



**Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla**



Facultad de Ciencias Biológicas

Licenciatura en Biología

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neuromodulación

**“Efecto de la dopamina sobre la actividad del receptor de
glutamato tipo NMDA en ausencia de glicina, en
neuronas disociadas de forma aguda del cuerpo estriado
de rata”**

Tesis

Para obtener el grado de

Licenciada en Biología

Presenta

Rubí Andrea León Martínez

Director de tesis

D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Co-director de tesis

D.C. Jesús Ángel Tapia López

Mayo 2025

Agradecimientos

A los miembros del jurado calificador.

Por sus valiosas observaciones y sugerencias, gracias.

A mis directores de tesis:

D.C. Jorge Luis Valente Flores Hernández, por su acompañamiento en la dirección de este trabajo.

D. C. Jesús Ángel Tapia López, por su participación en el seguimiento del proyecto.

A mis amigas del laboratorio de Neuromodulación que hicieron más ameno y divertido este proceso: Naye y Dany.

A la M. C. Erika Lorena Arroyo Ríos, por la paciencia y todo lo enseñado, además de su amistad.

A la M. C. Evelyn Alejandra Ruiz Luna, por su disposición y ayuda en los momentos más complicados del trabajo experimental, su amistad lo hizo especial.

A Edgar Macuil, por alentarme y acompañarme en este proceso.

A mi mamá, hasta el cielo, pero siempre tan cerca de mí.

A mi papá, mi hermano y hermana, mi apoyo infinito.

A mi abuelita que siempre cree en mi. A mi abuelito que ahora comparte espacio en el cielo con mamá.

ÍNDICE

Abreviaturas

Resumen

I.

Introducción.....

1.1 Ganglios basales.....

1.2 Cuerpo estriado.....

1.2.1 Neuronas espinosas medianas.....

2.1 Glutamato.....

2.2 Receptores de glutamato metabotrópicos.....

2.3 Receptores de glutamato ionotrópicos.....

2.3.1 Receptor de NMDA.....

3.1 Dopamina.....

4.1 Patologías.....

5.1 Antecedentes específicos.....

II. Planteamiento del problema.....

III. Hipótesis.....

IV. Objetivos.....

V. Métodos.....

VI. Resultados.....

VII. Discusión.....

VIII. Conclusión.....

IX. Referencias.....

Abreviaturas

ATD Dominio amino terminal (ATD) o Dominio N-terminal (NTD)

CTD Dominio carboxilo-terminal

DA Dopamina

GB Ganglios basales

Glu Glutamato

Gly Glicina

GP Globo Pálido

GPe Globo Pálido externo

GPi Globo Pálido interno

GPM Globo Pálido medial

iGluR Receptores ionotrópicos de glutamato

INMDA Corriente de NMDA

LBD Dominio de unión al ligando

MD Dominio transmembrana

mGluR Receptores metabotrópicos de glutamato

MSN Neurona espinosa mediana (medium spiny neurons)

MSNs Neuronas espinosas medianas (medium spiny neurons)

NMDAR Receptor de glutamato tipo NMDA

SN Sustancia *Nigra*

SNC Sustancia *Nigra pars compacta*

SNr Sustancia *Nigra pars reticulata*

STN Núcleo Subtalámico

TMD Dominio transmembrana

Resumen

El cuerpo estriado constituye el núcleo de entrada de los ganglios basales (GB), y envía sus aferencias a los núcleos de salida que son el globo pálido y la sustancia *nigra reticulata*. Puede dividirse en dos regiones fundamentales: la zona dorsal (caudo-putamen) y ventral (núcleo *accumbens*). La función del cuerpo estriado dorsal se asocia al control motor y el aprendizaje de habilidades motoras; es un sitio importante para la plasticidad sináptica. La célula de proyección y más abundante del cuerpo estriado es la neurona espinosa mediana (MSN) de tipo GABAérgico, las cuales se dividen en estriatonigrales y estriatopalidales, que conforman dos vías antagónicas: la vía directa e indirecta, respectivamente; a través de ellas se regulan las funciones de este núcleo, mediante los receptores dopaminérgicos de la familia D1 y D2, por lo que la dopamina (DA) es un neuromodulador necesario para el correcto funcionamiento de los GB, su disfunción está implicada en enfermedades como el Parkinson y el Huntington.

Múltiples estudios muestran una interacción entre la DA y el sistema glutamatérgico, a través de la modulación del receptor ionotrópico tipo NMDA (NMDAR), dicho canal tiene como característica el requerimiento clásico e indispensable un co-agonista, la glicina (Gly), necesario para su apertura. Sin embargo, algunas investigaciones proponen nuevos enfoques de estudio en la neuromodulación del NMDAR en ausencia del co-agonista clásico. Estudios en el Laboratorio de Neuromodulación han generado las corrientes de NMDA (INMDA) en ausencia de Gly, demostrando que no es necesaria la co-aplicación de NMDA y Gly para la generación de la INMDA, por lo que para este proyecto se utilizó la misma condición experimental para estudiar la modulación de la INMDA en presencia de diferentes concentraciones de DA. Los resultados en esta Tesis revelan un efecto potenciador o inhibidor, al aumentar o disminuir, respectivamente; la amplitud de la INMDA en la MSN disociada de forma aguda en ausencia de Gly. La potenciación e inhibición de la INMDA se ha determinado que es por la activación de la familia de receptores dopaminérgicos D1 y D2, sin embargo, en el laboratorio se han hecho propuestas que apuntan a una modulación de la INMDA por diferentes neuromoduladores en ausencia de glicina, por lo que se podría proponer también a la dopamina. Los resultados de este trabajo se lograron empleando la técnica de *patch-clamp* en configuración *whole-cell*.

Este estudio podría ampliarse mediante el uso de fármacos bloqueadores de D1 y D2, lo que permitiría evaluar si la DA modula el NMDAR de manera independiente de los receptores

metabotrópicos dopaminérgicos, además de explorar una posible interacción física entre la DA y el NMDAR.

Introducción

Ganglios basales

Los ganglios basales (GB) constan de cuatro núcleos subcorticales interconectados, que reciben aferencias de gran parte de la corteza cerebral y el tálamo, llevando las eferencias a la corteza motora primaria, premotora y prefrontal a través del tálamo y a núcleos del tronco encefálico como el núcleo pedunculopontino, núcleos reticulares y colículos superiores. Los núcleos de los GB se conforman por el cuerpo estriado (caudado-putamen), el globo pálido (GP), los cuales están incrustados en lo profundo de los hemisferios cerebrales; el núcleo subtalámico en el diencefalo y la Sustancia *Nigra* (SN) en el mesencéfalo, esta última se divide en *pars reticulata* (SNr) y *pars compacta* (SNc) (Kandel *et al.*, 2001).

Las funciones principales de este conjunto de núcleos radican en el control motor, pero también tienen implicaciones en el aprendizaje motor, en funciones ejecutivas, el comportamiento, aprendizaje procedimental, la plasticidad sináptica y las emociones (Lanciego *et al.*, 2012). Hasta el momento sus funciones se clasifican en tres vías de información asociativa, límbica y sensoriomotora (Foster *et al.*, 2021)

Las funciones de los ganglios basales se reconocieron a partir de observaciones clínicas durante el siglo XX, al notar que las lesiones en el núcleo lenticular (conformado por el putamen y el globo pálido) y en el núcleo subtalámico se relacionaban con los signos de la enfermedad de Parkinson, la distonía y el hemibalismo (Lanciego *et al.*, 2012).

La actividad de los ganglios basales se ha determinado a través de un modelo en el que se presentan dos vías denominadas directa e indirecta, mediadas a través del cuerpo estriado, provocando efectos opuestos en los núcleos de eferencia e interactúan de la siguiente manera (figura 1): la corteza cerebral y el tálamo envían aferencias excitatorias al cuerpo estriado (flechas verdes), que es la principal entrada de aferencias de los GB. En la vía directa, la salida de información de los GB (flechas azules) ocurre hacia el Globo Pálido medial (GPm) y la SNr, y se dirige principalmente a los núcleos talámicos para proyectarse a las áreas frontales de la corteza cerebral. En esta vía se induce el movimiento, lo que ocurre por la inhibición de la activación de la SNr, y así se desinhiben los circuitos de salida. Y la vía indirecta manda sus eferencias a través

del GP, que a su vez se dirigen al núcleo subtalámico (STN), proyectándose al GPm y la SN, de forma que esta interacción permite una conexión indirecta con la salida de los ganglios basales (como se muestra en la figura 1) y se suprime el movimiento, con un aumento de la activación de la SNr, lo que conlleva a la inhibición de los circuitos de salida (Kandel *et al.*, 2001; Gerfen, 2006; Freeze *et al.*, 2013).

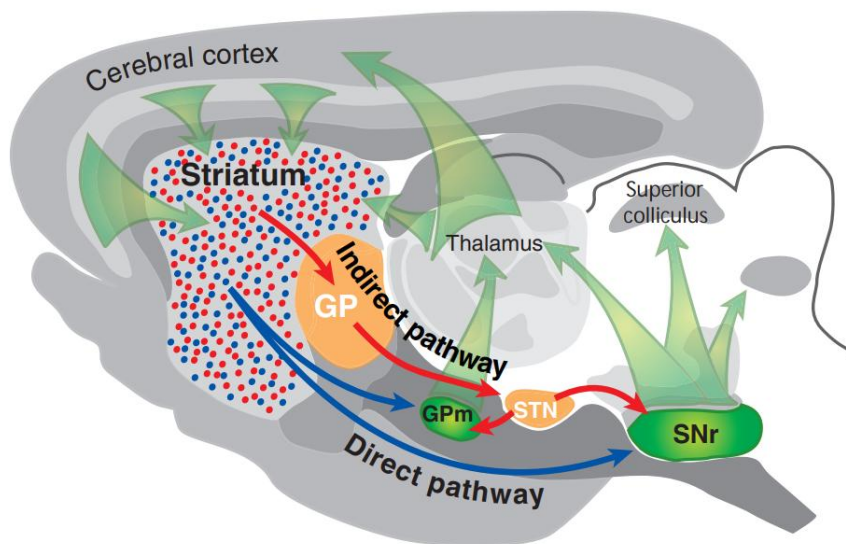


Figura 1. Corte sagital del cerebro de ratón que muestra los ganglios basales y la representación de la vía directa (azul) e indirecta (rojo). La vía directa facilita el movimiento al inhibir el GPm/SNr, reduciendo su inhibición sobre el tálamo y permitiendo la activación de la corteza motora. La vía indirecta inhibe el movimiento al activar el STN, lo que aumenta la inhibición del GPm/SNr sobre el tálamo y reduce la excitación cortical. (Tomada de Gerfen, 2006).

Los componentes de los ganglios basales están funcionalmente relacionados con el sistema musculoesquelético, oculomotor, asociativo (aprendizaje, memoria y planificación motora) y límbico de acuerdo con sus propiedades fisiológicas y sus interconexiones con las áreas de la corteza y tálamo, y el cuerpo estriado componente de los GB funge como principal receptor de aferencias (Garrett, 1994).

Cuerpo estriado

El cuerpo estriado está conformado por dos áreas: el estriado dorsal (caudo-putamen), también conocido como neostriado, y el estriado ventral, que incluye al núcleo accumbens (Kandel *et al.*, 2001). Su anatomía se considera como dos circuitos paralelos de corteza-ganglios

basales-tálamo-corteza, que divergen en este núcleo y son modulados por la dopamina (Kreitzer & Malenka, 2008).

La importancia del cuerpo estriado radica en que es la principal entrada de información de los ganglios basales y envía sus prolongaciones a los núcleos de eferencia: el GP y la SNr, para regular la vía directa e indirecta como ya se ha mencionado (Kandel *et al.*, 2001). También recibe inervaciones de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, representando un área importante para la plasticidad sináptica, ya que la dopamina al ser un neuromodulador, en el cuerpo estriado regula la actividad sináptica y modula la eficacia de las conexiones neuronales (Kreitzer & Malenka, 2008).

El cuerpo estriado participa tanto en el comportamiento motor como en la regulación de la actividad motora, el aprendizaje de habilidades motoras, la memoria procedimental, entre otras funciones como procesos motivacionales; además su desregulación provoca enfermedades como el Parkinson, la corea de Huntington, la adicción a las drogas y la esquizofrenia (Durieux *et al.*, 2011).

Este núcleo presenta una compleja organización tipo mosaico de sistemas neuroquímicos, por su disposición específica y compleja de sus componentes funcionales, caracterizada por la existencia de zonas denominadas "parches" y "matriz" lo que se relaciona con sus conexiones neuroanatómicas (Gerfen, 1992). Se presentan dos niveles de organización estriatal, un nivel con una función tripartita, la cual incluye una parte motora (dorsolateral), una parte asociativa y una parte límbica (las dos últimas, ventromediales); y el otro nivel en el que se divide el cuerpo estriado es el compartimental que corresponde a la matriz o parche, este último también denominado estriosoma (Joel & Weiner, 2000).

En el primer nivel de organización y el área en específico en el que se centra este trabajo es el cuerpo estriado dorsal con una función sensoriomotora, a diferencia del estriado ventral que se encarga del procesamiento de la información límbica (Figura 2). El estriado dorsal, además se puede subdividir en estriado dorso-lateral y dorso-medial, siendo el primero el encargado de mediar el aprendizaje procedimental a estímulos-respuesta, y el segundo está involucrado en el aprendizaje espacial, aunque el estriado ventral también ha demostrado su implicación en el aprendizaje espacial, sin embargo, en diferentes componentes (Voorn *et al.*, 2004).

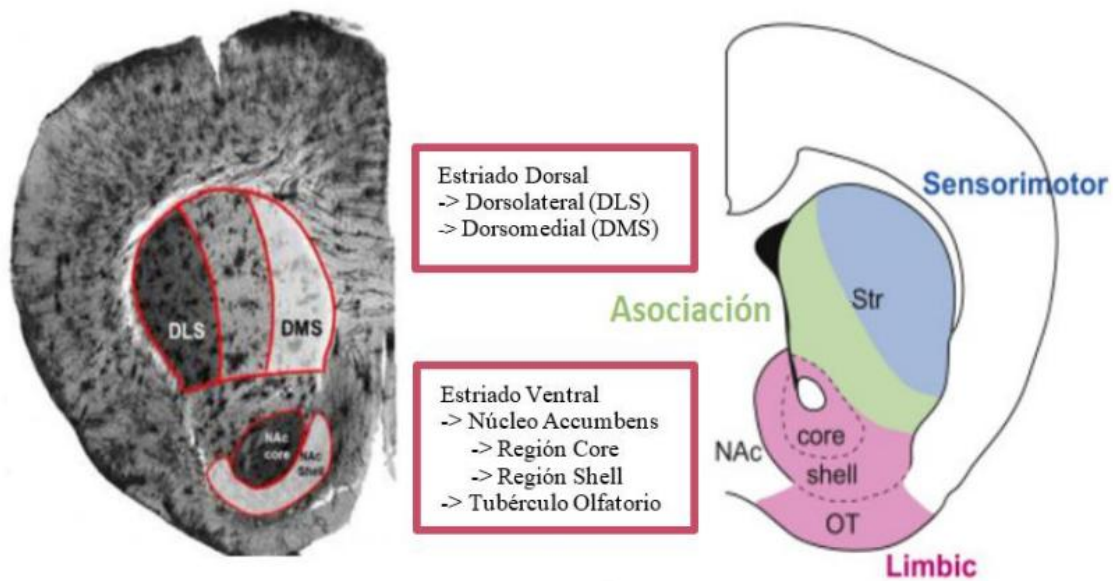


Figura 2. División morfofuncional del cuerpo estriado. De lado izquierdo se muestra demarcado en rojo el estriado dorsal (parte superior) y la región correspondiente al núcleo *accumbens* (parte inferior). Del lado derecho se muestran las principales áreas relacionadas con el procesamiento sensorial motor (azul), asociación (verde) y límbico (rosa). (Tomado de Arroyo-Ríos E.L., 2021)

En cuanto a su citología, hay una similitud entre el estriado dorsal y ventral, presentan el mismo tipo de células que en su mayoría son neuronas espinosas medianas (MSNs), aproximadamente el 95% del total de células; y aunque la densidad de los diferentes tipos celulares que presentan ambas áreas no difiere mucho, se ha mostrado una mayor complejidad neuroquímica y citoarquitectura en el estriado ventral. Para las MSNs se han clasificado a través de marcadores neuroquímicos y receptores que demuestran que este tipo celular se divide en las dos vías: directa (neuronas estriatonigrales, con expresión de receptores D1) e indirecta (neuronas estriatopalidales, con expresión de receptores D2) (Voorn *et al.*, 2004; Castro & Bruchas, 2019).

El 5% restante corresponde a las siguientes interneuronas: Interneuronas tónicamente activas denominadas también como colinérgicas, ya que liberan acetilcolina (*Tonically Active Interneurons*); interneuronas de disparo rápido, las cuales liberan parvalbumina (*Fast-Spiking Interneurons-FSI*) y las neuronas de umbral bajo, liberadoras de somatostatina, neuropéptido Y, y óxido nítrico (*Low-Threshold Spiking Neurons*). La clasificación descrita se puede observar en la figura 3 (Castro & Bruchas, 2019).

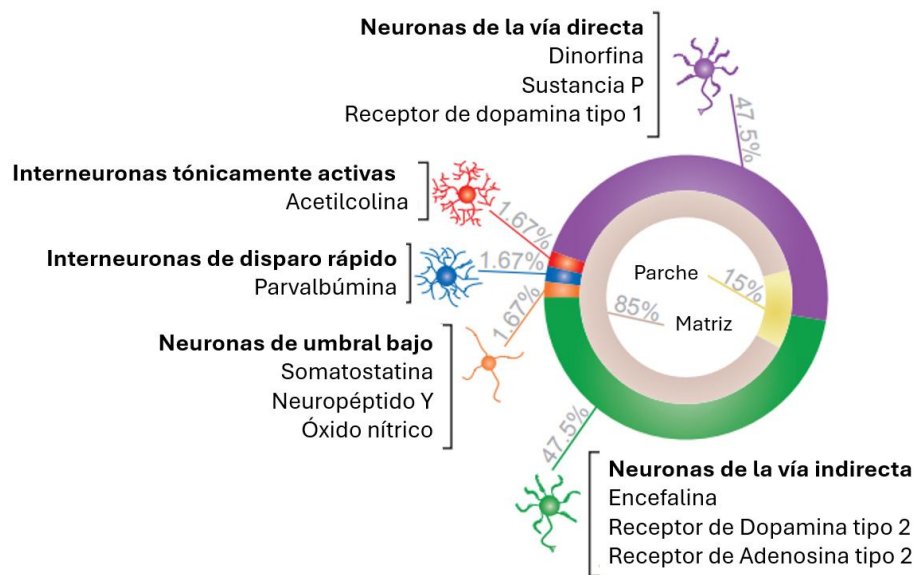


Figura 3. Gráfica que muestra la expresión aproximada de cada uno de los tipos celulares presentes en el cuerpo estriado dorsal (Tomada y modificada de Castro & Bruchas, 2019).

