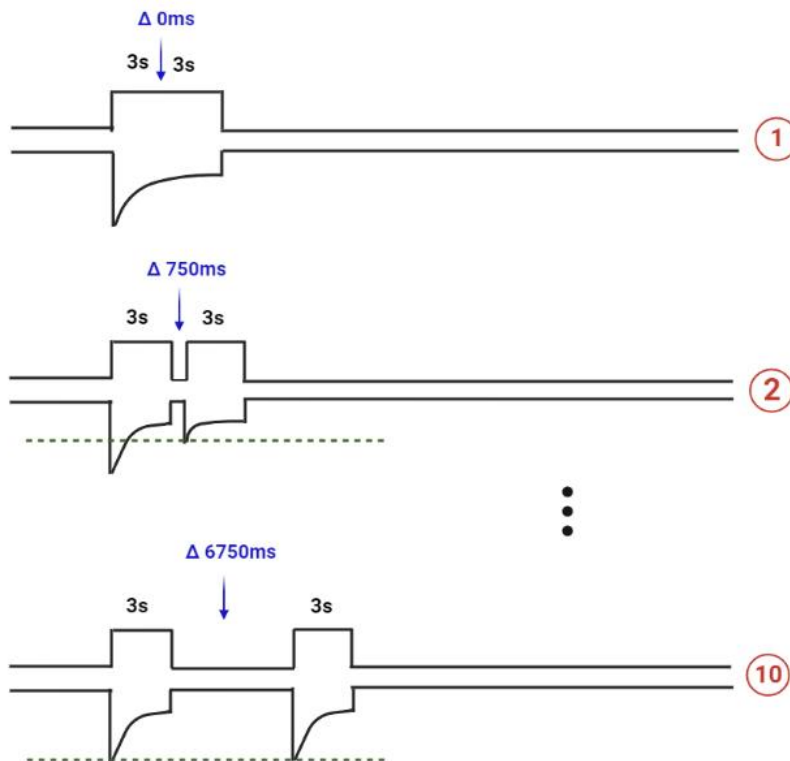
*El protocolo de rampa es usado para evaluar la viabilidad de la célula, inicia con un voltaje de -100mV hasta +40mV y genera las corrientes de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>.*

### 6.2.1.2 Protocolo de recuperación

El objetivo de este protocolo fue calcular el tiempo de recuperación de la desensibilización del RNMDA en la CPF de neuronas piramidales. Manteniendo a la célula en un potencial de mantenimiento de  $-80\text{mV}$  se aplicó un pulso de 3s de NMDA  $100\mu\text{M}$ , a continuación, se volvió a aplicar este mismo pulso con una latencia ( $\Delta$ ) de 0ms, que posteriormente se incrementó a 750ms por cada aplicación. Este proceso (Fig. 20) se repitió en 10 registros hasta llegar a una  $\Delta$  de 6750ms. Se realizó en 8 neuronas y se calculó el porcentaje total de recuperación, los resultados se encuentran en la Fig. 21.

**Figura 20**

*Diagrama del protocolo de recuperación*

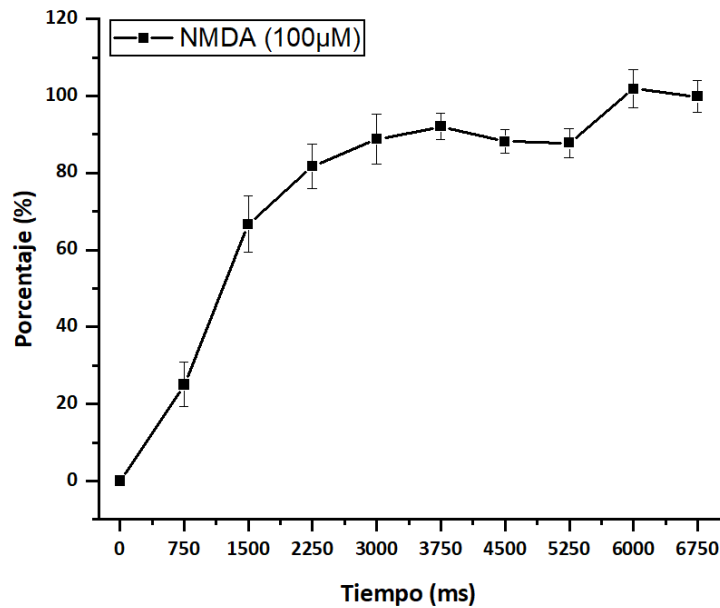


(1) representa el primer pulso de 3s de aplicación de NMDA, seguido de un periodo de latencia  $\Delta$  de 0ms y de un siguiente pulso de aplicación de 3s.

(2) representa un primer pulso de 3s seguido de un periodo de latencia de  $\Delta$  de 750ms. El protocolo sigue repitiéndose mientras  $\Delta$  aumenta 750ms cada paso hasta llegar a (10) donde  $\Delta$  es de 6750ms entre cada aplicación de 3s de NMDA.

**Figura 21**

*Gráfica del tiempo de recuperación de la corriente activada por NMDA*



*Se realizó el protocolo de recuperación para NMDA 100μM neuronas piramidales de la CPF, n=8. La gráfica muestra el porcentaje de recuperación del RNMDA en 6750ms.*

### 6.2.1.3 Aplicación de fármacos

La aplicación de fármacos (Fig. 23) para inducir la corriente activada por el ligando NMDA, se llevó a cabo a través de un sistema de dos capilares con un ángulo de 45° entre ellos, una inclinación de 30° con respecto al fondo y una distancia de 200 a 600μm de la célula a registrar. Uno de estos capilares (capilar 1) lleva la solución externa donde se agregarán los neuromoduladores de acuerdo con el protocolo; y en el otro (capilar 2) la misma solución más el neuromodulador y el NMDA.

El intercambio de solución se realizó por la apertura de válvulas solenoides 98302-00 (Cole-Parmer) controladas por la salida digital del sistema Digidata 1440A y un aparato de control fabricado en el laboratorio.



Para inducir la corriente a estudiar se fijó la neurona a un potencial de mantenimiento de -80mV seguido de un pulso de prueba de -10mV y con el fin de efectuar los tres primeros objetivos se siguieron tres protocolos distintos para caracterizar el efecto de NMDA, NMDA+Gly y NMDA+ACh mediante una curva dosis respuesta (DR) para cada condición; cabe mencionar que para los tres protocolos se usó el mismo control. Dichos protocolos se describen a continuación (Fig. 22):

**a) Aplicación de NMDA**

Control (NMDA 100µM): En esta condición la célula fue bañada con la solución externa por el capilar 1 durante 2s, seguido de esto se cierra el capilar 1 y se abre el capilar 2 el cual lleva NMDA (100µM) durante 3s. Después de que el capilar 2 se cierra, se abre nuevamente el capilar 1 por 25s. Estas aplicaciones tienen una duración total de 30s y se repiten hasta obtener de 3 a 5 trazos estables, antes de pasar a la aplicación efecto.

Efecto (NMDA 0.3-300µM): Después de la condición control y siguiendo con el mismo protocolo de 30s donde la célula es bañada por el capilar 1, se interrumpe 3s para abrir el capilar 2 y aplicar determinada concentración de NMDA (0.3, 1, 3, 10, 30 o 300 µM) de manera aleatoria, posteriormente se cierra el capilar 2 y se abre el capilar 1 para dejarlo por 25s. Estas aplicaciones tienen una duración total de 30s y se repiten hasta obtener de 3 a 5 trazos estables. Cada dos trazos de efecto se regresaron al control NMDA 100µM, obteniendo así curva la DR de NMDA en ausencia de Gly.

**b) Aplicación de NMDA (100µM) + Gly**

Control (NMDA 100µM): En esta condición la célula fue bañada con la solución externa por el capilar 1 durante 2s, seguido de esto se cierra el capilar 1 y se abre el capilar 2 el cual lleva NMDA (100µM) durante 3s. Después de que el capilar 2 se cierra, se abre nuevamente el capilar 1 por 25s. Estas aplicaciones tienen una duración total de 30s y se repiten hasta obtener de 3 a 5 trazos estables, antes de pasar a la aplicación efecto.

Efecto (NMDA 100 $\mu$ M +Gly): Seguido de la condición control y siguiendo con el mismo protocolo de 30s donde la célula es bañada por el capilar 1 (que en este caso contiene Gly) durante 2s, seguido de esto, el capilar 1 se cierra 3s para aplicar con el capilar 2 100 $\mu$ M de NMDA más Gly con una concentración definida (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 o 100  $\mu$ M), se cierra este último y se abre el capilar 1 por 25s. El protocolo para obtener de 3 a 5 trazos estables y se regresó a la condición control que también sirvió como lavado.

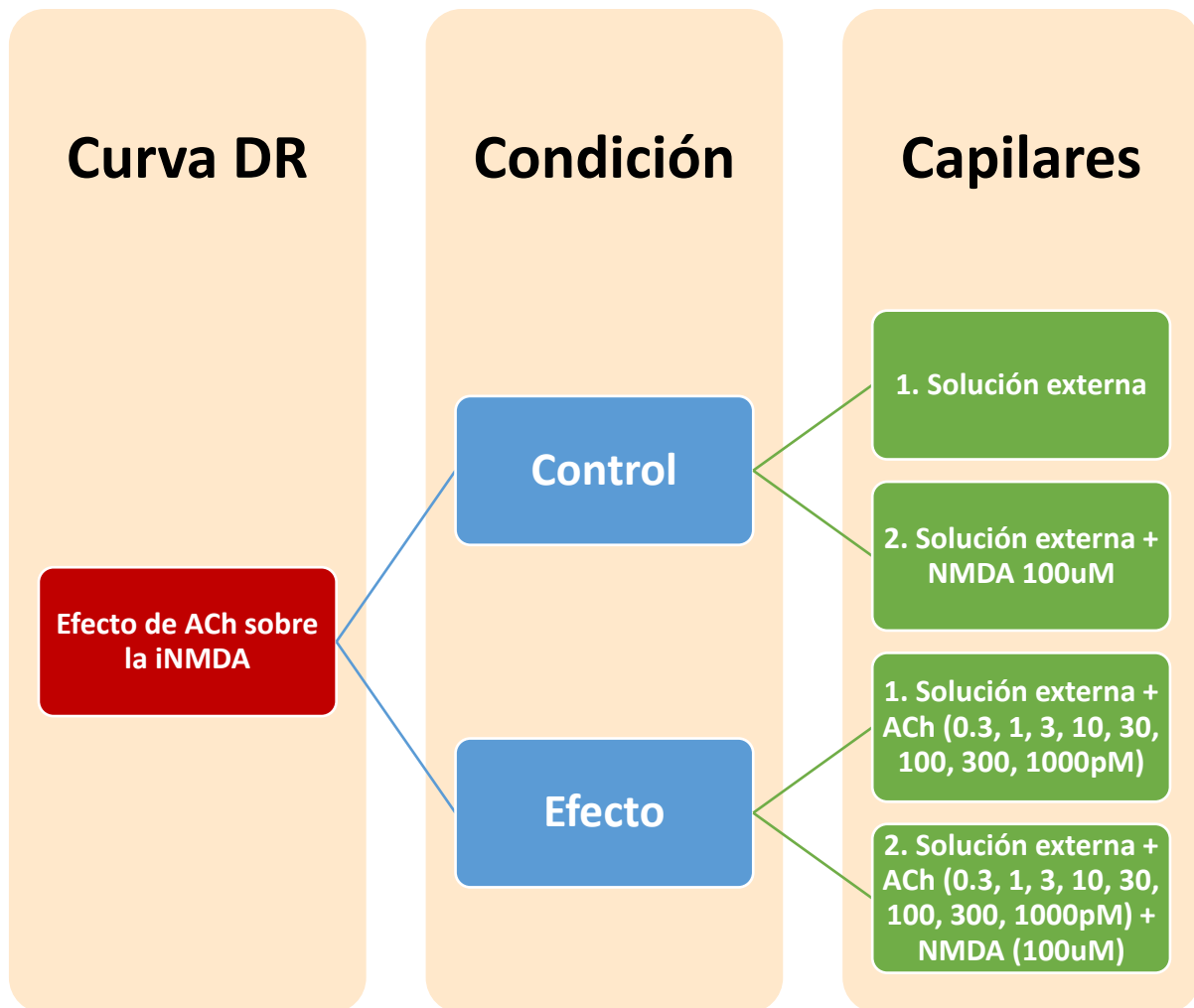
**c) *Aplicación de NMDA (100 $\mu$ M) + ACh***

Control: En esta condición la célula fue bañada con la solución externa por el capilar 1 durante 2s, seguido de esto se cierra el capilar 1 y se abre el capilar 2 el cual lleva NMDA (100 $\mu$ M) durante 3s. Después de que el capilar 2 se cierra, se abre nuevamente el capilar 1 por 25s. Estas aplicaciones tienen una duración total de 30s y se repiten hasta obtener de 3 a 5 trazos estables, antes de pasar a la aplicación efecto.

Efecto (NMDA 100 $\mu$ M+ACh): Después de la condición control, la célula es bañada por capilar 1 con la solución externa y ACh durante 2s, posteriormente se interrumpe 3s para aplicar 100 $\mu$ M de NMDA más ACh en concentraciones del orden de pM: 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 o 1000, se cierra entonces el capilar 1 y se abre el capilar 2 hasta completar el protocolo de 30s. El protocolo se dejó correr hasta obtener de 3 a 5 trazos estables. Teniendo siempre como control y lavado la concentración de 100 $\mu$ M de NMDA, obteniendo así la DR del efecto de ACh sobre la iNMDA.

Figura 22

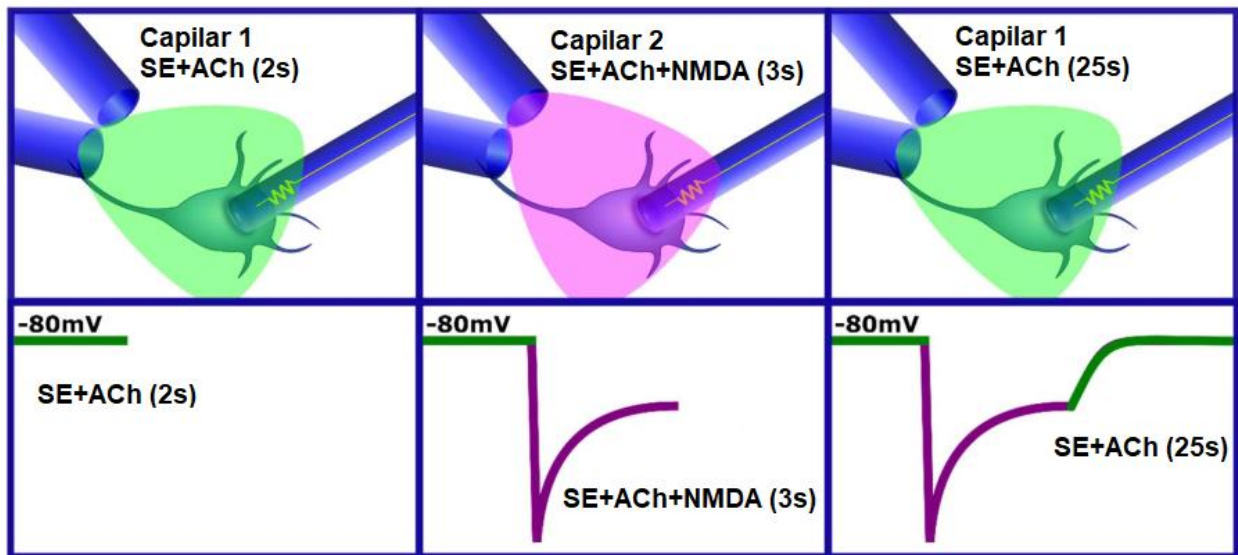
Esquema de la aplicación de acetilcolina y NMDA



El diagrama representa el protocolo que se siguió para realizar la curva DR del efecto de ACh sobre la iNMDA, este mismo diagrama puede representar el efecto de Gly cambiando ACh por Gly y las concentraciones que se ocuparon para este caso.

**Figura 23**

*Representación de la aplicación de acetilcolina y NMDA mediante capilares*



*La figura representa la aplicación de las soluciones mediante los capilares y con ello la activación del RNMDA y su correspondiente corriente (Modificado de Hernández-Carballo et al., 2020).*

## 6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

Los valores en tablas, gráficas o texto representan el valor de la media de los resultados obtenidos  $\pm$  su error estándar (ESM). Los ajustes y gráficas fueron realizados en el programa OriginPro 2018 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Los datos fueron analizados por las pruebas Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0.05$ ) para determinar el comportamiento de una distribución normal.

El efecto de los neuromoduladores sobre el Pico y el EE de corriente de NMDA, se calculó en porcentaje respecto a la media del control y lavado, tal como se muestra en la siguiente formula:

$$\% \text{ efecto} = \left( 1 - \frac{i_E}{\frac{i_C + i_L}{2}} \right) * 100 \quad (1)$$

Donde:

$i_E$ : Corriente efecto, generada por NMDA (100 $\mu$ M) más la aplicación del neuromodulador, en este caso Gly o ACh.

$i_C$ : Corriente control, generada por NMDA (100 $\mu$ M) previo a  $i_E$

$i_L$ : Corriente lavado, generada por NMDA (100 $\mu$ M) después de  $i_E$

Para elegir la función que mejor describiera los datos de las curvas DR de NMDA, se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC), dónde los datos se compararon con cinco tipos de funciones: una función sigmoidea simétrica (2), una función sigmoidea asimétrica (3), una función de crecimiento exponencial (4) y una función lineal; dada esta comparación se eligió la función con menor AIC. Esta elección fue realizada con el paquete drc (Ritz *et al.*, 2015) para R (R Core Team, 2019).

