



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología BUAP



Laboratorio de Neuromodulación

Título del Proyecto

“PAPEL DE LAS SUBUNIDADES NR2A Y NR2B SOBRE EL EFECTO DE ACETILCOLINA SOBRE LA CORRIENTE ACTIVADA POR NMDA EN EL CUERPO ESTRIADO Y CORTEZA PREFRONTAL DE RATA”

Fecha

Abril 2025

Tesis presentada para obtener el grado de:

Maestría en ciencias fisiológicas.

Presenta

LBM. Diana María Vázquez Candanedo

Director de Tesis

D.C. Jorge Luis V. Flores Hernández

Asesores de Tesis

D.C José Ramón Eguibar Cuenca

D.C Amira del Rayo Flores Urbina

ÍNDICE

I. Índice de Figuras.....	4
II. Índice de Tablas.....	7
III. Abreviaturas.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 LA CORTEZA PREFRONTAL.....	11
2.1.1 Estructura y conexiones de la corteza prefrontal.....	11
2.1.2 Funciones asociadas a la CPF.....	12
2.1.3 Capas de la Corteza prefrontal.....	14
2.1.3.1 Características de las capas de la Corteza prefrontal.....	14
2.2 EL CUERPO ESTRIADO.....	16
2.2.1 Estructura y conexiones del cuerpo estriado.....	16
2.2.1.1 Contenido celular del Cuerpo estriado.....	18
2.2.2 Funciones asociadas al cuerpo estriado.....	18
2.3 EL RECEPTOR A NMDA.....	19
2.3.1 Estructura de los receptores a NMDA.....	19
2.3.2 Activación de los receptores a NMDA.....	21
2.3.3 Farmacología y papel de las subunidades del receptor a NMDA.....	21
2.3.3.1 Función asociada a las subunidades de los receptores a NMDA.....	22
2.4 ACETILCOLINA.....	24
2.4.1 Estructura y Síntesis de la Acetilcolina.....	24
2.4.2 Funciones asociadas de la Acetilcolina en la corteza cerebral.....	25
2.4.3 Funciones asociadas de la Acetilcolina en el Cuerpo Estriado.....	26
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	27
3.1 Interacción de la Acetilcolina con los receptores Glutamatérgicos.....	27
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
5. JUSTIFICACIÓN.....	28
6. HIPÓTESIS.....	29
7. OBJETIVOS.....	29
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29

8.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	29
8.2 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL.....	30
8.3 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	30
8.3.1 COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS.....	31
8.4 ANÁLISIS DE DATOS.....	33
8.5 DISEÑO ESTADÍSTICO.....	36
9. LOGÍSTICA.....	37
9.1 RECURSOS HUMANOS.....	37
9.2 RECURSOS FINANCIEROS.....	36
10. BIOÉTICA.....	37
11. RESULTADOS.....	38
11.1 En el cuerpo Estriado.....	38
11.2 En la corteza prefrontal.....	47
12. DISCUSIÓN.....	56
13. CONCLUSIONES.....	61
14. REFERENCIAS.....	62

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El mapa arquitectónico de la corteza humana por Brodmann.....	11
Figura 2. Localización anatómica de la corteza prefrontal en la rata.....	11
Figura 3. Representación de la CPF en rata.....	12
Figura 4. Distribución de las conexiones generales entre las diferentes capas de la CPF.....	15
Figura 5. Fotografía de un corte frontal del encéfalo.....	16
Figura 6. Dibujo semi esquemático del estriado aislado.....	17
Figura 7. La estequiometría de las subunidades y la disposición de las subunidades de los receptores de NMDA.....	20
Figura 8. Organización del dominio de una sola subunidad del receptor de glutamato.....	20
Figura 9. Estructura de la acetilcolina.....	24
Figura 10. Metabolismo de la acetilcolina, catalizado por la acetilcolinesterasa.....	25
Figura 11. Trazos representativos de 3-5 trazos estables, que se promedian para obtener los picos de corriente utilizados para medir los efectos de los diferentes fármacos a utilizar.....	34
Figura 12. Histograma de las capacitancias celulares obtenidas de las 76 neuronas espinosas medianas registradas del cuerpo estriado.....	38
Figura 13. Trazo representativo de las corrientes de Na ⁺ y Ca ²⁺ obtenidas por el protocolo de RAMPa en el cuerpo estriado.....	39
Figura 14. Curva dosis-respuesta del efecto de Acetilcolina sobre la corriente de NMDA, en el cuerpo estriado.....	40
Figura 15. Trazos representativos del efecto de ifenprodil en el aumento generado por ACh sobre la corriente de NMDA en el cuerpo estriado.....	41

Figura 16. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10nM, en el cuerpo estriado.....	42
Figura 17. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10nM, 4) NMDA 100µM e Ifenprodil 1µM, 5) NMDA 100µM, Ifenprodil y ACh 10nM, en el cuerpo estriado.....	43
Figura 18. Comparación del efecto (%) sobre la corriente de NMDA de: 1) ACh 10nM, 2) Ifenprodil 1µM, 3) Ifenprodil y ACh 10nM, en el cuerpo estriado.....	43
Figura 19. Trazos representativos del efecto de TCN-201 en el aumento generado por ACh sobre la corriente de NMDA en el cuerpo estriado.....	44
Figura 20. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10nM, en el cuerpo estriado.....	45
Figura 21. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10nM, en el cuerpo estriado.....	46
Figura 22. Comparación del efecto (%) sobre la corriente de NMDA de: 1) ACh 10nM, 2) TCN-201 1µM, 3) TCN-201 1µM y ACh 10nM, en el cuerpo estriado.....	46
Figura 23. Histograma de las capacitancias celulares obtenidas de 62 neuronas piramidales de la corteza prefrontal.....	47
Figura 24. Trazo representativo de las corrientes de Na ⁺ y Ca ²⁺ obtenidas por el protocolo de RAMPA en la corteza prefrontal.....	48
Figura 25. Curva dosis-respuesta del efecto de Acetilcolina sobre la corriente de NMDA en la corteza prefrontal.....	49
Figura 26. Trazos representativos del efecto de ifenprodil en el aumento generado por de ACh sobre la corriente de NMDA en la corteza prefrontal.....	50
Figura 27. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10pM, en la corteza prefrontal.....	51
Figura 28. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10pM, 4) NMDA 100µM e Ifenprodil 1µM, 5) NMDA 100µM, Ifenprodil y ACh 10pM, en la corteza prefrontal.....	51
Figura 29. Comparación del efecto (%) sobre la corriente de NMDA de: 1) ACh 10pM, 2) Ifenprodil 1µM, 3) Ifenprodil y ACh 10 pM, en la corteza prefrontal.....	52

Figura 30. Trazos representativos del efecto de TCN-201 en la potenciación de ACh sobre la corriente de NMDA en la corteza prefrontal.....53

Figura 31. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10pM, en la corteza prefrontal.....53

Figura 32. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10pM, 4) NMDA 100µM y TCN-201 1µM, 5) NMDA 100µM, TCN-201 1µM y ACh 10pM, en la corteza prefrontal.....54

Figura 33. Comparación del efecto (%) sobre la corriente de NMDA de: 1) ACh 10pM, 2) TCN-201 1µM, 3) TCN-201 y ACh 10 pM, en la corteza prefrontal.....55

Figura 34. Resumen de los resultados.....55

II. ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Composición celular de la corteza prefrontal.....	14
Tabla 2. Clasificación anatómica de los tipos celulares del cuerpo estriado.....	18
Tabla 3. Potenciadores del receptor a NMDA y sus efectos.....	21
Tabla 4. Antagonistas de los receptores a NMDA y las subunidades a los cuales muestran mayor selectividad.....	22
Tabla 5. Composición de la solución de Isetionato de sodio.....	31
Tabla 6. Composición de la solución balanceada de Earl.....	32
Tabla 7. Composición de la solución balanceada de Hanks (HBSS).....	32
Tabla 8. Composición de la solución de fondo.....	32
Tabla 9. Composición de la solución libre de T.E.A.....	32
Tabla 10. Concentración de los fármacos a utilizar.....	33
Tabla 11. Equivalencia de capacitancias a micrómetros en el cuerpo estriado.....	38
Tabla 12. Equivalencia de capacitancias a micrómetros en la corteza prefrontal.....	47

III. ABREVIATURAS.

ACh: Acetilcolina.

ATD: Dominio amino terminal.

Ca²⁺: Calcio.

CCA: Corteza cingulada anterior.

COL: Corteza orbital lateral.

COM: Corteza orbital medial.

CPF: Corteza Prefrontal.

CPFm: Corteza prefrontal medial.

CPOV: Corteza ventrolateral.

CPOVL: Corteza orbital ventral.

CTD: Dominio carboxilo terminal intracelular.

DLP: Depresión a largo plazo.

EBSS: Solución salina balanceada de Earle.

EC50: Concentración efectiva 50.

fM: Femtomolar.

HBSS: Solución salina balanceada de Hanks.

IA: Corteza insular agranular ventral.

IC50: Concentración inhibitoria 50.

Ifen.: Ifenprodil.

IL: Corteza infralímbica.

INMDA: Corriente de NMDA.

LBD: Dominio de unión a ligando extracelular.

M2: Poro que forma el canal iónico.

MD: Dominio transmembrana.

MSNs: Neuronas espinosas medianas.

Na⁺: Sodio.

nM: Nanomolar.

NMDA: N-Metil-D-Aspartato.

NMDAr: El receptor de NMDA.

NMDArs: Receptores a NMDA.

NP: Neurona piramidal.

NPs: Neuronas piramidales.

PL: Corteza prefrontal.

PLP: Potenciación a largo plazo.

pM: Picomolar.

PrCm: Corteza Precentral.

SNC: Sistema nervioso central.

TM1,3 y 4: Tres segmentos del canal iónico.

μM: Micromolar.

1.INTRODUCCIÓN

El receptor de NMDA es un receptor ionotrópico de glutamato, el cual es permeable predominantemente al calcio. Este receptor es un heterotetrámero conformado por diferentes subunidades NR1, NR2 y NR3 de las cuales sólo NR2 y NR3 tienen subtipos. Los receptores a NMDA funcionales se conforman por dos subunidades NR1 obligatorias combinadas con subunidades NR2 y NR3. En cuanto a funciones, el receptor de NMDA se ve implicado en procesos como la potenciación a largo plazo (PLP), depresión a largo plazo (DLP) y la plasticidad cerebral (Dildy-Mayfield *et al.*, 1996; Cull-Candy *et al.*, 2001; Collingridge y Bliss, 1995; Bliss y Collingridge, 1993). Asimismo, existe evidencia que una función disminuida del receptor de NMDA está relacionada con disfunciones cognitivas, como la pérdida de memoria por envejecimiento y enfermedades como la esquizofrenia. Por lo que el desarrollo de terapias que potencien, de manera regulada la corriente generada por NMDA es de interés como posible terapia en contra de enfermedades relacionadas con una función disminuida del receptor.

Por otra parte, la acetilcolina es un neurotransmisor, en el sistema nervioso central, especialmente la corteza prefrontal recibe aferencias colinérgicas de los núcleos basales de Meynert, mientras que el cuerpo estriado recibe aferencias el tallo cerebral, y posee inervación colinérgica propia proveniente de las interneuronas colinérgicas (Kapalka y George, 2010).

Anteriormente se han descrito interacciones entre el receptor a NMDA y la acetilcolina. Se ha descrito un incremento colinérgico sobre las corrientes generadas por NMDA (INMDA) (Makram y Segal, 1990), así como inhibición (Metherate y Ashe, 1995). No obstante, estos efectos han demostrado un mecanismo de acción que esta mediado por los receptores colinérgicos, muscarínicos y nicotínicos y no sobre el receptor a NMDA directamente (Segal.,1992; Marino *et al.*, 1998; Aramakis y Metherate, 1998).

Por otro lado, también se ha descrito una interacción directa de la acetilcolina con el receptor a NMDA, por ejemplo, los compuestos colinérgicos han demostrado tener un efecto inhibitor sobre la corriente generada por el receptor a NMDA (Flores-Hernández *et al.*, 2009) así mismo se ha reportado un incremento de la INMDA causado por un tratamiento crónico con Nicotina (Ávila-Ruiz *et al.*, 2014) Finalmente, en el laboratorio de neuromodulación de la BUAP, se ha observado que agentes colinérgicos como la D-tubocurarina tiene un efecto inhibitor sobre la INMDA en neuronas del cuerpo estriado (Luna-Leal, 2016), también se ha encontrado un efecto potenciador en neuronas piramidales de la corteza prefrontal (Vazquez Candanedo, 2019).

El propósito del presente estudio es caracterizar el mecanismo de acción del aumento de la INMDA por la acetilcolina, y definir si este efecto se ve afectado en caso de que el receptor de NMDA este compuesto por subunidades específicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 LA CORTEZA PREFRONTAL

2.1.1 Estructura y conexiones de la corteza prefrontal

La corteza prefrontal (CPF) es una zona del Lóbulo frontal, el cual ocupa casi la mitad de la corteza cerebral en primates y aproximadamente dos tercios en el cerebro humano (Barbas, 2009). La CPF se considera como una corteza de asociación, la cual se ve implicada en los llamados “procesos superiores” tales como: la memoria operativa, la toma de decisiones, la planificación del comportamiento y el procesamiento de señales emocionales, entre otros (Lozano y Ostrosky, 2011). La CPF corresponde a 13 áreas de Brodmann en humanos y 12 en primates, ilustradas en la figura 1. (Fuster, 2001)

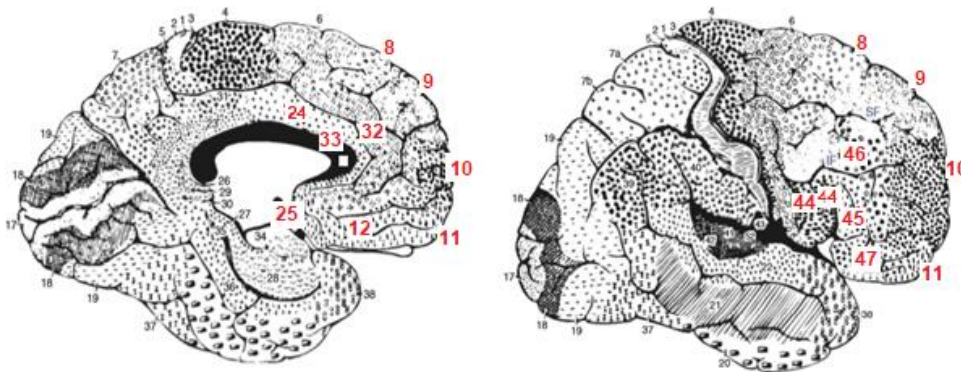


Figura 1. El mapa arquitectónico de la corteza humana por Brodmann. En rojo se muestran las áreas de Brodmann que corresponden a la corteza prefrontal (Modificado de Barbas, 2009).

En ratas, la corteza prefrontal es una zona de la corteza cerebral, que se encuentra en la zona cortical frontal, y no se encuentra tan diferenciada como la corteza prefrontal de primates, sin embargo, se distingue por ser una zona que comparte funciones de la corteza prefrontal en primates (Uylings *et al.*, 2003; Figura 2).

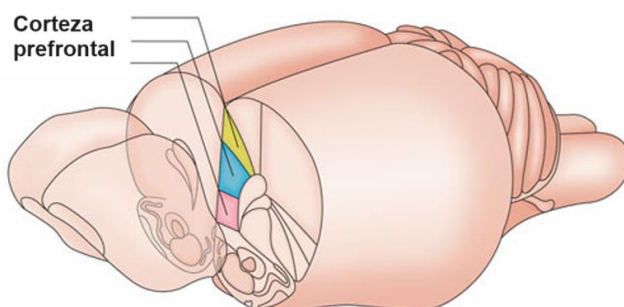


Figura 2. Localización anatómica de la corteza prefrontal en la rata. Se muestra un esquema de la vista coronal del cerebro de rata (Modificado de Tynan *et al.*, 2013).

La CPF en ratas, se subdivide en corteza medial, ventral medial, lateral y ventral., La corteza prefrontal medial a su vez, contiene la región medial dorsal que incluye la corteza precentral (PrCm) y la corteza cingulada anterior (CCA). La CPF medial ventral subdivide en corteza prelímbica y corteza infralímbica, así como en corteza orbital medial., La CPF lateral se puede subdividir en corteza dorsal y corteza ventral insular y las cortezas orbitales laterales. La corteza prefrontal ventral se puede subdividir en las orbitales ventrales y ventrolaterales (CPOVL / CPOV; Figura 3). (Uylings y Van Eden, 1985; Uylings *et al.*, 2003)

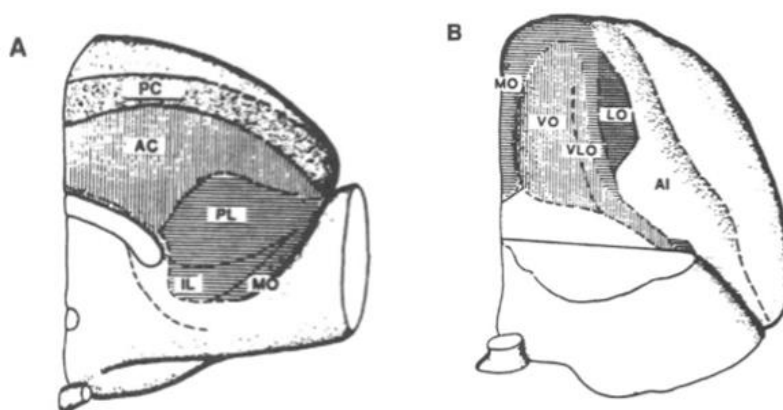


Figura 3. Representación de la CPF en rata. (A) Vista medial., (B) Vista ventral., CPPrC, corteza precentral; Cingulada anterior dorsal y ventral; PL-IL, corteza prelímbica e infralímbica; COM, corteza orbital medial; IA, dorsal y corteza insular agranular ventral; COL, corteza orbital lateral; CPOV, corteza orbital ventral; CPOVL, corteza orbital ventrolateral (Tomado de Kesner, 2011).

La región medial dorsal tiene sus conexiones principales con el neocórtex, la CPF medial ventral con el sistema límbico, la CPF lateral y la CPF ventral con las áreas neocorticales, incluidas las conexiones con los sistemas olfativo y gustativo, pero no con el sistema límbico. Las cuatro áreas diferentes de la CPF proyectan a diferentes partes del caudado putamen (Kesner y Churchwell, 2011).

2.1.2 Funciones asociadas a la CPF

Las funciones de la CPF están relacionadas con las conexiones que esta posee con otras estructuras del cerebro, como otras regiones corticales y estructuras subcorticales; principalmente el estriado y el tálamo (Fuster, 2008).

1. *Funciones ejecutivas*

Las funciones ejecutivas son las principales funciones de la CPF, conocidas por ser altas tareas cognitivas, y están relacionadas con la organización de acciones hacia una meta específica. Se pueden dividir en cuatro componentes: la formación de objetivos, la planificación para lograr un objetivo y el desempeño efectivo (Jurado y

Roselli, 2007), así mismo la moralidad y el comportamiento ético con funciones ejecutivas. Por todo lo anterior, es de esperarse que las funciones ejecutivas tengan un rol importante en la vida diaria (Ardila y Surloff, 2007).

Las funciones ejecutivas más estudiadas son las siguientes: El control de la atención; la planificación, la cual se encarga de identificar y organizar los pasos y elementos necesarios para lograr un objetivo (Lezak *et al.*, 2004); la flexibilidad cognitiva se refiere a la capacidad de cambiar rápidamente entre diferentes conjuntos de respuestas (Anderson, 2002) ; el control cognitivo de la memoria nos permite recuperar conocimiento, de manera ordenada y planeada para llevar a cabo acciones encaminadas hacia un plan (Fuster, 2008); la memoria de trabajo, el cual es un proceso para el mantenimiento activo a corto plazo de la información, así como para el procesamiento de la información mantenida (Goldman-Rakic, 1987; Baddeley, 2003; Lara y Wallis, 2015) ; la síntesis o integración temporal nos permite organizar elementos de percepción y acción temporalmente separados en el pensamiento, habla o comportamiento dirigidos a un objetivo; y el control verbal (Lezak *et al.*, 2004).

El control de las funciones ejecutivas se encuentra principalmente en la CPF lateral; sin embargo, también se involucran otras zonas de la CPF en mayor o menor grado. La CPF orbital contribuye en mayor grado a los componentes afectivos de la toma de decisiones y la CPF medial contribuye a la atención para realizar las acciones. Por lo tanto, existe una participación homogénea de los lóbulos frontales, y específicamente de la CPF (Stuss y Alexander, 2000; Stuss *et al.*, 2002; Koechlin *et al.*, 2000).

Por otro lado, los circuitos originados en la CPF que se dirigen al tálamo y los ganglios basales son considerados importantes para la realización de tareas ejecutivas: el circuito prefrontal dorso lateral se ve implicado en funciones de planeación, selección de metas, cambio de posición, memoria de trabajo, y autocontrol; mientras que el circuito prefrontal orbito frontal se encarga de evaluar riesgos y la inhibición de conductas inapropiadas (Royall *et al.*, 2002).

2. Control Emocional

Los estímulos emocionales negativos activan una amplia red de regiones del cerebro, incluyendo la corteza prefrontal medial (CPFm) en relación con la corteza del cíngulo anterior (CCA) (Etkin *et al.*, 2011). La actividad de la CCA está involucrada en las respuestas de la piel condicionadas por el miedo y con el aumento de la frecuencia cardíaca bajo una situación de estrés social (Wager *et al.*, 2008; Milad *et al.*, 2007), estas áreas no funcionan exclusivamente en la expresión de respuesta a estímulos, si no también pueden apoyar los procesos de evaluación de estímulos (Meyer *et al.*, 1975).

La CCA y CPFm se ven implicadas en la regulación de conflictos emocionales, como la inhibición del procesamiento de emociones negativas, para reducir la interferencia a realizar tareas (Schiller y Delgado, 2010), así mismo estas áreas se activan por

emociones positivas que disminuyen las emociones positivas, en este proceso la CCA se encarga de medir el valor de las acciones, mientras que la CPF orbital mide los refuerzos de los estímulos (Dixon *et al.*, 2007).

2.1.3 Capas de la Corteza prefrontal

2.1.3.1 Características de las capas de la Corteza prefrontal

La corteza cerebral se conforma de seis capas, ordenadas paralelamente a la superficie cortical, de modo que la capa superior es la más superficial., Éstas se clasifican según el tipo celular que es más prominente en estas (Siegel y Sapru, 2011). La apariencia histológica de la corteza cerebral varía entre regiones, lo cual se asocia con las diferencias de las funciones de estas zonas. Por lo tanto, en la tabla 1 se describen los tipos celulares encontrados en la CPF.

Tabla 1. Composición celular de la corteza prefrontal.,

Estructura	Consideraciones anatómicas	Importancia funcional
Células estrelladas (Granulares)	Cuerpos pequeños, localizados entre ramificaciones dendríticas. Todas las capas de la corteza, principalmente en la capa IV.	Neuronas receptoras de aferencias tálamicas. Modulan la excitabilidad de otras neuronas corticales.
Células piramidales	Cuerpos celulares variados. Presentan ramificación dendrítica apical y basal que se extienden perpendicularmente a la superficie cortical y proyectan en las capas superiores	Neuronas de proyección (p. ej., fibras [tractos] corticonucleares bulbares, corticoreticulares, y corticotálamicas).
Células de Martinotti	Células triangulares pequeñas presentes en todas las capas corticales.	Neuronas intracorticales.
Célula horizontal (de Cajal)	Células fusiformes pequeñas presentes principalmente en la capa cortical superficial.,	Neuronas intracorticales.
Célula de Betz	Células piramidales gigantes.	Concentradas en el área 4 de Brodmann, corteza motora primaria. Da origen al tracto corticoespinal.,
Modificado de Rubin y Safdieh, 2008.		

En cuanto a la distribución de las conexiones de las capas de la corteza prefrontal, se encuentran resumidas en la Figura 3.

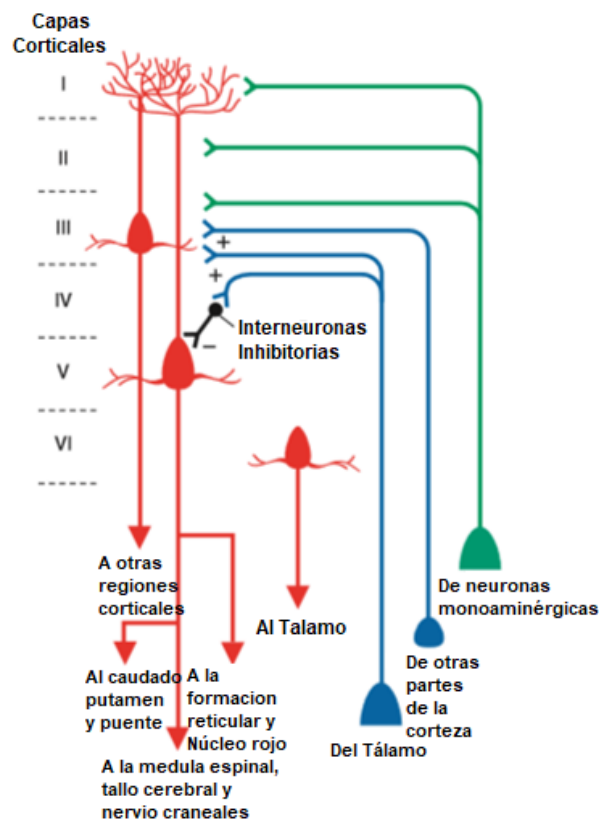


Figura 4. Distribución de las conexiones generales entre las diferentes capas de la CPF. Las capas I, II y III reciben información de las neuronas monoaminérgicas (en verde). Las capas III y IV reciben del tálamo y otras zonas corticales (en azul). La capa IV envía información al tálamo, la capa V al caudado putamen, al puente, a la médula espinal, a los nervios craneales, a la formación reticular y el núcleo rojo; y la capa VI envía información al tálamo (en rojo) (Modificado de Siegel y Sapru, 2015).

