Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neuromodulación

“Efecto de la dopamina sobre corrientes de NMDA en ausencia de glicina en neuronas piramidales de corteza prefrontal”

TESIS

Para obtener el grado de:

Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Daniela Laverde Estrada

Director de tesis:

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Puebla, Pue. Febrero 2024

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer a mi director de tesis que igualmente fue mi profesor en la licenciatura, el Dr. Jorge Flores Hernández. Además de su asesoría, agradezco ampliamente el haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y recibirme en esta familia académica que es el laboratorio de neuromodulación.

Agradezco a la M.C. Lorena Arroyo y a la M.C. Stephany Altamirano Aguilar por haberme enseñado las bases de los protocolos del laboratorio y sobre todo por su paciencia.

Gracias a mis compañeras L.B.M. Nayeli Coyotl por su buen humor y gran corazón. Gracias principalmente a mi amiga de laboratorio, la c.L.B. Rubí Andrea León Martínez por ser mi aliada tanto en los días caóticos de experimentación y análisis.

Gracias a mis padres y familiares que siempre intentaron entender lo que hacía y sin comprenderlo me seguían alentando a seguir. Gracias a mi Burbuja que, en los momentos más oscuros de mi vida, siempre me demostró su amor incondicional y me ayudó a continuar en la licenciatura hasta casi el final de ésta.

Agradezco especialmente al M.C. Hector Halin Carbajal Guevara quien me alentó en mis últimos días de desvelo en experimentación, prácticamente me enseñó a hacer una tesis, me dio las bases de estadística y me ayudó a no rendirme en los momentos que no veía la luz en el camino. Gran parte de este trabajo es gracias a ti.

Índice

Lista de abreviaturas....1
Resumen....3
1.1 Antecedentes Generales....4
1.1.1 Corteza prefrontal....4
1.1.1.1 Aferencias y eferencias....7
1.1.1.2 Histología....8
1.1.1.3 CPF de rata....9
1.1.2 Glutamato....10
1.1.2.1 Receptores NMDA....12
1.1.2.2 Glicina....14
1.1.3 Dopamina....15
1.1.3.1 Metabolismo de la dopamina....16
1.1.3.2 Receptores dopaminérgicos....17
1.1.3.3 Vías dopaminérgicas....19
1.1.4 Esquizofrenia....20
1.2 Antecedentes Específicos....21
1.2.1 Efecto de la DA sobre corrientes de NMDA en presencia de glicina....21
2. Justificación....22
3. Hipótesis....23
4. Objetivos....23
4.1 Objetivo general....23
4.2 Objetivos específicos....23
5. Metodología....23
5.1 Disociación aguda....23
5.3 Protocolos electrofisiológicos....26
5.4 Análisis estadístico....27
6. Diagrama de trabajo....28
6.1 Disociación de neuronas....28
7. Resultados....29
7.1 Análisis electrofisiológico....29
8. Discusión....38
9. Resumen de resultados....40
10. Conclusiones....40

11. Perspectivas.....40
12. Referencias 41

Lista de abreviaturas

µl – microlitros

µm – micrómetros

µM – micromolar

AID - área insular agranular dorsal

AIV - área insular agranular ventral

ALDH - aldehído deshidrogenasa

AMPA - α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AON - olfatorio anterior

AVT - área ventral tegmental

BH4 – tetrahidrobiopterina

BLA - núcleo basolateral amigdalar

Cg1 - cíngulo anterior

COMT - catecol-O-metiltransferasa

CPF- Corteza prefrontal

DA – dopamina

dmPFC - Corteza prefrontal dorsomedial

DOPAC - ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DOPAL - 3,4-Dihidroxifenilacetaldehido

GABA - ácido-gamma-aminobutírico

Glu – glutamato

Gly – glicina

GU - corteza gustativa

GΩ - giga Ohm

HVA - ácido homovanílico

IL - área límbica

iNMDA- corriente de NMDA

L-DOPA – levodopa

MAO-B - monoamina oxidasa B

mGluR – receptor glutamatérgico metabotrópico

ml – mililitros

mM – milimolar

MOp - área motora primaria

MOs - área motora secundaria

mOsm – miliosmoles

ms – milisegundos

mV – milivolts

NAcc – núcleo accumbens

nM - nanomolar

NMDA – N-metil-D-aspartato

ORBl - área orbital lateral

ORBm - área orbital medial

ORBvl - área orbital ventrolateral

pA – picoamperios

pF – pico faradios

PIR - corteza piriniforme

PL - prelímbica

SSp - área somatosensorial primaria

SSs - área somatosensorial suplementaria

Tyr - tirosina

VISC - corteza visceral

vlPFC - Corteza prefrontal ventrolateral

vmPFC - Corteza prefrontal ventromedial

Resumen

El NMDA es un receptor glutamatérgico asociado a procesos de aprendizaje, memoria y sobre todo a la arborización neuronal. Además, se ha caracterizado al receptor como altamente modulable, ya sea por sus co-agonistas como glicina (Gly) y serina, o por neurotransmisores como acetilcolina, serotonina y dopamina.

Últimamente se ha mencionado el papel que funge la dopamina a nivel corteza prefrontal en relación a los procesos de aprendizaje siendo un modulador de la atención. Mediante sus vías cerebrales, existe alta presencia del neurotransmisor en corteza prefrontal donde entra en contacto con el receptor NMDA (NMDAR).

De acuerdo con la literatura, el sinergismo dopamina-NMDA ha sido ampliamente estudiado en protocolos en presencia del aminoácido glicina. Sin embargo, las condiciones experimentales no han sido del todo fisiológicamente similares. Se cree que la glicina es necesaria para activar a los NMDAR, sin embargo, estudios experimentales en el laboratorio han demostrado que sólo es un co-agonista del receptor. Además, las concentraciones utilizadas del aminoácido en la experimentación registrada no se encuentran dentro de un rango fisiológico normal.

Debido a lo anterior, este trabajo pretende caracterizar el efecto de la dopamina sobre la activación de la corriente de NMDA (iNMDA) en un ambiente sin Gly en neuronas piramidales de corteza prefrontal (CPF) de rata, mediante técnicas de registro y fijación de voltaje en célula completa.

Se encontró que la dopamina (1 µM) presenta un efecto excitatorio sobre la iNMDA de manera significativa. Esto sugiere la activación de los canales de dopamina tipo D1 los cuales producen una excitación celular que permite el crecimiento de la iNMDA.

Antecedentes

1.1 Antecedentes Generales

1.1.1 Corteza prefrontal

La corteza cerebral se encarga de numerosas funciones clasificadas de manera jerárquica, las cuáles comprenden funciones simples impartidas por áreas sensoriales y motoras, posteriormente se ven involucradas las áreas integrativas y el área de la ejecución y la acción (Fuster, 2001).

El área prefrontal comprende el procesamiento de las emociones, la cognición, las funciones ejecutivas, lenguaje y sociabilidad (Teffer & Semedeferi, 2012).

El lóbulo frontal se encuentra en la parte más anterior de la corteza. Anatómicamente se ubica por delante de la cisura central o cisura de Rolando y por encima de la cisura lateral o cisura de Silvio (Miller, 2018). De acuerdo al dibujo de Brodmann, la corteza prefrontal (CPF) se encuentra en las áreas 8-13, 24, 32 y de 44 a 47 (Fuster, 2001), debido a su complejidad es un área muy extensa y corresponde alrededor del 30% de la masa cerebral humana (Groenewegen & Uylings, 2000). En el cerebro del chimpancé corresponde a un 17%, 11.5% en el macaco, 8.5% en el lémur y en el perro y gato comprende un 7% y 3.5% respectivamente (Fig. 1) (Fuster, 2015).

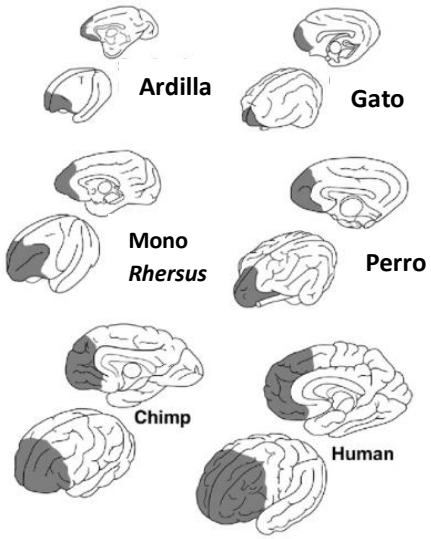


Figura 1. Corteza prefrontal de 6 mamíferos (Fuster 2015)

En cuestiones evolutivas dicha zona cortical comenzó a perfeccionarse a partir de los primates como una necesidad de coordinación y mayor control en actividades cognitivas y la conducta (Miller, 2007).

En 1954, el neurocirujano Wilder Penfield determinó las tres principales zonas de la corteza frontal del humano: la corteza motora, corteza premotora y CPF. Las cuales, a su vez, presentan subdivisiones según la función específica que realizan. La corteza motora y premotora mantienen una estrecha relación, esto se debe a su labor en cuanto a la motricidad de un individuo, comúnmente estas son descritas en conjunto debido al trabajo en la síntesis, desarrollo, procesamiento y realización de un movimiento (Miller, 2018).

En 1986 Stuss y Benson dieron una subdivisión de la CPF en relación a la función con la que se asocia. Dicha clasificación se describe a continuación:

- Corteza orbital: Se encuentra estrechamente relacionada con el sistema límbico, esta zona se encarga del control de las emociones, estados afectivos y la conducta propia. Detecta los cambios ambientales ya sean de riesgo o benéficos para el individuo. Por lo anterior, se considera que es el área donde se origina la toma de decisiones inmediatas ante situaciones impredecibles y repentinas.

- Corteza dorsolateral- Está formada por tres divisiones anatómicas: área superior, inferior y polo frontal. Se asocia con las funciones ejecutivas, la autoevaluación, metacognición y cognición social.

- Corteza del cíngulo anterior- Comprende las áreas de Brodmann 9 y 10 (Fig 2), algunos autores consideran que esta zona se encuentra integrada en la corteza frontomedial. Dicha corteza es la encargada de regular los procesamientos emocionales y sensoriales. A su vez, lleva a cabo los procesos de detección y solución de problemas y se encuentra íntimamente relacionada a los procesos de atención y motivación. En la parte inferior (área de Brodmann 32) se perciben las respuestas viscerales, estímulos afectivos, cambios de conducta en la piel mientras que en la zona superior se enfoca en procesos cognitivos (Mimenza, 2018).

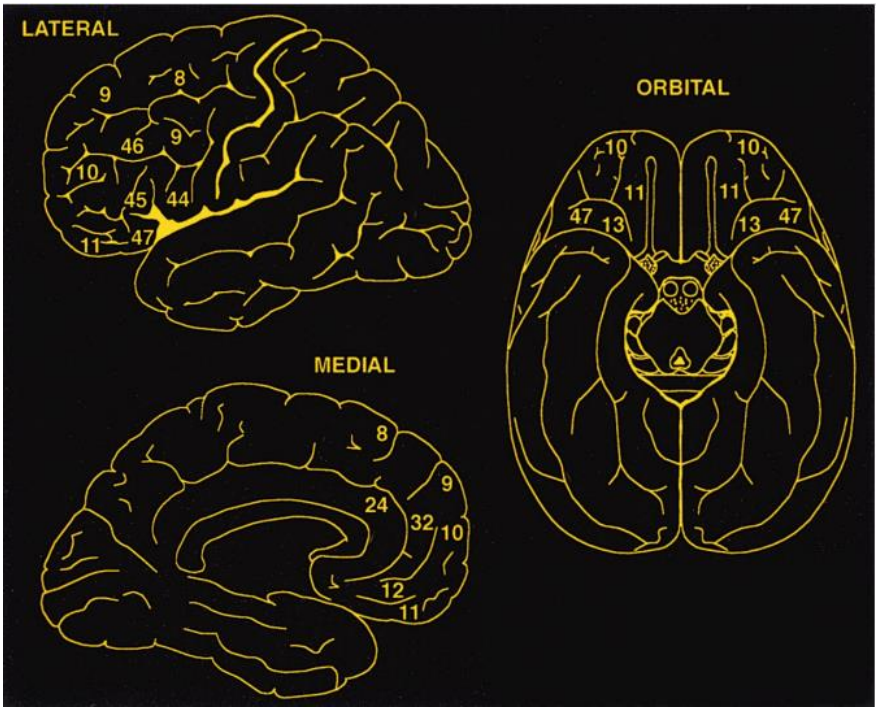


Figura 2. Corteza prefrontal de humano, la numeración representa las áreas de Brodmann que la comprenden (Fuster J. M. 2001)

La CPF está dividida en dos hemisferios, Flores y colaboradores en 2008 determinaron que ambos hemisferios contribuyen de manera individual a ciertas funciones. La CPF izquierda se relaciona con procesos de planeación secuencial, flexibilidad mental, fluidez verbal, estrategias de memoria, establecimiento de rutinas, apreciación del humor, procesamiento de información ante situaciones nuevas, la toma de decisiones lógicas y la cognición social. Por otro lado, el hemisferio derecho se enfoca en la toma de decisiones relativas al momento, decisiones adaptativas y subjetivas las cuáles se encuentran estrechamente relacionados al control ejecutivo.

Las funciones ejecutivas son definidas como actividades mentales complejas, necesarias para planificar, organizar, guiar, revisar, regularizar y evaluar el comportamiento necesario para adaptarse eficazmente al entorno y para alcanzar metas (Bauermeister, 2008).

Estas funciones son la integración del conocimiento humano, que, según Castillero en 2018, es la habilidad que nos diferencia del resto de los mamíferos. Se lleva a cabo mediante la integración de los aprendizajes de experiencias, emocionales, intelectuales, la práctica y las habilidades motoras.

De acuerdo con la neuroembriología, el desarrollo cerebral; específicamente el tubo neural, comienza en la tercera semana de gestación y termina en la adolescencia en cuestiones anatómicas. La CPF es una de las últimas regiones cerebrales en desarrollarse. Esto es debido al tipo de árboles dendríticos encontrados en la región, los cuales tienen una mayor complejidad (Teffer & Semedeferi, 2012) y se encuentran en constante crecimiento incluso 24 meses después del nacimiento humano (Fuster, 2015). Ejemplo, las primeras zonas en madurar suelen ser las motoras y somatosensoriales primarias, en las cuales predominan redes dendríticas simples (Teffer & Semedeferi, 2012).
El factor de crecimiento de fibroblastos regula el desarrollo del telencéfalo rostral, sin embargo, no se sabe con exactitud lo involucrado que está específicamente en la maduración de la CPF (Fuster, 2015).

Varios padecimientos y trastornos son relacionados con la disrupción de la CPF debido a su desarrollo tardío. Algunas de ellas son las enfermedades del espectro autista y esquizofrenia (Teffer & Semedeferi, 2012).

1.1.1.1 Aferencias y eferencias

La CPF es un área integrativa de estímulos tanto sensoriales como motores. Las conexiones de la CPF comprenden las vías aferentes y eferentes, de manera general, las conexiones aferentes proveen al área cortical con información sobre la percepción y procesos de memoria que ocurren en áreas subcorticales mientras que las vías eferentes refieren la información procesada a otras áreas corticales y subcorticales (Petrides, *et al.,* 2012)*,*

La corteza orbitofrontal medial se encuentra altamente conectada al hipotálamo (Small, *et al*., 2001) y se les atribuye la regulación del comportamiento emocional (Fuster, 2001) mientras que la CPF lateral está conectada con la corteza occipital, la ínsula y la parte anterior del lóbulo temporal (Small, *et al.,* 2001) y, en un nivel alto de procesamiento, se encarga de sintetizar información visual, somatosensorial y auditiva, dando apoyo cognitivo a la organización temporal del comportamiento, el habla y el razonamiento (Fuster, 2001). Las conexiones recíprocas de la CPF que contribuyen a la formación de asociaciones y memoria se

originan con regiones subcorticales como la amígdala, el hipocampo y el subículo (Van Eden & Buijs,2000).