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + e^{-K(\log(x) - \log(x_c))}} \quad (2)$$

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + e^{-K(x-x_c)}} \quad (3)$$

$$y = A_1 + (A_2 - A_1) \left(1 - e^{-\frac{x}{t}}\right) \quad (4)$$

Donde:

$A_1$ : Límite menor de la curva (Min)

$A_2$ : Límite mayor de la curva (Max)

$K$ : Pendiente

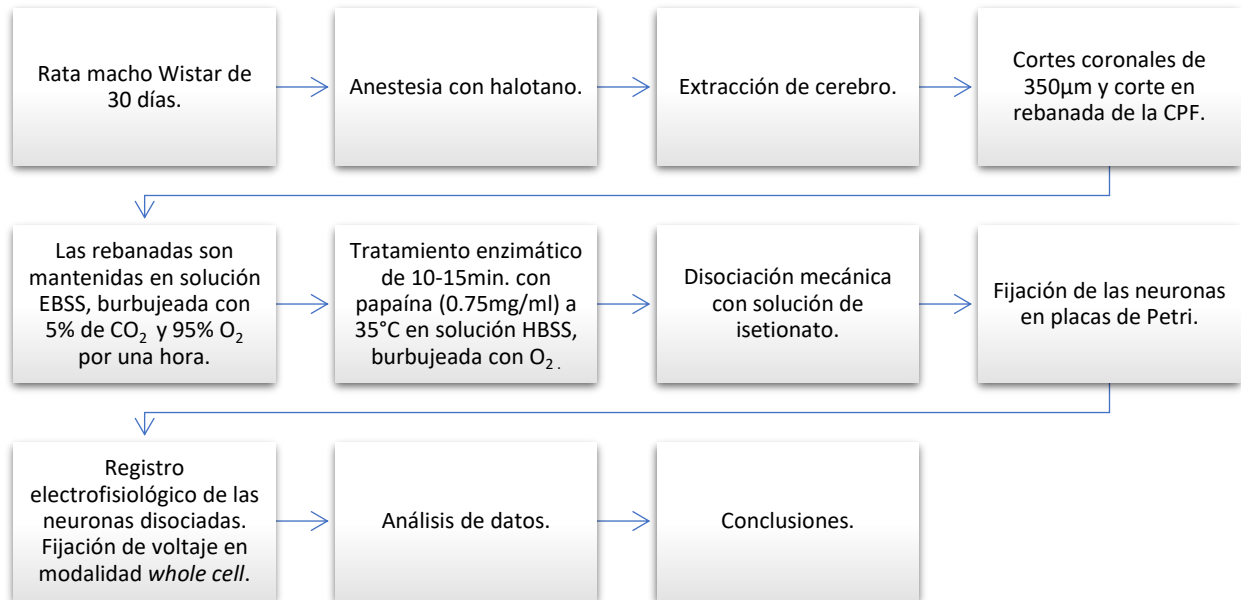
$x_c$ : Concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>)

$t$ : Constante de crecimiento de la curva

Finalmente, para calcular las diferencias significativas entre las medias del control-efecto de ACh y Gly se utilizó la prueba t pareada ( $p < 0.05$ ).

**Figura 24**

*Diagrama de trabajo*



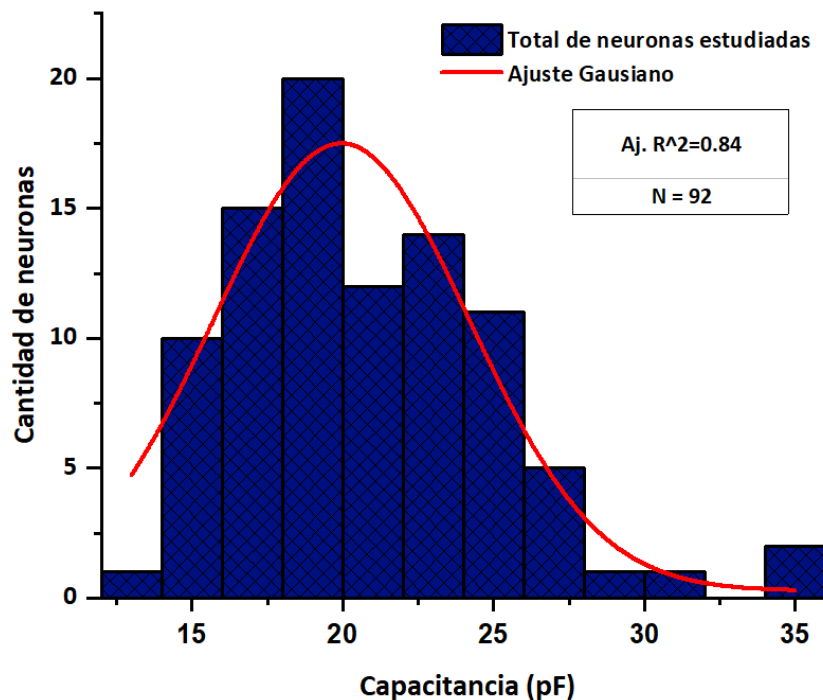
## 7 RESULTADOS

Para realizar este proyecto se registró un total de 92 neuronas piramidales de CPF provenientes de ratas Wistar con una edad de 30 días. En la muestra se incluyeron las neuronas que tuvieron una resistencia de membrana  $>1G\Omega$  y una resistencia de entrada  $<25M\Omega$ . La media ( $\bar{x}$ ) de las resistencias de acceso de las 92 neuronas fue de  $12.58M\Omega$  con una desviación estándar ( $\sigma$ ) de  $4.64 M\Omega$ .

Se registró la capacitancia de la población neuronal (Fig. 25) se tuvo una Min= $14.7pF$  y un Máx= $34.5pF$  obteniendo una  $\bar{x}=20.69pF$  y una  $\sigma=4.18pF$  y se le aplicó un ajuste Gaussiano con una  $R^2=0.84$ , esto último nos indica que las células estudiadas pertenecen a una misma población neuronal.

**Figura 25**

*Histograma de capacitancias*



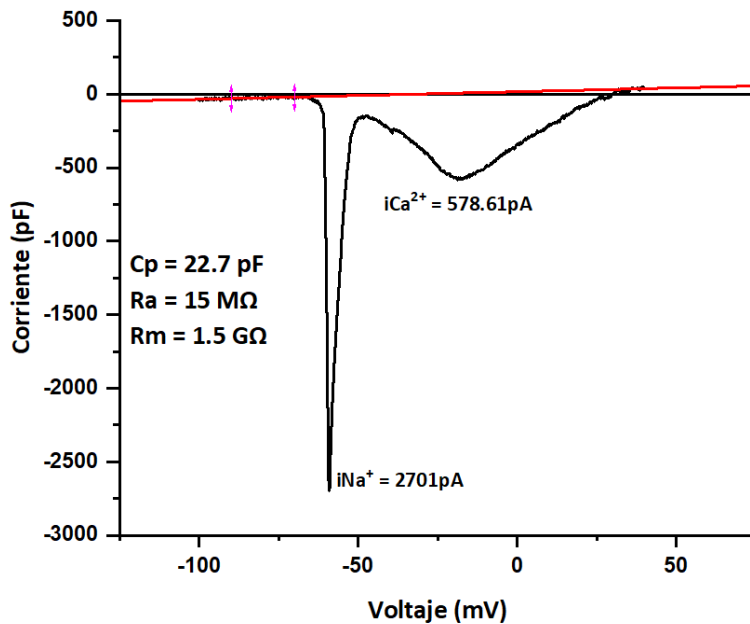
Se analizaron un total de 92 células las cuales contaban con una capacitancia promedio de  $20.69pF$ , una desviación estándar de  $4.18pF$  y los datos se ajustaron a una curva gaussiana con una  $R^2=0.84pF$  lo cual nos indica que las células estudiadas pertenecen a una misma población neuronal.



Antes de cada registro, a cada célula se le realizó el protocolo de rampa (Fig. 26) con el objetivo de evaluar la viabilidad de su membrana y generar las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Cuando en el registro no se presentaron dichas corrientes, la célula se descartó.

**Figura 26**

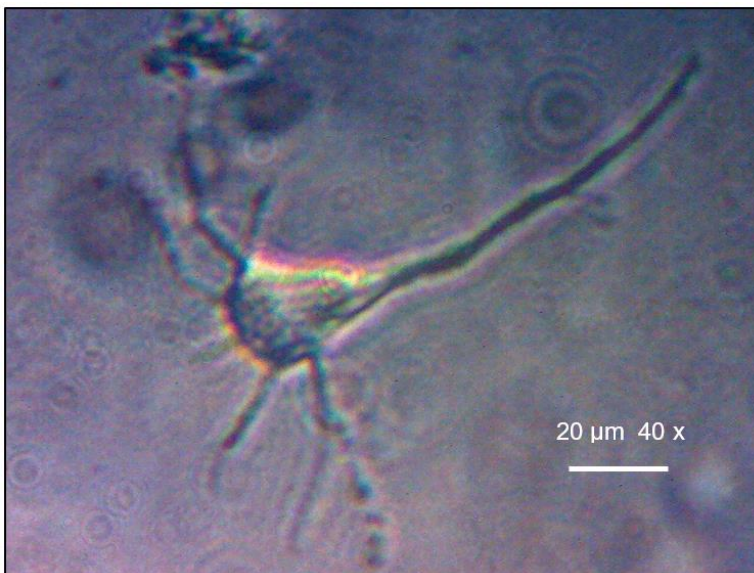
*Trazo representativo de una rampa*



*Trazo representativo del protocolo de rampa de una neurona piramidal. Se observa una corriente de  $\text{Na}^+$  = 2701pA y una de  $\text{Ca}^{2+}$ =578.61pA. Este protocolo se usó para conocer la viabilidad de una neurona, si la neurona a estudiar no presentaba las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se descartaba.*

**Figura 27**

*Micrografía de una neurona piramidal típica de la corteza prefrontal*



*En la imagen se observan las características principales de la neurona piramidal, un soma en forma de pera, dendritas apicales y dendritas basales sin ramificaciones secundarias*

Para cada uno de los objetivos se realizó un estudio detallado de las características biofísicas de la iNMDA (Fig. 28), las cuales se describen a continuación:

Pico: Representa la amplitud máxima que alcanza la iNMDA al abrirse el 100% de los canales de NMDA, se mide en pA.

Estado Estacionario (EE): Representa la amplitud donde el 50% de los canales se ha desensibilizado y permite que la corriente permanezca constante. Se mide como el promedio de los valores encontrados en 250ms de la corriente posterior a la desensibilización o los últimos 250ms de aplicación si la desensibilización no se ha alcanzado.

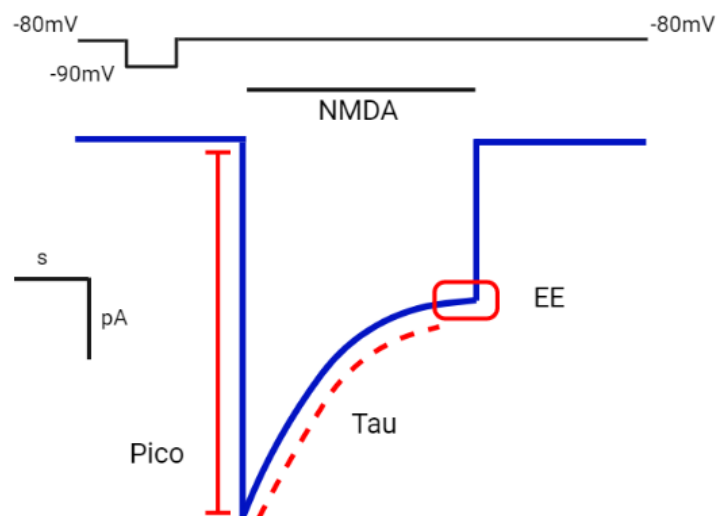
Tau: Es la constante de tiempo de desensibilización, es decir el tiempo que tarda la iNMDA en alcanzar el EE, se describe mediante una ecuación exponencial de decaimiento, su magnitud de medida es ms.

Ratio (EE/Pico): Establece la relación Estado Estacionario-Pico (EE/Pico) dicho valor puede ir de 0 a 1, donde 1 sería una corriente cuadrada y valores cercanos al 0 implica un EE pequeño respecto al Pico.

**Figura 28**

*Diagrama representativo de la corriente activada por NMDA*

*Se describen las características biofísicas estudiadas de la iNMDA: Pico, Estado Estacionario (EE) y Tau. El Pico representa la amplitud máxima que alcanza la corriente al abrirse los canales de NMDA, el EE se mide como el promedio de los valores encontrados en 250ms de la corriente posterior a la desensibilización o los últimos si la desensibilización aún no se ha alcanzado, Tau es la constante de tiempo de desensibilización, se calcula a partir de una ecuación exponencial de decaimiento. Otro parámetro que también resulta del estudio de la iNMDA es el ratio, dicho parámetro establece la relación Estado Estacionario-Pico (EE/Pico).*

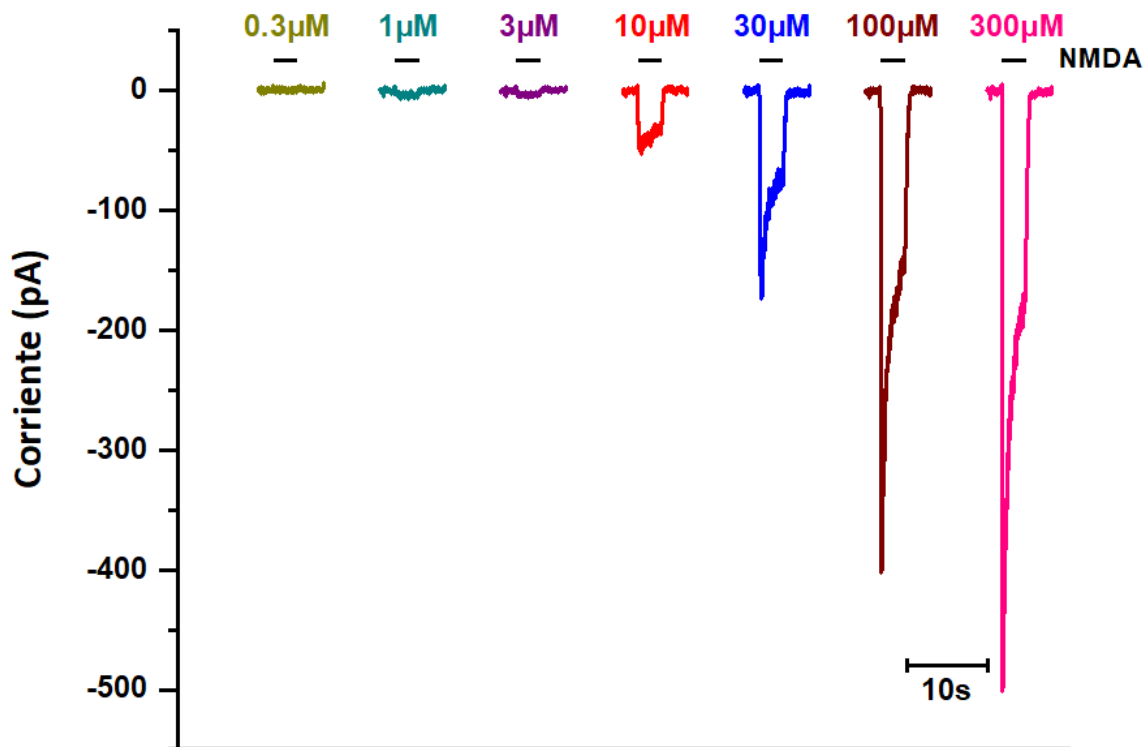


## 7.1 EFECTO DE LA CORRIENTE ACTIVADA POR NMDA

Se registraron 8 neuronas para realizar la curva DR de la iNMDA (0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300  $\mu\text{M}$ ) sin el co-agonista Gly. A continuación, se muestran los trazos representativos (Fig.29):

**Figura 29**

*Trazos representativos de la curva dosis respuesta de la corriente activada por NMDA sin glicina*



*En la gráfica se muestran los trazos promedio para cada concentración de NMDA (0.3, 1, 3, 10, 30 y 100  $\mu\text{M}$ ) sin Gly obtenidos de una neurona piramidal disociada de la CPF.*

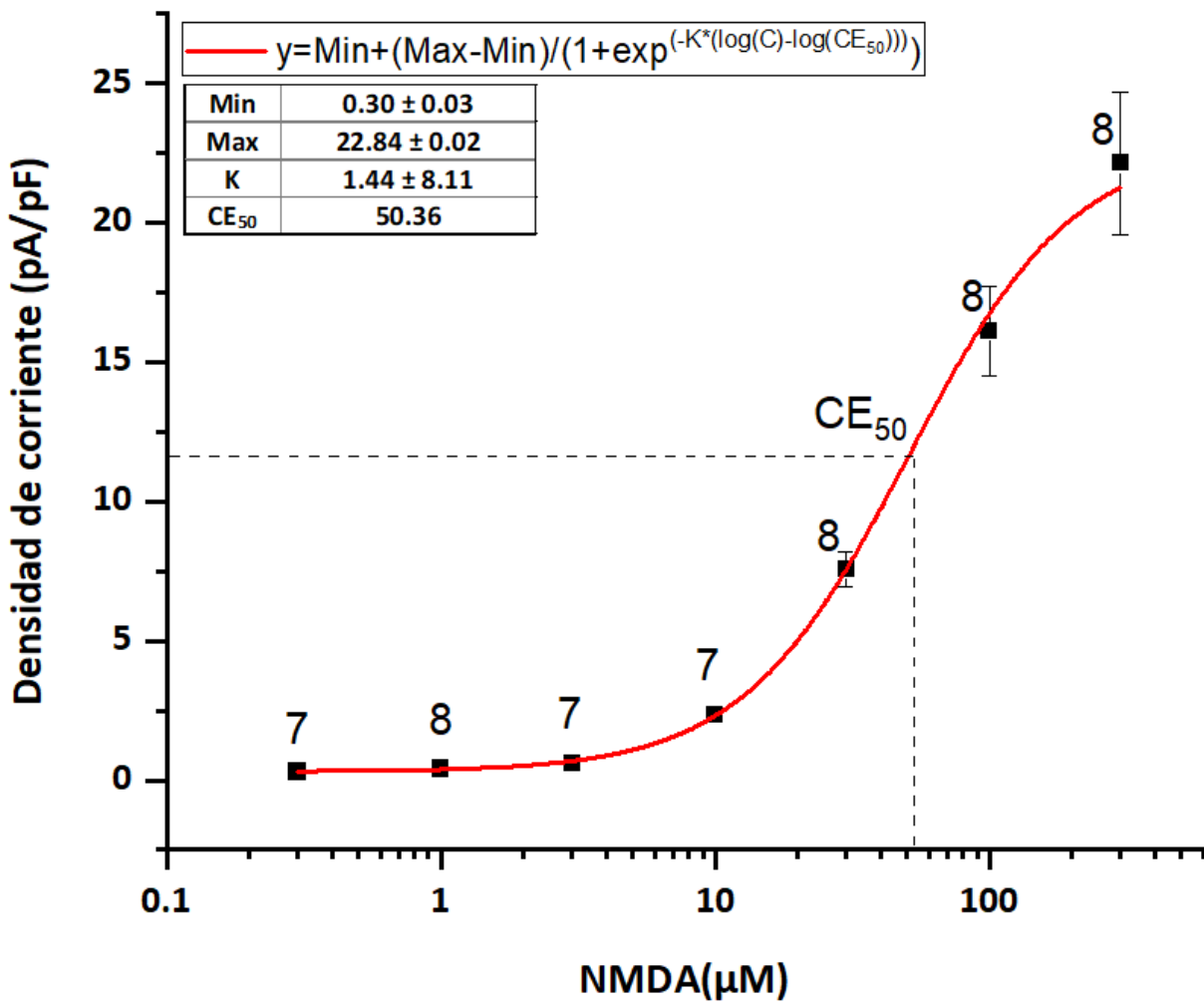
Para cada concentración se obtuvo el promedio de los parámetros, Pico, EE y Tau. A los tres conjuntos de datos obtenidos, se les analizó con las pruebas Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0.05$ ) para determinar el comportamiento de una distribución normal. Además, se calculó el

valor de la densidad de corriente tanto para el Pico y el EE, esta densidad de corriente resulta de dividir la corriente sobre la capacitancia celular (pA/pF).