El segundo nivel de organización en el cuerpo estriado es la división en los compartimentos de parche (o estriosoma) y matriz, cada uno se proyecta a diferentes regiones, proporcionando entradas a las áreas con neuronas dopaminérgicas (parche) y GABAérgicas (matriz) hacia la SN. Se ha considerado que esta compartimentalización está relacionada con a la organización laminar de la corteza. Es decir, las aferencias corticales hacia el parche provienen de la capa profunda V y VI de la corteza, mientras que las que se dirigen a la matriz se originan de la capa V superficial y las capas supragranulares: la capa granular externa (II) y la capa externa piramidal (III) (Gerfen, 1992; Hustler, Lee & Porter).

Estos dos compartimentos tienen una organización histoquímica bien definida, la matriz representa la mayor parte del estriado entre un 85 y 90% del tejido, con una alta cantidad de calbindina, somatostatina, encefalina, receptores D2 y marcadores colinérgicos que incluyen a la acetilcolinesterasa y colina acetiltransferasa. En el tejido del estriado se intercalan los estriosomas que corresponden al 10 y 15% restante, los cuales presentan altos niveles de expresión del receptor opioide μ (MOR), sustancia P, receptores D1, met-enkefalina, calretinina, Nr4a1, pro-dinorfina, GAD-2 y EGR-1, como se muestra en la figura 4 (Brimblecombe & Cragg, 2016; Voorn *et al.*, 2004).

Sin embargo, hay neuronas que expresan tanto los receptores D1 como los D2, los cuales se presentan tanto en la matriz como en los estriosomas, de forma que ambas pueden participar en la vía directa e indirecta. Sin embargo, en los estriosomas las neuronas de la vía directa se expresan en niveles ligeramente más altos que las de la vía indirecta.

La organización en parche y matriz se ha determinado a través de inmunotinción, sin embargo, otro nivel de organización que se ha propuesto utilizando histoquímica es por la distribución de la actividad de la acetilcolinesterasa o de los niveles del receptor mu (MOR) como se muestra en la figura 5 (Märtin *et al.*, 2019).

Además del parche y matriz, Smith *et al.* (2017) mediante marcadores genéticos y moleculares denominan una nueva región denominada exo-parche, la cual describen como poblaciones de neuronas que se localizan en la matriz pero que presentan propiedades neuroquímicas y electrofisiológicas de las neuronas del parche, también proponen que las tres regiones parche, exo-parche y matriz reciben información límbica y sensoriomotora, demostrando que contrario a lo que previamente se había reportado, los parches recibían la información límbica con proyección a la SNc y que la matriz solo recibía aferencias sensoriomotoras y sin inervaciones a la SNc.

La denominación de un exo-parche se reafirma con el trabajo de Märtin *et al.* (2019) mediante la técnica de marcaje genético de las neuronas pertenecientes al parche, demostrando que los exo-parches se encuentran distribuidos en todo el cuerpo estriado, pero mayormente en el área dorsolateral, obteniendo que alrededor del 88.5% de las neuronas marcadas genéticamente forman parte de los parches, mientras que el porcentaje remanente pertenece a los exo-parches. Con el marcaje genético de este trabajo, se identificaron genes específicos con distinta expresión en cada compartimento: Oprm1 (receptor opioide mu-1), Sema5b (semaforina 5B), Id4 (inhibidor de diferenciación 4) como se muestra en la figura 4 (Arriba), lo que demuestra que los parches y exoparches tienen perfiles moleculares distintos de la matriz, y sugiere funciones diferenciadas en la regulación motora y emocional; además de las tres subregiones del cuerpo estriado que presenta un perfil génico distinto que forman gradientes moleculares relacionados con las funciones motoras, sensoriales y cognitivas, ventro-medial (Dlk), medial (Crym) y lateral (Gpr155) (Figura 4- Abajo).

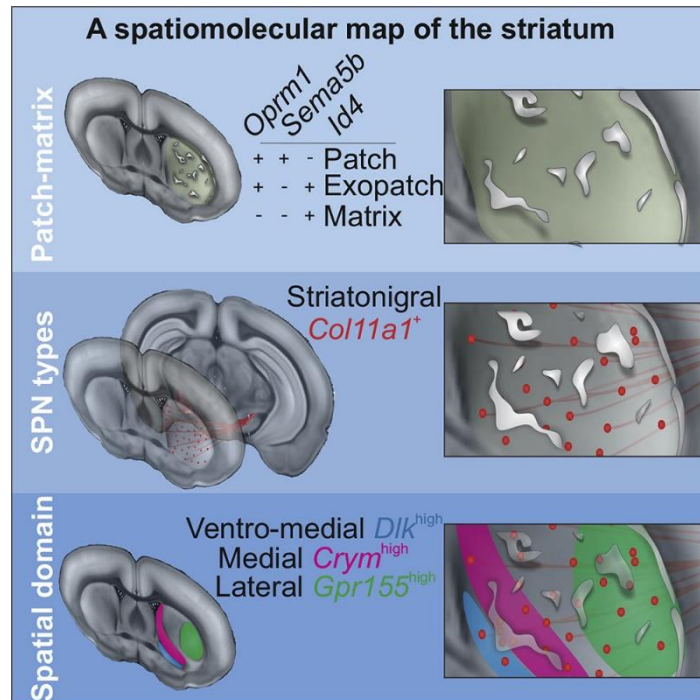


Figura 4. Mapa espaciomolecular del cuerpo estriado. **Arriba.** Organización Parche-Matriz (Patch-Matrix). Se muestra la expresión genética de cada compartimento; Parche (Striosoma): Expresión alta de *Oprm1*, *Sema5b* e *Id4* (+++); Exoparache: Expresión moderada (++); Matriz: Baja o nula expresión de estos genes (-). **En medio.** Tipos de Neuronas Espinosas Medias (SPN Types). Se destaca el subtipo estriatonigral de neuronas espinosas medias (SPNs), que expresan el gen *Col11a1* (colágeno tipo XI, alfa 1) y se observa cómo estas neuronas están distribuidas dentro del estriado. **Abajo.** Organización Espacial del Estriado (Spatial Domain). Se presentan tres subregiones del estriado, cada una con un perfil génico distinto: Ventro-medial: Expresión alta de *Dlk* (azul); Medial: Expresión alta de *Crym* (rojo); y Lateral: Expresión alta de *Gpr155* (verde). Imagen tomada de Märtin et al., 2019.

Neuronas espinosas medianas

Una de las características del cuerpo estriado es que presenta ausencia de neuronas glutamatérgicas. Las células de proyección son las neuronas espinosas GABAérgicas de tamaño medio (MSNs), 95% del total de células del cuerpo estriado, estriatonigrales y estriatopalidales, como ya se había mencionado (Jurado *et al.*, 2020; Plenz & Wickens, 2017).

Las MSNs tanto en la vía directa como la indirecta tienen el mismo número y forma, distribuidas en la organización tipo mosaico de sistemas neuroquímicos mencionado anteriormente (Gerfen, 1992).

Stefani *et al.* (1998) y Yan *et al.* (2001) demostraron que tanto la encefalina como la sustancia P se han encontrado en una misma neurona. Por otro lado, Schiffmann & Vanderhaeghen (1993) determinaron que las MSNs estriatonigrales, parte de la vía directa, co-expresan el receptor de dopamina de la familia D1 (D1R), dinorfina y sustancia P, mientras que para las neuronas estriatopallidales de la vía indirecta hay una co-expresión del receptor de dopamina de la familia 2 (D2R), del receptor de adenosina A2A (A2AR) y encefalina. Sin embargo, es más común encontrar en la literatura lo descubierto por Schiffmann & Vanderhaeghen.

De esta forma se consideran dos tipos de MSN, dependiendo de la predominancia de receptores de las familias D1 o D2 y por las proyecciones que presentan a los ganglios cortico-basales. En trabajos recientes se ha encontrado que los dos tipos de MSN tienen efectos antagónicos en los efectos con las drogas de abuso, lo que es consistente con la función en los comportamientos motores en la vía directa e indirecta. Todas las drogas de abuso activan la neurotransmisión dopaminérgica, por un lado, facilitando la activación glutamatérgica por D1, pero inhibiendo a través de D2 (Lobo & Nestler, 2011).

La morfología de la MSNs presenta una arquitectura somatodendrítica relativamente uniforme. El soma tiene un tamaño de 12-20 μm de diámetro, del soma surgen generalmente entre cinco a seis dendritas primarias, las cuales se dividen una o dos veces para formar dendritas secundarias y terciarias, lo que constituye el árbol dendrítico. El nombre de neuronas espinosas medianas lo reciben por la gran cantidad de espinas que presentan, pero no en todas las dendritas, ya que las dendritas proximales que son de un diámetro pequeño están relativamente libres de espinas. Mientras que las dendritas distales presentan una gran densidad de espinas, las cuales comienzan a partir de 20 μm desde el soma y hasta la punta de la dendrita. Cada MSN tiene un axón principal que va desde el cuerpo celular y proyecta hasta las estructuras de eferencia, una representación de una MSN se observa en la figura 5 (Plenz & Wickens, 2017).

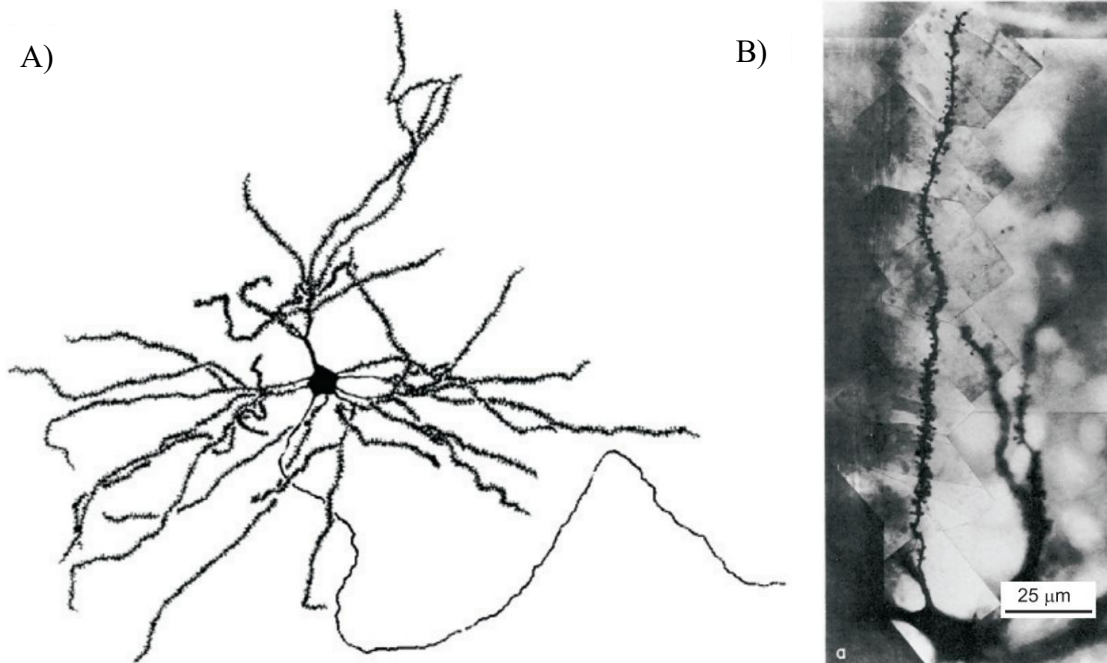


Figura 5. A) Reconstrucción de una MSN de cuerpo estriado que muestra la arborización dendrítica con HRP (Horseradish peroxidase) y B) una imagen de alta resolución de un microscopio electrónico donde se puede observar un árbol dendrítico y sus espinas (Tomada de Plenz & Wickens, 2017).

Con respecto a las propiedades electrofisiológicas entre las neuronas D1 y D2, Cepeda *et al.*, (2008), demostraron que las propiedades pasivas de la membrana como la resistencia de acceso, la capacitancia de la membrana y la constante de tiempo (producto de la resistencia y la capacitancia de la membrana neuronal) la relación entre eran parecidas y que todas las MSN presentaron un potencial de reposo hiperpolarizado, sin embargo, también hay diferencias, por ejemplo las neuronas D2 presentan un umbral menor para la activación de los potenciales de acción a diferencia de las D1, además mediante la técnica de *patch-clamp* en configuración *whole-cell* se realizaron registros *voltage-clamp* en donde la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras fue mayor en las MSN D2 que en las D1.

Glutamato

El glutamato (Glu) es un aminoácido no esencial y es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central, realiza múltiples funciones en el cerebro de los mamíferos como un componente esencial del metabolismo, forma parte en la construcción de

proteínas, como sustrato energético e incluso como una potente neurotoxina; y actúa como precursor del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) el cual es el principal neurotransmisor de inhibición (Brosnan & Brosnan, 2012; Bak *et al.*, 2006). También actúa como precursor de otros intermediarios del ciclo de ácido tricarboxílico (TCA) y participa en el equilibrio osmótico, por ejemplo, en la homeostasis del amoníaco (Sears & Hewett, 2021).

El glutamato no puede atravesar la barrera hematoencefálica, su síntesis se produce en la mitocondria de la neurona a partir de la glucosa y otros precursores, después se acumula en vesículas sinápticas en el citoplasma a través de un proceso dependiente de Mg^{2+}/ATP . Su síntesis ocurre tanto en neuronas como en los astrocitos, a partir de la glutamina por acción de la glutaminasa mitocondrial dependiente de fosfato. Otra fuente adicional de glutamato es a través de la transamidación de α -cetoglutarato mediante la enzima glutamato deshidrogenasa, intermediario importante en el ciclo de TCA (Sears & Hewett, 2021).

La liberación de glutamato a la hendidura sináptica se activa con la propagación del impulso nervioso hacia la terminal del axón, proceso dependiente de la entrada de Ca^{2+} , la cual estimula la interacción entre las proteínas vesiculares y las proteínas de la membrana sináptica, lo que permite que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana sináptica y se libere el glutamato el cual se unirá a los receptores específicos en la membrana de la célula postsináptica. Después de la unión de glutamato a sus receptores, para evitar la acumulación excesiva en la hendidura sináptica, es necesaria su recaptación a través de los transportadores de glutamato dependientes de sodio, es cual es un tipo de cotransporte activo secundario, impulsado por un gradiente electroquímico, por cada molécula de glutamato del exterior co-transporta dos iones de Na^+ dentro de la célula y también puede ser cotransportado un ión H^+ ; mientras que un ión de K^+ y un ión HO^- se transportan al exterior (Flores *et al.*, 2012; Atwell, Barbour & Szatkowski, 1993).

Es importante la regulación de las concentraciones de glutamato, ya que una concentración excesiva provoca desbalances en la neurotransmisión y neurodegeneración por excitotoxicidad, incluso conduciendo a la muerte celular (Mangia, Giove & DiNuzzo, 2012). Así como también es importante el equilibrio excitatorio (Glu)/inhibitorio (GABA), ya que su perturbación conlleva a enfermedades y trastornos como los accidentes cerebrovasculares, la enfermedad de Alzheimer, lesiones cerebrales, epilepsia, esquizofrenia, entre otros (Sears & Hewett, 2021).

La concentración de glutamato se ha estimado en una concentración de 10 a 15 mM dentro del citoplasma de la neurona, de esta concentración ocurre un rápido empaquetamiento dentro de vesículas sinápticas de las terminales nerviosas hasta acumular una concentración de 100 mM (Mangia, Giove & DiNuzzo, 2012).

En el espacio extracelular se ha informado una concentración que oscila entre 25 y 90 nM en el corte cerebral agudo, a través de mediciones electrofisiológicas de la actividad tónica del NMDAR. Por otro lado, en estudios con microdiálisis *in vivo* sugieren concentraciones más altas entre (0.2-35 μ M) lo que podría explicarse por el daño tisular generado por este procedimiento, que aunque es más localizado, el daño es acumulativo y difícil de controlar, a diferencia del daño por corte cerebral agudo que aunque es un mayor daño mecánico al inicio, no hay daño acumulativo (Sears & Hewett, 2021).

Gran parte de las sinapsis neuronales liberan glutamato en el sistema nervioso central, aproximadamente el 80-90 % (Sears & Hewett, 2021). La señalización de glutamato comienza a través de los receptores de glutamato: ionotrópicos (iGluRs) y metabotrópicos (mGluR), dependiendo a cuál se una, lo que se profundizará más adelante.

Receptores de glutamato

En la figura 6 se muestran los receptores, hasta el momento descritos, del neurotransmisor glutamato. Estos receptores se agrupan en 2 grandes familias, una ionotrópica que consisten en canales iónicos que permite el flujo de iones, y la otra de receptores metabotrópicos, los cuales se encuentran acoplados a una proteína G, que, tras su activación, desencadenan una vía de señalización dada por segundos mensajeros.

Receptores de glutamato metabotrópicos

El glutamato a través de los receptores acoplados a proteínas G, activa vías de señalización de segundos mensajeros para modular la excitabilidad celular y la transmisión sináptica (Niswender & Jeffrey, 2010). Los receptores metabotrópicos se clasifican en tres grupos (I, II y III) y se acoplan a proteínas G de la clase C (mGluR) (Meldrum, 2000)

Los mGluR se diferencian de los demás receptores asociados a proteínas G (A, B, D, E y F) porque presentan un dominio N-terminal extracelular el cual es denominado dominio Venus

flytrap (VFD) el cual contiene el sitio de unión al glutamato. Se conforman de 7 dominios transmembrana unidos a 3 bucles intracelulares y 3 bucles extracelulares, un dominio rico en cisteína y un dominio C-terminal que regula la modulación de la señalización y la expresión de acople a la proteína G (Suh, Chang & Roche, 2018).

El dominio VFD adopta diferentes conformaciones según el ligando unido. Cuando un antagonista se une, el VFD permanece en una conformación abierta-abierta, lo que impide la activación del receptor. En cambio, cuando un agonista se une, induce transiciones a las conformaciones abierto-cerrado o cerrado-cerrado, promoviendo la activación del receptor y su señalización intracelular (Luessen & Conn, 2022). Cabe destacar que el "abrir" o "cerrar" se refiere a cambios estructurales en el VFD, no a un canal iónico, ya que los mGluR son receptores acoplados a proteínas G, no canales iónicos como los receptores ionotrópicos de glutamato.

Los mGluR comprenden tres tipos de receptores: el grupo I que incluye a mGluR1 y mGluR5, se asocian a principalmente a la proteína G_q , los cuales se encargan de la activación de la fosfolipasa C, lo que conlleva a un aumento de la concentración intracelular de inositol trifosfato y de la movilización de Ca^{2+} ; este receptor se asocia a las respuestas sinápticas excitatorias. El grupo II incluye a mGluR2 y mGluR3; y el grupo III a mGluR4, mGluR7 y mGluR8, ambos grupos se acoplan a la proteína $G_{i/o}$ y se relacionan con la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa lo que conlleva a una disminución de la concentración intracelular de AMPc, y esto se expresa en el decaimiento de las respuestas sinápticas mediante la inhibición de la liberación del glutamato (Watkins & Jane, 2006; Reiner & Levitz, 2018).

