



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**EL PAPEL DE LAS BALSAS LIPÍDICAS EN LA INTERACCIÓN DE LOS  
RECEPTORES D1 Y NMDA**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
**Ricardo Felipe Esquivel García**

TUTOR PRINCIPAL:  
Dr. David Erasmo García Díaz  
Facultad de Medicina

COMITÉ TUTOR:  
Dra. María Magdalena Giordano Noyola  
Instituto de Neurobiología

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Ciudad Universitaria, CD. MX., agosto 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Facultad de Psicología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: **Ricardo Felipe Esquivel García**, cuyo título es: “**El papel de las balsas lipídicas en la interacción de los receptores D<sub>1</sub> y NMDA**” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Rogelio Arellano Ostoa.

\_\_\_\_\_

Secretario (Tutor)

Dr. David Erasmo García Díaz.

\_\_\_\_\_

Vocal

Dra. Julieta Garduño Torres.

\_\_\_\_\_

Suplente

Dr. José Jesús García Colunga.

\_\_\_\_\_

Suplente

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.

\_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico

\_\_\_\_\_  
Coordinador del Programa

Dra. Maricela Luna Muñoz

## **Agradecimientos**

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. David Erasmo García Díaz, dentro del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) de la UNAM. Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave del proyecto IN216119), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto No. 255635/ CVU/Becario No. 921951).

## **Agradecimientos**

Al Dr. David García por concederme la oportunidad de hacer ciencia, transmitirme su pasión por el conocimiento y enseñarme la excelencia a la que se debe aspirar.

A los miembros de mi comité tutor: Dra. Magdalena Giordano y Dr. Jaime Barral por su enseñanza, orientación y apoyos otorgados.

A los miembros del jurado: Dr. Julieta Garduño, Dr. José García y al Dr. Rogelio Arellano por sus sugerencias y comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Jorge Bravo por su invaluable ayuda técnica y teórica que permitieron la culminación de este proyecto.

A la Dra. (c) Karina Bermeo y al Dr. (c) Héctor Castro.

A mis compañeros de laboratorio: Antonio, Tayde, Luis, Isabel, Elvira, José María, Caro, Gaby, Nayeli e Irel.

A mis compañeros de clase: Oscar, Omar, Elías, Julieta, Natalia, Jorge y Daniel.

A mis compañeros del Laboratorio de Electrofisiología (UIICSE), en especial al M. en C. Ángel Robles.

A la coordinadora del programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología): Dra. Maricela Luna.

A la Dra. Nuri Aranda y la M. en C. Leonor Casanova de la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología (INB).

A los responsables de las unidades de videoconferencia: Lic. Daniel Villareal (FES-I), Lic. Ma. De Lourdes Lara (INB) y al Lic. Juan García (Fac Psi).

Al personal del bioterio de la Facultad de Medicina.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante mis estudios de maestría CVU/Becario No. 921951.

## **Dedicatoria**

A mi madre y a mis hermanos, cada esfuerzo es por y para ustedes.  
A Janeth, tu apoyo y compañía me han permitido alcanzar metas que creía inalcanzables.

## Índice

Abreviaturas .....	5
Resumen .....	6
Abstract.....	7
1. Introducción.....	8
1.1. Características de los receptores NMDA .....	8
1.2. Neuromodulación .....	12
1.2.1. Dopamina como neuromodulador.....	12
1.2.2. Neuromodulación dopaminérgica en el hipocampo.....	14
1.2.3. Interacciones intracelulares .....	16
1.2.4. Interacciones directas proteína a proteína .....	18
1.2.4.1. Complejo PSD-95-D1-NMDA.....	20
1.3. Balsas lipídicas .....	22
1.3.1. Implicaciones de las balsas lipídicas en la respuesta sináptica .....	23
2. Planteamiento del Problema .....	26
3. Hipótesis .....	26
3.1. Hipótesis nula.....	26
4. Objetivo general .....	27
4.1. Objetivos particulares.....	27
5. Método.....	27
5.1. Preparación de rebanadas hipocampales .....	27
5.2. Registros electrofisiológicos .....	28
5.3. Cuantificación del colesterol en la membrana.....	33
6. Análisis de datos.....	34
7. Resultados.....	35
7.1. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de CA1.....	35
7.2. Modulación dopaminérgica de las sinapsis glutamatérgicas.....	40
7.3. Efecto de la perturbación de las balsas lipídicas en las sinapsis glutamatérgicas .....	46
7.4. Modificación de la modulación dopaminérgica con la perturbación de las balsas lipídicas .....	54
8. Discusión .....	60
9. Conclusión.....	67
10. Referencias .....	68

## Abreviaturas

<b>AC</b>	adenilato ciclasa
<b>AMPA</b>	receptor del ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPC*</b>	monofosfato de adenosina cíclico
<b>ATV</b>	área tegmental ventral
<b>CA1</b>	cuerno de Amón 1
<b>CaM</b>	calmodulina
<b>CaMKII*</b>	Ca <sup>2+</sup> /calmodulina proteína cinasa II
<b>Cdk-5*</b>	cinasa-5 dependiente de ciclina
<b>CNQX</b>	cianquixalina ó 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
<b>DA</b>	dopamina
<b>DARPP-32*</b>	fosfoproteína regulada por AMPc y DA
<b>D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub></b>	receptor dopaminérgico (1,2)
<b>EEM</b>	error estándar de la media
<b>EPSCs*</b>	corriente postsináptica excitatoria
<b>FPP</b>	facilitación por pulsos pareados
<b>LC</b>	locus coeruleus
<b>LCEA</b>	liquido cerebro espinal artificial
<b>MCD</b>	metil ciclo dextrina
<b>M<math>\beta</math>CD</b>	metil- $\beta$ -ciclodextrina
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	catión magnesio
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>nA</b>	nanoamperios
<b>pA</b>	picoamperios
<b>PKA*</b>	proteína cinasa A
<b>PP1*</b>	proteína fosfatasa 1
<b>PP2A*</b>	proteína fosfatasa 2 A
<b>PSD-95*</b>	proteína de densidad postsináptica 95
<b>SCH23390</b>	clorhidrato de R (+) - 7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina
<b>Th75*</b>	treonina 75
<b>Th34*</b>	treonina 34
<b>Th286</b>	treonina 286

\*Por sus siglas en ingles

## Resumen

Los trabajos que han abordado el papel de las balsas lipídicas en la respuesta sináptica han propuesto cambios a nivel subcelular y molecular (Choi *et al.*, 2015; Frank *et al.*, 2004; Morin *et al.*, 2016). Sin embargo, los procesos que se alteran por la perturbación de las balsas lipídicas y que producen cambios en la respuesta sináptica no se han descrito en su totalidad. Uno de los mecanismos que podrían estar afectados por esta perturbación es la neuromodulación dopaminérgica producida por interacciones proteína-proteína en las sinápsis glutamatérgicas. Por lo tanto, el objetivo central de este proyecto fue evaluar el efecto de la perturbación de las balsas lipídicas en la modulación producida por el receptor D<sub>1</sub> sobre los receptores NMDA en las neuronas piramidales de CA1. Los experimentos se realizaron en rebanadas de hipocampo incubadas con 2 mM de M $\beta$ CD y se registraron las corrientes sinápticas en CA1 de ratas Wistar machos de 15 días. En presencia de SCH23390, un antagonista selectivo de D<sub>1</sub>, el registro de las EPSCs en CA1 por estimulación de las colaterales de Shaffer mostró un aumento en la amplitud de la corriente y una cinética de desactivación de la corriente sináptica más lenta en comparación con las EPSCs obtenidas con solo SCH23390. Estos cambios se redujeron por CaMKII<sub>(281-309)</sub>, un inhibidor de la actividad de CaMKII. En conjunto, los resultados sugieren que la perturbación de las balsas lipídicas interfiere con la interacción proteína a proteína entre los receptores NMDA y D<sub>1</sub> lo que permite que proteínas cinasas como la CaMKII fosforile al receptor NMDA y aumente su actividad. Esto podría ser un mecanismo que contribuya al deterioro cognitivo en patologías como el síndrome metabólico y la demencia tipo Alzheimer, debido a que la reducción de esta modulación podría llevar a la célula a procesos de excitotoxicidad por el aumento en la actividad del receptor NMDA.

**Palabras clave:** neuromodulación, balsas lipídicas, receptores tipo D<sub>1</sub>, receptores NMDA, CaMKII, Hipocampo

## Abstract

Changes have been proposed at molecular and subcellular level in previous papers concerning lipid rafts role on the synaptic response (Choi *et al.*, 2015; Frank *et al.*, 2004; Morin *et al.*, 2016). However, processes altered by lipid rafts depletion underlying synaptic changes have not been fully described. One of the mechanisms likely being influenced by lipid raft depletion is the dopaminergic neuromodulation produced by protein-protein interactions of glutamatergic synapses. Therefore, the main purpose of this project was to evaluate the effect of lipid raft depletion on modulation exerted by D<sub>1</sub> receptors on NMDA receptors in CA1 pyramidal neurons. Experiments were performed on 15-day-old male Wistar rats. Hippocampal slices were incubated with M $\beta$ CD at 2 mM concentration. EPSCs were recorded in CA1 by stimulation of Shaffer's collaterals. In the presence of SCH23390, a selective D<sub>1</sub> antagonist, the recording of the EPSCs in CA1 by stimulation of Shaffer's collaterals showed an increase in current amplitude and a slower synaptic current deactivation kinetics compared to EPSCs obtained with only SCH23390. These changes were reduced by CaMKII (281-309), an inhibitor of the activity of CaMKII. Overall, these results suggest that the lipid rafts depletion prevents protein-to-protein interaction between NMDA and D<sub>1</sub> receptors, it allows kinase proteins, such as CaMKII, to phosphorylate the NMDA receptor and increase its activity. It can be suggested that this mechanism contributes to cognitive impairment in pathologies such as metabolic syndrome and Alzheimer's-type dementia. The reduction of this modulation could lead the cell to excitotoxicity processes by the increase in NMDA receptor activity.

**Keywords:** neuromodulation, lipid rafts, D<sub>1</sub>-like receptors, NMDA receptors, CaMKII, Hippocampus

## 1. Introducción

### 1.1. Características de los receptores NMDA

La neurotransmisión excitatoria del sistema nervioso central está mediada mayormente por la liberación vesicular de glutamato, que activa tanto receptores metabotrópicos acoplados a la proteína G, como receptores ionotrópicos (MacDonald y Wojtowicz, 1980). Dentro de los receptores ionotrópicos, los receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA) son relevantes por su participación en distintos tipos de plasticidad neuronal y en procesos de excitotoxicidad (Michaelis, 1998).

Los receptores NMDA son proteínas integrales de membrana ensamblados a partir de subunidades homólogas de membrana GluN1 y GluN2 (A-D), y en algunos casos NR3A o B (Chazot *et al.*, 1994). Se encuentran predominantemente en dos formas, la forma de tipo A GluN1/GluN2A, y la forma tipo B GluN1/GluN2B (Al-Hallaq *et al.*, 2007; Volianskis *et al.*, 2015).

Cada subunidad y la combinación específica entre ellas le confieren al canal características biofísicas y farmacológicas particulares (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004), siendo la subunidad GluN2 determinante en la heterogeneidad de la función de los receptores NMDA. La identidad de esta subunidad es crucial para determinar características del canal como la activación, la probabilidad de apertura máxima del canal, la sensibilidad al agonista y la cinética de desactivación (Chen *et al.*, 1999). También es crucial para la localización subcelular, la expresión en la membrana y los ciclos de reciclaje/degradación de los subtipos de receptor NMDA. Estas propiedades pueden mostrar variaciones en función del tipo específico (A-D) de subunidad GluN2 que conforma el canal (Chen y Lipton, 2006).

Los receptores que contienen la subunidad NR2A y NR2B tienen una mayor conductancia, probabilidad de apertura, permeabilidad al calcio y sensibilidad al bloqueo de  $Mg^{2+}$  que los que tienen las subunidades NR2C y NR2D (Paoletti, 2011).

De forma general, los canales NMDA tienen tiempos de apertura más prolongados, es decir, cinética de activación más prologada y con mayor afinidad al glutamato en comparación con los receptores del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Dingledine *et al.*, 1999).

La cinética de desactivación también es más rápida en los receptores AMPA que en los NMDA. Estos últimos tienen tiempos de desactivación mayores a 100 ms (Monyer *et al.*, 1992; Vicini *et al.*, 1998) y pueden variar dependiendo de la isoforma de la subunidad NR1 que lo componen. Por ejemplo, la isoforma NR1a decae más rápido que la NR1b y todas las isoformas de la subunidad NR2 (NR2A, 100 ms; NR2B, 250 ms; NR2C, 250 ms; NR2D, 4 s.) que conforma el canal (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Rumbaugh *et al.*, 2000; Vance *et al.*, 2012).

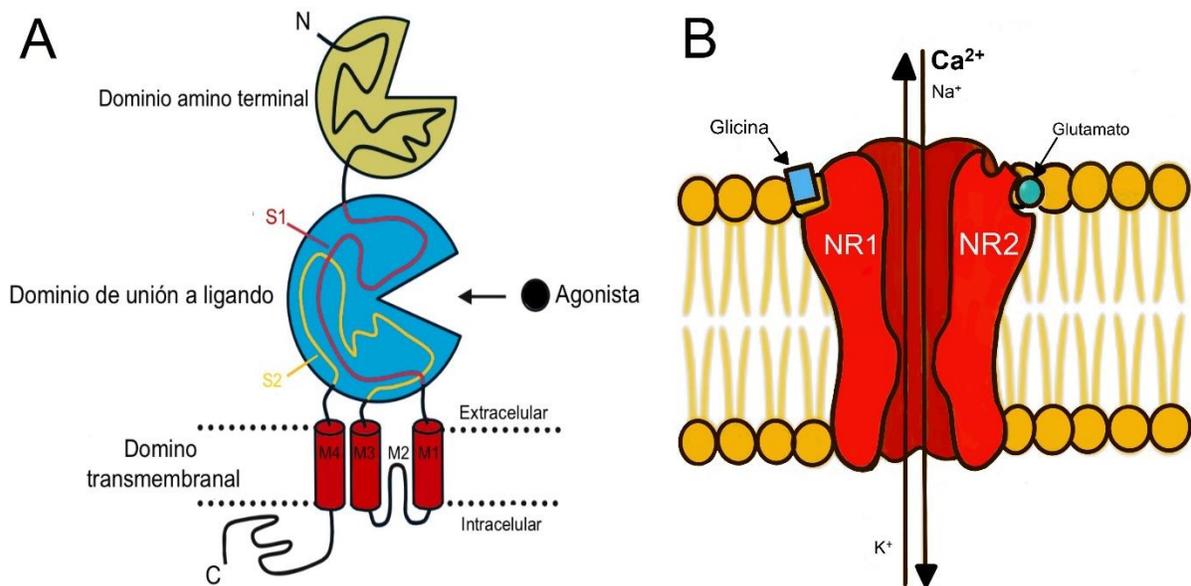
La permeabilidad iónica también muestra variaciones dependiendo de la subunidad que conforma el canal, los canales que contienen la subunidad NR2A y NR2B muestran una mayor conductancia que los que contienen la subunidad NR2C o NR2D (Wyllie, Béhé y Colquhoun, 1998). En general la composición GluN1/2 muestra una permeabilidad similar entre el potasio y el sodio ( $PK/PNa=1.14$ ) y una permeabilidad al calcio de 2 a 5 veces mayor ( $PCa=1.8-4.5$ ), siendo esta permeabilidad al calcio mayor que en los receptores AMPA (Burnashev *et al.*, 1995; Schneggenburger, 1996; Sharma y Stevens, 2002) (**Figura 1**).

Los receptores AMPA exhiben una desensibilización fuerte en comparación con la que muestran los receptores NMDA (Hansen *et al.*, 2018). La desensibilización de estos últimos tiene varias formas que involucran distintos elementos y vías, las cuales se pueden distinguir en función del tiempo y el mecanismo específico del que dependen. De esta manera podemos encontrar desensibilización dependiente de glutamato, de glicina, de calcio y de zinc (Monyer *et al.*, 1992; Wyllie *et al.*, 1998).

En los procesos de desensibilización también se pueden encontrar diferencias dependiendo de la subunidad NR2 que conforma el canal, por ejemplo, la desensibilización dependiente de calcio es más prominente en los canales con la subunidad NR2A que en el resto de subunidades NR2 (Medina *et al.*, 1995), mientras que la dependiente de zinc es más importante en las subunidades NR2A y NR2B (Williams, 1996).

El hecho de que los receptores NMDA muestren una desensibilización dependiente de glutamato menor que los de tipo AMPA, requiere la existencia de mecanismos de recaptura lo suficientemente eficaces para mantener la concentración extracelular en un nivel base por debajo de una concentración nanomolar de glutamato (Clements *et al.*, 2007; Herman y Jahr, 2007). De esta manera cuando la liberación de glutamato alcanza una concentración máxima de 1 mM en la hendidura sináptica es rápidamente removido por difusión o por mecanismos de recaptura con una constante de tiempo de aproximadamente 1 ms (Bergles *et al.*, 1999).

Como se representa en la **Figura 1** cada subunidad que conforma el canal NMDA contiene una región de poro compuesta de tres hélices (M1, M3 y M4) y un lazo reentrante M2, siendo estas regiones las que están involucradas en los procesos de transición del poro hacia la configuración permeable (Krupp *et al.*, 1998; Villarroel *et al.*, 1998). El lazo reentrante M2 funciona como un filtro selectividad y es en esta región donde el ion magnesio actúa como un potente antagonista, bloqueando la conductancia del canal de forma dependiente del voltaje (Mayer y Westbrook, 1984; Nowak *et al.*, 1984). Por estas condiciones el canal permanece bloqueado a bajas concentraciones milimolares de este ion (Adult, 1980) y en potencial de membrana en reposo (Collingridge *et al.*, 2013).