Los valores resultantes de la densidad de corriente en el pico se describieron mediante una curva sigmoïdal característica (Fig. 30), los datos se ajustaron a un modelo Logístico con una  $R^2=0.99$  y se obtuvieron los siguientes parámetros Min=  $0.30 \pm 0.03$ , Max= $22.84 \pm 2.20$ ,  $CE_{50}=50.36$ , Pendiente (K)= $1.44 \pm 0.10$ .

**Figura 30**

*Curva dosis respuesta correspondiente a la amplitud del pico de la corriente activada por NMDA*

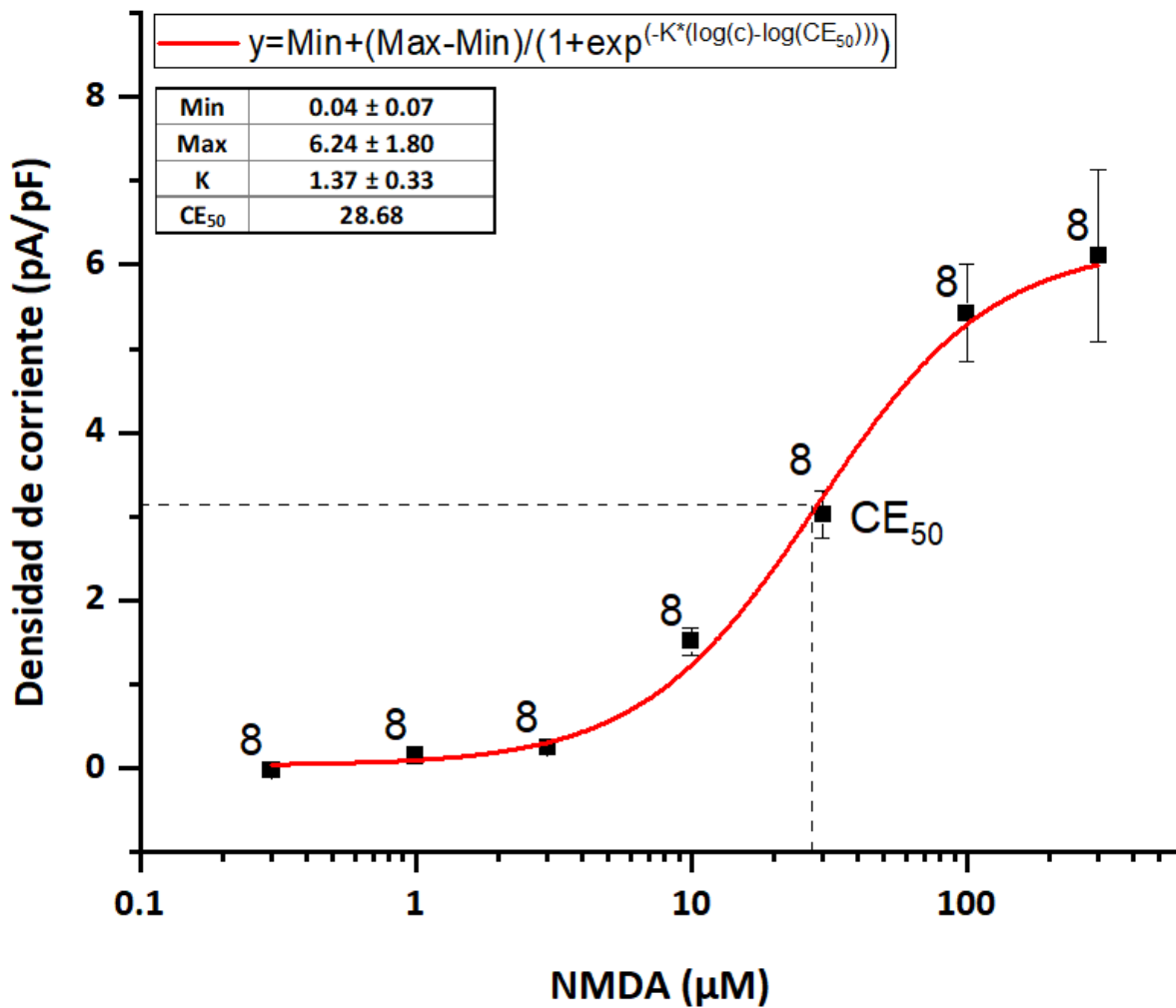


*Gráfica de la curva DR de la iNMDA para cada concentración (0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 µM). La curva se ajustó a un modelo Logístico con una  $R^2=0.99$ , Min=  $0.30 \pm 0.03$ , Max= $22.84 \pm 2.20$ ,  $CE_{50}=50.36 \pm 8.11$ , Pendiente (K)= $1.44 \pm 0.10$ . El número junto a cada punto representa la n para cada concentración.*

En cuanto a la densidad de corriente del EE, se ajustaron también a una curva sigmoideal (Fig. 31), del cual se obtuvieron los siguientes parámetros:  $Min=0.04\pm 0.07$ ,  $Max=6.24\pm 1.80$ ,  $CE_{50}=28.68\pm 15.15$  y una  $K=1.37\pm 0.33$ , los datos se ajustaron a un modelo Logístico con una  $R^2=0.96$ .

**Figura 31**

*Curva dosis respuesta correspondiente a la amplitud del estado estacionario de la corriente activada por NMDA*

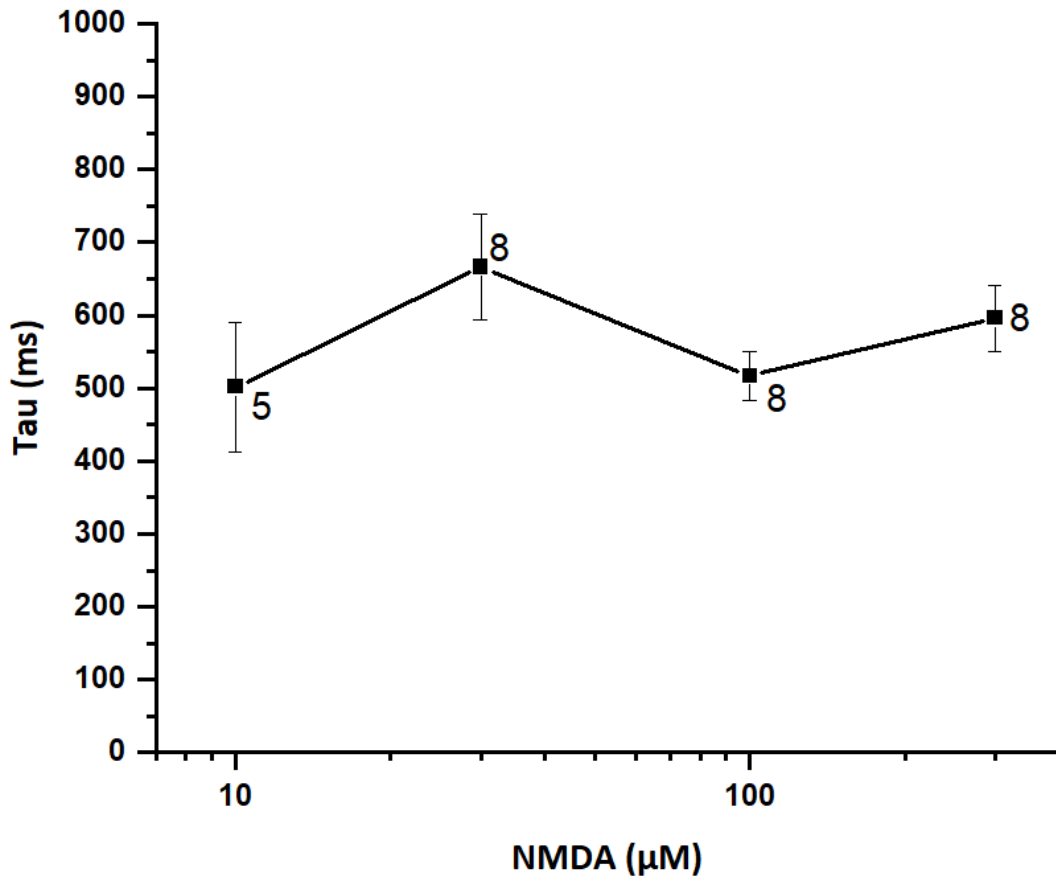


*Gráfica de la curva DR normalizada de la iNMDA para cada concentración (0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 µM). La curva se ajustó a un modelo LogLogístico con una  $R^2=0.96$ ,  $Min= 0.04 \pm 0.07$ ,  $Max=6.24 \pm 1.80$ ,  $CE_{50}=28.68$ , Pendiente ( $K$ )= $1.37 \pm 0.33$ . El número junto a cada punto representa la n para cada concentración.*

Así mismo en el análisis de la Tau para cada concentración de NMDA, se obtuvo la media (Fig. 32). Las concentraciones 0.3, 1 y 3  $\mu\text{M}$  se omitieron debido a que la corriente en estas concentraciones es muy pequeña, por lo cual el valor de la Tau se vuelve insignificante. Esta dosis respuesta no se ajustó a un modelo.

**Figura 32**

*Constante de desensibilización (Tau) de la corriente activada por NMDA*



*La gráfica muestra el tamaño de la constante de desensibilización (Tau) para cada concentración de NMDA 10, 30, 100 y 300  $\mu\text{M}$ . Las concentraciones más pequeñas 0.3, 1 y 3  $\mu\text{M}$  se omitieron dado que las corrientes son muy pequeñas y la Tau insignificante. La dosis respuesta no se ajustó a un modelo. El número junto a cada punto representa la n para cada concentración.*

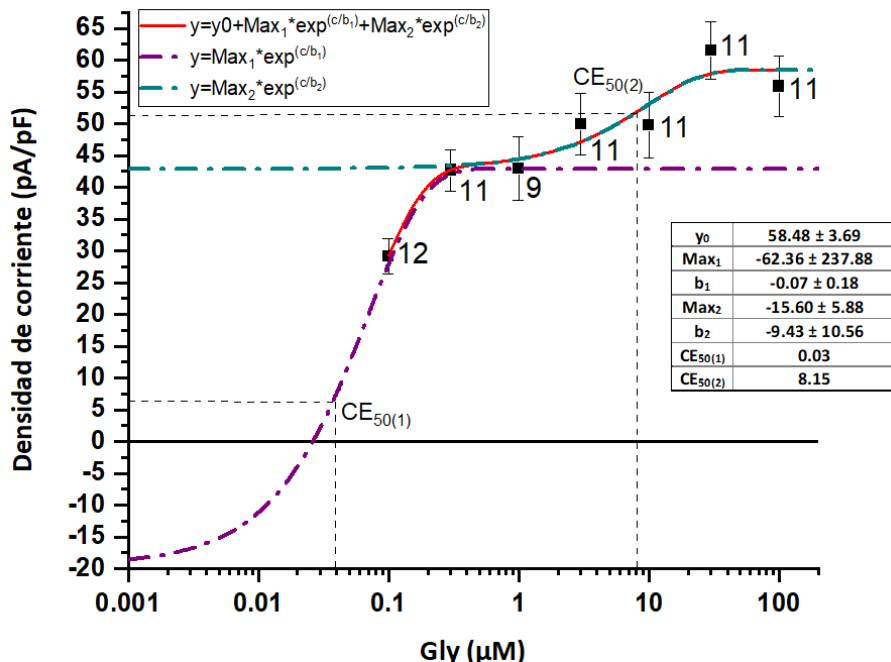
## 7.2 EFECTO DE GLICINA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA POR NMDA

Para cumplir el segundo objetivo se realizó una curva dosis respuesta del efecto de Gly sobre la iNMDA, para ello se eligió la concentración de 100 $\mu$ M de NMDA a la cual se le agregaron cada una de las concentraciones de Gly (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100  $\mu$ M). Se registraron 27 neuronas y se obtuvieron los valores promedio del Pico, EE, Tau y Ratio para cada concentración de Gly.

Los valores de la densidad de corriente en el pico se ajustaron a una función exponencial (Fig. 33), donde se obtuvieron los siguientes parámetros:  $y_0 = 58.48 \pm 3.69$ ,  $Max_1 = -62.36 \pm 237.88$ ,  $b_1 = -0.07 \pm 0.18$ ,  $CE_{50(1)} = 0.03$ ,  $Max_2 = -15.60 \pm 5.88$ ,  $b_2 = -9.93 \pm 10.56$ ,  $CE_{50(2)} = 8.15$ , los datos se justaron a un modelo de doble crecimiento exponencial con una  $R^2 = 0.92$ .

**Figura 33**

*Curva dosis respuesta del efecto de glicina sobre el pico de la corriente activada por NMDA (100 $\mu$ M)*

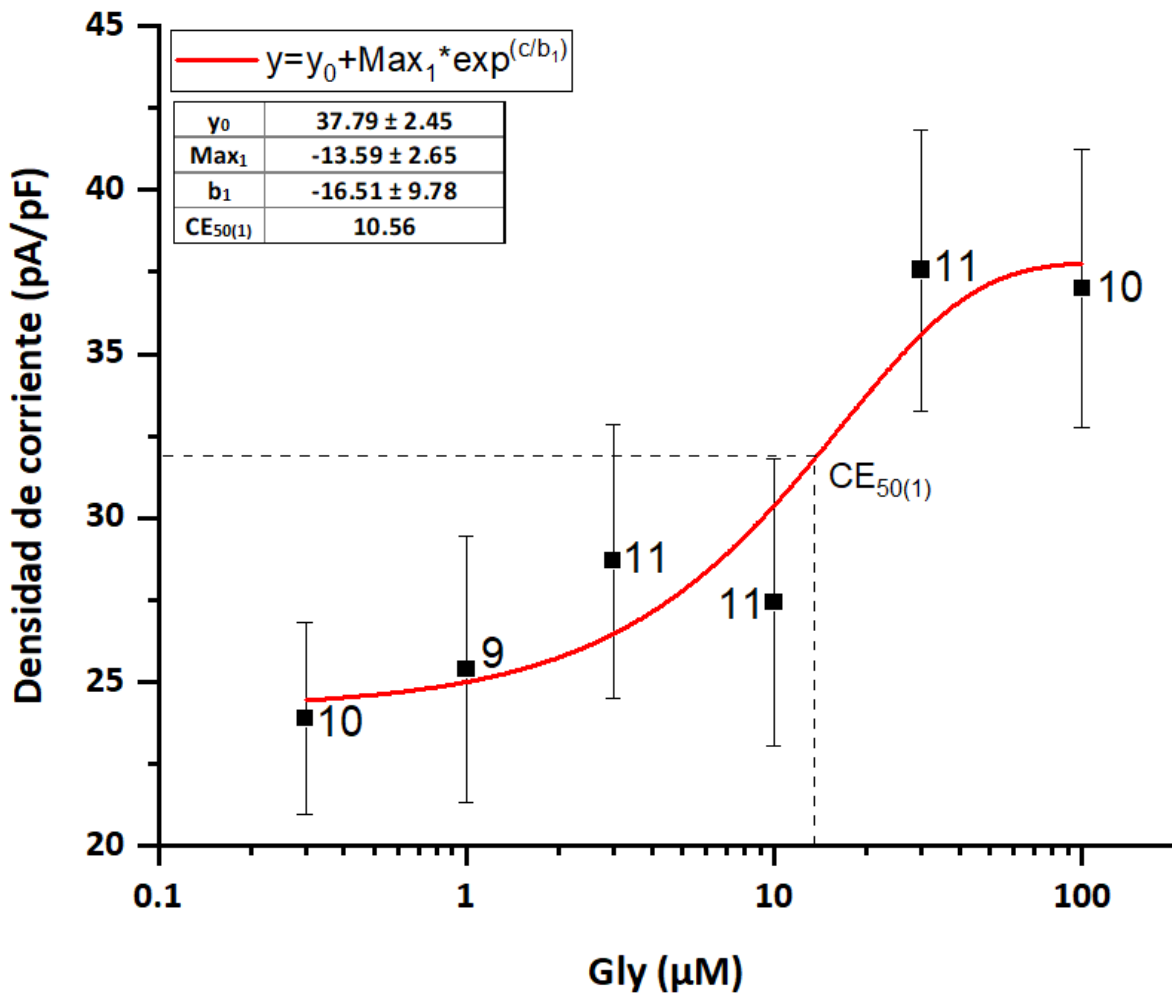


En la gráfica se muestra el ajuste de doble crecimiento exponencial (línea color roja) y un peeling de dicho ajuste del cual resulta: la primera exponencial (línea punteada color púrpura) con  $Max_1 = -62.36 \pm 237.88$ ,  $b_1 = -0.07 \pm 0.18$  y  $CE_{50(1)} = 0.03$  y la segunda exponencial (línea punteada color cian)  $Max_2 = -15.60 \pm 5.88$ ,  $b_2 = -9.43 \pm 10.56$ ,  $CE_{50(2)} = 8.15$ . Los datos se justaron al modelo con una  $R^2 = 0.92$ . El número junto a cada punto representa la n para cada concentración.

En cuanto a la densidad de corriente en el EE, los datos se ajustaron a una función exponencial (Fig. 34) del cual se obtuvo lo siguiente:  $y_0 = 37.79 \pm 2.45$ ,  $Max_1 = -13.59 \pm 2.65$ ,  $b_1 = -16.51 \pm 9.78$ ,  $CE_{50(1)} = 10.56$ , los parámetros obtenidos se ajustaron a un crecimiento exponencial con una  $R^2 = 0.97$

**Figura 34**

*Curva dosis respuesta del efecto de glicina sobre el estado estacionario de la corriente activada por NMDA (100 $\mu$ M)*



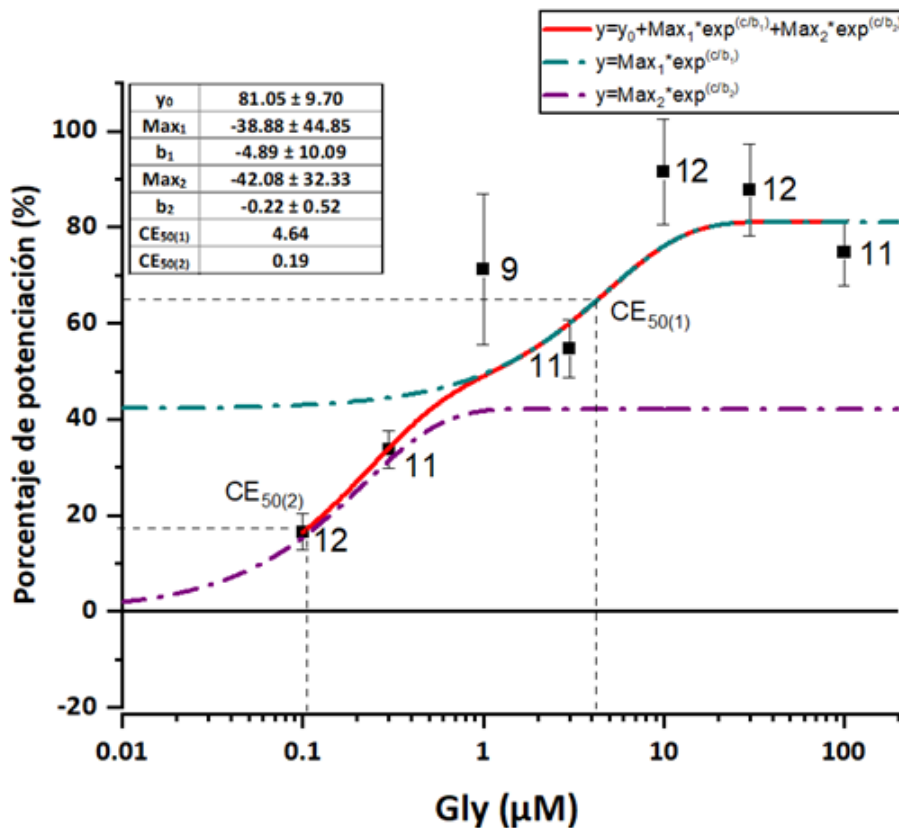
Los datos de la curva DR se ajustaron a un modelo de crecimiento exponencial (línea color rojo), del cual se obtuvo  $y_0 = 37.79 \pm 2.45$ ,  $Max_1 = -13.59 \pm 2.65$ ,  $b_1 = -16.51 \pm 9.78$ ,  $CE_{50(1)} = 10.56$ , los parámetros obtenidos se ajustaron al modelo con una  $R^2 = 0.97$ . El número junto a cada punto representa la n para cada concentración.