2.2 EL CUERPO ESTRIADO

2.2.1 Estructura y conexiones del cuerpo estriado

El cuerpo estriado forma parte de los ganglios basales, los cuales son estructuras nucleares subcorticales, que se derivan del telencéfalo y se conocen por su relación con el control y el aprendizaje motor, los ganglios basales se conforman por los núcleos caudado, putamen, globo pálido, núcleo subtalámico y sustancia negra. (Carpenter, 1994). El cuerpo estriado, que obtiene su nombre por el aspecto rayado blanco causado por los fascículos nerviosos que lo cruzan, se sitúa en el espesor de los hemisferios cerebrales, por fuera del tálamo y alrededor de la cápsula interna (Figura. 5; Freire, 2007).

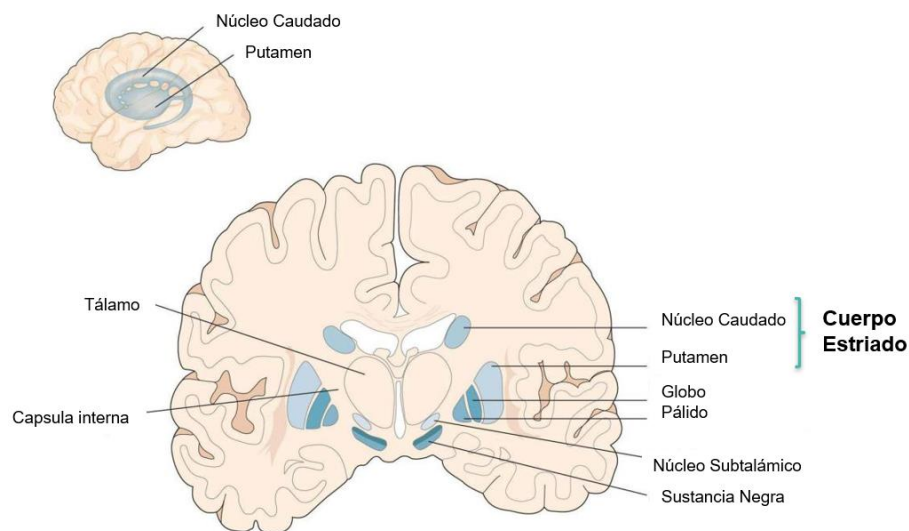


Figura 5. Fotografía de un corte frontal del encéfalo, se muestran los núcleos que conforman a los ganglios basales (Modificado de Nieuwenhuys, Voogd y Van Huijzen, 1981)

En cuanto a la conformación del cuerpo estriado hay autores que consideran que se forma por el núcleo caudado, el putamen y el globo pálido, sin embargo, la mayoría de los textos consultados en el presente trabajo, consideran al globo pálido como un núcleo separado, por lo tanto, solo se considerará a los núcleos caudado y putamen como parte del Cuerpo estriado (Sierra et al., 2019; Carpenter, 1994; Naidich, 2017)

El núcleo caudado es una estructura de sustancia gris que posee forma de letra C y se encuentra en relación con el ventrículo lateral, el caudado se puede dividir en cabeza, cuerpo y cola. La cabeza, es la estructura anterior bulbosa, la cual se encuentra rostral al tálamo y sobresale en el interior del asa anterior del ventrículo lateral., El cuerpo es la parte más voluminosa del estriado el cual se encuentra dorso lateralmente al tálamo y recorre a lo largo de la pared del ventrículo lateral., Finalmente, la cola es curva y pasa por la pared lateral de la asta temporal, terminando

en el putamen inferior cercano a la amígdala (Sierra *et al.*, 2019; Carpenter, 1994; Naidich, 2017).

Por su parte el putamen, es el núcleo de mayor tamaño de los ganglios basales y se localiza entre la cápsula externa y la lámina medular externa del globo pálido, por debajo de la corteza insular (Sierra *et al.*, 2019; Carpenter, 1994; Naidich, 2017; Figura 6).

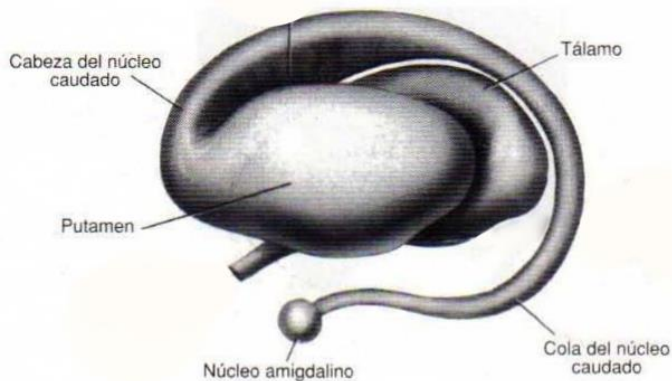


Figura 6. Dibujo semi esquemático del estriado aislado, también se muestra el tálamo y núcleo amigdalino, muestra 1) La cabeza del núcleo caudado 2) las relaciones entre la cola del núcleo caudado y el núcleo amigdalino (Modificado de Carpenter, 1994, Fundamentos de neuroanatomía).

Aferentes

Las principales fibras aferentes que llegan al cuerpo estriado provienen de la corteza cerebral, partes de la amígdala, los núcleos del tálamo intralaminares, la sustancia negra y el núcleo dorsal del rafe (Carpenter, 1994).

La mayoría de las zonas corticales proyectan al estriado, y se pueden clasificar, dependiendo de la zona cortical donde se originan, en territorio sensoriomotor, asociativo y límbico. La zona sensoriomotora recibe aferentes de la corteza motora primaria, somatosensorial, premotora y el área suplementaria motora. La zona asociativa recibe de las áreas frontales, temporales, parietales inferiores, preoccipitales y parahipocámpales. El territorio límbico obtiene aferencias de la corteza límbica, paralímbica, la amígdala y el hipocampo (Alexander & DeLong, 1985; Flaherty & Graybiel 1991).

El cuerpo estriado recibe aferentes de la sustancia negra y el área ventral tegmental, el estriado también recibe aferencias del tálamo, principalmente del complejo centromediano/parafascicular (Tisch *et al.*, 2004).

Eferentes

El estriado proyecta principalmente al globo pálido y a la sección reticular de la sustancia negra (Carpenter, 1994).

2.2.1.1 Contenido celular del Cuerpo estriado

Los tipos celulares asociados al cuerpo estriado se encuentran resumidos en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación anatómica de los tipos celulares del cuerpo estriado (Carpenter, 1994; Kreitzer, 2009).

	Características generales	Neurotransmisor	Subtipos	Características
Neuronas Espinosas Medianas (Neuronas espinosas de proyección)	De forma redonda y ovalada, de mediano tamaño, poseen múltiples dendritas primarias cubiertas con espinas y tienen axones largos,	GABA	Tipo I	Poseen somas lisos y dendritas proximales que se encuentran cubiertas de espinas, sus dendritas tienen una longitud de 200 micrómetros.
			Tipo II	Células de mayor tamaño, poseen dendritas de 600 micrómetros, sus axones son largos.
Neuronas de dendritas lisas (Interneuronas sin espinas)	Caracterizadas por sus axones cortos	GABA y ACh	Tipo I	Pequeñas, poseen dendritas varicosas, y un axón corto altamente ramificado.
			Tipo II	Poseen grandes cuerpos celulares y dendritas de más de 250 micrómetros de largo.
			Tipo III	Interneuronas colinérgicas gigantes.

2.2.2 Funciones asociadas al cuerpo estriado

Alexander, De Long y Strick en 1986, definieron una serie de circuitos que se originan en la corteza, pasan por el estriado y regresan a la corteza, el total de circuitos definidos fueron cinco, sin embargo, de interés para el presente trabajo son los que incluyen estructuras pertenecientes a la corteza prefrontal., Estos circuitos los cuales se definieron con base en su función y su principal proyección de la corteza son:

- a) El circuito asociativo, que incluye la corteza prefrontal dorsolateral y el caudado.
- b) El circuito límbico, que incluye el estriado ventral y la corteza cingulada anterior.
- c) El circuito orbitofrontal lateral, el cual incluye el caudado ventromedial y la corteza orbitofrontal lateral.,

El circuito proveniente de la corteza prefrontal dorsolateral, se ve implicado en la mediación de las funciones ejecutivas, como la planeación, la organización, la regulación, el monitoreo de los comportamientos orientados hacia metas y la memoria de trabajo. Si bien el rol de la corteza prefrontal en los procesos ejecutivos se ha mencionado anteriormente, es de interés mencionar que la memoria de trabajo, también es afectado por lesiones en el estriado (Días, Robbins & Roberts, 1996).

Los circuitos límbico y orbitofrontal lateral, tienen un rol en el control social y la empatía, de igual modo actúan como intermediarios para la información motivacional y afectiva; por otro lado, se ven implicados en la respuesta a recompensas (Tisch, 2004). En estudios de imagen se vio una mayor actividad en el cíngulo anterior, el estriado ventral, la amígdala y el hipocampo cuando los sujetos fueron presentados con recompensas (Kunig *et al.*, 2000).

2.3 EL RECEPTOR A NMDA

El receptor de N-Metil-D-Aspartato o NMDAR, forma parte de la familia de los receptores ionotrópicos del Glutamato, el cual se conoce como el principal neurotransmisor excitador del Sistema Nervioso Central.

2.3.1 Estructura de los receptores a NMDA

Los receptores a NMDA son tetrámeros que pueden ser formados por tres diferentes subunidades denominadas NR1-3. La subunidad NR1 es codificada por solo un gen, el cual, después de la transcripción produce ocho diferentes variantes de la subunidad NR1, debido a que estas variantes son provenientes de un solo gen, no se conocen como, subtipos de la subunidad; mientras que en el caso de las subunidades NR2 y NR3 son codificadas por cuatro y dos genes respectivamente, por lo tanto se conocen los subtipos NR2A-D y NR3A y B (Moriyoshi *et al.*, 1991, Sugihara *et al.*, 1992, Zukin y Bennett 1995). Los receptores a NMDA funcionales son heterotetrámeros, que se componen de dos subunidades NR1 obligatorias, junto con dos subunidades NR2 o NR3 (Monyer *et al.*, 1992, Ulbrich y Isacoff 2008; Figura 7).

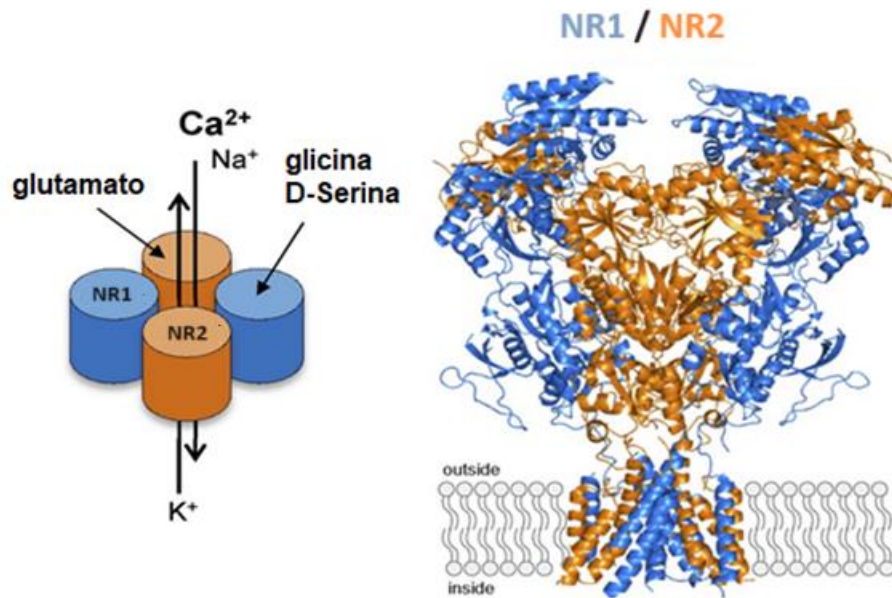
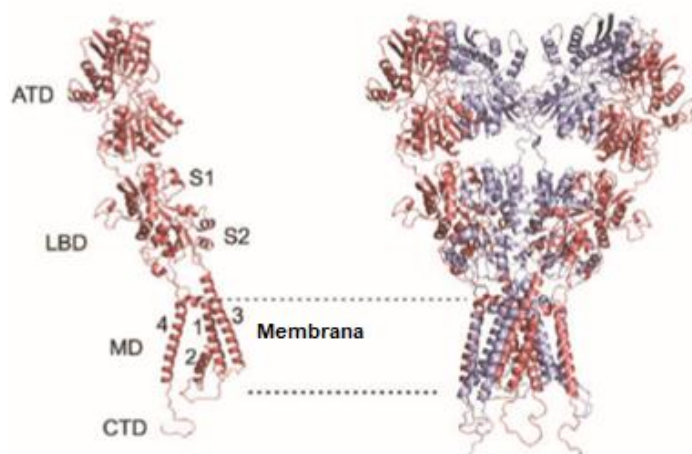


Figura 7. La estequiometría de las subunidades y la disposición de las subunidades de los receptores de NMDA. A) Se esquematiza un tetrámero formado x2 subunidades NR1 se muestran en azul y las subunidades NR2 en anaranjado. La figura ilustra como la subunidad NR1 es afín a la Glicina y la D-Serina, mientras que la subunidad NR2 es afín al glutamato. B) Se muestra la cristalografía del tetrámero de NMDA, con los dominios extracelulares e intracelulares (Modificado de Kasper *et al.*, 2018).

Todas las subunidades de los NMDAR tiene una estructura en común, consisten en un dominio amino terminal (ATD) vinculado a un dominio de unión a ligando extracelular (LBD); que a su vez está conectado a un dominio transmembrana (MD) el cual conforma el canal iónico con tres segmentos (TM1,3 y 4), un poro que forma el canal iónico (M2), un circuito extracelular entre TM3 y TM4; las hélices transmembrana que a su vez se comunican con un dominio carboxilo terminal intracelular (CTD; Mullasseril *et al.*, 2010; Paoletti y Neyton, 2007; Figura 8).

Figura 8. Organización del dominio de una sola subunidad del receptor de glutamato. Dos dominios extracelulares (el terminal amino (ATD) y el dominio de unión al ligando (LBD) compuesto por dos segmentos (S1 superior y S2 inferior) están conectados al canal iónico formado por cuatro hélices de membrana (MD) que se comunican con el dominio intracelular carboxiterminal (CTD; Tomado de Vyklicky *et al.*, 2013).



2.3.2 Activación de los receptores a NMDA

La activación del receptor a NMDA se da por el glutamato, el cual se considera el neurotransmisor excitador principal en el SNC, este es liberado por los terminales presinápticos pertenecientes a las sinapsis glutamatérgicas. El glutamato se une a los sitios de unión en la LBD que pertenece a las subunidades NR2, después de esta unión el canal iónico se abre para dejar pasar Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Mayer y Westbrook 1987; Johnson y Asher, 1987).

2.3.3 Farmacología y papel de las subunidades del receptor a NMDA

La actividad del NMDAR se puede modular tanto positiva como negativamente. Los moduladores positivos aumentan la respuesta o la afinidad por el agonista y contienen un sitio de unión diferente del sitio de unión para el agonista (Mullasseril *et al.*, 2010). Algunos de los potenciadores de los receptores a NMDA y sus efectos se encuentran resumidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Potenciadores del receptor a NMDA y sus efectos (Wu *et al.*, 1991; Malayev *et al.*, 2002; Horak *et al.*, 2006; Mullasseril *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 1990; Traynelis *et al.*, 1995; Mony *et al.*, 2011)

Potenciador	Efecto
Poliaminas	Potencian la actividad de los receptores que contienen NR2B al aumentar la sensibilidad del receptor a glicina, se unen en la al sitio que se encuentra entre los ATD de las subunidades NR1 y NR2B.
El sulfato de pregnenolona	Potencia los receptores que contienen NR2A o NR2B al aumentar la probabilidad de que se abra el canal
(3-clorofenil) (6,7-dimetoxi-1 ((4-metoxifenoxi) metil) 3,4-dihidroisoquinolin2 (1H) -il) metanona (CIQ),	Aumenta la frecuencia de apertura de receptores que contienen subunidades NR2C o NR2D

Los antagonistas pueden clasificarse según su lugar de acción: en el sitio de unión del agonista (competitivo), dentro del poro del canal iónico (no competitivos), o en sitios de modulación específicos. Los antagonistas no activan el receptor. Los compuestos que inhiben al NMDAR ocupando el poro del canal iónico, son antagonistas no competitivos porque su acción requiere de la activación previa del receptor. Algunos de los antagonistas se encuentran clasificados en la Tabla 4 junto con el tipo de subunidad que contienen los receptores a NMDA a los cuales son más selectivos.

Tabla 4 . Antagonistas de los receptores a NMDA y las subunidades a los cuales muestran mayor selectividad (Raditsch *et al.*, 1993; Chao *et al.*, 1997).

Lugar de Acción	Antagonista	Selectividad a receptores que contienen las subunidades.
En el sitio de unión del agonista (Competitivo)	(R)-2-amino-5-fosfonopentanoato (R-AP5)	NR2A
	(R)-CPP y (R)-AP7	NR2A y NR2D
	NVP-AAM077	NR2A
Dentro del poro del canal iónico (No competitivos)	Dizolcipina (MK-801)	NR1, NR2A o B
	Argiotoxina-636 o N1-dansil-espermina	NR1y NR2A o NR1 y NR2B
	Ifenprodil	NR2B
	Zn ²⁺	NR2A

2.3.3.1 Función asociada a las subunidades de los receptores a NMDA

Existen variaciones en cuanto a la estructura, farmacología, propiedades electrofisiológicas y función de los NMDARs, las cuales se han asociado a su composición en subunidades.

Primeramente, los receptores que expresan las distintas subunidades poseen distintos patrones de expresión en el sistema nervioso central, en adultos se ha encontrado una expresión mayor de receptores heterométricos con la combinación NR1/NR2B y NR1/NR2A, receptores con la combinación NR1/ NR2A/NR2B se encuentran en adultos, especialmente en el hipocampo y la corteza (Gray *et al.*, 2011, Al-Hallaq *et al.*, 2007). También se han encontrado receptores triheteroméricos como los que poseen subunidades NR1/NR2A/NR2C y NR1/NR2B/NR2D (Cull-Candy *et al.*, 2004, Palloetti *et al.*, 2011)

Igualmente, se puede encontrar una diferencia en las subunidades de los NMDARs en la misma célula, en los adultos los receptores a NMDA sinápticos principalmente poseen subunidades NR1/NR2A y NR1/NR2A/NR2B, mientras que los NMDARs extrasinapticos poseen la subunidad NR2B (Hardingham, *et al.*, 2010, Gladding *et al.*, 2011). También se han reportado subunidades NR2C y NR2D en receptores NMDA sinápticos de los ganglios basales (Logan *et al.*, 2007, Brothwell. *et al.*, 2008, Harney *et al.*, 2008, Schwartz *et al.*, 2012).

Por otro lado, las diferentes subunidades también influyen en la activación de los NMDARs. Se ha observado que las subunidades NR2A y NR2B generan receptores con una apertura de canal de alta conductancia, con una alta sensibilidad a ser bloqueados por Mg^{2+} y una alta permeabilidad a Ca^{2+} ; mientras que, las subunidades NR2A y NR2D tienen menor conductancia, su sensibilidad a Mg^{2+} es menor y su permeabilidad al calcio también disminuye; finalmente, se ha observado que las subunidades NR3 reduce de mayor manera todas estas propiedades (Hensons *et al.*, 2010, Pachernegg *et al.*, 012).

Finalmente se han encontrado que diferentes mutaciones en los genes que codifican las diferentes subunidades de los receptores a NMDA se encuentran presentes en patologías a nivel del sistema nervioso central., Se han encontrado mutaciones del gen GRIN1, el cual codifica para la subunidad NR1 en pacientes con discapacidad intelectual no-sindrómica (mutación p.Glu662Lys) y con distintos tipos de epilepsia (mutación p.Ser560dup) (Hamdan *et al.*, 2011; Allen *et al.*, 2013), con respecto a la mutación p.Glu662Lys se encontró que se esta relacionada con una reducción de la actividad de los receptores mientras que la mutación p.Ser560dup se asoció con un aumento de las corrientes de Ca^{2+} .

Por otro lado, mutaciones en el gen GRIN2A. que codifica para la subunidad NR2A se han encontrado en pacientes con desordenes del espectro epilepsia-afasia, como problemas cognitivos y de comportamiento, o deterioro del habla y/o del lenguaje, así como el síndrome del sueño de ondas lentas, el síndrome de Landau-Kleffner y epilepsia Rolándica (Carvill *et al.*, 2013; Lemke, *et al.*, 2013). Estas mutaciones se han observad. en pacientes con desórdenes del neurodesarrollo más severos, que no se relacionan con el espectro epilepsia-afasia (Reutlinger *et al.*, 2010). Finalmente, las mutaciones en este gen se han asociado a la enfermedad de Parkinson (Yamada-Fowler *et al.*, 2014)

Por otra parte, se han reportado mutaciones en el gen GRIN2B que codifica para la subunidad NR2B, las cuales se encontraron en pacientes con discapacidad intelectual, esquizofrenia y trastornos del espectro autista, en este caso estas mutaciones se vieron relacionadas con la pérdida de la función de los receptores a NMDA (Endele *et al.*, 2010, Myers *et al.*, 2011; O'Roak *et al.*, 2012, Lemke *et al.*, 2014,).

Finalmente, se han reportado mutaciones de los genes GRIN2C, GRIN3A y GRIN3B, que codifican para las subunidades NR2C, NR3A y NR3B respectivamente, en pacientes con autismo y pacientes con esquizofrenia (Tarabeux *et al.*, 2011).

2.4 ACETILCOLINA

2.4.1 Estructura y Síntesis de la Acetilcolina

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor con actividad tanto en el sistema nervioso periférico como en el sistema nervioso central, cuya fórmula química es $C_7H_{16}NO_2$. La ACh es una molécula pequeña, la cual posee un éster, y un nitrógeno cuaternario, el cual le confiere cierta polaridad (PubChem, 2019; Figura 9)

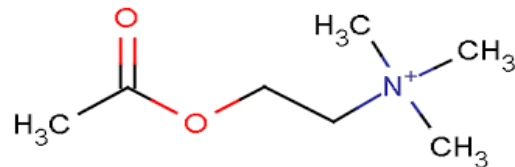


Figura 9. Estructura de la acetilcolina. Recuperado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Acetylcholine, CID=187.

El precursor de la acetilcolina es la colina, la cual lleva a cabo una reacción con la acetil-coenzima A, esta es catalizada por la acetilcolinesterasa, la cual acetila la colina para sintetizar ACh. La colina es transportada por la sangre desde la periferia hasta el SNC, la acetil-coenzima A es un producto del metabolismo de carbohidratos y la acetilcolinesterasa es sintetizada por el retículo endoplásmico (Webster, 2002).

Metabolismo

Después de actuar en el SNC, la acetilcolina es recapturada por transportadores, poco afines, y es almacenada en vesículas, ahí la acetilcolina es eliminada por la acetilcolintransferasa. La butirilcolinesterasa es otra enzima que escinde a la ACh, encontrada principalmente en células gliales (Wu y Hersh, 1994).

La ACh reacciona con el grupo hidroxilo de la serina, encontrada en el grupo aniónico de la acetilcolintransferasa, esta se acetila y libera colina la cual regresa al medio para formar más ACh, finalmente la acetilcolintransferasa se acetila y forma ácido acético volviendo a su estado activo. (Webster, 2002; Figura 10).

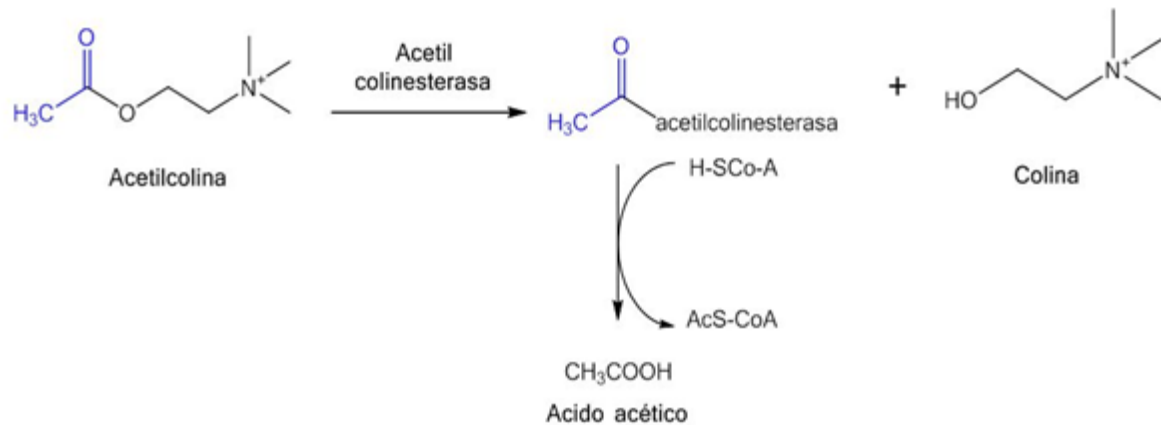


Figura 10. Metabolismo de la acetilcolina, catalizado por la acetilcolinesterasa. La ACh se une al grupo aniónico de la acetilcolinesterasa y reacciona con el grupo hidroxil-serina de la enzima, permitiendo la acetilación de la acetilcolinesterasa, liberando la colina, la cual regresa al medio para formar más ACh, después la enzima se hidroliza y vuelve a su estado activo, formando ácido acético. (Tomado de Balanta D.J., 2016).