**Figura 1. Estructura del receptor NMDA. A)** Representación de la estructura de una subunidad. Cada subunidad contiene un dominio amino terminal extracelular, una cola carboxilo terminal intracelular, un dominio de unión a ligando que es formado por dos segmentos de cadenas de polipéptidos (S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) y un dominio transmembranal formado por tres hélices transmembranales (M1, M3 y M4) y un lazo reentrante (M2). **B)** Representación de un receptor NMDA compuesto por dos subunidades NR1 y dos subunidades NR2. La subunidad NR1 contiene los sitios de unión al ligando glicina, mientras que la subunidad NR2 contiene los sitios de unión a glutamato. Los receptores con esta composición de subunidades tienen una permeabilidad similar entre el ion sodio y potasio y una mayor permeabilidad al ion Ca<sup>2+</sup>. Modificada de Burnashev y Szepetowski, 2017.

Debido a que este bloqueo es dependiente de voltaje, se puede liberar cuando la membrana postsináptica se encuentra en un potencial de membrana cercano a los 0 mV. Para una apertura eficiente del canal de los receptores NMDA, en adición a la despolarización de la membrana, se requiere del acople simultáneo tanto de glutamato como de su coagonista glicina o de D-serina (Johnson y Ascher, 1987; Kleckner y Dingledine, 2016). Estructuralmente las subunidades NR1 y NR2 forman el poro permeable a cationes; la subunidad NR1 contiene los sitios de unión a glicina/D-serina y la subunidad NR2 contiene los sitios de unión a glutamato (Albensi, 2007).

Por otra parte, el dominio carboxilo terminal de las subunidades de los receptores NMDA se encuentra en la parte citoplasmática y contiene numerosos sitios de fosforilación, de modificaciones postraduccionales y de interacciones proteína a proteína. Lo anterior tiene importantes implicaciones para la función, localización, tráfico y señalización del receptor (Lussier *et al.*, 2015; Sanz-Clemente *et al.*, 2013). Por lo que las funciones de los receptores NMDA están influenciadas por una variedad de moduladores intracelulares y extracelulares (Dingledine *et al.*, 1999). Uno de los más importantes es la neuromodulación generada a partir de receptores acoplados a proteína G (Lisman *et al.*, 2011).

## 1.2. Neuromodulación

Un neuromodulador es una sustancia, usualmente un neurotransmisor, que tiene la capacidad de potenciar o atenuar las respuestas provocadas por otros neurotransmisores a partir de inducir pequeños cambios en la actividad neuronal basal (Pignatelli y Bonci, 2015) mediante acciones sinérgicas con otros receptores (Kaczmarczyk *et al.*, 2013). Se considera que una de sus principales funciones es actuar como un filtro neurobiológico que controla el flujo de la información (Hasselmo, 2006).

### 1.2.1. Dopamina como neuromodulador

La dopamina (DA), un miembro de la familia de las catecolaminas, puede actuar como neuromodulador importante de los sistemas glutamatérgicos gracias a que se libera en la proximidad de las sinapsis glutamatérgicas (Freund *et al.*, 1984; Kornhuber y Kornhuber, 1983). La modulación dopaminérgica amplifica las entradas excitatorias a través de los receptores NMDA, siendo ésto consistente con el papel de la DA sobre la prominencia del estímulo (Cepeda *et al.*, 1993).

Se ha mostrado que la DA puede generar tanto aumentos (Cepeda *et al.*, 1993; Cepeda y Levine, 1998; Ladepeche *et al.*, 2013; Levine *et al.*, 1996; Nai *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012) como disminuciones (Frey *et al.*, 1991; Hagen y Manahan-Vaughan, 2016; Huang y Kandel, 1995; Lemon y Manahan-Vaughan, 2006) de la respuesta glutamatérgica. Uno de los factores que inciden en la dirección de la modulación es el tipo particular de receptor dopaminérgico expresado en la sinapsis (Cepeda *et al.*, 1993; Hernández-Echeagaray *et al.*, 2004).

Los receptores dopaminérgicos están divididos en dos grandes familias, que en términos generales se distinguen por tener un acoplamiento positivo o negativo con adenilato ciclasa (AC) (Andersen *et al.*, 1990; Niznik y Van Tol, 1992). La familia de los receptores D<sub>1</sub> incluye a los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, que están acoplados a la proteína G<sub>s</sub>, la cual activa a la AC. Por su parte, la familia D<sub>2</sub> conformada por los receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> inhibe a la AC por acoplamiento con la proteína G<sub>i</sub> (Kebabian *et al.*, 1979).

De forma consistente se ha reportado una mayor participación de los receptores de la subfamilia D<sub>1</sub> en el aumento de la respuesta glutamatérgica (Cepeda *et al.*, 1998; Chen y Yang, 2002; Nai *et al.*, 2010; Seamans y Yang, 2004; Yang, 2000), mientras que la subfamilia de los receptores D<sub>2</sub> participa en la disminución de la misma (Bethus *et al.*, 2010; Otmakhova y Lisman, 1998).

La concentración de DA en el espacio extracelular puede determinar la familia y el tipo específico de receptor que se activa en la sinapsis (Huang y Kandel, 1995; Shetty *et al.*, 2016). Bajas concentraciones de DA activan los receptores D<sub>2</sub>, los cuales muestran una alta afinidad a la DA (Chen y Yang, 2002). Cuando existen altas concentraciones se activan los receptores de baja afinidad a la DA, es decir, los receptores de la subfamilia D<sub>1</sub> (Mendoza y Hernández, 2015; Zheng *et al.*, 1999).

En relación a la concentración de DA y a la activación de las subfamilias de sus receptores que se activan, se ha encontrado que la presencia de DA en concentraciones altas (>10  $\mu$ M) aumenta la corriente en los receptores NMDA en la corteza cerebral (Calabresi *et al.*, 1987; Murphy *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009) y en regiones hipocampales (Shetty *et al.*, 2016). Este efecto fue mimetizado por la aplicación de SKF38393, un agonista selectivo de D<sub>1</sub>, y bloqueado por SCH31966, antagonista selectivo de D<sub>1</sub> (Yang, 2000). Efectos contrarios se han mostrado con la administración de dosis bajas de DA (<10  $\mu$ M) (Zeng *et al.*, 2001).

En apoyo a esta relación específica, Millan (2002) mostró que la activación no selectiva de los receptores dopaminérgicos por medio de apomorfina, un agonista de alta afinidad para todos los subtipos de receptores dopaminérgicos, previene el establecimiento de la potenciación a largo plazo en las sinapsis de las fibras colaterales de Schaffer, lo que es un indicador de disminución de la respuesta glutamatérgica.

### 1.2.2. Neuromodulación dopaminérgica en el hipocampo

Debido a que el efecto de la DA como neuromodulador está relacionado con el tipo de receptor que participa en la sinapsis, resulta relevante no solo la concentración de la DA en el espacio extracelular, sino también el tipo de subfamilia de receptor dopaminérgico expresada en la neurona objetivo (Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Aunque los receptores dopaminérgicos están ampliamente distribuidos por el cerebro, las densidades de los subtipos de receptores varían entre las diferentes áreas cerebrales.

Una de las áreas cerebrales más importantes por su relación con los procesos de plasticidad y con procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria es el hipocampo (Huang y Kandel, 1995), el cual está considerablemente poblado de receptores dopaminérgicos de las dos subfamilias de receptores, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Hansen y Manahan-Vaughan, 2014; Smith y Greene, 2012; Wei *et al.*, 2018). Sin embargo, existen diferencias en la expresión de los subtipos de receptores en diferentes regiones hipocámpales y a lo largo de su eje dorsoventral.

Entre el giro dentado y la región del cuerno de Amón 1 (CA1) existen diferencias en la sensibilidad de la mediación de las sinapsis glutamatérgicas a partir de los sistemas dopaminérgicos (Hansen y Manahan-Vaughan, 2014; Kulla y Manahan-Vaughan, 2000; Lemon y Manahan-Vaughan, 2006). Estas diferencias se deben a que en la región de CA1 hay una mayor expresión de los receptores de la subfamilia D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> que en el giro dentado (Köhler *et al.*, 1991; Mu *et al.*, 2011). Así mismo, en la región de CA1 se observa una mayor inervación de fibras dopaminérgicas provenientes del área tegmental ventral (ATV), mientras que en el giro dentado hay una mayor inervación de terminales noradrenérgicas que nacen del locus coeruleus (LC) (Smith y Greene, 2012).

Consecuentemente, se ha encontrado que la administración de agonistas o antagonistas dopaminérgicos de D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> no afecta la respuesta glutamatérgica en el giro dentado pero sí afecta en la región de CA1 (Huang y Kandel, 1995; Kulla y Manahan-Vaughan, 2000). Por otra parte, en el giro dentado hay una mayor coparticipación de otros neuromoduladores como la noradrenalina (Hansen y Manahan-Vaughan, 2014; Parfitt *et al.*, 1992).

Del mismo modo, pueden observarse diferencias a lo largo del eje dorso-ventral del hipocampo (Wei *et al.*, 2018a). En la región dorsal, hay una expresión ampliamente segregada de las dos familias de receptores dopaminérgicos, así como altas tasas de colocación en las

regiones de CA3 y CA1. Sin embargo, esto se daría en mayor proporción en interneuronas que en neuronas piramidales (Gangarossa *et al.*, 2012).

En el hipocampo ventral, hay una alta expresión y buena colocalización de ambos tipos de receptores, especialmente en células piramidales de CA1 y en áreas de subiculum (Ciliax *et al.*, 2000; Gangarossa *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2018b). Empero, también se ha descrito que en la región de CA1 hay una amplia expresión de los receptores D<sub>1</sub> pero no de los receptores D<sub>2</sub> (Köhler *et al.*, 1991; Mu *et al.*, 2011).

Esta diferencia en la distribución de las subfamilias de receptores dopaminérgicos a lo largo del eje dorsoventral, se traduce en diferencias funcionales de la modulación dopaminérgica. En el trabajo de Papaleonidopoulos y colaboradores (2018) reportaron que en rebanadas hipocampales el bloqueo con antagonistas selectivos de los receptores de la subfamilia D<sub>1</sub> como el SCH23390, reduce la magnitud de respuesta glutamatérgica en las regiones ventrales. Por su parte, la administración de agonistas selectivos como el SKF82958, aumentó significativamente la magnitud de la respuesta glutamatérgica en la región hipocampal ventral pero no en la región dorsal. Esto muestra correspondencia con la expresión de este subtipo de receptor, ya que se puede observar una mayor expresión del subtipo de receptor D<sub>1</sub> en la región ventral que en la región dorsal.

Estas diferencias pueden deberse en el origen de las fibras dopaminérgicas que convergen en una y otra región. El hipocampo dorsal recibe información sensorial polimodal de regiones corticales, mientras que el hipocampo ventral está vinculado con estructuras subcorticales tales como la amígdala y el ATV (Bannerman *et al.*, 2014).

El ATV y el hipocampo forman un lazo bidireccionalmente modulado; en el que el hipocampo controla la actividad del ATV (Lisman y Grace, 2005) y el ATV media la actividad hipocampal a través de la liberación dopaminérgica (Broussard *et al.*, 2016; Fields *et al.*, 2007). Se ha comprobado, por medio de la técnica de optogenética, que altos niveles de liberación de DA del ATV al hipocampo aumenta la magnitud de las sinapsis excitatorias en la región de CA1 (Rosen, Cheung y Siegelbaum, 2015), por lo que la modulación dopaminérgica en el hipocampo ventral parece ser dependiente de ATV (Lisman y Grace, 2005).

Como puede notarse el impacto funcional de la DA en el circuito neuronal del hipocampo es sustancial y depende de factores como: la concentración de DA, la expresión y la colocalización de los receptores dopaminérgicos en la neurona blanco (Frey *et al.*, 1990; Hansen

y Manahan-Vaughan, 2014; Ito y Schuman, 2012; Kempadoo *et al.*, 2016; Werlen y Jones, 2015). Dados estos factores, la DA y sus receptores D<sub>1</sub> en la región de CA1 tienen un papel esencial en la modulación glutamatérgica (Kerr y Wickens, 2001; Wise, 2004).

### 1.2.3. Interacciones intracelulares

La función de la DA como neuromodulador puede mostrarse en términos de señalización intracelular (Greengard, 2001), así como mediante interacciones directas proteína a proteína entre los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos (Lee *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006).

Con respecto a la señalización intracelular, la vía más prominente ocurre segundos después de la activación de la proteína G $\alpha$ (s) e involucra a la vía de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) – proteína cinasa A (PKA) - fosfoproteína regulada por AMPC y DA (DARPP-32) (Lachowicz y Sibley, 1997; Missale *et al.*, 1998).

La activación de esta vía, AMPC-PKA-DARPP-32, parece ser dependiente de la concentración de DA (Shetty *et al.*, 2016). Niveles basales de estimulación del receptor de D<sub>1</sub> activan a la cinasa-5 dependiente de ciclina (Cdk-5), la cual inhibe a DARPP-32 a través de fosforilarla en la posición treonina 75 (Th75). Esta inhibición permite que la proteína fosfatasa 1 (PP1) se active y tenga efectos negativos en la respuesta glutamatérgica (Hemmings *et al.*, 1984), mediante su capacidad de inhibir a la PKA (Bibb *et al.*, 1999) y la autofosforilación de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina cinasa II (CaMKII) (Lisman, 1989).

Por el contrario, niveles altos de liberación dopaminérgica tienen la capacidad de activar a la proteína fosfatasa-2A (PP2A), quien remueve la influencia inhibitoria de Cdk-5 sobre DARPP-32, permitiendo su activación mediante la fosforilación en la treonina 34 (Th34) para que tenga la posibilidad de eliminar las funciones inhibitorias de PP1. Esta capacidad de DARPP-32 es compartida únicamente por la proteína inhibidora de la proteína fosfatasa 2. Un punto importante a resaltar es que tanto DARPP-32 como la proteína inhibidora de la fosfatasa 2 tienen bajas concentraciones en el hipocampo en comparación con otras regiones cerebrales (Ouimet *et al.*, 1984).

Gracias a este aumento en la actividad de PKA, la DA a través de los receptores D<sub>1</sub> contribuye al aumento de la respuesta glutamatérgica, particularmente por las implicaciones reguladoras de esta proteína en los receptores NMDA. La activación del receptor D<sub>1</sub> induce la fosforilación de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, lo que aumenta la respuesta del receptor NMDA (Blank *et al.*, 1997; Flores-Hernández *et al.*, 2006; Otmakhova y Lisman, 1996). Esta fosforilación es bloqueada cuando se inactiva genéticamente a DARPP-32 (Snyder *et al.*, 1998), ocasionando un menor aumento de las corrientes activadas por NMDA de forma dependiente de D<sub>1</sub> (Flores-Hernández *et al.*, 2006).

Sin embargo, también se ha descrito que la eliminación de DARPP-32 no altera la fosforilación de las subunidades de NMDA (Dunah, 2004). De la misma manera se ha mostrado que la eliminación de DARPP-32 reduce el aumento de las corrientes activadas por NMDA generadas por la DA, sin embargo no las elimina por completo (Flores-Hernández *et al.*, 2002), e incluso, Sarantis y colaboradores (2009) no detectaron aumentos en la fosforilación de DARPP-32 (thr34) en el hipocampo tras la activación del receptor D<sub>1</sub>. Esto puede deberse a las bajas concentraciones en el hipocampo de esta fosfoproteína con respecto a otras regiones como el cuerpo estriado (Ouimet *et al.*, 1984). Estos resultados indican que DARPP-32 es parte de los mecanismos que contribuyen a la potenciación de las corrientes de NMDA generadas por D<sub>1</sub>, pero su participación en el hipocampo no es tan relevante como lo es en regiones como el cuerpo estriado (Nagai *et al.*, 2007; Ouimet *et al.*, 1984; Roberson *et al.*, 1999).

Dadas estas condiciones se han considerado otros mecanismos que participan en la modulación que ejerce la DA en la actividad glutamatérgica, una de estas vías ocurre a partir de interacciones directas proteína a proteína entre ambos receptores (Lee *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006).

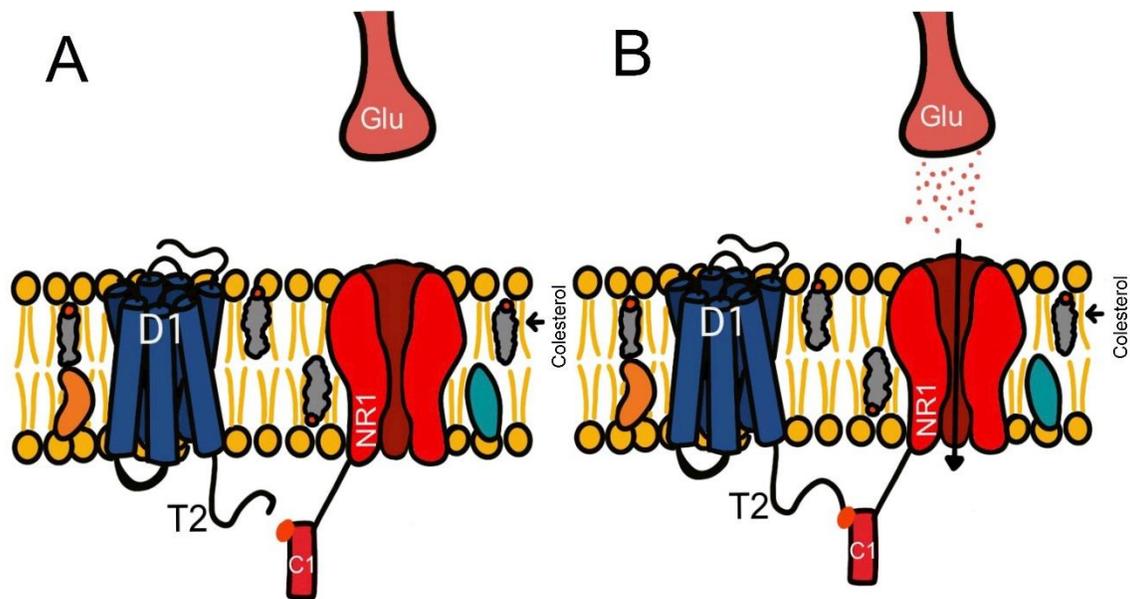
#### 1.2.4. Interacciones directas proteína a proteína

Inicialmente se pensaba que la modulación dopaminérgica de las sinapsis glutamatérgicas era generada exclusivamente mediante interacciones intracelulares, ya que los receptores acoplados a proteínas G, como los receptores dopaminérgicos, solo se concebían como monómeros. Por lo que sus interacciones con otros receptores se limitaban a una interacción indirecta en el citoplasma (Greengard, 1976).