Para poder evaluar el efecto porcentual de Gly sobre la iNMDA; se comparó Pico, EE y Tau respecto a la media del control y lavado (NMDA 100 $\mu$ M). A continuación, se muestra la curva obtenida del efecto porcentual de Gly en el Pico, dicha curva (Fig. 35) se ajustó a un modelo de doble crecimiento exponencial con una  $R^2=0.95$  con los siguientes parámetros:  $y_0= 81.05 \pm 9.70$ ,  $Max_1= -38.88 \pm 44.85$ ,  $b_1= -4.89 \pm 10.09$ ,  $CE_{50(1)}= 4.64$ ,  $Max_2= -42.08 \pm 32.33$ ,  $b_2= -0.22 \pm 0.52$ ,  $CE_{50(2)}= 0.19$ .

**Figura 35**

*Curva dosis respuesta del porcentaje de efecto de glicina sobre el pico de la corriente activada por NMDA (100 $\mu$ M)*

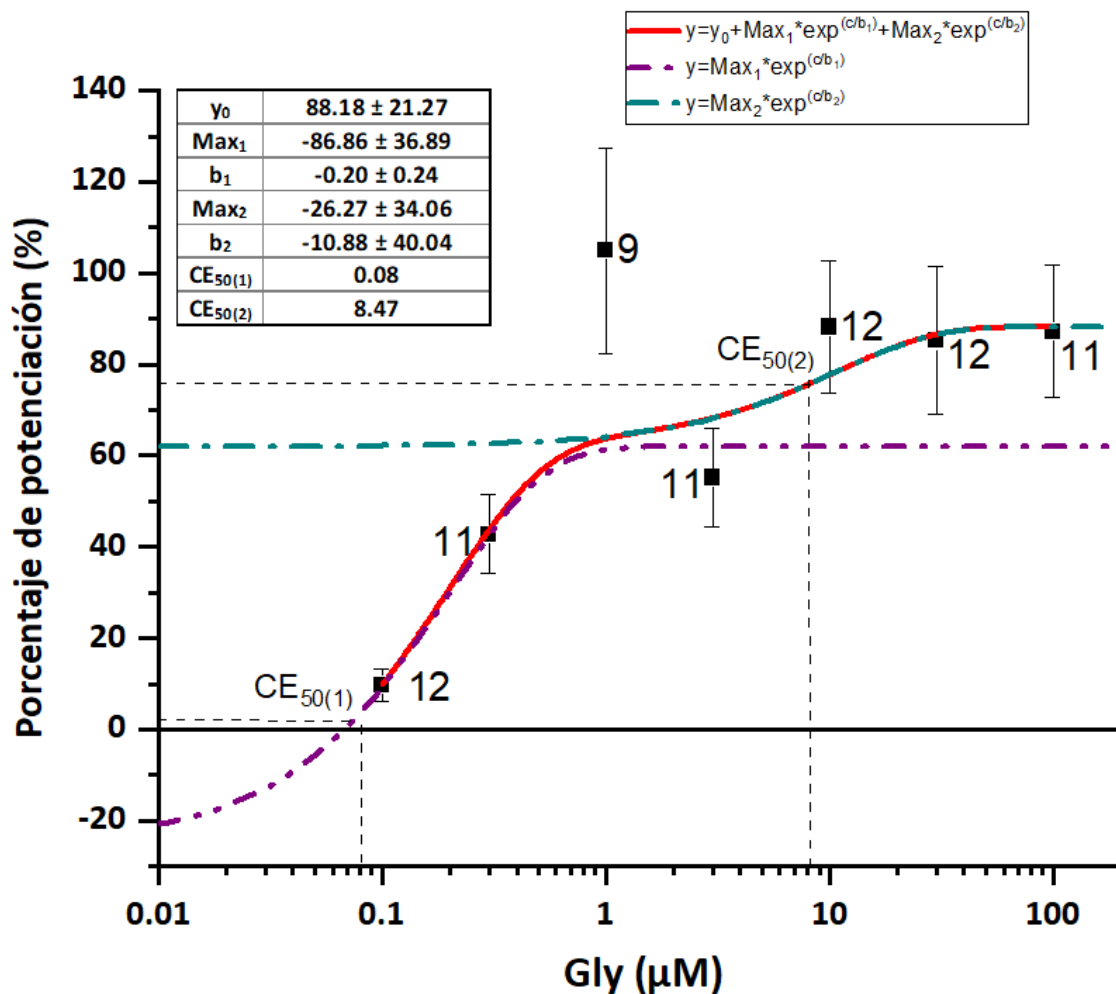


*En la gráfica se muestra el ajuste de doble crecimiento exponencial (línea color roja) y un peeling de dicho ajuste del cual resulta: la primera exponencial (línea punteada color cian) con  $Max_1= -38.88 \pm 44.85$ ,  $b_1= -4.89 \pm 10.09$  y  $CE_{50(1)}= 4.64$  y la segunda exponencial (línea punteada color púrpura)  $Max_2= -42.08 \pm 32.33$ ,  $b_2= -0.22 \pm 0.52$ ,  $CE_{50(2)}=0.19$ . Los datos se ajustaron al modelo con una  $R^2= 0.97$ . El número junto a cada punto representa la n para cada concentración.*

De igual manera, el efecto porcentual de Gly sobre el EE de la iNMDA se ajustó con una  $R^2=0.94$  a un modelo de doble crecimiento exponencial (Fig. 36) y se obtuvieron los siguientes datos:  $Y_0=88.18 \pm 21.27$ ,  $Max_1=-86.86 \pm 36.89$ ,  $b_1=-0.20 \pm 0.24$ ,  $CE_{50(1)}=0.08$ ,  $Max_2=-26.27 \pm 34.06$ ,  $b_2=-10.88 \pm 40.04$ ,  $CE_{50(2)}=8.47$ .

**Figura 36**

*Curva dosis respuesta del porcentaje de efecto de glicina sobre el estado estacionario de la corriente activada por NMDA (100 $\mu$ M)*



En la gráfica se muestra el ajuste de doble crecimiento exponencial (línea color roja) y un peeling de dicho ajuste del cual resulta: la primera exponencial (línea punteada color púrpura) con los parámetros  $Y_0=88.18 \pm 21.27$ ,  $Max_1=-86.86 \pm 36.89$ ,  $b_1=-0.20 \pm 0.24$  y  $CE_{50(1)}=0.08$ ; y la segunda exponencial (línea punteada color cian) con los parámetros  $Max_2=-26.27 \pm 34.06$ ,  $b_2=-10.88 \pm 40.04$ ,  $CE_{50(2)}=8.47$ . El número junto a cada punto representa la n para cada concentración.

La siguiente tabla (Tabla 1) resume los datos obtenidos del efecto de potenciación que tuvo Gly sobre la iNMDA, además se muestra el trazo representativo (Fig. 37) que más se acercó a la media de la potenciación más alta, la cual se obtuvo con 10 $\mu$ M de Gly.

**Tabla 1**

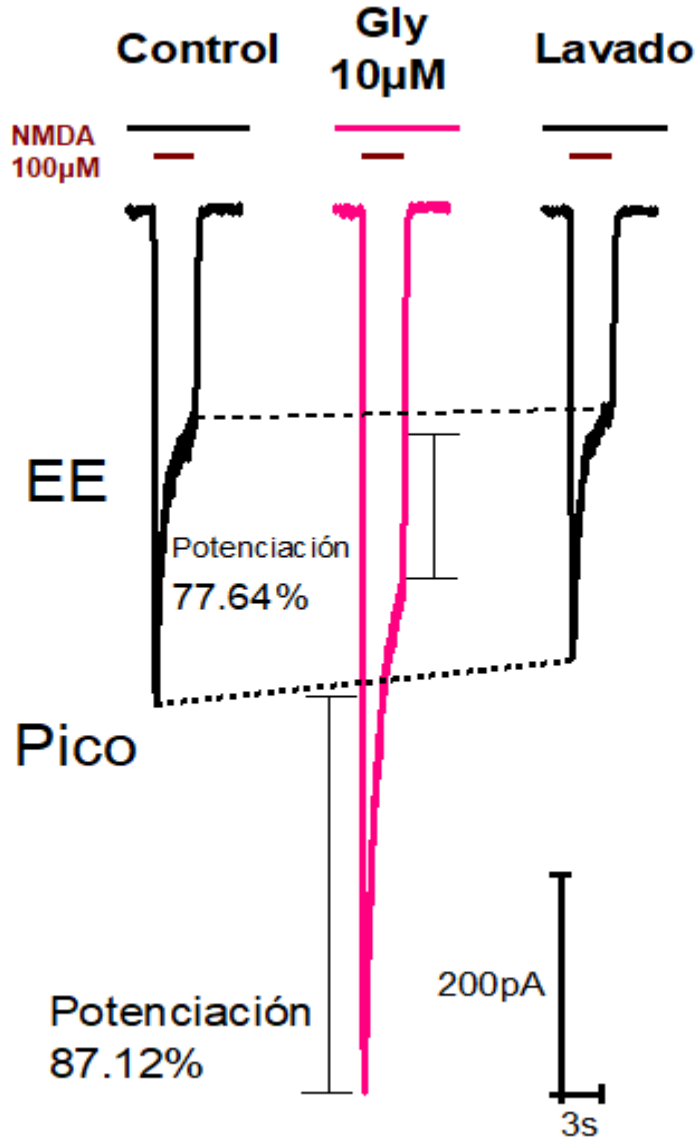
*Efecto porcentual de glicina sobre la corriente activada por NMDA, tanto en el pico como en el estado estacionario*

| <b>Concentración<br/>NMDA 100<math>\mu</math>M<br/>+ Gly (<math>\mu</math>M)</b> | <b>n</b> | <b>Efecto en<br/>el Pico<br/>(%)</b> | <b>ESM</b> | <b>Efecto en<br/>el EE<br/>(%)</b> | <b>ESM</b> |
|--|----------|--------------------------------------|------------|------------------------------------|------------|
| 0.1  | 12       | <u>16.57</u>                         | 3.78       | <u>9.83</u>                        | 3.63       |
| 0.3  | 11       | 33.80                                | 3.82       | 42.81                              | 8.62       |
| 1  | 9        | 71.20                                | 15.68      | <u>104.97</u>                      | 22.50      |
| 3  | 11       | 54.70                                | 5.97       | 55.17                              | 10.70      |
| 10   | 12       | <u>91.46</u>                         | 10.95      | 88.23                              | 14.58      |
| 30   | 12       | 87.77                                | 9.45       | 85.20                              | 16.17      |
| 100  | 11       | 74.75                                | 6.80       | 87.23                              | 14.50      |

*Se observa que el efecto más alto ( $91.46 \pm 10.95$ ) en el pico de la iNMDA (100 $\mu$ M) fue con 10 $\mu$ M de Gly y el más bajo ( $16.57 \pm 3.78$ ) con 0.1 $\mu$ M de Gly. En cuanto al estado estacionario el efecto más alto ( $104.97 \pm 22.50$ ) fue con 1 $\mu$ M de Gly y el menor ( $9.83 \pm 3.63$ ) con 0.1 $\mu$ M de Gly.*

Figura 37

Trazo representativo del efecto de potenciación de glicina sobre la corriente activada por NMDA de una neurona piramidal disociada de la corteza prefrontal.

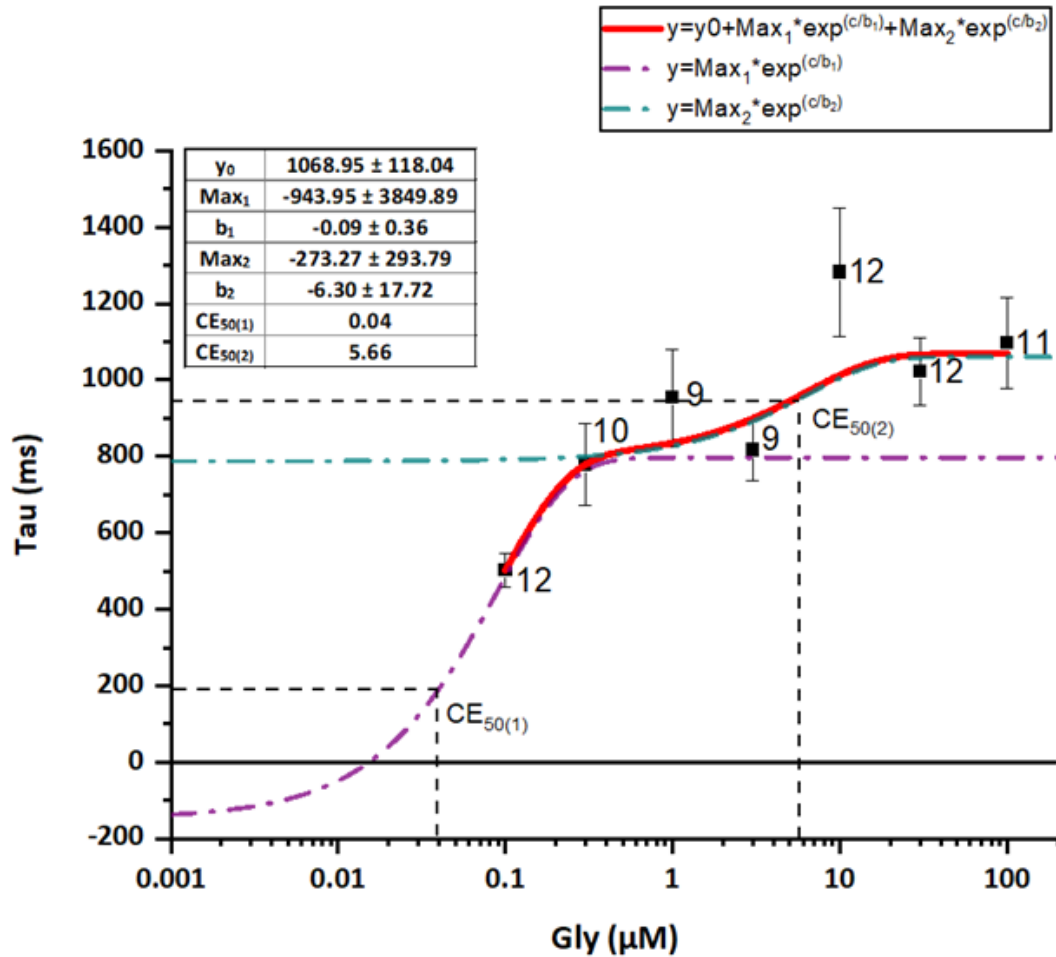


Se muestra el efecto de potenciación (87.12%) de Gly (trazo color rosa), respecto a los trazos de control y lavado (100µM NMDA en color negro).

Los datos analizados de la Tau se justaron también a un modelo de crecimiento exponencial doble (Fig. 38) con una  $R^2=0.92$  y los parámetros obtenidos fueron:  $Y_0= 1068.95 \pm 118.04$ ,  $Max_1= -943.95 \pm 3849.89$ ,  $b_1= -0.09 \pm 0.36$ ,  $CE_{50(1)}= 0.04$ ,  $Max_2= -273.27 \pm 293.79$ ,  $b_2= -6.30 \pm 17.72$ ,  $CE_{50(2)}= 5.66$ .

**Figura 38**

*Curva dosis respuesta de la constante de desensibilización del efecto de glicina sobre la corriente activada por NMDA (100 $\mu$ M)*

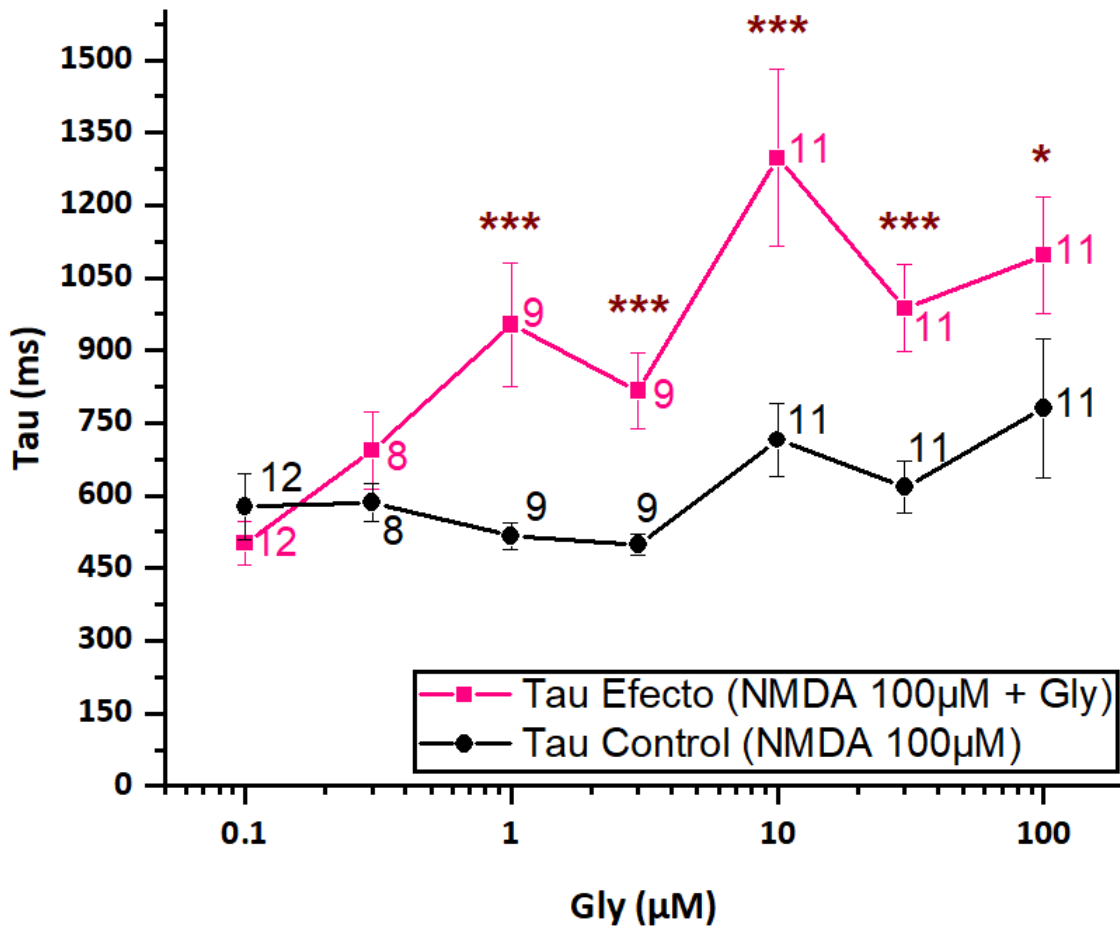


En la gráfica se muestra el ajuste de doble crecimiento exponencial (línea color roja) y un peeling de dicho ajuste del cual resulta: la primera exponencial (línea punteada color púrpura) con los parámetros:  $Max_1= -943.95 \pm 3849.89$ ,  $b_1= -0.09 \pm 0.36$ , y  $CE_{50(1)}= 0.04$ ; y la segunda exponencial (línea punteada color cian) con los siguientes parámetros:  $Max_2= -273.27 \pm 293.79$ ,  $b_2= -6.30 \pm 17.72$ ,  $CE_{50(2)}= 5.66$ . Los datos se ajustaron al modelo con una  $R^2= 0.92$ . El número junto a cada punto representa la n para cada concentración.