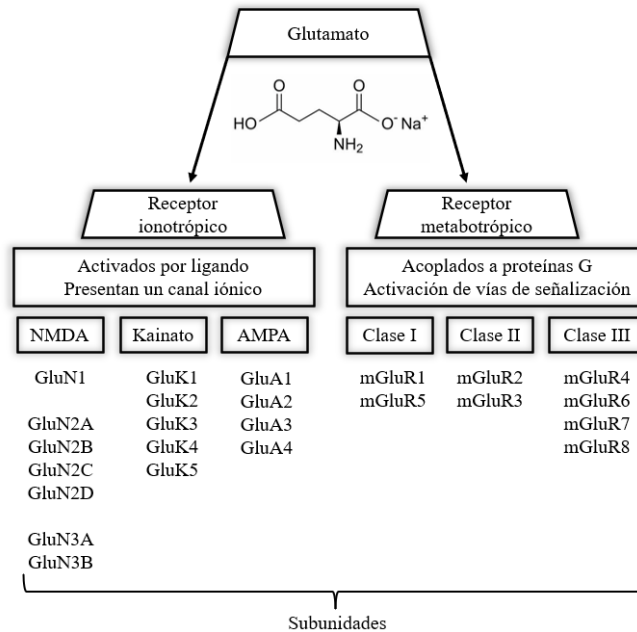


Figura 6. Clasificación de las familias de receptores de glutamato. Diagrama modificado de Flores *et al.*, 2012.

Receptores de glutamato ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) son tetrámeros que funcionan como canales iónicos activados por ligando, modulando la transmisión sináptica excitatoria rápida. Presentan un sitio ortostérico donde el glutamato se une para activar el receptor, así como sitios alostéricos donde otras moléculas pueden modular su actividad sin activarlo directamente. Además, poseen un poro transmembranal permeable a iones, cuya apertura o cierre depende de cambios conformacionales inducidos por agonistas y moduladores alostéricos (Luessen & Conn, 2022; Traynelis, 2010).

Estos receptores se clasifican de acuerdo con su farmacología y homología estructural, que incluye 4 clases de receptores: AMPA (ácido α -mino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) con las subunidades GluA1-GluA4, Kainato (Ácido Kaínico) con las subunidades GluK1-GluK5, NMDA (N-methyl-D-aspartate) con las subunidades GluN1, GluN2A-D, GluN3A y GluN3B, como se muestra en la figura 6. Cada uno de estos receptores son permeables al Na^+ y K^+ , y los receptores de NMDA también al Ca^{2+} (Traynelis, 2010; Flores *et al.*, 2012). La estructura de los receptores AMPA (AMPA) consta de cuatro subunidades centrales GluA1-4, formando homo y heterotetrámeros. Estos receptores presentan una cinética particularmente rápida, en un tiempo

inferior a un milisegundo, de forma que el canal se abre y cierra en milisegundos, lo que permite la rápida despolarización de la membrana postsináptica. Gracias a esto, se logra eliminar el bloqueo por Mg^{2+} del receptor de NMDA (NMDAR), esto al permitir la entrada de Ca^{2+} lo que facilita los cambios en la transmisión sináptica (Greger, Watson & Cull, 2017).

Los receptores de Kainato, se conforman de una combinación de las subunidades GluK1-GluK5. Con las subunidades GluK1, GluK2 y GluK3 pueden formar un receptor homomérico o heteromérico, mientras que, las subunidades GluK4 y GluK5 pueden solo formar receptores funcionales al unirse con las subunidades GluK1, GluK2 y GluK3. Una diferencia de este receptor con respecto al AMPAR y NMDAR es que presenta corrientes pequeñas y con una cinética lenta de activación y desensibilización (Negrete, Falcón & Rodríguez, 2021). Se puede observar la diferencia entre las corrientes del AMPAR y Kainato en la figura 7.

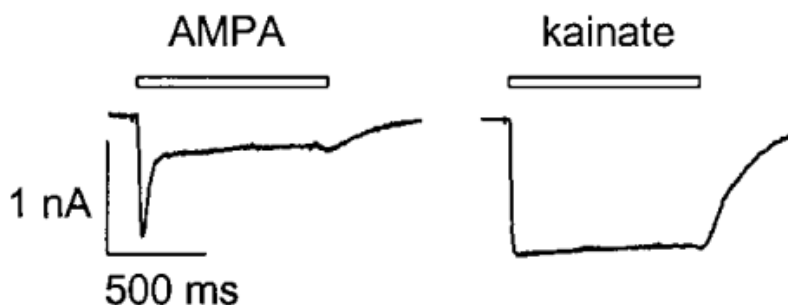


Figura 7. Comparación de las corrientes inducidas por la activación de los receptores AMPA y Kainato en motoneuronas de rata. La corriente de AMPA muestra una rápida activación seguida de desensibilización parcial y recuperación gradual, mientras que la corriente de Kainato es más sostenida, con menor desensibilización y un decaimiento más lento. Eje Y: Representa la corriente medida en nanoamperios (nA). Eje X: Representa el tiempo en milisegundos (ms). Barras horizontales arriba de cada traza: Indican la duración de la aplicación del agonista. (Tomado de Vandenberghe *et al.*, 2000).

Receptor de NMDA

El receptor de NMDA (NMDAR) es un complejo que forma un heterotetrámero que puede contener tres tipos de subunidades diferentes GluN1, GluN2 y GluN3, cada subunidad es codificada por diferentes genes. El gen GRIN1 genera 8 isoformas de la subunidad GluN1; GluN2 son codificadas por GRIN2A-D; y GluN3 por GRIN3A-B (Paoletti & Neyton, 2007; Vyklicky *et al.*, 2013). Para su conformación funcional se requiere de 4 subunidades, necesariamente 2 subunidades de GluN1 combinadas con dos subunidades de GluN2 y/o GluN3 (Traynelis *et al.*,

2010). Además de generar una señal eléctrica, estos receptores regulan la entrada de Ca^{2+} , el cual tiene un papel importante en la plasticidad y transmisión sináptica en el aprendizaje y memoria (Zhu *et al.*, 2016).

Su estructura se conforma de un dominio extracelular amino-terminal o N-terminal (NTD), el cual se vincula con otro dominio de unión al ligando (LBD) con dos segmentos de aminoácidos: S1 y S2; LBD a su vez se conecta a un dominio transmembrana (TMD), el cual forma parte del poro del canal iónico. El TMD contiene tres hélices transmembranales (M1, M3 y M4) que se conectan con un dominio carboxilo-terminal (CTD) (Vyklícky *et al.*, 2014; Glasgow *et al.*, 2015). Aparte de estas hélices, contiene un bucle de reentrada al canal denominado M2 (Traynelis *et al.*, 2010).

El LBD se conforma de dos dominios: S1 superior y S2 inferior. En un dímero de dos LBD, el papel que juega S1 superior es formando un contacto con el segundo dominio superior, lo que mantiene a ambos dominios en contacto de forma rígida. Por otro lado, los dominios inferiores S2 al parecer no tienen un contacto de dimerización, por lo que se mantienen relativamente móviles, esto tiene importancia en el tipo de activación del receptor en la configuración en la que se presente (Vyklícky *et al.*, 2014; Sobolevsky *et al.*, 2007).

La subunidad GluN2 define propiedades de la actividad del NMDAR como la diversidad funcional, la sensibilidad, la conductancia y la desensibilización del receptor lo que repercute directamente en las corrientes. Esta subunidad presenta diversos sitios de unión en la región extracelular, donde se unen ligandos endógenos como poliaminas, así como protones y Zn^{+} , los cuales actúan como reguladores de la actividad del NMDAR, en la entrada y salida de Ca^{2+} . Y también se pueden unir ligandos exógenos como el ifenprodil (Flores *et al.*, 2012).

Para el ensamblaje de las subunidades del receptor funcional se han propuesto tres modelos (Traynelis *et al.*, 2010). El primer modelo planteado por Papadakis, Hawkins & Stephenson (2004) sugiere que, para el ensamblaje funcional del NMDAR, inicialmente se acoplan los homodímeros GluN1-GluN1 mediante puentes disulfuro, posteriormente los homodímeros de GluN2 se unen para formar el tetrámero. Mientras que el segundo modelo según Atlason *et al.* (2007), inicialmente ocurre la homodimerización de GluN1-GluN1 y después la unión de cada uno de los dos monómeros de GluN2 hasta formar el tetrámero, esto lo demostraron en una línea celular en donde las subunidades NR2 Y NR3 presentaron una degradación más rápida a diferencia de NR1 que

presenta un plegamiento más estable al expresarse solo, pero cuando se co-expresó NR1 y NR2, esta última era más estable, de forma que pueden asociarse finalmente al dímero GluN1-GluN1. El tercer modelo según Schüler *et al.* (2008), a diferencia de los otros dos donde primero se forman homodímeros, primero se forman heterodímeros GluN1/GluN2 o GluN1/GluN3 para determinar el ensamblaje del NMDAR con la posterior unión de otro heterodímero.

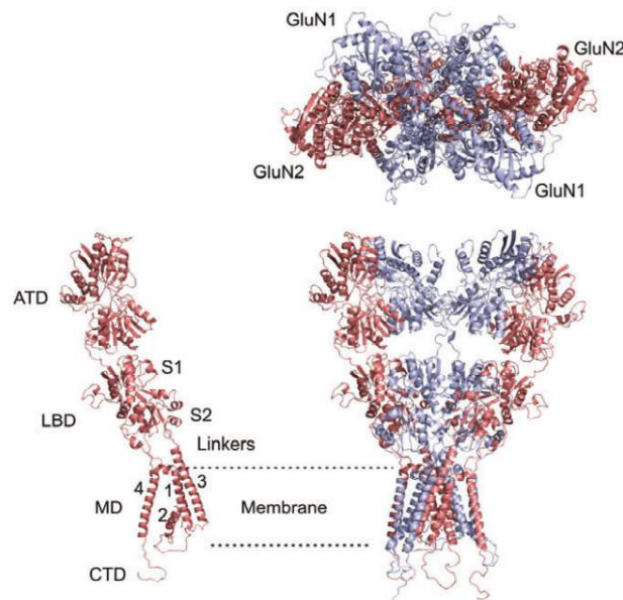


Figura 8. Estructura cristalizada del receptor de NMDA. Se observan las subunidades GluN1 y GluN2, el dominio amino terminal (ATD), el dominio de unión al ligando (LBD) con los dominios S1 (superior) y S2 (inferior), el dominio transmembrana (MD) y el dominio carboxilo terminal (CTD) (Tomada de Vyklicky *et al.*, 2014).

La activación del NMDAR que presenta las subunidades GluN1/ GluN2 requiere de dos moléculas de glutamato, las cuales se unen a LBD de GluN2, además, clásicamente desde 1987 con el trabajo de Johnson & Ascher, se considera también necesarias dos moléculas de glicina que actúan como co-agonistas, los cuales se unen a GluN1, además de otros co-agonistas propuestos como D-serina y D-alanina. El NMDR formado por estas subunidades presentan una mayor densidad de expresión. Por otra parte, los NMDAR compuestos por las subunidades GluN1/GluN3 requieren de una sola molécula de glicina para su activación (Vycklicky *et al.*, 2014; Johnson & Ascher, 1987).

El NMDAR tiene propiedades distintivas entre los receptores ionotrópicos, como el bloqueo voltaje-dependiente por Mg^{2+} extracelular. Aunque el glutamato puede unirse al receptor NMDA en presencia de Mg^{2+} , el canal permanece bloqueado y no hay flujo iónico. Cuando un

impulso sináptico produce una despolarización, los receptores AMPA se activan rápidamente, lo que reduce la fuerza de atracción entre el Mg^{2+} y la carga negativa del canal, permitiendo su liberación. Esto desbloquea el poro del canal, permitiendo el paso de iones, incluida la entrada de Ca^{2+} , característica clave de este receptor. La corriente generada se activa lentamente y puede durar entre decenas a cientos de milisegundos (Hansen *et al.*, 2018; Watkins & Jane, 2006).

Se ha propuesto que la activación del receptor de NMDA requiere obligadamente de la coactivación por Glicina, sin embargo, en una publicación reciente Islas y colaboradores proponen en estudios *in silico* la interacción de acetilcolina uniéndose al sitio de glicina (Islas *et al.*, 2022). Este hecho abre la posibilidad de que la acetilcolina module la actividad del receptor de NMDA lo cual ya había sido propuesto por Flores-Hernández *et al.*, en 2009, abriendo la posibilidad de que acetilcolina tiene acciones más allá de la clásica actividad nicotínica o muscarínica.

Existen otros agonistas parciales y completos para activar el NMDAR como: el NMDA (N-methyl-D-aspartate) del cual recibe su nombre al ser un agonista que no se une a ningún otro receptor de glutamato; también L-glutamato, D-glutamato, D-aspartato y L-aspartato (Vyklícky *et al.*, 2014).

Los NMDAR en su estructura presentan diversidad en sus sitios de unión para ligandos endógenos u otros agentes farmacológicos, ya que modulan la actividad del receptor de forma selectiva por subunidades, por ejemplo, presenta el sitio de unión a glutamato, el poro del canal iónico y sitios alostéricos que recientemente se han identificado en el NTD como se puede observar en la figura 9 (Paoletti & Neyton, 2007). Puede ser modulado por moléculas como el Zn^{+} endógeno, los protones, las poliaminas, los compuestos sintéticos y los moduladores alostéricos como Ro 25-6981 que se ha probado como bloqueador de los subtipos de receptores de NMDA (Shujia *et al.*, 2016; Fischer *et al.*, 1997).

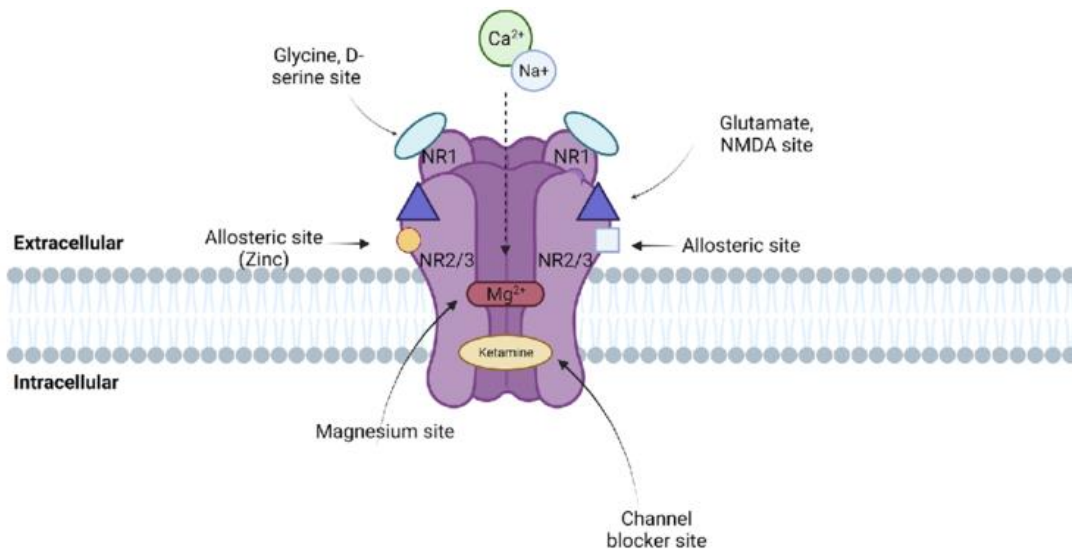


Figura 9. Diversidad de los sitios de unión del NMDAR. Se pueden observar el sitio de unión a glutamato, sitio de unión a glicina, el poro del canal iónico donde se encuentra el Mg²⁺, y los sitios de unión alostéricos (Tomado de Mitchell *et al.*, 2023).

El NMDAR se modula tanto positiva como negativamente mediante antagonistas y agonistas. Los antagonistas pueden ser clasificados dependiendo del lugar de acción:

Como bloqueador del canal iónico dentro del poro o inhibiendo la actividad de dos formas: como antagonistas competitivos y no competitivos, los primeros se unen al sitio de unión de los agonistas, pero sin activar el receptor. Por otro lado, la inhibición con antagonistas no competitivos requiere la activación previa del receptor, esto lo pueden realizar diversos compuestos orgánicos que se caracterizan por tener carga positiva y no ser dependientes de voltaje (Vyklícky *et al.*, 2014). De los primeros antagonistas descubiertos fueron los de tipo no-competitivo en el sitio de unión al glutamato y uno de los primeros compuestos utilizados fue el R-AP5 (R-2-amino-5-fosfonopentanoato) (Paoletti & Neyton, 2007).

La regulación del NMDAR es importante para evitar los efectos de excitotoxicidad que provoca la activación excesiva del receptor por la liberación de glutamato, lo que conlleva a la elevación de Ca²⁺ intracelular y provoca la lipoperoxidación de la membrana citoplasmática, el retículo endoplásmico y la mitocondria. La muerte celular y neurodegeneración se relacionan con enfermedades como la epilepsia, isquemia cerebral, enfermedad de Huntington, Alzheimer y Parkinson (Flores *et al.*, 2012).

Dopamina

La dopamina (DA), conocida también como 3, 4-dihidroxitiramina, es una catecolamina sintetizada en el citosol de la célula a partir de la enzima tirosina hidroxilasa, que al agregar un grupo hidroxilo a la tirosina la transforma en L-DOPA, la cual mediante la DOPA descarboxilasa se transforma en dopamina, como se puede observar en la figura 10 (Speranza *et al.*, 2021).

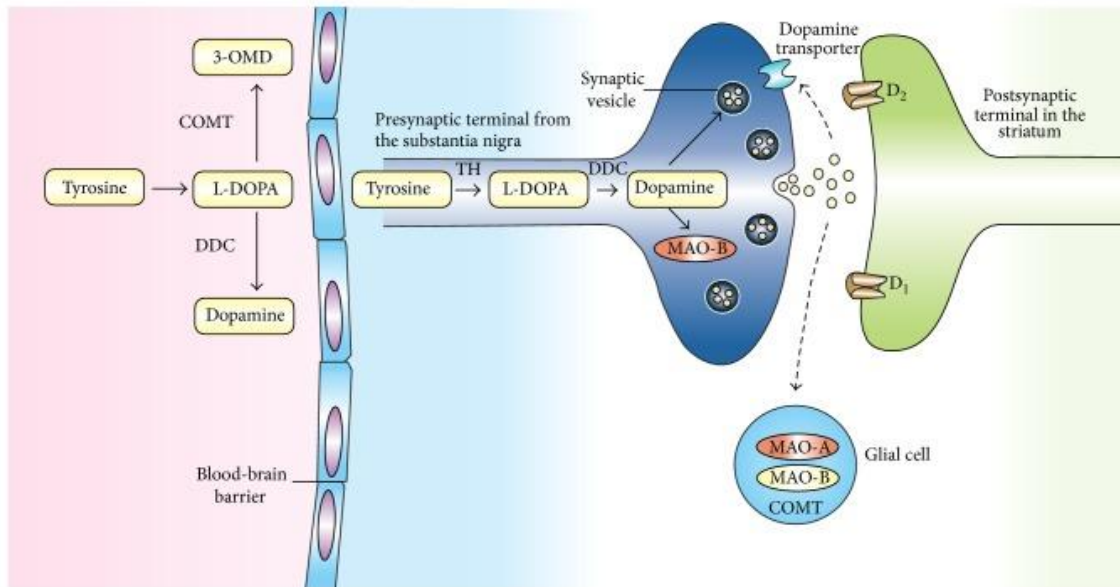


Figura 10. Síntesis de la dopamina. Se sintetiza a partir de la Tirosina, mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y la transforma en L-DOPA, después la DOPA descarboxilasa la convierte finalmente en DA, la cual se integra a las vesículas sinápticas a través del transportador vesicular de monoaminas 2 y se almacena hasta ser descargada por exocitosis en la membrana celular y se libera en la sinapsis (Tomada de Juárez *et al.*, 2016).