Empero, se ha demostrado que los receptores dopaminérgicos tienen la capacidad de formar dímeros y oligómeros con otros receptores ionotrópicos (George *et al.*, 2002; Milligan, 2004). Siendo una capacidad importante tanto en los procesos de regulación del transporte y expresión de receptores en la membrana celular (Kong, 2006), como para la modulación de su actividad y función (Kara *et al.*, 2010).

En el hipocampo, particularmente en CA1, los receptores D<sub>1</sub> forman un complejo con el receptor ionotrópico NMDA. Este complejo se forma principalmente por la interacción de la región carboxilo terminal C1 de la subunidad NR1 del receptor NMDA con la sección L387-L416 (T2) de la cola carboxilo terminal del receptor D<sub>1</sub> (Lee *et al.*, 2003; Fiorentini *et al.*, 2003), como se ilustra en la **Figura 2**. Esta interacción parece actuar como un freno al aumento de la actividad del receptor NMDA (Lee *et al.*, 2002), debido a que D<sub>1</sub> se une en el mismo sitio en el que se une calmodulina (CaM) y CaMKII a la cola carboxilo terminal de NR1 (Castner y Williams, 2007; Pei, 2004), lo que limita el aumento de la actividad del receptor NMDA.

Sin embargo, cuando se activan los receptores D<sub>1</sub> se produce una separación del complejo NR1-D<sub>1</sub> (Lee *et al.*, 2002) eliminando así el freno generado por D<sub>1</sub>. Es probable que por esta razón, en el trabajo de Nai y colaboradores (2010) encontraron aumentos en las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) activadas por NMDA en neuronas hipocampales con la aplicación de un agonista selectivo, SKF81297, del receptor de la subfamilia D<sub>1</sub>.



**Figura 2. Interacción proteína a proteína entre los receptores D1 y NMDA. A)** Cuando el receptor NMDA tiene una actividad basal se mantienen separados de los receptores NMDA. **B)** Cuando la actividad del receptor NMDA aumenta los receptores D<sub>1</sub> se unen a través de su región T2 a la región C1 de la cola carboxilo terminal de la subunidad NR1. Modificado de Lee *et al.*, 2002.

Otro mecanismo a tomar en consideración, es la situación contraria, la activación de los receptores NMDA, que produce un aumento en la densidad de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> en la membrana plasmática (Fiorentini *et al.*, 2003; Pei, 2004), particularmente en el hipocampo (Scott *et al.*, 2006) y que estos luego modulan al receptor NMDA.

Este aumento puede darse por la inserción en la membrana del complejo D<sub>1</sub>-NR1 formado en el retículo endoplasmático, favoreciendo la localización final de D<sub>1</sub> en la densidad postsináptica en las proximidades de las sinapsis glutamatérgicas y previniendo su internalización generada por agonistas dopaminérgicos como un medio de supervivencia celular (Fiorentini *et al.*, 2003).

El complejo también puede formarse en la membrana plasmática a partir de interacciones D<sub>1</sub>-NR1 (Pei, 2004), lo que estabiliza las difusiones laterales de los receptores D<sub>1</sub> en las espinas dendríticas hipocampales (Ladepêche *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2002). Esto es generado por el anclaje de los receptores NMDA a la densidad postsináptica mediante proteínas de andamiaje específicas como la PSD-95. Esta proteína es considerada un andamio prototípico estructural y de señalización en la densidad postsináptica que le permiten al receptor NMDA, tras su activación, estabilizar los coeficientes de difusión de los receptores D<sub>1</sub> (Kruusmägi *et al.*, 2009) mediante

modificaciones alostéricas. Este proceso forma el complejo D<sub>1</sub>-NR1 que produce un aumento en la densidad postsináptica de las espinas dendríticas hipocampales de los receptores D<sub>1</sub> (Pei, 2004; Scott *et al.*, 2002).

La formación del complejo heteroreceptor D<sub>1</sub>-NR1 parece ser fundamental en la modulación de la actividad neuronal (Huang, 1998). Permite que se recluten mayor cantidad de receptores D<sub>1</sub> en las cercanías de la densidad postsináptica, donde ocurre la actividad sináptica, facilitando una mediación rápida de la modulación de la potenciación de la respuesta glutamatérgica a partir de interacciones proteína a proteína y de procesos de señalización intracelular (Blank *et al.*, 1997; Colwell y Levine, 2018). Por este motivo, se ha encontrado que el bloqueo de la actividad de NMDA reduce la habilidad del receptor D<sub>1</sub> para modular la actividad neuronal (Huang, 1998).

Se ha podido observar que una de las consecuencias de la formación de este complejo heteroreceptor y de las interacciones proteína a proteína entre los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos es la generación de un lazo de retroalimentación positiva; de no ser regulado provocaría un exceso de actividad de ambos receptores que podría desencadenar, excitotoxicidad (Ladepêche *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009).

#### **1.2.4.1. Complejo PSD-95-D1-NMDA**

El lazo de retroalimentación positiva puede ser detenido por un mecanismo que depende de los receptores D<sub>2</sub>, que en términos generales se traduce en una inhibición de la respuesta glutamatérgica (Bethus *et al.*, 2010; Otmakhova y Lisman, 1998), lo que detendría el lazo de retroalimentación positiva. Sin embargo, podría darse el caso que exista poca o mínima regulación debido a factores de colocalización en la neurona (Fiorentini *et al.*, 2003). Zhang y colaboradores (2009), han propuesto que la proteína de andamio postsináptico PSD-95 participa como un freno a este lazo formado por el complejo D<sub>1</sub>-NMDA, a partir de interferir en las interacciones directas entre estos receptores para formar el complejo PSD-95-D<sub>1</sub>-NMDA. La formación de este complejo regularía la interacción y funcionamiento del complejo heteroreceptor D<sub>1</sub>-NMDA en neuronas hipocampales.

De esta manera, la presencia de PSD-95 inhibe la asociación de D<sub>1</sub> con NR1, debido a que se genera una competencia de unión con los receptores D<sub>1</sub>, ya que tanto PSD-95 como NR1 se unen a una región superpuesta de la cola carboxilo terminal de D<sub>1</sub> (Castner y Williams, 2007; Pei, 2004; Zhang *et al.*, 2009). En presencia de PSD-95 la precipitación de D<sub>1</sub> y NR1 se reduce. Una de las implicaciones funcionales se traduce en una inhibición de la regulación de los receptores D<sub>1</sub> por la activación de los receptores NMDA, es decir, se elimina la inhibición de la internalización de los receptores D<sub>1</sub>, generados por la actividad de NMDA. Una de las consecuencias de esta interrupción se observa en la capacidad de NMDA para potenciar la actividad de D<sub>1</sub>. Se han observado disminuciones en la producción de AMPc relacionado con la actividad de los receptores D<sub>1</sub>, sin que sea necesaria la interrupción de la señalización de calcio intracelular para estos efectos (Zhang *et al.*, 2009).

Para la interrupción de NR1-D<sub>1</sub>, no sólo se requiere de la interrupción de la unión física entre los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos, sino también la participación de los dos primeros dominios homólogos de la proteína PSD-95 que se ligan a la región carboxilo terminal de la subunidad NR2 (Kim *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1996). Por lo que estarían implicados complejos de señalización intracelular reclutados por la proteína PSD-95, es decir, que los efectos de la interrupción de la interacción D<sub>1</sub>-NMDA por la PSD-95 pueden darse no sólo por obstrucción física directa, sirviendo como barrera física, sino que también a través de complejos de señalización particulares reclutados por la PSD-95 (Zhang *et al.*, 2009).

Las proteínas de señalización que pueden ser reclutadas, incluyendo a la PSD-95, y los elementos que permiten la formación y modulación del complejo heteroreceptor D<sub>1</sub>-NMDA, pueden variar en función de las balsas lipídicas (Man *et al.*, 2003).

### 1.3. Balsas lipídicas

Las balsas lipídicas son micro dominios dinámicos de membrana ricos en colesterol, esfingolípidos y glicosilfosfatidilinositol (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002). Son más estrechas que el resto de la membrana, presentan diámetros entre 25 y 100 nm (Pike, 2006), debido a una mayor presencia de cadenas de hidrocarburos saturadas en los esfingolípidos y fosfolípidos, en comparación con los ácidos grasos no saturados de los fosfolípidos fuera de las balsas lipídicas (Simons y Vaz, 2004).

Las balsas lipídicas no son homogéneas ni en su composición ni en sus propiedades, por esta razón se han propuestos dos tipos de balsas lipídicas que se diferencian en su forma y en la proteína de unión al colesterol que contienen. Las planas se caracterizan por contener la proteína flotilina, mientras que las invaginadas contienen a la proteína caveolina (Kauer *et al.*, 1988).

Gracias a su composición las balsas lipídicas proporcionan un orden a los componentes de la membrana celular (Brown y Rose, 1992). Esto es de particular importancia en células polarizadas como las neuronas, cuyas funciones requieren la segregación de proteínas en microdominios específicos de la membrana (Hering *et al.*, 2003).

Debido a que muchos de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos, como los NMDA (Abulrob *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2004; Guirland *et al.*, 2004) y D<sub>1</sub> (Sorkina *et al.*, 2005; Strange, 2005; Yu *et al.*, 2004), así como sus elementos de respuesta se encuentran en las balsas lipídicas, pueden proporcionarle a este micro dominio de membrana la capacidad de facilitar o inhibir sus interacciones (Allen *et al.*, 2007).

De esta forma se tiene la hipótesis de que las balsas lipídicas proporcionan un punto de encuentro espacial y temporal a los elementos postsinápticos (Gaudreault *et al.*, 2004), lo que cinéticamente puede favorecer o impedir las interacciones de estos elementos. La dirección de esta modulación parece depender de la participación proteica en estas balsas lipídicas (Allen *et al.*, 2007).

Uno de los elementos que ayuda con esta modulación en las balsas lipídicas es la proteína de andamio postsináptico PSD-95 al promover la asociación de otras proteínas y la formación de complejos proteicos diferenciales en las balsas lipídicas (Hering *et al.*, 2003; Man *et al.*, 2003). Una de las interacciones más importantes que mantiene la PSD-95 se da con la región carboxilo terminal de las subunidades NR1 y NR2 del receptor NMDA (Traynelis *et al.*, 2010; Sans *et al.*,

1996). Esta interacción ayuda a anclar a estos receptores en la región postsináptica (Frank *et al.*, 2004), por lo tanto, se ha reportado una composición diferente del complejo formado por la PSD-95, NMDA y sus proteínas de asociación las balsas lipídicas entre la densidad postsináptica y las fracciones solubles.

Uno de los elementos que se expresa de forma diferente entre estos dominios de membrana es la CaMKII. Esta proteína cinasa además de tener un papel importante en la respuesta glutamatérgica (Leonard *et al.*, 1999), ayuda a estabilizar la asociación de la proteína de andamio PSD-95 con las balsas lipídicas (Suzuki *et al.*, 2008), después de que el aumento de calcio intracelular promueva el agrupamiento de CaMKII con las balsas lipídicas (Du *et al.*, 2006).

Se han encontrado indicios de las implicaciones de las balsas lipídicas en la respuesta sináptica y en los procesos cognitivos normales y patológicos. Se han descrito disminuciones en la densidad de los receptores NMDA en las balsas lipídicas de neuronas hipocampales en modelos animales de la demencia tipo Alzheimer (Morin *et al.*, 2016). Asimismo, después de una isquemia existe un movimiento de los receptores NMDA de las balsas lipídicas a la densidad postsináptica (Besshoh *et al.*, 2005). Además, durante el aprendizaje espacial se han descrito cambios de los receptores NMDA y de PSD-95 entre la densidad postsináptica y las balsas lipídicas (Delint-Ramírez *et al.*, 2008).

### **1.3.1. Implicaciones de las balsas lipídicas en la respuesta sináptica**

Experimentalmente también se ha indagado la relevancia fisiológica de la localización de las proteínas en esos dominios de membrana para conocer el papel específico de las balsas lipídicas en la respuesta sináptica (Abulrob *et al.*, 2005; Besshoh *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2015; Frank *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2008; Koudinov y Koudinova, 2005).

Uno de los métodos más utilizados es la depleción o perturbación de las balsas lipídicas mediante agentes que secuestran, quelan o previenen la síntesis del colesterol (Gaudreault *et al.*, 2004). Uno de ellos es la metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD), un oligosacárido cíclico capaz de capturar moléculas lipídicas solubles, teniendo una mayor afinidad por el colesterol (Kilsdonk *et al.*, 1995). Esto lo hace ser uno de los agentes más eficientes, ya que en tratamientos *in vitro* con M $\beta$ CD (1-100mg/ml) se generan disminuciones en el colesterol dentro de la primera hora

(Koudinov y Koudinova, 2005). Además ha mostrado no ser tóxico para las neuronas (Kilsdonk *et al.*, 1995).

Los estudios en los que se ha utilizado M $\beta$ CD en distintas concentraciones han revelado disminuciones en la respuesta glutamatérgica (Abulrob *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2015; Frank *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2004; Hering *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2008) dependiente del tiempo de incubación de las neuronas con M $\beta$ CD (Antonini *et al.*, 2018).

Se ha reportado que la perturbación de las balsas afecta la localización y estabilidad de los receptores AMPA (Choi *et al.*, 2015b; Frank *et al.*, 2008; Hering *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2008), por lo que han asociado la disminución de la respuesta glutamatérgica con afectaciones en este componente y no en los mediados por NMDA (Choi *et al.*, 2015a).

Sin embargo, hay resultados que indican que el componente NMDA también se ve afectado con la perturbación de las balsas. Antonini y colaboradores (2018) reportaron que las EPSCs activadas por NMDA reducen su amplitud con la incubación de las neuronas con (0.2-2 mM) M $\beta$ CD durante 30 minutos y que muestran una reducción más prominente con su incubación durante una hora.

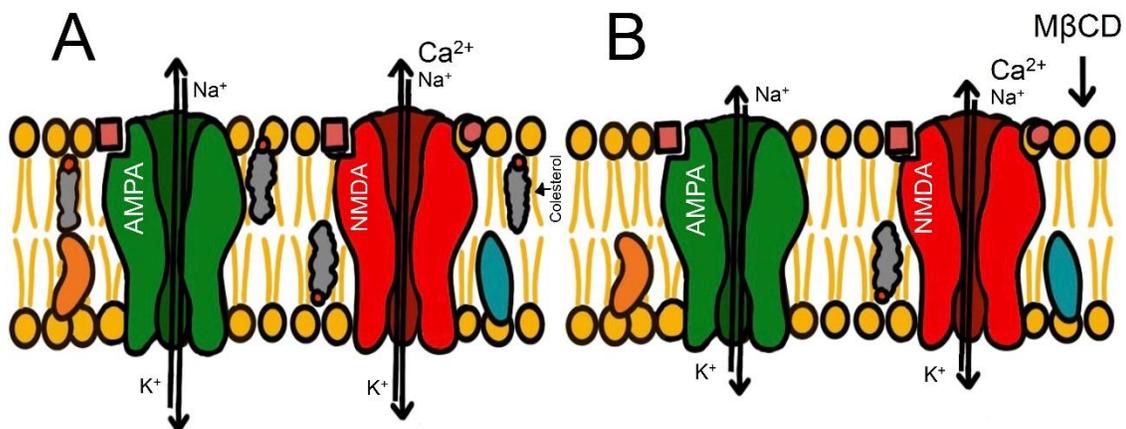
Por su parte, Frank y colaboradores (2004) describieron una reducción en el influjo de calcio a través de los receptores NMDA por la incubación de neuronas hipocámpales con 0.76 mM de M $\beta$ CD. Sin embargo, Abulrob y colaboradores (2005) no encontraron alteraciones en el influjo de calcio dependiente de NMDA tras el tratamiento con M $\beta$ CD, por lo que no sería un mecanismo concluyente para explicar las alteraciones en las corrientes postsinápticas generadas por el receptor NMDA reportadas en su estudio.

Se ha mencionado la posibilidad de que la M $\beta$ CD tenga un efecto directo en el canal NMDA y que esto explique los resultados obtenidos. Por esta razón en el estudio de Abulrod y colaboradores (2005) realizaron un experimento en el que aplicaron 0.88 mM de forma aguda (durante 3 segundos) de la M $\beta$ CD y la metil ciclo dextrina (MCD), dos miembros de las dextrina, cuyo funcionamiento y capacidad para capturar el colesterol es similar. Los resultados mostraron que la dextrina no metilada reduce las corrientes activadas por NMDA, mientras que la metilada no, por lo que esta no tendría un efecto directo en el canal.