2.4.2 Funciones asociadas de la Acetilcolina en la corteza cerebral.,

La ACh actúa sobre la corteza cerebral estimulando la actividad neuronal en ratas y primates, en primates esta estimulación está relacionada con el comportamiento (Kastner y Ungerleier, 2000),.

La ACh tiene dos tipos de funciones sobre la CFP: El primero está relacionado con los procesos "top-down" los cuales se ven implicados en la optimización del procesamiento de estímulos y asociaciones, estos ayudan a clasificar los estímulos en importantes y distractores (Kastner y Ungerleier, 2000), esto influye en el comportamiento del individuo ayudando a poder actuar acorde a un estímulo; el segundo tipo de función son los procesos "bottom-up" los cuales ayudan a la identificación del contexto del estímulo sensorial (Treisman y Gelade, 1980), esto influye en la detección de objetivos y el procesamiento de la atención

La acetilcolina también tiene un rol en el proceso del estado de alerta o el estado consciente, el ritmo circadiano (Consolo *et al.*, 1990; Kametani y Kawamura, 1991), así mismo, en el prosencéfalo basal la ACh incrementa el estado de alerta y suprime el sueño caracterizado por movimientos oculares rápidos (Baghdoyan, Spotts y Snyder, 1993).

2.4.3 Funciones asociadas de la Acetilcolina en el Cuerpo Estriado.

Antes de describir la acción de la ACh a nivel del cuerpo estriado, es importante mencionar el origen de la ACh que se encuentra actuando en el cuerpo estriado. Se han encontrado 2 fuentes de ACh, la primera y la más importante, las interneuronas colinérgicas, y una menor de la proyección del núcleo pedunculopontino tegmental (Woolf & Butcher, 1981, 1986)

Las interneuronas colinérgicas, son interneuronas grandes y aproximadamente representan un 1-2% de la población celular del cuerpo estriado. (Graybiel, 1990). Estas interneuronas son inervadas por vías glutamatérgicas provenientes de la corteza y el tálamo (Wilson et al., 1990; Lapper & Bolam, 1992), así como por vías dopaminérgicas. Por otro lado, las interneuronas colinérgicas proyectan a las neuronas espinosas medianas de proyección, las cuales también reciben información de las fibras glutamatérgicas de la corteza y el tálamo (Calabresi, et al., 1996, Graybiel, 1990).

Por lo anteriormente mencionado se observa que las fibras glutamatérgicas y las colinérgicas que llegan a las neuronas espinosas medianas tengan una estrecha relación. Se ha encontrado evidencia de que las interneuronas colinérgicas del estriado podrían mediar la información que proviene de la corteza a las neuronas espinosas medianas (Calabresi, 2000).

También se ha encontrado que la ACh actúa como regulador de la liberación de neurotransmisores en el estriado (Contant *et al.*, 1996). Por ejemplo, se ha encontrado evidencia de que la ACh reduce la liberación de GABA y glutamato en el cuerpo estriado, mediante la acción de sus receptores muscarínicos (Sugita et al., 1991).

Por otro lado, hay evidencia de una interacción entre la dopamina y la ACh, se cree que la ACh tiene una acción sobre la liberación de dopamina mediante receptores nicotínicos, mientras que la dopamina previene la liberación de ACh por las interneuronas colinérgicas (Yan & Surmeier, 1997).

Otro punto es la acción de la ACh sobre las neuronas espinosas medianas, en las cuales se ha encontrado que contribuyan a su activación, mediante la inhibición de corrientes de K^+ , las cuales contribuyen a su estado inactivado, sin embargo, esta acción se ha atribuido a los receptores muscarínicos M1 (Shen *et al.*, 2007). Del mismo modo, se ha encontrado que los receptores M4 de ACh inhiben a las neuronas espinosas medianas (Oldenburg & Ding, 2011).

Por último, se ha encontrado evidencia que sugiere que la ACh tiene un rol en la enfermedad de Parkinson y la adicción en el cuerpo estriado (Smith & Villalba, 2008), en el caso de la enfermedad de Parkinson, está caracterizada por una disminución de los sistemas dopaminérgicos del cuerpo estriado, mientras que en la adicción a

estimulantes se encuentra un aumento de la función dopaminérgica, ambos defectos en la función dopaminérgica son precedidos por defecto en la actividad de otros neurotransmisores, incluida la ACh (Di Chiara & Bassareo, 2007; Sulzer & Surmeier, 2013), lo cual puede sugerir que un desbalance de la interacción dopamina-acetilcolina está implicado en la patofisiología de la enfermedad de parkinson y la adicción a sustancias (Williams & Adinoff, 2008; Mark *et al.*, 2011; Brichta, Geengard & Flajolet, 2013).

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

3.1 Interacción de la Acetilcolina con los receptores Glutamatérgicos

Se ha encontrado que la ACh ejerce un rol mediante sus receptores nicotínicos sobre la liberación de glutamato y otros neurotransmisores en el sistema nervioso central (Girod *et al.*, 2000; Bancila *et al.*, 2009).

Se ha descrito un aumento de la muerte celular causada por ACh, este aumento fue bloqueado por atropina y no se vio afectado por tubocurarina, ambos antagonistas clásicos de los receptores muscarínicos y nicotínicos de la ACh respectivamente (Mattson, 1989) este efecto también fue observado sobre la exocitosis ligada a glutamato siendo mediado por la activación de receptores nicotínicos (Yamada *et al.*, 1998).

Con respecto a la interacción de la ACh con el NMDAR, se han observado potenciaciones de la corriente de NMDA, después de una aplicación tópica con ACh y después de una perfusión de ACh y NMDA; sin embargo, estos efectos fueron bloqueados por atropina (Markham y Segal, 1990; Metherate y Ashe, 1995; Daniel y Dohanich, 2001), por lo tanto, es posible que la acción muscarínica es la responsable por este efecto potenciador.

Por otro lado, también se ha descrito una acción nicotínica que aumenta los potenciales excitatorios postsinápticos, específicamente por los receptores $\alpha 7$ nicotínicos, así mismo este efecto potenciador activa la liberación de glutamato (Yang *et al.*, 2013; Zappettini *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014).

Por último, algunos estudios sugieren una interacción directa de la molécula de ACh con el NMDAR. Flores-Hernández (*et al.*, 2009), en experimentos realizados en presencia del co-agonista clásico de los receptores de NMDA, glicina, describen un efecto inhibitorio directo sobre la INMDA dada por agonistas y colinérgicos nicotínicos, así como por la fisostigmina, un inhibidor de la colinesterasa, en las cortezas prefrontal y auditiva de rata, el cual no se debe a proteínas G. así mismo el efecto inhibitorio se conservó aun en presencia de atropina lo cual sugiere que el mecanismo de este efecto no es muscarínico. Además, Ávila-Ruiz (*et al.*, 2014) reportó un aumento de la INMDA, en neuronas espinosas medianas y piramidales de rata tras un tratamiento

crónico con Nicotina. Este estudio detalla que, tras el uso de antagonistas del AMPc, el efecto persiste; proponiendo que actúa por un mecanismo diferente al muscarínico. Así mismo, en neuronas piramidales de la corteza prefrontal de rata se ha observado un efecto potenciador de la corriente de NMDA dado por acetilcolina, el cual se sugiere es directo sobre el receptor de NMDA ya que este efecto se conserva en presencia de antagonistas de los receptores clásicos a acetilcolina, en este estudio se describieron dos efectos potenciadores de la ACh sobre la corriente de NMDA. (Vázquez-Candanedo, 2019). Finalmente, en un estudio reportado por Islas et al. (2022) se observó que la ACh puede estar compitiendo por el sitio de unión a ligando del NMDAr, en estudios realizados en neuronas espinosas del cuerpo estriado y estudios computacionales.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que la acetilcolina tiene un efecto potenciador sobre la corriente de NMDA en neuronas piramidales de la corteza prefrontal de rata, que no está relacionado a los receptores clásicos de Acetilcolina muscarínicos o nicotínicos ya que el efecto potenciador fue conservado en presencia de los antagonistas clásicos tubocurarina y atropina. Por otro lado, experimentos previos realizados en el Laboratorio de Neuromodulación de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, han descrito que este efecto potenciador de la ACh sobre la corriente de NMDA también se encuentra en neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado, esto con concentraciones de ACh iguales a las utilizadas en la corteza prefrontal.,

Por esta razón es de interés describir a detalle el mecanismo de acción de la acetilcolina sobre el receptor a NMDA, se describirá el papel de las subunidades NR2A y NR2B sobre este aumento.

5. JUSTIFICACIÓN

La acetilcolina es un neurotransmisor con efecto en varias estructuras del sistema nervioso central, de nuestro interés específico es la corteza prefrontal y el cuerpo estriado. En la corteza prefrontal, la acetilcolina actúa como estimulador tanto en ratas como en primates y de igual forma tiene un efecto sobre el estado de alerta y las distintas funciones ejecutivas en la corteza prefrontal como el procesamiento de estímulos, la detección de objetivos, el proceso de atención y la memoria.

Se ha observado una interacción entre el receptor a NMDA y la ACh, si bien hay evidencia de que esta interacción se da por medio de los receptores clásicos de ACh, nicotínicos y muscarínicos, es del interés de este estudio la interacción directa de la ACh con el receptor a NMDA, que ha sido descrita en estudios como un efecto potenciador que no es dado por receptores muscarínicos (Ávila-Ruiz *et al.*, 2014) y tampoco por receptores nicotínicos (Vázquez-Candanedo *et al.*, 2019).

Debido a que se ha observado que existen dos diferentes efectos de la ACh sobre la corriente de NMDA es de interés describir el mecanismo de acción de este efecto potenciador, y ya que se han descrito diferencias en la corriente de NMDA relacionada a las subunidades que los componen, se sugiere que el efecto potenciador de la acetilcolina está regulado por el tipo de subunidades que componen al receptor.

6. HIPÓTESIS

El efecto potenciador de la acetilcolina sobre el receptor a NMDA se verá modificado por la composición de subunidades del receptor, por lo que receptores que posean diferentes tipos de subunidades tendrán diferentes reacciones a la acetilcolina.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el papel de las subunidades NR2A y NR2B sobre el efecto potenciador de acetilcolina sobre la corriente activada por NMDA en corteza prefrontal y cuerpo estriado de rata.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los siguientes objetivos se realizarán en neuronas espinosas del cuerpo estriado y neuronas piramidales de la corteza prefrontal de rata

- Evaluar el efecto de Acetilcolina en dosis respuesta sobre la corriente de NMDA
- Caracterizar el efecto de la acetilcolina sobre la corriente activada por NMDA en presencia de antagonistas selectivos a las subunidades NR2A (TCN-201) y a la subunidad NR2B (Ifenprodil).

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio básico experimental.

8.2 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL

Este proyecto es llevado a cabo en el laboratorio de Neuromodulación dentro del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla durante el período comprendido entre 2023 y 2024.

8.3 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

La técnica de trabajo a utilizar es la técnica de *patch clamp* en configuración *Whole cell* en células agudamente disociadas de ratas Wistar macho.

Preparación

1. Extracción de las células de ratas Wistar macho de 30 días, y de 100-120 gr. de peso: Se utiliza Halotano para anestesiarse a los animales y decapitarlos, se realiza la extracción del cerebro en menos de un minuto y treinta segundos para preservar la viabilidad celular; El cerebro se sumerge en una solución Isetionato burbujeado con O₂.
2. Extracción de rebanadas: El cerebro se retira de la solución isetionato para colocarlo en un vibratomo y realizar rebanadas de 350 µm que contengan la zona de interés, y se disecciona. Finalmente, las rebanadas se sumergen en solución salina balanceada de Earl (EBSS), por al menos una hora, burbujeadas con una mezcla de 5%CO₂/ 95% O₂.
3. Disociación de rebanadas: Para disociar las rebanadas se colocan en solución de salina balanceada de Hanks (HBSS), en la cual previamente se disuelve 30 mg de papaína y se coloca a 35°C, por 10 minutos. Posteriormente se disocian las rebanadas mecánicamente utilizando pipetas de vidrio de tamaño descendente.

Técnica electrofisiológica

1. Detección de células: La suspensión obtenida tras la disociación de células disociadas se observa al microscopio, y es perfundida por una solución de fondo en constante recambio, la cual provee a las células de nutrientes que contribuyen a la conservación de las neuronas.
Durante esta fase se buscan células viables para el experimento, las cuales se identifican de acuerdo a su morfología, una vez encontrada una célula viable se utiliza un capilar de vidrio previamente llenado con una solución que asemeja el interior de la célula, el cual cubrirá un electrodo que registrará la actividad de la célula y se acercará a la célula para tocarla
2. Sello: Una vez se toca la célula con el capilar, se hace sello entre el electrodo de registro y la membrana (del orden de GΩ) y posteriormente se rompe la membrana celular mediante un proceso de succión.

3. Protocolo electrofisiológico:

a) Protocolo de rampa: Consiste en someter a la célula a cambios súbitos de voltaje, desde los -100mV hasta +40 mV, con el fin de activar canales iónicos activados por voltaje de Na⁺ y Ca²⁺ y observar corrientes evocadas por estos canales. Este protocolo se utiliza para evaluar la resistencia de la membrana a cambios eléctricos, y en caso de obtener corrientes de Na⁺ y Ca²⁺ se considera como un indicativo de viabilidad celular y se prosigue con el siguiente protocolo electrofisiológico. En caso de que la célula no presente estas corrientes, se descarta.

b) Protocolo de aplicación: Se realiza mediante la técnica de fijación de voltaje a un potencial de -80 mV en configuración de célula completa. Para realizar la aplicación del fármaco, se acercan a la célula dos capilares que perfundirán a la célula con las soluciones a utilizar.

Primero se perfunde la célula con una solución control libre de T.E.A, en este caso la cual no genera ningún cambio en la apertura de canales y se considera. En segundo lugar, se aplica el fármaco que generará las corrientes a estudiar de las cuales se medirá el efecto y finalmente se detiene esta aplicación.

El protocolo completo tiene una duración de 30 segundos de los cuales 3 segundos son destinados a la aplicación del fármaco generador de corrientes.

8.3.1 Composición de las soluciones utilizadas

La composición de las soluciones utilizadas se encuentra en las siguientes tablas, en la parte superior de cada tabla se encuentra el nombre de la solución:

Tabla 5. Composición de la solución de Isetionato de sodio

Isetionato de sodio	
Agente	Concentración (mM)
Isetionato de sodio	140
Glucosa	23
HEPES	15
KCl	2
MgCl ₂	2
CaCl ₂	0.1
Rojo Fenol	1%

Tabla 6. Composición de la solución salina balanceada de Earl (EBSS).

Solución salina balanceada de Earl	
Agente	Concentración (mM)
KCl	5.36
NaCl	116.35
Bicarbonato de sodio	26.18
NaHPO	1.015
MgSO ₄	1.62
CaCl ₂	2
Glucose	5.54
Rojo fenol	1%

Tabla 7. Composición de la solución salina balanceada de Hanks (HBSS).

Solución salina balanceada de Hanks	
Agente	Concentración (mM)
Stock, SIGMA	5.4
HEPES	0.3

Tabla 8. Composición de la solución de fondo.

Solución de fondo	
Agente	Concentración (mM)
NaCl	140
Glucosa	23
HEPES	15
KCl	2
MgCl ₂	2
CaCl ₂	1
Rojo fenol	1%

Tabla 9. Composición de la solución libre de T.E.A.

Solución de registro libre de T.E.A	
Agente	Concentración (mM)
NaCl	127
Glucosa	12
HEPES	10
KCl	2
CaCl ₂	2
CsCl	20
BaCl ₂	5
Rojo fenol	1%

Todas las soluciones fueron ajustadas a un p.H fisiológico de 7.4 y una osmolaridad de 300-310 mOsm. Para el caso de las soluciones: de Isetionato de sodio, EBSS y HBSS, fueron suplementadas con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N-G-nitro-Larginina y 1 ácido kinurénico.

En cuanto a los fármacos a utilizar para probar sus efectos, estos se diluyeron en la solución Libre de T.E.A para obtener las concentraciones deseadas mencionadas a continuación.

Tabla 10. Concentración de los fármacos a utilizar.

Fármaco	Concentración	Justificación
NMDA	100 μ M	La concentración por encima de EC50 y que produce respuestas consistentes. (Flores-Hernandez <i>et. al.</i> , 2002)
Acetilcolina	1, 3, 10, 30, 100, 300 pM 1, 3, 10, 30, 100, 300 nM 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M	Obtener una curva dosis respuesta del efecto de ACh sobre la corriente de NMDA.
Ifenprodil	1 μ M	Se ha observado un bloqueo de la corriente de receptores a NMDA conformados por la subunidad NR2B a esta concentración (Brittain <i>et al.</i> , 2012)
TCN-201	1 μ M	Concentración inhibitoria 50 del fármaco en receptores que expresan las subunidades NR2A (Hansen, 2012).

8.4 ANÁLISIS DE DATOS

Para medir el efecto del fármaco de interés se requiere adquirir corrientes de tres condiciones experimentales:

- a) Condición control: En la cual se caracterizan las corrientes obtenidas en presencia del ligando que evoca las corrientes.
- b) Condición efecto: En esta condición se coaplica el ligando junto con otro fármaco que ejercerá un efecto sobre la corriente a estudiar.
- c) Condición de lavado: Se regresa a la condición control para determinar si el efecto del tratamiento es reversible.

Se obtienen 3-5 trazos estables de las condiciones anteriores, y se promedian, en la figura 11 se muestran trazos representativos de los 3-5 trazos estables y el promedio obtenido, de estos promedios se mide la corriente al pico. Para obtener el efecto de la condición tratamiento se utiliza la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de efecto} = \left(\left(\frac{\text{Condición efecto}}{\text{Promedio condición control y condición lavado}} \right) - 1 \right) * 100$$

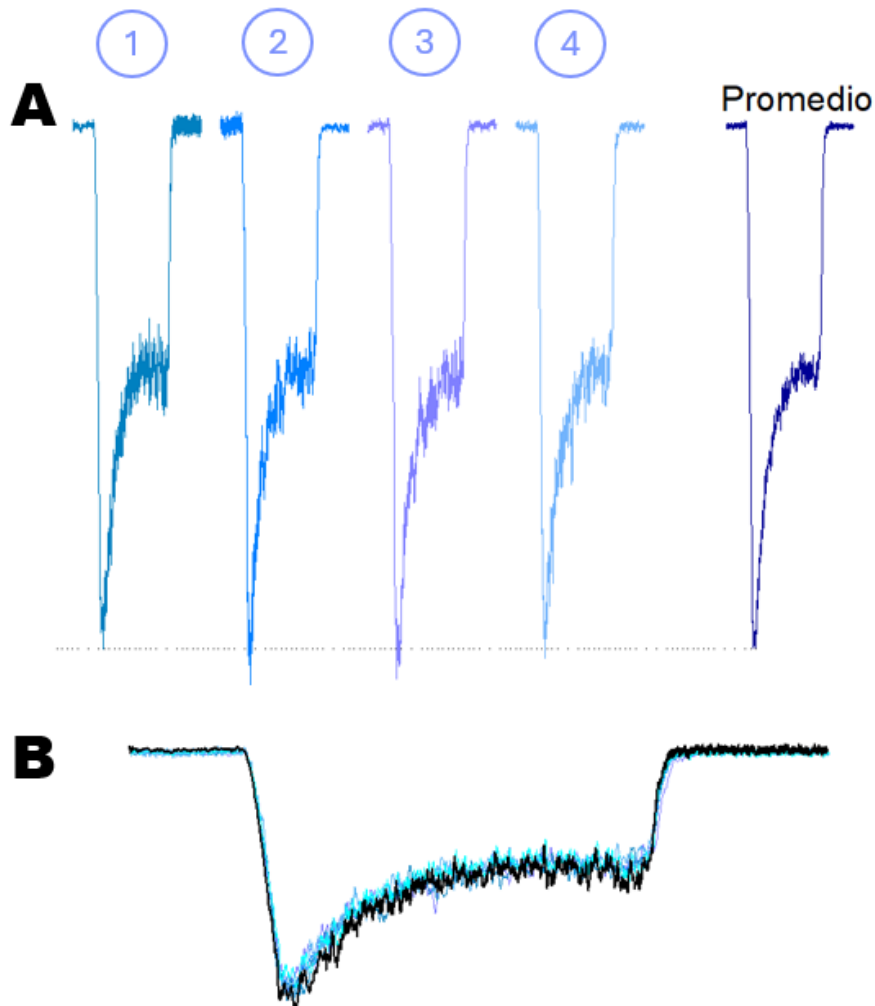


Figura 11. Trazos representativos de 3-5 trazos estables, que se promedian para obtener los picos de corriente utilizados para medir los efectos de los diferentes fármacos a utilizar. En A, se muestran los trazos separados (1-4), y el promedio, en B se muestran los mismos trazos superpuestos, y en negro se resalta el promedio

Determinación de la condición control y condición efecto.

1. Para la curva dosis respuesta: Se tomó como condición control y lavado la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por 100 μM de NMDA. Se tomó como condición efecto la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por la coaplicación de 100 μM de NMDA y las diferentes concentraciones de ACh.
2. Para la determinación del papel de la subunidad NR2A: En este caso se utilizó el antagonista selectivo a las subunidades NR2B, el Ifenprodil para bloquear esta subunidad y trabajar sobre los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2A.
Para este caso se tomaron diferentes condiciones de control y de lavado:

-En primer lugar se desea determinar el efecto de Ifenprodil sobre la corriente de NMDA por lo que se tomó como condición control y lavado la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por 100 μM de NMDA.

Se tomó como condición efecto la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por la coaplicación de 100 μM de NMDA y de 1 μM de Ifenprodil.

-Para determinar si se conserva el efecto de ACh sobre la corriente de NMDA, se tomó como condición control y lavado la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por la coaplicación de 100 μM de NMDA y de 1 μM de Ifenprodil. Se tomó como condición efecto la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por la coaplicación de 100 μM de NMDA, 1 μM de Ifenprodil y ACh dependiendo de la información dada por la curva dosis respuesta.

-Finalmente para determinar si existe una diferencia entre los efectos de Ifenprodil 1 μM y la coaplicación de Ifenprodil y ACh, se toma como condición control y lavado la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por 100 μM de NMDA. Se tomó como condición efecto la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por la coaplicación de 100 μM de NMDA, 1 μM de Ifenprodil y ACh dependiendo de la información dada por la curva dosis respuesta.

3. Para la determinación del papel de la subunidad NR2B: En este caso se utilizó el antagonista selectivo a las subunidades NR2A, el TCN-201 para bloquear esta subunidad y trabajar sobre los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B.

Para este caso se tomaron diferentes condiciones de control y de lavado:

-En primer lugar, se desea determinar el efecto de Ifenprodil sobre la corriente de NMDA por lo que se tomó como condición control y lavado la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por 100 μM de NMDA.

Se tomó como condición efecto la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por la coaplicación de 100 μM de NMDA y de 1 μM de TCN-201.

-Para determinar si se conserva el efecto de ACh sobre la corriente de NMDA, se tomó como condición control y lavado la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por la coaplicación de 100 μM de NMDA y de 1 μM de TCN-201. Se tomó como condición efecto la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por la coaplicación de 100 μM de NMDA, 1 μM de TCN-201 y ACh dependiendo de la información dada por la curva dosis respuesta.

-Finalmente para determinar si existe una diferencia entre los efectos de Ifenprodil 1 μM y la coaplicación de TCN-201 y ACh, se toma como condición control y lavado la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por 100 μM de NMDA. Se tomó como condición efecto la medición de la corriente al pico del promedio de 3-5 trazos estables de la corriente generada por la coaplicación de 100 μM de NMDA, 1 μM de TCN-201 y ACh dependiendo de la información dada por la curva dosis respuesta.

8.5 DISEÑO ESTADÍSTICO

Para realizar la curva dosis respuesta se obtuvieron al menos 5 mediciones del efecto se cada una de las concentraciones de ACh las cuales se promediaron y se obtuvieron la desviación estándar y el error estándar, de los cuales, se graficó el promedio del efecto y el error estándar, y se realizó un ajuste a una función no lineal para explicar la tendencia de los datos.

Para determinar si el efecto de ACh seguía presente en presencia de los antagonistas a las diferentes subunidades, se realizó una prueba *t* de *Student*, para determinar la diferencia entre el efecto de ACh (tomando como condición de control y lavado la

aplicación de 100 μ M de NMDA) y el efecto de ACh en presencia de los antagonistas (tomando como condición control y lavado la aplicación de los antagonistas).