La DA está implicada en diversas funciones como el control motor, el aprendizaje, la motivación, la recompensa, y también realiza actividades en la periferia como modulador de la motilidad gastrointestinal, de la función cardiovascular, en la liberación de otras catecolaminas, en la secreción de hormonas, la función renal y tono vascular por ello se destaca su importancia, ya que una desregulación en las vías dopaminérgicas puede provocar enfermedades que representan una problemática en los sistemas de salud, como la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, la adicción, el síndrome de Tourette y la hiperprolactinemia (Liu & Kaeser, 2019)

Los receptores del sistema dopaminérgico (DR) se clasifican en dos familias: la familia D1 y la familia D2. La primera familia incluye a D₁ y D₅; y la segunda incluye a D₂, D₃ y D₄. Ambas familias de receptores activan proteínas G. Los receptores tipo D1 se unen a la proteína G_{s/olf}, acoplada positivamente a la adenilato ciclasa, su activación conlleva al incremento de los niveles citosólicos de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), mientras que los receptores tipo D2 al unirse a la proteína G_{i/o}, disminuyen los niveles de AMPc. La activación de los receptores D1, después de aumentar los niveles de AMPc, lleva la activación de PKA lo que a su vez aumenta la conductancia de los canales de Ca²⁺ tipo L y disminuye la conductancia de K⁺.

Los receptores de dopamina D1, además de activar la adenilato ciclasa, también aumentan el metabolismo de los fosfoinosítidos, mientras que los receptores D2 activan a la fosfolipasa C y realizan actividades no clásicas como interactuar con otros mediadores y sistemas de receptores, (Teng *et al.*, 2022; Myslivecek, 2022).

Los DR acoplados a las proteínas G, forman una asociación reversible con proteínas intracelulares heterotriméricas y una alta afinidad para que un agonista se pueda unir al receptor, depende en parte de que la subunidad α se una a GDP y el receptor sufre un cambio conformacional que provoca que se intercambie GDP por GTP. Por consiguiente, se disocia el heterotrímico del receptor lo que conduce a estado de baja afinidad para el agonista. Siguiendo el ciclo, la subunidad α se une a GTP, lo que media los efectos en la adenilato ciclasa, por otro lado, la actividad enzimática intrínseca hidroliza GTP a GDP, de forma que de nuevo la afinidad de los agonistas del receptor vuelve a ser alta (Cumming, 2011; Andersen & Jansen, 1990). La afinidad de los DR puede depender de varios factores, Cumming (2011) en el estriado demostró que una subpoblación de receptores D₁, se une a agonistas con alta afinidad, lo que generalmente pero no siempre resulta en la conversión a un estado de baja afinidad tras la adición de GTP. Richfield, Penney & Young (1989) hallaron que los receptores D₁ y D₂ mostraron diferentes estados de afinidad en ausencia de nucleótidos de guanina exógenos, el D₁ mostró un estado de baja afinidad tanto para el agonista selectivo como no selectivo, mientras que el receptor D₂ mostró un estado de afinidad alto tanto para un agonista no selectivo como selectivo.

Para el receptor D₂, se han propuesto dos teorías para determinar la afinidad del receptor que también se conoce dependiendo de la alta o baja afinidad como acoplada o desacoplada a la proteína G. La primera teoría denominada como pre-acoplada propone que el receptor D₂, forma

un complejo con la proteína G, lo que conlleva a que el receptor tenga una alta afinidad a la unión de los agonistas. La segunda se denomina la teoría de colisión y plantea que tanto el receptor como la proteína G se encuentran libremente en la membrana plasmática sin el agonista, pero cuando este se une, entonces cambia su conformación a una con mayor afinidad por la proteína G, lo que conduce después a su activación (Skinbjerg *et al.*, 2012).

De todos los receptores, tanto D₁ como D₂ son los que mayormente se encuentran en el cuerpo estriado adulto. El receptor que se expresa en mayor cantidad en comparación con todos los tipos es el D₁ en el cerebro adulto, expresado generalmente en el estriado dorsal y ventral, también se ha detectado en el sistema límbico, hipotálamo y tálamo (Dziedzicka, 2004). Se ha localizado el receptor D₂ dentro en las MSNs en los axones, dendritas y el soma de la parte dorsolateral del núcleo caudado putamen y accumbens (Delle, Sesack & Pickel, 1997).

La dopamina al interactuar con sus DR desempeña un papel como neuromodulador de las cascadas de señalización intracelulares, ya que la activación de las proteínas G provoca que se activen segundos mensajeros. Mediante técnicas electrofisiológicas, se ha comprobado que las células del núcleo estriado se median por diversos receptores, además de los DR, que, en conjunto con la modulación de corrientes dependientes de voltaje, permiten la potenciación o inhibición de las respuestas activadas por NMDA. Específicamente, se ha determinado que los receptores D₁ potencia las respuestas del glutamato en la vía directa, mientras que los receptores D₂ atenúa las respuestas del glutamato en la vía indirecta en las MSNs (Cepeda & Levine, 2012)

La población más grande de neuronas dopaminérgicas, aproximadamente del 70% se encuentra en el mesencéfalo ventral, y se conforma de tres núcleos: la sustancia nigra (SN), la cual se divide en la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) y sustancia *nigra pars compacta* (SNc); el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo arqueado del hipotálamo (Speranza *et al.*, 2021).

Las vías dopaminérgicas surgen en el hipotálamo y en el mesencéfalo que llevan prolongaciones al diencefalo y telencefalo. Se reconocen 4 vías para las neuronas dopaminérgicas, las cuales se puede observar en la figura 11: La vía mesocortical se proyecta del VTA a las corteza prefrontal; la vía mesolímbica se proyecta también desde del VTA pero al estriado ventral (núcleo accumbens) y esta vía junto con la mesocortical se asocian con el control de la recompensa y la motivación; la vía nigroestriatal desde la sustancia SNc donde se encuentran los somas que proyectan sus axones ramificados al cuerpo estriado dorsal (caudo-putamen) y su función se asocia

con el control motor; y la vía tuberoinfundibular la cual se proyecta del núcleo arqueado y el núcleo paraventricular a la glándula pituitaria, esta vía se encarga de la secreción de prolactina de la glándula pituitaria anterior (Liu & Kaeser, 2019; Xu, H. & Yang, F. 2022).

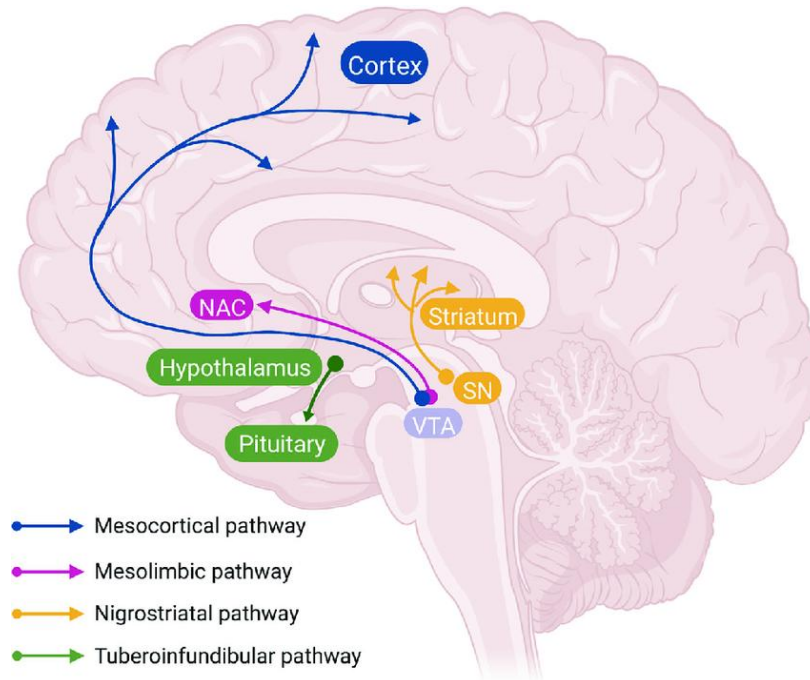


Figura 11. Vías dopaminérgicas. Se reconocen 4 vías: la vía mesocortical (azul), la vía mesolímbica (lila), la vía nigroestriatal (amarillo) y la vía tuberoinfundibular (verde) (Tomada de Xu & Yang, 2022).

Uno de los mecanismos para regular las concentraciones intracelulares de dopamina es a través de los transportadores vesiculares de monoaminas (Elsworth, 2020). También se modulan los niveles extracelulares de DA a través de dos mecanismos denominados como transmisión tónica y transmisión fásica. En la primera ocurre cuando hay una descarga de una pequeña cantidad de DA que no depende de la actividad neuronal y se modula mediante la actividad neuronal y la recaptación de neurotransmisores. Mientras que la transmisión fásica ocurre cuando la DA se libera por las células dopaminérgicas (Juárez *et al.*, 2015).

Uno de los mecanismos para regular las concentraciones intracelulares de dopamina es el uso de los transportadores vesiculares de monoaminas (Elsworth, 2020). Por otro lado, los niveles extracelulares de dopamina se modulan mediante dos mecanismos principales: la transmisión tónica y la transmisión fásica. La transmisión tónica implica la liberación de pequeñas cantidades de dopamina, independientes de la actividad neuronal directa, y está regulada por la recaptación

de neurotransmisores y la actividad neuronal. En contraste, la transmisión fásica ocurre cuando las células dopaminérgicas liberan dopamina en respuesta a estímulos específicos (Juárez *et al.*, 2015).

Las concentraciones de dopamina en el cuerpo estriado fluctúan según la actividad del cerebro, como cuando responde a estímulos o regula funciones básicas. Los niveles de DA varían en el tiempo desde segundos hasta oscilaciones en horas. Lo que también depende de la transmisión tónica y fásica. La tónica se presenta entre el 50 y 98% de las neuronas dopaminérgicas, este tipo de activación genera niveles transitorios de DA de corta duración y ya que la DA se disipa de forma rápida en el espacio extracelular, los niveles basales considerados entre ~2-20 nM de DA dependerán del equilibrio entre la liberación tónica y la recaptación a través del transportador de dopamina. Y por otro lado en la liberación fásica es una rápida elevación de DA que activa de forma simultánea varios sitios de liberación de DA. Esta última se relaciona también con la activación de NMDAR y como respuesta a estímulos ambientales (Liu, Goel & Kaeser, 2021)

Patologías

La DA es indispensable para el funcionamiento normal de los GB en general, por lo que su desbalance conlleva al desarrollo de enfermedades de distintos tipos que afectan la cognición, la memoria y el control motor, causando enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y la enfermedad de Huntington (Cepeda *et al.*, 2009).

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) se reconoce como un trastorno neurodegenerativo complejo y multi sistémico, el cual después de la enfermedad de Alzheimer es el más común, afectando al 1% de la población de adultos mayores de 60 años (McGregor & Nelson, 2019). Aunque principalmente se presenta en adultos mayores, también puede aparecer en pacientes mucho más jóvenes, y los hombres presentan una probabilidad de 1.5 a 2 veces de padecer esta enfermedad que las mujeres (Beitz, 2014).

La EP se manifiesta con síntomas motores y no motores. La fisiopatología de la enfermedad de Parkinson se centra en la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* y el desarrollo de los cuerpos de Lewy. Se ha demostrado que hay una relación entre los oligómeros de α -sinucleína y la EP, que conlleva a la formación de estos cuerpos (Elsworth, 2020).

Cuando los síntomas de la enfermedad se comienzan a manifestar, se estima que ya hay una pérdida del 60% al 70% de las neuronas (Beitz, 2014).

La α -sinucleína es una proteína presente en las neuronas, las conformaciones oligoméricas que forma, denominadas fibrillas son las que producen la toxicidad que afecta la homeostasis celular lo que puede inducir la muerte celular (Stefanis, 2012).

La EP se puede desencadenar por el envejecimiento, estrés oxidativo, factores genéticos y se ha sugerido además al estrés ambiental como desencadenante de la EP, así como la exposición a toxinas ambientales como pesticidas o el consumo de drogas de abuso como la heroína sintética y los factores genéticos (Beitz, 2014).

En condiciones normales, la corteza cerebral libera glutamato hacia el cuerpo estriado, mientras que la sustancia negra compacta (SNc) libera dopamina (DA) para modular esta señal. La dopamina actúa sobre dos tipos de receptores: los D1, que aumentan la actividad neuronal, y los D2, que la reducen, equilibrando así la transmisión. En la enfermedad de Parkinson, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc disminuye los niveles de DA. Como los receptores D1 requieren un aumento de DA para activarse, la vía directa pierde su efecto facilitador. Al mismo tiempo, la falta de activación de los D2 impide la inhibición de la vía indirecta, lo que favorece una sobreestimulación glutamatérgica de la corteza al cuerpo estriado. Como consecuencia, el cuerpo estriado libera más GABA, inhibiendo fuertemente el globo pálido externo (GPe). Esto reduce su acción inhibitoria sobre el núcleo subtalámico, que entonces activa en exceso al globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra reticulada (SNr). Ambos núcleos inhiben fuertemente al tálamo (VA/VL), lo que disminuye la excitación de la corteza motora y provoca los síntomas hipocinéticos del Parkinson (Kandel *et al.*, 2001).

Hay investigaciones en las que se ha descrito la interacción entre los receptores de NMDA y la enfermedad de Parkinson, donde se expone que existe una hiperactividad en los receptores de NMDA del cuerpo estriado, que induce a un aumento en los niveles de AMPc, esto ocurre de forma indirecta mediante la estimulación de los receptores de adenosina, sugiriendo una vía de señalización en común en el cuerpo estriado (Nash & Brotchie, 2000).

Algunos de los síntomas motores centrales se tratan con la terapia de reemplazo de dopamina con el precursor de dopamina como levodopa o con agonistas de dopamina (McGregor & Nelson, 2019).

Enfermedad de Huntington

La Enfermedad de Huntington (EH), considerada como una enfermedad neurodegenerativa hereditaria implica déficits motores de forma progresiva, síntomas psiquiátricos y deterioro cognitivo. La prevalencia de esta enfermedad se estima en 2.7 por cada 100, 000 individuos (Kim *et al.*, 2021) y aparece en un rango de 35 a 50 años y progresa durante 15 a 20 años hasta la muerte, con síntomas motores como movimientos involuntarios coreiformes, desequilibrio postural, dificultad para hablar y tragar y conforme progresa la enfermedad se presenta la acinesia y rigidez (Fernandes & Raymond, 2009).

La EH es hereditaria de forma autosómica y dominante, el gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 4 y presenta un brazo largo por un aumento del número normal de repeticiones CAG citosina-adenina-guanina (glutamina) en la proteína HTT (Huntingtin protein, por sus siglas en inglés), lo que resulta en la proteína (m)HTT (mutant Huntingtin protein) y causa la pérdida de MSNs del cuerpo estriado. (Levine, Cepeda & André, 2010).

El cuadro patológico de la EH se caracteriza por la pérdida de las neuronas del cuerpo estriado que se encargan de la vía indirecta, y ocurre una reducción de la inhibición de las neuronas en el globo pálido externo, lo que conlleva a una mayor excitación de sus neuronas y por consiguiente a la inhibición del núcleo subtalámico, lo que dirige a los síntomas coreiformes. Con el avance de la enfermedad la pérdida de las neuronas que se proyectan al segmento del globo pálido interno se asocia con la rigidez y acinesia de la enfermedad, a causa de la disminución de inhibición en ese núcleo y aumentar la actividad en las neuronas (Kandel *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que los NMDAR tienen un papel importante en el comienzo de la enfermedad y la pérdida de las MSNs del cuerpo estriado, ya que un aumento de este receptor y sobre todo con una estequiometría dada por las subunidades GluN1 y GluN2B presentan un riesgo mayor de pérdida de neuronas. Por otro lado, se ha encontrado un aumento de la corriente de NMDA (INMDA) en ratones pre-sintomáticos y sintomáticos (Fernandes & Raymond, 2009). La mutación se asocia con cambios conformacionales de la proteína e interacciones anormales

proteína-proteína, lo que además de la sobreactivación de los NMDAR, causa citotoxicidad, disfunción sináptica, disminución del calcio mitocondrial y de los orgánulos, aumento de la oxidación, lo que conduce finalmente a la muerte neuronal (Fão *et al.*, 2022).

Se ha demostrado que los NMDAR tienen un papel importante en el comienzo de la enfermedad y la pérdida de las MSNs del cuerpo estriado, lo que se asocia a que las neuronas con mayor cantidad de NMDAR y sobre todo formado por las subunidades NR1/NR2B, presentan un riesgo mayor de pérdida y por otro lado hay un aumento de la INMDA en ratones pre-sintomáticos y sintomáticos (Fernandes & Raymond, 2009). La mutación se asocia con cambios conformacionales de la proteína e interacciones anormales proteína-proteína, lo que además de la sobreactivación de los NMDAR, causa citotoxicidad, disfunción sináptica, disminución del calcio mitocondrial y de los orgánulos, aumento de la oxidación, lo que conduce finalmente a la muerte neuronal (Fão *et al.*, 2022).

Antecedentes específicos

Desde 1987 con el trabajo de Johnson & Ascher, se comenzó a utilizar la glicina (Gly) como un potenciador de la corriente inducida por NMDA o glutamato. En los registros en configuración *whole-cell* de su trabajo, se observó una potenciación de la corriente la cual fue detectable desde la concentración de 10 nM y el aumento llegó a la saturación con 1 μ M de Gly, al momento que se aplicó 10 μ M de NMDA, sin embargo, al aplicar cada uno por separado no se generaron corrientes significativas, considerando desde este momento, tradicionalmente a la Gly como un potenciador, sin embargo, se sugería definir el mecanismo de la potenciación, subyacente al incremento de la corriente como un tipo de modulación alostérica del NMDAR.

El papel de la glicina se convirtió en un requerimiento para la activación del receptor de NMDA, por lo que se ha utilizado de forma obligatoria en el estudio de la INMDA.

Las concentraciones de este aminoácido neurotransmisor y del glutamato en el cuerpo estriado de ratas conscientes se han reportado en una concentración de 1.0 μ M a 2.5 μ M (Harsing & Matyus, 2013). Sin embargo, a través de los años, la investigación con los NMDAR, al utilizar glicina, se aplican diferentes concentraciones, en el caso del estudio en rebanada se considera requiere una mayor cantidad de Gly en comparación con la célula dissociada, debido a una mayor dificultad para penetrar a través de los tejidos, determinando que la concentración de Gly puede

estar siendo regulada por mecanismos de absorción o incluso la actividad excitadora de la Gly podría ser disfrazado por su acción inhibitoria (Abe *et al.*, 1990).