La conexión entre el sistema límbico, el núcleo caudado y la corteza orbitofrontal se da a través del fascículo uncinado, región involucrada en el procesamiento de emociones y recompensa (Teffer & Semedeferi, 2012).

1.1.1.2 Histología

En la corteza cerebral, entre un 70 y 80% está compuesta por células excitatorias, las cuales pueden ser células espinosas estrelladas o células piramidales (Banister, 2005). Petrides (2012) aclara la presencia de neuronas piramidales entre las capas II y VI tanto en humanos como en macacos. Sin embargo, en la capa IV predominan las espinosas estrelladas (Fig. 3) (Banister, 2005) y las neuronas multipolares de axón corto o Golgi tipo II (Fuster, 2015). La capa III predomina la concentración de receptores de dopamina (Fuster, 2015).

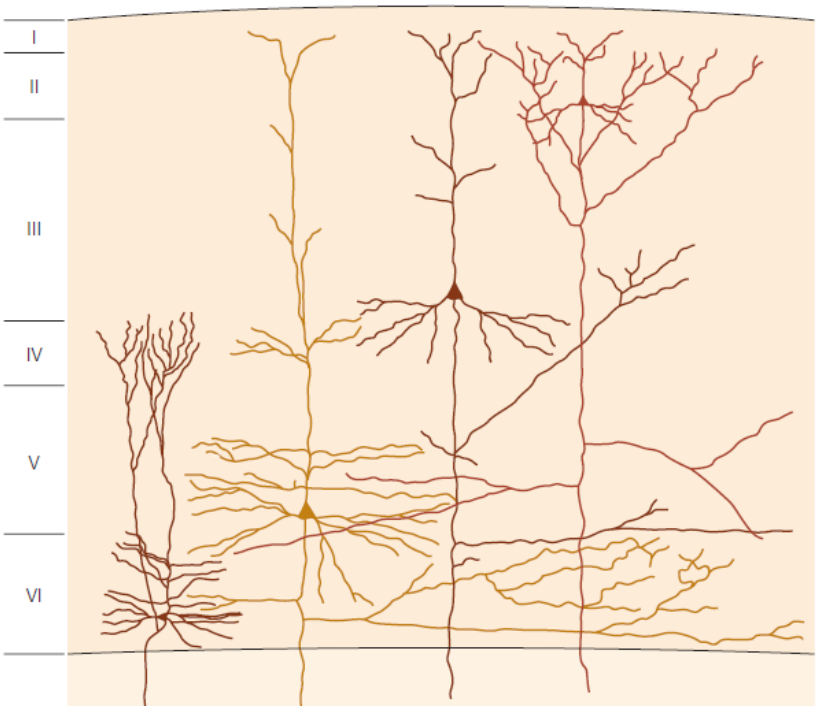


Figura 3. Capas de la corteza (Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum, & Hudspeth, 2012)

1.1.1.3 CPF de rata

En términos anatómicos y cognitivos, la corteza prefrontal en roedores no presenta el mismo nivel de complejidad que la de mamíferos superiores (Kesner & Churchwell, 2011) además que la capa IV o lámina granular sólo es encontrada en primates (Liu, *et al*., 2021). Sin embargo, las funciones de la CPF del roedor incluyen similitudes con aquellas del humano. La CPF está involucrada en el procesamiento sensorial, preparación de la actividad motora, funciones emocionales y viscerales (como expresión del miedo y aversión), procesamiento del valor y recompensa, atención, memoria de trabajo, toma de decisiones, procesamiento del monitoreo y predicción, discriminación contextual, memoria al corto plazo y de largo plazo (Le Merre, *et al*., 2021).

Extrapolar la corteza prefrontal de un humano a una rata es más fácil en cuestiones de conectividad que en criterios citoarquitectónicos o topográficos (Fuster, 2015). La ubicación de la CPF en rata se determinó mediante las aferencias del núcleo dorsomedial talámico y de las células dopaminérgicas localizadas en el área ventral tegmental (AVT). Las zonas que comprenden la CPF en rata son: del lado ventral área insular agranular dorsal (AID) y ventral (AIV), área límbica (IL), prelímbica (PL), cingulada anterior (Cg1) (Krettek & Price, 1977) (Vertes, 2004) (Gonzalez-Islas & Hablitz, 2001) área motora secundaria (MOs) y áreas orbitales: lateral (ORBl), ventrolateral (ORBvl) y medial (ORBm) (Le Merre, *et al.,* 2021).

La CPF del roedor es subdividida en tres regiones: CPF dorsomedial (dmPFC) compuesta por MOs y Cg1, CPF ventromedial (vmPFC) que la comprende PL, IL, ORBvl y ORNm , y por último la corteza PF ventrolateral (vlPFC) que es el área ORBl (Le Merre, *et al*., 2021) (Fig 4).

La dmCPF está involucrada en procesos sensorimotores debido a la conexión con el área motora primaria (MOp) y las áreas somatosensoriales primarias (SSp) y suplemettarias (SSs). El área vlCPF se relaciona al sistema límbico por lo que tiene una influencia directa con los procesos de recompensa. La vlCPF presenta eferencias del núcleo olfatorio anterior (AON), corteza piriniforme (PIR), corteza gustativa (GU) y corteza visceral (VISC). El área ventromedial de la CPF se encuentra conectada a AVT, núcleo basolateral amigdalar (BLA) y núcleo accumbens (Le Merre, *et al*., 2021).

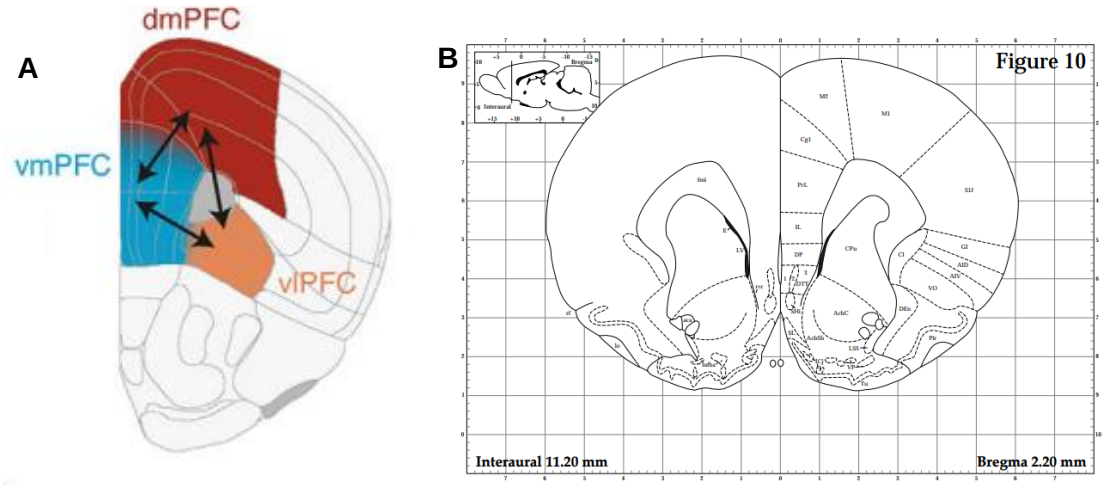


Figura 4. A CPF de rata (Le Merre P., Ährlund-Richter, S., & Carlén, M., 2021). B Vista coronal de la corteza prefrontal de rata +2.2 mm anterior a bregma (Paxinos & Watson, 1998)

Debido a su identidad límbica, la CPF se ve altamente involucrada en los procesos de toma de decisiones, formación de secuencias para realizar una acción e involucrar las emociones y memorias. A su vez, afecta patrones de aprendizaje, recompensa y condicionamiento del dolor (Le Merre*, et al.,* 2021).

La CPF de roedor está compuesta aproximadamente de 82% neuronas excitatorias, 17% neuronas inhibitorias y 1% neuronas neuromoduladoras (dopaminérgicas, serotoninérgicas y colinérgicas) (Le Merre, *et al*., 2021).

En las ratas, la CPF medial está compuesta de 5 capas (excluyendo la número IV). La primera capa, la más superficial contiene dendritas apicales de células piramidales corticales y somas de interneuronas GABAérgicas *slow-spiking* que proveen acción inhibitoria en las dendritas de las células piramidales. Las capas II y III contienen los somas de pequeñas células piramidales y diversos tipos de interneuronas incluyendo tanto slow- como fast-spiking. En cuanto a las capas V y VI, poseen somas de neuronas piramidales de gran tamaño y predominan las interneuronas fast-spiking (Puig, 2011).

1.1.2 Glutamato

El glutamato es un aminoácido no esencial y el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso. Dentro de sus funciones se encuentra la

diferenciación neuronal, migración y supervivencia durante el neurodesarrollo, además de contribuir a la consolidación de memorias que es la base del aprendizaje a largo plazo. Sin embargo, también es el neurotransmisor involucrado en los procesos de citotoxicidad y neurodegeneración (Meldrum, 2000).

Es sintetizado a partir de la glutamina la cual se hidroliza por las neuronas glutamatérgicas, posteriormente, el glutamato puede ser convertido en ácido-gamma-aminobutírico (GABA) gracias a la enzima ácido glutámico descarboxilasa (Bak, *et al*., 2006). El glutamato es liberado por los astrocitos después de un aumento de calcio intracelular tanto en astrocitos como en neuronas a su alrededor (Fig 5).

La manera en la que el glutamato es eliminado del espacio intercelular es a través de la recaptación por proteínas transportadoras presentes en los astrocitos, una vez dentro de la célula, es convertida en glutamina ya que esta es liposoluble y facilita su transporte de vuelta al botón sináptico donde se convertirá de nuevo en glutamato y completar el ciclo (Mahmoud, *et al*., 2019). Hasta ahora no se conocen enzimas degradadoras de este neurotransmisor (Zhou & Danbolt, 2014).

Actualmente se sabe de tres tipos de canales glutamatérgicos ionotrópicos (Meldrum, 2000) y ocho canales de carácter metabotrópico divididos en tres familias (Niswender & Conn, 2010). Los canales permeables a cationes o inotrópicos están compuestos de cuatro subunidades y poseen un dominio extracelular amino terminal, un dominio extracelular de unión a ligando, dominio transmembranal y dominio intracelular carboxi terminal (Mahmoud, *et al*., 2019). Estos canales son el AMPA (*alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) que es permeable a sodio, NMDA (*N-methyl-D-aspartate)* que es permeable a calcio y el receptor de kainato (Meldrum, 2000). Los receptores metabotrópicos o mGluR se dividen en la familia uno mGluR1 y mGluR5, la segunda familia mGluR2 y mGluR3, mientras que la familia tres incluye a mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8 (Niswender & Conn,2010).

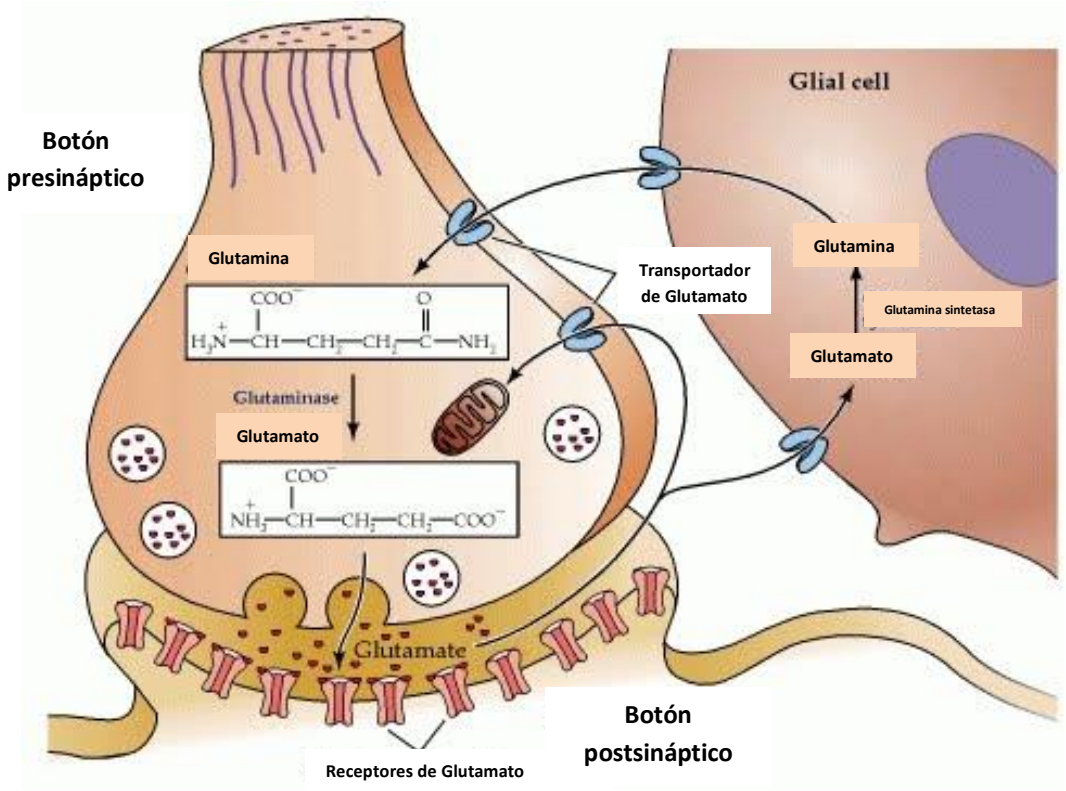


Figura 5. Metabolismo del glutamato (Purves, 2008)

1.1.2.1 Receptores NMDA

En la sinapsis glutamatérgica, los primeros receptores en ser activados son los AMPA que presentan una activación, desensibilización y desactivación rápida en un rango entre los 0.7 y 5 milisegundos. En la ola de entrada iónica de sodio provoca una activación del canal de NMDA al remover el ion de magnesio que bloquea la entrada, produciendo una respuesta de cinética lenta a comparación de AMPA. Su activación ocurre en milisegundos, la desactivación ronda entre los diez y miles de milisegundos mientras que la desensibilización es relativamente débil (a partir de los 365 milisegundos) o nula (Traynelis, *et al*., 2010).

Los receptores tetraméricos de NMDA consisten en combinaciones de tres subunidades clasificadas en los grupos NR-1, NR-2 y NR-3. Cada grupo conforma cierto número de isoformas que determinan las características farmacológicas y biofísicas del receptor (Heresco, *et al.,* 2013), éstas son llamadas GluN seguido del número de grupo y su subclasificación (Vyklicky, *et al.,* 2013), a excepción del NR-1 que no posee variaciones. El grupo NR-2 se clasifica de GluN2A a GluN2D, y el grupo NR-3 en GluN3A y GluN3B (Fig 6) (Heresco, *et al*., 2013).
Usualmente los canales se conforman por dos NR-1 y dos NR-2. De acuerdo a la literatura convencional, para activar un canal de esta índole, se requiere de cuatro

ligandos, dos moléculas de glutamato y dos moléculas de glicina (Vyklicky, *et al*., 2013), las cuales interactúan en el sitio de unión alostérico también llamado sitio modulador de glicina (Heresco, 2013). Sin embargo, se ha demostrado que moléculas como la D-serina, L-serina, D-alanina y L-alanina también fungen como agonistas con una CE50 (concentración efectiva 50) en un rango micromolar de 0.65, 77, 0.89 y 36 respectivamente (Vyklicky, *et al.,* 2013), aumentando el tiempo de apertura del canal (Heresco, 2013).