La Tau de la curva DR de Gly, fue comparada con la Tau resultante de la media entre el control y el lavado mediante una T-pareada ( $p < 0.05$ ). De dicho análisis se obtuvieron diferencias significativas en  $1\mu\text{M}$ ,  $3\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$  y  $100\mu\text{M}$  (Fig. 39).

**Figura 39**

*Comparación de la constante de desensibilización del efecto de glicina y del control NMDA ( $100\mu\text{M}$ )*

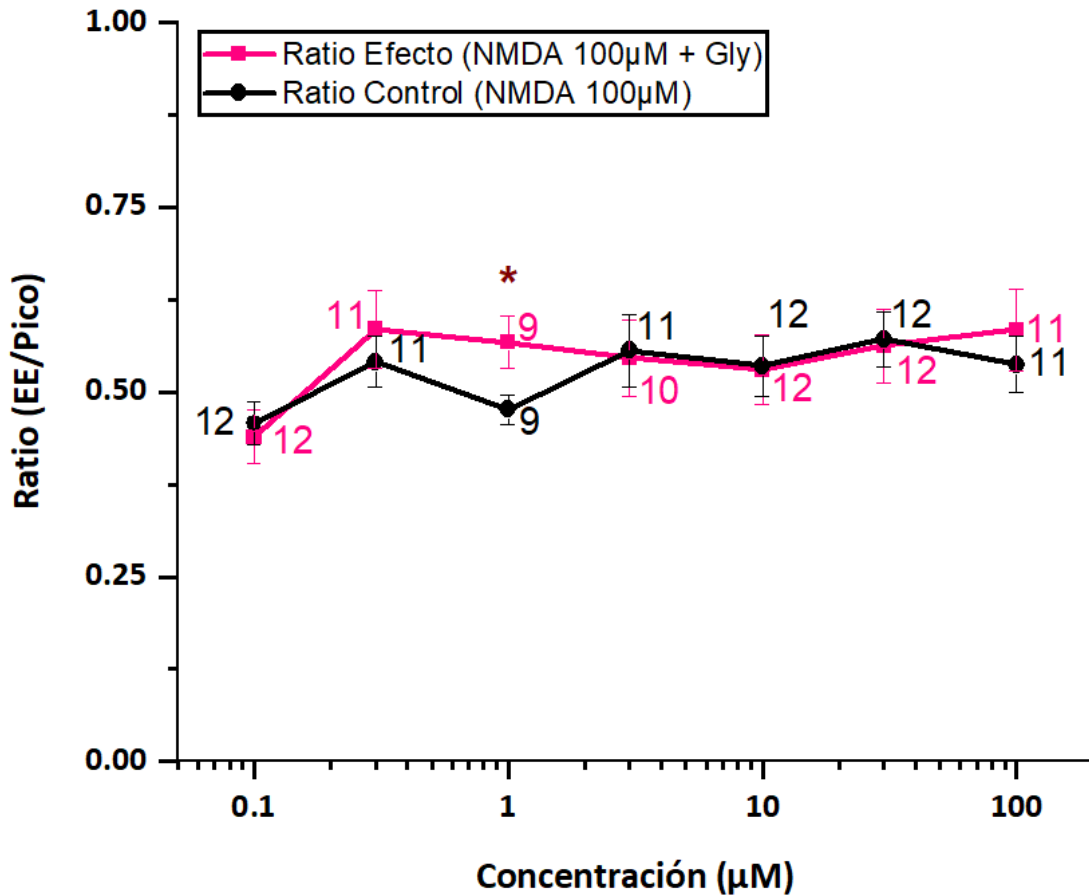


*Se puede observar un incremento en la Tau de efecto a medida que la concentración de Gly aumenta. Así mismo se observan diferencias significativas respecto a la Tau control. ( $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.005 = ***$ ).*

De manera subsecuente, se analizó la proporción el Pico/EE (ratio) tanto del efecto de Gly y la media del control y lavado, tal como se muestra en la siguiente gráfica (Fig. 40). Se evaluó la significancia entre el ratio del efecto de Gly y el ratio del control mediante una t-pareada ( $p < 0.05$ ), de la cual solo se obtuvo una diferencia significativa para  $1\mu\text{M}$ .

**Figura 40**

*Comparación del ratio del efecto de glicina y el ratio control NMDA ( $100\mu\text{M}$ )*



*Gráfica de comparación entre el ratio del efecto de Gly y el ratio del control. Sólo se obtuvo una diferencia significativa (\*) en la concentración  $1\mu\text{M}$  de Gly, ( $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.005 = ***$ ).*

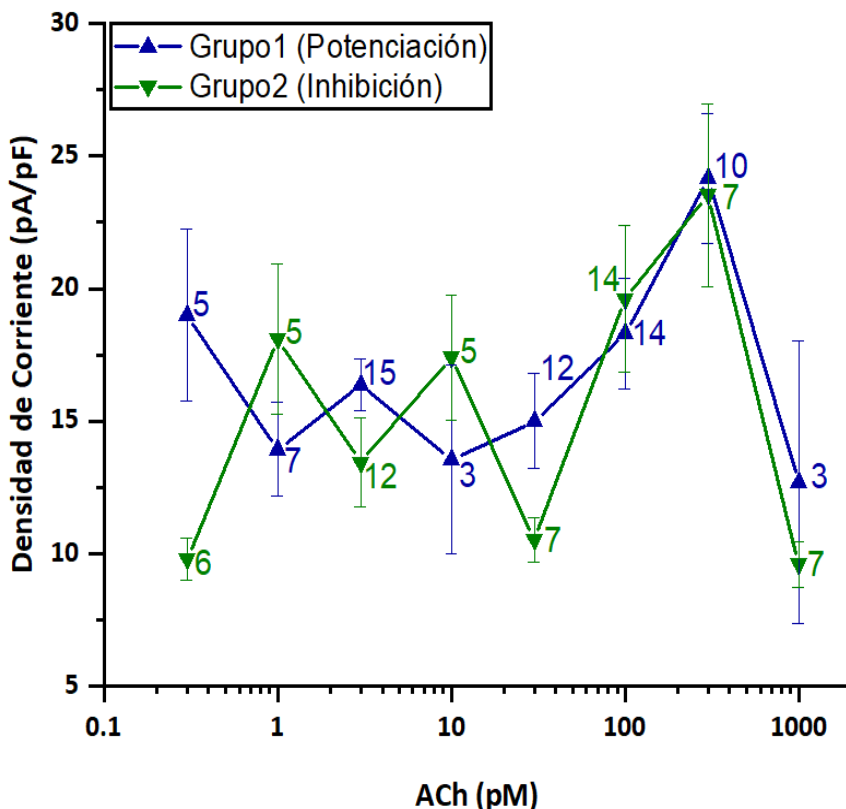
## 7.3 EFECTO DE LA ACETILCOLINA SOBRE CORRIENTE ACTIVADA POR NMDA

Para este objetivo se realizó una curva dosis respuesta del efecto de ACh sobre la iNMDA, e igualmente se eligió la concentración de 100 $\mu$ M de NMDA a la cual se le agregaron cada una de las concentraciones de ACh (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000pM). Se registraron 52 neuronas y de la misma manera se obtuvieron los valores promedio del Pico, EE, Tau y Ratio para cada concentración de ACh.

Debido a que se observó un efecto al azar de potenciación e inhibición por ACh en el Pico de la iNMDA, se decidió analizar dichos datos mediante una prueba K-Means, este método agrupó cada observación al grupo cuyo valor medio fuera más cercano. Es así como se clasificaron los datos en dos grupos, un grupo con efecto de potenciación (grupo 1) y otro con un efecto de inhibición (grupo 2). En la siguiente gráfica (Fig. 41) se muestra el efecto de ACh sobre el Pico de la iNMDA.

**Figura 41**

*Curva dosis respuesta del efecto de acetilcolina sobre el pico de la corriente activada por NMDA (100 $\mu$ M)*



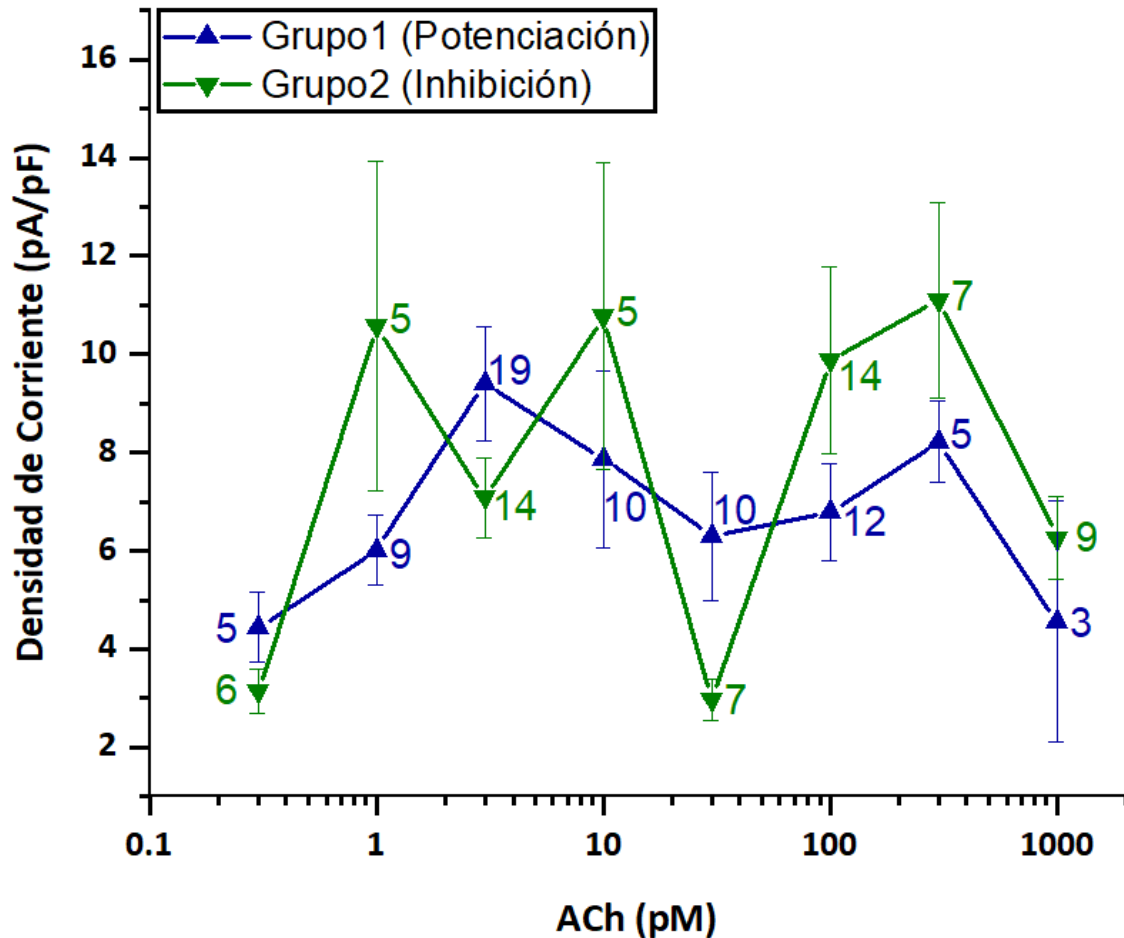
*Se muestra el efecto de potenciación e inhibición en color azul y verde respectivamente. El número a un costado de cada punto representa la n de estudio para cada concentración.*



En la siguiente gráfica (Fig. 42) se muestra el efecto de ACh sobre el EE de la iNMDA.

**Figura 42**

*Dosis respuesta del efecto de acetilcolina sobre el estado estacionario de la corriente activada de NMDA (100 $\mu$ M)*

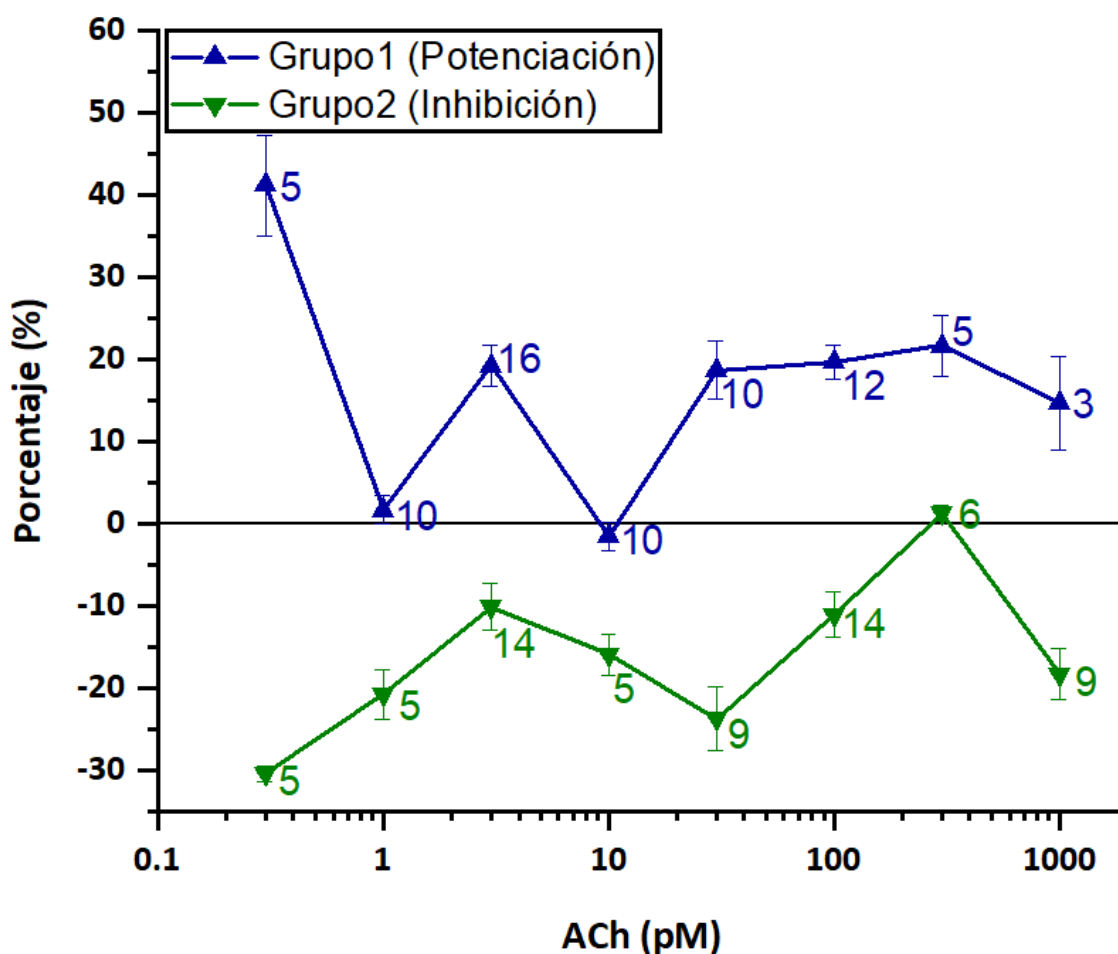


*Se muestra el efecto de potenciación e inhibición en color azul y verde respectivamente. El número a un costado de cada punto representa la n de estudio para cada concentración.*

Como se mencionó anteriormente se obtuvo un doble efecto de la ACh. En la siguiente gráfica (Fig. 43) se muestra el efecto porcentual tanto para la potenciación como para la inhibición en el Pico de la iNMDA. Se observó que para cada caso la concentración de 0.3pM de ACh presentó un mayor efecto en comparación con las demás.

Figura 43

Porcentaje de efecto de acetilcolina sobre el pico de la corriente activada por NMDA (100 $\mu$ M)



Gráfica del efecto porcentual de ACh sobre el pico de la iNMDA. Se muestra el efecto de potenciación e inhibición en color azul y verde respectivamente. El número a un costado de cada punto representa la n de estudio para cada concentración.

La siguiente tabla (2) resume los datos obtenidos del efecto de potenciación que tuvo ACh sobre la iNMDA, además se muestran los trazos representativos que más se acercan a la media de la potenciación (Fig. 44) y de la inhibición (Fig. 45) más grandes, las cuales se obtuvieron con 0.3pM de ACh.