Finalmente para determinar el efecto de la ACh en presencia de los antagonistas se realizó una prueba *t* de *Student*, para determinar la diferencia entre el efecto de los antagonistas y el efecto de ACh en presencia de los antagonistas (en ambos efectos tomando como condición de control y lavado la aplicación de 100 μ M de NMDA).

9. LOGÍSTICA

9.1 RECURSOS HUMANOS

Experimentación: Diana María Vázquez Candanedo

Asesoría: D.C Jorge Luis Valente Flores Hernández, M. en C. Erika Lorena Arroyo Ríos.

9.2 RECURSOS FINANCIEROS

El equipo de laboratorio, así como los reactivos y sustancias usados en este proyecto son financiados por el fondo fijo del Laboratorio de Neuromodulación del Instituto de Fisiología de la BUAP.

Los modelos animales, y su mantenimiento son financiados por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El cuidado de los modelos animales es realizado por el bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

10. BIOÉTICA

Todos los animales utilizados en este estudio fueron mantenidos y manejados por el bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

11. RESULTADOS

11.1 En el cuerpo Estriado

Se registraron un total de 76 neuronas espinosas medianas (MSNs) del cuerpo estriado de ratas de la cepa Wistar, con los datos obtenidos se realizó un histograma de distribución de capacitancias. Las capacitancias obtenidas se encuentran en un rango de 4 - 11 pF, con un promedio de 7.47 ± 0.18 . Los datos fueron ajustados a una curva gaussiana con una R^2 de 0.87, indicándonos una distribución normal (Figura 12). Ya que la capacitancia tiene equivalencia con el tamaño neuronal en micrómetros, se realizó una equivalencia en la tabla 11.

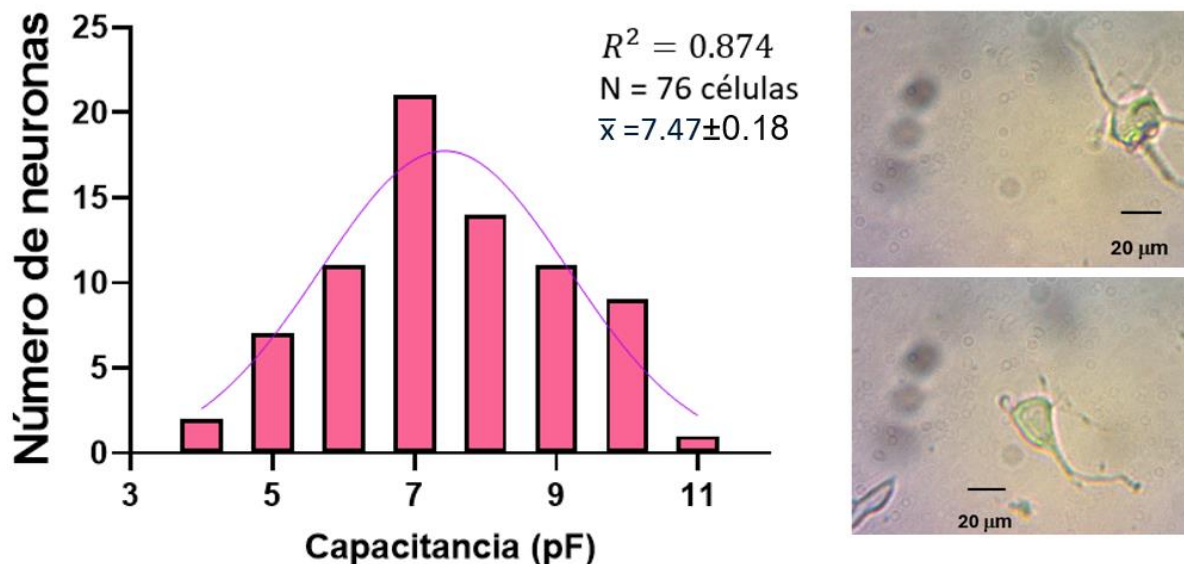


Figura 12. Histograma de las capacitancias celulares obtenidas de las 76 neuronas espinosas medianas registradas del cuerpo estriado. Este parámetro fue registrado antes de aplicar algún protocolo electrofisiológico. Se obtuvo la capacitancia (en picofaradios - pF) de 76 neuronas y se les aplicó un ajuste de Gauss con una $R^2 = 0.874$. A la derecha se muestran micrografías representativas de MSNs registradas.

Capacitancia registrada	Radio en micrómetros	Equivalencia utilizada
4	22.48	Tomando en cuenta a la capacitancia como una constante biológica que equivale aproximadamente a 1 picofaradio por 5.6 micrómetros de diámetro, si se considera a la neurona como una esfera, sin embargo, este cálculo no es exacto ya que solo se toma en cuenta los somas celulares y las dendritas suman superficie al tamaño de la célula y por lo tanto suman al valor de la capacitancia.
5	28.1	
6	33.72	
7	39.34	
8	44.96	
9	50.58	
10	56.2	
11	61.82	

Tabla 11. Equivalencia de capacitancias a micrómetros en el cuerpo estriado. Se tabularon los valores registrados de capacitancia y se convirtieron a micrómetros utilizando la equivalencia de 1 picofaradio por 5.6 micrómetros de diámetro, si se considera a la neurona como una esfera, sin embargo, este cálculo no es exacto ya que solo se toma en cuenta los somas celulares y las dendritas suman superficie al tamaño de la célula y por lo tanto suman al valor de la capacitancia.

Para establecer la viabilidad de las células registradas, se aplicó a cada una de las células un protocolo de rampa de voltaje, en caso de obtener una corriente de sodio (Na^+) y una corriente de Calcio (Ca^{2+}) se considera como un indicativo de la viabilidad celular ya que señala que la membrana celular es resistente a cambios de voltaje y por lo tanto puede regular estos cambios (Arroyo-Rios, 2021). Por lo tanto, solo se aplicaron los siguientes protocolos electrofisiológicos a MSNs que presentaran corriente de sodio (Na^+) y una corriente de Calcio (Ca^{2+}) (Gráfica 1).

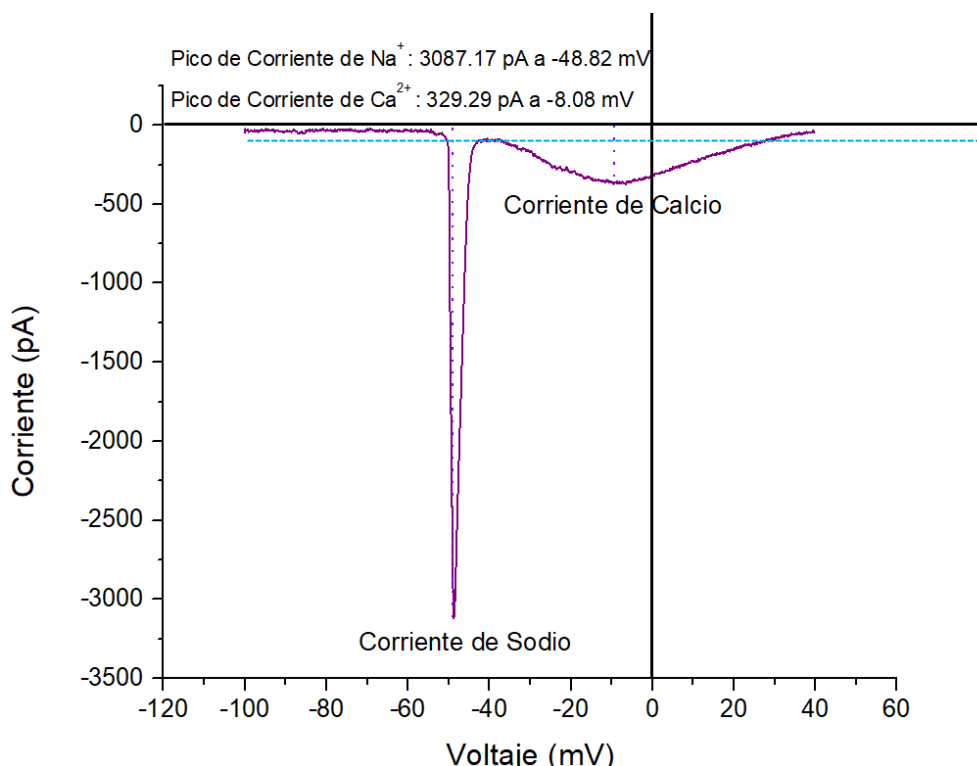


Figura 13. Trazo representativo de las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} obtenidas por el protocolo de RAMPA en el cuerpo estriado.

Para la siguiente etapa del experimento, se registraron las MSNs neuronas mediante la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa, se aplicó NMDA a una concentración de $100 \mu\text{M}$, en ausencia de Glicina, y acetilcolina a concentraciones en picomolar (pM): 0.3, 1, 3, 10, 30, 300; en nanomolar (nM): 1,3, 10, 30, 300 y en micromolar (μM): 1,3, 10, con el objetivo de realizar una curva dosis respuesta y determinar si el efecto modulador de la ACh es dependiente de la concentración.

Para una mejor representación gráfica y análisis de los datos que incluyen varios órdenes de magnitud, fueron convertidos a escala logarítmica, posteriormente fueron ajustados a una función que describa el efecto regulador de la ACh sobre la corriente.

Para este caso se realizó un ajuste con una función doble de Hill con una R^2 de 0.81, y la cual describe una relación directamente proporcional al aumento de la concentración desde concentraciones picomolares, hasta concentraciones nanomolares, donde llega a su máximo efecto de 57.39%, para posteriormente reducir

el efecto conforme las concentraciones de acetilcolina llegan a niveles micromolares, se obtuvo una concentración efectiva 50 de aproximadamente 10.10 nM y para el caso de la disminución del efecto potenciador tiene una concentración inhibitoria 50 de aproximadamente 643 nM (Gráfica 2).

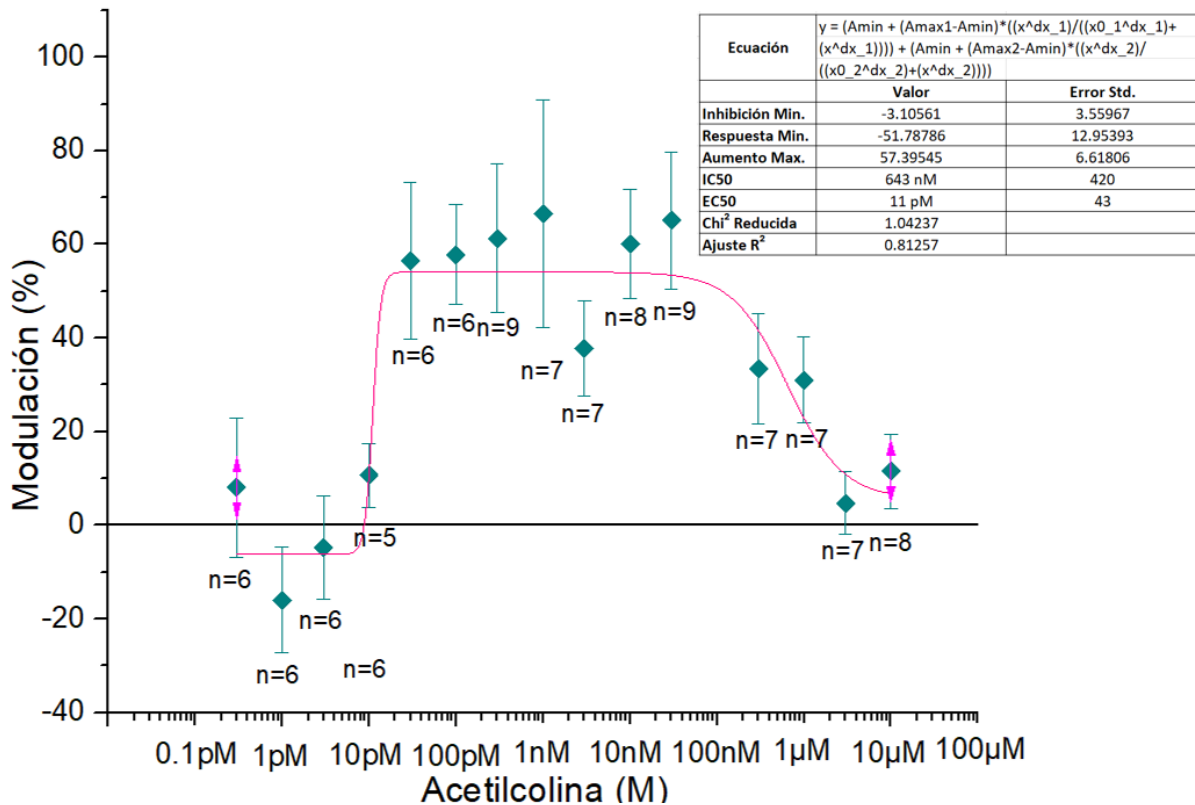


Figura 14. Curva dosis-respuesta del efecto de Acetilcolina sobre la corriente de NMDA, en el cuerpo estriado. Se muestra una curva dosis respuesta del efecto de Acetilcolina a concentraciones molares, en picomolar (pM): 1, 3, 10, 30, 300; en nanomolar (nM) : 1, 3, 10, 30, 300 y en micromolar (μM) 1, 3, 10, 30 y 300) sobre la corriente de NMDA, se observa un aumento del efecto de la acetilcolina relacionado al aumento de la concentración desde concentraciones picomolares [1pM], hasta concentraciones nanomolares [300nM], donde llega a su máximo efecto a una concentración de [10nM], el aumento de la concentración comienza a disminuir en la concentración de [1μM] para disminuir a un mínimo de [10μM].

Una vez obtenida la curva dosis respuesta y debido a que se propone que el efecto potenciador de Acetilcolina sobre la corriente de NMDA se debe a la variabilidad en la composición de los receptores a NMDA en cuanto a subunidades, se realizaron experimentos para investigar si las subunidades NR2A y NR2B desempeñan un papel en este efecto potenciador.

Para dilucidar el papel de la subunidad NR2A, se realizaron experimentos aplicando el antagonista selectivo a la subunidad NR2B, el Ifenprodil, para aislar farmacológicamente a los receptores cuya estequiometría incluyera la subunidad NR2A, para esta fase del experimento se registraron 9 MSNs, los trazos representativos de estos experimentos se encuentran en la figura 15, enumerados según la condición. Primeramente, se estableció que la concentración de acetilcolina 10 nM incrementara la corriente de NMDA en ausencia del coagonista glicina. Se consideró dicha concentración debido a que, como se muestra en la figura 14, ejerce un efecto máximo de aumento sobre la corriente de NMDA, además de que el error

estándar es menor. Se obtuvo un promedio de aumento del $45.11 \pm 8.48\%$, en los trazos representativos se muestra un aumento del 26.11% (Figura 13, trazos 1 y 3 representan los controles y el trazo 2 representa el efecto de ACh 10nM).

En caso de confirmar que existió un incremento, se coaplicó [Ifenprodil 1 μ M] y [NMDA 100 μ M] (Figura 13, trazo 4) para investigar el papel de los receptores de NMDA con subunidades NR2A, encontrándose que reduce la corriente con un promedio del $70.96 \pm 3.62\%$. Para dilucidar el efecto de la acetilcolina sobre los NMDARs con estequiometría mencionada, se añadió al baño [ACh 10nM] (Figura 13, trazo 5), encontrándose un incremento con promedio del $7.21 \pm 6.53\%$ con respecto a su control, en la figura 12 se representa un 10.06% de aumento (Figura 13, trazos 4 y 6).

Una vez determinado el efecto de la acetilcolina 10 nM en las condiciones previamente descritas, se retiró del baño este neurotransmisor, observándose un efecto reversible (Figura 13, trazo 6) con respecto a su control (Figura 13, trazo 4). Posteriormente se lavó el efecto del Ifenprodil (Figura 13, trazo 7), el cual fue parcialmente lavado con respecto al trazo "3". Finalmente, para corroborar que la acetilcolina incrementa la corriente en ausencia de Ifenprodil se coaplicó al final de cada protocolo [NMDA 100 μ M] y [ACh 10nM] (Figura 13, trazos 7 y 9 controles trazo 8 efecto ACh 10nM), notándose en este registro un aumento del 25.06%. Todas las pruebas se realizaron en ausencia del coagonista clásico glicina.

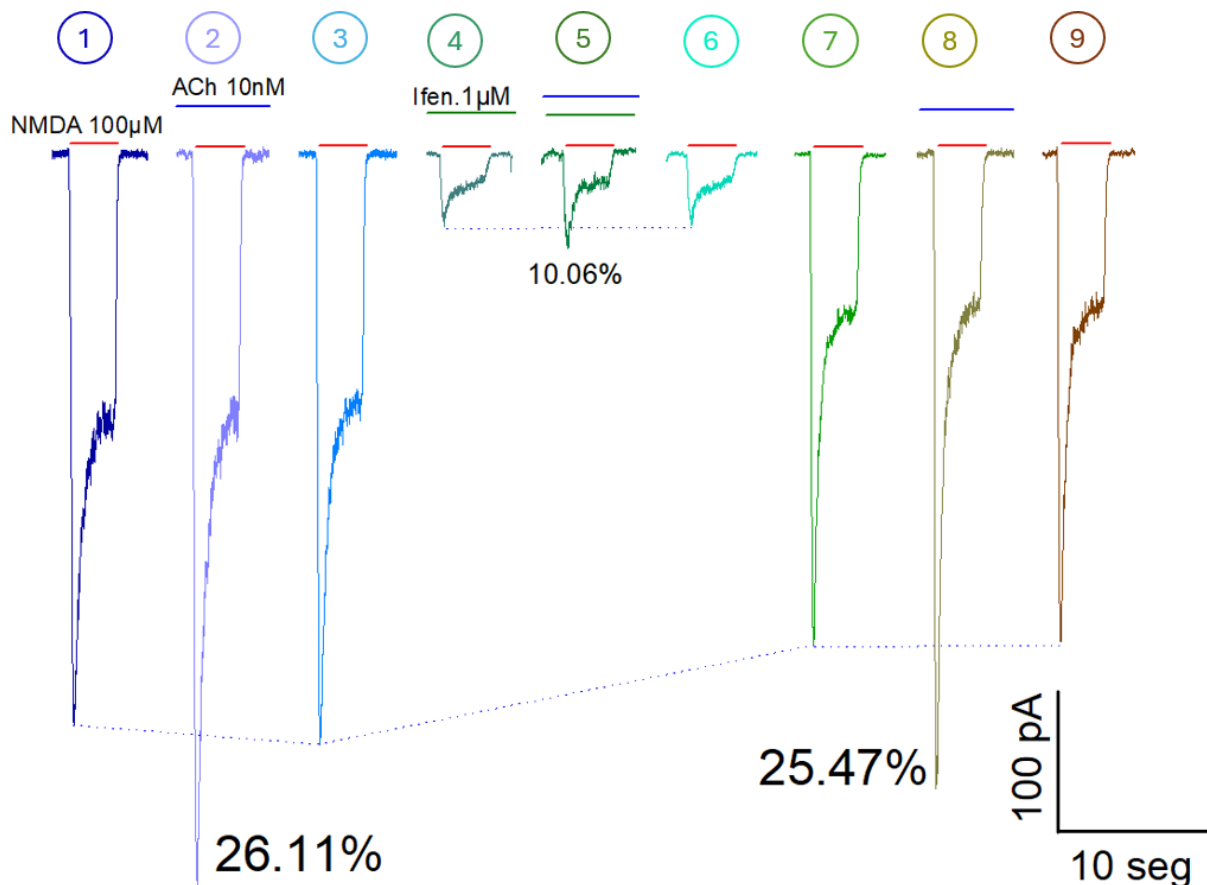


Figura 15. Trazos representativos del efecto de ifenprodil en el aumento generado por ACh sobre la corriente de NMDA en el cuerpo estriado. Cada trazo representa la corriente de NMDA generada por distintas condiciones, indicadas por las líneas horizontales sobre los trazos, y enumeradas.

Para determinar si los efectos anteriores son significativos, se comparó la corriente generada por las diferentes condiciones (Figura 15, 1-9). Para confirmar que existe un aumento de la corriente de NMDA dado por [ACh 10nM] se compararon los picos de ambas condiciones con una prueba *t* de *Student* (Pareada), y se encontró que son estadísticamente diferentes con una $p=0.003$; $t=4.01$; grados de libertad(gl)=8 (Figura 16)

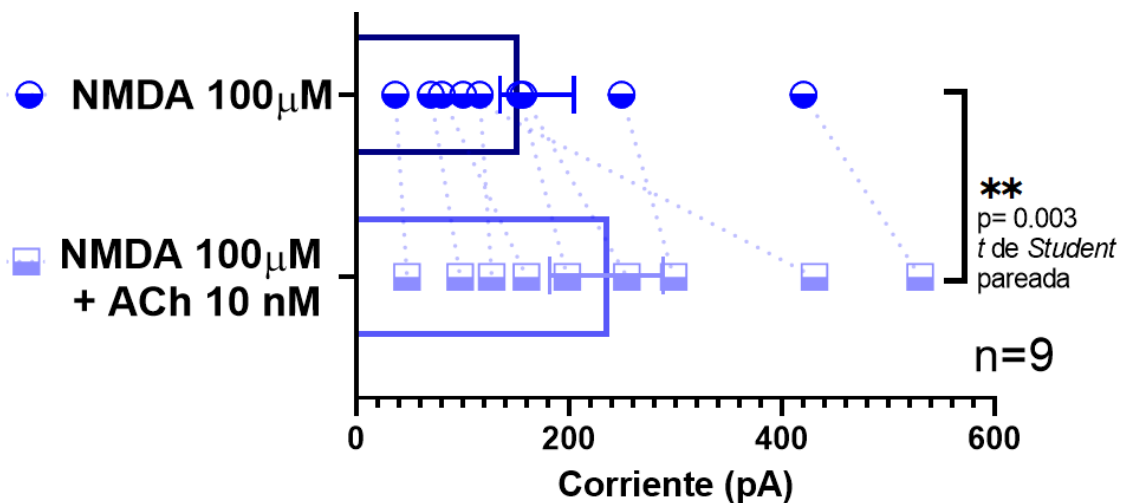


Figura 16. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100 μM, 2) NMDA 100 μM y ACh 10 nM, en el cuerpo estriado. Las barras representan los promedios de los picos con sus respectivos errores estándar, mientras que las formas representan los picos de los trazos individuales. Se observa un aumento de la corriente de NMDA dado por la acetilcolina el cual es significativo dado por una prueba *t* de *Student* (Pareada), ($p=0.003$). Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$ y ns para no significativo.

En segundo lugar, se encontró que el efecto inhibitor del ifenprodil sobre la corriente de NMDA es significativo con una $p=0.005$; $t=3.805$; $gl=8$ (Figura 17, A). Si bien al añadir [ACh 10nM] provocó un aumento, este no fue significativo con una $p=0.305$; $t=1.094$; $gl=8$ (Figura 17, B), finalmente al comparar el efecto de [ACh 10nM] e [Ifenprodil 1 μM y ACh 10nM] sobre la corriente de NMDA se encontró una diferencia significativa con una $p=0.003$; $t=4.154$; $gl=8$ (Figura 17, C). Estas diferencias fueron dadas por una prueba *t* de *Student* pareada.

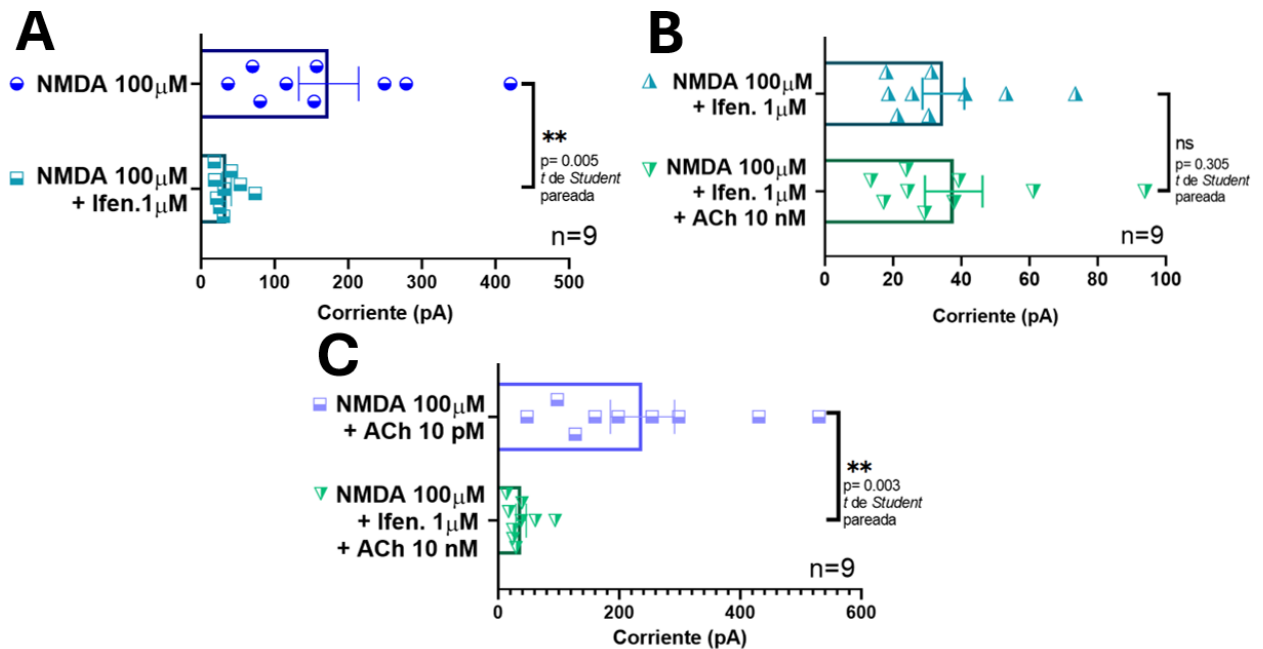


Figura 17. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100 μ M, 2) NMDA 100 μ M y ACh 10nM, 4) NMDA 100 μ M e Ifenprodil 1 μ M, 5) NMDA 100 μ M, Ifenprodil y ACh 10nM, en el cuerpo estriado. Las barras representan los promedios de los picos con sus respectivos errores estándar, mientras que las formas representan los picos de los trazos individuales. Se observa que el ifenprodil disminuye la corriente de NMDA significativamente ($p=0.003$), mientras que la adición de ACh no genera algún cambio significativo ($p=0.305$), y que el efecto de aumento de ACh no se conserva en presencia del ifenprodil. Prueba realizada: “*t*” de Student pareada. Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$ y ns para no significativa.