Por otro lado, Islas *et al.* (2022) comprobaron que el receptor NMDA no requiere la molécula de glicina para ser activado a nivel central. Además, se menciona que la acetilcolina también es afín al sitio de unión.

Existe una variación de NMDAR compuestos de NR-1 y NR-3 (Vyklicky, *et al*., 2013); como se mencionó anteriormente, NR-3 puede ser GluN3A o GluN3B. GluN3B se presenta mayormente en neuronas motoras mientras que NR3A se encuentra difundido en la corteza. La composición GluN1/GluN3 son inafectados por glutamato o NMDA a pesar de ser canales clasificados bajo ese neurotransmisor, en cambio, son activados exclusivamente por glicina, haciéndolos un canal excitatorio de glicina contrario al hecho de que dicho neurotransmisor aminoacídico se considera mayormente inhibitorio (Chatterton, *et al*., 2002).

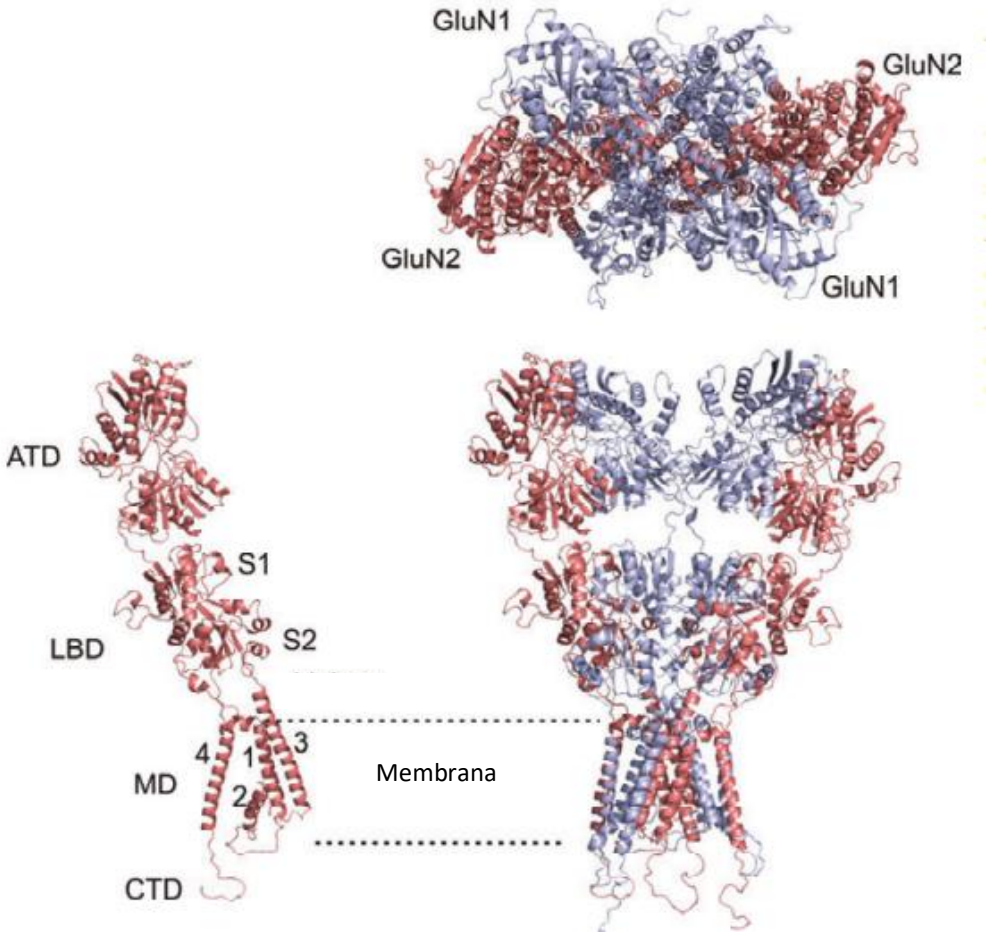


Figura 6. Modelo tetramérico de receptor GluN1/GluN2 (Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M. & Vyklicky, L., 2013)

1.1.2.2 Glicina

La glicina es un aminoácido no esencial sintetizado a partir de serina, colina hidroxiprolina y treonina a través del metabolismo intraorgánico principalmente en riñones e hígado (Razak, *et al*., 2017). Es un neurotransmisor inhibitorio a nivel troncoencefálico y medular debido a su similitud con los receptores GABAa por la permeabilidad a cloro (Hernandes & Troncone, 2009). Existen dos tipos de transportadores de glicina denominados, GLYT1 y GLYT2. EL neurotransmisor se encuentra naturalmente en el medio extracelular, su concentración en el fluido cerebroespinal es aproximadamente 4.2 micromolar (Vyklicky, *et al.*, 2013) sitio donde se encuentra en mayor cantidad a comparación del resto del sistema nervioso. Hernandes y Troncone (2009), establecen la posibilidad que su producción sea a nivel espinal y un proceso desconocido a nivel SNC, sin embargo,

Kure y cols. (1997) establecieron la posibilidad de que GCS (*glycine cleavage system*) sea el regulador de glicina a nivel de los receptores NMDA.

Los receptores de glicina se encuentran principalmente en médula espinal y en cierta cantidad en cerebro, sobre todo en tallo cerebral. En un experimento realizado por Araya y colaboradores en 2021, realizaron una potenciación farmacológica de receptores de glicina en AVT y CPF. Concluyeron que el efecto observado sólo se presentó en AVT y no en CPF. Por otro lado, en el laboratorio de Neuromodulación se han realizado experimentos sobre los efectos del bloqueador selectivo al receptor de glicina, estricnina. Concluyeron que la glicina puede presentar efectos tanto potenciadores como inhibidores, dependiendo del potencial en reposo que se encuentre la célula.

La hiperglicinemia no cetósica consiste en una mutación que lleva al mal funcionamiento del proceso GCS irrumpiendo en la degradación de la glicina. Los niveles altos de glicina en sangre y fluido cerebroespinal en neonatos, da como resultado diversos síntomas neurológicos como hipotonía, mioclonías, convulsiones y, en su mayoría, la muerte. Esto se debe a la acción excitatoria de la glicina a nivel corteza, principalmente actuando a través de los canales de NMDA (Kure, *et al*., 1997).

1.1.3 Dopamina

La dopamina (DA) es una hormona y neurotransmisor de la familia de las monoaminas. Pertenece a las catecolaminas y es precursora de la noradrenalina y la adrenalina (Webster, 2001). Su fórmula molecular es $C_8H_{11}NO_2$, también se le conoce como 3,4-dihidroxifeniletilamina y de acuerdo a la IUPAC, 4-(2-aminoacetil) benceno-1,2-diol (NCBI, 2020).

La DA se adhiere a los receptores adrenérgicos metabotrópicos alpha-1 y beta-1 (NCBI, 2020). Dentro de sus funciones principales está la regulación de neuronas motoras, memoria espacial, motivación, excitación, náusea, recompensa, placer (Klein, *et al.,* 2018), alimentación, afecto, aprendizaje, además de regular procesos fisiológicos como el olfato, funciones cardiovasculares, regulación hormonal, retinal, simpática, inmunológica, renal, entre otras (Beaulieu &

Gainetdinov, 2011). La presencia de dopamina es esencial en la CPF debido a su papel importante en la cognición tanto en ratas (Zahrt, *et al.,* 1997) como en humanos (Yang, *et al.*, 1999) y primates, sobre todo en la porción dorsolateral de la CPF (Arnsten, Wang & Paspalas, 2015).

En un cerebro humano de 40 años, existe un aproximado de 350, 000 células dopaminérgicas, en macacos ronda los 165, 000 mientras que en la rata circula los 45, 000 células (Chinta & Andersen, 2005).

1.1.3.1 Metabolismo de la dopamina

Al ser una catecolamina, se deriva del aminoácido tirosina (Tyr) e indirectamente de la L-fenilananina, ya que esta es convertida en Tyr a partir de la enzima fenilananina hidroxilasa. La DA y sus derivados son producidos principalmente en el SNC y en algunos órganos periféricos como los riñones y el intestino. La vía metabólica principal se lleva a cabo en el citosol, la tirosina hidroxilasa convierte a la tirosina en levodopa (L-DOPA) en presencia de los cofactores tetrahidrobiopterina (BH4), oxígeno y hierro (Fe2+). Posteriormente la DOPA descarboxilasa usa el cofactor piridoxal fosfato para finalmente convertir la L-DOPA en DA (Klein, *et al.*, 2018) (Fig 7)

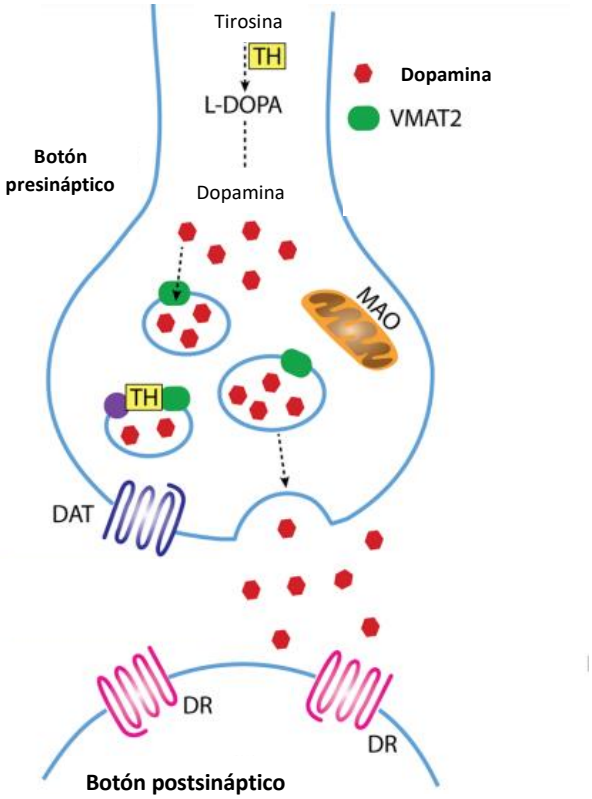


Figura 7. Metabolismo de la dopamina (Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G., 2019).

La DA es sensible a la oxidación y esto se evita en el ambiente ácido de las vesículas sinápticas. La monoamina oxidasa B (MAO-B) es la responsable de su oxidación, la convierte en 3,4-Dihidroxifenilacetaldehido (DOPAL), la aldehído deshidrogenasa (ALDH) la convierte en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) finalmente convertida en ácido homovanílico (HVA) por la catecol-O-metiltransferasa (COMT), la COMT a su vez, puede convertir directamente la DA en 3-metoxitiramina (Klein, *et al.*, 2018).

1.1.3.2 Receptores dopaminérgicos

Los receptores dopaminérgicos D1, D2, D3, D4, y D5 son de carácter metabotrópico y se dividen en familia D1 y D2 (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Actualmente existen diversos tratamientos terapéuticos enfocados en el control de las corrientes dopaminérgicas para regular trastornos neuropsiquiátricos como bipolaridad, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia y depresión (Beaulieu, *et al*., 2015).

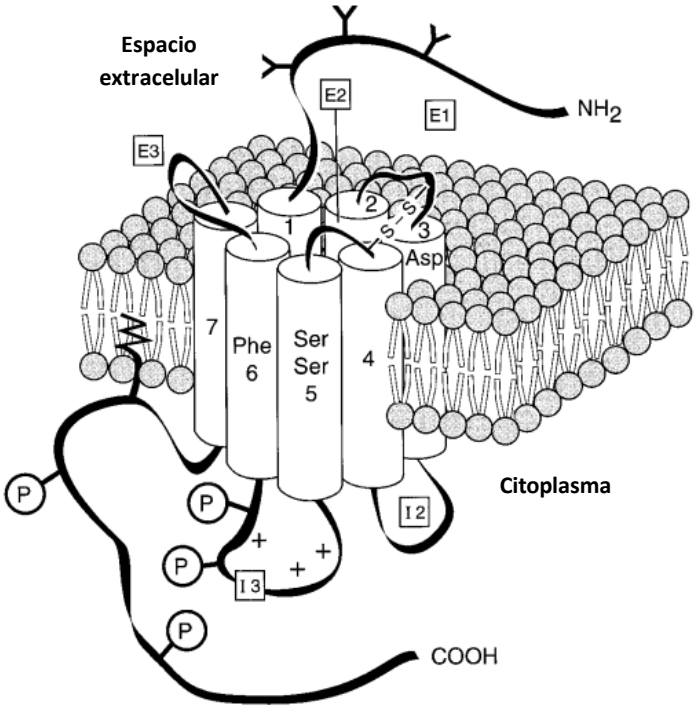


Figura 8. Representación del receptor D1 (Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G., 1998).

La familia D1 compuesta por los receptores D1 y D5 son receptores acoplados a proteína Gs activando la adenilato ciclasa. La familia D2 está conformada por D2, D3 y D4, los cuales están acoplados a proteínas Gi que inhiben la adenilato ciclasa y activan canales de potasio (Missale, *et al.,* 1998) (Fig 8). Según Mrzljak y colaboradores (2007), los receptores D5 responden 10 veces más que los receptores D1.

En la CPF del mono *rhesus*, específicamente en el área dorsolateral, predomina la presencia de receptores D1 en las capas supragranulares (II y III) y en la V, mientras que los receptores D5 se encuentran en menor cantidad y distribuidos uniformemente en espinas dendríticas (Mrzljak, *et al.,* 2007).

La transmisión dopaminérgica ocurre de dos maneras. La señalización tónica hace referencia a un mantenimiento constante de niveles normalmente bajos de DA (4 nMolar en NAcc) y activa principalmente a receptores de la familia D2. Contrariamente, la señalización fásica ocurre en periodos cortos de tiempo y los niveles de DA aumentan considerablemente (1.6 mMolar en NAcc) y activa receptores de la familia D1 (Fig 9) (Moore & Grace, 1999) (Hauber, 2010).

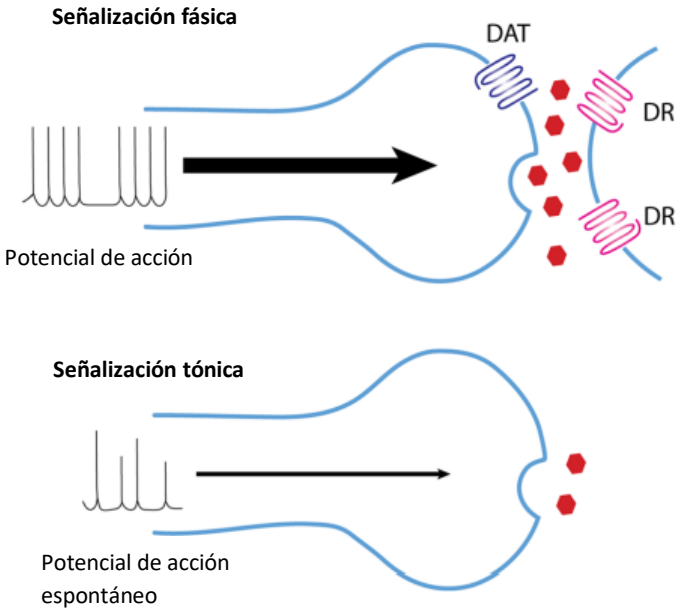


Figura 9. Ilustración de corriente dopaminérgica fásica y tónica (Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G., 2019).

1.1.3.3 Vías dopaminérgicas

La DA proviene de las neuronas dopaminérgicas de tipo A8, A9 y A10 (Hauber, 2010) ubicadas en diencéfalo, mesencéfalo y bulbo olfatorio. El 90% de estas células se encuentran en el mesencéfalo ventral. Las neuronas del grupo A8 se encuentran en el área retrorubral, las A9 en sustancia negra y las A10 en el área ventral tegmental (Björklund & Dunnett, 2007). Es a partir de la substancia *nigra pars compacta* donde se origina una de las cuatro vías dopaminérgicas del cerebro (Chinta & Andersen, 2005) mostradas en la figura 10.