**Tabla 2**

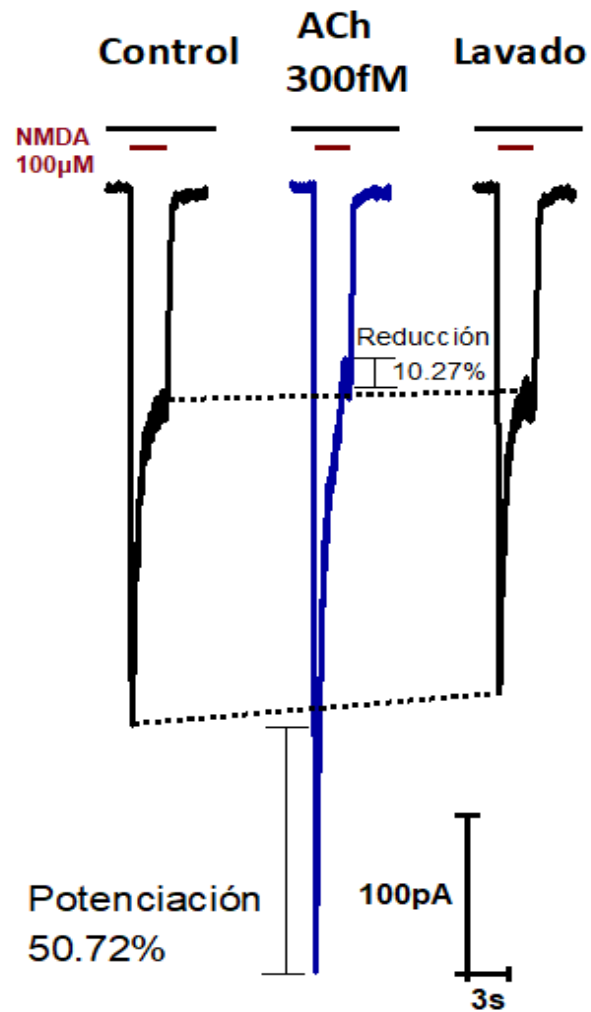
*Resumen del efecto porcentual de inhibición y potenciación de acetilcolina sobre el pico de la corriente activada por NMDA*

| <b>NMDA 100<math>\mu</math>M +<br/>Concentración<br/>ACh (<math>\mu</math>M)</b> | <b>n</b> | <b>Efecto en el<br/>Pico (%)<br/>Potenciación</b> | <b>ESM</b> | <b>n</b> | <b>Efecto en el<br/>Pico (%)<br/>Inhibición</b> | <b>ESM</b> |
|--|----------|---|------------|----------|---|------------|
| 0.3  | 5        | 41.23   | 6.11       | 5        | -30.35  | 0.97       |
| 1  | 10       | 1.75  | 1.69       | 5        | -20.70  | 3.00       |
| 3  | 16       | 19.31   | 2.50       | 14       | -10.07  | 2.80       |
| 10   | 10       | -1.47   | 1.67       | 5        | -15.87  | 2.48       |
| 30   | 10       | 18.74   | 3.50       | 9        | -23.65  | 3.91       |
| 100  | 12       | 19.68   | 2.04       | 14       | -10.96  | 2.70       |
| 300  | 5        | 21.68   | 3.70       | 6        | 1.30  | 0.99       |
| 1000   | 3        | 14.70   | 5.73       | 9        | -18.28  | 3.09       |

*Se observa que el efecto mayor tanto en potenciación ( $41.23 \pm 6.11$ ) como en inhibición ( $30.35 \pm 0.97$ ) fue en  $0.3\mu$ M.*

**Figura 44**

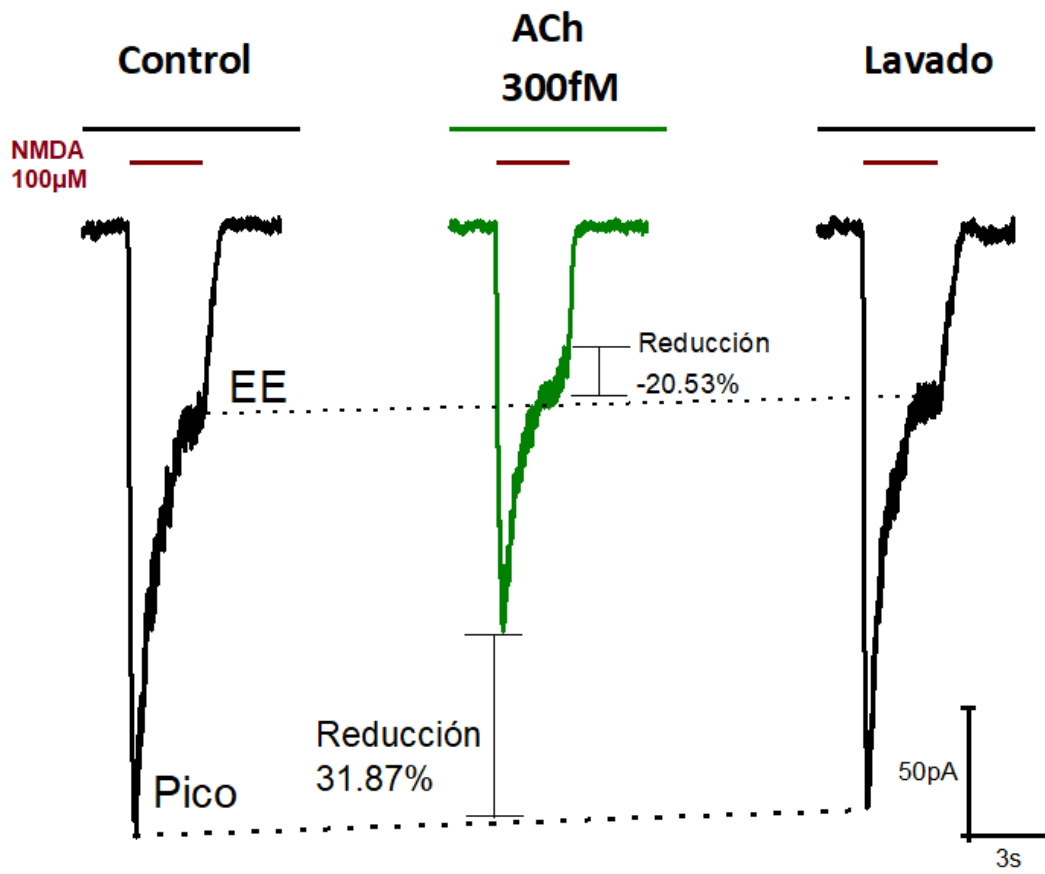
*Trazo representativo del efecto de potenciación de acetilcolina (300fM).*



*Trazo representativo del efecto de potenciación de ACh sobre la iNMDA. Se muestra el efecto de potenciación en el pico (50.72%) de ACh y de inhibición en el EE (-10.27%) (trazo color azul), respecto a los trazos de control y lavado (100 μM NMDA).*

Figura 45

Trazo representativo del efecto de inhibición de acetilcolina (300fM)

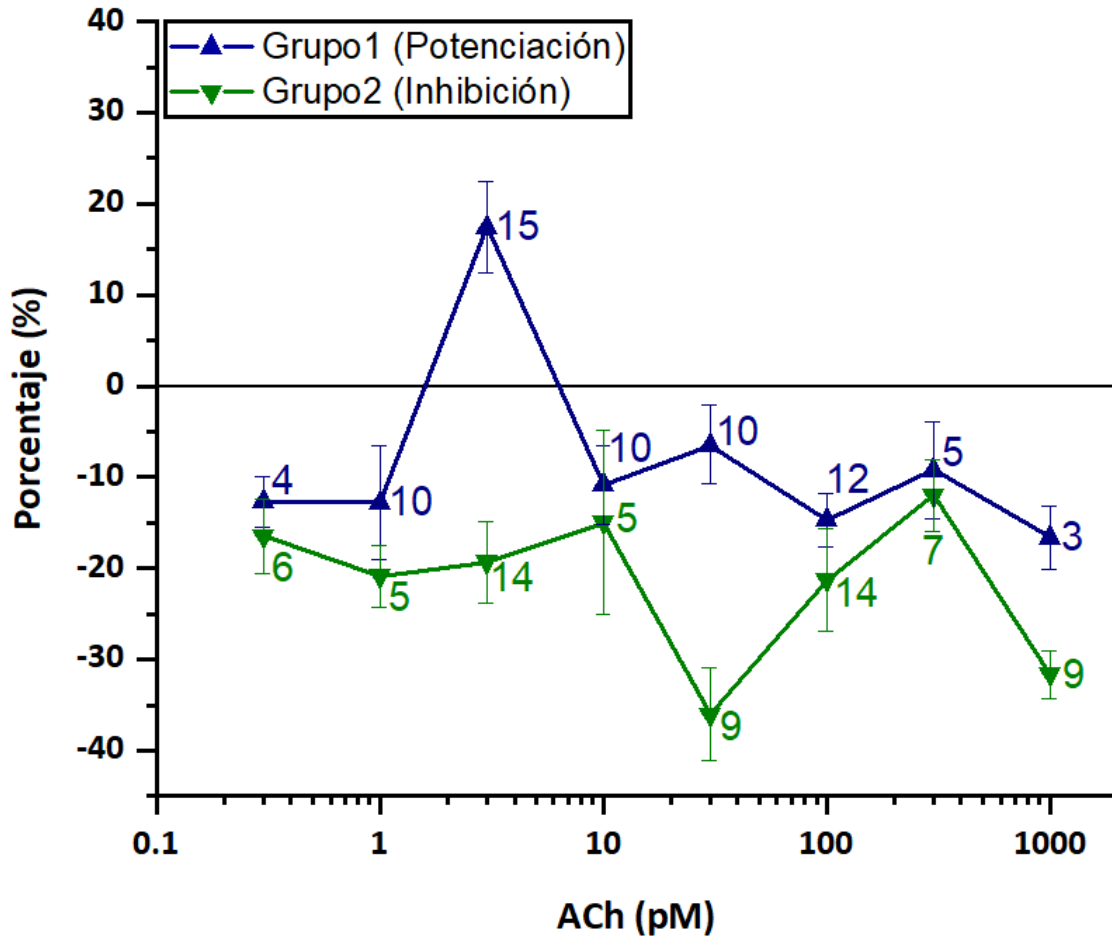


Trazo representativo del efecto de inhibición de ACh sobre la iNMDA. Se muestra el efecto de inhibición (31.87%) de ACh (trazo color verde), respecto a los trazos de control y lavado (100 μM NMDA, trazo color negro).

La siguiente gráfica (Fig. 46) describe el efecto porcentual en el EE de la iNMDA. Se observa que en todas las concentraciones se observa un efecto de inhibición en el EE.

Figura 46

Porcentaje de efecto de acetilcolina sobre el estado estacionario de la corriente activada por NMDA



Se muestra el efecto de potenciación e inhibición en color azul y verde respectivamente. El número a un costado de cada punto representa la n de estudio para cada concentración.

**Tabla 3**

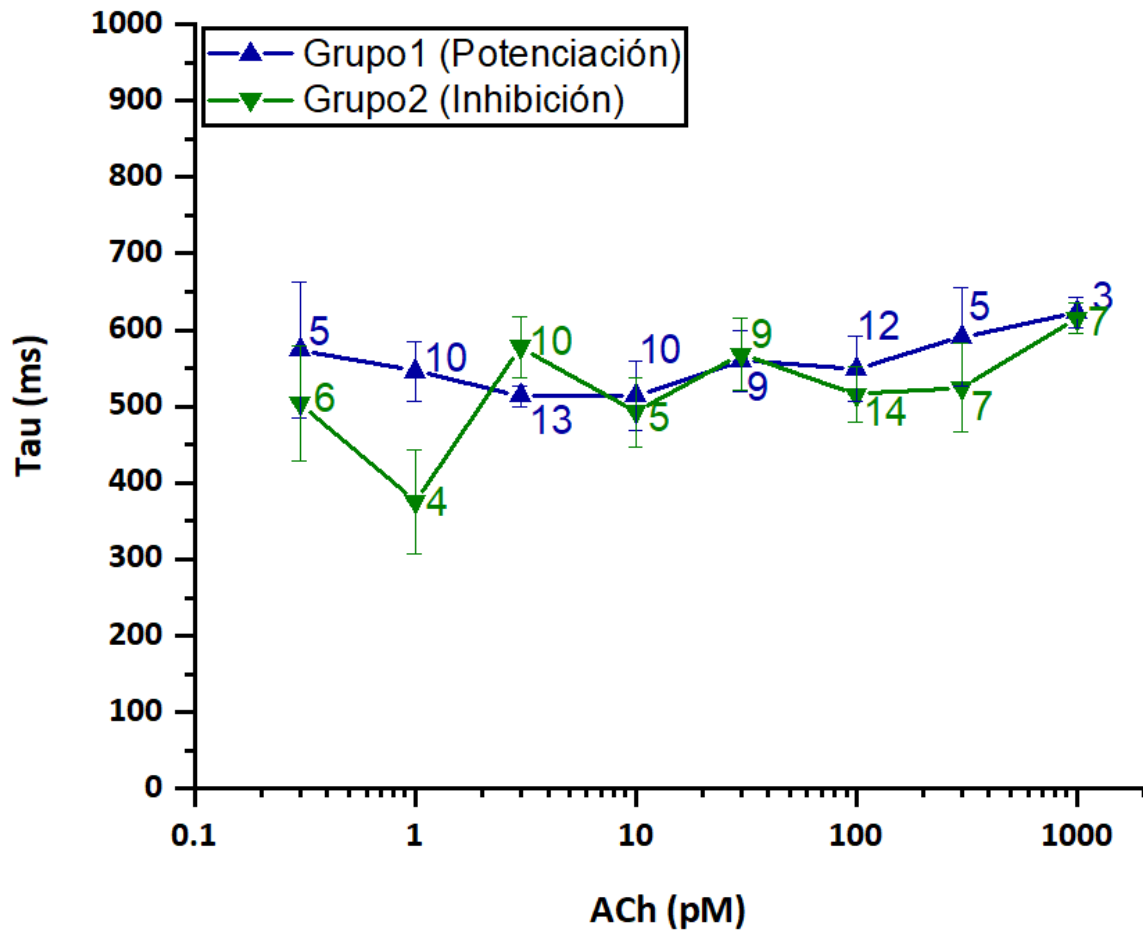
Resumen de los datos del efecto porcentual de inhibición y potenciación de acetilcolina, sobre el estado estacionario de la corriente activada por NMDA

| <b>NMDA 100<math>\mu</math>M +<br/>Concentración<br/>ACh (<math>\mu</math>M)</b> | <b>n</b> | <b>Efecto en el<br/>EE (%)<br/>Potenciación</b> | <b>ESM</b> | <b>n</b> | <b>Efecto en el<br/>EE (%)<br/>Inhibición</b> | <b>ESM</b> |
|--|----------|---|------------|----------|---|------------|
| 0.3  | 4        | -12.70  | 2.73       | 6        | -16.46  | 4.05       |
| 1  | 10       | -12.77  | 6.31       | 5        | -20.85  | 3.40       |
| 3  | 15       | 17.43   | 4.98       | 14       | -19.30  | 4.47       |
| 10   | 10       | -10.83  | 4.31       | 5        | -14.96  | 10.07      |
| 30   | 10       | -6.46   | 4.32       | 9        | -36.05  | 5.08       |
| 100  | 12       | -14.72  | 2.92       | 14       | -21.28  | 5.57       |
| 300  | 5        | -9.20   | 5.35       | 7        | -12.00  | 3.87       |
| 1000   | 3        | -16.60  | 3.45       | 9        | -31.60  | 2.61       |

Así mismo se analizó la Tau para cada grupo, se observa que de manera general el valor de Tau está en el rango 350-650ms (Fig. 47).

**Figura 47**

*Constante de desensibilización (Tau) del efecto de acetilcolina sobre la corriente activada por NMDA (100μM)*



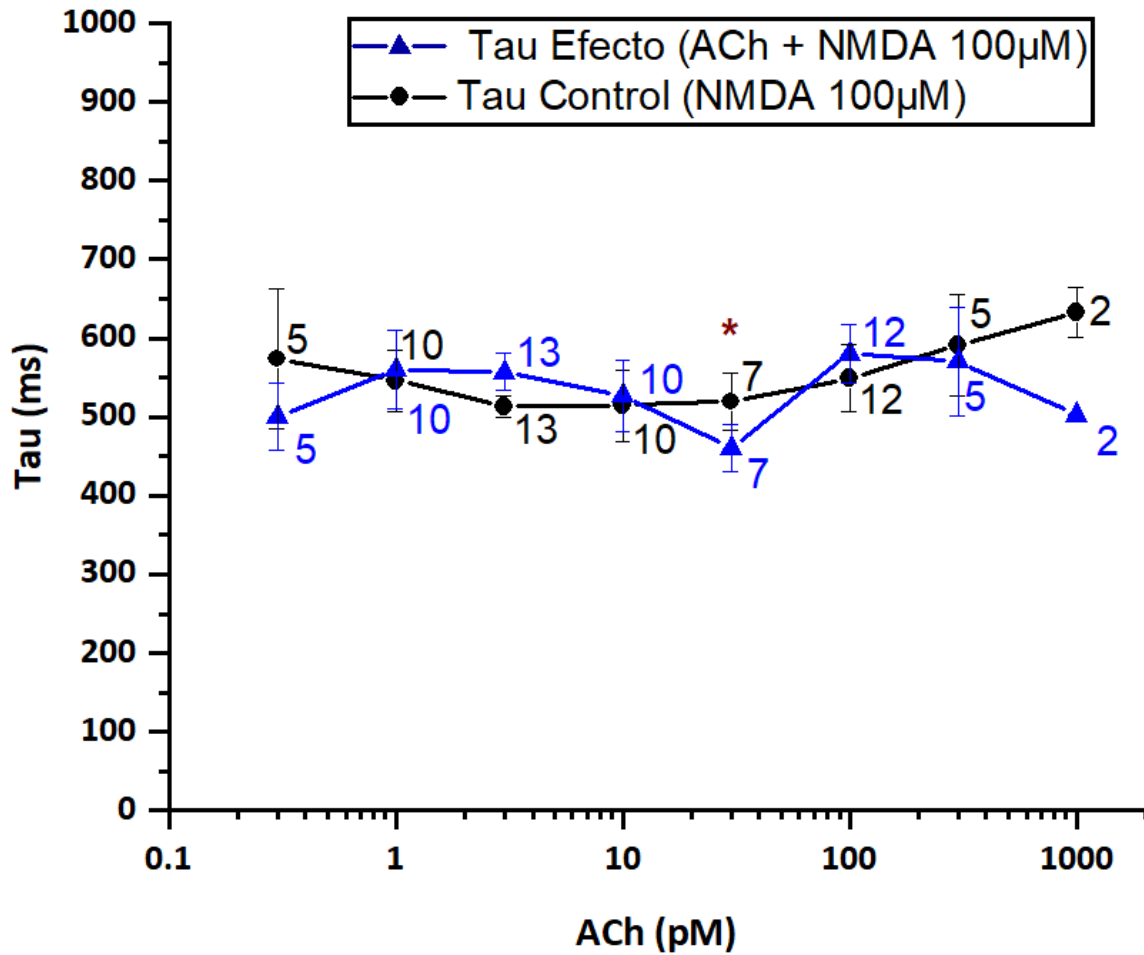
*En la gráfica se muestran los valores de la Tau respecto a los valores de ACh, tanto en el grupo de inhibición (color verde), como en el grupo de potenciación (color azul). Los valores junto a los puntos representan la n.*

Dada la diferencia encontrada del efecto de Gly en la Tau, se decidió comparar también con una t-pareada ( $p < 0.05$ ), el efecto de ACh con la media del control y lavado (100μM), los resultados se muestran en las Fig. 48 y 49. Solo se obtuvo una diferencia significativa (\*) en el grupo de potenciación 30pM de ACh.