También se consideró la posibilidad de que existiera una reducción en la densidad de los receptores NMDA, sin embargo esto fue descartado por los resultados obtenidos por Antonini y colaboradores (2018) ya que no encontraron cambios en la densidad de estos receptores con la

incubación de las neuronas con M $\beta$ CD. Lo que sí se ha encontrado es que de forma similar a lo que ocurre con los receptores AMPA, la M $\beta$ CD genera un desarreglo en la plataforma en la que los receptores NMDA están embebidos, particularmente la subunidad NR1, generando cambios en su distribución y localización en la membrana plasmática (Antonini *et al.*, 2018; Frank *et al.*, 2004). Por lo que la proteína PSD-95 y los complejos que genera con NR1 es una de las condiciones específicas que podrían verse afectadas (Frank *et al.*, 2004).

Puede observarse que un resultado coincidente en estas investigaciones es la afectación en los procesos que median la respuesta sináptica (**Figura 3**). Sin embargo, no es la misma situación con los mecanismos específicos que se ven alterados con la depleción de las balsas lipídicas. Por lo tanto, el mecanismo que podría estar afectado con esta depleción y que contribuye a generar los efectos mostrados son las interacciones proteína a proteína entre los receptores glutamatérgicos y dopaminérgicos.



**Figura 3. La respuesta glutamatérgica cambia con la perturbación de las balsas lipídicas. A)** Respuesta sináptica en condiciones normales. Los receptores AMPA permiten el influjo del ion sodio y el eflujo del ion potasio, mientras que los receptores NMDA permiten el influjo del ion sodio y en mayor cantidad del ion calcio y el eflujo de sodio. **B)** La M $\beta$ CD cambia la actividad de estos receptores al disminuir la concentración de colesterol de las balsas lipídicas en las que se encuentran. Modificado de Burnashev y Szepetowski, 2017.

## **2. Planteamiento del Problema**

La modulación dopaminérgica de las sinapsis glutamatérgicas en la región de CA1 parece depender de las interacciones proteína a proteína que mantienen los receptores D<sub>1</sub> y NMDA. Existen elementos que pueden favorecer o impedir estas interacciones, y las balsas lipídicas son uno de los más importantes, ya que representan en la membrana plasmática un punto de encuentro espacial y temporal para los receptores D<sub>1</sub> y NMDA, así como para elementos que modulan su interacción como la proteína PSD-95.

Por otro lado, los cambios en estas sinapsis producidas por la depleción de las balsas lipídicas no han sido descritos en su totalidad, y han sido controversiales. Por lo que se desconoce si uno de los elementos que se ven afectados es la modulación ejercida por la DA en estas sinapsis. Por consiguiente, el propósito de este proyecto fue investigar los posibles cambios en la respuesta sináptica de CA1 como resultado de alteraciones en la interacción de los receptores NMDA-D<sub>1</sub> inducidas por perturbación de las balsas lipídicas.

## **3. Hipótesis**

Si la depleción de las balsas lipídicas por la M $\beta$ CD modifica la interacción entre los receptores D<sub>1</sub> y NMDA, esta alteración se reflejará en cambios en la modulación ejercida por la DA en las sinapsis glutamatérgica de la región de CA1.

### **3.1. Hipótesis nula**

Si la depleción de las balsas lipídicas por la M $\beta$ CD no modifica la interacción entre los receptores D<sub>1</sub> y NMDA, esta alteración no reflejará cambios en la modulación ejercida por la DA en las sinapsis glutamatérgica de la región de CA1.

## 4. Objetivo general

Evaluar el efecto de la depleción de las balsas lipídicas generada por M $\beta$ CD en la modulación producida por el receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> en los receptores NMDA de las neuronas piramidales de CA1.

### 4.1. Objetivos particulares

Identificar los componentes relacionados por el receptor NMDA en la sinapsis de CA1.

Determinar el efecto de la disminución de la actividad del receptor D<sub>1</sub> en la respuesta sináptica mediada por NMDA en neuronas piramidales de CA1.

Evaluar el efecto de la depleción de las balsas lipídicas generada por M $\beta$ CD en la respuesta sináptica mediada por receptores NMDA en neuronas piramidales de CA1.

## 5. Método

### 5.1. Preparación de rebanadas hipocampales

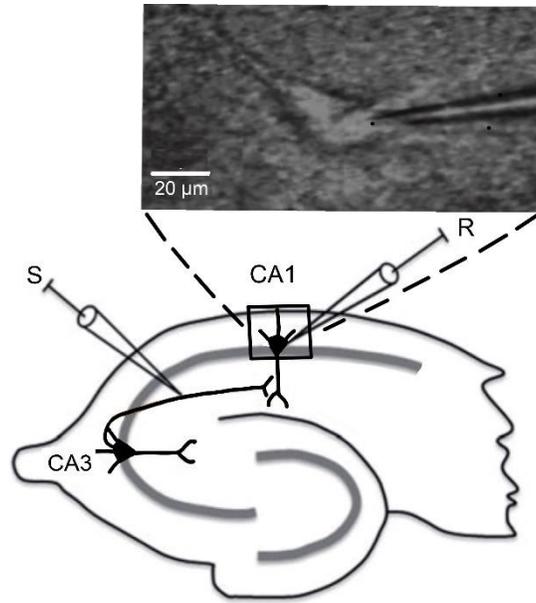
Se utilizaron ratas machos de 15 días de edad de la cepa *Wistar*, mantenidas en condiciones estándar de laboratorio, con estricto apego a los procedimientos autorizados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), acorde con la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Se extrajo el cerebro de la rata anestesiada con pentobarbital sódico a través de una inyección intraperitoneal (50 mg/kg) y se colocó en un helado (4 ° C) líquido cerebro espinal artificial (LCEA) el cual contenía (mM): 125 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> y 10 glucosa a pH 7.4 equilibrada con carbógeno (95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>). Utilizando un vibratomo Leica (VT 1200S; Leica *Biosystems*) se obtuvieron rebanadas sagitales de cerebro de 300  $\mu$ m de espesor que contenían el hipocampo. Estas rebanadas se incubaron en LCEA con burbujeo de carbógeno constante a temperatura ambiente por al menos 1 hora antes de los registros. En los experimentos en los que se perturbaron las balsas lipídicas, se añadió M $\beta$ CD en distintas concentraciones (0.757 mM, 2 mM y 5 mM) al LCEA a 28-30 °C por lo menos dos horas antes del registro.

## 5.2. Registros electrofisiológicos

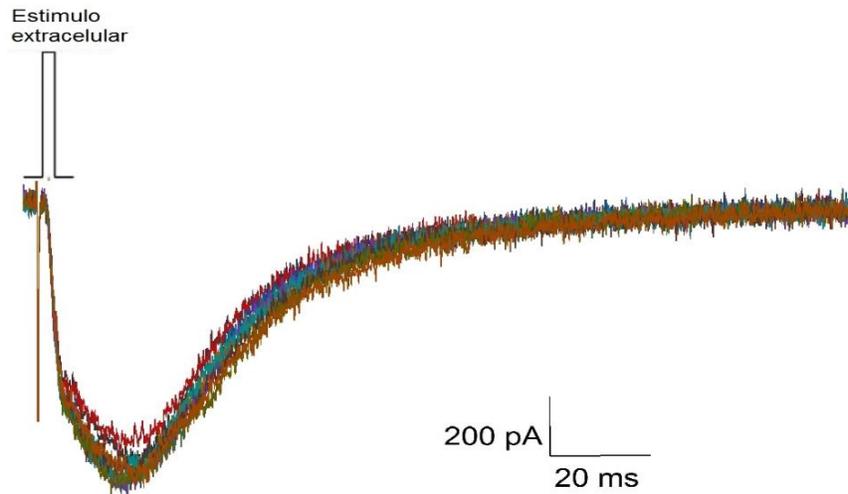
Las rebanadas individuales a la cámara de registro, inmovilizadas con una rejilla de nylon y perfundida con LCEA a 34 °C. En este punto se le añadió al LCEA 10  $\mu\text{M}$  de Bicuculina, y dependiendo de la condición experimental se añadió 20  $\mu\text{M}$  de cianquixalina o 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) o 20  $\mu\text{M}$  de clorhidrato de R (+) - 7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina (SCH23390). Los experimentos con este último reactivo se realizaron en condiciones de oscuridad.

Los registros en fijación de voltaje se realizaron utilizando la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula entera con un amplificador AxoClamp 2B (*Molecular Devices*) y monitoreado con una computadora personal con el software Clampex 6 (*Molecular Devices*). Las señales se filtraron a 5 kHz y se digitalizaron mediante un convertidor analógico a digital de la serie de Digidata 1200 con una tasa de muestreo de 10 kHz usando el software pClamp6. Los electrodos de registro. Los electrodos de registro se fabricaron a partir de tubos de vidrio de borosilicato (*World Precision Instruments, WPI*) con una resistencia de 2-4  $\text{M}\Omega$  al llenarse con una solución que contenía (mM): 115 gluconato de potasio, 20 CsCl, 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 10 TEA-Cl, 5 QX-314, 2 ATP-Na, 0.3 GTP-Mg con un pH de 7.2 ajustado con CsOH. En una condición experimental se añadió 10  $\mu\text{M}$  del fragmento 281-309 de CaMKII. Las neuronas individuales fueron observadas usando un microscopio (*Nikon Eclipse E600FN*) con un objetivo de inmersión en agua 60 X. Las neuronas seleccionadas para el registro se ubicaron en la región de CA1 del hipocampo.

Las EPSCs se obtuvieron fijando el potencial de membrana a un valor constante de -60 mV y colocando un electrodo de estimulación bipolar concéntrico en el estrato radiado del hipocampo a 200 micras (máximo) del de registro, como se muestra en la **Figura 4**. La duración del estímulo extracelular aplicado fue de 100  $\mu\text{s}$  a una frecuencia de 0.3 Hz y su intensidad se ajustó para inducir una corriente cuya amplitud fuese de la mitad de la corriente máxima (**Figura 5**). Las corrientes se obtuvieron tanto en condiciones control como con la depleción de las balsas lipídicas.

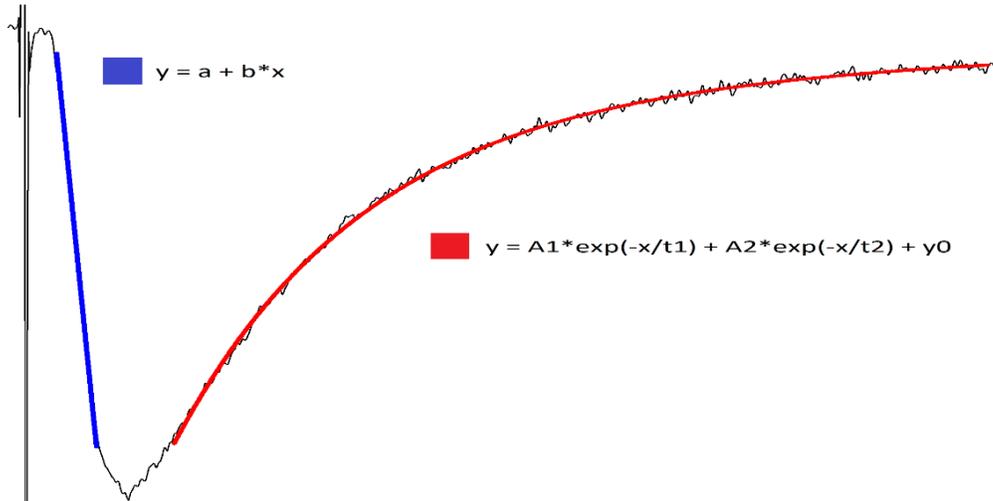


**Figura 4. Disposición de los electrodos en el hipocampo.** El electrodo de estimulación (S) se colocó en las fibras colaterales de Schaffer para activar las sinapsis entre las neuronas piramidales del Cuerno de Amón 3 (CA3) y las neuronas piramidales del Cuerno de Amón 1 (CA1). En las neuronas piramidales de CA1 se colocó el electrodo de registro (R) a una distancia no mayor de 200 micras del electrodo de estimulación.



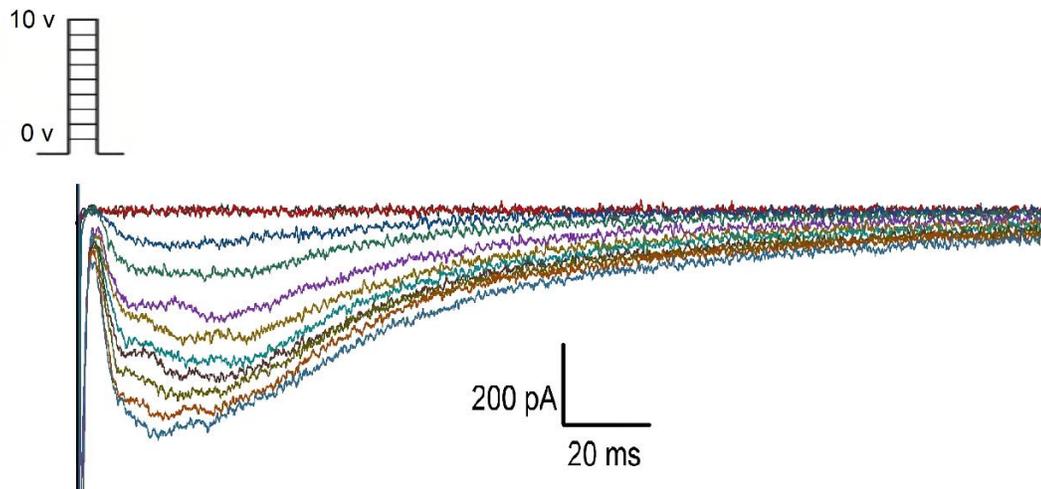
**Figura 5. Protocolo de registro de las EPSCs.** Trazos representativos de las EPSCs y protocolo de estimulación empleado. El estímulo extracelular aplicado tuvo una duración de  $100 \mu\text{s}$  a una frecuencia de 0.3 Hz y la intensidad fue la necesaria para inducir una corriente cuya amplitud fuese de la mitad de la corriente máxima.

Con el objetivo de obtener información cuantificable de los trazos de corriente, al trazo promedio de cada célula registrada se le ajusto una recta en la región de activación para obtener un valor de pendiente  $m$ . Así como una doble exponencial en la región de desactivación para obtener los valores de las constantes de tiempo  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , correspondientes a los dos componentes de esta región. Se tomaron en cuenta para el promedio en cada condición solo aquellas con un valor de  $R^2$  ajustada superior al 0.97 **Figura 6**.



**Figura 6. Parámetros analizados en trazo promedio de corriente postsináptica excitatoria.** En azul se muestra el ajuste de una recta a la activación de la corriente. En rojo se muestra el ajuste de una doble exponencial a la desactivación de la corriente.

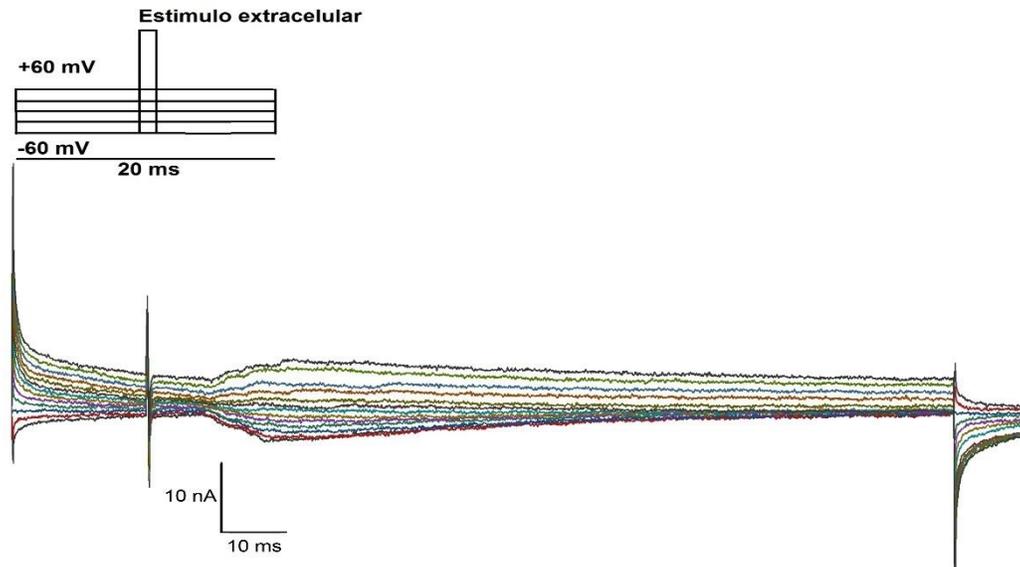
La eficiencia sináptica se delineó en las distintas condiciones experimentales empleadas, aplicando una serie de pulsos extracelulares de intensidad creciente (0-10 V) y se registraron las EPSCs resultantes (Figura 7). Las EPSCs obtenidas se utilizaron para graficar una curva entrada-salida, la cual relaciona las magnitudes de la intensidad del estímulo (V) y la corriente máxima producida con esa intensidad. A la relación lineal de estos elementos se ajustó una recta ( $y = a + b * x$ ) para conocer el valor de la pendiente  $m$ . Este valor de pendiente se utilizó como parámetro de la eficiencia sináptica porque refleja la tasa de cambio de la intensidad de la corriente máxima en función de la intensidad de la corriente.



**Figura 7. Protocolo de curva entrada/salida.** EPSCs representativas obtenidas mediante un protocolo de estimulación extracelular creciente de 0V a 10V en pasos de 1V.