Específicamente, en los que se ha estudiado la interacción entre el NMDAR-DA en presencia de Gly, son Cepeda, Buchwald & Levine (1993), en donde se estudió la neuromodulación de la dopamina en cortes de neocórtex con registros intracelulares *current-clamp*, para determinar los efectos con los agonistas. Al colocar el agonista de D₁ (SKF 38393) se observó una potenciación de las respuestas evocadas por NMDA, mientras que con el agonista del receptor del receptor D₂ (Quinpirole) atenuó las respuestas evocadas por NMDA. Otro trabajo que presentó resultados similares y siguiendo con la misma línea de investigación para dilucidar el papel de la dopamina en la corriente inducida por NMDA fue el de Cepeda *et al.* (1998), en donde se utilizó una metodología de fijación de voltaje en configuración de *whole-cell*, también se utilizaron agonistas de los receptores D₁ y D₂, la activación de los receptores D₁ indujo una potenciación de la corriente, sin embargo, en la activación de los receptores D₂, los resultados fueron inconsistentes, presentando disminución, aumento o incluso sin ningún efecto sobre la corriente de NMDA.

Planteamiento del problema

Dado que el estudio de las corrientes inducidas por NMDA se ha realizado en presencia de glicina (Gly) tras su descubrimiento como potenciador de la corriente del NMDAR, además de su acción inhibitoria a través de sus propios receptores (Johnson & Ascher, 1998), la investigación en esta área se ha centrado principalmente en esa dirección. Así, la Gly se ha considerado un coagonista obligatorio para la activación del NMDAR (Berger *et al.*, 1998). En este contexto, la potenciación e inhibición de la INMDA se ha explicado tradicionalmente mediante mecanismos de señalización clásicos, y considerando el enfoque de este estudio, a través de la vía de señalización de la dopamina en el cuerpo estriado de la rata, sujeto también a la unión de Gly (Cepeda & Levine, 2012).

Sin embargo, investigaciones recientes han comenzado a plantear nuevos modelos que sugieren mecanismos adicionales en la potenciación e inhibición de la INMDA, independientes de los receptores metabotrópicos. Estos avances han destacado el papel de otros neuromoduladores como reguladores de la respuesta del NMDAR, lo que amplía la visión sobre la modulación de este receptor más allá de lo establecido tradicionalmente. En particular, se ha demostrado que la

Gly no es el único ligando capaz de unirse a la subunidad GluN1, ya que otros compuestos, como la acetilcolina, pueden actuar como moduladores de la INMDA (Islas et al., 2022).

En este contexto, el objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la dopamina a diferentes concentraciones sobre el comportamiento de las corrientes inducidas por NMDA en ausencia de Gly en neuronas del cuerpo estriado dorsal de rata.

Las interacciones entre los receptores NMDA y dopaminérgicos desempeñan un papel clave en funciones como la cognición, la memoria y el control motor. En este contexto, los ganglios basales regulan el movimiento y están implicados en trastornos como la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Huntington (EH). Ambos presentan alteraciones motoras, como temblores y movimientos involuntarios, pero con mecanismos distintos: en la EP, la hiperactividad de la vía indirecta del núcleo subtalámico provoca síntomas hipocinéticos, mientras que en la EH, la pérdida neuronal en el cuerpo estriado reduce la inhibición del globo pálido externo, alterando la excitación del núcleo subtalámico (Kandel et al., 2000).

Por lo que, el estudio en el cuerpo estriado como principal centro de aferencias de los ganglios basales es fundamental para seguir descifrando su funcionamiento y patologías asociadas. Además, permite profundizar la investigación de neuromoduladores como la DA y su interacción con los NMDAR en ausencia de Gly.

Hipótesis

La dopamina presenta efectos diferenciales de potenciación e inhibición de manera dependiente de la concentración sobre la actividad del receptor a glutamato tipo NMDA en ausencia de glicina en neuronas disociadas de forma aguda del cuerpo estriado de rata.

Objetivo general

Evaluar los efectos de la dopamina a diferentes concentraciones sobre la actividad del receptor de glutamato tipo NMDA en ausencia de glicina en neuronas disociadas de forma aguda del cuerpo estriado de rata.

Objetivos específicos

Analizar los efectos de la dopamina en las concentraciones de 3nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM y 1 μ M.

Realizar una curva dosis-respuesta utilizando concentraciones de dopamina de 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM y 1 μ M, para comparar sus efectos y ajustar los datos obtenidos a una ecuación de Hill.

Métodos

Modelo biológico

Se obtuvieron neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado dorsal de ratas macho de 30 días de edad de la cepa Wistar de 100 g. Las ratas fueron proporcionadas por el bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Criterios de inclusión y exclusión de las MSNs

Para delimitar el tamaño de la muestra, se seleccionaron las neuronas espinosas medianas con una capacitancia 3 a 10 pF (Surmeier *et al.*, 1995; Song & Surmeier 1996). Además de la capacitancia se consideró a las células con una resistencia de membrana $>1G\Omega$ y una resistencia de acceso $<25M\Omega$. Las células con las características anteriores presentaron corrientes dependientes de voltaje de Na^+ y Ca^{2+} , lo que indicaban la viabilidad de la célula para realizar el

experimento. Las neuronas con una capacitancia mayor a 10 pF o con una resistencia de membrana $<1\text{G}\Omega$ o una resistencia de acceso $>25\text{M}\Omega$ fueron excluidas del estudio.

Protocolo de disociación

El protocolo de disociación de neuronas utilizado se basó en los descrito por Flores-Hernández *et al.*, 2002.

Las ratas se anestesiaron con halotano e inmediatamente se decapitaron, se extrajo el cerebro y se colocó rápidamente en una solución fría de Isetionato baja en Ca^{2+} , elaborada con 140 mM Isetionato de sodio, 2 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , 23 mM glucosa, 15 mM HEPES, ajustada con un $\text{pH}=7.4$ y 300-305 mOsm/L, la misma fue suplementada con 1 mM ácido kinúrenico, 0.005 mM glutatión, 1 mM ácido pirúvico, 0.1 mM NG-nitro-L-arginina. El isetionato se mantuvo oxigenado todo el tiempo que se utilizó.

Posteriormente se realizaron cortes coronales de 350 μm con un vibratomo, cada uno de los cortes se colocaron en una placa de Petri, para disecar el cuerpo estriado dorsal con ayuda de un microscopio estereoscópico y con agujas para obtener rebanadas de menor tamaño que faciliten la disociación.

Cada una de las rebanadas se sumergieron en la solución de EBBS (Earle's balanced salts solution), amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y suplementada con 1 mM ácido kinúrenico, 0.005 mM glutatión, 1 mM ácido pirúvico, 0.1 mM NG-nitro-L-arginina. El EBSS se mantuvo burbujeado con 95% O_2 y 5% CO_2 , ajustado con un $\text{pH}=7.4$ y 300-305 mOsm/L.

Las rebanadas se dejaron reposar por al menos una hora dentro del EBSS para poder continuar con la disociación. Durante todo el experimento se mantienen en esta solución hasta el momento en el que se sumergieron las rebanadas en HBSS (Hank's balanced salt solution), con 0.75 mg/mL de papaína a una temperatura de 35° durante 9 minutos y 15 segundos, para lograr la disociación enzimática. El HBSS en su preparación se amortigua con HEPES y se suplementa con 1 mM ácido kinúrenico, 0.005 mM glutatión, 1 mM ácido pirúvico, 0.1 mM NG-nitro-L-arginina; y se mantiene burbujeada solo con O_2 .

Después de la disociación enzimática, se lavaron las rebanadas con la solución de Isetionato que se mantuvo oxigenada, posteriormente se realizó la disociación mecánica con pipetas Pasteur

de vidrio de diferente calibre (pulidas al fuego), la disociación se realizó en serie a partir de la pipeta de mayor a menor calibre. La disociación del tejido se coloca en cajas Petri de poliestireno de 35 mm (Corning), montadas en el microscopio invertido Leica, se dejó reposar 5 minutos la muestra para que las células se adhirieran a la caja Petri y se procedió a lavar la suspensión de células con solución de fondo: 140 mM NaCl, 23 mM glucosa, 15 mM HEPES, 2mM KCL, 2mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ y 1 % rojo fenol, ajustada a un pH= 7.4 y 300-305 mOsm/L, esta solución también se mantuvo oxigenada.

Protocolos electrofisiológicos

Rampa

Para seleccionar las células a las que se les aplicó el protocolo electrofisiológico, primero se utilizó un protocolo de rampa de voltaje, como se muestra en la Figura 12. Se aplicó un cambio continuo de voltaje de -100 mV a +40 mV durante 100 ms para inducir corrientes de Na⁺ y Ca²⁺ dependientes de voltaje, lo que permitió evaluar la viabilidad de la membrana celular. Si la célula no presentaba estas corrientes, se consideraba no óptima y se descartaba, ya que la ausencia de corrientes iónicas puede indicar una membrana dañada, condiciones fisiológicas inadecuadas para mantener la excitabilidad eléctrica o una disfunción en la expresión de los canales de Na⁺ y Ca²⁺. Esto último puede deberse a variabilidad en la expresión de los canales o a daño celular.

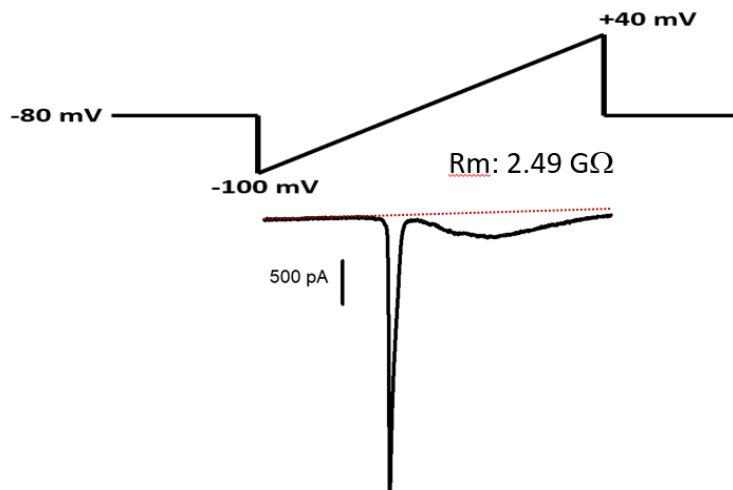


Figura 12. Protocolo de rampa de voltaje. En la parte superior rampa de voltaje aplicado a la célula de -100 mV a +40 mV con un potencial de mantenimiento de -80 mV. En la parte inferior corrientes voltaje-dependientes de Na⁺ y Ca²⁺. La célula presentó una resistencia de membrana (R_m) de 2.49 GΩ.

Fijación de voltaje en célula completa (*whole-cell, patch-clamp*)

En las neuronas viables se realizó el registro electrofisiológico de fijación de voltaje en la configuración de célula completa, de las corrientes inducidas por NMDA.

Los electrodos se realizaron mediante un estiramiento de tubos capilares de borosilicato y un estirador de micropipetas modelo P-97 (Sutter Instruments CO).

La solución interna de los electrodos se preparó con 175 mM N-metil-D-glutamina (NMDG), 40 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 10 mM ácido etilen glicol-bis (β-aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), 12 mM fosfocreatina, 3 mM Na₂ATP, 0.35 mM Na₃GTP, 0.1 mM leupeptina, pH: 7.25 y Osm: 270 a 275.

La solución externa se compone de 127 mM NaCl, 20 mM CsCl, 5 mM BaCl₂, 2 mM CaCl₂, 12 mM glucosa, 10 mM HEPES, pH = 7.4 y Osm: 300. Además, se le agregó ácido ascórbico en una concentración de 200 μM como antioxidante para evitar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y productos de oxidación que pueden afectar la señalización y la función celular y mantener estable a la dopamina.

Los registros se obtuvieron con un amplificador para fijar el voltaje “voltage clamp” Multiclamp 700A y con un Digitalizador 1440A (Axon Instruments), controlados a través del programa pClamp (Versión 9, Axon Instruments).

La resistencia de los electrodos tuvo un rango entre 6 a 8 MΩ. Después de la ruptura del sello, la resistencia de acceso considerable en todas las neuronas fue menor a 25 MΩ. El potencial de mantenimiento fue de -80 mV.

La aplicación de NMDA y DA se realizó cada 15 segundos, a través de capilares. Las concentraciones de DA empleadas fueron 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM y 1 μM. Los fármacos se prepararon en una solución control libre de Tetraetilamonio (TEA “free”). El stock de NMDA se preparó a una concentración de 100 mM. Para evitar la oxidación de la DA esta se preparó inmediatamente antes de cada experimento en un ambiente con luz en el extremo inferior

del espectro visible (620 a 750 nm) y empleando ácido ascórbico en concentraciones fisiológicas de 200 μM , el stock se preparó con la solución de TEA free.

Aplicación de fármacos

La duración de cada trazo fue de 15 segundos (como se observa en la figura 13), a través de dos capilares con un ángulo de 45° . El potencial de mantenimiento fue de -80 mV. Los fármacos se aplicaron de la siguiente manera:

De la duración de 15 segundos de cada trazo, 12 segundos corresponden a la aplicación de solución externa a través de un capilar, con la interrupción de 3 segundos durante los cuales se baña a la célula con NMDA (100 μM), a través del otro capilar. Esta condición experimental se utilizó como control y lavado del efecto de la aplicación de la DA. El número de trazos se delimitó por la estabilidad de la corriente.

Condición experimental NMDA+DA: De igual manera que el control con respecto al tiempo y los capilares, en esta condición la célula se baña con NMDA+DA durante 3 segundos cada 12 segundos a través de un capilar. La DA se aplicó de forma aleatoria, en las diferentes concentraciones ya mencionadas. El número de trazos también se delimitó por la estabilidad de la corriente. Entre cada concentración se realizó un lavado con la solución control.

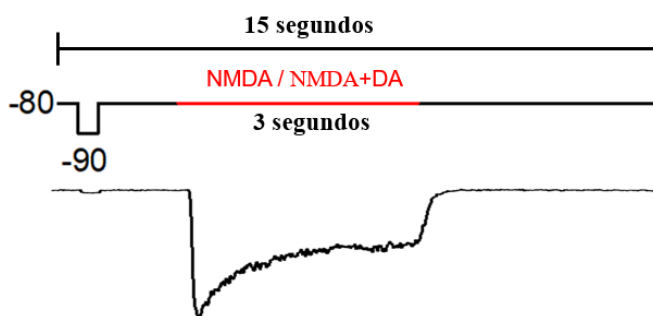


Figura 13. Trazo representativo de la aplicación del fármaco. Protocolo de aplicación de la dopamina durante 3 segundos cada 12 segundos, 15 segundos de duración por cada trazo. Se mantuvo un potencial de mantenimiento en -80 mV. Aproximadamente se promediaron entre 5 a 10 trazos estables de la corriente de cada condición experimental.

Análisis estadístico

Para analizar los efectos de la DA en diferentes concentraciones en la actividad del glutamato tipo NMDA, se evaluaron los efectos en el pico de la corriente de NMDA en las concentraciones utilizadas de 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 1 μ M de DA; lo que se determinó como porcentaje de potenciación o inhibición en la INMDA. Los porcentajes se obtuvieron con la fórmula que se observa en la figura 14.

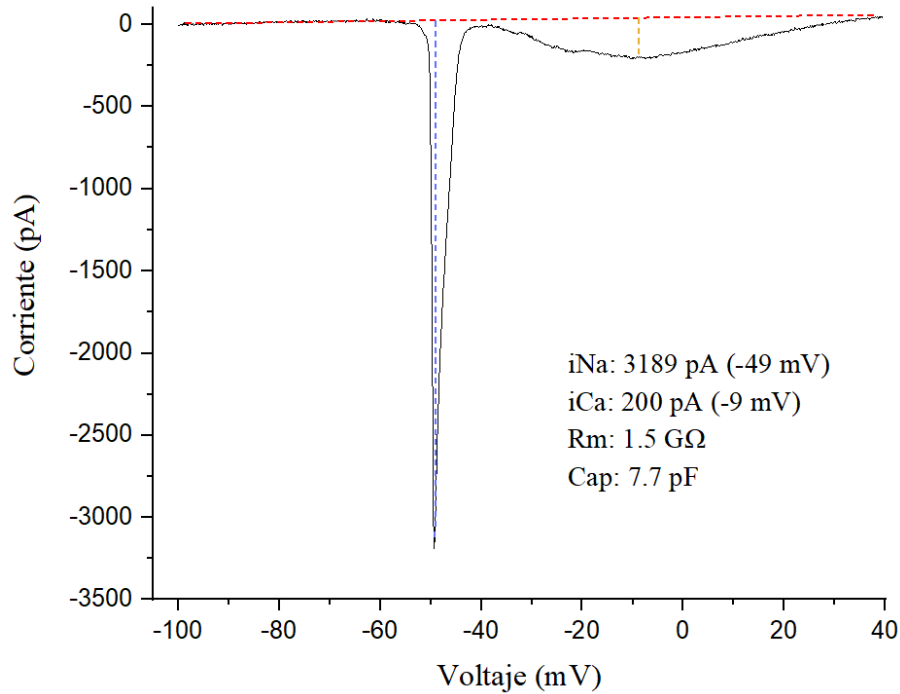
$$\% = 1 - \left(\frac{\text{efecto}}{\left(\frac{\text{control+lavado}}{2} \right)} \right) * 100$$

Figura 14. Fórmula para calcular el porcentaje de efecto en la INMDA. El control y lavado fueron la amplitud de la corriente en ausencia de DA, mientras que la condición efecto era la amplitud de la corriente con las diferentes concentraciones de DA.

Al obtener todos los porcentajes se realizó un análisis estadístico, aplicando una prueba de normalidad a los porcentajes de los picos de las corrientes en SigmaPlot 11.0. Los valores no presentaron una distribución normal en los porcentajes de potenciación de la corriente ($p = 0.151$), ni en los porcentajes de inhibición de la corriente ($p = 0.758$). Dado que los datos no son normales se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis de una vía, en la cual se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones con una de $p < 0.001$ para los porcentajes de potenciación de la corriente, para determinar entre que concentraciones se aplicó una post-prueba de Dunn. Además, se realizó una normalización de los datos para obtener la densidad de corriente (pA/pF), dividiendo la amplitud de la corriente (pA) entre la capacitancia de la neurona (pF). Esto permitió comparar las respuestas independientemente del tamaño celular. Posteriormente, se realizó un nuevo análisis estadístico utilizando también la prueba Kruskal-Wallis de una vía y la prueba de Dunn.