Finalmente, se comparó el porcentaje de efecto de [ACh 10nM], [Ifenprodil 1 μ M] e [Ifenprodil 1 μ M y ACh 10nM] realizando una prueba ANOVA de 2 vías, obteniendo una diferencia significativa entre los grupos [ACh 10nM] e [Ifenprodil 1 μ M] y grupos [ACh 10nM] e [Ifenprodil 1 μ M y ACh 10nM] con una $p<0.001$ y no se encontró diferencia significativa entre los grupos [Ifenprodil 1 μ M] e [Ifenprodil 1 μ M y ACh 10nM] con una $p=0.995$ (Figura 18).

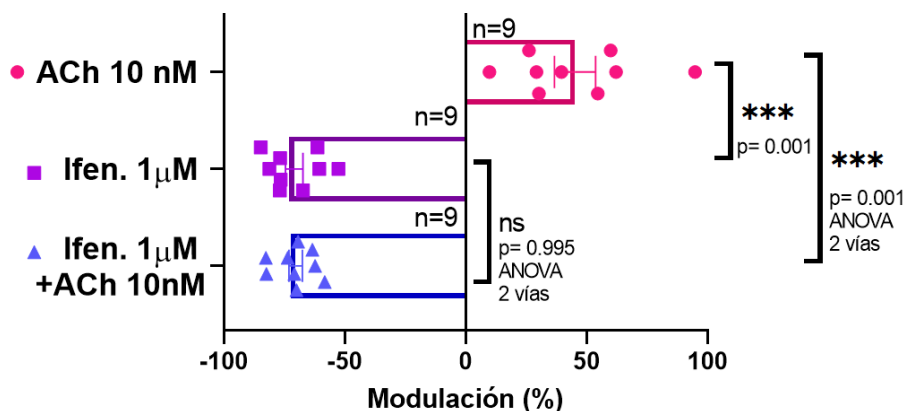


Figura 18. Comparación del efecto (%) sobre la corriente de NMDA de: 1) ACh 10nM, 2) Ifenprodil 1 μ M, 3) Ifenprodil y ACh 10nM, en el cuerpo estriado. Las barras representan los promedios de los porcentajes de efecto con sus respectivos errores estándar. Se observa que la ACh tiene aumenta la corriente de NMDA con un promedio aproximado del $45.11\pm 8.48\%$, mientras que el ifenprodil disminuye la corriente con un promedio del $70.95\pm 3.61\%$ y la ACh en presencia del ifenprodil no genera un cambio significativo ($p=0.995$) realizando una prueba ANOVA de 2 vías. Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$. y ns para no significativa.

Con el objetivo de aislar farmacológicamente los receptores cuya estequiometría incluyera la subunidad NR2B, se realizaron registros en 9 neuronas espinosas medianas de cuerpo estriado los trazos representativos de estos experimentos se encuentran en la figura 19, enumerados según la condición. En primer lugar, se determinó que una concentración de 10 nM de acetilcolina incrementaba la corriente de NMDA en ausencia del coagonista glicina, se registró un incremento del $27.21 \pm 6.05\%$, mientras que en los trazos representativos se observó un aumento del 26.80% (Figura 19, los trazos 1 y 3 representan controles y el trazo 2 representa el efecto de ACh).

En caso de confirmar que existe incremento, se realizaron experimentos utilizando [TCN-201 $1 \mu\text{M}$] antagonista selectivo a las subunidades NR2A, se obtuvo un aumento de la corriente con un promedio del $24.60 \pm 7.71\%$, en la figura se representa un aumento del 40.06% (Figura 19, trazo 4). Para estudiar el efecto de la ACh sobre los NMDARs con la estequiometría deseada, se coaplicó el [TCN-201 $1 \mu\text{M}$] y [ACh 10nM] (Figura 19, trazo 5) encontrándose un aumento con promedio del $19.81 \pm 4.19\%$ sobre el aumento generado por el [TCN-201 $1 \mu\text{M}$], una vez se obtuvo este efecto, se detuvo la aplicación de [ACh 10nM] lo cual restableció el efecto con respecto a su control (Figura 19, trazo 6). Así mismo, se lavó el efecto del TCN-201 el cual fue parcialmente lavado con respecto al control del trazo 3 (Figura 19). Finalmente, para verificar que la ACh conserva el efecto de incremento, se coaplicó, al final de cada protocolo [NMDA $100 \mu\text{M}$] y [ACh 10nM], cuando la célula registrada lo permitiera, en este registro el aumento fue del 40.09%. (Figura 19, trazos 7 y 9 representan controles y el trazo 8 representa el efecto de ACh).

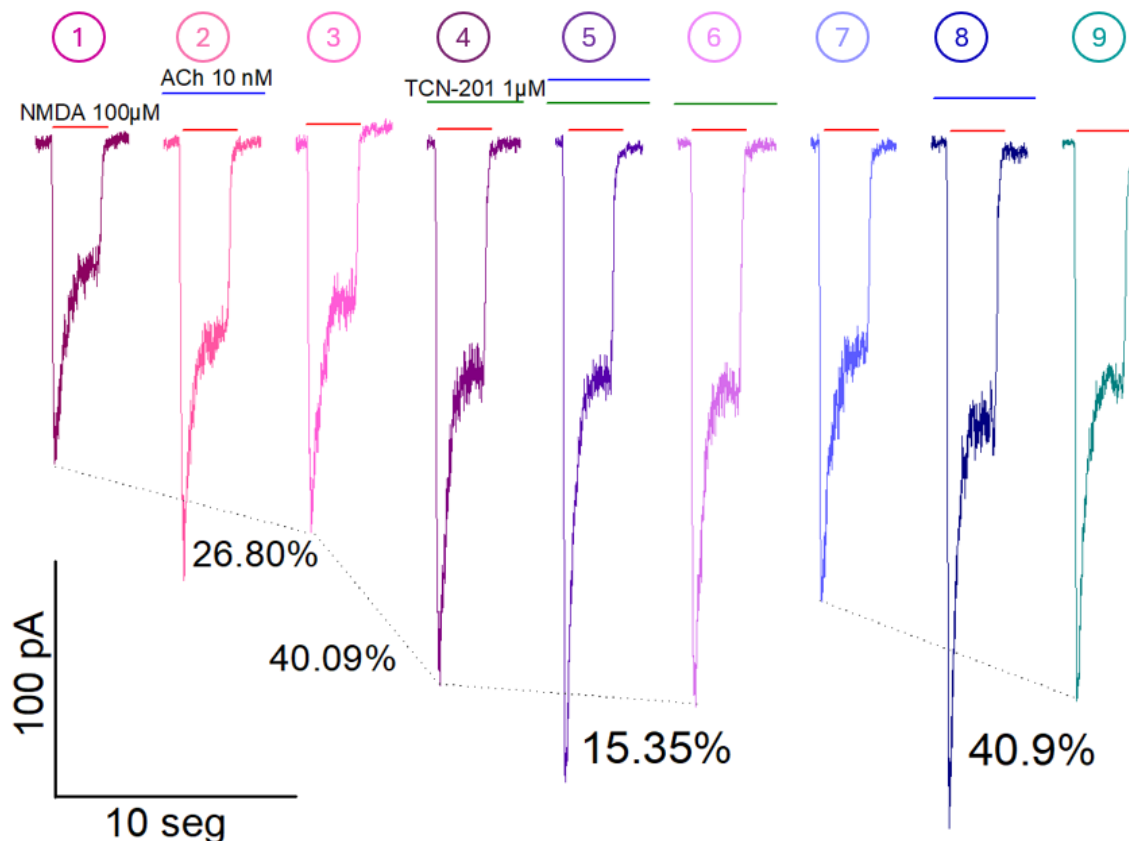


Figura 19. Trazos representativos del efecto de TCN-201 en el aumento generado por ACh sobre la corriente de NMDA en el cuerpo estriado. Cada trazo representa la corriente de NMDA generada por distintas condiciones, indicadas por las líneas horizontales sobre los trazos, y enumeradas.

Con el fin de evaluar si los efectos observados son significativos, se comparó la corriente generada bajo las distintas condiciones experimentales (Figura 19, 1-9). Para verificar el aumento en la corriente de NMDA provocado por [ACh 10 nM], se analizaron los picos de ambas condiciones mediante una prueba *t* de *Student* pareada, la cual arrojó una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p=0.004$; $t=4.468$; $gl=8$ (Figura 20).

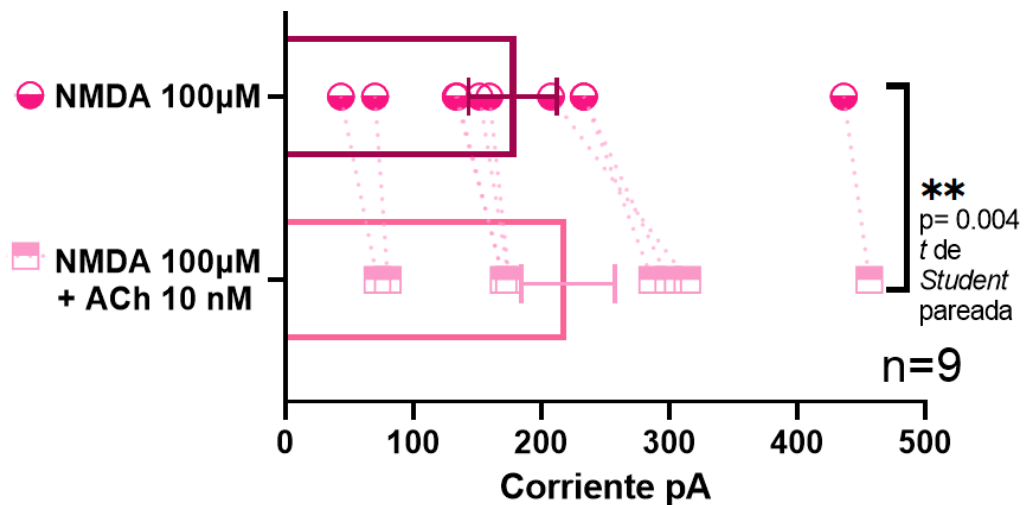


Figura 20. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10nM, en el cuerpo estriado. Las barras representan los promedios de los picos con sus respectivos errores estándar, mientras que las formas representan los picos de los trazos individuales. Se observa un aumento de la corriente de NMDA dado por la acetilcolina el cual es significativo dado por una prueba *t* de *Student* ($p=0.004$). Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$ y ns para no significativo.

En segundo lugar, se determinó si el efecto del TCN-201 sobre la corriente de NMDA es significativo, y si bien se puede observar un aumento, este no fue significativo al aplicar una prueba “*t*” de *Student*, arrojando una $p=0.342$; $t=1.009$; $gl=8$ (Figura 21, A). Sin embargo, al aplicar [ACh 10 nM] produjo un aumento significativo, con una $p=0.03$; $t=2.598$; $gl=8$ (Figura 21, B). Por último, al comparar el efecto de [ACh 10 nM] con el de [TCN-201 1 µM y ACh 10 nM] sobre la corriente de NMDA, no se obtuvo una diferencia significativa con una $p=0.629$; $t=0.5018$; $gl=8$ (Figura 21, C). Estas diferencias se determinaron mediante una prueba *t* de *Student*, previa verificación de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk.

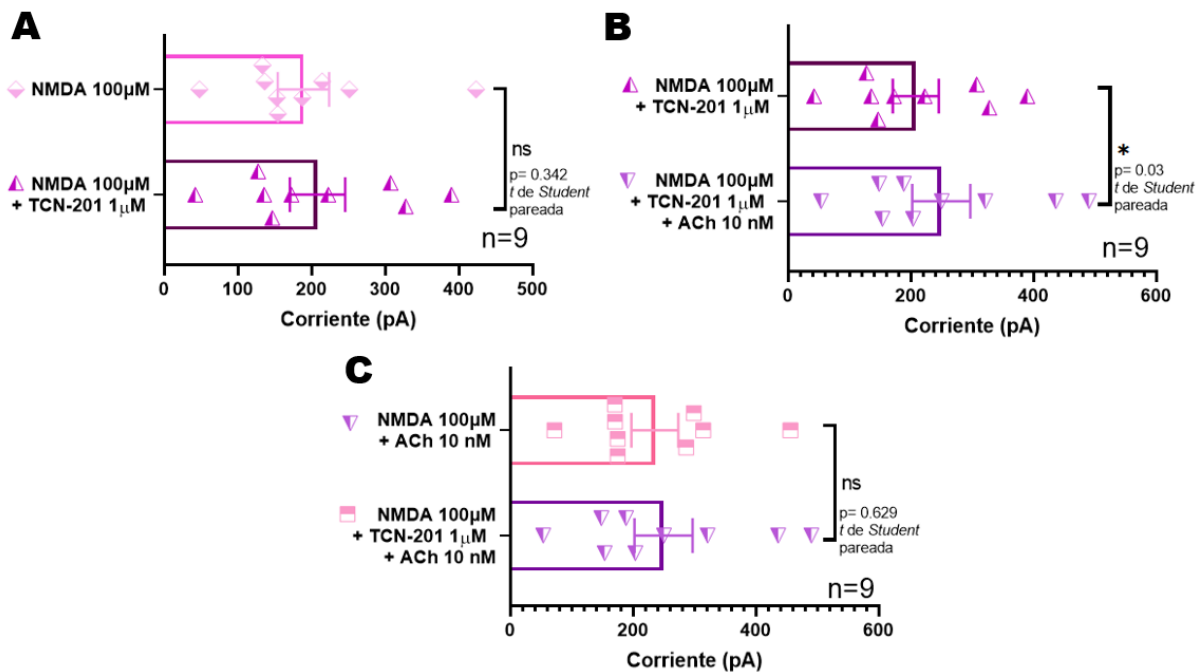


Figura 21. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10nM, 4) NMDA 100µM y TCN-201 1µM, 5) NMDA 100µM, TCN-201 µM y ACh 10nM, en el cuerpo estriado. Las barras representan los promedios de los picos con sus respectivos errores estándar, mientras que las formas representan los picos de los trazos individuales. Se observa que el aumento de TCN-201 sobre corriente de NMDA no es significativo ($p=0.342$), mientras que la adición de ACh genera un aumento significativo ($p=0.031$) sobre el aumento generado por TCN-201 y que las corrientes generadas por NMDA 100µM+ ACh 10nM y NMDA 100µM+TCN-201 1µM+ACh 10nM no son significativamente diferentes $p=0.629$. Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$ y ns para no significativa.

Finalmente, se compararon los porcentajes de efecto de [ACh 10 nM], [TCN-201 1 µM] y [TCN-201 1 µM y ACh 10 nM] mediante una prueba ANOVA de 2 vías. Los análisis mostraron que no existe diferencia significativa entre ninguno de los grupos $p=0.961$, $p=0.346$ y $p=0.485$ (Figura 22).

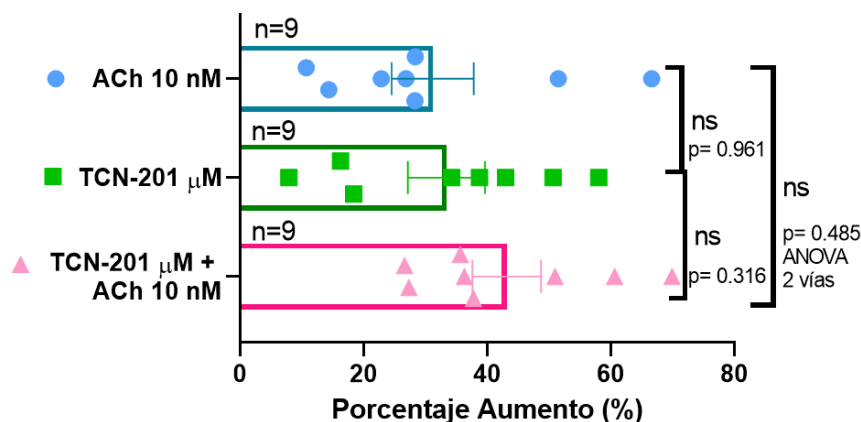


Figura 22. Comparación del efecto (%) sobre la corriente de NMDA de: 1) ACh 10nM, 2) TCN-201 1µM, 3) TCN-201 1µM y ACh 10nM, en el cuerpo estriado. Las barras representan los promedios de los porcentajes de efecto con sus respectivos errores estándar. Se observa que la ACh tiene un aumento de la corriente de NMDA con un promedio del $27.21\pm6.05\%$ mientras que el TCN-201 aumenta la corriente con un promedio del $24.6\pm7.71\%$ y la ACh en presencia del TCN-201 genera un aumento adicional con promedio del $19.82\pm4.19\%$. Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$ y ns para no significativa.

11.2 En la corteza prefrontal

Se registraron un total de 62 neuronas piramidales (NPs) de la corteza prefrontal de ratas de la cepa Wistar. A partir de los datos obtenidos, se construyó un histograma de distribución de capacitancias. Las capacitancias registradas oscilaron entre 7 y 22 pF, con un promedio de 12.08 ± 0.41 . Los datos se ajustaron a una curva gaussiana con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.958, lo que sugiere una distribución normal (Figura 23).

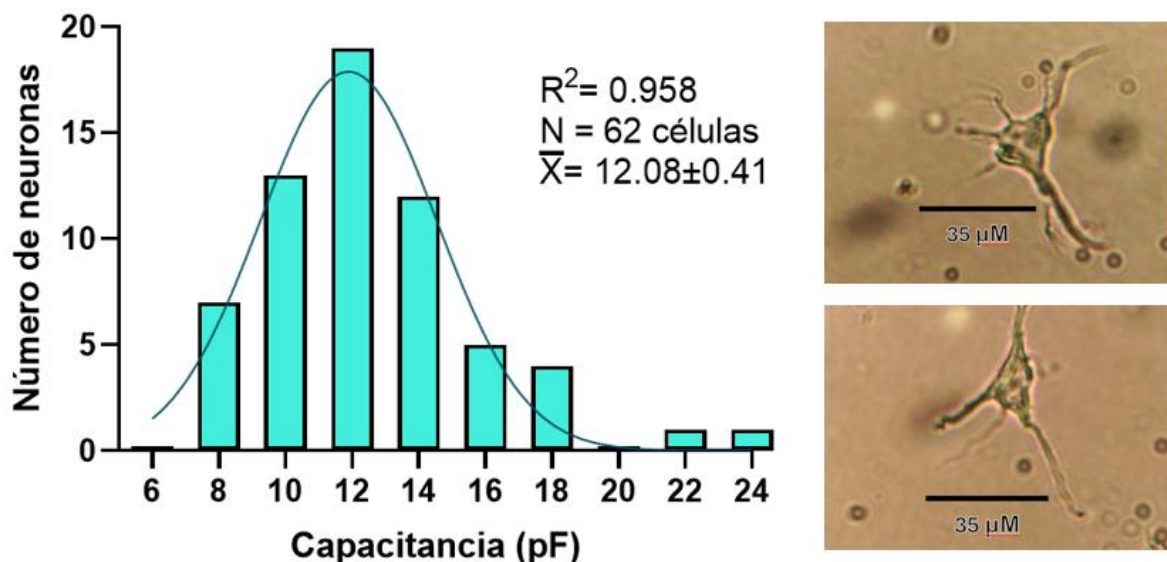


Figura 23. Histograma de las capacitancias celulares obtenidas de 62 neuronas piramidales de la corteza prefrontal. Este parámetro fue registrado antes de aplicar algún protocolo electrofisiológico. Se obtuvo la capacitancia (en picofaradios) de 62 neuronas y se les aplicó un ajuste de Gauss con una $R^2 = 0.958$. A la derecha se muestran micrografías representativas de NPs registradas.

Capacitancia registrada	Radio en micrómetros	Equivalencia utilizada
7	39.34	<p>Tomando en cuenta a la capacitancia como una constante biológica que equivale aproximadamente a 1 picofaradio por 5.6 micrómetros de diámetro, si se considera a la neurona como una esfera, sin embargo, este cálculo no es exacto ya que solo se toma en cuenta los somas celulares y las dendritas suman superficie al tamaño de la célula y por lo tanto suman al valor de la capacitancia.</p>
8	44.96	
9	50.58	
10	56.2	
11	61.82	
12	67.44	
13	73.06	
14	78.68	
15	84.3	
18	101.16	
21	118.02	
23	129.26	

Tabla 12. Equivalencia de capacitancias a micrómetros en la corteza prefrontal. Se tabularon los valores registrados de capacitancia y se convirtieron a micrómetros utilizando la equivalencia de 1 picofaradio por 5.6 micrómetros de diámetro, si se considera a la neurona como una esfera, sin embargo, este cálculo no es exacto ya que solo se toma en cuenta los somas celulares y las dendritas suman superficie al tamaño de la célula y por lo tanto suman al valor de la capacitancia.

Para evaluar la viabilidad celular, se aplicó a cada NP un protocolo de rampa de voltaje. La presencia de corrientes de sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) se consideró

indicativa de la viabilidad de la membrana celular, ya que refleja la capacidad de la célula para resistir y regular cambios de voltaje (Arroyo-Ríos, 2021). Sólo las NPs que presentaron dichas corrientes fueron seleccionadas para aplicar protocolos electrofisiológicos adicionales (Figura 24).

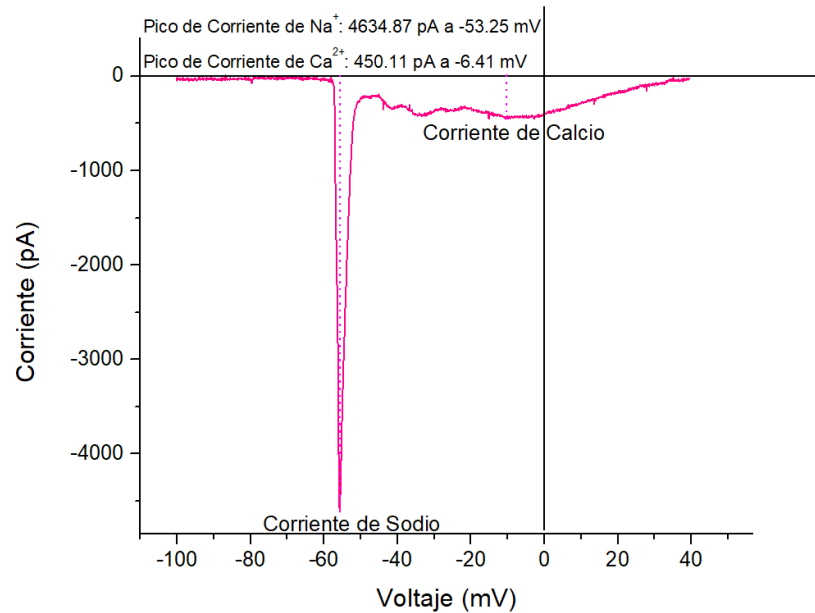


Figura 24. Trazo representativo de las corrientes de Na⁺ y Ca²⁺ obtenidas por el protocolo de RAMPA en la corteza prefrontal.

En la siguiente etapa del experimento, se registraron las NPs mediante la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa. Se aplicó NMDA a una concentración de 100 μM , en ausencia de glicina, junto con acetilcolina a concentraciones que abarcaron diferentes órdenes de magnitud: en femtomolar (fM): 3, 10, 30, 100, 300; en picomolar (pM): 1,3, 10, 30, 100, 300; en nanomolar (nM): 1,3, 10, 30, 100, 300 y en micromolar (μM): 1,3, 10. Esto permitió construir una curva dosis-respuesta para determinar si el efecto modulador de la ACh depende de su concentración. Los datos se convirtieron a escala logarítmica para facilitar el análisis y se ajustaron a una función que describe el efecto regulador de la ACh sobre la corriente (Gráfica 8). Se realizó un ajuste con una función doble de Hill, obteniendo un R^2 de 0.95. Los resultados indicaron que la ACh provoca un efecto directamente proporcional al aumento de su concentración desde niveles femtomolares hasta picomolares, alcanzando un efecto máximo del 82.97%. Posteriormente, el efecto disminuye conforme las concentraciones de ACh alcanzan niveles nanomolares y micromolares. Se calculó una concentración efectiva 50 (EC50) de aproximadamente 648 fM y una concentración inhibitoria 50 (IC50) de 202 nM para la reducción del aumento (Figura 25).