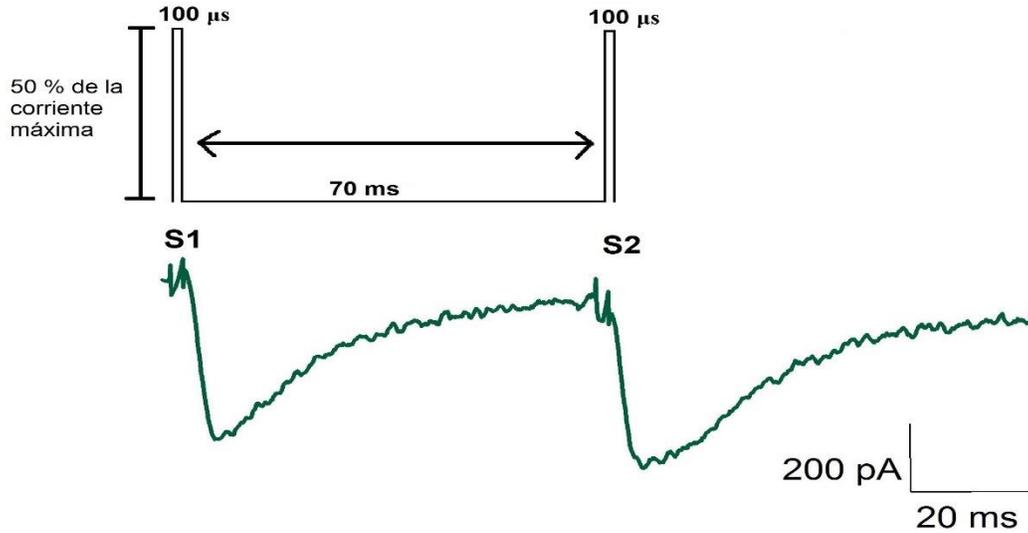
Para conocer el comportamiento de la corriente que depende del voltaje en las diferentes condiciones medidas se utilizó un protocolo de estimulación doble, uno intracelular con una duración de 20 ms e intensidad variable cuyo objetivo fue mantener y cambiar el potencial de membrana de +60 a -60mV en pasos de 10 mV. Después de 10 ms del inicio de este pulso intracelular se aplicó uno extracelular con una duración de 100  $\mu$ s e intensidad ajustada para producir una corriente cuya amplitud fuese la mitad de la corriente máxima. El objetivo de esta estimulación extracelular fue activar las sinapsis y registrar las corrientes resultantes a cada cambio de potencial de membrana. El protocolo utilizado se ejemplifica en la **Figura 8**.

Con base en las EPSCs obtenidas mediante este protocolo de curva I/V en cada condición, se obtuvo el índice de rectificación dividiendo el promedio de la corriente producida a +50 mV entre el promedio de la corriente producida a -50 mV (Seung *et al.*, 2009). El valor obtenido se utilizó como un parámetro de comparación entre la actividad de los receptores AMPA y los receptores NMDA. Se ha establecido que un índice de rectificación con valores superiores a 1 refleja una menor participación de los receptores AMPA (Randall *et al.*, 1990), mientras que un índice inferior a 1 está asociado a una menor actividad del receptor NMDA (Mayer y Westbrook, 1984).



**Figura 8. Protocolo de curva corriente/voltaje.** Se muestran los trazos de corriente representativos y el protocolo de estimulación empleado. Se utilizó un protocolo de estimulación doble, el estímulo intracelular tuvo una duración de 20 ms e intensidad variable para cambiar el potencial de membrana de +60 a -60 mV en pasos de 10 mV. Después de 10 ms del inicio de este estímulo intracelular se aplicó uno extracelular con una duración de 100  $\mu$ s e intensidad ajustada para producir una corriente cuya amplitud fuera de la mitad de la corriente máxima. El objetivo de esta estimulación extracelular fue activar las sinapsis y registrar las corrientes resultantes a cada cambio de potencial de membrana.

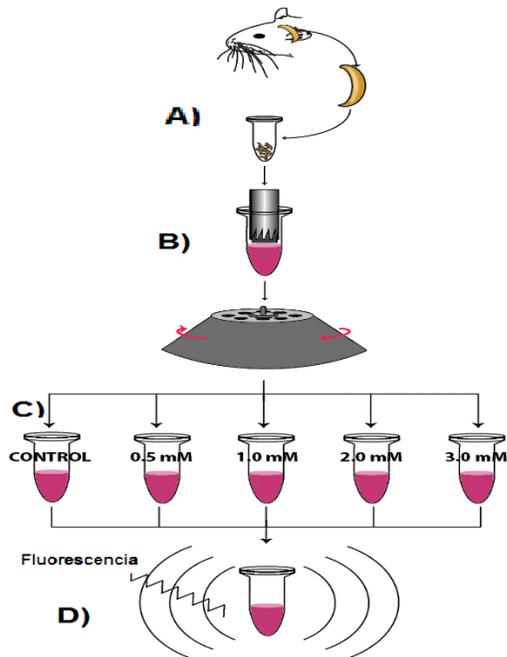
Para evaluar los efectos a nivel pre y/o postsináptico, se llevó a cabo un protocolo de facilitación por pulsos pareados (FPP); dicho protocolo se muestra en la **Figura 9**. Se aplicaron un par de pulsos de amplitud y duración idénticos (1-10 V, 100  $\mu$ s), separados por un intervalo constante de 70 ms. Cada par de pulsos se administró a una frecuencia de 0.1 Hz (10 s de latencia). Los cambios en la liberación se determinaron a partir del índice de facilitación, es decir, el cociente entre  $S_2/S_1$ .



**Figura 9. Protocolo de pulsos pareados.** Se aplicaron un par de pulsos de amplitud y duración idénticos (1-10 V, 100 μs), separados por un intervalo constante de 70 ms. Cada par de pulsos se administró a una frecuencia de 0.1 Hz.

### 5.3. Cuantificación del colesterol en la membrana

Se cuantificó el porcentaje de colesterol capturado en las membranas plasmáticas por la incubación con distintas concentraciones de MβCD mediante el *kit amplex red* (excitación a 560 y emisión a 590); siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El proceso en detalle se muestra en la **Figura 10**. Los resultados ayudaron a determinar la concentración ideal de MβCD utilizada en los registros electrofisiológicos.



**Figura 10. Método de cuantificación del colesterol en la membrana plasmática.**

- A)** Obtención del tejido. Se extrajo el tejido cerebral de 22 ratas, se removió el hipocampo y se congeló a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- B)** Obtención de la membrana. Se homogeneizó el tejido y se realizaron dos pasos de centrifugación para obtener la membrana plasmática.
- C)** Depleción del colesterol. Se incubaron las muestras con diferentes dosis de M $\beta$ CD por 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- D)** Cuantificación del colesterol. Se cuantificó el colesterol mediante el kit amplex red, basado en fluorescencia.

## 6. Análisis de datos

Para determinar la normalidad de los datos obtenidos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks. Para las condiciones requeridas se utilizó la prueba *t* de Student y para otras condiciones se calculó un ANDEVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey para evaluar las diferencias entre más de un par de condiciones experimentales. Los valores están expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Las gráficas y las pruebas estadísticas se realizaron mediante el uso programas Origin 8 y Prim 8 (Graphpad), respectivamente.

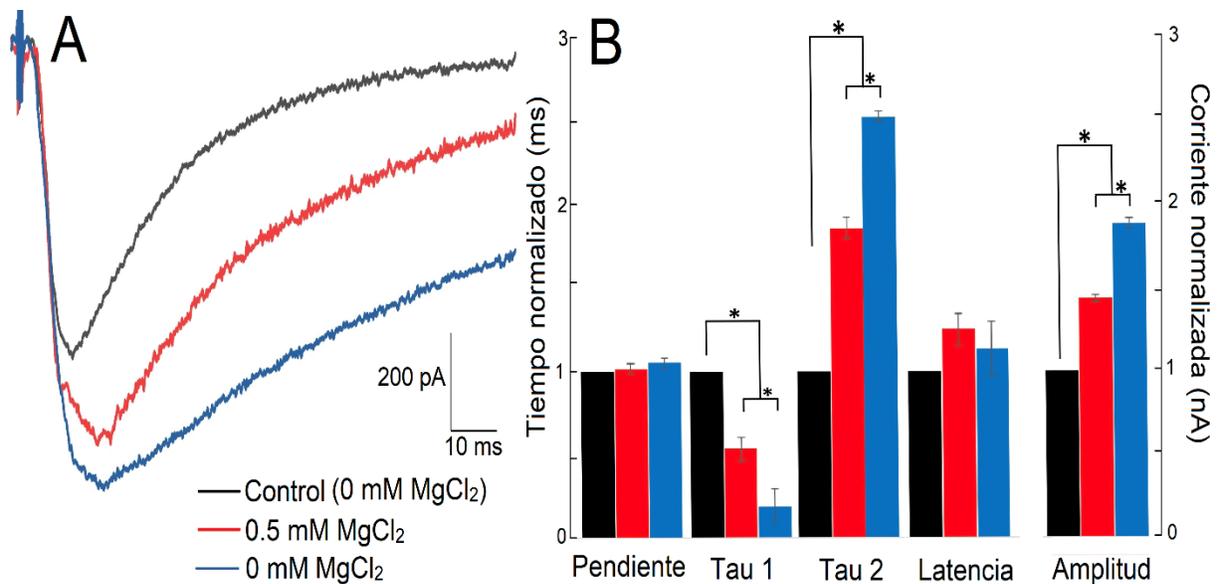
## 7. Resultados

### 7.1. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de CA1

Previo a abordar la pregunta de investigación planteada, se identificaron electrofisiológicamente las sinapsis glutamatérgicas en la región hipocampal de CA1. En estas sinapsis participan principalmente componentes relacionados con los receptores AMPA y NMDA.

Para caracterizar los componentes de las corrientes excitatorias vinculados con el receptor NMDA se realizaron registros en los que la variable independiente fue la concentración de  $MgCl_2$  en la solución extracelular. Esto con la finalidad de modificar el bloqueo de estos receptores por su antagonista endógeno, el  $Mg^{2+}$ . La **Figura 11** muestra los registros de las EPSCs con diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ . La disminución en su concentración generó un aumento en la amplitud de corriente ( $-0.67 \pm 0.01$  nA (Control) vs  $-0.83 \pm 0.05$  nA (0.5 mM) vs  $-0.92 \pm 0.1$  nA (0 mM),  $F_{(2, 15)} = 32.07$ ,  $p \leq 0.05$ ) y en el valor de tau 2 ( $24.1 \pm 3.1$  ms (Control) vs  $46.1 \pm 10.1$  ms (0.5 mM) vs  $66.6 \pm 5.1$  ms (0mM),  $F_{(2, 15)} = 58.75$ ,  $p \leq 0.05$ ). No se observaron cambios en la pendiente de activación ni en la latencia al pico.

Este resultado muestra que conforme disminuye la concentración de  $MgCl_2$  hay una mayor participación de los receptores NMDA. Esto se hace evidente en el aumento de la corriente y en la región de desactivación, en donde ocurrió una disminución del componente rápido (tau 1) y un aumento del componente lento (tau 2). Considerando que los tiempos de desactivación de los receptores AMPA son más rápidos que los tiempos de los receptores NMDA (Monyer *et al.*, 1992; Vicini *et al.*, 1998), los cambios en las constantes de tiempo señalan una mayor participación de los receptores NMDA conforme se va reduciendo la concentración de  $MgCl_2$  de la solución extracelular.



**Figura 11. La disminución de la concentración de MgCl<sub>2</sub> aumenta la participación de los receptores NMDA en la respuesta sináptica.** A) Promedio de las EPSCs obtenidas con 1 mM, 0.5 mM y 0 mM MgCl<sub>2</sub>. B) Se grafican los valores normalizados ± EEM de los valores medidos, n= 6 \*p ≤ 0.05.

La relación corriente-voltaje en estas condiciones (**Figura 12**) mostró un comportamiento no lineal en el registro control, debido a una menor cantidad de corriente a potenciales de membrana negativos. Esta corriente fue aumentando conforme el potencial se acercó a los -20 mV. En los registros con reducciones en la concentración de Mg<sup>2+</sup> el comportamiento de la corriente fue más lineal, principalmente a potenciales de membrana negativos, generando cambios en la pendiente de la curva que reflejan cambios en la conductancia.

Esto implicaría que en condiciones fisiológicas (~1 mM MgCl<sub>2</sub>) hay una mayor participación de los receptores AMPA, principalmente a potenciales de membrana negativos, ya que en estas condiciones los receptores NMDA se encuentran bloqueados por el Mg<sup>2+</sup>. Con la disminución de este ion del medio extracelular o con cambios del potencial de membrana a valores más positivos, la corriente activada por NMDA aumenta. Por esta razón los cambios en la curva I-V debido a la disminución de Mg<sup>2+</sup> no son tan notorios en potenciales positivos como sí lo son en potenciales de membrana negativos.

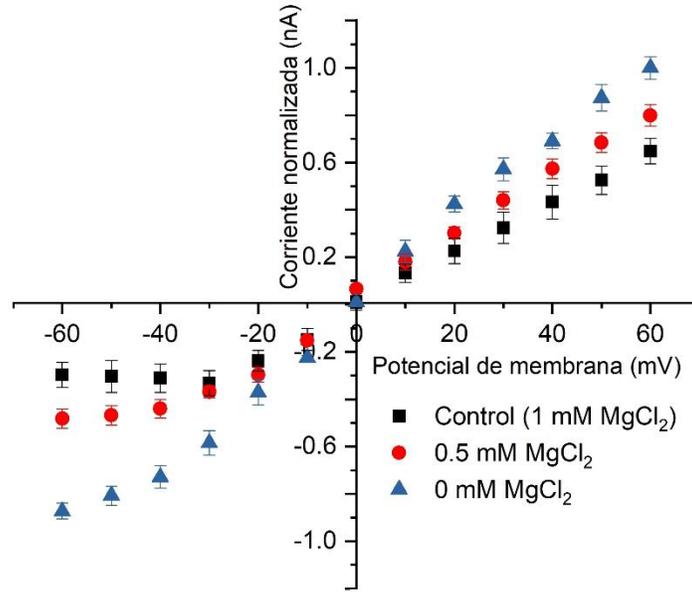


Figura 12. Curva I/V con variaciones en la concentración de MgCl<sub>2</sub> extracelular.

La disminución del MgCl<sub>2</sub> generó pendientes más pronunciadas en la curva entrada-salida ( $-0.06 \pm 0.02$  nA/V (Control) vs  $-0.14 \pm 0.01$  nA/V (0.5 mM) vs  $-0.2 \pm 0.01$  nA/V (0 mM),  $F(2, 15) = 83.75$ ,  $p \leq 0.05$ ) como se muestra en la **Figura 13**. Estos resultados sugieren un aumento en la eficiencia sináptica conforme la cantidad de MgCl<sub>2</sub> disminuye en el líquido extracelular. En estas condiciones la intensidad del estímulo que se requiere para producir determinada amplitud de corriente es cada vez menor, gracias a una mayor participación de receptores NMDA.

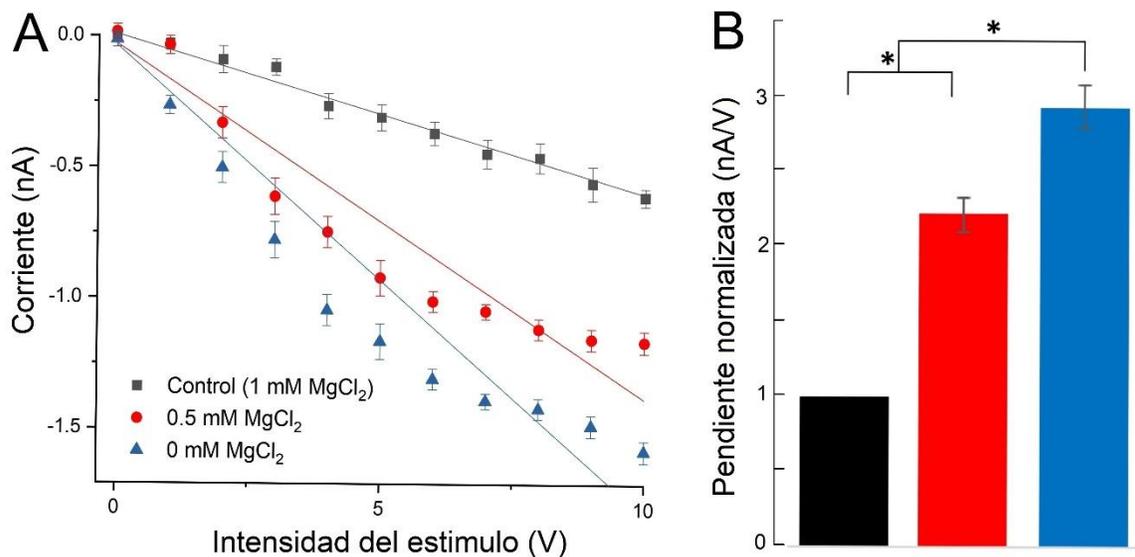
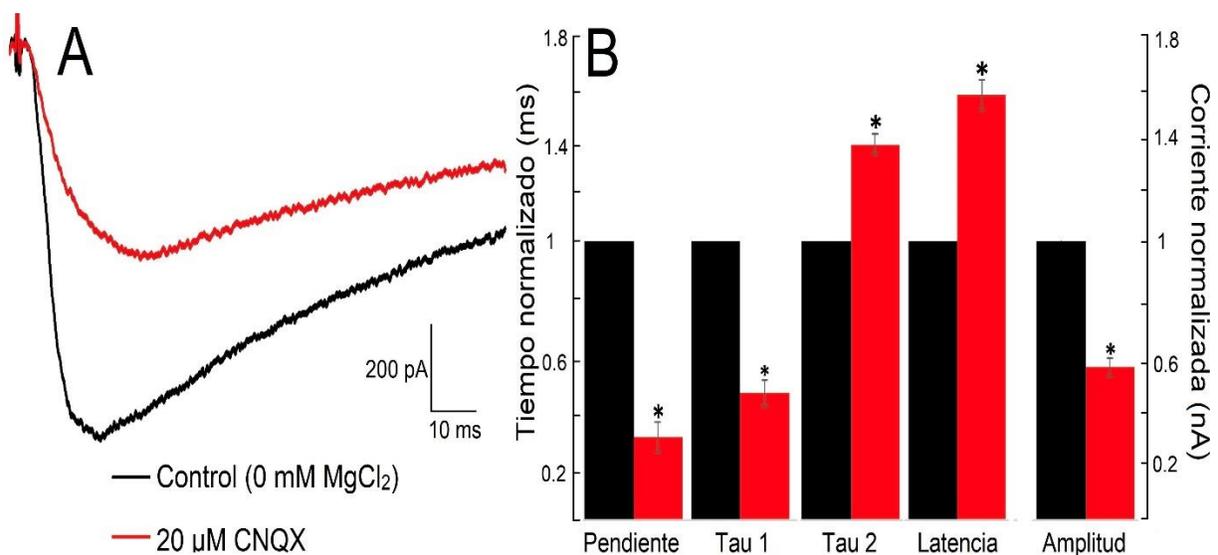


Figura 13. La disminución de MgCl<sub>2</sub> aumenta la eficiencia sináptica. **A)** Curva E/S obtenida con diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> extracelular. **B)** Cambios en la pendiente. Datos expresados en media  $\pm$  EEM,  $n = 6$ ,  $*p \leq 0.05$ .