La vía nigroestriatal comienza en la substancia negra y las fibras llegan al núcleo caudado y putamen en el estriado. La función principal recae en los movimientos voluntarios finos.

Como segunda vía está la mesolímbica, ésta se origina en el AVT y proyecta principalmente hacia núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, septum, amígdala e hipocampo. La vía mesocortical comprende asimismo del AVT que inerva hacia CPF, cíngulo y corteza perirrinal. La segunda y tercera vía, ya que suelen concurrir áreas cercanas, suelen referirse como una sola, la vía mesocorticolímbica.

Y como última está la vía tuberoinfundibular la cual comprende la transmisión de DA de hipotálamo a hipófisis (Chinta & Andersen, 2005).

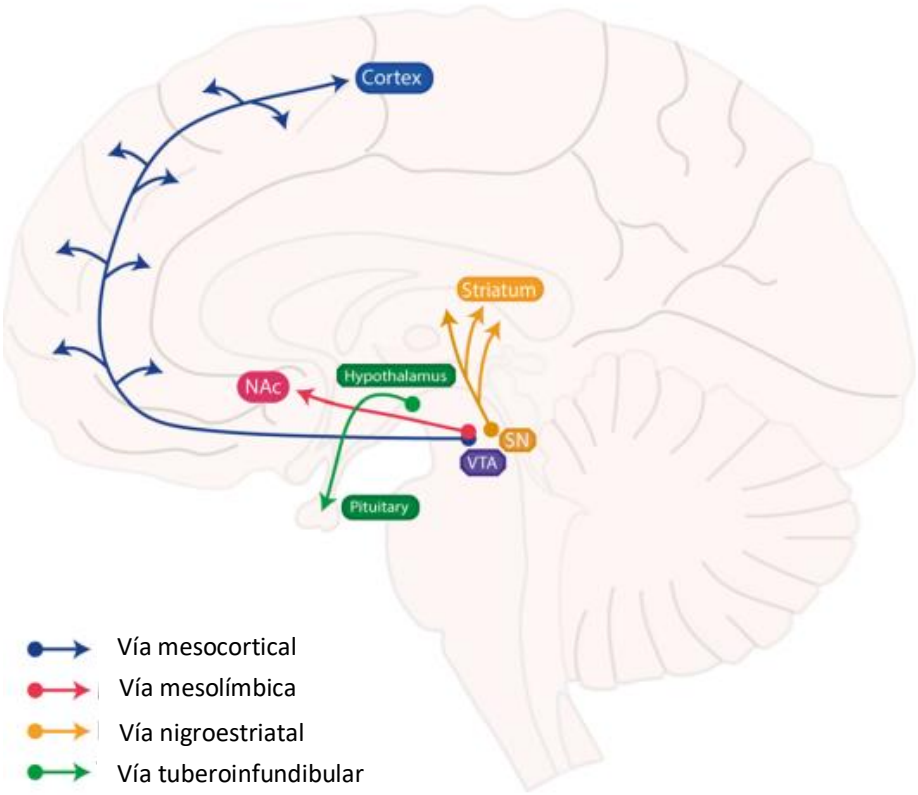


Figura 10. Vías dopaminérgicas (Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G., 2019).

1.1.4 Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno emocional y psicótico caracterizado por la distorsión de la realidad. Estos pacientes presentan síntomas positivos como: alucinaciones y delirios; síntomas negativos: retracción social y apatía, así como síntomas cognitivos, caracterizados por la dificultad para pensar, expresión de los pensamientos, razonamiento, atención y memoria (Dziwota, 2018). La incapacidad de interacción social causa principalmente carga emocional excesiva en el paciente, desencadenando el surgimiento de trastornos como ansiedad y depresión (Thornicroft, 2004).

Los mecanismos neurobiológicos subyacentes a la manifestación de este desorden son inciertos. Para explicar la sintomatología se han planteado diversas ideas. La literatura indica que la patofisiología recae en el déficit de actividad

GABAérgica de la CPF y su desconexión con el resto del cerebro. La hipótesis de desconexión indica como origen un fallo en la plasticidad neuronal y una neuromodulación anómala en la expresión y función del receptor NMDA debido a los neurotransmisores neuromoduladores DA, serotonina y acetilcolina (Gao, *et al.*, 2022).

En la patología se demostró un aumento de la concentración de DA en las vías tuberoinfundibular, nigroestriatal y mesolímbica, mientras que la DA disminuye en la vía mesocortical. Por otro lado, “la teoría glutamatérgica de la esquizofrenia” que asocia el cuadro clínico con una hipofunción de los receptores de glutamato tipo NMDA en las fibras Corteza-Tálamo, dando como resultado una reducción de la inhibición Talámica. Esto genera un exceso de percepción sensorial en el individuo, ocasionando los signos positivos de la enfermedad (Egerton, 2020).

1.2 Antecedentes Específicos

1.2.1 Efecto de la DA sobre corrientes de NMDA en presencia de glicina

De acuerdo a Flores-Hernandez y cols. (2002) en neuronas de corteza estriada, la activación de receptores D1 con ayuda del agonista SKF 81297 resulta en un aumento de la corriente NMDA en presencia de glicina. Por otro lado, Pickel y cols. (2006) demostró en células neuronales de la amígdala basolateral que la DA disminuye la corriente de NMDA.

Ahora, en un estudio de Wang y cols. (2003) en neuronas de corteza prefrontal, establece que mediante el agonista PD168077 de D4 (perteneciente al grupo D2) muestra una inhibición en la corriente de NMDA además de reducir la expresión del receptor de NMDA en la membrana.

Otro estudio realizado por Leyrer-Jackson y Thomas (2018) confirma la potenciación de la corriente de NMDA a causa de la activación de D1 en neuronas de CPF, sin embargo, establece que dicho aumento sólo se observa en neuronas de la capa V.

2. Justificación

La dopamina se propuso como modulador de la corriente de NMDA y los resultados observados han sido diferentes dependiendo del área cortical. En corteza prefrontal se observó una activación de canales tipo D1 y aumentando la corriente de carácter glutamatérgico en presencia de glicina.

El registro de las corrientes de NMDA en experimentos realizados, es en presencia de glicina al 10µM. Como ya fue mencionado anteriormente, la glicina es un factor excitatorio en la corriente de NMDA mas no es necesario como activador de esta.

Basándonos en la evidencia de la ausencia de neuronas glicinérgicas a nivel telencéfalo y los experimentos realizados previamente en el laboratorio de neuromodulación, el demostrar los efectos de la dopamina sobre las corrientes de NMDA en ausencia de glicina, tiende a representar el efecto puro de la dopamina sin aumento o disminución provocada por glicina sobre la corriente glutamatérgica.

3. Hipótesis

La dopamina en ausencia de glicina tendrá un efecto potenciador sobre la amplitud de la corriente activada por NMDA.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar los efectos excitatorios o inhibitorios de la dopamina (1nM, 100nM y 1uM) sobre la corriente activada por NMDA en ausencia de glicina en neuronas piramidales de corteza prefrontal de rata.

4.2 Objetivos específicos

Identificar si la respuesta de la corriente NMDA 100 µM ante tres concentraciones de dopamina (1nM, 100nM y 1uM) en ausencia de glicina en neuronas piramidales de corteza prefrontal de rata es de carácter potenciador o inhibidor.

5. Metodología

5.1 Disociación aguda

La metodología llevada a cabo fue descrita por Flores Hernández *et al.* (2009) y Bargas *et al.* (1994) realizando ciertas modificaciones.

La rata fue anestesiada con halotano, una vez comprobada la ausencia de reflejos, se hizo un corte en la unión occípito-atloidea. Se removió la piel superior de la cabeza y con ayuda de tijeras más pequeñas se hizo un corte sagital en dirección lambda-Bregma y dos cortes desde el foramen magno hacia la mandíbula. Con ayuda de pinzas de disección se removió el cráneo y con una espátula, se depositó el cerebro en 100 ml de solución de isetionato a baja temperatura conteniendo NaCl, 2 KCl, 2 MgCl2, 0.1 CaCl2, 23 glucosa, 15 HEPES, pH 7.4, 300-310 mOsm/L, suplementada: ácido kinurénico (1 mM), NG – nitro – L – arginina (0.1 mM), ácido pirúvico (1 mM) y glutatión (0.005 mM), gaseada en oxígeno. Se esperó

unos segundos y el cerebro se extrae de la solución. Con ayuda de una navaja, se retiraron los bulbos olfatorios y se hizo un corte coronal entre el cerebelo y el telencéfalo.

Después, con un vibratomo (Campden) se hicieron cortes coronales del cerebro con un grosor de 350 µm sumergidas en la solución anterior de isetionato. De las rebanadas se obtuvieron la zona pre-límbica, IL y Cg1 (Bregma 4.2 a 2.2 mm) (Paxinos & Watson, 1997) (Figura 11). Los cortes reposaron al menos 1 hora a temperatura ambiente sumergidos en 50 ml de solución balanceada de Earl (EBSS, SIGMA) pH 7.4, 300-310 mOsm/L, burbujeada (95% O2 y 5% CO2) y suplementada: ácido kinurénico (1 mM), NG – nitro – L – arginina (0.1 mM), ácido pirúvico (1 mM) y glutatión (0.005 mM).

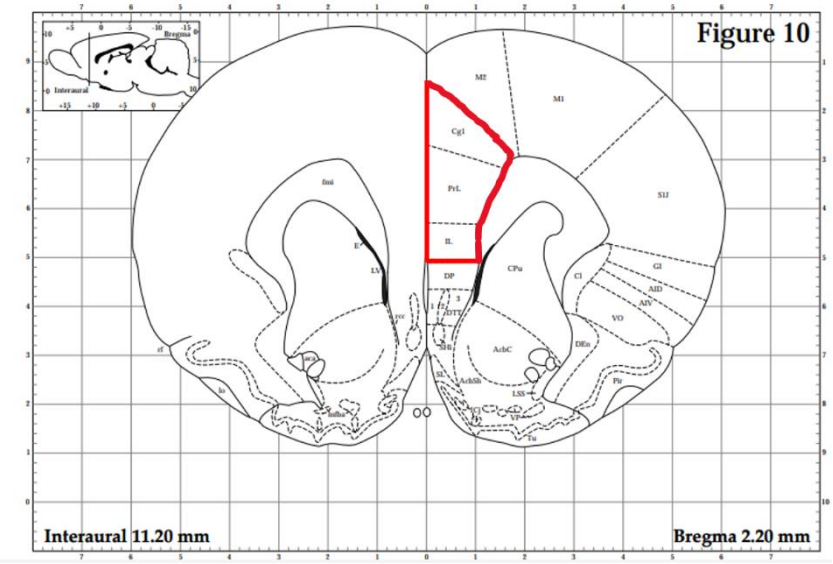


Figura 11. Corte coronal de cerebro de rata +2.2 mm anterior a bregma (Paxinos & Watson, 1998) se resalta el área prefrontal donde se realizó el corte.

El tratamiento enzimático se realizó sumergiendo la rebanada durante 10 minutos en 40 ml de solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) en constante oxigenación, amortiguada con HEPES a 35 ± 1 °C y suplementada: 0.75 mg/ml de papaína (Calbiochem) ácido kinurénico (1 mM), NG – nitro – L – arginina (0.1 mM), ácido pirúvico (1 mM) y glutatión (0.005 mM).

Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido se lavó con la solución de isetionato y posteriormente disociado mecánicamente con pipetas Pasteur pulidas al fuego para obtener diferentes diámetros de punta. La suspensión

de células se colocó en cajas Petri de 35 mm (Nunclon Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. La suspensión fue perfundida con una solución de fondo o *background* conteniendo (en mM): 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl2, 1 CaCl2 y 1% rojo fenol, burbujeada con O2, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300-310 mOsm/L; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa.

5.2 Técnica célula completa en protocolos de fijación de voltaje

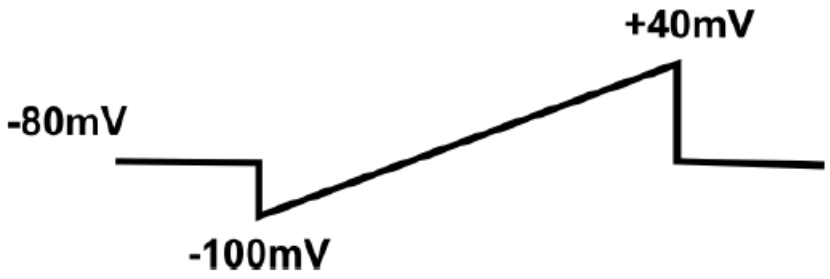
Se empleó la técnica de célula completa con fijación de voltaje (Bargas *et al.*, 1994). Los electrodos de registro fueron estirados de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI 1B120F4, Sarasota FL) utilizando un Micropipette Puller Modelo p-97, (Sutter Instrument Co). La solución interna utilizada en los registros de corriente está compuesta de (en mM): 175 N-Metil-D-Glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2 MgCl2, 10 ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter) -N, N, N', N'- tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na2ATP, 0.35 Na3GTP, 0.1 leupeptina, pH = 7.25 ajustado con H2SO4, 265-270 mOsm/L. La solución externa o Background compuesta de (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl2, 2 CaCl2, 12 glucosa, 10 HEPES, pH = 7.4 con NaOH, 300-305 mOsm/L. Los registros se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje (voltage clamp) Multiclamp 700 A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) y un digitalizador Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), controlados con el programa pClamp Versión 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ejecutándose en una computadora con procesador tipo Pentium IV (1.5GHz), 1 GB de memoria RAM y sistema operativo Windows XP SP3. La resistencia de los capilares de registro en el baño fue de 4-7 MΩ. Después de la ruptura del sello, la resistencia es menor a 25 MΩ. El potencial de mantenimiento de membrana fue de -80mV en el protocolo de generación de corriente de NMDA. Las neuronas piramidales fueron identificadas primeramente por la disección de la subregión correspondiente con ayuda del atlas "El cerebro de la rata en coordenadas estereotáxicas" (Paxinos *et al.*, 1998); y en segundo lugar, fueron identificadas por su morfología.

5.3 Protocolos electrofisiológicos

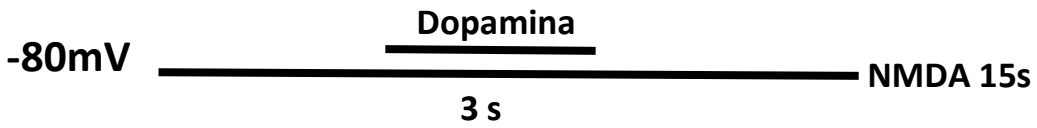
Para obtener las corrientes, se utilizó un sistema de dos capilares con un ángulo de 45° entre ellos y una distancia de 1 a 2 mm de la célula a registrar. Un capilar llevó la solución externa o de fondo (control: NMDA 100nM) y el otro llevó esta misma más dopamina en diferentes concentraciones. El intercambio de solución se realizó por la apertura de válvulas solenoides 98302-00 (Cole-Parmer) comandadas por la salida digital del sistema Digidata 1322A, y un aparato de control fabricado en el laboratorio. La célula es bañada por la solución del primer capilar con la solución control, después del cambio, la célula se bañó con la solución del segundo capilar conteniendo el ligando a probar durante 2s a 6s, según el protocolo empleado para posteriormente regresará la solución control.

Los protocolos empleados para el registro fueron:

Rampa (-100 mV a +40 mV) con una duración de 100 ms para generar las corrientes de Na+ y Ca2+ dependientes de voltaje. Con el objetivo de conocer las características funcionales de la célula.