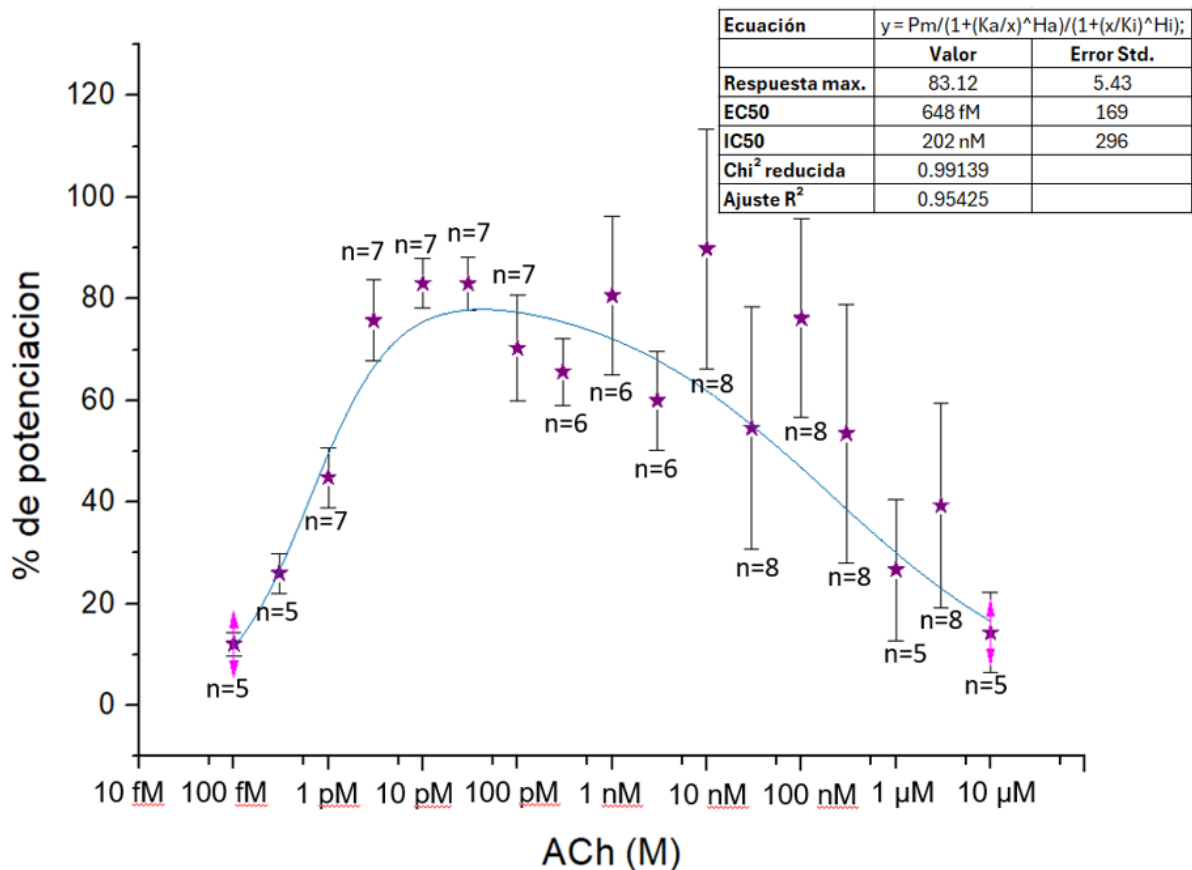


Figura 25. Curva dosis-respuesta del efecto de Acetilcolina sobre la corriente de NMDA en la corteza prefrontal. Se muestra una curva dosis respuesta del efecto de Acetilcolina a concentraciones molares, en femtomolar (fM): 3, 10, 30, 100, 300; en picomolar (pM): 1,3, 10, 30, 100, 300; en nanomolar (nM): 1,3, 10, 30, 100, 300 y en micromolar (μM): 1,3, 10 sobre la corriente de NMDA, se observa un aumento del efecto de la acetilcolina relacionado al aumento de la concentración desde concentraciones femtomolares [100fM], hasta concentraciones picomolares [300nM], donde llega a su máximo efecto a una concentración de [10 pM], el aumento de la concentración comienza a disminuir en la concentración de [30 nM] para disminuir a un mínimo de 7.91% de aumento en [10μM].

Dado que se plantea que el efecto potenciador de la ACh sobre la corriente de NMDA depende de la composición de las subunidades de los receptores, se realizaron experimentos para evaluar el papel de las subunidades NR2A y NR2B.

Para estudiar la subunidad NR2A, se empleó ifenprodil, un antagonista selectivo de la subunidad NR2B, con el objetivo de aislar receptores que incluyeran NR2A en su estequiometría los trazos representativos de estos experimentos se encuentran en la figura 15, enumerados según la condición. Se registraron 9 NPs y se estableció que una concentración de ACh de 10 pM incrementaba la corriente de NMDA en ausencia de glicina, con un aumento promedio del $58.72 \pm 7.32\%$ (Figura 26, trazos 1 y 3 representan controles y el trazo 2 representa el efecto de ACh). Posteriormente, se coaplicaron [Ifenprodil 1 μM] y [NMDA 100 μM], lo que resultó en una reducción de la corriente promedio del $57.77 \pm 2.99\%$ (Figura 26, trazo 4). Al añadir ACh (10 pM) a esta condición, se observó una ligera disminución promedio del $3.51 \pm 4.21\%$, mientras que los trazos representativos mostraron un incremento del 0.52% (Figura 26, trazo 5).

Tras retirar ACh, el efecto fue reversible (Figura 26, trazo 6), y el lavado del ifenprodil fue parcial respecto al control (Figura 26, trazo 7). Finalmente, para verificar que ACh incrementa la corriente en ausencia de ifenprodil, se coaplicaron nuevamente [NMDA 100 μ M] y [ACh 10 pM], observándose un aumento del 43.91% (Figura 26, trazos 7 y 9 representan controles y el trazo 8 representa el efecto de ACh).

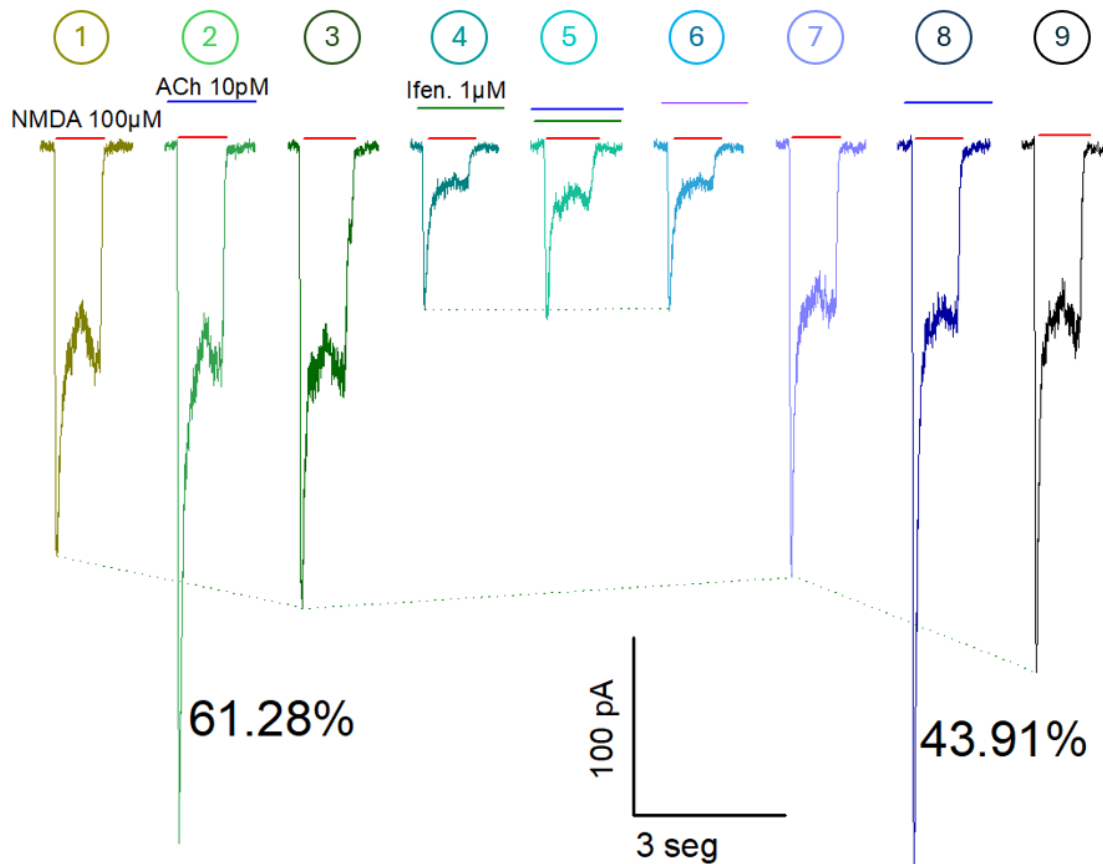


Figura 26. Trazos representativos del efecto de ifenprodil en el aumento generado por de ACh sobre la corriente de NMDA en la corteza prefrontal. Cada trazo representa la corriente de NMDA generada por distintas condiciones, indicadas por las líneas horizontales sobre los trazos, y enumeradas.

El análisis estadístico mediante una prueba *t* de *Student* pareada confirmó que el aumento de la corriente de NMDA inducido por ACh (10 pM) fue significativo ($p=0.01$; $t=3.213$; $gl=8$; *t* de *Student* pareada) (Figura 27). Asimismo, el efecto inhibitor de ifenprodil sobre la corriente de NMDA también fue significativo ($p<0.001$; $t=0.4954$; $gl=8$; *t* de *Student* pareada) (Figura 28, A). Sin embargo, el aumento observado al añadir [ACh 10 pM] no fue estadísticamente significativo ($p=0.633$, *t* de *Student* pareada) (Figura 28, B). Al comparar los efectos de [ACh 10 pM] e [ifenprodil 1 μ M + ACh 10 nM], se encontró una diferencia significativa ($p=0.003$, $t=7.02$, $df=8$ *t* de *Student* pareada) (Figura 28, C).

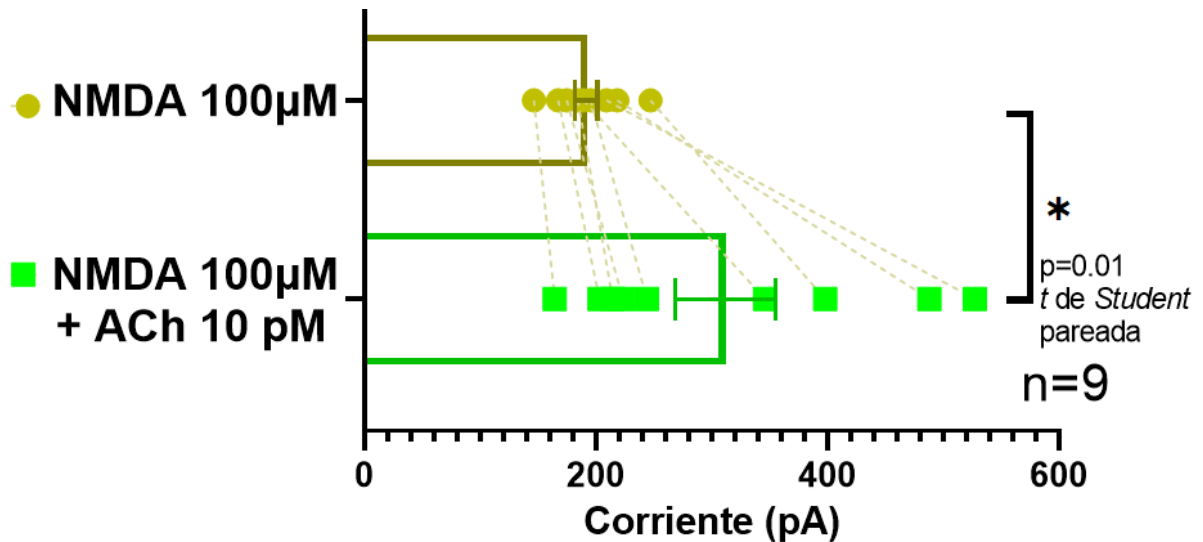


Figura 27. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10pM, en la corteza prefrontal. Las barras representan los promedios de los picos con sus respectivos errores estándar, mientras que las formas representan los picos de los trazos individuales. Se observa un aumento de la corriente de NMDA dado por la acetilcolina el cual es significativo dado por una prueba *t* de *Student* (Pareada), ($p=0.01$). Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$ y ns para no significativo.

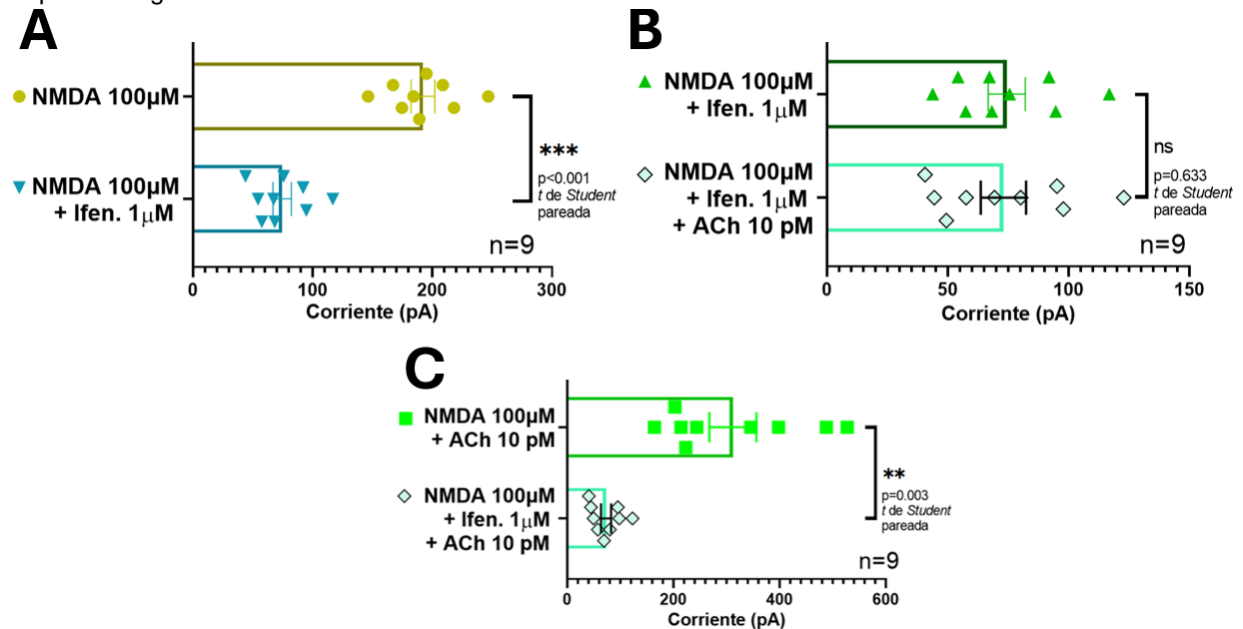


Figura 28. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100µM, 2) NMDA 100µM y ACh 10pM, 4) NMDA 100µM e Ifenprodil 1µM, 5) NMDA 100µM, Ifenprodil y ACh 10pM, en la corteza prefrontal. Las barras representan los promedios de los picos con sus respectivos errores estándar, mientras que las formas representan los picos de los trazos individuales. Se observa que el ifenprodil disminuye la corriente de NMDA significativamente ($p<0.001$), mientras que la adición de ACh no genera algún cambio significativo ($p=0.633$), y que el efecto de aumento de ACh no se conserva en presencia del ifenprodil. Prueba realizada: *t* de *Student* (Pareada). Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$ y ns para no significativo.

Se utilizó una prueba ANOVA de dos vías para comparar los efectos de [ACh 10 nM], [Ifenprodil 1 μ M] y [Ifenprodil 1 μ M + ACh 10 pM]. Hubo diferencias significativas entre [ACh 10 pM] y los otros dos grupos ($p < 0.001$), pero no entre [Ifenprodil 1 μ M] y [Ifenprodil 1 μ M + ACh 10 pM] ($p = 0.994$, Figura 29).

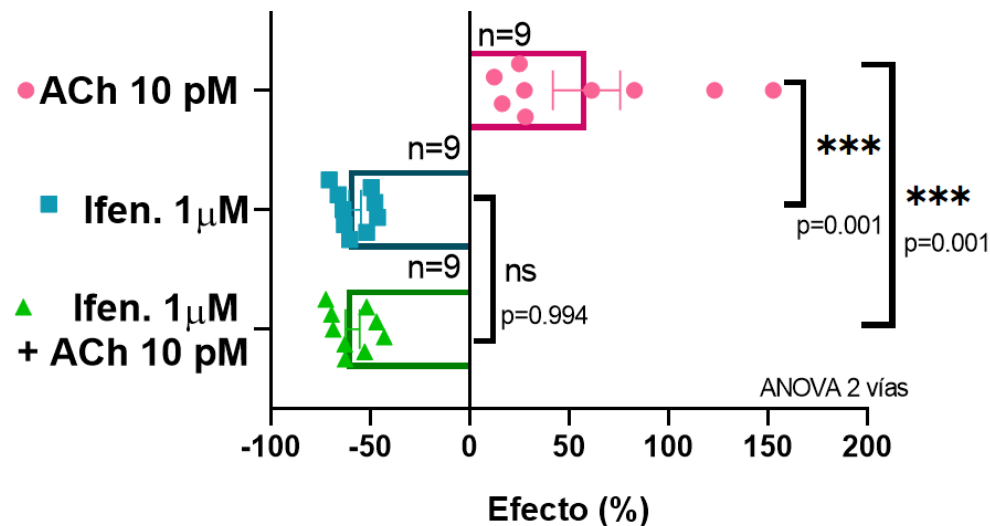


Figura 29. Comparación del efecto (%) sobre la corriente de NMDA de: 1) ACh 10pM, 2) Ifenprodil 1 μ M, 3) Ifenprodil y ACh 10 pM, en la corteza prefrontal. Las barras representan los promedios de los porcentajes de efecto con sus respectivos errores estándar. Se observa que la ACh tiene un aumento de la corriente de NMDA con un promedio aproximado del $58.72 \pm 7.32\%$, mientras que el ifenprodil disminuye la corriente con un promedio del $57.77 \pm 2.99\%$ y la ACh en presencia del ifenprodil no genera un cambio significativo ($p = 0.994$) realizando una prueba ANOVA de 2 vías. Los asteriscos representan la significancia al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p < 0.05$ (**) para $p < 0.005$ y (***) para $p < 0.001$ y ns para no significativo.

Para analizar el papel de las subunidades NR2B, se registraron 9 NPs, los trazos representativos de estos experimentos se encuentran en la figura 15, enumerados según la condición. Se determinó que una concentración de 10 pM de ACh incrementaba la corriente de NMDA en ausencia de glicina, con un aumento promedio del $59.48 \pm 17.82\%$ (Figura 30, trazos 1, 3 representan controles y el trazo 2 representa el efecto de ACh). Utilizando [TCN-201 1 μ M], un antagonista selectivo de la subunidad NR2A, se obtuvo un aumento promedio de la corriente del $18.86 \pm 6.27\%$ (Figura 30, trazo 4). Al coaplicar [TCN-201 1 μ M] y [ACh 10 nM], se observó un incremento adicional promedio del $27.90 \pm 2.99\%$ (Figura 30, trazo 5), que se revirtió tras retirar ACh (Figura 30, trazo 6). Finalmente, se coaplicaron [NMDA 100 μ M] y [ACh 10 nM] al final de cada protocolo, con un aumento registrado en la figura representativa del 48.34% (Figura 30, trazos 7, 9 representan controles y el trazo 8 representa el efecto de ACh).

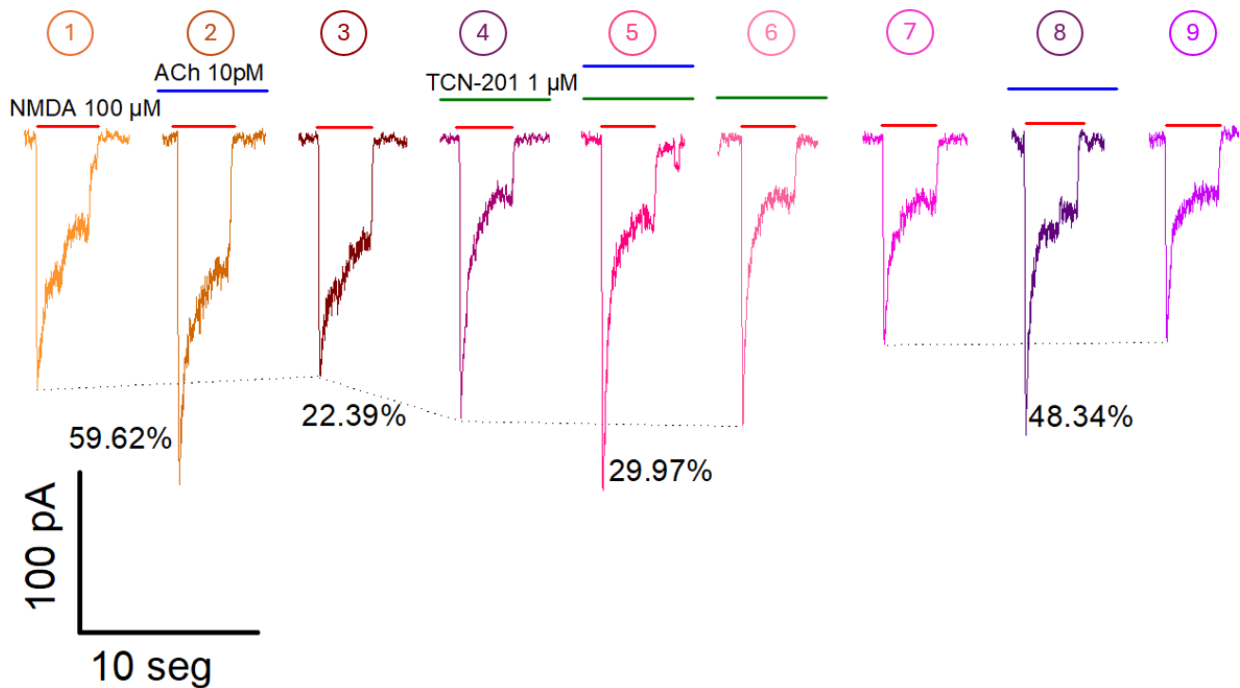


Figura 30. Trazos representativos del efecto de TCN-201 en la potenciación de ACh sobre la corriente de NMDA en la corteza prefrontal. Cada trazo representa la corriente de NMDA generada por distintas condiciones, indicadas por las líneas horizontales sobre los trazos, y enumeradas.

Para determinar si los efectos observados son significativos, se comparó la corriente generada bajo las distintas condiciones experimentales (Figura 30, 1-9). El aumento en la corriente de NMDA inducido por [ACh 10 pM] se analizó mediante una prueba *t* de *Student* (Pareada), que mostró una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p=0.002$; $t=3.936$; $gl=8$ (Figura 31).

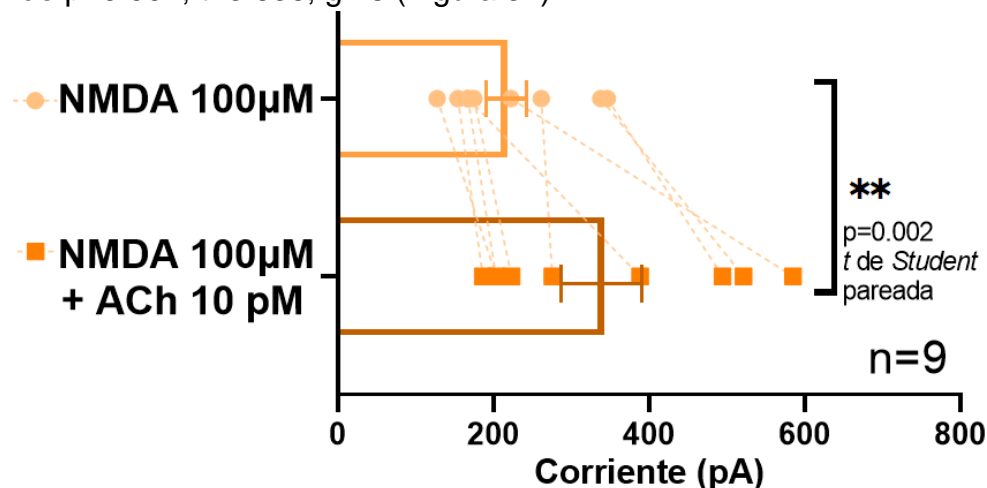


Figura 31. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100 μM, 2) NMDA 100 μM y ACh 10 pM, en la corteza prefrontal. Las barras representan los promedios de los picos con sus respectivos errores estándar, mientras que las formas representan los picos de los trazos individuales. Se observa un aumento de la corriente de NMDA dado por la acetilcolina el cual es significativo dado por una prueba *t* de *Student* (Pareada) ($p=0.002$). Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$ y ns para no significativo.