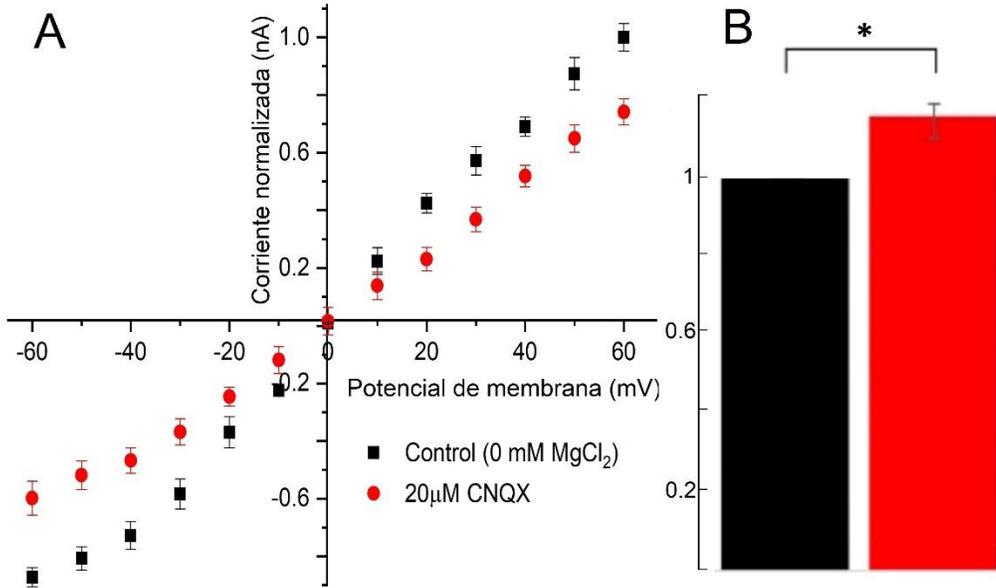
Con la intención de disecar los componentes de las sinapsis glutamatergicas mediadas por los receptores AMPA y NMDA se llevaron a cabo experimentos con la administración de 20  $\mu$ M CNQX, antagonista selectivo de los receptores AMPA, y en condiciones control con 0 mM  $MgCl_2$

Puede apreciarse en la **Figura 14** que el CNQX provocó una disminución en la amplitud de la corriente, un aumento en la latencia al pico y cambios en la activación y desactivación de la corriente. El análisis cuantitativo mostró una diferencia significativa en todos los parámetros analizados, siendo de principal interés los cambios que resaltan las características cinéticas lentas de los receptores NMDA como los ocurridos en la pendiente ( $-0.114 \pm 0.03$  (Control) vs  $-0.034 \pm 0.05$  (CNQX),  $t_{(10)} = 3.1$ ,  $p \leq 0.05$ ), en la latencia al pico ( $17.7 \pm 0.02$  ms (Control) vs  $26.95 \pm 0.04$  ms (CNQX),  $t_{(10)} = 461.3$ ,  $p \leq 0.05$ ) y en la tau 2 ( $66.6 \pm 5.1$  ms (Control) vs  $80.4 \pm 3$  ms (CNQX),  $t_{(10)} = 9.5$ ,  $p \leq 0.05$ ).



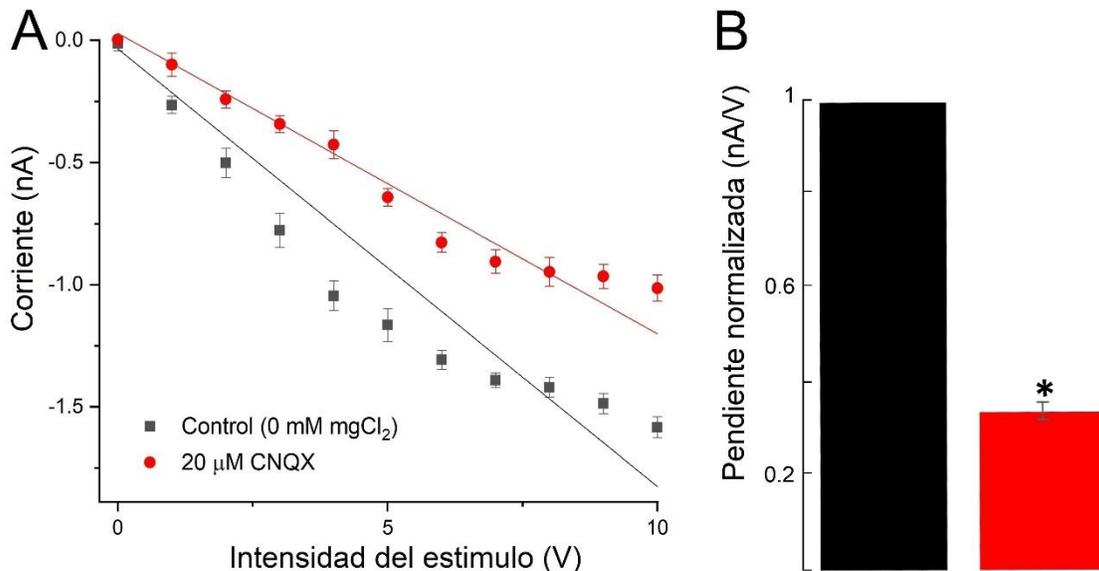
**Figura 14. Componentes de las EPSCs mediados por los receptores NMDA. A)** Promedio de las EPSCs obtenidas con 0 mM  $MgCl_2$  y 20  $\mu$ M CNQX. **B)** Se grafican los valores normalizados  $\pm$  EEM de los valores medidos,  $n = 6$  \* $p \leq 0.05$ .

La relación corriente-voltaje mostró que el antagonista de AMPA provocó una disminución en las corrientes generadas en cada potencial de membrana, principalmente a potenciales de membrana negativos (**Figura 15**). El índice de rectificación en la condición con CNQX fue mayor que en la condición control ( $-1.16 \pm 0.04$  (Control) vs  $-1.25 \pm 0.03$  (CNQX),  $t_{(10)} = 4.02$ ,  $p \leq 0.05$ ), lo que denota una disminución en la actividad de los receptores AMPA en estas sinapsis (Randall *et al.*, 1990).



**Figura 15. CNQX produce una disminución de corrientes principalmente a potenciales de membrana negativos. A)** Curva I/V obtenida con 0 mM MgCl<sub>2</sub> y 20 μM CNQX. **B)** Cambios en el índice de rectificación. Se grafican los valores normalizados ± EEM, n= 6 \**p* ≤ 0.05.

En la **Figura 16** podemos observar un cambio en la curva entrada-salida con CNQX ( $-0.2 \pm 0.01$  nA/V (Control) vs  $-0.06 \pm 0.001$  nA/V (CNQX),  $t_{(10)}=22.23$ ,  $p \leq 0.05$ ). Esta disminución en la eficiencia sináptica podría deberse a una disminución en la cantidad de receptores AMPA capaces de responder a la estimulación.



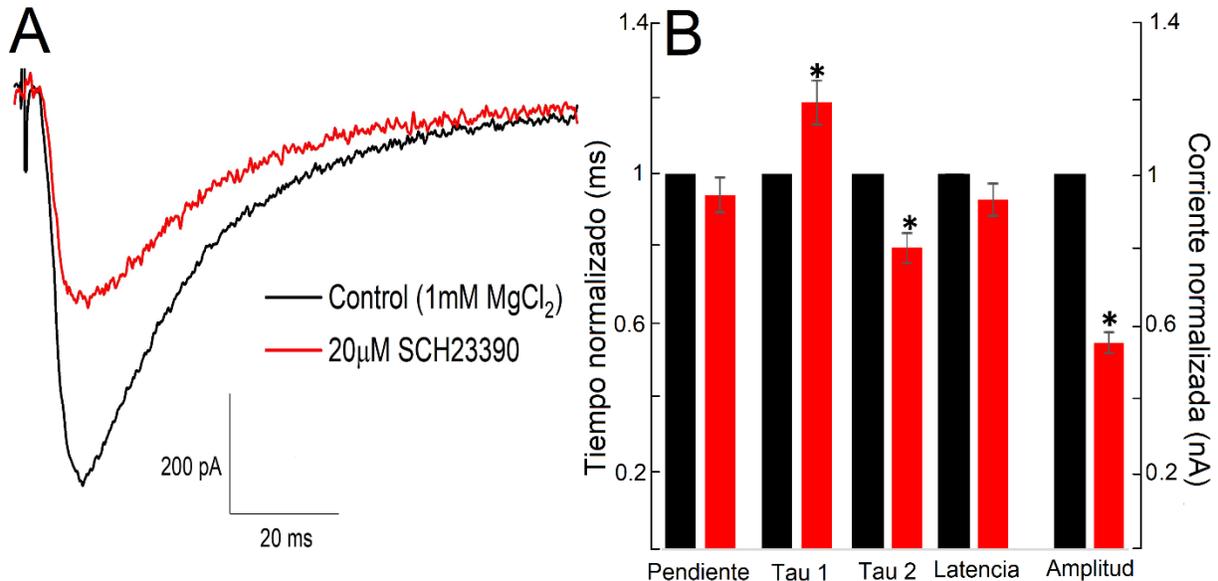
**Figura 16. CNQX produce una disminución en la eficiencia sináptica. A)** Curva E/S obtenida con 0 mM MgCl<sub>2</sub> y 20 μM CNQX **B)** Cambios en la pendiente. Se grafican los valores normalizados ± EEM, n= 6 \**p* ≤ 0.05.

## 7.2. Modulación dopaminérgica de las sinapsis glutamatérgicas

Una vez identificados los componentes de las sinapsis a estudiar, particularmente de los receptores NMDA, se continuó con el estudio de la modulación dopaminérgica en estas sinapsis. Para cumplir con este objetivo se realizaron experimentos con la aplicación de 20  $\mu$ M SCH23390, el cual es un antagonista selectivo de los receptores D<sub>1</sub>.

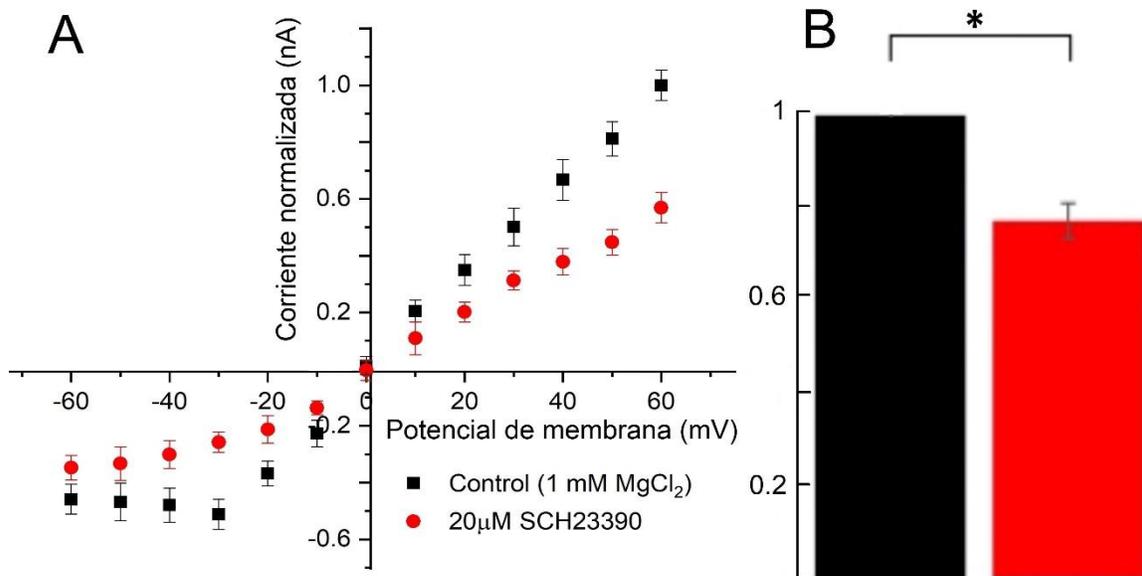
Las EPSCs registradas en presencia de SCH23390 tuvieron una menor amplitud ( $-0.67 \pm 0.01$  nA (Control) vs  $-0.36 \pm 0.08$  nA (SCH),  $t_{(10)}=8.66$ ,  $p \leq 0.05$ ), y cambios en tau 2 ( $24.1 \pm 3.1$  ms (Control) vs  $19.1 \pm 2.2$  ms (SCH),  $t_{(10)}=3.30$ ,  $p \leq 0.05$ ) haciéndolo más rápido este componente en comparación con el control. Ni el valor de la pendiente en la región de activación ni la latencia al pico máximo de corriente mostraron cambios (**Figura 17**).

Estos resultados y los descritos previamente con CNQX, permiten afirmar que la aplicación del antagonista de D<sub>1</sub> tiene un efecto principalmente en los componentes mediados por los receptores NMDA. Esto debido a que los cambios más importantes ocurren en la desactivación de la corriente, es decir, un aumento en el componente rápido (tau 1) y una disminución en el componente lento (tau 2). Sugiriendo una menor participación de los receptores NMDA. Así la disminución en la amplitud de la corriente probablemente se deba a cambios en el receptor NMDA generados por la reducción en la actividad del receptor de tipo D<sub>1</sub>.



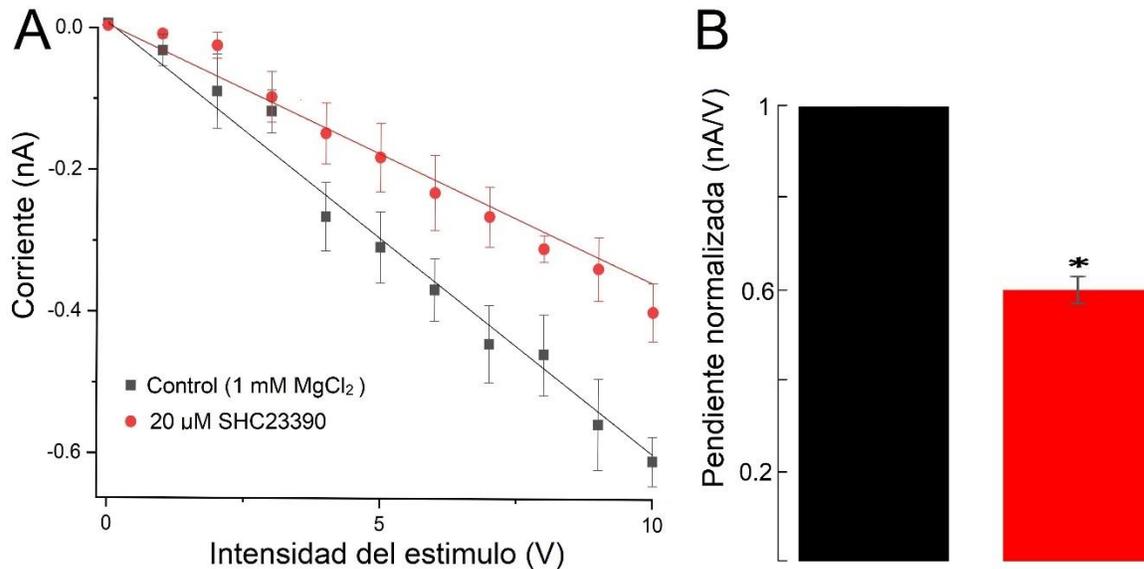
**Figura 17. SCH23390 afecta los componentes de las EPSCs mediados por NMDA. A)** Promedio de las EPSCs obtenidas con 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 20  $\mu$ M SCH23390. **B)** Se grafican los valores normalizados  $\pm$  EEM de los valores medidos, n= 6 \* $p \leq 0.05$ .

La aplicación de SCH23390 (**Figura 18**) produjo un comportamiento más lineal con respecto al control en la curva I-V, con disminuciones en las corrientes predominantemente a potenciales de membrana positivos; como consecuencia el índice de rectificación disminuyó con respecto al control ( $-1.74 \pm 0.03$  (Control) vs  $-1.34 \pm 0.04$  (SCH23390),  $t_{(10)}=18.40$ ,  $p \leq 0.05$ ). De tal manera que el cambio en la pendiente de la curva observado podría manifestar una disminución en la conductancia de los canales NMDA (Mayer y Westbrook, 1984).



**Figura 18. SCH23390 genera una disminución de las corrientes principalmente a potenciales de membrana positivos A)** Curva I/V obtenida con 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 20 μM SCH23390. **B)** Cambios en el índice de rectificación. Se grafican los valores normalizados  $\pm$  EEM,  $n=6$  \* $p \leq 0.05$ .