Aplicación de dopamina en un medio de solución NMDA 100 µM y ácido ascórbico 200 µM, el potencial de mantenimiento fue de –80mV, se capturó 6s de registro, de los cuales 3s son para la aplicación de dopamina *y* evocar la corriente de estudio. La duración total del protocolo fue de 15s. Se establecieron tres condiciones experimentales en cada neurona: (1) control, (2) efecto y (3) lavado. De cada condición experimental se obtuvieron de 2-4 trazos estables al pico de la corriente y posteriormente se promediaron los trazos.



5.4 Análisis estadístico

Los ajustes fueron hechos en Origin 2023b (Microcal Software Inc) y MD pClamp Clampfit. Las gráficas fueron realizadas en SigmaPlot 11.0 (SYSTAT Software Inc.).

En el análisis estadístico primero se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk ($p<0.05$). Posteriormente se hizo análisis de varianza (ANOVA) de una vía con prueba *post-hoc* de Tukey $p<0.05$ para la comparación de porcentajes y una prueba de Dunnett $p<0.05$ para las gráficas de datos crudos.

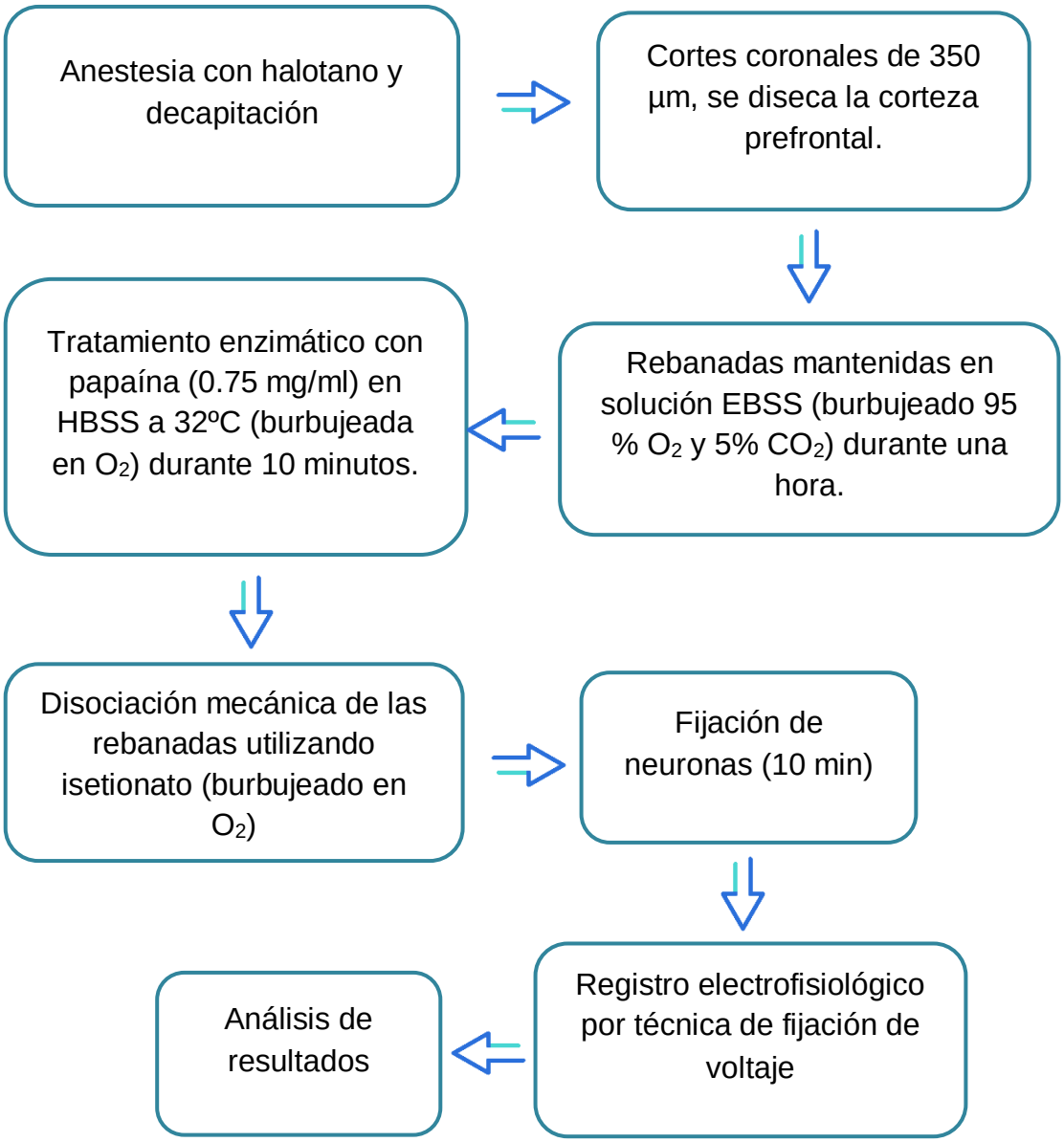
El efecto de la dopamina se calculó en porcentaje a través de la siguiente fórmula:

$$\textbf{\% de inhibición o potenciación} = \left(\frac{\text{Dopamina}}{(\text{Control} + \text{Lavado})/2} \right) * 100$$

Donde dopamina es el promedio de la amplitud del pico en presencia del ligando a evaluar. Control es el promedio de la amplitud del pico antes de hacer la aplicación del neuromodulador y lavado es el promedio del pico posterior a la aplicación.

6. Diagrama de trabajo

6.1 Disociación de neuronas



7. Resultados

7.1 Análisis electrofisiológico

De 12 ratas se registraron exitosamente 36 células (Fig. 14). La viabilidad de las células se evaluó mediante la resistencia mayor a 1GΩ y la medida de su área observada como capacitancia los valores oscilaron entre 5 y 18 pF (Fig. 12).

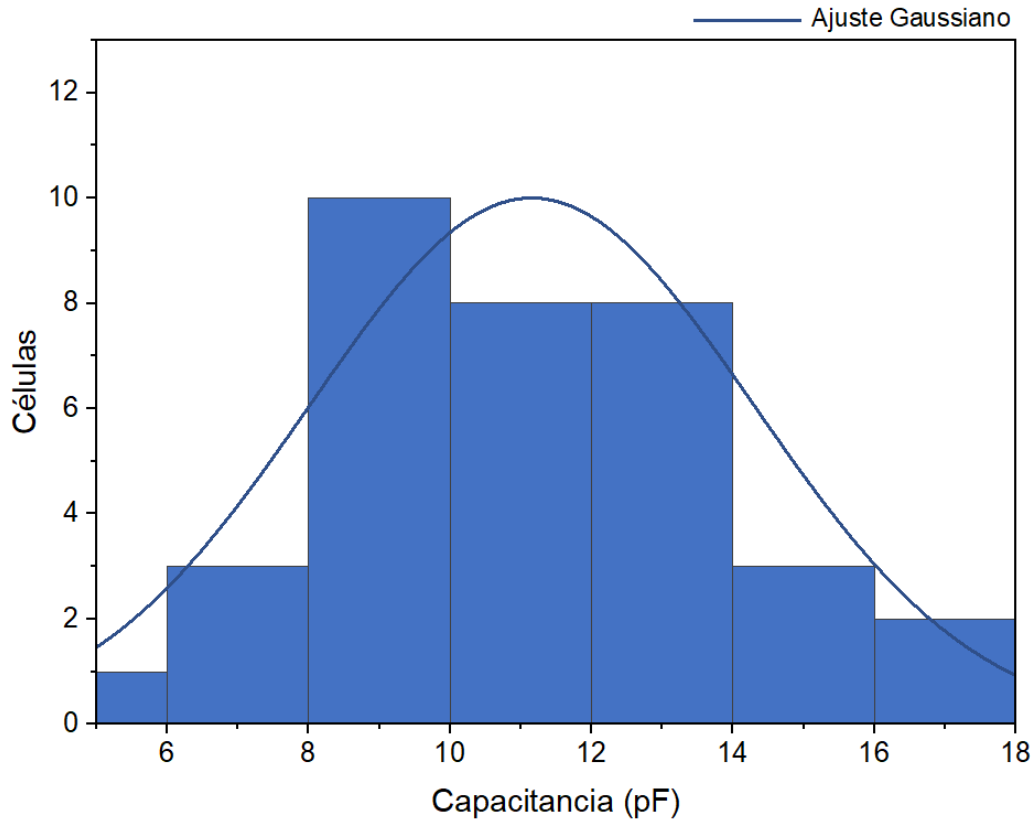


Figura 12. Histograma de frecuencia de capacitancia de neuronas. La mediana es 11.09 pF y una DS=3.13 (n=36).

De igual forma, el primer registro electrofisiológico realizado; la RAMPA (Fig. 13), fungía como determinante para determinar la viabilidad de la célula. Si la neurona presentaba corrientes de Na^{+} (sodio) y Ca^{2+} (calcio) dependientes de voltaje, la célula podía continuar con el protocolo de registro.

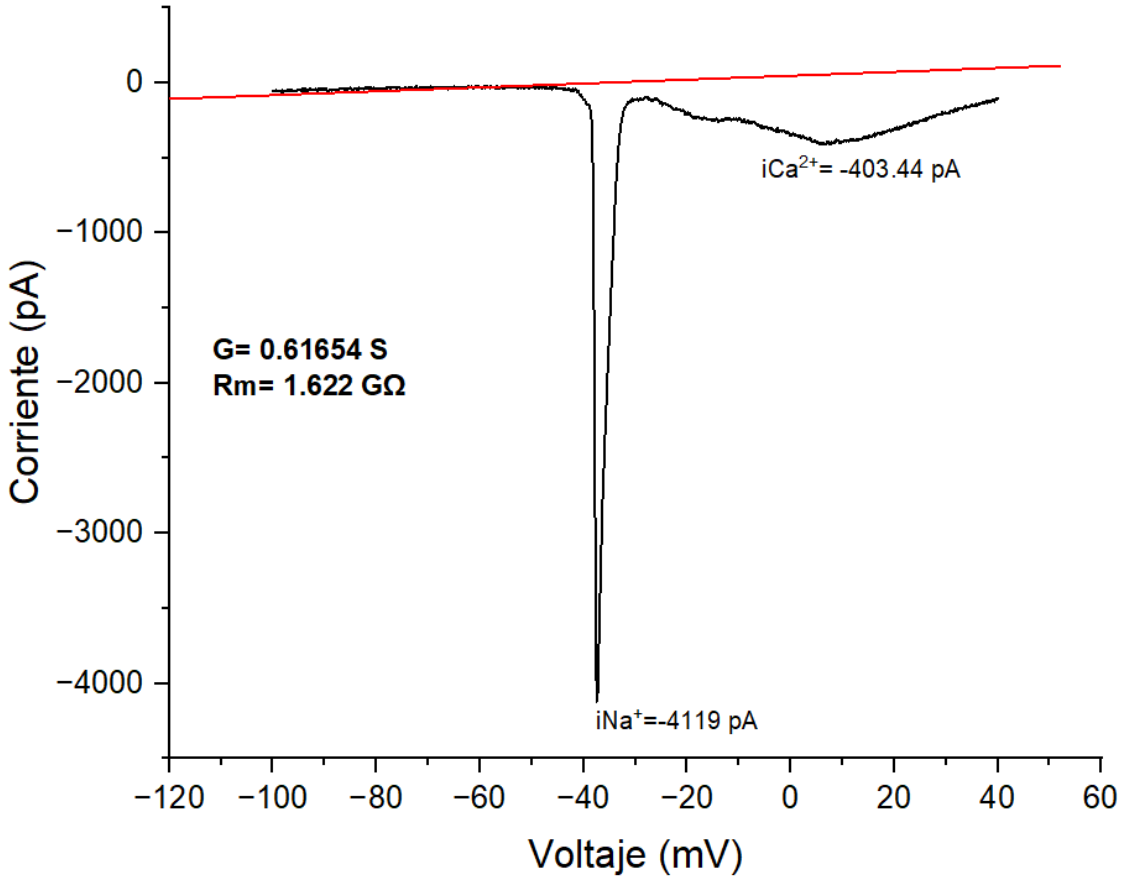


Figura 13. Trazo representativo de Rampa. Se observa una corriente de sodio (Na^+) de -4119 pA y una corriente de calcio (Ca^{2+}) de -403.44 pA. Además, de la recta (rojo) tocando entre puntos -90 y -70 correspondientes al eje X, se obtiene la pendiente (m) que equivale a la conductancia (G) de la membrana. La inversa de 0.61654 S (Siemens) corresponde a la resistencia de la membrana.

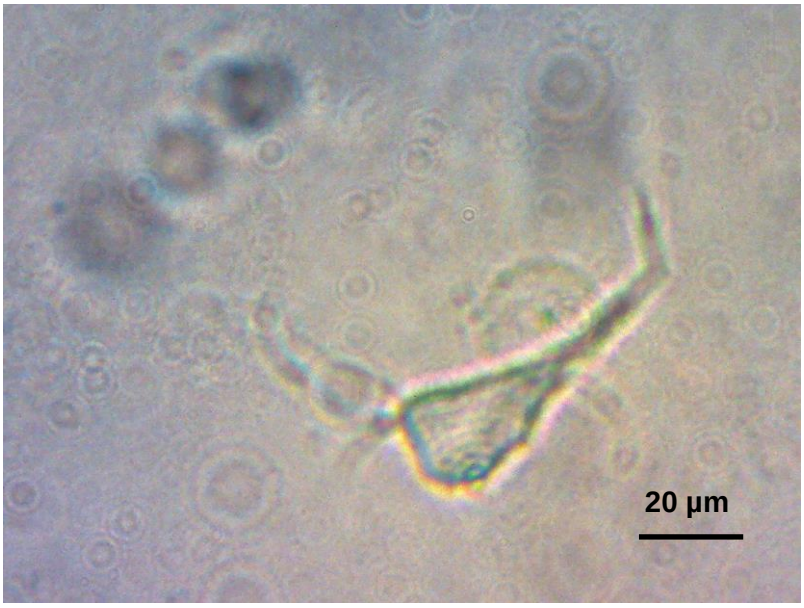


Figura 14. Micrografía de neurona piramidal disociada de corteza prefrontal (40x) Escala 20 µm.

Protocolo de aplicación de Dopamina

La corriente activada por NMDA en ausencia de glicina era graficada y se establecía como el control. Posteriormente, al añadir Dopamina (en una de las 3 concentraciones a evaluar) se establecía el efecto. Como último trazo, se retiraba la dopamina observando de nuevo la corriente de NMDA solo para establecer la condición del lavado (Fig. 15)

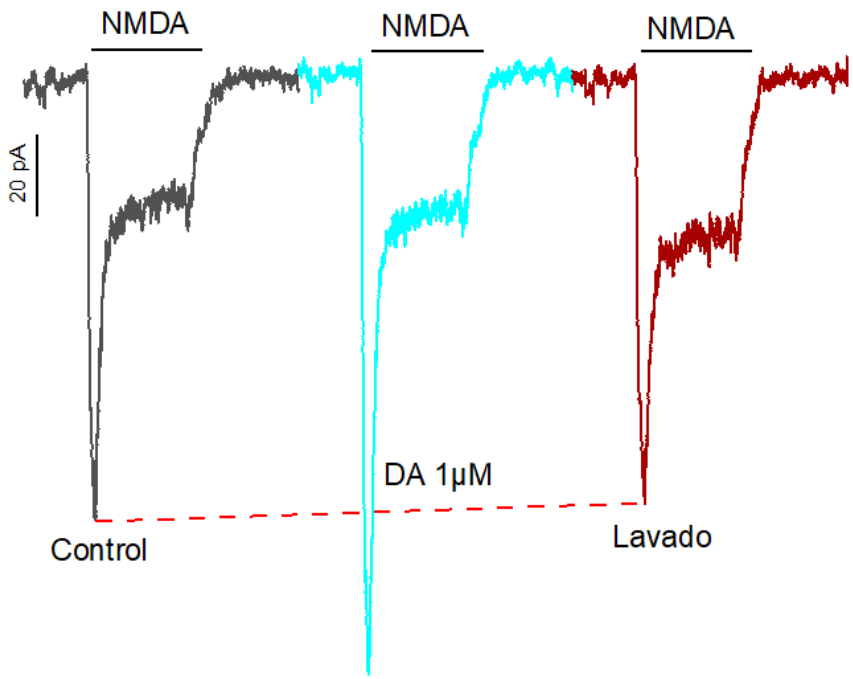


Figura 15. Trazo representativo del protocolo de aplicación de Dopamina. Se presenta un registro obtenido de una aplicación de dopamina 1 µM.