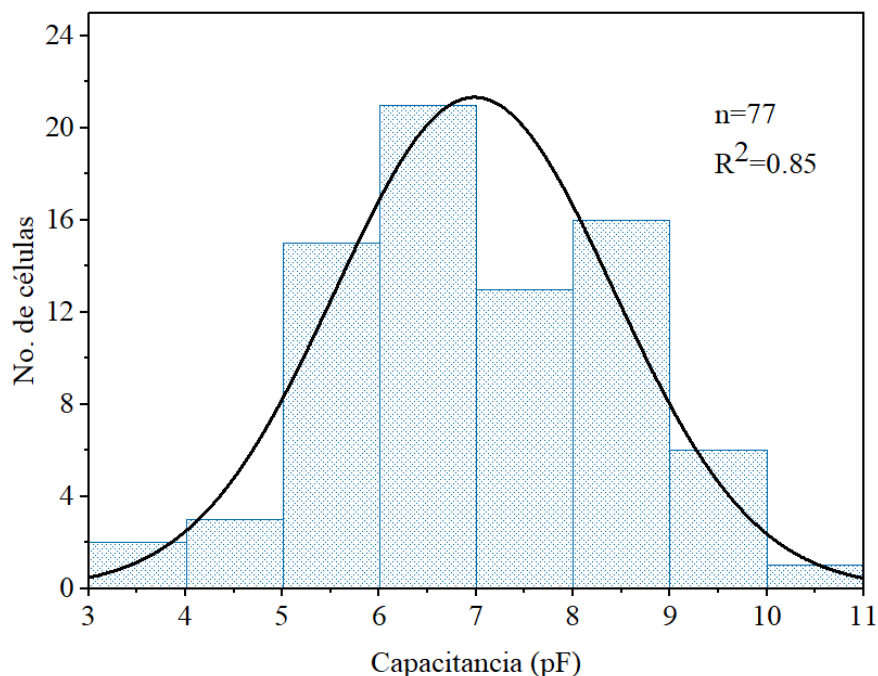
Resultados

Todas las células registradas presentaron corrientes dependientes de voltaje de Na^+ y Ca^{2+} como se observa en el trazo representativo de una célula, con una capacitancia de 7.7 pF (gráfica 1).



Gráfica 1. Corriente de sodio y calcio obtenida por la aplicación del protocolo de rampa. Se graficó el tamaño de la corriente en picoAmperios (pA) con respecto al voltaje (mV). En la figura se observa un trazo representativo de la corriente dependientes de voltaje, las cuales se obtienen del promedio de varios trazos de la aplicación del protocolo de rampa. Para esta célula en particular con una capacitancia de 7.7 pF, el pico máximo fue el de Na⁺ con una amplitud de la corriente de 3189 pA en un voltaje de -49 mV, mientras que el pico de la corriente de Ca²⁺ tuvo una amplitud de 200 pA en un voltaje de -9 mV.

Se registraron un total de 77 neuronas provenientes de 25 ratas. En promedio se registraron 3 neuronas por rata. Todas presentaron los parámetros electrofisiológicos establecidos con una resistencia de membrana $>1\text{G}\Omega$ y una resistencia de acceso $<25\text{M}\Omega$. Para determinar la población neuronal de estudio (MSNs), se consideró la capacitancia como la medida del tamaño celular, considerando de 3 a 10 pF con base en lo reportado en la literatura para las MSNs para el registro electrofisiológico en configuración *whole-cell* (Surmeier *et al.*, 1995; Song & Surmeier 1996). La capacitancia promedio fue de 6.98 pF, valor que no está alejado de lo reportado por Shen *et al.*, (2004) para MSNs con una capacitancia de 7.6 ± 0.2 pF. La población de neuronas se ajustó a una curva gaussiana con una R^2 de 0.85 como se observa en la gráfica 2.

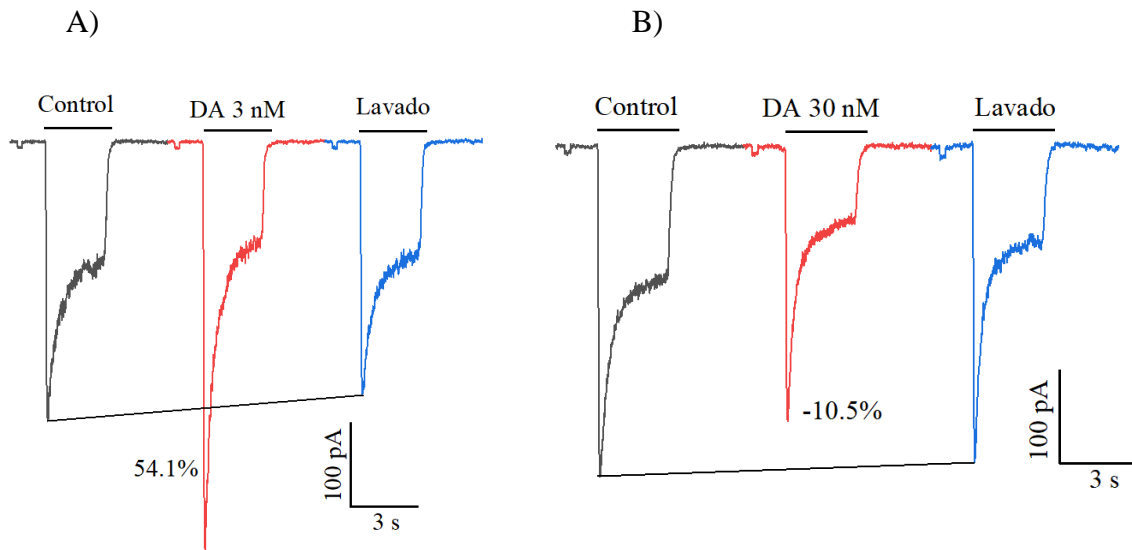


Gráfica 2. Histograma de la distribución de capacitancias de las MSNs registradas en el cuerpo estriado dorsal de rata. El total de neuronas registradas fue de 77 en un rango de 3 a 10 pF, aquellas con una capacitancia mayor a 10 pF se excluyeron. La moda se observa en 6 pF, la media de la capacitancia fue de 6.98 pF. Se observa una distribución normal de los datos que se ajusta a una curva de Gauss con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.85.

Efecto de la dopamina sobre la actividad de glutamato tipo NMDA en ausencia de Gly en las MSNs de cuerpo estriado de rata

En este estudio los efectos de la dopamina en las concentraciones de 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 1 μ M; fueron potenciación e inhibición sobre la actividad del receptor de glutamato tipo NMDA en ausencia de glicina en neuronas disociadas de forma aguda del cuerpo estriado de rata, de lo que se obtuvo el porcentaje de efecto obtenido con la fórmula de la figura 14. Los resultados no se ajustaron a una curva dosis respuesta, pero al mostrar diferencias visibles entre concentraciones, se realizó un análisis estadístico entre concentraciones para determinar si las diferencias observables eran significativas.

Se obtuvieron trazos representativos de cada uno de los efectos, potenciación e inhibición, los cuales se muestran en la gráfica 3.



Gráfica 3. Trazos representativos de la potenciación e inhibición de la corriente INMDA en el cuerpo estriado dorsal de rata, inducidas por diferentes concentraciones de DA. Los registros mostrados representan el promedio de cinco o más trazos, obtenidos bajo tres condiciones experimentales: aplicación de la solución control, aplicación de DA y lavado. A) Potenciación del 54.1% de la INMDA con una concentración de 3 nM de DA. B) Inhibición del 10.5% de la INMDA con una concentración de 30 nM de DA. Los trazos corresponden a neuronas diferentes.

Para los datos de potenciación de la INMDA, se aplicó la prueba de normalidad, la cual fue superada ($p = 0.173$), lo que indica que los datos no presentan desviaciones significativas de una distribución normal. Sin embargo, la prueba de homogeneidad de varianzas falló ($p < 0.050$), lo que sugiere que las varianzas entre los grupos no son iguales. Por esta razón, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual arrojó un estadístico $H=29.176$ con 5 grados de libertad y una $p < 0.001$, confirmando la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados. Posteriormente, la prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Dunn reveló diferencias significativas ($p < 0.05$) en las siguientes comparaciones: 3 nM vs 100 nM, 3 nM vs 1 μ M, 3 nM vs 1 nM y 30 nM vs 100 nM (Gráfica 4).

Para los datos de inhibición de la INMDA, la prueba de normalidad fue superada ($p = 0.740$), indicando que los datos siguen una distribución normal. Sin embargo, la prueba de homogeneidad de varianzas falló ($p < 0.050$). Por lo que, también se aplicó la prueba Kruskal-Wallis. Los resultados de esta prueba mostraron un estadístico $H=22.921$ con 5 grados de libertad y un $p < 0.001$, lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento. Para identificar qué concentraciones diferían entre sí, también se aplicó la prueba de

comparaciones múltiples de Dunn, en la cual se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las siguientes comparaciones: 1 nM vs 3 nM, 1 nM vs 30 nM y 10 nM vs 3 nM (Gráfica 5).

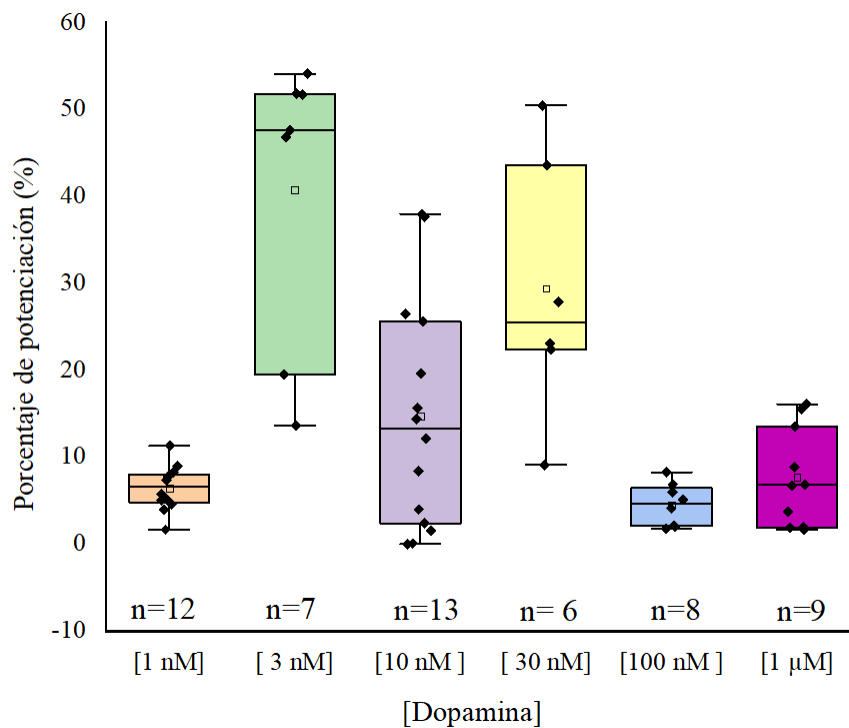
Se procedió a graficar la media \pm EE (Error Estándar) para cada concentración aplicada (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 1 μ M), de lo que se construyeron gráficas boxplot para los porcentajes de potenciación e inhibición, de las cuales la mediana es la mejor opción para representar los datos, ya que, la prueba de normalidad arrojó una $P \geq 0.05$ y aunque los datos podrían seguir una distribución normal, la prueba de homogeneidad de varianzas falló ($P < 0.05$).

Se procedió a graficar la media \pm Error Estándar (EE) para cada concentración aplicada. A partir de estos datos se construyeron gráficas tipo boxplot para los porcentajes de potenciación e inhibición.

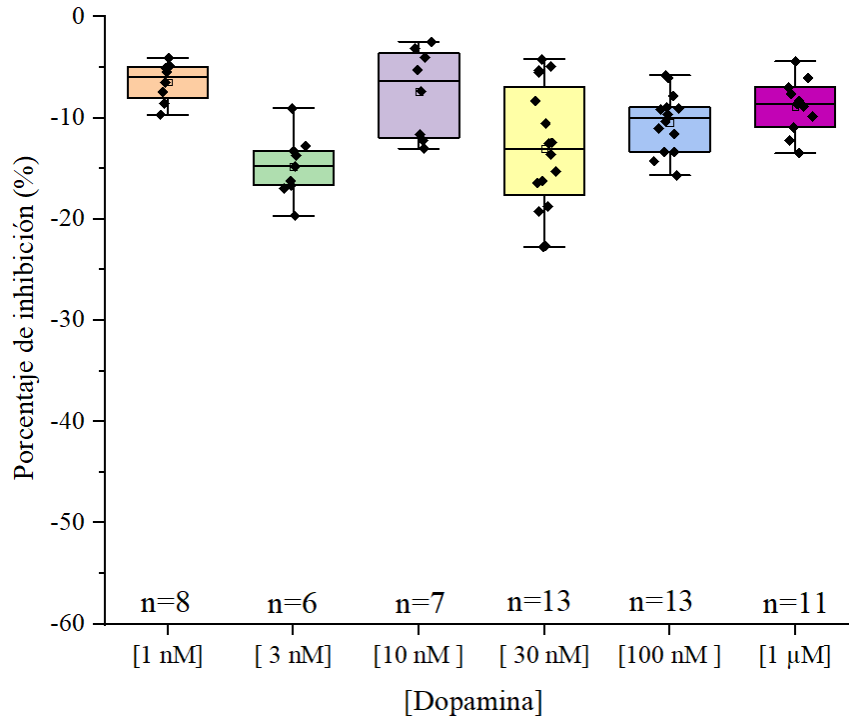
En la potenciación, los valores obtenidos para la media \pm error estándar (EE) fueron: 6.47 ± 0.75 para 1 nM, 40.75 ± 6.34 para 3 nM, 14.71 ± 3.53 para 10 nM, 29.42 ± 6.19 para 30 nM, 4.53 ± 0.86 para 100 nM y 7.69 ± 1.79 para 1 μ M.

En la inhibición, los valores obtenidos para la media \pm error estándar (EE) fueron: -6.46 ± 0.70 para 1 nM, -14.78 ± 1.02 para 3 nM, -7.40 ± 1.53 para 10 nM, -13.05 ± 1.55 para 30 nM, -10.44 ± 0.79 para 100 nM y -8.85 ± 0.80 para 1 μ M.

La mediana se consideró la mejor medida de tendencia central para representar los datos, ya que la prueba de normalidad arrojó un valor de $p \geq 0.05$. Sin embargo, a pesar de esta posible distribución normal, la prueba de homogeneidad de varianzas resultó significativa ($P < 0.05$), lo que sugiere diferencias en la dispersión de los datos entre grupos.



Gráfica 4. Porcentaje de potenciación de la INMDA (%). El eje x muestra las concentraciones de DA. La prueba Kruskal-Wallis de una vía, tuvo una diferencia significativa entre las concentraciones aplicadas ($p < 0.001$). La prueba de Dunn mostró diferencia significativa ($P < 0.05$), entre: 3 nM vs 100 nM, 3 nM vs 1 μ M, 3 nM vs 1 nM y 30 nM vs 100 nM. Las medianas de cada concentración fueron: 7.39 para 1 nM, 46.80 para 3 nM, 13.25 para 10 nM, 23.05 para 30 nM, 4.12 para 100 nM y 6.86 para 1 μ M.



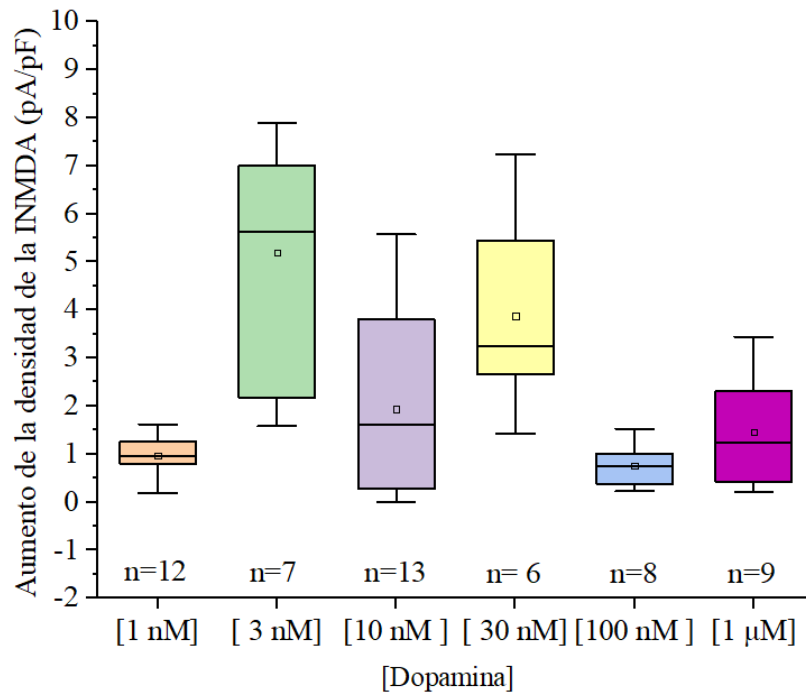
Gráfica 5. Porcentaje de inhibición de la INMDA (%). El eje x muestra las concentraciones de DA. La prueba de Kruskal-Wallis de una vía, tuvo una diferencia significativa entre concentraciones ($P < 0.001$). La prueba de Dunn mostró diferencia significativa ($P < 0.05$), entre: 1 nM vs 3 nM, 1 nM vs 30 nM y 10 nM vs 3 nM. Las medianas de cada concentración fueron: -5.96 para 1 nM, -14.79 para 3 nM, -6.30 para 10 nM, -13.08 para 30 nM, -10.02 para 100 nM y -8.59 para 1 µM.

Se realizó la normalización de los datos de amplitud de la potenciación e inhibición de la corriente en términos de densidad de corriente (pA/pF), con el objetivo de evaluar si los cambios observados son proporcionales al tamaño celular, eliminando la posible influencia de diferencias en la capacitancia y asegurando que los cambios observados en la INMDA reflejen modificaciones en la función del receptor y no solo variaciones estructurales de las células registradas

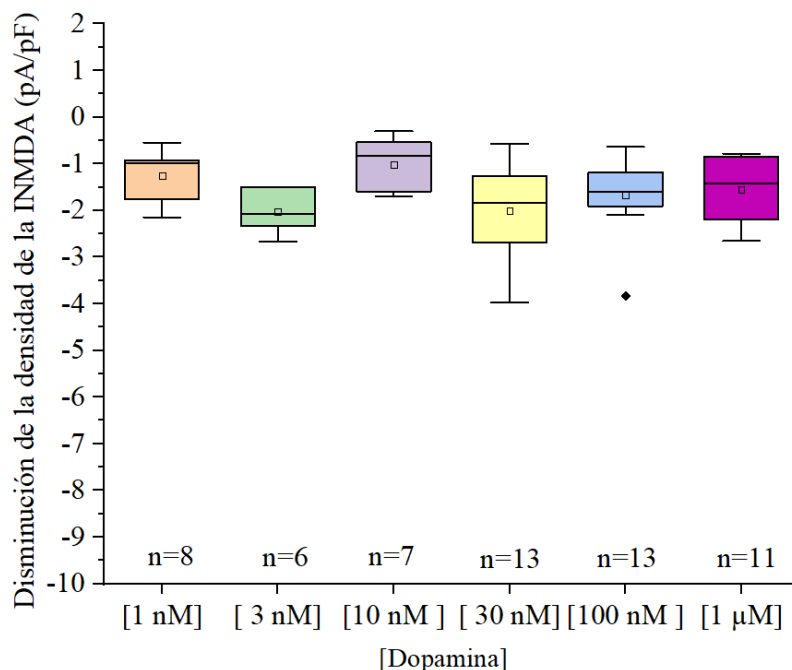
En el análisis del aumento de la densidad de la corriente, la prueba de normalidad mostró un resultado favorable ($P = 0.373$), pero la prueba de igualdad de varianzas falló ($P < 0.050$). Por lo que se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual, indicó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($P < 0.001$). Por lo que se procedió a realizar, la prueba post-hoc de Dunn, donde se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las siguientes concentraciones: 3 nM vs 100 nM, 3 nM vs 1 nM, 3 nM vs 1 µM y 30 nM vs 100 nM (Gráfica 6).