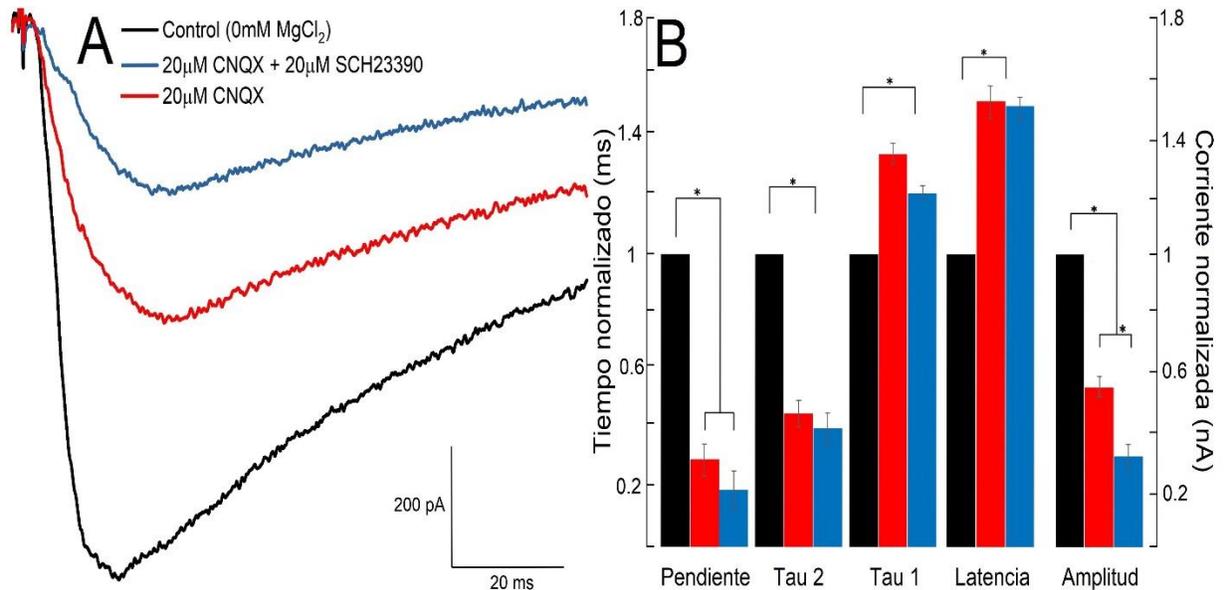
La baja en la actividad de los receptores D<sub>1</sub> por medio de SCH23390 también generó cambios en la pendiente de la curva entrada-salida (**Figura 19**) ( $-0.06 \pm 0.02$  nA/V (Control) vs  $-0.04 \pm 0.02$  nA/V (SCH),  $t_{(10)}=2.4$ ,  $p \leq 0.05$ ). Estos resultados sugieren que el cambio en la eficiencia sináptica es originado por una disminución en la actividad de los receptores NMDA, producidos por la reducción en la actividad de los receptores de tipo D<sub>1</sub>.



**Figura 19. SCH23390 produce una disminución en la eficiencia sináptica. A)** Curva E/S obtenida con 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 20 μM SCH23390 **B)** Cambios en la pendiente. Se grafican los valores normalizados ±EEM, n= 6 \**p* ≤ 0.05.

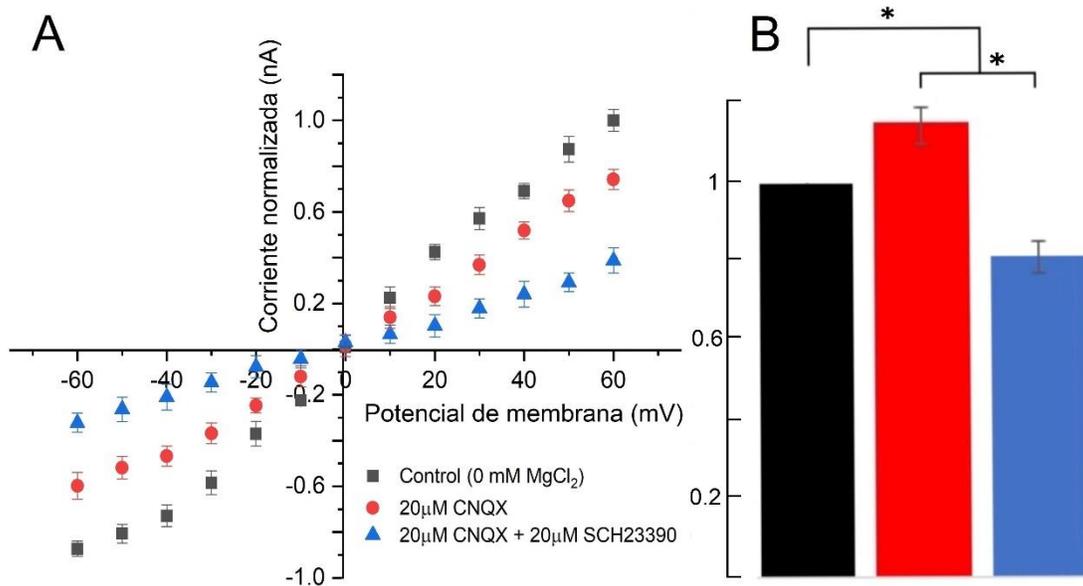
Para comprobar que los efectos observados tras la aplicación de SCH23390 son sobre los receptores NMDA, se llevaron a cabo registros en los que se añadió 20 μM SCH23390 y 20 μM CNQX en la solución de registro. El objetivo fue aislar e identificar los cambios en el receptor NMDA en ausencia de los componentes relacionados con AMPA.

Los registros de las EPSCs en estas condiciones (**Figura 20**) mostraron una disminución en la amplitud de la corriente ( $-0.92 \pm 0.1$  nA (Control) vs  $-0.50 \pm 0.1$  nA (CNQX) vs  $-0.28 \pm 0.05$  nA (CNQX y SCH),  $F_{(2, 15)} = 128.5$ ,  $p \leq 0.05$ ) y cambios en la tau 2 ( $66.6 \pm 5.1$  ms (Control) vs  $80.4 \pm 3$  ms (CNQX) vs  $73.1 \pm 2.1$  ms (CNQX y SCH),  $F_{(2, 15)} = 23.56$ ,  $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias importantes en la región de activación, ni en latencia al pico de corriente máxima de las EPSCs con SCH23390 + CNQX en comparación con el registro con CNQX.



**Figura 20. Efecto de SCH23390 en las EPSCs en ausencia del componente mediado por AMPA. A)** Promedio de EPSCs con 0 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µM CNQX y 20 µM SCH23390. **B)** Se grafican los valores normalizados ± EEM de los valores medidos, n= 6 \*p ≤ 0.05.

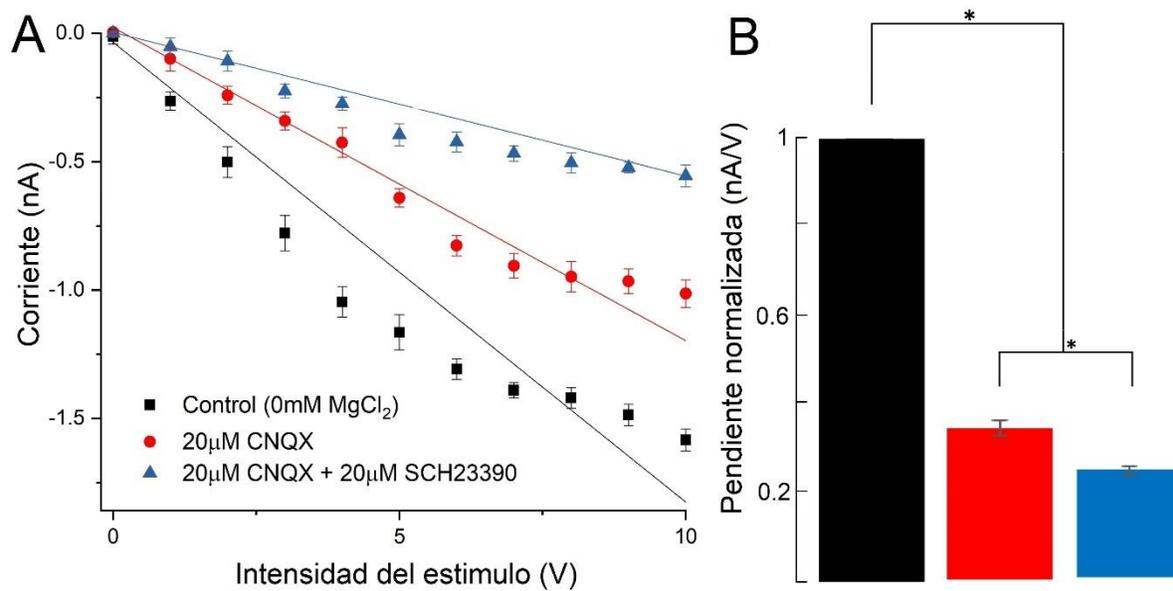
De la misma manera, en la relación corriente-voltaje se encontró una disminución más pronunciada en la amplitud de la corriente en cada potencial de membrana con la aplicación de CNQX y SCH23390 en comparación con la aplicación solo de CNQX y el control (**Figura 21**). El índice de rectificación aumentó con la aplicación de CNQX como se describió previamente. No obstante, con la aplicación de CNQX y SCH23390 el índice de rectificación disminuyó con respecto al valor de CNQX ( $-1.16 \pm 0.04$  (Control) vs  $-1.25 \pm 0.03$  (CNQX) vs  $-1.11 \pm 0.01$  (CNQX + SCH23390),  $F_{(2, 15)} = 28.31$ ,  $p \leq 0.05$ ). Esto implicaría un mayor efecto de SCH23390 sobre los receptores NMDA, de no ser así, el índice tendría un valor superior al asociado a CNQX cuando se aplica junto con SCH23390, mostrando una mayor participación de NMDA por afectación del componente AMPA (Randall *et al.*, 1990).



**Figura 21. La aplicación de CNQX enfatiza el efecto de SCH23390 sobre la corriente a potenciales de membrana positivos. A)** Curva I/V obtenida con 0 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 μM CNQX y 20 μM CNQX + 20 μM SCH23390. **B)** Cambios en el índice de rectificación. Se grafican los valores normalizados ± EEM, n= 6 \**p* ≤ 0.05.

La curva entrada-salida obtenida en estas condiciones (**Figura 22**) mostró una disminución en el valor de la pendiente en la condición de CNQX y SCH23390, en comparación con solo CNQX y control ( $-0.2 \pm 0.01$  nA/V (Control) vs  $-0.06 \pm 0.001$  nA/V (CNQX) vs  $-0.04 \pm 0.004$  nA/V (CNQX + SCH),  $F_{(2, 15)} = 526.5$ ,  $p \leq 0.05$ ).

Considerando este resultado y los descritos anteriormente podemos afirmar que este cambio en la eficiencia sináptica es debido a una disminución en la actividad de los receptores NMDA. Si SCH23390 tuviera un efecto sobre AMPA, la disminución en la eficiencia sináptica sería menor a la observada, considerando que el antagonista de AMPA no tenga un efecto en la totalidad de receptores.



**Figura 22. SCH23390 genera una disminución en la eficiencia sináptica en ausencia del componente mediado por AMPA. A)** Curva E/S obtenida con 0 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µM CNQX y 20 µM SCH23390. **B)** Cambios en la pendiente. Se grafican los valores normalizados ±EEM, n= 6  
\**p* ≤ 0.05.

### 7.3. Efecto de la perturbación de las balsas lipídicas en las sinapsis glutamatérgicas

Una vez identificada la interacción funcional entre los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos en la sinapsis de CA1, se estudió el efecto de la perturbación de las balsas lipídicas en la respuesta glutamatérgica, principalmente sus efectos en la actividad de los receptores NMDA.

Previo al registro electrofisiológico en estas condiciones, se comprobó el efecto de la M $\beta$ CD sobre el colesterol de las balsas lipídicas. Se hizo mediante un experimento en el que, se cuantificaron los cambios en la concentración de colesterol en la membrana plasmática de las neuronas del hipocampo incubadas con M $\beta$ CD.

Los resultados descritos en la Figura 23, demuestran que la M $\beta$ CD disminuye la concentración de colesterol de la membrana plasmática de neuronas del hipocampo de forma dependiente de la concentración. Con base en este resultado, podemos decir que la M $\beta$ CD sí captura el colesterol, el cual representa el elemento principal de las balsas lipídicas.

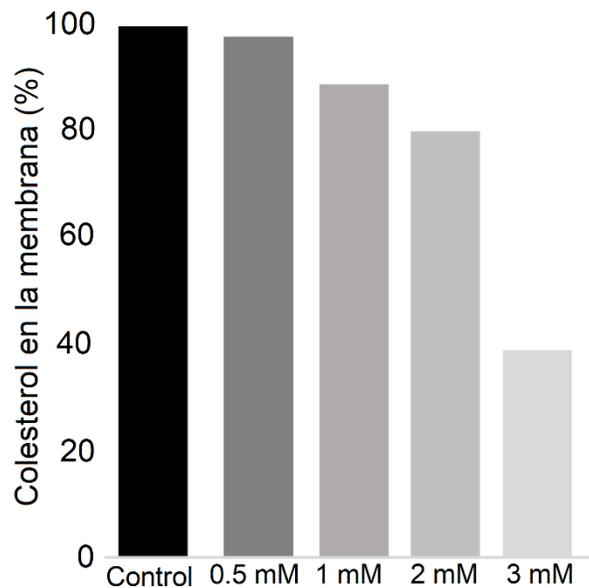
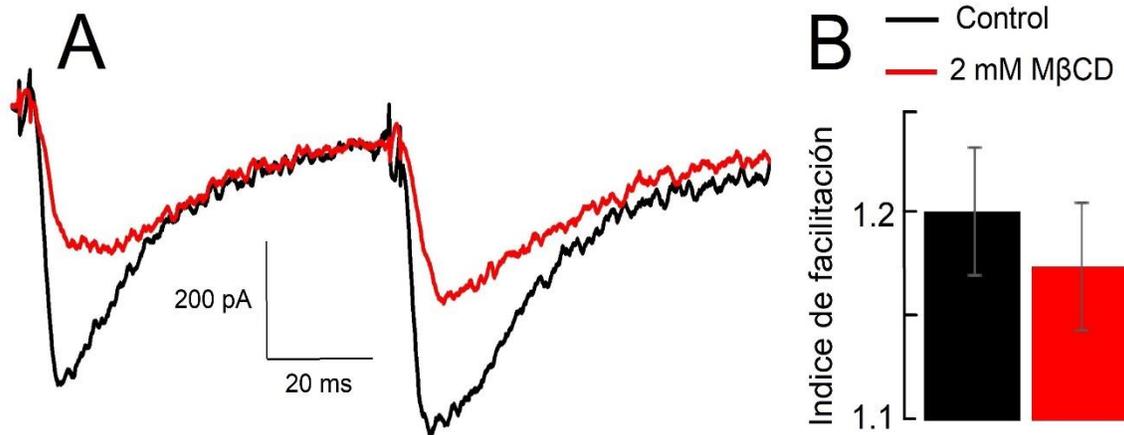


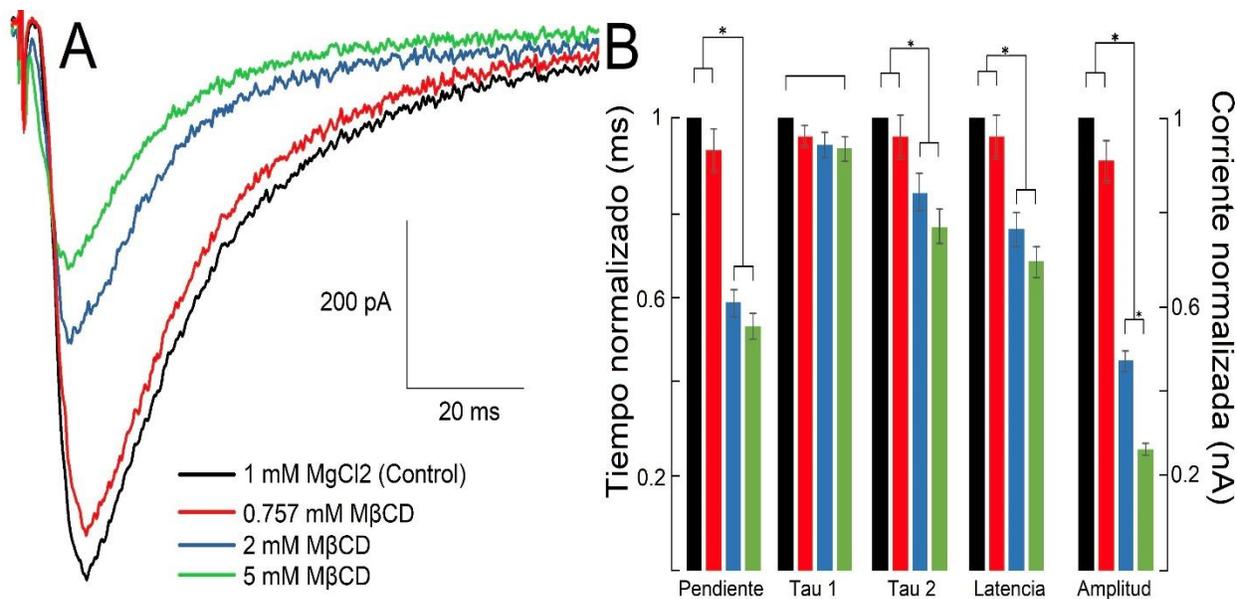
Figura 23. La M $\beta$ CD disminuye la concentración de colesterol de forma dependiente de la concentración.