La aplicación de DA en las concentraciones 1 nM, 100 nM y 1 µM presentó tanto potenciaciones como inhibiciones de la corriente activada por NMDA en los tres grupos.

En la potenciación de la corriente de NMDA obtenida por 1 µM (Fig.16), graficando control, aplicación y lavado se obtuvieron diferencias significativas evaluadas por una prueba de Dunnett ($p<0.050$) tomando como referencia la aplicación de DA 1 µM, comparando contra control y lavado, ambas diferencias fueron estadísticamente significativas (*) (Tabla 1).

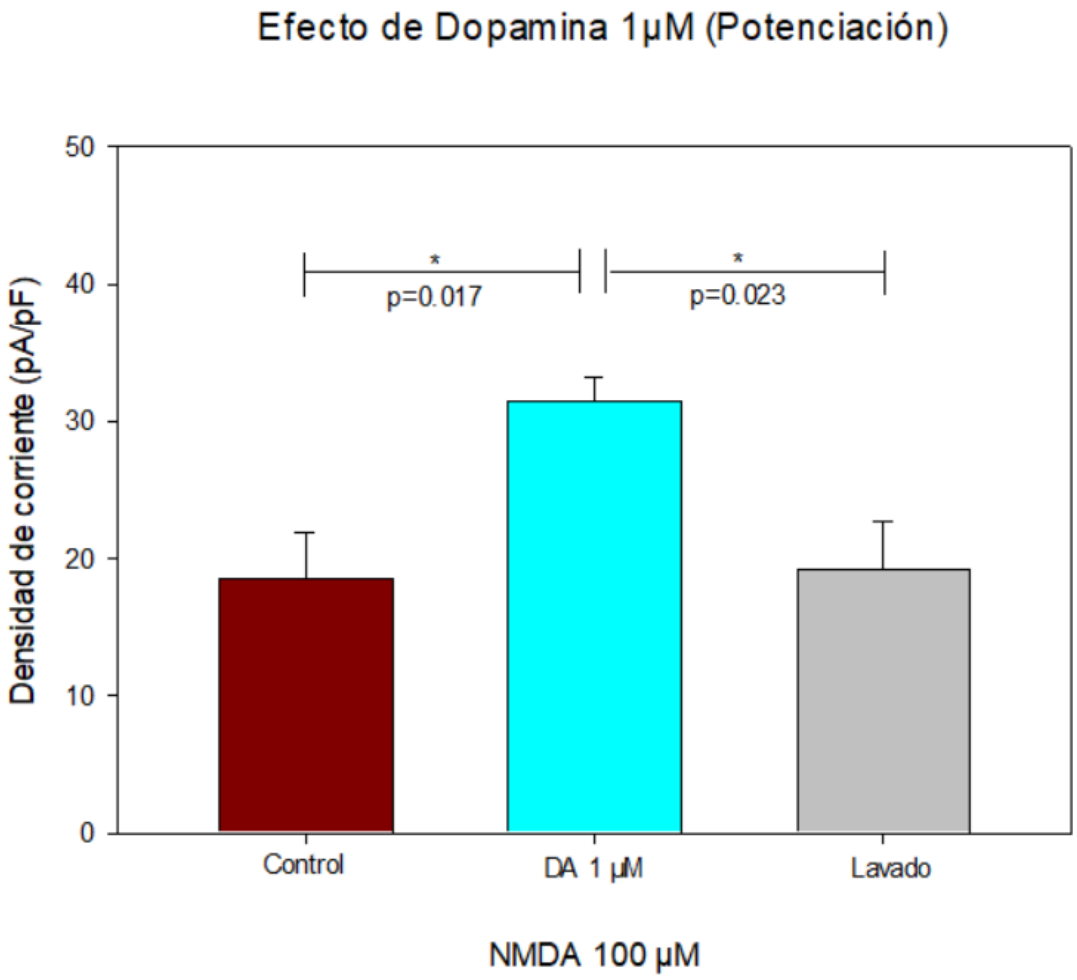


Figura 16. Densidad de corriente NMDA. Se grafica el control sólo en presencia de NMDA, la aplicación de DA en concentración 1 µM y posteriormente un lavado. Observamos que la aplicación tiene un efecto estadísticamente significativo. Entre control y aplicación con un valor p=0.017; entre aplicación y lavado presenta un valor de p=0.023. Los valores fueron obtenidos a partir de una ANOVA de un factor y un análisis post hoc de Dunnett.

Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Ctrl - 1uM	-12.98	4.21	(-23.51, -2.45)	-3.09	0.017
Lavado - 1uM	-12.29	4.21	(-22.82, -1.76)	-2.92	0.023

Nivel de confianza individual = 97.22%

Tabla 1. Prueba *post hoc* de Dunnett. Datos obtenidos del efecto excitador de la dopamina 1 µM sobre la corriente de NMDA (Figura 16).

Las células del grupo de aplicación dopamina 1 µM, el 45.46% de las células presentaron un aumento en la potenciación de la corriente NMDA (Fig.16). Por otro lado, el 54.54% restante presentó una inhibición en la corriente NMDA, sin embargo, las diferencias no fueron significativas. En la figura 17 se encuentra el gráfico de densidad de corriente (A) donde se percibe la disminución, acompañado de un trazo representativo (B) del protocolo de aplicación dopamina 1 µM.

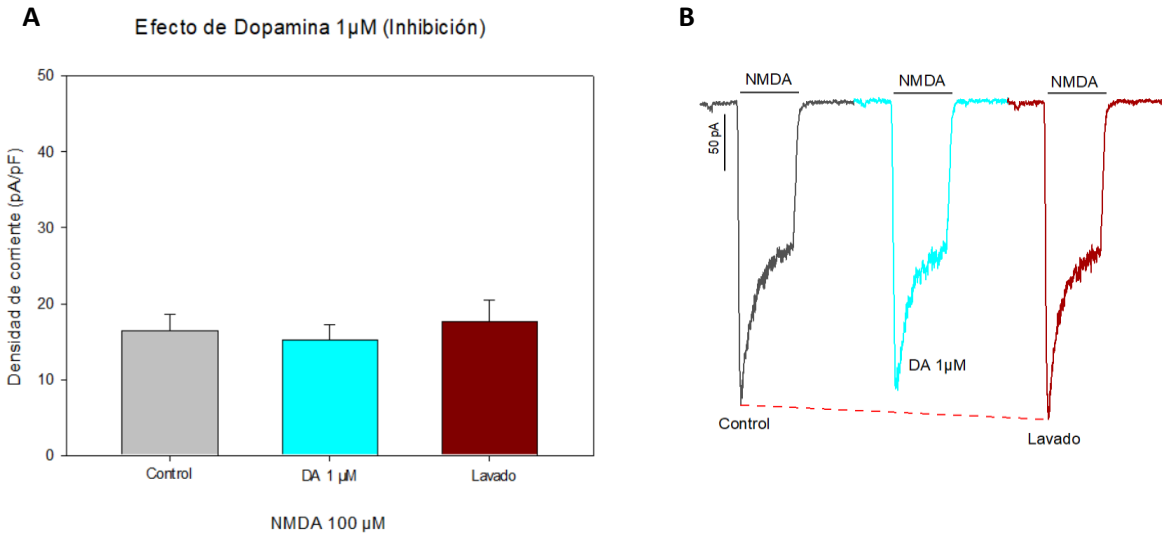


Figura 17. **A.** Efecto de la Dopamina 1 µM sobre la densidad de corriente de NMDA. Se grafica el control sólo en presencia de NMDA, la aplicación de DA en concentración 1 µM y posteriormente un lavado. En esta gráfica observamos los casos en los que la aplicación DA 1 µM tuvo un efecto inhibitorio. El análisis de varianzas no demostró diferencia significativa entre los grupos. **B.** Trazo representativo del protocolo de aplicación de dopamina 1 µM mostrando un efecto inhibitorio.

En el segundo grupo de neuronas, donde se aplicó dopamina en una concentración 100 nM. El 30.77% de las células tuvo una respuesta de potenciación (Fig. 18) mientras que el 69.23% faltante presentó una respuesta inhibitoria (Fig. 19) en la densidad de corriente de NMDA. A diferencia del grupo DA 1 µM, la dopamina en concentración 100 nM no resultó ser una concentración suficiente para mostrar cambios significativos sobre la iNMDA tanto al alta como a la baja de corriente.

El último grupo de neuronas fueron probadas con dopamina en concentración 1 nM. El 53.33% de las células presentó una potenciación (Fig. 20) mientras que del 46.67% mostró una inhibición en la corriente de NMDA (Fig.21). Al igual que el grupo DA 100 nM, en ninguno de los casos; potenciación o inhibición, se obtuvo diferencia significativa entre los controles y la aplicación dopaminérgica.

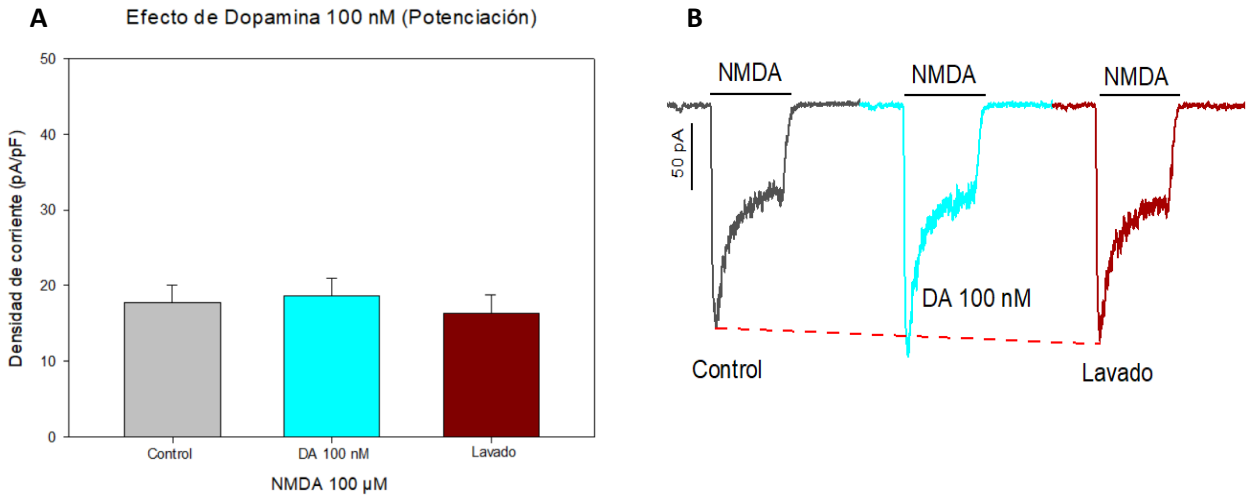


Figura 18. A. Efecto de la Dopamina 100 nM sobre la densidad de corriente de NMDA. Se grafica el control sólo en presencia de NMDA, la aplicación de DA en concentración 100 nM y posteriormente un lavado. En esta gráfica observamos los casos en los que la aplicación 100 nM tuvo un efecto potenciador. El análisis de varianzas no demostró diferencia significativa entre los grupos. **B.** Trazo representativo del protocolo de aplicación de dopamina 100 nM mostrando un efecto potenciador.

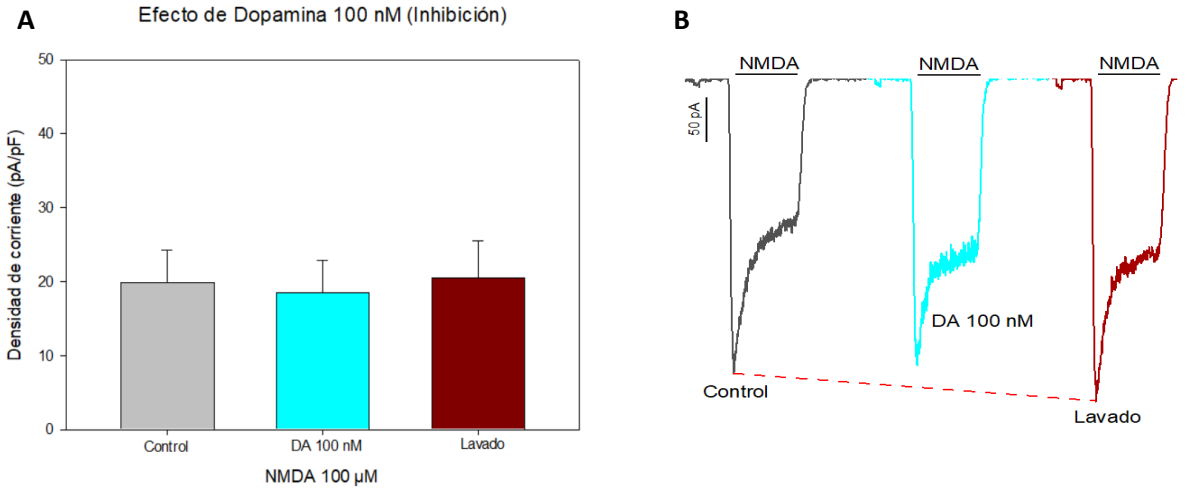


Figura 19. A. Efecto de la Dopamina 100 nM sobre la densidad de corriente de NMDA. En esta gráfica observamos los casos en los que la aplicación 100 nM tuvo un efecto inhibitorio. El análisis de varianzas no demostró diferencia significativa entre los grupos. **B.** Trazo representativo del protocolo de aplicación de dopamina 100 nM mostrando un efecto inhibitorio.

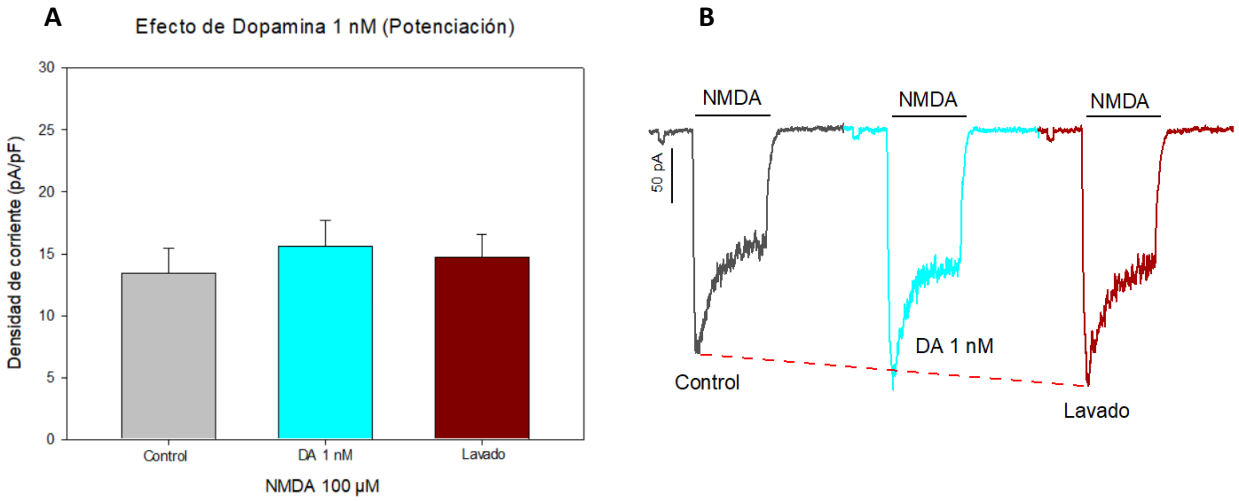


Figura 20. A. Efecto de la Dopamina 1 nM sobre la densidad de corriente de NMDA. Se grafica el control sólo en presencia de NMDA, la aplicación de DA en concentración 1 nM y posteriormente un lavado. En esta gráfica observamos los casos en los que la aplicación 1 nM tuvo un efecto potenciador. El análisis de varianzas no demostró diferencia significativa entre los grupos. **B.** Trazo representativo del protocolo de aplicación de dopamina 1 nM mostrando un efecto potenciador.