En el análisis de disminución de la densidad de la corriente, la prueba de normalidad ($P=0.136$) y la homogeneidad de varianzas ($P=0.102$) fueron superadas, por lo que se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, para comparar las medias entre los grupos, de la cual no se presentaron diferencias significativas ($P=0.068$).

Después de calcular la densidad de corriente (pA/pF), se procedió a graficar la media \pm EE (Error Estándar) para cada concentración, de lo que se construyeron las siguientes gráficas Boxplot para el aumento y disminución de la densidad de corriente.



Gráfica 6. Aumento de la densidad de la INMDA. Se obtuvieron diferencias significativas entre grupos con la prueba de Kruskal-Wallis de una vía con una $p < 0.001$. Mediante la prueba de Dunn se determinaron diferencias significativas entre las concentraciones: 3 nM vs 100 nM, 3 nM vs 1 nM, 3nM vs 1 μ M y 30 nM vs 100 nM. Debido a que los datos no son normales y no hay homogeneidad de varianzas, también se utiliza la mediana como la mejor medida para representar los datos. Las medianas de cada concentración fueron: 0.97 para 1 nM, 5.63 para 3 nM, 1.60 para 10 nM, 3.26 para 30 nM, 0.76 para 100 nM y 1.25 para 1 μ M.



Gráfica 7. Disminución de la densidad de la INMDA. No se obtuvieron diferencias significativas entre grupos a través de un ANOVA de una vía con una $P = 0.068$. En este caso, dado que la distribución es aproximadamente normal y las varianzas son homogéneas, la media es la mejor para representar estos datos. Las medias de cada concentración fueron: 1.25 para 1 nM, 2.03 para 3 nM, 1.02 para 10 nM, 2.00 para 30 nM, 1.67 para 100 nM y 1.55 para 1 µM. El rombo indica un dato atípico en una concentración de 100 nM de dopamina.

Para la potenciación de la INMDA, los grupos con concentraciones de 3 nM y 30 nM muestran diferencias significativas con otros grupos, especialmente con 1nM, 100 nM, 1 µM.

Para la inhibición de la INMDA, se sugiere que la aplicación de DA con 3 nM y 30 nM tuvo efectos significativamente diferentes en comparación con 1 nM y 10 nM.

Mientras que en la disminución de densidad de corriente no se encontraron diferencias significativas, en el aumento de densidad de corriente sí hubo diferencias, la concentración de 3 nM y 30 nM producen un aumento significativo de la densidad de corriente en comparación con 100 nM, y 3 nM también con respecto a 1 nM y 1 µM.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la DA puede modular la corriente inducida por NMDA en neuronas disociadas de forma aguda del cuerpo estriado de rata, provocando tanto potenciación como inhibición de la INMDA, en ausencia de glicina. Aunque las concentraciones aplicadas no siguieron un comportamiento de dosis-respuesta, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ciertas concentraciones, lo que sugiere una regulación compleja de la interacción entre DA y los receptores NMDA (NMDAR).

La densidad de corriente fue utilizada para comparar las respuestas de INMDA independientemente del tamaño celular, normalizando la corriente por la capacitancia de cada célula. De esta forma, se observó que la potenciación (aumento en la densidad de corriente) presentó diferencias significativas entre concentraciones, lo que indica que el efecto se mantiene incluso al controlar por el tamaño celular. En cambio, en el caso de la inhibición (disminución en la densidad de corriente), no se observaron diferencias significativas tras la normalización, lo que podría estar relacionado con la variabilidad en la capacitancia celular, atenuando así la magnitud del efecto observado. Esto resalta la importancia de utilizar la densidad de corriente como parámetro de análisis, ya que permite evaluar los efectos sobre INMDA de manera más precisa y controlada.

El efecto de potenciación e inhibición de la corriente INMDA por acción de la dopamina (DA), a diferentes concentraciones, es consistente con lo reportado por Cepeda, Buchwald y Levine (1993). En su estudio, el agonista selectivo de receptores D1 (SKF 38393) potenció la corriente inducida por NMDA, mientras que el agonista de receptores D2 (Quinpirole) atenuó dicha corriente. Una diferencia importante con el presente trabajo es que ellos utilizaron glicina exógena como coagonista del receptor NMDA. En contraste, en este estudio no se añadió glicina, ya que en condiciones basales no hay en el cerebro y no es regulable, de manera que se permite conocer los efectos de la DA en la INMDA sin la influencia de la Gly. Esto podría representar una condición más fisiológica.

Además, en este trabajo, no se utilizaron agonistas selectivos de los receptores D1 o D2, sino dopamina directamente lo que sugiere la activación simultánea de receptores D1 y D2 en las neuronas espinosas medianas (MSNs). Esto es relevante porque ambos receptores en las MSNs median efectos opuestos sobre la corriente INMDA: Las MSNs D1 forman la vía directa y

proyectan al GPi y la SNr, facilitando la transmisión motora al aumentar su excitabilidad y potenciar la corriente NMDA. En cambio, las MSNs D2 integran la vía indirecta, proyectando al GPe, y su activación reduce la excitabilidad y la corriente NMDA. Los receptores D1 se expresan en las MSNs estriatonigrales de la vía directa, mientras que los D2 se localizan en las estriatopallidales de la vía indirecta (Lu et al., 2021). La activación conjunta de ambos subtipos podría explicar los efectos divergentes observados según la concentración de DA en el cuerpo estriado.

La activación de los receptores D1 se asocia a proteínas $G_{s/olf}$, que activan positivamente al adenilato ciclasa, lo que incrementa los niveles de cAMP y conlleva a la activación de PKA y la fosforilación de varios objetivos intracelulares, como por ejemplo la función dual de la fosfoproteína DARPP-32. Mientras que los receptores D2 están acoplados a proteínas $G_{i/o}$, que se encarga de inhibir la adenilato ciclasa a través de las subunidades $G_{\alpha i}$, lo que no permite la activación de PKA (Surmeier *et al.*, 2007).

Aunque el presente estudio no abordó directamente los mecanismos intracelulares de señalización, los efectos diferenciales de potenciación e inhibición observados en la corriente de NMDA (INMDA) inducida por dopamina en ausencia de glicina, podrían explicarse mediante procesos de modulación intracelular previamente descritos. Por ejemplo, Blank et al. (1997) demostraron que la activación de los receptores de dopamina induce un aumento en los niveles de cAMP, lo que activa a la proteína quinasa A (PKA), promoviendo la fosforilación del receptor NMDA y, en consecuencia, potenciando su actividad. En ese estudio, realizado en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaban subunidades del NMDAR del cuerpo estriado de rata, también se evidenció la participación de la proteína quinasa C (PKC), que actúa de manera complementaria a PKA, modulando al receptor en diferentes sitios de fosforilación. Además, la inhibición de las fosfatasa PP1 y/o PP2 generó una potenciación sostenida de la corriente mediada por el NMDAR. Estos hallazgos apoyan la posibilidad de que los efectos observados en este trabajo, tanto de potenciación como de inhibición de la INMDA, podrían depender de la activación diferencial de estas vías intracelulares de señalización, incluso en un contexto experimental donde la glicina está ausente. En conjunto, los resultados de este estudio aportan nuevas evidencias sobre la capacidad de la dopamina para modular directamente la actividad del NMDAR en neuronas del cuerpo

estriado, lo que sugiere la existencia de mecanismos adicionales a los clásicos modelos dependientes del co-agonista glicina.

El trabajo de Flores-Hernández et al. (2002) demostró el papel de la proteína DARPP-32 (fosfoproteína de 32 kDa) en la cascada de señalización activada por los receptores de dopamina. En su estudio, utilizaron agonistas de los receptores D1 y D2, así como glicina a una concentración de 0.02 mM. Los resultados mostraron que la aplicación del agonista del receptor D1 (SKF 81297) potenció de manera dosis-dependiente la corriente inducida por NMDA con un valor medio de $25 \pm 4\%$, mientras que el agonista del receptor D2 (Quinpirole) redujo la corriente en un $4 \pm 2\%$. Además, se observó que la coaplicación de los agonistas D1 y D2 redujo la potenciación inducida por D1 a un $12 \pm 2\%$, lo que representa una disminución de aproximadamente el 52%. En este mismo estudio, se empleó un modelo Knock-Out para DARPP-32, donde la potenciación inducida por D1 fue significativamente menor ($16.9 \pm 3.2\%$), en comparación con los animales control ($32.4 \pm 4.6\%$), lo cual resalta el papel crítico de DARPP-32 como inhibidor de PP-1 al ser fosforilada por PKA. Este mecanismo fue reforzado por el uso de ácido okadaico, un inhibidor de PP-1/2A, que incrementó la fosforilación de la subunidad NR1 del NMDAR y, por lo tanto, la INMDA. También se ha demostrado previamente (Cepeda et al., 1998) que la activación de receptores D1 incrementa las corrientes de Ca^{2+} tipo L, lo que podría actuar en sinergia con la modulación del NMDAR.

En contraste, en el presente estudio se obtuvo una potenciación de $17.26 \pm 5.62\%$ y una inhibición de $10.16 \pm 1.25\%$ en ausencia de Gly. Tanto este trabajo como el de Flores-Hernández et al. (2002) coinciden en que la dopamina modula funcionalmente al NMDAR; sin embargo, los resultados aquí presentados amplían dicha perspectiva al demostrar que esta modulación también puede ocurrir sin la presencia del coagonista glicina. Esto sugiere la existencia de mecanismos adicionales o alternativos a los modelos clásicos de coagonismo, como ya se ha mencionado. En este contexto, los hallazgos del presente estudio podrían también complementar observaciones como las de Flores-Hernández et al. (2009), quienes mostraron que la acetilcolina puede inhibir la corriente mediada por NMDAR en neuronas corticales, incluso en condiciones en que se bloquean los receptores colinérgicos y las proteínas G. Aunque los mecanismos exactos no se dilucidaron, dicho estudio plantea la posibilidad de interacciones no convencionales con el NMDAR. De manera similar, los resultados obtenidos aquí abren la posibilidad de que la dopamina module la

actividad del receptor mediante mecanismos independientes del coagonista Gly o de la señalización metabotrópica clásica, lo que podría explorarse en estudios futuros.

El mecanismo clásico de señalización de dopamina (DA) implica la activación de vías intracelulares mediadas por PKA y DARPP-32, como lo reportaron Blank et al. (1997) y Flores-Hernández et al. (2002). Sin embargo, en este estudio se observaron efectos moduladores de DA sobre la corriente INMDA incluso en ausencia de Gly, lo que sugiere la existencia de mecanismos alternativos de modulación. En este contexto, estudios como el de Cui, Xu y Atzori (2006) han propuesto una interacción directa entre DA y el receptor NMDA, independiente de los receptores metabotrópicos clásicos.

Cui, Xu y Atzori (2006) demostraron que la dopamina y algunos ligandos de los receptores D1 pueden bloquear directamente al receptor NMDA de forma independiente de los receptores dopaminérgicos, utilizando un modelo recombinante de células HEK (Human Embryonic Kidney), neuronas de hipocampo y ratones Knock-Out para el receptor D1. En su estudio, las células HEK fueron transfectadas con cDNAs de las subunidades NR1A y NR2A del NMDAR, y se utilizó el agonista de D1 SKF 81297. Sus resultados sugieren que el efecto modulador del agonista depende de la activación previa del canal, ya que cuando el agonista se aplicó inmediatamente antes del glutamato no se observó ningún efecto, pero cuando se aplicó después, se registró una inhibición significativa de la corriente del NMDAR. Esto sugiere que la apertura del canal es un requisito necesario para que el agonista ejerza su acción. Además, aunque en este estudio se logró evidenciar una interacción directa entre la dopamina (o sus agonistas) y el NMDAR en ausencia de receptores D1, las soluciones contenían glicina a 20 μ M, lo cual deja abierta la posibilidad de que la modulación observada dependa también de la presencia del coagonista Gly. Esta observación es relevante en comparación con el presente estudio, donde se obtuvieron efectos moduladores en ausencia de glicina, lo que podría indicar un mecanismo diferente de interacción. Cui et al. también plantearon la posibilidad de que el sitio de unión de la dopamina se une en los dominios N-terminal, o de unión al ligando, o al mismo poro del canal, considerando que SKF 81297 podría actuar como un bloqueador del canal. Hasta la fecha, aún no se ha determinado con certeza cuál sería el sitio de interacción de la dopamina con el NMDAR en ausencia de receptores dopaminérgicos y la Gly.

Adicionalmente, Islas et al. (2022) demostraron que la acetilcolina (ACh) potencia significativamente la corriente inducida por NMDA (INMDA) en neuronas del cuerpo estriado,

con un aumento promedio del 45% respecto al control. Esta potenciación fue reversible: tras retirar la ACh y aplicar nuevamente la solución control (lavado), la amplitud del pico de la corriente regresó gradualmente a su nivel basal aproximadamente 30 segundos después, lo que indica que el efecto no depende de cambios duraderos en la maquinaria intracelular o expresión de receptores. Este comportamiento es similar al observado en el presente estudio con la dopamina (DA), donde tanto los efectos de potenciación como de inhibición de la INMDA fueron también reversibles tras el lavado. Aunque no se realizaron pruebas específicas para descartar la participación de proteínas G, la reversibilidad de los efectos sugiere la posibilidad de que, al igual que con ACh, la DA pueda estar modulando al NMDAR mediante un mecanismo independiente de receptores metabotrópicos, aunque esta hipótesis aún requiere ser comprobada experimentalmente.

Se sugiere que el efecto de ACh es independiente de la activación de receptores acoplados a proteínas G porque en el estudio se utilizó GDP- β -S, un bloqueador de proteínas G, y aun así se observó la potenciación de la corriente. Además, no se registraron cambios en las constantes de inactivación ni en la fase de estado estable de la corriente, parámetros que suelen modificarse cuando hay una participación significativa de segundos mensajeros intracelulares. Esto refuerza la hipótesis de una interacción directa de ACh con el NMDAR, posiblemente compitiendo con el sitio de glicina en la subunidad GluN1 (Islas et al., 2022).

En particular, el estudio de Islas et al. (2022) sugiere que existen interacciones competitivas directas entre neurotransmisores y el sitio de glicina del NMDAR. Demostraron que la glicina potencia las corrientes de NMDA en un mayor porcentaje; sin embargo, al coaplicar Gly y ACh, se encontró que la acetilcolina inhibe de forma parcial la activación máxima inducida por Gly, lo que sugiere una posible competencia directa con el coagonista clásico. Esto respalda el modelo molecular de interacción ACh/NMDAR y sustenta la teoría de una interacción física entre un neuromodulador y el NMDAR independiente de receptores metabotrópicos. Aunado a esto, se realizaron registros electrofisiológicos en configuración whole-cell en neuronas estriatales para determinar dicha competencia inhibitoria, lo que posteriormente fue validado mediante simulaciones computacionales de docking molecular. Estas simulaciones modelaron la interacción de ACh con el NMDAR y permitieron esclarecer que la ACh puede modular la conformación semi-cerrada del sitio de unión del coagonista en la subunidad GluN1, lo cual podría influir directamente en la modulación de la INMDA.

Lo anterior podría contribuir a explicar por qué, en nuestro estudio, la dopamina (DA) provocó efectos divergentes, potenciación o inhibición de la INMDA, incluso cuando se aplicaron las mismas concentraciones en distintas células, así como la ausencia de una curva dosis-respuesta convencional. Estos resultados podrían deberse a diferencias la condición metabólica de la célula, en la expresión o composición de subunidades del NMDAR, o bien, a la existencia de múltiples mecanismos de modulación, incluyendo una posible interacción directa de la DA con el receptor, como se ha propuesto para la ACh.

A pesar de la ausencia de una fase experimental más extensa en este estudio, los resultados presentados establecen una base sólida para futuras investigaciones con el NMDAR en ausencia de Gly, con una perspectiva diferente a la farmacología clásica del receptor. Utilizando más herramientas que permitan un mejor entendimiento de la fisiología y funcionamiento de este canal, que en el caso de este estudio se puede complementar con la utilización de antagonistas de los receptores dopaminérgicos o en un biomodelo Knock-Out de estos receptores, para determinar solo el efecto de la DA en el NMDAR, incluso otras técnicas como la inmunohistoquímica que permitiría caracterizar la expresión de los receptores dopaminérgicos en las neuronas estudiadas, proporcionando una mayor comprensión sobre la variabilidad en las respuestas obtenidas.

Fisiológicamente, la modulación del NMDAR por DA en ausencia de glicina representa una ventaja clave, ya que permite una regulación más flexible de la excitabilidad neuronal sin depender estrictamente de la disponibilidad de glicina, la cual puede ser variable en diferentes condiciones fisiológicas. Además, en regiones como los ganglios basales y la corteza cerebral, no se han descrito poblaciones funcionales de neuronas glicinérgicas, a diferencia de áreas como el tallo cerebral o la médula espinal donde la glicina actúa como neurotransmisor inhibitorio principal. Esto respalda el uso de preparaciones experimentales sin glicina en estudios del cuerpo estriado, como el presente trabajo, ya que refleja de forma más precisa el entorno fisiológico local de estas estructuras.

El hecho de que los efectos moduladores de la DA se observen en ausencia de glicina sugiere una posible modulación directa del NMDAR, ya que en ausencia de Gly, el canal debería permanecer cerrado. En trabajos previos, como el de Cui, Xu y Atzori (2006), se propuso una interacción directa entre DA y el NMDAR, pero en presencia de glicina, por lo que no se podía descartar su participación. En cambio, nuestros resultados implican que la dopamina puede influir sobre el receptor sin requerir la activación del sitio coagonista, lo que refuerza la hipótesis de una

interacción física directa aún no caracterizada. Esto podría tener varias implicaciones importantes, por ejemplo:

Una regulación más flexible de la excitabilidad neuronal. La capacidad de la DA para modular la INMDA en ausencia de Gly implica que el cerebro podría ajustar la transmisión glutamatérgica de manera más dinámica, sin estar estrictamente limitado por los niveles de la misma. Un mecanismo independiente de la señalización clásica, como lo sugieren los estudios computacionales y experimentales en la ACh, la DA podría interactuar directamente con el NMDAR, modulando su actividad sin necesidad de activar receptores dopaminérgicos acoplados a proteínas G.

Si la DA puede modular el NMDAR de manera independiente de la glicina, esto plantea una posible perspectiva terapéutica para enfermedades en las que la señalización glutamatérgica se encuentra alterada, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, especialmente considerando el enfoque de este trabajo en el control motor a través del cuerpo estriado. Esta forma de modulación podría representar una ventaja al no depender de la glicina, cuyo nivel o disponibilidad puede estar comprometido en condiciones patológicas. Además, permitiría una regulación más localizada del NMDAR en regiones dopaminérgicas afectadas, ayudando a restablecer el equilibrio entre la señalización dopaminérgica y glutamatérgica, sin provocar una activación indiscriminada del receptor. Estos hallazgos aportan una nueva perspectiva sobre los mecanismos de modulación del NMDAR, independiente de la modulación clásica, y abren la puerta a futuras investigaciones que profundicen en el papel de la dopamina como modulador directo en contextos tanto fisiológicos como patológicos.