En segundo lugar, se evaluó si el efecto del TCN-201 sobre la corriente de NMDA era significativo. Aunque se observó un aumento, este no resultó significativo al aplicar una prueba *t* de *Student* (Pareada), ($p=0.152$; $t=1.580$; $gl=8$ Figura 32, A). Sin embargo, la adición de [ACh 10 pM] generó un aumento estadísticamente significativo con una $p=0.002$; $t=4.305$; $gl=8$ (prueba *t* de *Student* pareada; Figura 32, B). Por último, al comparar el efecto de [ACh 10 pM] con el de [TCN-201 1 μ M y ACh 10 pM] sobre la corriente de NMDA, no se encontraron diferencias significativas, obteniendo una $p=0.933$; $t=0.08564$; $gl=8$ (prueba *t* de *Student* pareada; Figura 32, C). Todas estas comparaciones se realizaron utilizando una prueba *t* de *Student* (Pareada).

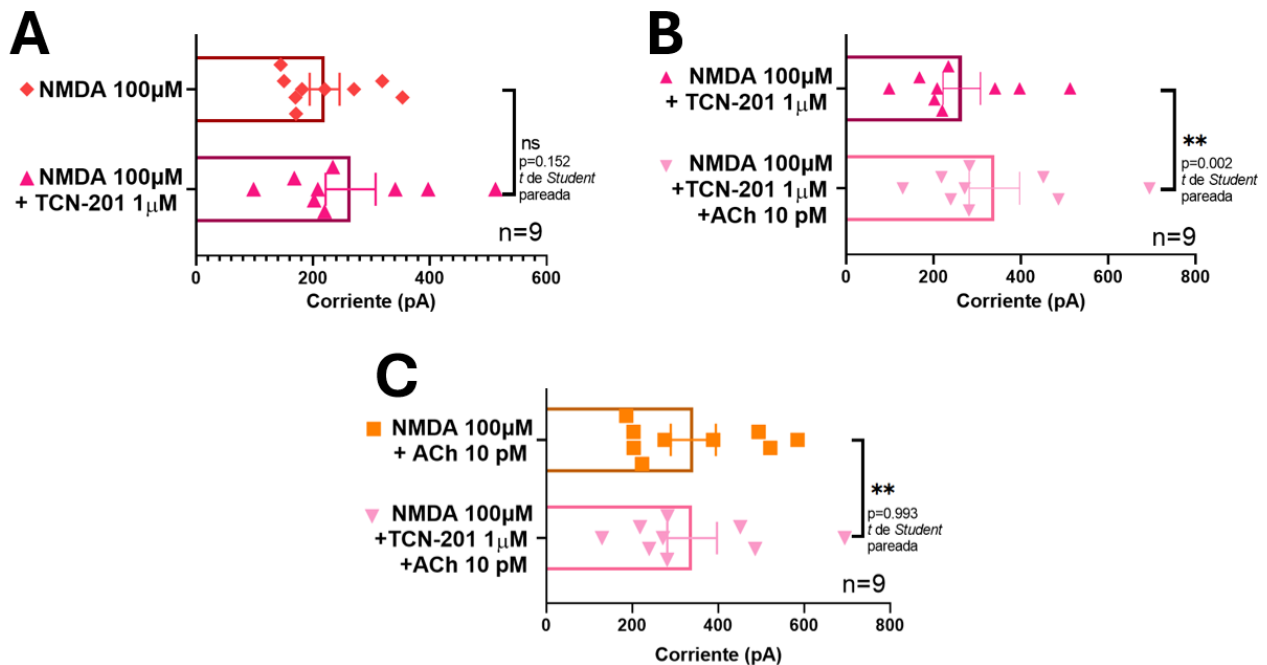


Figura 32. Comparación de las corrientes generadas por la aplicación de: 1) NMDA 100 μ M, 2) NMDA 100 μ M y ACh 10pM, 4) NMDA 100 μ M y TCN-201 1 μ M, 5) NMDA 100 μ M, TCN-201 1 μ M y ACh 10pM, en la corteza prefrontal. Las barras representan los promedios de los picos con sus respectivos errores estándar, mientras que las formas representan los picos de los trazos individuales. Se observa que si bien el TCN-201 provoca un aumento este no es significativo ($p=0.152$), mientras que la adición de ACh genera un aumento significativo ($p=0.003$), y que las corrientes generadas por NMDA 100 μ M+ ACh 10nM y NMDA 100 μ M+TCN-201 1 μ M+ACh 10nM no son significativamente diferentes $p=0.933$. Los asteriscos representan la significancias al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p<0.05$ (**) para $p<0.005$ y (***) para $p<0.001$ y ns para no significativa.

Finalmente, se analizaron los porcentajes de efecto de [ACh 10 pM], [TCN-201 1 μ M] y [TCN-201 1 μ M y ACh 10 pM] mediante una prueba ANOVA de dos vías. Los resultados indicaron que hubo una diferencia significativa entre el efecto de [ACh 10 pM] y [TCN-201 1 μ M] ($p=0.01$) y entre [TCN-201 1 μ M] y [TCN-201 1 μ M y ACh 10 pM] ($p=0.006$), mientras que no hubo diferencia entre de [ACh 10 pM] y [TCN-201 1 μ M y ACh 10 pM] ($p=0.971$) (Figura 33).

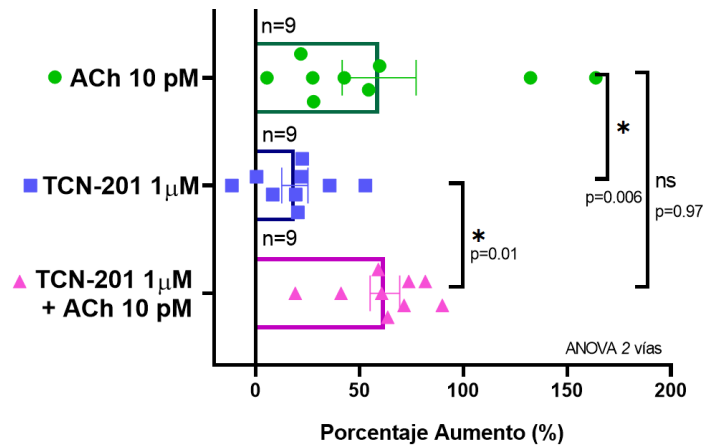


Figura 33. Comparación del efecto (%) sobre la corriente de NMDA de: 1) ACh 10pM, 2) TCN-201 1µM, 3) TCN-201 y ACh 10 pM, en la corteza prefrontal. Las barras representan los promedios de los porcentajes de efecto con sus respectivos errores estándar. Se observa que la ACh tiene un aumento de la corriente de NMDA con un promedio aproximado del $59.48 \pm 17.82\%$, mientras que el TCN-201 aumenta la corriente con un promedio del $18.86 \pm 6.27\%$ y la ACh en presencia del TCN-201 genera un aumento del $27.90 \pm 2.99\%$ sobre el aumento de TCN-201. Los asteriscos representan la significancia al realizar las pruebas estadísticas: (*) para $p < 0.05$ (**) para $p < 0.005$ y (***) para $p < 0.001$ y ns para no significativo.

Para finalizar este apartado se resumieron los resultados en la figura 34.

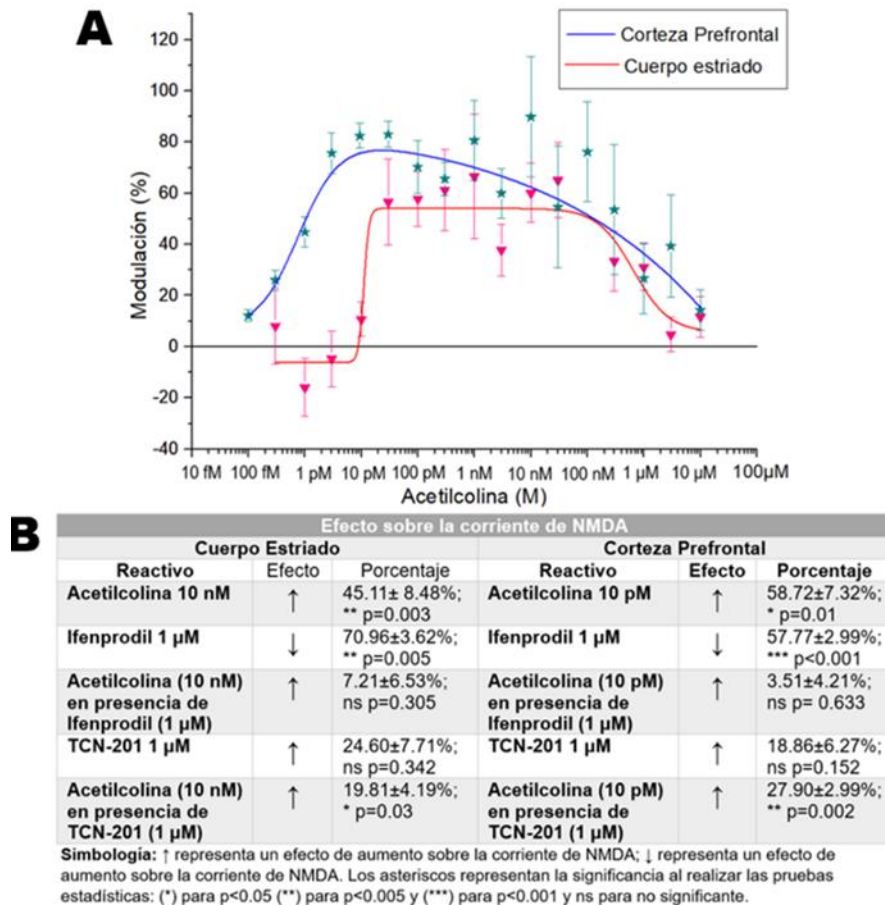


Figura 34. Resumen de los resultados. A) Se resumen los resultados de las curvas dosis respuesta del efecto de ACh sobre la corriente de NMDA, en azul en la corteza prefrontal, y en rojo del cuerpo estriado. Se observa que en la corteza prefrontal el efecto de aumento comienza a una concentración más baja (100 fM) que en el estriado (10 pM). B) Se resumen los resultados al coaplicar ACh y los diferentes agonistas de subunidades del receptor a NMDA Ifenprodil para la subunidad NR2B y TCN-201 para la subunidad NR2A.

12. DISCUSIÓN

La modulación de los receptores de NMDA puede estar relacionada con la regulación de la plasticidad sináptica, un proceso importante para el aprendizaje y la memoria. En este estudio, se evaluó el efecto de aumento que ejerce ACh sobre la corriente mediada por receptores NMDA en dos regiones del cerebro: el cuerpo estriado y la corteza prefrontal. Se utilizó una curva dosis-respuesta para caracterizar este efecto y se investigó la contribución específica de las subunidades NR2A y NR2B mediante el uso de antagonistas selectivos.

Los resultados no solo confirman el papel de la ACh en la regulación de la actividad de los receptores NMDA, sino que también revelan diferencias funcionales entre las dos regiones estudiadas.

En el cuerpo estriado

El cuerpo estriado, está implicado en el control motor y los procesos de aprendizaje, mostró una respuesta dual a la modulación por acetilcolina (ACh) sobre los receptores NMDA.

Primeramente, la capacitancia que se registró en el presente trabajo coincide con lo descrito en estudios previos para las MSNs en el protocolo de registro en célula completa (Surmeier *et al.*, 1995; Mermelstein *et al.*, 1996).

Este efecto que muestra la ACh dependiendo de su concentración puede explicarse ya que a concentraciones menores, en el rango picomolar, el receptor puede no tener la concentración necesaria de ACh para provocar el efecto potenciador, los resultados muestran que las concentraciones en el orden de magnitud nanomolar generan un incremento en la corriente de NMDA del estriado, mientras que las concentraciones mayores en el orden de magnitud micromolar parecen disminuir el efecto potenciador, esto podría explicarse por una saturación del NMDAr lo que provocaría una menor actividad o por la activación de receptores nicotínicos o muscarínicos, ya que se ha reportado que agonistas nicotínicos y muscarínicos tienen un efecto inhibitor sobre la corriente de NMDA, sin embargo estos efectos no pueden explicarse por acción sobre dichos receptores, ya que no se han observado corrientes iónicas activadas por ACh o nicotina, además de que el bloqueo de los sistemas metabotrópicos asociados a proteínas G no disminuyen el efecto de ACh (Flores-Hernández *et al.*, 2009). Los resultados de la curva dosis respuesta confirman estudios anteriores que reportaron un aumento de la actividad del receptor de NMDA en presencia de ACh, en estos estudios se utilizaron concentraciones altas de ACh o agonistas colinérgicos (10 nM, 1 μ M, 100 μ M, 1mM), concentraciones que en esta tesis disminuyeron la actividad potenciadora de la ACh sobre la corriente activada por NMDA. Sin embargo, es importante destacar que este trabajo utilizamos neuronas agudamente disociadas de cuerpo estriado, en específico neuronas medianas, logrando un control de las soluciones en el sistema de registro. Esto difiere de lo reportado como actividad de

disparo de neuronas en rebanadas de hipocampo (Bali *et al.*, 2017), registro en rebanada de hipocampo (Dennis *et al.*, 2016) y medición de liberación de Calcio en el núcleo accumbens (Zapettini *et al.*, 2014).

Para definir la contribución de las subunidades NR2A y NR2B en la modulación de ACh en la corriente generada por el NMDAr se utilizaron antagonistas selectivos (ifenprodil para NR2B y TCN-201 para NR2A). Se observó que la presencia de ifenprodil redujo la corriente de NMDA, con un promedio del -70.95%, mientras que la coaplicación con ACh conservó la inhibición generada por el Ifenprodil con un promedio del -70.41% lo cual no es estadísticamente diferente a la aplicación sola de ifenprodil, por lo que el aumento generado por ACh se pierde estando en presencia de ifenprodil. Tomando en cuenta que el ifenprodil es un antagonista selectivo de las subunidades NR2B (Brittain *et al.*, 2012) se puede sugerir que esta subunidad es esencial para generar el efecto potenciador por parte de ACh sobre la corriente de NMDA.

Por otra parte, la inhibición de la subunidad NR2A mediante TCN-201 provocó inicialmente un efecto potenciador del 24.60%, mientras que la coaplicación de ACh y TCN-201 provocó un incremento del 45.41% sobre la corriente de NMDA, el aumento provocado por TCN-201 y la coaplicación de TCN-201 y ACh presentaron diferencias estadísticamente significativas lo cual indica que la ACh genera un efecto potenciador sobre las corrientes de NMDA aun en presencia de TCN-201, lo cual sugiere que la subunidad NR2A no es responsable por el efecto potenciador de la ACh y confirma la posibilidad de que el efecto potenciador sobre la corriente NMDA generado por la ACh es dependiente de la subunidad NR2B. Sin embargo, no podemos explicar por qué TCN-201 incrementa la corriente activada por NMDA, ya que esperaríamos tener una reducción de la corriente activada por NMDA.

Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que destacan el papel crítico de la diversidad de las subunidades de los receptores a NMDA. Por una parte, la subunidad NR2B es importante en la plasticidad sináptica del estriado dorsal, particularmente en el fortalecimiento de las sinapsis cortico-estriatales (Duan *et al.*, 2018). Se ha reportado que esta subunidad es altamente expresada en las neuronas espinosas medianas (MSNs), las cuales constituyen el 95% de las neuronas del estriado (Standaert *et al.*, 1994; Landwehrmeyer *et al.*, 1995). Estos estudios respaldan la relevancia funcional de NR2B en el aprendizaje motor y el control de respuestas estímulo-refuerzo.

Además, las alteraciones en el balance entre NR2A y NR2B han sido implicadas en patologías como la enfermedad de Parkinson y las discinesias inducidas por L-DOPA, donde una regulación anómala de estas subunidades contribuye a la disfunción sináptica (Mellone *et al.*, 2015), ya que las neuronas espinosas medianas fisiológicamente expresan una mayor densidad de la subunidad NR2B en comparación con la subunidad NR2A (Standaert *et al.*, 1994) es probable que una modulación positiva de la subunidad NR2B pueda ayudar a disminuir las repercusiones causadas por desbalances entre las subunidades.

En la corteza prefrontal

La corteza prefrontal es conocida por su rol en funciones cognitivas como la memoria de trabajo, el aprendizaje asociativo y la toma de decisiones (Lozano y Ostrosky, 2011). En este estudio, se midió el parámetro de capacitancia de las neuronas piramidales, el cual concordó con lo reportado en estudios previos para neuronas piramidales (Desai, Rutherford y Turrigiano, 1999; Gentet, Stuart y Clements, 2000).

Por otro lado, se observó que la acetilcolina (ACh) tiene un efecto de aumento sobre la corriente generada por receptores NMDA en esta región, el cual se demostró es dependiente de la concentración mediante la realización de una curva dosis respuesta, los datos para realizar la curva fueron ajustados a un modelo de función doble de Hill con una R^2 de 0.955.

Si bien el efecto de la ACh sobre la corriente de NMDA es potenciador, sigue teniendo un comportamiento dual, el efecto potenciador tiene su mínimo en una concentración de 30fM y sigue un comportamiento dependiente de la concentración donde su máximo se da a concentraciones picomolares. Por otro lado, en concentraciones más altas el efecto comienza su segunda fase al disminuir el efecto que podría deberse a la saturación del receptor a NMDA, disminuyendo su actividad, o a la activación de receptores nicotínicos, ya que se ha reportado que los agonistas nicotínicos y muscarínicos ejercen un efecto inhibitor sobre la corriente de NMDA (Flores-Hernández *et al.*, 2009). Los resultados de la curva dosis-respuesta confirman estudios previos que observaron un incremento de la actividad del receptor en presencia de ACh (Dennis *et al.*, 2016; Zapettini *et al.*, 2014; Talantova *et al.*, 2013; Bali *et al.*, 2017).

Para determinar si las subunidades NR2A y NR2B poseen un papel sobre el aumento generado por ACh, se utilizaron antagonistas selectivos para las subunidades, ifenprodil para NR2B y TCN-201 para NR2A. Los resultados confirmaron lo observado en el cuerpo estriado, ya que se encontró una disminución por parte del ifenprodil (-57-77%) y un efecto nulo al añadir ACh mientras que al aplicar TCN-201 se encontró un aumento de la corriente de NMDA y un aumento adicional al agregar ACh. Estos resultados suman a nuestra propuesta que define a la subunidad NR2B como esencial para que la ACh ejerza su efecto potenciador.

Los resultados anteriores son consistentes con reportes previos que destacan el rol de la subunidad NR2B en la plasticidad sináptica y en la expresión de LTP en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal ya que al afectar la expresión de la subunidad NR2B, la expresión de LTP se vio disminuida (Balsara *et al.*, 2014). Así mismo, la subunidad NR2B se ha definido como importante para la memoria de trabajo (Wang *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2013) y para el aprendizaje emocional positivo en la corteza prefrontal medial (Burgdorf *et al.*, 2013) y se sugiere que es importante para el desarrollo de tareas dirigidas a objetivos que dependen de la corteza prefrontal en la adolescencia (Flores-Barrera *et al.*, 2013).

Estos hallazgos refuerzan la importancia de las subunidades NR2B en los procesos de plasticidad sináptica dependientes de la corteza prefrontal, sugiriendo un mecanismo crítico para el procesamiento de información contextual y el aprendizaje (Burgdorf *et al.* 2013, Wang *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2013). Además, la relación entre el NR2B y funciones cognitivas clave destaca su potencial como objetivo terapéutico en trastornos que afectan esta región, como la esquizofrenia y los trastornos del estado de ánimo (Penzes *et al.*, 2011), ya que una disminución de la actividad de esta subunidad o su expresión se han visto implicadas en la patofisiología de estos trastornos una modulación controlada de esta subunidad, como la observada en este trabajo, puede ser prometedora para mejorar las afectaciones que ocasionan estos trastornos.

Comparación entre regiones

Los resultados obtenidos en el cuerpo estriado y la corteza prefrontal revelan similitudes y diferencias en la modulación de la actividad de los receptores NMDA por acetilcolina (ACh). En ambas regiones, la ACh ejerce un efecto potenciador sobre la corriente de NMDA que es dependiente de la concentración (10pM - 100 nM en cuerpo estriado; 30 fM - 10 nM en corteza prefrontal) y modulada por las subunidades NR2A y NR2B.

Con respecto a la modulación de las subunidades, el antagonista selectivo a las subunidades NRA, el TCN-201, ha sido reportado como un inhibidor de la corriente de NMDA (Edman *et al.* 2012). En esta tesis, reportamos que el TCN-201 aumenta la corriente de NMDA, el contraste entre estos dos resultados puede ser explicado ya que en trabajos previos se realizaron en presencia de glicina y esto podría causar una diferencia en la modulación de la corriente. Por otro lado, se sugiere que al bloquear receptores con subunidades NR2A, se estaría observando la corriente generada por receptores con subunidades NR2B y la corriente generada por estos receptores podría ser de mayor amplitud que la generada por los receptores con subunidades NR2A, sin embargo, son necesarios más experimentos para caracterizar estas corrientes en ausencia de glicina.

En el cuerpo estriado, el NR2B está más estrechamente relacionado con procesos de aprendizaje motor y respuestas estímulo-refuerzo, mientras que en la corteza prefrontal su papel es crucial para funciones cognitivas como la memoria de trabajo y la toma de decisiones (Balsara *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2013, Burgdorf *et al.* 2013, Flores-Barrera *et al.*, 2013). La subunidad NR2A está relacionada con el desarrollo de conductas depresivas (Francija *et al.*, 2019, Penzes *et al.*, 2011, Duan *et al.*, 2018, Durante *et al.*, 2019). Estas diferencias reflejan cómo las adaptaciones moleculares y sinápticas en cada región responden a sus demandas funcionales.

La presencia de NR2A y NR2B en ambas regiones también resalta similitudes en sus mecanismos de plasticidad sináptica, como el equilibrio entre LTP y LTD. Sin embargo, la organización y dinámica de estas subunidades varían, lo que sugiere una especialización para soportar las funciones específicas del cuerpo estriado y la corteza prefrontal.

Finalmente, si bien en ambas regiones la modulación potenciadora se da a diferentes concentraciones (10pM - 100 nM en cuerpo estriado; 30 fM - 10 nM en corteza prefrontal), nosotros sugerimos que este aumento de la corriente de NMDA es regulado por una interacción directa con el receptor ya que las concentraciones a las cuales la ACh aumenta la corriente son más pequeñas que aquellas necesarias para activar los receptores clásicos de ACh (Radu *et al.* 2017, Friis *et al.* 2009), esto es congruente con estudios previos que sugieren que la modulación ejercida por ACh no está relacionada con la actividad de los receptores clásicos colinérgicos.

Relevancia clínica

Los hallazgos de este estudio tienen implicaciones significativas en el ámbito clínico. Las subunidades NR2A y NR2B han sido asociadas con diversas condiciones neuropsiquiátricas y neurodegenerativas. Por ejemplo, el NR2B desempeña un papel clave en la flexibilidad cognitiva y la memoria de trabajo, y su disfunción ha sido vinculada con esquizofrenia y autismo (Zhou y Sheng, 2013, Moghaddam y Javitt, 2012, Balu, 2012). Por otro lado, el desequilibrio entre NR2A y NR2B en el cuerpo estriado se ha relacionado con la enfermedad de Parkinson y las discinesias inducidas por L-DOPA (Mellone *et al.*, 2015).

Además, los moduladores específicos de NR2B han mostrado efectos prometedores como terapias para mejorar la plasticidad sináptica y reducir la excitotoxicidad en condiciones como el Alzheimer (Mony *et al.*, 2009, Martel *et al.*, 2012, Zhou y Sheng, 2013, Parsons y Raymond, 2014). Este estudio resalta el potencial de estrategias terapéuticas dirigidas a estas subunidades para tratar trastornos que afectan tanto funciones cognitivas como motoras.

Limitaciones del estudio

Aunque los hallazgos obtenidos son significativos, este estudio presenta algunas limitaciones que deben considerarse. Primero, la falta de correlación directa entre los cambios en la plasticidad sináptica y medidas conductuales específicas limita la interpretación funcional de los resultados. Estudios adicionales podrían proporcionar un vínculo más sólido entre la actividad de los receptores NMDA y el comportamiento.

Segundo, el uso de antagonistas selectivos, como ifenprodil y TCN-201, permitió explorar el rol de las subunidades NR2A y NR2B, pero no fue posible evaluar la contribución de receptores triheteroméricos que contienen ambas subunidades. Esto

deja una brecha en la comprensión completa de la dinámica receptor-subunidad en ambas regiones.

12. CONCLUSIONES

1. En el cuerpo estriado, la acetilcolina genera un efecto dual en la corriente generada por los receptores a NMDA, concentraciones picomolares a nanomolares existe un aumento el cual es dependiente de la concentración, y a concentraciones micromolares disminuye este efecto.

2. En la corteza prefrontal, la acetilcolina genera un efecto potenciador que se puede describir en dos fases en la corriente generada por los receptores a NMDA, el cual es dependiente de la concentración, a concentraciones femtomolares existe un efecto potenciador menor el cual llega a su máximo en concentraciones picomolares y disminuye a partir de concentraciones nanomolares hasta micromolares.

En ambas zonas:

3. En presencia de ifenprodil se inhibe la corriente de NMDA y la acetilcolina pierde su efecto potenciador.

4. En presencia de TCN-201 se potencia la corriente de NMDA y la acetilcolina conserva su efecto potenciador.

5. Los resultados sugieren que la subunidad NR2B del receptor a NMDA es responsable por el efecto potenciador de la acetilcolina.