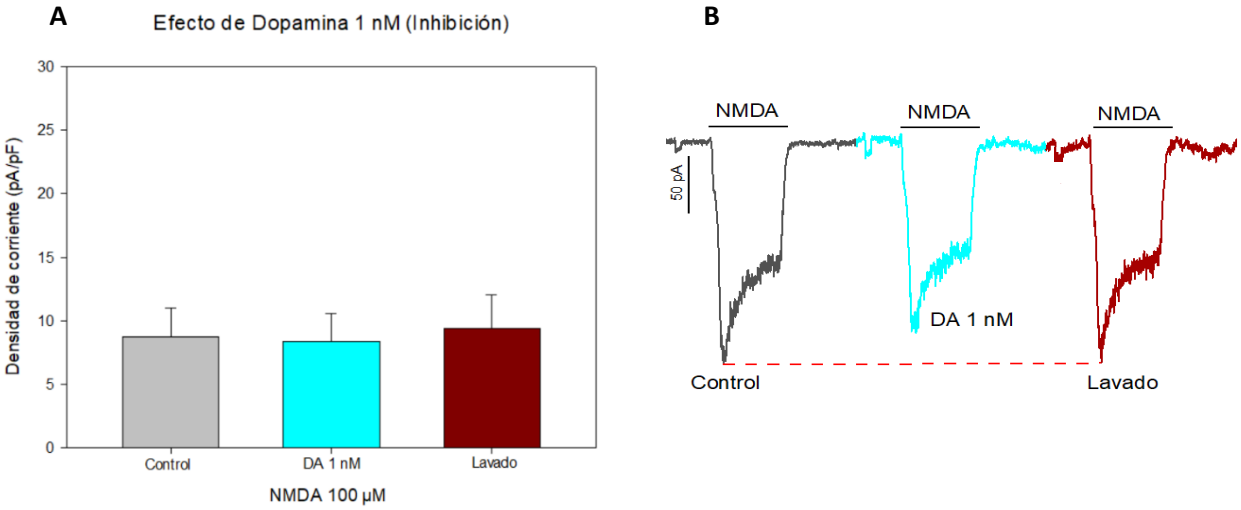


Figura 21. A. Efecto de la Dopamina 1 nM sobre la densidad de corriente de NMDA. En esta gráfica observamos los casos en los que la aplicación 1 nM tuvo un efecto inhibitorio. El análisis de varianzas no demostró diferencia significativa entre los grupos. **B.** Trazo representativo del protocolo de aplicación de dopamina 1 nM mostrando un efecto inhibitorio.

Se obtuvieron los porcentajes tanto de potenciación como inhibición de las tres concentraciones. Por el lado de las potenciaciones se observó una diferencia que se evaluó a través de una prueba de Tukey ($p<0.050$) (Tabla 2), se obtuvo

una diferencia significativa (*) entre el grupo 1 nM contra 1 µM. En la figura 22 se grafican los porcentajes de potenciación y error estándar de cada muestra.

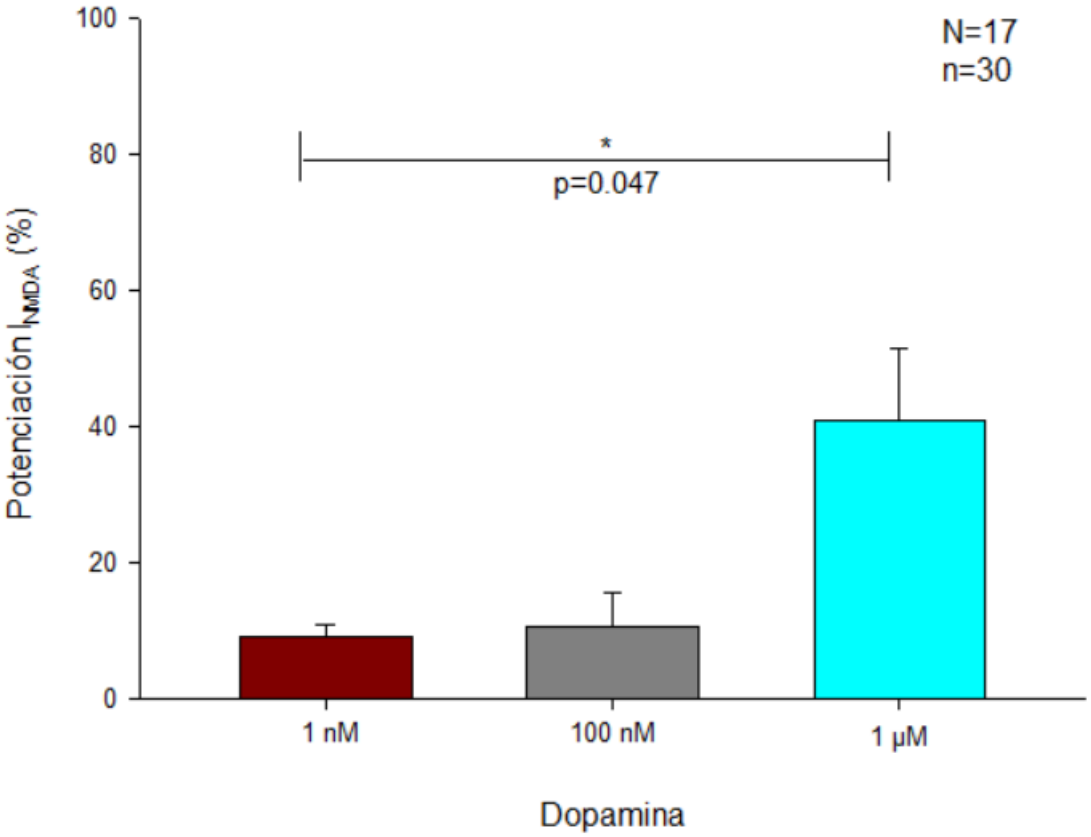


Figura 22. Porcentaje de aumento de la amplitud del pico de corriente de NMDA en presencia de dopamina (1 nM, 100 nM y 1 µM). Se observa una diferencia estadísticamente significativa entre 1 nM y 1 µM con un valor de p=0.047* obtenida a partir de una ANOVA de un factor y análisis *post hoc* Tukey.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
100nM - 1nM	2.3	19.0	(-44.9, 49.5)	0.12	0.992
1 µM - 1nM	**32.4**	**13.0**	**(0.3, 64.6)**	**2.50**	**0.047**
1 µM - 100nM	30.1	18.0	(-14.5, 74.7)	1.68	0.233

Nivel de confianza individual = 98.04%

Tabla 2. Prueba *post hoc* de Tukey para comparación de medias. Nótese la diferencia significativa para la condición 1µM-1nM obtenidos a partir de los porcentajes de potenciación de aumento de la amplitud de pico de corriente NMDA.

De igual forma se graficaron los porcentajes de inhibición de corriente y el error estándar de cada grupo. En este gráfico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 23)

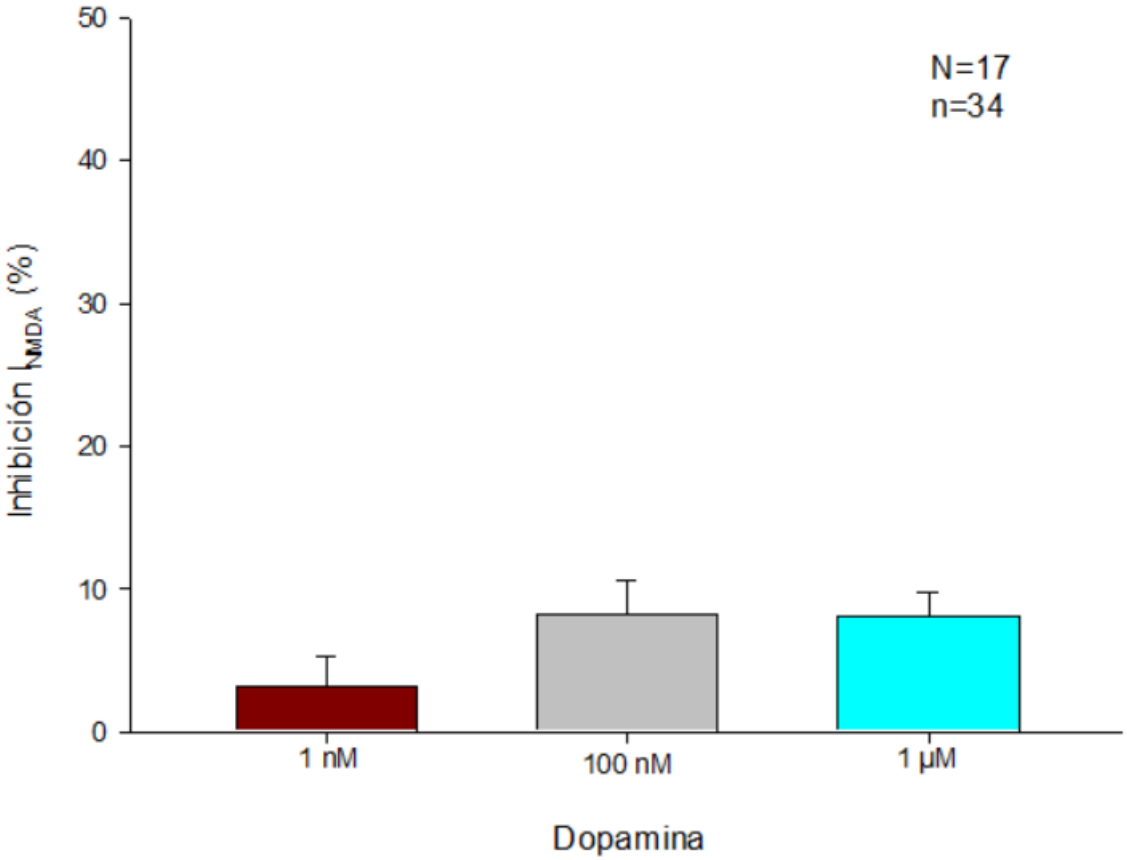


Figura 23. Porcentaje de inhibición de la amplitud del pico de corriente de NMDA en presencia de dopamina (1 nM, 100 nM y 1 µM). No se observan diferencias significativas entre los grupos. De acuerdo con la prueba *post-hoc* de Tukey: 1 nM vs 100 nM p=0.248, 1 nM vs 1 µM p=0.272 y 100 nM vs 1 µM p=0.999.

8. Discusión

En el presente trabajo se realizó el registro de corriente de NMDA en ausencia de su principal co-agonista; la glicina y se observó su comportamiento al añadir dopamina. Los resultados obtenidos coinciden con lo previamente reportado. La dopamina produce un aumento en la corriente de NMDA (Flores-Hernández, *et al.*, 2002; Chen *et al.,* 2004; Kruse *et al.,* 2009), sin embargo, no en la magnitud que se esperaba debido a que la mayoría de los resultados que no fueron estadísticamente significativos.

Flores-Hernández (2002) establece la potenciación de NMDA producida por dopamina a través de los receptores D1 ya que en activación de D2 la corriente es inhibida en células de estriado en presencia de glicina 20 µM. Por otro lado, el aumento de la corriente de NMDA obtenido por dopamina a 1 µM específicamente en corteza prefrontal se dio en 2004 por Chen *et al*. utilizando glicina en una concentración 20 µM, mientras que Kruse *et al.* (2009) lo confirmó utilizando glicina 10 µM. De igual manera Chen (2004) utilizó el antagonista de receptores D1; SCH23390, llegando a la misma conclusión que Flores-Hernández: el aumento de iNMDA se debe a la activación de receptores D1.

Las corrientes de NMDA son aumentadas por la presencia de dopamina actuando en los receptores de la familia D1 debido a su carácter excitador por ser canales acoplado a proteínas Gs. Al ser activado el receptor D1 se produce lo siguiente: se estimula la formación de adenilato ciclasa (AC) y AMPc quien aumenta la protein cinasa A (PKA) para activar a DARP-32 e inhibir la función de PP1. Chen *et al.* (2004) propone el mecanismo de acción de los receptores D1 sobre los NMDAR es a través de la activación de PKA, la cual fosforila la subunidad NR1 del canal NMDA. En el caso contrario, cuando es activado D2, un receptor acoplado a proteína Gi, la corriente de carácter glutamatérgico no se ve aumentada debido a la ausencia de PKA y la actividad de PP1 que es la desfosforilación intracelular. Esta hipótesis fue probada por Flores-Hernández en 2002 al utilizar ratones *knock-out* (KO) de DARP-32. Los ratones KO presentaron una menor excitación producida por D1 en comparación con los ratones *wild-type* (WT).

Se infiere que la diferencia de amplitud de corrientes en comparación al presente trabajo e investigaciones realizadas por Chen, Greengard y Yan en 2004 y Kruse en 2009 es debido al uso de glicina. Aplicando el mismo protocolo de registro *whole cell* de células piramidales de CPF de rata con una concentración 100 µM de NMDA más 1 µM de dopamina, los resultados varían en cuanto a la presencia de glicina. La potenciación resulta en corrientes de tal amplitud que llegan a los rangos de nano amperios mientras que en ausencia de glicina sólo se observaron rangos de pico amperios. Esto puede dar entrada a la comprobación que la glicina y la dopamina actúan en un sinergismo supraaditivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, mi primera propuesta sería realizar una curva dosis respuesta aplicando el mismo protocolo que en este trabajo, añadiendo más concentraciones de dopamina sobre todo entre los valores de 100 nM y 1 µM. Basándonos en la literatura establecida, los receptores D1 son activados en concentraciones altas de dopamina por lo que me atrevería a descartar un aumento de la corriente de NMDA producido por concentraciones menores a 1 nM de dopamina (Moore & Grace, 1999) (Hauber, 2010). Además, para asegurar que el aumento de la corriente de carácter glutamatérgico en ausencia de glicina es a través de la activación de receptores dopaminérgicos de la familia D1, sería útil el uso del agonista D1, SKF21297 más antagonista de la familia D2; sulpiride (Flores Hernández, *et al.*, 2002).

En la esquizofrenia, se presenta una baja concentración dopaminérgica en la vía mesocortical, posiblemente dando como consecuencia un déficit cognitivo en los pacientes. Por otro lado, se observa un aumento de la concentración dopaminérgica en la vía mesolímbica hecho al que se atribuye la manifestación de los síntomas positivos. Además, la teoría glutamatérgica de la esquizofrenia asocia el cuadro clínico con una hipofunción de los receptores de glutamato tipo NMDA en las fibras Corteza-Tálamo, dando como resultado una reducción de la inhibición talámica. Esto genera un exceso de percepción sensorial en el individuo, relacionado igualmente a la sintomatología positiva. Para contrarrestar estos síntomas, los pacientes son tratados con el antipsicótico Haloperidol, un antagonista de receptores D2 (Egerton, 2020). A pesar de que se emplea un antagonista de D2 no se registran mejoras en las funciones cognitivas ya que el objetivo principal es disminuir cuadros de psicosis y delirios, no el mejorar la cognición del paciente. Tal es la diferencia de respuesta cerebral producida por receptores D1 y D2, que se ha reconocido el papel de la dopamina en los procesos de aprendizaje y memoria a través de protocolos de administración de agonistas de receptores D1 en monos (Chen, *et al.*, 2004).