Conclusión

La aplicación de dopamina en diferentes concentraciones tuvo efectos de potenciación o inhibición sobre la corriente inducida por NMDA, lo que podría estar regulado a través de la activación de los receptores D1 y D2. La potenciación sugiere un aumento en la actividad del NMDAR, posiblemente mediado por receptores D1, favoreciendo la entrada de calcio y procesos asociados a la plasticidad sináptica. Por otro lado, la inhibición observada podría estar relacionada con la activación de receptores D2, reduciendo la excitabilidad neuronal y modulando el equilibrio funcional entre señales excitatorias e inhibitorias en el cuerpo estriado.

Los efectos de la dopamina no se ajustaron a una curva dosis-respuesta, sin embargo, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre varias concentraciones, lo que sugiere que la respuesta podría depender de factores como la organización subunitaria del NMDAR, el tipo de receptor dopaminérgico activado, o incluso como perspectiva, una posible modulación directa del receptor.

La potenciación por DA de la corriente activada por NMDA tuvo valores estadísticamente significativos entre las concentraciones: 3 nM vs 100 nM, 3 nM vs 1 nM y 30 nM vs 100 nM; mientras que la inhibición de la corriente activada por NMDA tuvo valores estadísticamente significativos entre las concentraciones: 1 nM vs 3 nM, 1 nM vs 30 nM y 10 nM vs 3 nM.

En conjunto, estos hallazgos muestran que la dopamina modula de forma compleja la actividad del NMDAR en el cuerpo estriado, y sugieren nuevos posibles mecanismos de interacción que podrían ser relevantes en el control motor y en patologías asociadas a disfunción dopaminérgica y glutamatérgica.

Referencias

Andersen, P. H. & Jansen, J. A. (1990). Dopamine receptor agonists: selectivity and dopamine D1 receptor efficacy. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*. 188(6), 335–347. doi:10.1016/0922-4106(90)90194-3

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. (tesis de Maestría). Repositorio institucional Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Atlason, P.T., Garside, M.L., Meddows, E., Whiting, P. & McIlhinney, R.A. (2007). N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(35):25299-307. doi: 10.1074/jbc.M702778200.

Attwell, D., Barbour, B. & Szatkowski, M. (1993). Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*. 11(3):401-7. doi: 10.1016/0896-6273(93)90145-h.

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):641-53. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x.

Beitz, J.M. (2014). Parkinson's disease: a review. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*. 6(1):65-74. doi: 10.2741/s415. PMID: 24389262.

Blank, T., Nijholt, I., Teichert, U., Kügler, H., Behrsing, H., Fienberg, A., Greengard, P. & Spiess J. (1997). The phosphoprotein DARPP-32 mediates cAMP-dependent potentiation of striatal N-methyl-D-aspartate responses. *Proceedings of the National Academy Sciences U S A*. 94(26):14859-64. doi: 10.1073/pnas.94.26.14859.

Brimblecombe, K. & Cragg, S. (2017). The Striosome and Matrix Compartments of the Striatum: A Path through the Labyrinth from Neurochemistry toward Function. *ACS Chemical Neuroscience*. Vol. 8(2): 235-242. doi: 10.1021/acscemneuro.6b00333.

Brosnan, J.T. & Brosnan, M.E. (2013). Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*. 45(3):413-8. doi: 10.1007/s00726-012-1280-4.

Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V. & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience*. 17(8):1022-30. doi: 10.1038/nn.3743.

Castro, D. & Bruchas, M. (2019). A Motivational and Neuropeptidergic Hub: Anatomical and Functional Diversity within the *Nucleus Accumbens* Shell. *Neuron*. Vol. 102 (3): 529-552. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.003>

Cepeda, C. & Levine, M.S. (2012). Dopamine-NMDA receptor interactions: twenty years later. *Developmental Neuroscience*. 34(1):2-4. doi: 10.1159/000338590.

Cepeda, C., André, V., Yamazaki, I., Wu, N., Kleiman-Weiner, M. & Levine, M. (2008). Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *The European Journal of Neuroscience*. 27(3):671-82. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06038.x.

Cepeda, C., André, V.M., Jocoy, E. L. & Levine, M.S. (2009). NMDA and Dopamine: Diverse Mechanisms Applied to Interacting Receptor Systems. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Chapter 3. PMID: 21204414.

Cepeda, C., Buchwald, N.A. & Levine, M.S. (1993). Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 90(20):9576-80. doi: 10.1073/pnas.90.20.9576.

Cepeda, C., Colwell, C.S., Itri, J.N., Chandler, S.H. & Levine, M.S. (1998). Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *Journal of Neurophysiology*. 79(1):82-94. doi: 10.1152/jn.1998.79.1.82.

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):1761-70. doi: 10.1124/mol.106.028332.

Cumming, P. (2011). Absolute abundances and affinity states of dopamine receptors in mammalian brain: a review. *Synapse*, 65(9), 892-909. doi: <https://doi.org/10.1002/syn.20916>

Delle Donne, K.T., Sesack, S.R., Pickel, V.M. (1997). Ultrastructural immunocytochemical localization of the dopamine D2 receptor within GABAergic neurons of the rat striatum. *Brain Research*. 746(1-2):239-55. doi: 10.1016/s0006-8993(96)01226-7.

Dziedzicka-Wasylewska, M. (2004). Brain dopamine receptors--research perspectives and potential sites of regulation. *Polish Journal of Pharmacology*. 56(6):659-71. PMID: 15662079.

Durieux, P.F., Schiffmann, S.N. & de Kerchove d'Exaerde, A. (2011). Targeting neuronal populations of the striatum. *Frontiers in Neuroanatomy*. 15; 5:40. doi: 10.3389/fnana.2011.00040.

Durieux, P.F., Schiffmann, S.N., de Kerchove d'Exaerde, A. (2012). Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *The EMBO Journal*. 1;31(3):640-53. doi: 10.1038/emboj.2011.400.

Elsworth, J.D. (2020). Parkinson's disease treatment: past, present, and future. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*.127(5):785-791. doi: 10.1007/s00702-020-02167-1.

Fão, L., Coelho, P., Rodrigues, R.J. & Rego, A.C. (2022). Restored Fyn Levels in Huntington's Disease Contributes to Enhanced Synaptic GluN2B-Composed NMDA Receptors and CREB Activity. *Cells*. 29;11(19):3063. doi: 10.3390/cells11193063.

Fernandes, H.B. & Raymond, L.A. (2009). NMDA Receptors and Huntington's Disease. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 2. PMID: 21204413.

Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C.R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., Greengard, P. & Levine, M. S. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol*. 2002 Dec;88(6):3010-20. doi: 10.1152/jn.00361.2002. PMID: 12466426.

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):308-18. doi: 10.1002/syn.20609.

Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301-310. doi: 10.1016/j.nrl.2011.10.014.

Foster, N., Barry, J., Korobkova, L., Garcia, L., Gao, L., Becerra, M., Sherafat, Y., Peng, B., Li, X., Choi, J., Gou, L., Zingg, B., Azam, S., Lo, D., Khanjani, N., Zhang, B., Stanis, J., Bowman, I., Cotter, K., Cao, C., Yamashita, S., Tugangui, A., Li, A., Jiang, T., Jia, X., Feng, Z., Aquino, S., Mun, H., Zhu, M., Santarelli, A., Benavidez, N., Song, M., Dan, G., Fayzullina, M., Ustrell, S., Boesen, T., Johnson, D., Xu, H., Bienkowski, M., Yang, X., Gong, H., Levine, M., Wickersham, I., Luo, Q., Hahn, J., Lim, B., Zhang, L., Cepeda, C., Hintiryan, H., Dong, H. (2021). The mouse cortico-basal ganglia-thalamic network. *Nature*. 598(7879):188-194. doi: 10.1038/s41586-021-03993-3.

Freeze, B., Kravitz, A., Hammack, N., Berke, J. & Kreitzer, A. (2013). Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience*. 33(47):18531-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1278-13.2013.

Garret, A. (1994). Basal Ganglia-Thalamocortical Circuits: Their Role in Control Of Movements. *Journal of Clinical Neurophysiology*. 11 (4):420-431. PMID: 7962489

Gerfen, C. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neuroscience* 15(4):133-9. doi: 10.1016/0166-2236(92)90355-c.

Gerfen, C. (2006). Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*. Vol. 9 (2):157-8. doi: 10.1038/nn0206-157.

Greger, I. H., Watson, J.F. & Cull-Candy, S.G. (2017). Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron*. 94(4):713-730. doi: 10.1016/j.neuron.2017.04.009.

Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Furukawa, H., Wollmuth, L.P., Gibb, A.J. & Traynelis SF. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *The Journal of General Physiology*. 150(8):1081-1105. doi: 10.1085/jgp.201812032.

Harsing, L.G. Jr. & Matyus, P. (2013). Mechanisms of glycine release, which build up synaptic and extrasynaptic glycine levels: the role of synaptic and non-synaptic glycine transporters. *Brain Research Bulletin*. 93:110-9. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.12.002.

Hutsler, J.J., Lee, D.G., Porter, K.K. (2005). Comparative analysis of cortical layering and supragranular layer enlargement in rodent carnivore and primate species. *Brain Research*. 1052(1):71-81. doi: 10.1016/j.brainres.2005.06.015.

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. doi: 10.1021/acchemneuro.1c00639.

Joel, D. & Weiner, I. (2000). The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*. 96(3): 451-74. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00575-8.

Johnson, J. W. & Ascher, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*. Vol. 325 (6104):529-31. doi: 10.1038/325529a0

Juárez Olguín, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E. & Barragán Mejía, G. (2016). The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016:9730467. doi: 10.1155/2016/9730467.

Kandel, E., Schwartz, J. & Jessel, Thomas. (2000). Capítulo 43: Los ganglios basales. *Principios de neurociencia*. McGraw-Hill Interamericana. 4° edición.

Kim, A., Lalonde, K., Truesdell, A., Gomes Welter, P., Brocardo, P.S., Rosenstock, T.R. & Gil-Mohapel, J. (2021). New Avenues for the Treatment of Huntington's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(16):8363. doi: 10.3390/ijms22168363.

Kreitzer, A. & Malenka, R. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*. 26; 60(4):543-54. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.005.

Lanciego, J., Luquin, N., Obeso, J. (2012) Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2 (12):a009621 doi: 10.1101/cshperspect.a009621.

Levine, M.S., Cepeda, C. & André, V.M. (2010). Location, location, location: contrasting roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in Huntington's disease. *Neuron*. 28;65(2):145-7. doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.010.

Liu, C. & Kaeser, P.S. (2019). Mechanisms and regulation of dopamine release. *Current Opinion Neurobiol.* 57:46-53. doi: 10.1016/j.conb.2019.01.001.

Liu, C., Goel, P. & Kaeser, P.S. (2021). Spatial and temporal scales of dopamine transmission. *Nature Reviews Neuroscience*. 22(6):345-358. doi: 10.1038/s41583-021-00455-7.

Lobo, M. & Nestler, E. (2011). The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*. 18:5:41. doi: 10.3389/fnana.2011.00041.

Lu, J., Cheng, Y., Xie, X., Woodson, K., Bonifacio, J., Disney, E., Barbee, B., Wang, X., Zaidi, M. & Wang, J. (2021). Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Dopamine D1 and D2 Receptor-Expressing Medium Spiny Neurons in the Posterior Dorsomedial Striatum. *eNeuro*. 8(1):ENEURO.0348-20.2020. doi: 10.1523/ENEURO.0348-20.2020.

Luessen, D.J. & Conn, P.J. (2022). Allosteric Modulators of Metabotropic Glutamate Receptors as Novel Therapeutics for Neuropsychiatric Disease. *Pharmacological Reviews*. 74(3):630-661. doi: 10.1124/pharmrev.121.000540.

Mangia, S., Give, F. & DiNuzzo, M. (2012). Metabolic pathways and activity-dependent modulation of glutamate concentration in the human brain. *Neurochemical Research*. 37(11):2554-61. doi: 10.1007/s11064-012-0848-4.

Märting A, Calvigioni D, Tzortzi O, Fuzik J, Wärnberg E, Meletis K. (2019). A Spatiomolecular Map of the Striatum. *Cell Reports*. 29(13):4320-4333.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.096.

McGregor, M. M. & Nelson, A.B. (2019). Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease. *Neuron*. 101(6):1042-1056. doi: 10.1016/j.neuron.2019.03.004.

Meldrum, B.S. (2010). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*. 130(4S Suppl):1007S-15S. doi: 10.1093/jn/130.4.1007S.

Mermelstein, P., Becker, J. & Surmeier, J. (1996). Estradiol Reduces Calcium currents in Rat Neostriatal Neurons via a Membrane Receptor. *The Journal of Neuroscience*. 16 (2): 595-604. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-02-00595.1996

Mitchell, J.S., Hermens, D.F., Bennett, M.R., Can, A.T. & Lagopoulos, J. (2023). Ketamine and Zinc: Treatment of Anorexia Nervosa Via Dual NMDA Receptor Modulation. *CNS Drugs*. 37(2):159-180. doi: 10.1007/s40263-022-00984-4.

Myslivecek, J. (2022). Dopamine and Dopamine-Related Ligands Can Bind Not Only to Dopamine Receptors. *Life (Basel)*. 12(5):606. doi: 10.3390/life12050606.

Nash, J. E., Brotchie JM. A common signaling pathway for striatal NMDA and adenosine A2a receptors: implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2000 Oct 15;20(20):7782-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-20-07782.2000.

Negrete-Díaz, J.V., Falcón-Moya, R. & Rodríguez-Moreno A. (2021). Kainate receptors: from synaptic activity to disease. *The FEBS Journal*. 289(17):5074-5088. doi: 10.1111/febs.16081.

Niswender, C.M. & Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual Review Pharmacology Toxicology*. 50:295-322. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.

Papadakis, M., Hawkins, L.M. & Stephenson, F.A. (2004). Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(15):14703-12. doi: 10.1074/jbc.M313446200.

Plenz, D. & Wickens J. R. 2017. Chapter 6: The Striatal Skeleton: Medium Spiny Projection Neurons and Their Lateral Connections. Steiner, K. & Tseng, K. *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. 2^o edition. doi: 10.1016/B978-0-12-802206-1.00006-4

Reiner, A. & Levitz, J. (2018). Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*. 98(6):1080-1098. doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.018.

Richfield, E. K., Penney, J. B. & Young, A. B. (1989). Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D₁ y D₂ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. Vol. 30, No. 3, pp. 767-777. doi: 10.1016/0306-4522(89)90168-1

Schiffmann, S. & Vanderhaeghen, J. (1993). Adenosine A₂ receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons. *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience*. 13 (3): 1080-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-03-01080.1993

Schüler, T., Mesic, I., Madry, C., Bartholomäus, I. & Laube, B. (2007). Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(1):37-46. doi: 10.1074/jbc.M703539200.

Sears, S.M. & Hewett, S.J. (2021). Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 246(9):1069-1083. doi: 10.1177/1535370221989263.

Shen, W., Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T. & Held, J.E. (2004). Surmeier DJ. Kv1.2-containing K⁺ channels regulate subthreshold excitability of striatal medium spiny neurons. *Journal of Neurophysiology*. 91(3):1337-49. doi: 10.1152/jn.00414.2003.

Skinbjerg, M., Sibley, D. R., Javitch, J. A. & Abi-Dargham, A. (2012). Imaging the high-affinity state of the dopamine D₂ receptor in vivo: fact or fiction?. *Biochemical Pharmacology*. 15;83(2):193-8. doi: 10.1016/j.bcp.2011.09.008.

Smith, J., Klug, J., Ross, D., Howard, C., Hollon, N., Ko, V., Hoffman, H., Callaway, E., Gerfen, C. & Jin, X. (2016). Genetic-Based Dissection Unveils the Inputs and Outputs of Striatal Patch and Matrix Compartments. *Neuron*. 91(5):1069-1084. doi: 10.1016/j.neuron.2016.07.046.

Song, W. & Surmeier, J. (1996). Voltage-Dependent Facilitation of Calcium Channels in Rat Neostriatal Neurons. *Journal of Neurophysiology*. Vol. 76, No. 4. doi: 10.1152/jn.1996.76.4.2290

Speranza, L., di Porzio, U., Viggiano, D., de Donato, A. & Volpicelli, F. (2021). Dopamine: The Neuromodulator of Long-Term Synaptic Plasticity, Reward and Movement Control. *Cells*. 10(4):735. doi: 10.3390/cells10040735.

Stefani, A., Chen, Q., Flores-Hernández, J., Jiao, Y., Reiner, Anton. & Surmeier, D. (1998). Physiological and Molecular Properties of AMPA/Kainate Receptors Expressed by Striatal Medium Spiny Neurons. *Developmental neuroscience*. doi: 10.1159/000017318

Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(2):a009399. doi: 10.1101/cshperspect.a009399.

Suh, Y.H., Chang, K., Roche, K.W. (2018). Metabotropic glutamate receptor trafficking. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 91:10-24. doi: 10.1016/j.mcn.2018.03.014.

Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z. & Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neuroscience*. 30(5):228-35. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.008.

Surmeier, J., Bargas, J., Hemmings, H., Nairn, A. & Greengard, P. (1995). Modulation of Calcium Currents by a D₁ Dopaminergic Protein Kinase/Phosphatase Cascade in Rat Neostriatal Neurons. *Neuron*. Vol. 14, 385-397. doi: 10.1016/0896-6273(95)90294-5

Teng, X., Chen, S., Wang, Q., Chen, Z., Wang, X., Huang, N. & Zheng, S. (2022). Structural insights into G protein activation by D1 dopamine receptor. *Sciences Advances*. 8(23):eabo4158. doi: 10.1126/sciadv.abo4158.

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):405-96. doi: 10.1124/pr.109.002451. Erratum in: *Pharmacological Reviews*. 2014 Oct ;66(4):1141. PMID: 20716669

Ulbrich, M.H. & Isacoff, E.Y. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*. 16;105(37):14163-8. doi: 10.1073/pnas.0802075105.

Vandenberghe, W., Ihle, E.C., Patneau, D.K., Robberecht, W. & Brorson, J.R. (2000). AMPA receptor current density, not desensitization, predicts selective motoneuron vulnerability. *The Journal of Neuroscience*. 20(19):7158-66. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-19-07158.2000.

Voorn, P., Vanderschuren, L., Groenewegen, H., Robbins, T. & Pennartz, C. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*. 27(8):468-74. doi: 10.1016/j.tins.2004.06.006.

Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M. & Vyklicky L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*. 63(Suppl 1):S191-203. doi: 10.33549/physiolres.932678.

Watkins, J.C. & Jane, D.E. (2006). The glutamate story. *British Journal of Pharmacology*. 147 Suppl 1(Suppl 1):S100-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0706444.

Xu, H. & Yang, F. (2022). The interplay of dopamine metabolism abnormalities and mitochondrial defects in the pathogenesis of schizophrenia. *Translational Psychiatry*. 12(1):464. doi: 10.1038/s41398-022-02233-0.

Yan, Z., Flores-Hernández & Surmeier, D. (2001). Coordinated of muscarinic receptor RNAs in striatal medium spiny neurons. *Elsevier Science*. Vol. 103, No. 4, pp. 1017-1024. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00039-2