13. REFERENCIAS

- Al-Hallaq, R. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D. & Wenthold, R. J. (2007) NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 8334–8343.
- Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, Dlugos D, Eichler EE, Epstein MP, Glauser T, Goldstein DB, Han Y et al., (2013) De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*, 501: 217-221
- Anderson, P. (2002). Assessment and Development of Executive Function (EF) During Childhood. *Child neuropsychology: a journal on normal and abnormal development in childhood and adolescence.* 8. 71-82. 10.1076/chin.8.2.71.8724.
- Aramakis, V.B., Metherate, R., (1998). Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex. *Journal of Neuroscience* 18, 8485–8495.
- Ardila, A. y Surloff, C. (2007). *Dysexecutive syndromes*. San Diego: Medlink Neurology.
- Arroyo-Rios E.L. (2021). Efecto de 17 β estradiol y la progesterona sobre la corriente activada por NMDA en neuronas disociadas del estriado dorsolateral y del núcleo accumbens core y shell de la rata ovariectomizada. Repositorio digital Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Avila-Ruiz, T., Tellez, V., López-López, G., Limon, D., Martínez, I., Flores, G. y Flores-Hernandez, J. (2014). Chronic Administration of Nicotine Enhances NMDA-Activated Currents in the Prefrontal Cortex and Core Part of the Nucleus Accumbens of Rats. *Synapse (New York, N.Y.)*. 68. 10.1002/syn.21726.
- Baddeley, A. (2003). Working memory and language: An overview. *Journal of communication disorders.* 36. 189-208. 10.1016/S0021-9924(03)00019-4.
- Baghdoyan, H.A., Spotts, J.L. y Snyder, S.G. (1993) Simultaneous pontine and basal forebrain microinjections of carbachol suppress \checkmark .REM sleep, *J. Neurosci.*, 13.229–242.
- Balanta, D.J. (2016). Ilustración la hidrolisis de la acetilcolina. Recuperado de <http://https://slideplayer.es/slide/3826742/>
- Bali Z.K, Nagy L.N. y Hernádi I. (2017) Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Play a Predominant Role in the Cholinergic Potentiation of N-Methyl-D-Aspartate Evoked Firing Responses of Hippocampal CA1 Pyramidal Cells. *Front. Cell. Neurosci.*, 11:271. doi: 10.3389/fncel.2017.00271

- Ballard TM, Pauly-Evers M, Higgins GA, Ouagazzal AM, Mutel V, Borroni E, Kemp JA, Bluethmann H, Kew JN: (2002) Severe impairment of NMDA receptor function in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site results in drug-resistant nonhabituating hyperactivity. *J Neuroscience*, 22:6713-6723.
- Balsara R.D., Ferreira A.N, Donahue D.L, Castellino F.J, Sheets P.L. (2014). Probing NMDA receptor GluN2A and GluN2B subunit expression and distribution in cortical neurons. *Neuropharmacology*, 79, 542-549.
- Balu, D. T. (2016). The NMDA receptor and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Adv. Pharm.* 76, 351–382.
- Barbas, H. (2009). Prefrontal Cortex: Structure and Anatomy. *Encyclopedia of Neuroscience*. 909-918. 10.1016/B978-008045046-9.00427-7
- Belforte, J. E. et al., (2010). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature Neurosci.* 13, 76–83.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993; 361:31–39.
- Brichta, L., P. Greengard & M. Flajolet (2013). Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. *Trends Neurosci.* 36: 543–554.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the “accumbens” part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J. Comp. Neurol.* 338:255–78
- Brothwell, S. L. et al., (2008). NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *J. Physiol.* 586, 739–750
- Burgdorf J., Kroes R.A., Weiss C., Oh M.M., Disterhoft J.F., Brudzynski S.M., Panksepp J., Moskal J.R. (2011) Positive emotional learning is regulated in the medial prefrontal cortex by GluN2B-containing NMDA receptors. *Neuroscience*, 29;192:515-23.
- Calabresi, P. et al.,(1996) The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 19, 19–24
- Carpenter MB. *Neuroanatomía: Fundamentos*. 4° Edición. Buenos Aires (Argentina): Editorial Médica Panamericana.

- Carvill GL, Regan BM, Yendle SC, O'Roak BJ, Lozovaya N, Bruneau N, Burnashev N, Khan A, Cook J, Geraghty E et al., (2013) GRIN2A mutations cause epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nat Genet*, 45:1073-1076.
- Clayton, D. A., Mesches, M. H., Alvarez, E., Bickford, P. C. & Browning, M. D. A (2002). Hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in longterm potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J. Neurosci.* 22, 3628–3637.
- Collingridge, G. L., & Bliss, T. V. P. (1995). Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends in Neurosciences*, 18(2), 54–56.
- Consolo, S., Bertorelli, R., Forloni, G.L. y Butcher, L.L. (1990). Cholinergic neurons of the ponto mesencephalic tegmentum release acetylcholine in the basal nuclear complex of freely moving rats, *Neuroscience*, 32, 717–723.
- Contant, C. et al., (1996) Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience* 71, 937–947
- Cull-Candy, S. G. & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE* 2004, re16.
- Cull-Candy, S.G., Brickley, S., Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327-335. Current opinion in neurobiology. 11. 327-35. 10.
- Daniel, J. M., y Dohanich, G. P. (2001). Acetylcholine Mediates the EstrogenInduced Increase in NMDA Receptor Binding in CA1 of the Hippocampus and the Associated Improvement in Working Memory. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6949–6956.
- Dennis S.H, Pasqui F., Colvin E.M., Sanger H., Mogg A.J, Felder C.C, Broad L.M., Fitzjohn S.M., Isaac J.T. y Mellor J.R. (2016) *Cerebral Cortex* ,26, 414–426.
- Desai, N., Rutherford, L. & Turrigiano, G. (1999). Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2, 515–520.
- Di Chiara, G. & V. Bassareo. (2007). Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7: 69–76.
- Dias R, Robbins TW, Roberts AC. (1996). Primate analogue of the Wisconsin Card Sorting Test: effects of excitotoxic lesions of the prefrontal cortex in the marmoset *Behav Neurosci*; 110:872–86.
- Dildy-Mayfield, J.E., Eger II, E.I., Harris, R.A. (1996). Anesthetics produce subunitselective actions on glutamate receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 276, 1058–1065.

- Dixon, M., Thiruchselvam, R., Todd, R., y Christoff, K. (2017). Emotion and the Prefrontal Cortex: An Integrative Review. *Psychological bulletin*. 143. 10.1037/bul0000096.
- Durante, V., de Iure, A., Loffredo, V., Vaikath, N., De Risi, M., Paciotti, S., ... Calabresi, P. (2019). Alpha-synuclein targets GluN2A NMDA receptor subunit causing striatal synaptic dysfunction and visuospatial memory alteration. *Brain*. doi:10.1093/brain/awz065
- Edman, S., McKay, S., MacDonald, L. J., Samadi, M., Livesey, M. R., Hardingham, G. E., & Wyllie, D. J. A. (2012). *TCN 201 selectively blocks GluN2A-containing NMDARs in a GluN1 co-agonist dependent but non-competitive manner. Neuropharmacology, 63(3), 441–449.*
- Endele S, Rosenberger G, Geider K, Popp B, Tamer C, Stefanova I, Milh M, Kortum F, Fritsch A, Pientka FK et al., (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet*, 42:1021-1026.
- Etkin, A., Egner, T., Kalisch, R. (2011). Etkin A, Egner T, Kalisch R. Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. *Trends Cogn Sci* 15: 85-93. *Trends in cognitive sciences*. 15. 85-93. 10.1016/j.tics.2010.11.004.
- Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM. (2007). Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu. Rev. Neurosci.* 30:289–316.
- Flaherty AW, Graybiel AM. (1993). Output architecture of the primate putamen. *J Neurosci*; 13:3222–37.
- Flores-Barrera E., Thomases D.R., Heng L.J, Cass D.K., Caballero A., Kuei Y. Tseng K.Y. (2014). Late Adolescent Expression of GluN2B Transmission in the Prefrontal Cortex Is Input-Specific and Requires Postsynaptic Protein Kinase A and D1 Dopamine Receptor Signaling, *Biological Psychiatry*, 75,508-516.
- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., Greengard, P. y Levine, M. S. (2002). *Dopamine Enhancement of NMDA Currents in Dissociated Medium-Sized Striatal Neurons: Role of D1 Receptors and DARPP-32. Journal of Neurophysiology, 88(6), 3010–3020.*
- Flores-Hernandez, J., Salgado, H., De La Rosa, V., Avila-Ruiz, T., Torres-Ramirez, O., Lopez-Lopez, G. y Atzori, M. (2009). Cholinergic direct inhibition of N Methyl D Aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. *Synapse*, 63(4), 308–318.

- 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.
- Francija E., Petrovic Z., Brkic Z., Mitic M., Radulovic J., Adzic M. (2019). Disruption of the NMDA receptor GluN2A subunit abolishes inflammation-induced depression, *Behavioural Brain Research*, 359, 550-559.
- Freire M. (2007) *Histología del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados*. Editorial CSIC, Ministerio de Sanidad y Consumo (España), Boletín Oficial del Estado (España).
- Friis, S., Mathes, C., Sunesen, M., Bowlby, M. R., & Dunlop, J. (2009). *Characterization of compounds on nicotinic acetylcholine receptor alpha7 channels using higher throughput electrophysiology. Journal of Neuroscience Methods*, 177(1), 142–148.
- Fuster, J. (2001). The prefrontal cortex—An update: Time is of the essence. *Neuron*. 30. 319-33. 10.1016/S0896-6273(01)00285-9.
- Fuster, J. (2008). *The Prefrontal Cortex* (4th Edition).
- Gentet, L. J., Stuart, G. J., & Clements, J. D. (2000). *Direct Measurement of Specific Membrane Capacitance in Neurons. Biophysical Journal*, 79(1), 314–320.
- Girod, R., Barazangi, N., McGehee, D. y Role, L. W. (2000). Facilitation of glutamatergic neurotransmission by presynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 39(13), 2715–2725.
- Gladding, C. M. & Raymond, L. A. (2011). Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Mol. Cell Neurosci.* 48, 308–320.
- Goldman PS, Nauta WJ. (1977-9. An intricately patterned prefronto-caudate projection in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 72:369–86
- Goldman-Rakic, P. S. (1987). Development of cortical circuitry and cognitive function. *Child Development*, 58(3), 601–622.
- Gray, J. A. et al., (2011). Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron* 71, 1085–1101.
- Graybiel, A.M. (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 13, 133–154

- Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y, Lin DT, Yoshizawa Y, Higashi K, Park AR, Spiegelman D, Dobrzyńska S, Piton A et al., (2011) Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet*, 88:306-316.
- Hardingham, G. E. & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Rev. Neurosci.* 11, 682–696.
- Harney, S. C., Jane, D. E. & Anwyl, R. (2008). Extrasynaptic NR2D-containing NMDARs are recruited to the synapse during LTP of NMDAR-EPSCs. *J. Neurosci.* 28, 11685–11694. (2008).
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Perez-Otano, I. & Philpot, B. D. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog. Neurobiol.* 91, 23–37.
- Isaacson, R.L. y Pribram, K.H. (1975). (Eds.), *The Hippocampus*, Vols. 1 and II, Plenum, New York.
- 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.
- Jurado, M-B. y Rosselli, M. (2007). The Elusive Nature of Executive Functions: A Review of our Current Understanding. *Neuropsychology review*. 17. 213-33.
- Kapalka, George, M. (2010). "Substances Involved in Neurotransmission". *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents*. Elsevier. pp. 71–99. Buy book ISBN 978-0-12-374927-7.
- Kastner, S. y Ungerleider, L. G. (2000). Mechanisms of visual attention in the human cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 23,315–341
- Kesner, R., Churchwel,J. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem.* Oct; 96(3): 417–431. Published online 2011 Aug 9.
- Kesner, R., Churchwel,I J. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem.* Oct; 96(3): 417–431. Published online 2011 Aug 9.
- Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE. PubChem (2023) update.

- Koechlin, E., Corrado, G., Pietrini, P., Grafman, J. (2000). Dissociating the role of the medial and lateral anterior prefrontal cortex in human planning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97.
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 127–147.
- Kunig G, Leenders KL, Martin-Solch C, Missimer J, Magyar S, Schultz W. (2000) Reduced reward processing in the brains of Parkinsonian patients. *Neuroreport* ;11:3681–7.
- Kunzle H. (1975). Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain Res.* 88:195–209
- Lapper, S.R. and Bolam, J.P. (1992) Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience* 51, 533–545
- Lara, A. H., y Wallis, J. D. (2015). The Role of Prefrontal Cortex in Working Memory: A Mini Review. *Frontiers in systems neuroscience*, 9, 173. doi:10.3389/fnsys.2015.00173
- Lemke JR, Hendrickx R, Geider K, Laube B, Schwake M, Harvey RJ, James VM, Pepler A, Steiner I, Hortnagel K et al., (2014). GRIN2B mutations in West syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. *Ann Neurol*, 75:147-154.
- Lemke JR, Lal D, Reinthaler EM, Steiner I, Nothnagel M, Alber M, Geider K, Laube B, Schwake M, Finsterwalder K et al., (2013). Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nat Genet*, 45:1067-1072.
- Lezak, M.D., Howieson, D.B. y Loring, D.W. (2004). *Neuropsychological assessment* (4a. ed.). Oxford, New York: Oxford University Press.
- Lezak, M.D., Howieson, D.B. y Loring, D.W. (2004). *Neuropsychological assessment* (4a. ed.). Oxford, New York: Oxford University Press.
- Liles SL, Updyke BV. (1985). Projection of the digit and wrist area of precentral gyrus to the putamen: relation between topography and physiological properties of neurons in the putamen. *Brain Res.* 339:245–55
- Lin, H., Hsu, F.-C., Baumann, B. H., Coulter, D. A. y Lynch, D. R. (2014). Cortical synaptic NMDA receptor deficits in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor gene deletion models: Implications for neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of Disease*, 63, 129–140.

- Logan, S. M., Partridge, J. G., Matta, J. A., Buonanno, A. & Vicini, S. (2007). Long-lasting NMDA receptor-mediated EPSCs in mouse striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* 98, 2693–2704.
- Lozano, A. y Ostrosky, F. (2011). *Desarrollo de las Funciones Ejecutivas y de la Corteza Prefrontal.*, 11. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México.
- Luna, A. (2016). Estudio de la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA en neuronas agudamente disociadas de núcleo estriado de rata. (Tesis de Pregrado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Manuela Mellone M., Stanic J., Hernandez L.F., Iglesias E., Zianni E., Longhi A., Prigent A., Picconi B., Calabresi P., Hirsch E.C., Obeso J. A, Di Luca M. y Gardoni F. (2015) NMDA receptor GluN2A/GluN2B subunit ratio as synaptic trait of levodopa-induced dyskinesias: from experimental models to patients. *Front. Cell. Neurosci.* 9:245.
- Marino, M. J., Rouse, S. T., Levey, A. I., Potter, L. T. y Conn, P. J. (1998). Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-Daspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19), 11465–11470.
- Mark, G.P. et al., 2011. Cholinergic modulation of mesolimbic dopamine function and reward. *Physiol. Behav.* 104: 76–81.
- Markram, H., Segal, M. (1990). Acetylcholine potentiates responses to N-methyl-Daspartate in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.*; 113:62–65. [PubMed: 1973273]
- Martel, M.-A. et al. (2012) The subtype of GluN2 C-terminal domain determines the response to excitotoxic insults. *Neuron* 74, 543–556.
- Mattson, M. P. (1989). Acetylcholine potentiates glutamate-induced neurodegeneration in cultured hippocampal neurons. *Brain Research*, 497(2), 402–406.
- McGeorge AJ, Faull RL. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503–37
- Metherate R. y Ashe J. (1995). Synaptic interactions involving acetylcholine, glutamate, and GABA in rat auditory cortex. *Experimental Brain Research*, 107(1).
- Meyer D., Schvaneveldt R., Ruddy M. (1975). Loci of Contextual Effects on Visual Word Recognition.

- Moghaddam, B. & Javitt, D. (2012). From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology* 37,4–15.
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, 98:427-436.
- Mony, L., Kew, J. N., (2009) Gunthorpe, M. J. & Paoletti, P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1301–1317.
- Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-37, 1991
- Mueller, H. T. & Meador-Woodruff, J. H. (2004). NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder. *Schizophr. Res.* 71, 361–370.
- Myers RA, Casals F, Gauthier J, Hamdan FF, Keebler J, Boyko AR, Bustamante CD, Piton AM, Spiegelman D, Henrion E et al., (2011). A population genetic approach to mapping neurological disorder genes using deep resequencing. *PLoS Genet*, 7: e1001318.
- Naidich TP. *Imagenología del cerebro*. Tomo 1, Sec. 4. Philadelphia: Amolca; 2017.
- O’Roak BJ, Vives L, Fu W, Egertson JD, Stanaway IB, Phelps IG, Carvill G, Kumar A, Lee C, Ankenman K et al., (2012). Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science*, 338:1619-1622.
- Oldenburg IA, Ding JB. (2011). Cholinergic modulation of synaptic integration and dendritic excitability in the striatum. *Curr Opin Neurobiol*; 21:425– 432.
- Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N. & Hollmann, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends Neurosci.* 35, 240–249.
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1351–1365.
- Parsons, M. P. & Raymond, L. A. (2014) Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* 82, 279–293.

- Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., VanLeeuwen, J.E., Woolfrey, K.M. (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 14, 285e293
- Radu, B. M., Osculati, A. M. M., Suku, E., Banciu, A., Tsenov, G., Merigo, F., ... Fabene, P. F. (2017). All muscarinic acetylcholine receptors (M1-M5) are expressed in murine brain microvascular endothelium. *Scientific Reports*, 7(1).
- Ragsdale CW Jr, Graybiel AM. (1981). The fronto-striatal projection in the cat and monkey and its relationship to inhomogeneities established by acetylcholinesterase histochemistry. *Brain Res.* 208:259–66
- Reutlinger C, Helbig I, Gawelczyk B, Subero JI, Tonnie H, Muhle H, Finsterwalder K, Vermeer S, Pfundt R, Sperner J et al., (2010). Deletions in 16p13 including GRIN2A in patients with intellectual disability, various dysmorphic features, and seizure disorders of the rolandic region. *Epilepsia*, 51:1870-1873.
- Royall D., Lauterbach E., Cummings J., Reeve A., Rummans T., Kaufer D., LaFrance Jr. W. C., Coffey C. (2002). Executive control function: A review of its promise and challenges for clinical research. A report from the Committee on Research of the American Neuropsychiatric Association. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences.* 14. 377-405.
- Rubin M., Safdieh J. E. (2008). Netter, Neuroanatomía Esencial., Masson, 1ra Edición.
- Schiller D. y Delgado M. (2010). Overlapping neural systems mediating extinction, reversal and regulation of fear. *Trends in cognitive sciences.* 14. 268-76.
- Schwartz, E. J. et al., (2012). NMDA receptors with incomplete Mg²⁺ block enable low-frequency transmission through the cerebellar cortex. *J. Neurosci.* 32, 6878–6893.
- Segal M. (1992). Acetylcholine enhances NMDA-evoked calcium rise in hippocampal neurons. *Brain Research*, 587(1), 83–87.
- Shen W, Tian X, Day M, et al., (2007). Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci* ;10:1458 – 1466.
- Siegel A. y Sapru H.N. (2011). *Essential neuroscience*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Sierra D. F. J., Sierra I. J., Caicedo-Montaña C. A., Mora-Salazar J. A., Tramontini-Jens C. (2019). ANATOMÍA BÁSICA DE LOS GANGLIOS BASALES *Rev.Medica. Sanitas* 22 (2): 66-71.

- Smith, Y. & R. Villalba. (2008). Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov. Disord.* 23(Suppl 3): S534–S547.
- Standaert, D. G., Testa, C. M., Young, A. B., & Penney, J. B. (1994). Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 343(1), 1–16.
- Stuss D. T., Alexander M. P., Floden D., Binns M. A., Levine B., McIntosh A. R., Hevenor S. J. (2002). Fractionation and localization of distinct frontal lobe processes: evidence from focal lesions in humans. En D. T. Stuss y R. T. Knight (Eds.), *Principles of frontal lobe function*. Nueva York: Oxford University Press.
- Stuss D. y Alexander M. (2000). Executive functions and the frontal lobes: A conceptual view. *Psychological Research*, 63, 289-298.
- Sugita, S. et al., (1991) Distinct muscarinic receptors inhibit release of GABA and excitatory amino acids in mammalian brain. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2608–2611
- Sulzer, D. & D.J. Surmeier. (2013). Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 28: 715–724.
- Talantova M., Sanz-Blasco S., Zhang X., Xia P., Akhtar M.W., Okamoto S., Dziejczapolski G., Nakamura T., Cao G., Pratt A.E., Kang Y.J., Tu S., Molokanova E., McKercher S.R., Hires S.A., Sason H., Stouffer D.G., Buczynski M.W., Solomon J.P., Michael S., Powers E.T., Kelly J.W., Roberts A., Tong G., Fang-Newmeyer T., Parker J., Holland E.A., Zhang D., Nakanishi N., Chen H.S., Wolosker H., Wang Y., Parsons L.H., Ambasadhan R., Masliah E., Heinemann S.F., Piña-Crespo J.C., Lipton S.A. (2013) A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Tarabeux J, Kebir O, Gauthier J, Hamdan FF, Xiong L, Piton A, Spiegelman D, Henrion E, Millet B, Fathalli F et al., (2011).Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Transl Psychiatry*, 1: e55
- Tisch, S., Silberstein, P., Limousin-Dowsey, P., & Jahanshahi, M. (2004). The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatric Clinics of North America*, 27(4), 757–799.
- Treisman A.M. y Gelade G. (1980). A feature-integration theory of attention. *Cognitive Psychology*, 12, 97-136.

- Tsai G, Coyle JT (2002). Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42:165-179.
- Uylings H., Groenewegen H., Kolb B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, Volume 146, Issues 1–2, Pages 3-17, ISSN 0166-4328.
- Van Eden C. G. y Uylings H. B. (1985), Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 241: 253-267.
- Wang H, Stradtman GG 3rd, Wang XJ, Gao WJ (2008) A specialized NMDA receptor function in layer 5 recurrent microcircuitry of the adult rat prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16791–16796.
- Wang M, Yang Y, Wang CJ, Gamo NJ, Jin LE, Mazer JA, et al. (2013) NMDA receptors subserve persistent neuronal firing during working memory in dorsolateral prefrontal cortex. *Neuron* 77:736–749.
- Webster R. (2002). Acetylcholine (ACh). In *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function*, R. A. Webster (Ed.).
- Williams, M.J. y Adinoff B.(2008). The role of acetylcholine in cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology* 33: 1779– 1797.
- Wilson, C.J. et al., (1990) Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* 10, 508–519
- Woo, T. U., Walsh, J. P. & Benes, F. M. (2004). Density of glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA-containing neurons that express the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 649–657.
- Wolf, N.J. and Butcher, L.L. (1981) Cholinergic neurons in the caudate-putamen complex proper are intrinsically organized: a combined Evans blue and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res. Bull.* 7, 487–507
- Wolf, N.J. and Butcher, L.L. (1986) Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res. Bull.* 16, 603–637
- Wu D. y Hersh L. B. (1994). Choline Acetyltransferase: Celebrating Its Fiftieth Year. *Journal of Neurochemistry*, 62: 1653-1663.
- Yamada H., Ogura A., Koizumi S., Yamaguchi A. y Moriyama Y. (1998). Acetylcholine Triggers I-Glutamate Exocytosis via Nicotinic Receptors and Inhibits Melatonin Synthesis in Rat Pinealocytes. *The Journal of Neuroscience*, 18(13), 4946–4952.

- Yamada-Fowler N, Fredrikson M, Soderkvist P (2014). Caffeine interaction with glutamate receptor gene GRIN2A: Parkinson's disease in Swedish population. PLOS ONE, 9: e99294.
- Yan Z, Song WJ, Surmeier J. (1997) D2 dopamine receptors reduce N-type Ca² currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein kinase-C-insensitive pathway. J Neurophysiol;77: 1003–1015.
- Yang Y., Paspalas C., Jin L., Picciotto M., Arnsten A., Wang M.(2013). Nicotinic $\alpha 7$ receptors enhance NMDA cognitive circuits in dorsolateral prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci USA.; 110:12078– 12083. [PubMed: 23818597]
- Yanhong D., Qi W., Qingwen Z., Jiayue W., Zhenzhen C., Meichen X., Yale D., Zheng Z., Qingsheng X., Xiaohua C. (2018). Striatal GluN2B involved in motor skill learning and stimulus-response learning, Neuropharmacology, 135,73-85.
- Zappettini E., Grilli M., Olivero G., Chen J., Padolecchia C., Pittaluga A., Tomé A.R., Rodrigo A., Cunha R.A. y Marchi M. (2014) Nicotinic $\alpha 7$ receptor activation selectively potentiates the function of NMDA receptors in glutamatergic terminals of the nucleus accumbens. Front. Cell. Neurosci.,8,332.
- Zappettini S., Grilli M., Olivero G., Chen J., Padolecchia C., Pittaluga A., Tomé A., Cunha R., Marchi M. (2014). Nicotinic $\alpha 7$ receptor activation selectively potentiates the function of NMDA receptors in glutamatergic terminals of the nucleus accumbens. Front Cell Neurosci; 8:332. [PubMed: 25360085]
- Zhou, Q., & Sheng, M. (2013). *NMDA receptors in nervous system diseases. Neuropharmacology, 74, 69–75.*