Figura 48

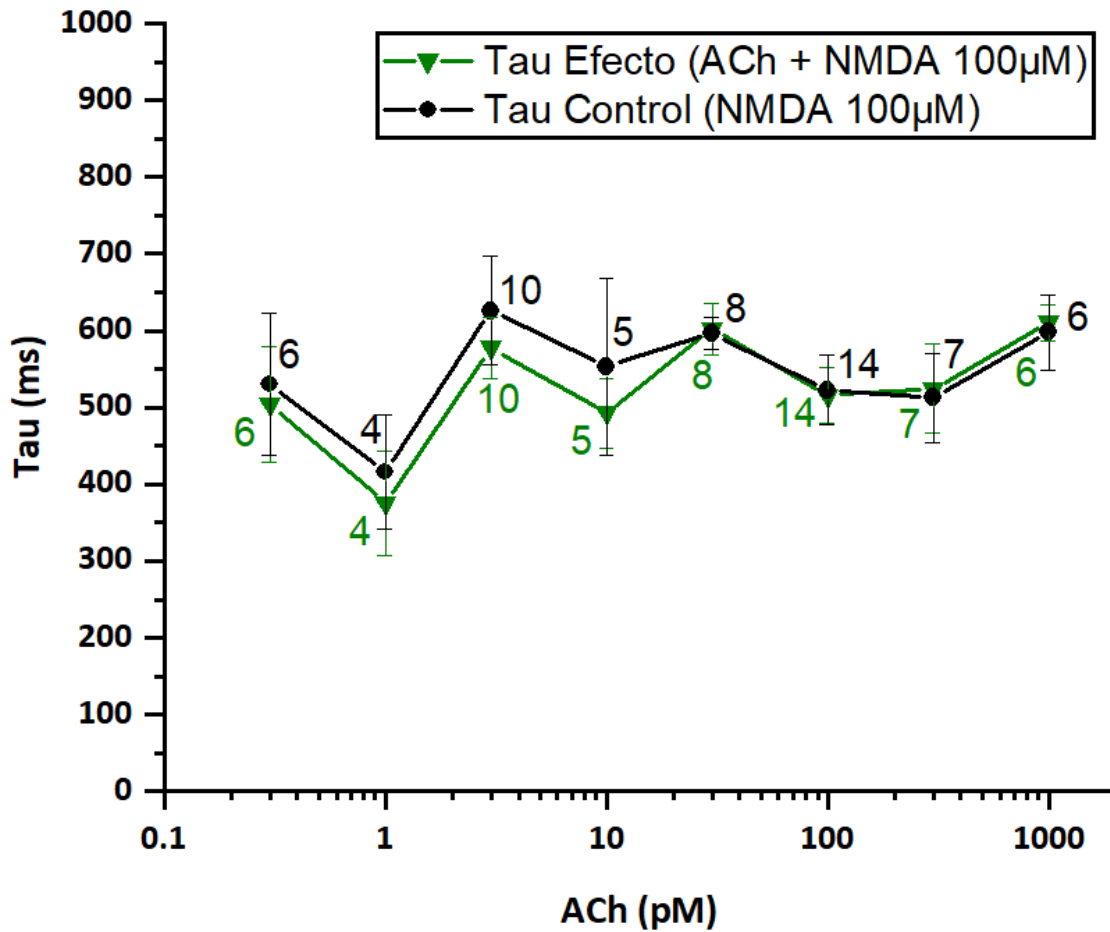
Comparación de la constante de desensibilización (Tau) del efecto de acetilcolina y del control, en el grupo de potenciación



Se realizó una prueba de *t*-pareada ( $p < 0.05$ ) para medir la diferencia entre el grupo control y el grupo efecto ( $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.005 = ***$ ). Solo se obtuvo una diferencia significativa en 30pM (\*). Los valores junto a los puntos representan la *n*.

Figura 49

Comparación de la constante de desensibilización (Tau) del efecto de acetilcolina y del control, en el grupo de inhibición

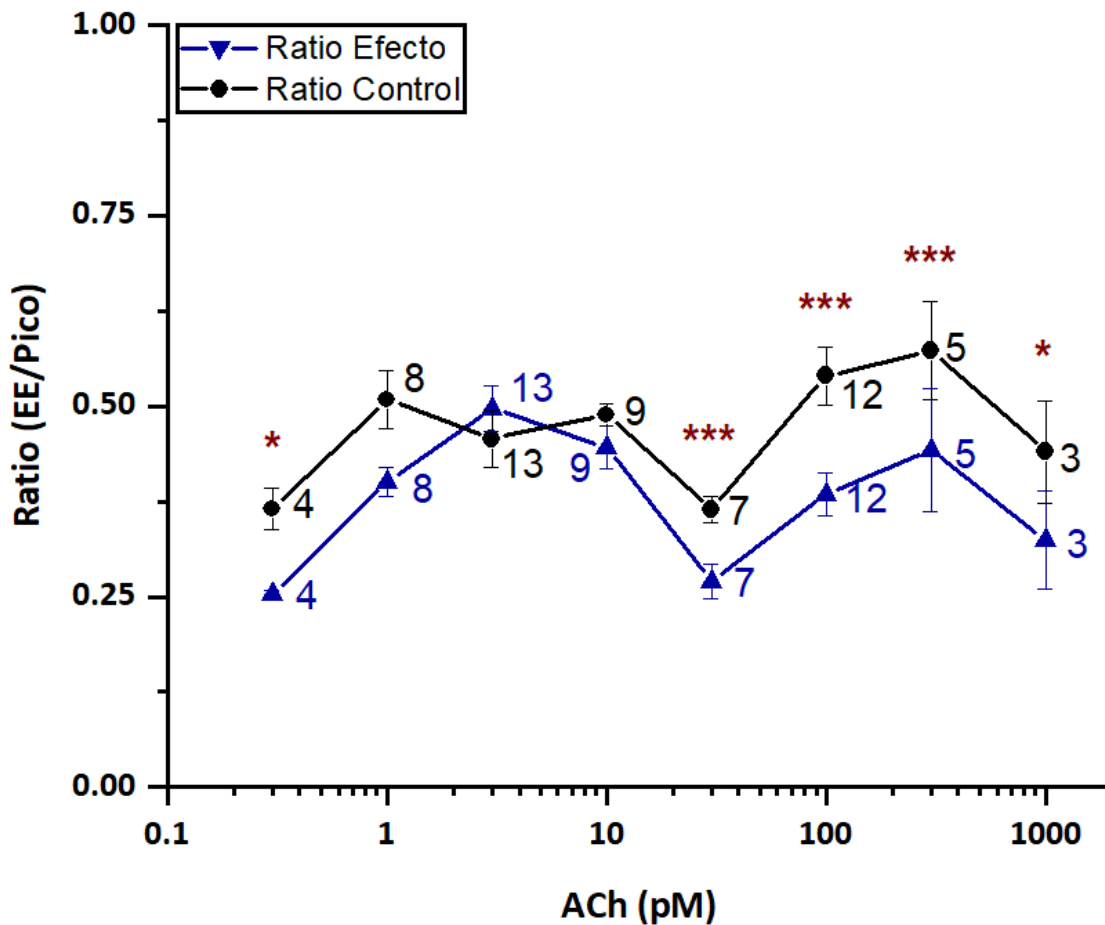


Se realizó una prueba de *t*-pareada ( $p < 0.05$ ) para medir la diferencia entre el grupo control y el grupo efecto ( $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.005 = ***$ ). No se obtuvieron diferencias significativas. Los valores junto a los puntos representan la *n*.

Se analizó también el ratio para cada efecto de ACh tal como se muestra en la siguientes gráficas (Fig. 50 y 51). Se evaluó la significancia entre el ratio del efecto de ACh y el ratio del control mediante una t-pareada ( $p < 0.05$ ), de la cual se obtuvo diferencias significativas 0.3, 30, 100, 300 y 1000pM en ambos grupos.

**Figura 50**

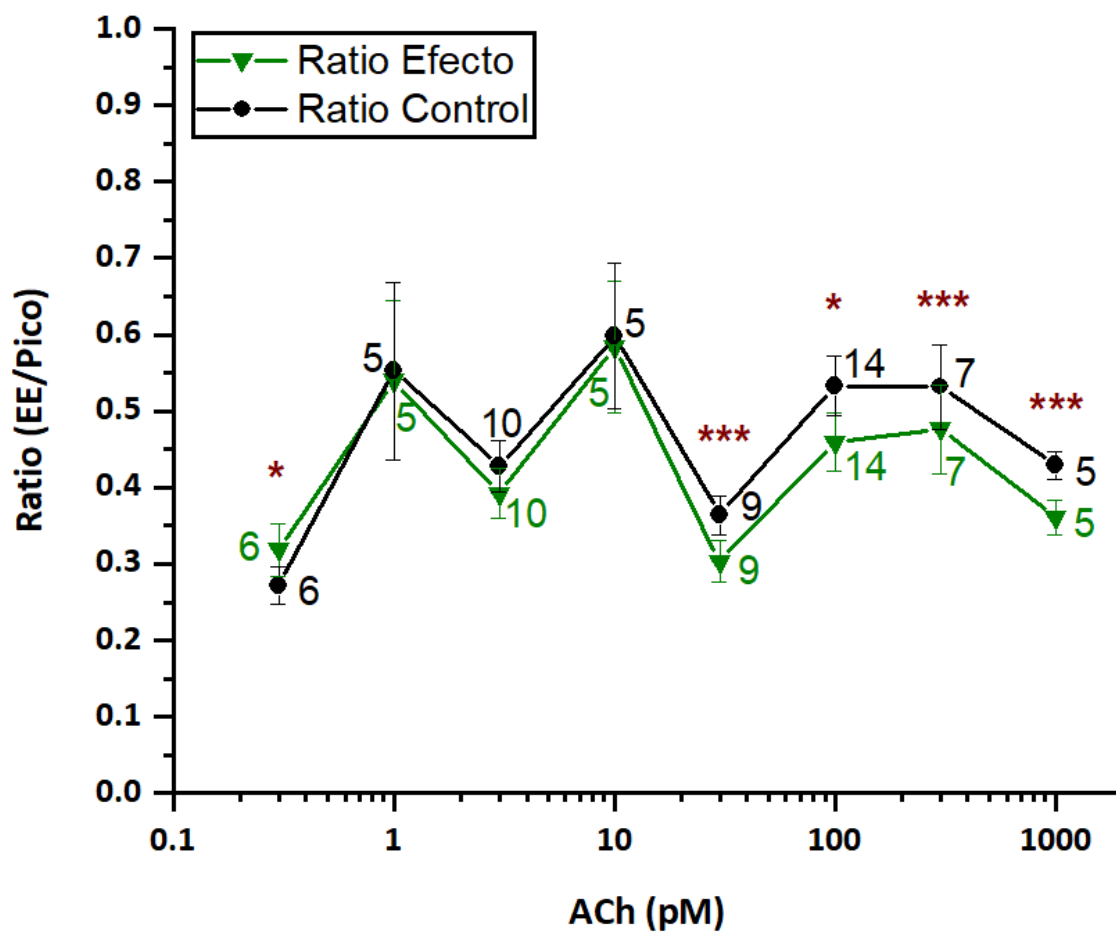
*Comparación del ratio del efecto de acetilcolina y el ratio del control del grupo de potenciación*



Se realizó una prueba de t-pareada ( $p < 0.05$ ) para medir la diferencia del ratio entre el grupo control y el grupo efecto ( $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.005 = ***$ ). Los valores junto a los puntos representan la n.

Figura 51

Comparación del ratio del efecto de acetilcolina y el ratio del control del grupo de inhibición



Se realizó una prueba de *t*-pareada ( $p < 0.05$ ) para medir la diferencia del ratio entre el grupo control y el grupo efecto ( $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.005 = ***$ ). Los valores junto a los puntos representan la *n*.

## 8 DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar el efecto de ACh sobre la iNMDA, para cumplir dicho objetivo fue necesario primero caracterizar la iNMDA en ausencia de Gly mediante una DR de NMDA (0.3-300 $\mu$ M). De acuerdo con investigaciones iniciales (Johnson & Ascher, 1987; Kleckner & Dingledine, 1988) se ha considerado como un paradigma tradicional que para activar el RNMDA es necesaria la participación de Gly como co-activador. Los resultados de este trabajo describen que para las concentraciones entre 0.3 $\mu$ M y 3 $\mu$ M de NMDA las corrientes de NMDA, dado su tamaño, son insignificantes. Sin embargo, obtuvimos corrientes con características definidas de Pico y EE desde 10 $\mu$ M hasta 300 $\mu$ M de NMDA en ausencia de Gly, de manera que este sería el primer reporte de registros de iNMDA en neuronas piramidales agudamente disociadas de la CPF en ausencia de Gly, por lo que se sugiere que Gly no es un co-activador esencial en esta área para la apertura del canal.

La curva DR de NMDA obtenida en ausencia de Gly tuvo una forma característica sigmoidea con una  $CE_{50} = 50.36 \pm 8.11$ ,  $V_{min} = 0.30 \pm 0.03$  y  $V_{max} = 22.84 \pm 2.20$ ; es consistente con resultados antes obtenidos en el laboratorio (Hernández-Carballo *et al.*, 2020) para curva DR de NMDA en presencia de Gly 10 $\mu$ M en CPF.

Aunado a lo anterior, no se ha descrito una fuente endógena neuronal de Gly en SNC; sin embargo, otros autores (Hayashi *et al.*, 2006) sugieren que el efecto de Gly sobre la iNMDA es de potenciación, por lo cual se postuló realizar una DR de Gly (0.1-100 $\mu$ M) como segundo objetivo de este trabajo.

En cuanto a la curva DR de Gly, los resultados del efecto de Gly sobre la iNMDA (100 $\mu$ M) fueron de potenciación, dicho efecto fue desde 16.57% hasta 91.4%, siendo este último correspondiente a 10 $\mu$ M de Gly. La curva se ajustó a un modelo de doble exponencial lo cual nos sugiere que podrían existir más de un sitio de unión a Gly en RNMDA o debido a la existencia de varias isoformas presentes en CPF (Rudolf *et al.*, 1996), se sabe que la Gly se une en el sitio GluN1 (Hirai *et al.*, 1996; Paoletti *et al.*, 2013) pero existen diferentes isoformas (GluN1-1a, GluN1-2a, GluN1-3a, GluN1-4a, GluN1-1b, GluN1-2b, GluN1-3b, GluN1-4b) por lo que las diferentes características

de estas isoformas podrían ser los dos sitios de unión; o algún sitio alostérico en alguna otra subunidad (GluN2 o GluN3).

Lo anterior también concuerda con lo recientemente descrito por Islas *et al.* (2020), quien menciona que las propiedades de apertura del receptor cambian en función de los sitios de unión que tiene ocupados por sus agonistas y/o moduladores.

Por otra parte, cabe resaltar el hallazgo de que la curva de desensibilización Tau, tiene diferencias significativas a pesar de que el ratio no tiene cambios significativos. Es decir, la desensibilización del canal se vuelve más lenta con Gly, aunque la proporción entre el Pico y el EE de la iNMDA se mantiene con y sin Gly. De hecho, de acuerdo con el modelo de ajuste, la Tau crece exponencialmente a medida que la concentración de Gly aumenta, recordemos que la Tau representa la constante de desensibilización, que implica la rapidez con la cual el receptor se desensibiliza; por lo que este cambio significativo sugiere que la Gly esté induciendo un incremento en la cantidad de carga a través de los RNMDA con las subunidades GluN2A/GluN2B, dichas subunidades están relacionadas con la cinética de desensibilización del canal y son las que conforman principalmente el receptor NMDA en las neuronas piramidales de la CPF (Akazawa *et al.*, 1994; Rudolf *et al.*, 1996), es decir, la modulación de Gly potencia la corriente y ralentiza el cierre de los canales.

En cuanto al efecto de ACh sobre la iNMDA ninguno de los parámetros analizados se ajustó a algún tipo de función, las curvas con estas características suelen deberse a la interacción de uno o más de los siguientes factores: varios sitios de unión o diferentes estados de activación del receptor lo que modifica la afinidad a los neuromoduladores (Nahum-Levy *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2016), el estado funcional de la célula (Cai *et al.*, 2002) y/o la participación de varios receptores (Wallace & Bertrand, 2013).

La iNMDA en presencia ACh presentó tanto potenciación como inhibición a diferentes concentraciones, sin embargo, esto no fue proporcional para el EE, por lo que la única concentración de ACh que tuvo efecto de potenciación fue 3pM (Fig. 46). En consecuencia, el resultado del análisis del parámetro de ratio (EE/P) fue significativamente menor que el respectivo control para casi todas las concentraciones excepto 1, 3 y 10 pM en ambos grupos

(potenciación e inhibición), esto implica que la modulación de ACh en iNMDA está alterando el equilibrio de canales abiertos y cerrados, por lo que la cantidad de corriente que está entrando es menor cuando se co-aplica ACh a diferencia de Gly, por ello se propone que también hay una participación de las subunidades GluN2, probablemente la GluN2A (Sibarov & Antonov, 2018), en relación con la morfología de la corriente (Fig. 7), en la modulación que ejerce la ACh en el RNMDA y no exclusivamente la que corresponde al sitio de unión a Gly, es decir, la subunidad GluN1. Esto también concuerda con la propuesta de Islas *et al.* (2020), donde menciona que la ACh también tiene afinidad por un sitio de unión alostérico negativo descrito en la interfase GluN1-GluN2A.

Finalmente, en el análisis comparativo de Tau no hubo cambios significativos con respecto al control a comparación con el efecto de Gly, lo que significa que la velocidad de desensibilización de los canales no se ve modificada con ACh a diferencia de la modulación con Gly.

Con respecto a la probable participación de receptores colinérgicos, se mencionó previamente que en los experimentos realizados en el presente trabajo se seleccionaron neuronas piramidales de CPF, teniendo como criterio de selección aquellas que tuvieran sus dendritas tanto basales como apicales visiblemente cortas y sin bifurcación. Este criterio fue definido de acuerdo con los resultados publicados en Medalla & Barbas (2012) y Mrzljak *et al.*, (1993) los cuales describen que los receptores muscarínicos en CPF de primates se ubican en espinas de las dendritas de segundo orden por lo que podemos descartar de manera teórica la participación de los receptores muscarínicos en los resultados presentados.

Por otra parte, con relación a los receptores nicotínicos que también son activados por ACh, los reportes de la literatura señalan que éstos se encuentran mayormente en el soma de la neurona de la CPF (Poorthuis *et al.*, 2013; Poorthuis & Mansvelder, 2013), por lo que, la influencia de este tipo de receptor colinérgico podría estar presente, sin embargo, se descartó su participación por que el rango de afinidad de los receptores nicotínicos está en el rango de 7.6 a 3500nM (Bisson *et al.*, 2005; Charton *et al.*, 2008).