En la actualidad existe un modelo de ratón que expresa solamente el 5% de la cantidad “normal” de la subunidad NR1 de los canales de NMDA. Este ratón se ha utilizado como un modelo de esquizofrenia debido a los síntomas que presenta. Tales son anormalidades conductuales, incremento en la actividad motora y déficits tanto sociales como sexuales (Mohn, et al,.1999).

Utilizar un modelo de hipofunción de los canales de NMDA podría dar respuestas en cuanto a la fisiopatología de la esquizofrenia y abrir el camino a posibles tratamientos enfocados a los déficits cognitivos presentes en pacientes con esquizofrenia. Desde obtener curva dosis respuesta en presencia de dopamina, quinpirole, SKF21297 o incluso añadiendo D-serina, el segundo co-agonista de NMDA más utilizado en la clínica y con mayor concentración a nivel corteza (Burnet, *et al.*, 2008).

9. Resumen de resultados

La dopamina en concentración 1 µM produce un efecto potenciador sobre las corrientes de NMDA 100 µM en ausencia de glicina en neuronas piramidales de corteza prefrontal de rata.

La dopamina en concentración 1 nM y 100 nM no produce un cambio significativo en la corriente de NMDA 100 µM en ausencia de glicina en neuronas piramidales de corteza prefrontal de rata.

10. Conclusiones

Por primera vez en el laboratorio de neuromodulación se demostró el efecto excitatorio de la dopamina sobre corrientes de NMDA en ausencia de glicina en neuronas piramidales de corteza prefrontal de rata obteniendo resultados significativos en la aplicación de dopamina 1 µM. Asimismo, no se mostraron cambios significativos en cuanto a las concentraciones 100 nM y 1 nM de dopamina.

11. Perspectivas

El producto del presente trabajo además del efecto potenciador de la dopamina 1 µM sobre la corriente de NMDA abre nuevas preguntas de investigación que podrían ser abordadas en el laboratorio de neuromodulación. Nosotros proponemos realizar el protocolo presentado en este trabajo agregando el agonista de receptores D1, SKF21297 más antagonista de la familia D2; sulpiride para comprobar si el aumento de la corriente de NMDA inducida por la dopamina es a través de la activación de los canales dopaminérgicos D1.

12. Referencias

- Araya, A., Gallegos, S., Viveros, R., San Martin, L., Muñoz, B., Harvey, R. J., Zeilhofer, H. U., & Aguayo, L. G. (2021). Presence of ethanol-sensitive and ethanol-insensitive glycine receptors in the ventral tegmental area and prefrontal cortex in mice. British journal of pharmacology, 178(23), 4691–4707. https://doi.org/10.1111/bph.15649
- Arnsten, A. F., Wang, M., & Paspalas, C. D. (2015). Dopamine's Actions in Primate Prefrontal Cortex: Challenges for Treating Cognitive Disorders. Pharmacological reviews, 67(3), 681–696. https://doi.org/10.1124/pr.115.010512
- Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. Journal of neurochemistry, 98(3), 641–653. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x
- Bannister A. P. (2005). Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. Neuroscience research, 53(2), 95–103. https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.06.019
- Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y., & Surmeier, D. J. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca2+ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. The Journal of Neuroscience, 14(11 Pt 1), 6667–6686. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-11-06667.1994
- Bauremeister, J. (1998) Trastorno por déficit de atención e hiperactividad. The Guilford Press. Nueva York.
- Beaulieu, J. M., Espinoza, S., & Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. British journal of pharmacology, 172(1), 1–23. https://doi.org/10.1111/bph.12906
- Beaulieu, J. M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacological reviews, 63(1), 182–217. https://doi.org/10.1124/pr.110.002642
- Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. Trends in neurosciences, 30(5), 194–202. https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006

- Brock, L. G., Coombs, J. S., & Eccles, J. C. (1952). The recording of potentials from motoneurones with an intracellular electrode. The Journal of physiology, 117(4), 431–460.
- Brosnan, J. & Brosnan, M. (2012) Glutamate: a truly functional amino acid. Amino Acids 45(3). Pp:413-8.
- Burnet, P. W., Hutchinson, L., von Hesling, M., Gilbert, E. J., Brandon, N. J., Rutter, A. R., Hutson, P. H., & Harrison, P. J. (2008). Expression of D-serine and glycine transporters in the prefrontal cortex and cerebellum in schizophrenia. Schizophrenia research, 102(1-3), 283–294. https://doi.org/10.1016/j.schres.2008.02.009
- Castillero, O. (2018) Las 11 funciones ejecutivas del cerebro humano. https://psicologiaymente.com/inteligencia/funciones-ejecutivas
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., & Zhang, D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. Nature, 415(6873), 793–798. https://doi.org/10.1038/nature715
- Chen, G., Greengard, P., & Yan, Z. (2004). Potentiation of NMDA receptor currents by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(8), 2596–2600. https://doi.org/10.1073/pnas.0308618100
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. The international journal of biochemistry & cell biology, 37(5), 942–946. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009
- Cui, C., Xu, M., & Atzori, M. (2006). Voltage-dependent block of N-methyl-D-aspartate receptors by dopamine D1 receptor ligands. Molecular pharmacology, 70(5), 1761–1770. https://doi.org/10.1124/mol.106.028332
- Díaz-Castro, L., Cabello-Rangel, H., Medina-Mora, M. (2020) Necesidades de atención en salud mental y uso de servicios en población mexicana con trastornos mentales graves. Salud Pública de México. 62 (1).
- Dziwota E, Stepulak MZ, Włoszczak-Szubzda A, Olajossy M. (2018) Social functioning and the quality of life of patients diagnosed with schizophrenia. Ann Agric Environ Med.14;25(1):50-55.

- Egerton, A., Grace, A. A., Stone, J., Bossong, M. G., Sand, M., & McGuire, P. (2020). Glutamate in schizophrenia: Neurodevelopmental perspectives and drug development. Schizophrenia research, 223, 59–70. https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.09.013
- Flores-Hernandez, J., Salgado, H., De La Rosa, V., Avila-Ruiz, T., Torres-Ramirez, O., Lopez-Lopez, G., & Atzori, M. (2009). Cholinergic direct inhibition of N-methyl-D aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. Synapse 63(4), 308–318. https://doi.org/10.1002/syn.20609
- Flores, J. Otrosky, F. (2008) Neuropsicología de Lóbulos Frontales, Funciones Ejecutivas y Conducta Humana. México
- Fuster J. M. (2001). The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. Neuron, 30(2), 319–333. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00285-9
- Fuster, J. (2015). The Prefrontal Cortex (5th edition). Amsterdam: Elsevier.
- Gao, W. J., Yang, S. S., Mack, N. R., & Chamberlin, L. A. (2022). Aberrant maturation and connectivity of prefrontal cortex in schizophrenia-contribution of NMDA receptor development and hypofunction. Molecular psychiatry, 27(1), 731–743. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01196-w
- Goldstein, R. *et al.* (2002) Drug Addiction and Its Underlying Neurobiological Basis: Neuroimaging Evidence for the Involvement of the Frontal Cortex. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.10.1642
- Gonzalez-Islas, C. & Hablitz, J. (2001) Dopamine inhibition of evoked IPSCs in rat prefrontal cortex. J. Neurophysiol. 86: 2911-8.
- Groenewegen, H. J., & Uylings, H. B. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. Progress in brain research, 126, 3–28. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26003-2
- Hauber W. (2010). Dopamine release in the prefrontal cortex and striatum: temporal and behavioural aspects. Pharmacopsychiatry, 43 Suppl 1, S32–S41. https://doi.org/10.1055/s-0030-1248300
- Heresco-Levy, U., Shoham, S., & Javitt, D. C. (2013). Glycine site agonists of the N-methyl-D-aspartate receptor and Parkinson's disease: a hypothesis. Movement disorders, 28(4), 419–424. https://doi.org/10.1002/mds.25306
- Hernandes, M. S., & Troncone, L. R. (2009). Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. Journal of neural transmission 116(12), 1551–1560. https://doi.org/10.1007/s00702-009-0326-6

- Islas, Á. A., Scior, T., Torres-Ramirez, O., Salinas-Stefanon, E. M., Lopez-Lopez, G., & Flores-Hernandez, J. (2022). Computational Molecular Characterization of the Interaction of Acetylcholine and the NMDA Receptor to Explain the Direct Glycine-Competitive Potentiation of NMDA-Mediated Neuronal Currents. ACS chemical neuroscience, 13(2), 229–244. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00639
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2012). Principles of Neural Science, Fifth Edition (5th edition). New York: McGraw-Hill Professional
- Kesner, R. P., & Churchwell, J. C. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. Neurobiology of learning and memory, 96(3), 417–431. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.07.002
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. Cellular and molecular neurobiology, 39(1), 31–59. https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3
- Krettek, J. E., & Price, J. L. (1977). The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. The Journal of comparative neurology, 171(2), 157–191. https://doi.org/10.1002/cne.901710204
- Kure, S., Tada, K., & Narisawa, K. (1997). Nonketotic hyperglycinemia: biochemical, molecular, and neurological aspects. The Japanese journal of human genetics, 42(1), 13–22. https://doi.org/10.1007/BF02766917
- Le Merre, P., Ährlund-Richter, S., & Carlén, M. (2021). The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. Neuron, 109(12), 1925–1944. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.035
- Leonard C. M. (2016). Finding prefrontal cortex in the rat. Brain Research, 1645, 1–3. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.002
- Leyrer-Jackson, J. M., & Thomas, M. P. (2018). Layer-specific effects of dopaminergic D1 receptor activation on excitatory synaptic trains in layer V mouse prefrontal cortical pyramidal cells. Physiological reports, 6(15), e13806. https://doi.org/10.14814/phy2.13806
- Liu, H., Xu, L., Fu, J., Su, Q., Liu, N., Xu, J., Tang, J., Li, W., Zhao, F., Ding, H., Liu, F., Qin, W., & Yu, C. (2021). Prefrontal Granule Cell-Related Genes

and Schizophrenia. Cerebral cortex 31(4), 2268–2277. https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa360

- Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., & Gris, D. (2019). Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. Cells, 8(2), 184. https://doi.org/10.3390/cells8020184
- Meldrum B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. The Journal of nutrition, 130(4S Suppl), 1007S–15S. https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1007S
- Mimenza, O. (20018) Las 47 áreas de Brodmann, y las regiones del cerebro que contienen. Consultado el 3 de mayo de 2019 en: https://psicologiaymente.com/neurociencias/areas-brodmann
- Miller, B. Cummings, J. (2018) The Human Frontal Lobes. Tercera edición. The Guilford Press. Nueva York.
- Miller, B. Cummings, J. (2007) The Human Frontal Lobes. Segunda edición. The Guilford Press. Nueva York.
- National Center for Biotechnology Information, NCBI (2020). PubChem Compound Summary for CID 681, Dopamine.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. Physiological reviews, 78(1), 189–225. https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189
- Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., & Koller, B. H. (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. Cell, 98(4), 427–436. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81972-8
- Moore, H., West, A. R., & Grace, A. A. (1999). The regulation of forebrain dopamine transmission: relevance to the pathophysiology and psychopathology of schizophrenia. Biological psychiatry, 46(1), 40–55. https://doi.org/10.1016/s0006-3223(99)00078-5
- Moroz, L. L., Nikitin, M. A., Poličar, P. G., Kohn, A. B., & Romanova, D. Y. (2021). Evolution of glutamatergic signaling and synapses. Neuropharmacology, 199, 108740. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108740

- Mrzljak, L., Fieles, W., Medd, A. , Largent, B. and Khan, Z. (2007) Distribution of D1-Like and D2 Receptors in the Monkey Brain: Implications for Cognitive Function in Schizophrenia. In Atzori, A. and Tseng, K. Monoaminergic Modulation of Cortical Excitability (pp. 21-33) Springer
- Neher, E. & Sakmann, B. (1992) The Patch Clamp Technique. Scientific American, 266(3), 44–51.O. Klein, M., Battagello, D., Cardoso, A., Hausser, D., Bittencourt, J. & Correa, R. (2018) Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. Cellular and Molecular Neurobiology 39. Pp:31–59
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. Annual review of pharmacology and toxicology, 50, 295–322. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
- Petrides, M., Tomaiuolo, F., Yeterian, E. H., & Pandya, D. N. (2012). The prefrontal cortex: comparative architectonic organization in the human and the macaque monkey brains. Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior, 48(1), 46–57. https://doi.org/10.1016/j.cortex.2011.07.002
- Pickel, V. M., Colago, E. E., Mania, I., Molosh, A. I., & Rainnie, D. G. (2006). Dopamine D1 receptors co-distribute with N-methyl-D-aspartic acid type-1 subunits and modulate synaptically-evoked N-methyl-D-aspartic acid currents in rat basolateral amygdala. Neuroscience, 142(3), 671–690. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.059
- Razak, M. A., Begum, P. S., Viswanath, B., & Rajagopal, S. (2017). Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017, 1716701. https://doi.org/10.1155/2017/1716701
- Segev, A., Garcia-Oscos, F., & Kourrich, S. (2016). Whole-cell Patch-clamp Recordings in Brain Slices. Journal of visualized experiments : JoVE, (112), 54024.
- Small, D. M., Zatorre, R. J., Dagher, A., Evans, A. C., & Jones-Gotman, M. (2001). Changes in brain activity related to eating chocolate: From pleasure to aversion. Brain, 124, 1720–1733.

- Stępnicki P, Kondej M, Kaczor AA. (2018) Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. Molecules. 20;23(8):2087.
- Stuss, D. T., Benson, D. F., Clermont, R., Della Malva, C. L., Kaplan, E. F., & Weir, W. S. (1986). Language functioning after bilateral prefrontal leukotomy. Brain and language, 28(1), 66–70. https://doi.org/10.1016/0093-934x(86)90091-x
- Teffer, K., & Semendeferi, K. (2012). Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. Progress in brain research, 195, 191–218. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53860-4.00009-X
- Thornicroft G, Tansella M, Becker T, Knapp M, Leese M, Schene A & Vazquez-Barquero JL. (2004) The personal impact of schizophrenia in Europe. Schizophr Res. 1;69(2-3):125-32.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacological reviews, 62(3), 405–496. https://doi.org/10.1124/pr.109.002451
- Van Eden, C. G., & Buijs, R. M. (2000). Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions. Progress in brain research, 126, 49–62. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26006-8
- Vertes R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse, 51(1), 32–58. https://doi.org/10.1002/syn.10279
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M. & Vyklicky, L. (2013) Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels. Physiol. Res. 63 (Suppl. 1).
- Yang, A. C., & Tsai, S. J. (2017). New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. International journal of molecular sciences, 18(8), 1689. https://doi.org/10.3390/ijms18081689
- Yang, C. R., Seamans, J. K., & Gorelova, N. (1999). Developing a neuronal model for the pathophysiology of schizophrenia based on the nature of electrophysiological actions of dopamine in the prefrontal cortex. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of

Neuropsychopharmacology, 21(2), 161–194. https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00112-2

- Zahrt, J., Taylor, J. R., Mathew, R. G., & Arnsten, A. F. (1997). Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 17(21), 8528–8535. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-21-08528.1997
- Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996), 121(8), 799–817. https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8