En conclusión, existe una modulación de ACh de la iNMDA en ambos sentidos y esto se puede interpretar por la afinidad del receptor a ésta por los diferentes componentes (subunidades) como se mencionó previamente, la potenciación del Pico podría explicarse por la unión de ACh al

sitio de Gly, ya que tiene una alta afinidad a éste. La inhibición tanto del Pico como del EE, sugiere que hay una mayor participación de las subunidades GluN2A, de acuerdo con las características biofísicas de la corriente o la probable acción a través del sitio de unión en la interfaz entre las subunidades Glun1-Glun2.

## 9 CONCLUSIONES

En las neuronas piramidales agudamente disociadas de corteza prefrontal de rata:

- Se demostró la existencia de iNMDA con características definidas de Pico y EE en ausencia de Gly.
- La Gly potencia y modifica las propiedades biofísicas de la iNMDA.
- La ACh modula la iNMDA en ambos sentidos y modifica sus propiedades biofísicas.
- La modulación de ACh es diferente a la de Gly en cuanto al Ratio (EE/Pico) y a la Tau de desensibilización de la corriente activada por NMDA.

## 10 PERSPECTIVAS

- Utilizar bloqueadores específicos de las subunidades GluN2A y GluN2B, para saber si efectivamente existe una participación de estos en la modulación.
- Descartar el efecto de receptores muscarínicos a través de bloqueo de sistemas metabotrópicos, asociados a proteínas G (GTP $\gamma$ S o GDP $\beta$ S).
- Utilizar concentraciones mayores a 1nM de ACh junto con antagonistas muscarínicos para conocer el efecto a concentraciones mayores a 1nM y encontrar el efecto máximo.
- Encontrar el efecto cero de ACh sobre la iNMDA utilizando concentraciones menores a 300fM.



## BIBLIOGRAFÍA

- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., & Mizuno, N. (1994). Differential Expression of Five N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit mRNAs in the Cerebellum of Developing and Adult Rats. *The journal of comparative neurology* (Vol. 347).  
<https://doi.org/10.1002/cne.903470112>
- Armstrong, N., Jasti, J., Beich-Frandsen, M., & Gouaux, E. (2006). Measurement of Conformational Changes accompanying Desensitization in an Ionotropic Glutamate Receptor. *Cell*, 127(1), 85–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.037>
- Baddeley, A. (1996). Exploring the Central Executive. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section A: Human Experimental Psychology*, 49(1), 5–28.  
<https://doi.org/10.1080/713755608>
- Bisson, W. H., Scapozza, L., Westera, G., Mu, L., & Schubiger, P. A. (2005). Ligand selectivity for the acetylcholine binding site of the rat  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic subtypes investigated by molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(16), 5123–5130.  
<https://doi.org/10.1021/jm040881a>
- Bloem, B., Poorthuis, R. B., & Mansvelder, H. D. (2014). Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: The role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 8).  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00017>
- Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W., Price, D. L. (2012). Basic neurochemistry : principles of molecular, cellular and medical neurobiology, 8th ed. *Academic Press*.  
<https://doi.org/10.1016/C2009-0-00066-X>
- Cai, X., Flores-Hernandez, J., Feng, J., & Yan, Z. (2002). Activity-dependent bidirectional regulation of GABAA receptor channels by the 5-HT4 receptor-mediated signalling in rat prefrontal cortical pyramidal neurons. *Journal of Physiology*, 540(3), 743–759.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013391>
- Carpenter, B., Sutin, J. (1983). Human neuroanatomy. 8th ed. *Williams & Wilkins*.  
<https://doi.org/10.1002/mus.880060612>
- Cepeda, C., & Levine, M. S. (2006). Where Do You Think You Are Going? The NMDA-D1 Receptor Trap. *Science's stake*. Vol. (2016)  
<https://doi.org/10.1126/stke.3332006pe20>

- Charton, Y., Guillonneau, C., Lockhart, B., Lestage, P., & Goldstein, S. (2008). Preparation and affinity profile of novel nicotinic ligands. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(6), 2188–2193. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.12.075>
- Chen, B. S., & Roche, K. W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. In *Neuropharmacology* (Vol. 53, Issue 3, pp. 362–368). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.05.018>
- Cheriyian, J., Mezes, C., Zhou, N., Balsara, R. D., & Castellino, F. J. (2015). Heteromerization of ligand binding domains of N-methyl-D-aspartate receptor requires both coagonists, L-glutamate and glycine. *Biochemistry*, 54(3), 787–794. <https://doi.org/10.1021/bi501437s>
- Chu, N. S. (2005). Contribution of a snake venom toxin to myasthenia gravis: The discovery of  $\alpha$ -bungarotoxin in Taiwan. *Journal of the History of the Neurosciences* (Vol. 14, Issue 2, pp. 138–148). <https://doi.org/10.1080/096470490881770>
- Conner, J. M., Culberson, A., Packowski, C., Chiba, A. A., & Tuszynski, M. H. (2003). Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron* (Vol. 38). [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00288-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00288-5)
- Cotman, C. W., Monaghan, D. T., Ottersen, P., & Storm-Mathisen, J. (1987). Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Cell Press*. Vol. (10) [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90172-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90172-X)
- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* (Vol. 2004, Issue 255). <https://doi.org/10.1126/stke.2552004re16>
- Cull-Candy S. G., Brickley S., Farrant M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* Vol(11). [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00215-4](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00215-4)
- Dani, J. A. (2001). Overview of Nicotinic Receptors and Their Roles in the Central Nervous System. *Biol Psychiatry* (Vol. 49). [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01011-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01011-8)
- DeFelipe, J., & Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology* (Vol. 39). [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(92\)90015-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90015-7)

- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., Greengard, P., & Levine, M. S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: Role of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology*, *88*(6), 3010–3020.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00361.2002>
- Flores-Hernandez, J., Salgado, H., de La Rosa, V., Avila-Ruiz, T., Torres-Ramirez, O., Lopez-Lopez, G., & Atzori, M. (2009). Cholinergic direct inhibition of N-methyl-D aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. *Synapse*, *63*(4), 308–318.  
<https://doi.org/10.1002/syn.20609>
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurologia* (Vol. 27, Issue 5, pp. 301–310).  
<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
- Flores-Soto, M. E., Segura, J. E. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci* Vol.(20).
- Fuster, J. (2015). The prefrontal cortex: anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe, 5th ed. *New York: Raven Press*. p. 333  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407815-4.00009-X>
- Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. *Progress in Neurobiology* (Vol. 74, Issue 6, pp. 363–396).  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.006>
- Groenewegen, H. J., & Uylings, H. B. M. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progress in Brain Research* (Vol. 126).  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)26003-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26003-2)
- Hayashi, Y., Ishibashi, H., Hashimoto, K., & Nakanishi, H. (2006). Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *GLIA*, *53*(6), 660–668.  
<https://doi.org/10.1002/glia.20322>
- Hernandes, M. S., & Troncone, L. R. P. (2009). Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *Journal of Neural Transmission* 2009 *116*:12, *116*(12), 1551–1560.  
<https://doi.org/10.1007/S00702-009-0326-6>
- Hernández-Carballo, G., Ruíz-Luna, E. A., López-López, G., Manjarrez, E., & 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).

<https://doi.org/10.3390/brainsci10040221>

Hirai, H., Kirsch, J., Laube, B., Betz, H., & Kuhse, J. (1996). The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 6031–6036.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.93.12.6031>

Ishii, M., & Kurachi, Y. (2006). Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 12).

<https://doi.org/10.2174/138161206778522056>

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

<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00639>

Johnson, J., & Ascher P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*. (Vol.325)

<https://doi.org/10.1038/325529a0>

Kleckner, N. W., & Dingledine, R. (1988). Requirement for Glycine in Activation of NMDA-Receptors Expressed in Xenopus Oocytes. *New Series* (Vol. 241, Issue 4867).

<https://doi.org/10.1126/science.28417>

Krettek, J. E., & Price, J. L. (1977). Projections from the Amygdaloid Complex to the Cerebral Cortex and Thalamus in the Rat and Cat 1. *The journal of comparative neurology* (Vol. 172).

<https://doi.org/10.1002/cne.901720408>

Lee, H. K. (2006). Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacology & Therapeutics*, 112(3), 810–832.

<https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2006.06.003>

Levey, A. I. (1993). Immunological localization of ml-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sciences* (Vol. 52).

[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90300-R](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90300-R)

Le Novère, N., Changeux, J. P. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol*.

<https://doi.org/10.1007/BF00167110>

- Llansola, M., Sanchez-Perez, A., Cauli, O., & Felipo, V. (2005). Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *Cerebellum*, 4(3), 154–161.  
<https://doi.org/10.1080/14734220510007996>
- López-Corcuera, B., Geerlings, A., & Aragón, C. (2001). Glycine neurotransmitter transporters: An update. *Molecular Membrane Biology*, 18(1), 13–20.  
<https://doi.org/10.1080/09687680010028762>
- Lu, Y., & Ye, J. H. (2011). Glycine-activated chloride currents of neurons freshly isolated from the prefrontal cortex of young rats. *Brain Research*, 1393, 17.  
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2011.03.073>
- Lysakowski, A., Wainer, B. H., Bruce, G., & Hersh, L. B. (1989). An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience* (Vol. 28).  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90180-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90180-2)
- Luchicchi, A., Bloem, B., Viaña, J. N., Mansvelder, H. D., Role, L. W. (2014). Illuminating the role of cholinergic signaling in circuits of attention and emotionally salient behaviors. *Front Synaptic Neurosci*.  
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00024>
- Ma, W., Yang, L., & He, L. (2018). Overview of the detection methods for equilibrium dissociation constant KD of drug-receptor interaction. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8(3), 147–152.  
<https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2018.05.001>
- Medalla, M., & Barbas, H. (2012). The Anterior Cingulate Cortex May Enhance Inhibition of Lateral Prefrontal Cortex Via m2 Cholinergic Receptors at Dual Synaptic Sites. *The Journal of Neuroscience*, 32(44), 15611.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2339-12.2012>
- Mesulam, M., & Geula, C. (1988). Nucleus Basalis (Ch4) and Cortical Cholinergic Innervation in the Human Brain: Observations Based on the Distribution of Acetylcholinesterase and Choline Acetyltransferase. *The journal of comparative neurology* (Vol. 275).  
<https://doi.org/10.1002/cne.902750205>
- Mesulam, M., Mufson, E. J., Levey, A. I., & Wainer, B. H. (1983). Cholinergic Innervation of Cortex by the Basal Forebrain: Cytochemistry and Cortical Connections of the Septa1 Area, Diagonal Band Nuclei, Nucleus Basalis (Substantia Innominata), and Hypothalamus in the Rhesus Monkey. *The journal of comparative neurology* (Vol. 214).  
<https://doi.org/10.1002/cne.902140206>

- Michaelis, E. K. (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* (Vol. 54).  
[https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(97\)00055-5](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(97)00055-5)
- Millan, M. J. (2005). N-Methyl-d-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: Novel insights and clinical perspectives. In *Psychopharmacology* (Vol. 179, Issue 1, pp. 30–53).  
<https://doi.org/10.1007/s00213-005-2199-1>
- Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual review of neuroscience* Vol. (24).  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Mora, F., & Ferrer, J. M. R. (1986). Neurotransmitters, pathways and circuits as the neural substrates of self-stimulation of the prefrontal cortex: facts and speculations. *Behavioural Brain Research* (Vol. 22).  
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(86\)90034-3](https://doi.org/10.1016/0166-4328(86)90034-3)
- Mori, H., & Mishina, M. (1995). *Structure and Function of the NMDA Receptor Channel* (Vol. 34, Issue 10).  
[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00109-J](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00109-J)
- Mrzljak, L., Levey, A. I., & Goldman-Rakic, P. S. (1993). Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 5194–5198.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.90.11.5194>
- Murphy, D. J. (2004). Determination of accurate KI values for tight-binding enzyme inhibitors: An in silico study of experimental error and assay design. *Analytical Biochemistry*, 327(1), 61–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.12.018>
- Nahum-Levy, R., Lipinski, D., Shavit, S., & Benveniste, M. (2001). Desensitization of NMDA receptor channels is modulated by glutamate agonists. *Biophysical Journal*, 80(5), 2152–2166.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76188-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76188-7)
- Nakanishi, S. (1992). Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Function. *Science*, 258(5082), 597–603.  
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1329206>
- Ongür D, Price JL. (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* Vol. (10).  
<https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.206>

- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2013 14:6, 14(6), 383–400.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Papadakis, M., Hawkins, L. M., & Stephenson, F. A. (2004). Appropriate NR1-NR1 Disulfide-linked Homodimer Formation Is Requisite for Efficient Expression of Functional, Cell Surface N-Methyl-D-aspartate NR1/NR2 Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14703–14712.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M313446200>
- Paul, S., Jeon, W. K., Bizon, J. L., & Han, J. S. (2015). Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 7).  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00043>
- Paxinos, George., & Watson, Charles. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates : Hard Cover Edition*. 466.
- Piña-Crespo, J. C., Talantova, M., Micu, I., States, B., Chen, H. S. V., Tu, S., Nakanishi, N., Tong, G., Zhang, D., Heinemann, S. F., Zamponi, G. W., Stys, P. K., & Lipton, S. A. (2010). Excitatory glycine responses of CNS myelin mediated by NR1/NR3 “NMDA” receptor subunits. *Journal of Neuroscience*, 30(34), 11501–11505.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1593-10.2010>
- Poorthuis, R. B., Bloem, B., Schak, B., Wester, J., de Kock, C. P. J., & Mansvelder, H. D. (2013). Layer-specific modulation of the prefrontal cortex by nicotinic acetylcholine receptors. *Cerebral Cortex*, 23(1), 148–161.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhr390>
- Poorthuis, R. B., & Mansvelder, H. D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors controlling attention: Behavior, circuits and sensitivity to disruption by nicotine. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 86, Issue 8, pp. 1089–1098).  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.003>
- Preuss, T.M., Wise, S.P. (2022). Evolution of prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacol.* 47, 3–19  
<https://doi.org/10.1038/s41386-021-01076-5>
- Proulx, E., Piva, M., Tian, M. K., Bailey, C. D. C., & Lambe, E. K. (2014). Nicotinic acetylcholine receptors in attention circuitry: The role of layer VI neurons of prefrontal cortex. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 71, Issue 7, pp. 1225–1244). Birkhauser Verlag AG.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-013-1481-3>

- Rojas, H. A., & Neri, I. P. (2016). Tema selecto Glutamato para principiantes. *Arch Neurocien (Mex) INNN* (Vol. 21).
- Rudolf, G. D., Cronin, C. A., Landwehrmeyer, G. B., Standaert, D. G., Penney, J. B., & Young, A. B. (1996). Expression of n-methyl-d-aspartate glutamate receptor subunits in the prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience* (Vol. 73).  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00048-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00048-6)
- Schorge, S., & Colquhoun, D. (2003). Studies of NMDA Receptor Function and Stoichiometry with Truncated and Tandem Subunits. *Journal of neuroscience* (Vol. 23).  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-04-01151.2003>
- Schüler, T., Mesic, I., Madry, C., Bartholoma, I., & Laube, B. (2008). Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 37–46.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M703539200>
- Shim, J., Hong, Z. Y., Sohn, I., & Hwang, C. (2021). Prediction of drug–target binding affinity using similarity-based convolutional neural network. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83679-y>
- Sibarov, D. A., & Antonov, S. M. (2018). Calcium-Dependent Desensitization of NMDA Receptors. *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 83, Issue 10, pp. 1173–1183).  
<https://doi.org/10.1134/S0006297918100036>
- Srinivasan, B. (2020). Explicit Treatment of Non Michaelis-Menten and Atypical Kinetics in Early Drug Discovery. *ChemMedChem, an oficial journal of the EFMC* Vol. (16).  
<https://doi.org/10.20944/preprints202010.0179.v1>
- Srinivasan, B., Kantae, V., & Robinson, J. (2020). Resurrecting the phoenix: When an assay fails. *Medicinal Research Reviews* (Vol. 40, Issue 5, pp. 1776–1793). John Wiley and Sons Inc.  
<https://doi.org/10.1002/med.21670>
- Stein, V., & Nicoll, R. A. (2003). GABA Generates Excitement. *Neuron*, 37(3), 375–378.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00056-4)
- Sterling, A & Gamba, D. (2018). Piramidal Neuron. *Neo Brain Game*.  
<https://www.danielagamba.com/brain-art>
- Tian, M. K., Bailey, C. D. C., de Biasi, M., Picciotto, M. R., & Lambe, E. K. (2011). Plasticity of prefrontal attention circuitry: Upregulated muscarinic excitability in response to decreased nicotinic



signaling following deletion of  $\alpha 5$  or  $\beta 2$  subunits. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16458–16463.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3600-11.2011>

Tingley, W. G., Roche, K. W., Thompson, A. K., & Huganir, R. L. (1993). Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 1993 364:6432, 364(6432), 70–73.  
<https://doi.org/10.1038/364070a0>

Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews* (Vol. 62, Issue 3, pp. 405–496).  
<https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>

Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J., & Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex?. *Behavioural Brain Research* (Vol. 146, Issues 1–2, pp. 3–17).  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028>

Vijayraghavan, S., & Everling, S. (2021). Neuromodulation of Persistent Activity and Working Memory Circuitry in Primate Prefrontal Cortex by Muscarinic Receptors. *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 15).  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2021.648624>

Wada, E., McKinnon, D., Heinemann, S., Patrick, J., & Swanson, L. W. (1990). The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family ( $\alpha 5$ ) in the rat central nervous system. *Brain Research*, 526(1), 45–53.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90248-A](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90248-A)

Wallace, T. L., & Bertrand, D. (2013). Importance of the nicotinic acetylcholine receptor system in the prefrontal cortex. *Biochemical Pharmacology* (Vol. 85, Issue 12, pp. 1713–1720).  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.04.001>

Wess, J., Eglen, R. M., Gautam, D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov*.  
<https://doi.org/10.1038/nrd2379>

Woolf, N. J. (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Progress in Neurobiology* (Vol. 37).  
[https://doi.org/10.1016/0301-0082\(91\)90006-M](https://doi.org/10.1016/0301-0082(91)90006-M)

- Yu, A., & Lau, A. Y. (2018). Glutamate and Glycine Binding to the NMDA Receptor. *Structure*, 26(7), 1035-1043.e2.  
<https://doi.org/10.1016/J.STR.2018.05.004>
- Zhu, S., Stein, R. A., Yoshioka, C., Lee, C. H., Goehring, A., McHaourab, H. S., & Gouaux, E. (2016). Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation. *Cell*, 165(3), 704–714.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.03.028>
- Zwart, R., Reed, H., & Sher, E. (2018). Oxotremorine-M potentiates NMDA receptors by muscarinic receptor dependent and independent mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 481–486.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.036>