Con la finalidad de averiguar si la M $\beta$ CD tiene un efecto a nivel presináptico, se realizaron experimentos utilizando un protocolo de facilitación por pulsos pareados. Como resultado de este, en la **Figura 24** se puede apreciar un aumento en S2 con relación a S1 tanto en la condición control (1 mM MgCl<sub>2</sub>) como en la de incubación con 2 mM de M $\beta$ CB. Ambas condiciones tuvieron un índice de facilitación superior a 1 y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Indicando que, los efectos de la M $\beta$ CB estarían asociados a cambios a nivel postsináptico más que a presináptico.



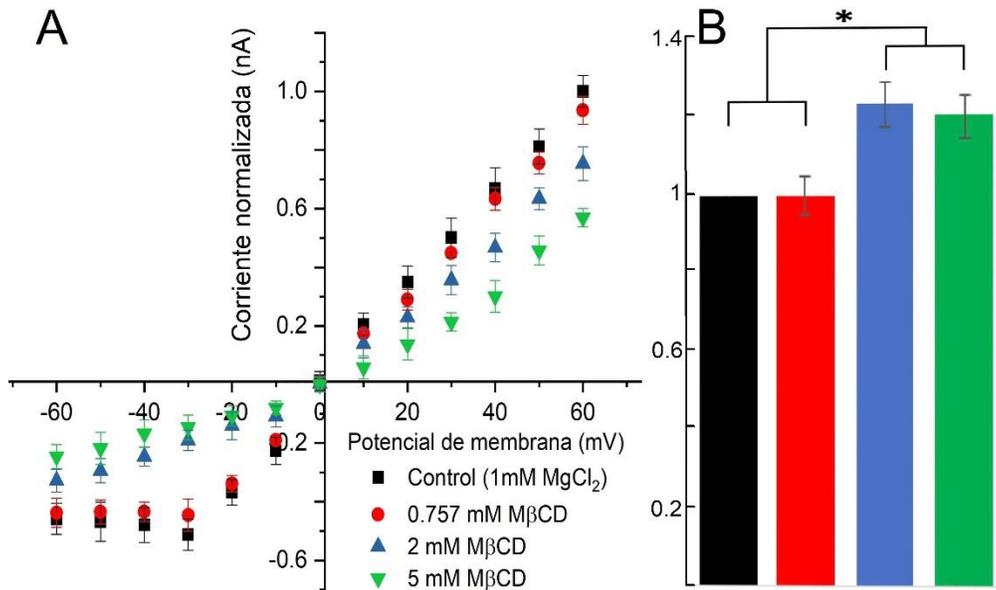
**Figura 24. La M $\beta$ CB ejerce sus efectos a nivel postsináptico. A)** EPSC asociadas a S1 y S2 en las condiciones control y 2 mM M $\beta$ CB. **B)** Cambios en el índice de facilitación. Valores expresados en media  $\pm$  EEM de los valores medidos, n=6.

Posteriormente, se realizaron experimentos en los que las rebanadas de cerebro se incubaron durante un mínimo de 2 h a 37 °C, con distintas concentraciones de M $\beta$ CD. Posteriormente se realizaron los registros electrofisiológicos. En la **Figura 25** se ilustran los cambios que ocurren en las EPSCs, entre los que es importante resaltar aquellos que ocurren en el componente lento de la desactivación de la corriente entre las concentraciones altas y bajas de M $\beta$ CD ( $24.1 \pm 3.1$  ms (Control) vs  $23.1 \pm 2.1$  ms (0.757 mM) vs  $17.1 \pm 2.1$  ms (2 mM) vs  $14.1 \pm 1.2$  ms (5 mM),  $F_{(3, 20)} = 27.22$ ,  $p \leq 0.05$ ) y en la latencia al pico de la corriente ( $12.4 \pm 0.3$  ms (Control) vs  $12.5 \pm 0.4$  ms (0.757 mM) vs  $10 \pm 0.1$  ms (2 mM) vs  $9.3 \pm 0.6$  ms (5 mM),  $F_{(3, 20)} = 120.1$ ,  $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, no se encontraron cambios entre el control y 0.757 mM de M $\beta$ CD ni entre 2 mM ni 5 mM de M $\beta$ CD. Estos resultados sugieren que la depleción del colesterol de las balsas lipídicas afecta a los dos componentes de estas EPSCs, de acuerdo con los parámetros establecidos previamente.



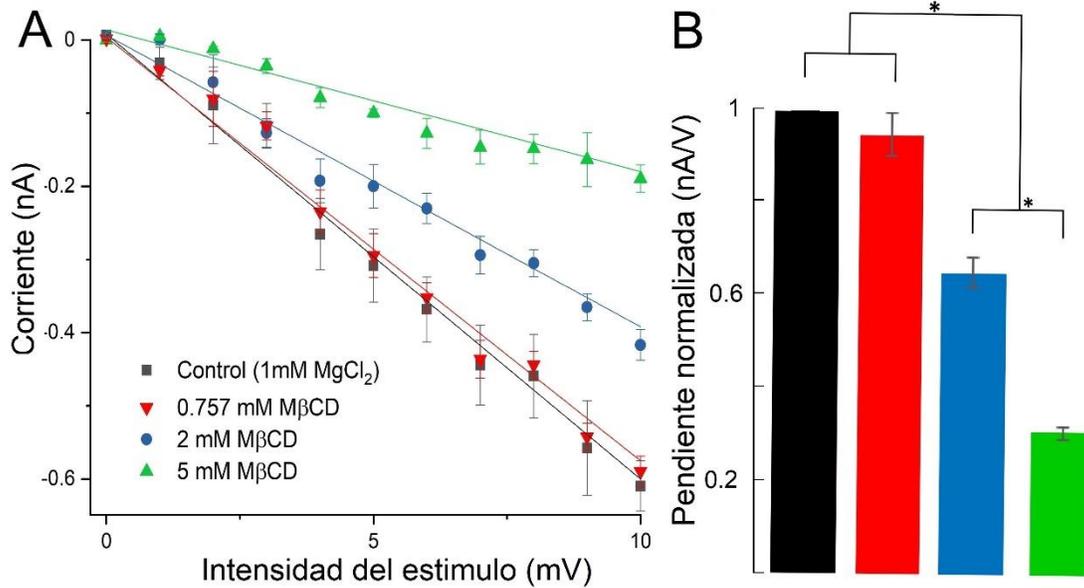
**Figura 25. La MβCD afecta a los dos componentes principales de las EPSCs. A)** Promedio de las EPSCs obtenidas con 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.757, 2 y 5 mM MβCD. **B)** Se grafican los valores normalizados ± EEM de los valores medidos, n=6 \**p* ≤ 0.05.

La incubación de las rebanadas con 0.757 mM no generó cambios importantes en la relación corriente-voltaje, como sí lo generaron las concentraciones de 2 y 5 mM de MβCD (**Figura 26**). Con estas concentraciones se observa un comportamiento más lineal, así como disminuciones de las corrientes sobre todo a potenciales negativos. Por esta razón, su índice de rectificación aumentó significativamente con respecto al control ( $-1.74 \pm 0.03$  (Control) vs  $-1.76 \pm 0.02$  (0.757 mM) vs  $-2.16 \pm 0.04$  (2mM) vs  $-2.1 \pm 0.1$  (5 mM),  $F_{(3, 20)} = 98.73$ ,  $p \leq 0.05$ ). Además, se generó un cambio en la pendiente de esta curva con estas concentraciones de MβCD, lo que sugiere un cambio en la conductancia de los receptores AMPA y NMDA. Sin embargo, el aumento del índice de rectificación muestra una mayor afectación del componente rápido de estas sinapsis.



**Figura 26. La MβCD genera una mayor disminución de la corriente a potenciales de membrana negativos. A)** Curva I/V obtenida en con 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.757, 2 y 5 mM MβCD en cada potencial de membrana. **B)** Cambios en el índice de rectificación. Se grafican los valores normalizados ± EEM, n= 6 \**p* ≤ 0.05.

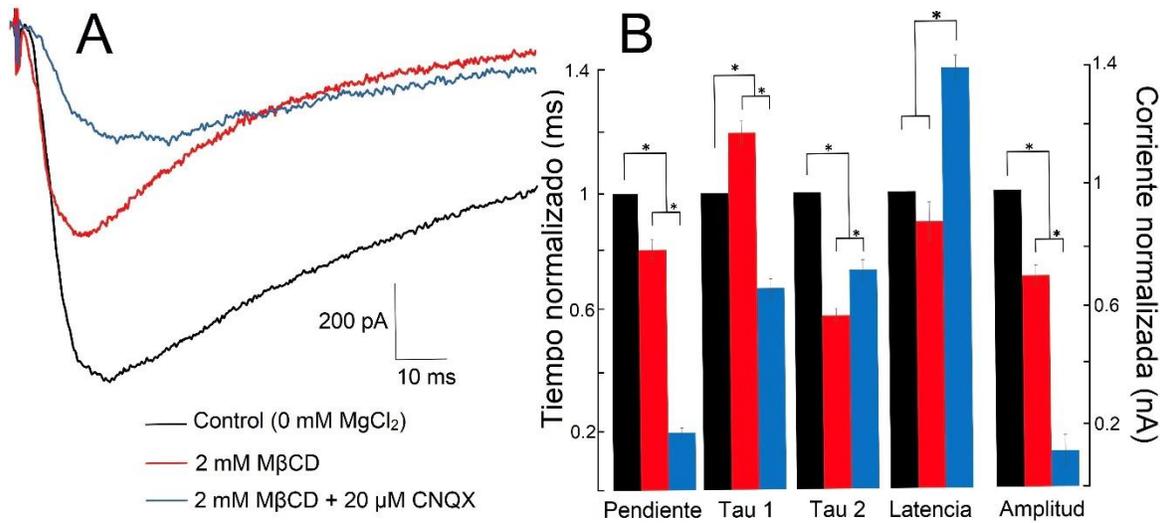
La perturbación de las balsas lipídicas también provocó cambios en la eficiencia sináptica, como se puede notar en la **Figura 27**. La incubación de las rebanadas con 2 y 5 mM de MβCD generó una reducción en el valor de la pendiente de la recta ajustada, en comparación con 0.757 mM y el grupo control ( $-0.06 \pm 0.02$  nA/V (Control) vs  $-0.06 \pm 0.002$  nA/V (0.757 mM) vs  $-0.04 \pm 0.002$  nA/V (2 mM) vs  $-0.02 \pm 0.008$  nA/V (5 mM),  $F_{(3, 20)} = 18.54$ ,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 27. MβCD genera una disminución en la eficiencia sináptica. A)** Curva E/S obtenida con 0.757 mM, 2 mM y 5 mM MβCD. **B)** Cambios en la pendiente. Se grafican los valores normalizados  $\pm$  EEM,  $n = 6$  \* $p \leq 0.05$ .

Por lo observado en éste y en los otros protocolos utilizados, se puede considerar que la perturbación de las balsas lipídicas afecta la eficiencia sináptica por medio de alteraciones en los dos componentes de las sinapsis. Estos se ven afectados con la incubación con MβCD, por lo que se realizaron los mismos experimentos, pero ahora añadiendo CNQX para disminuir el componente de AMPA e identificar mejor el efecto de la perturbación de las balsas lipídicas sobre NMDA. En los resultados previos se encontró que una concentración de 2 mM de MβCD genera diferencias significativas con respecto al control, por lo que se utilizó esta concentración en los experimentos posteriores.

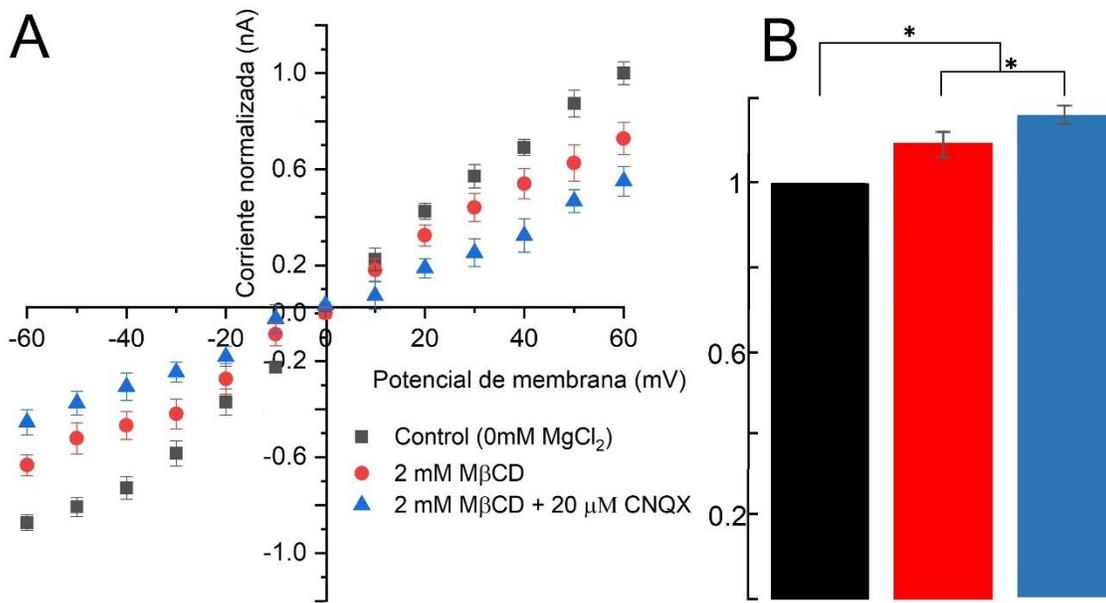
Las EPSCs registradas en estas condiciones mostraron (**Figura 28**) cambios principalmente en la amplitud de la corriente ( $-0.92 \pm 0.1$  nA (Control) vs  $-0.54 \pm 0.6$  nA (MβCD) vs  $-0.31 \pm 0.1$  nA (MβCD + CNQX),  $F_{(2, 15)} = 88.51$ ,  $p \leq 0.05$ ), en la latencia al pico ( $18.8 \pm 1.3$  ms (Control) vs  $15.3 \pm 4$  ms (MβCD) vs  $26.7 \pm 3$  ms (MβCD + CNQX),  $F_{(2, 15)} = 24.74$ ,  $p \leq 0.05$ ) y en la Tau 2 ( $66.6 \pm 5.1$  ms (Control) vs  $37.1 \pm 3.6$  ms (MβCD) vs  $55.7 \pm 4.5$  ms (MβCD + CNQX),  $F_{(2, 15)} = 66.87$ ,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 28. Los componentes de las EPSCs mediados por NMDA se conservan con la depleción de las balsas lipídicas. A)** Promedio de las EPSCs obtenidas con 0 mM MgCl<sub>2</sub> (Control), 2 mM MβCD y 2 mM MβCD + 20 μM CNQX. **B)** Se grafican los valores normalizados ± EEM de los valores medidos, n= 6 \**p* ≤ 0.05.

Resultados similares se obtuvieron con el protocolo de para obtener una curva I-V. En la **Figura 29** se puede advertir una disminución en la corriente asociada a cada potencial de membrana en las dos condiciones con respecto al control, principalmente en potenciales de membrana hiperpolarizantes. Esto generó un aumento en el índice de rectificación con respecto al control en las dos condiciones, sobre todo con la aplicación del antagonista ( $-1.16 \pm 0.04$  (Control) vs  $-1.21 \pm 0.03$  (MβCD) vs  $-1.3 \pm 0.03$  (MβCD + CNQX),  $F_{(2,15)} = 14.4$ ,  $p \leq 0.05$ ).

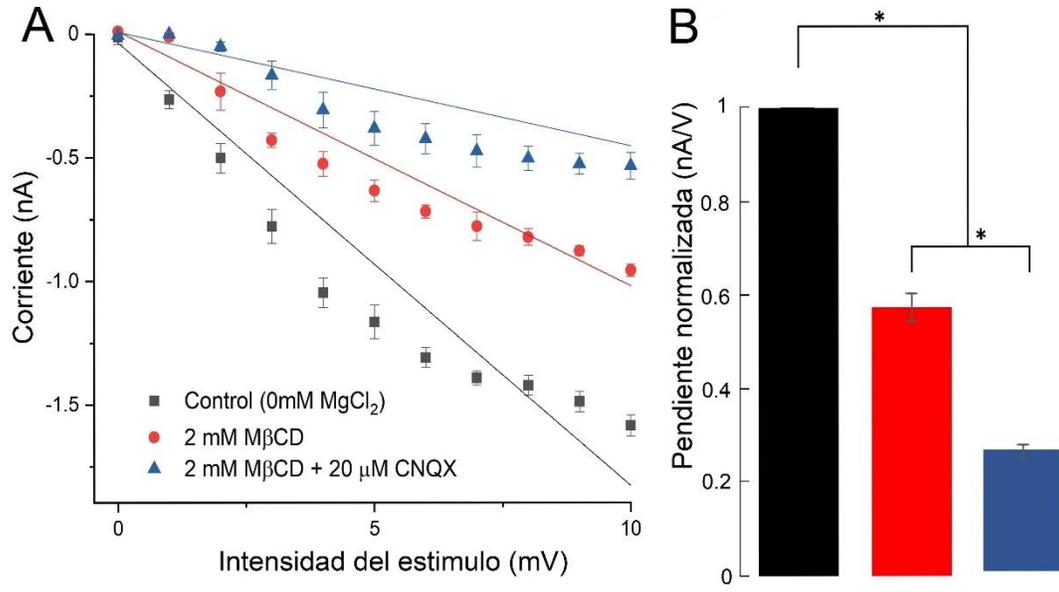
El aumento en el índice con MβCD sugiere que hay una menor participación de los receptores AMPA. Sin embargo, este agente no sólo afecta a este componente porque cuando se aplica el antagonista se observa un efecto similar. Por lo que en primera instancia la MβCD afecta a los receptores AMPA, pero también a los receptores NMDA. De otra forma la aplicación del antagonista de AMPA no tendría un efecto importante en estos receptores, considerando aún que el antagonista tenga un efecto en la totalidad de receptores.



**Figura 29. La MβCD acentúa la disminución de la corriente a potenciales de membrana negativos generada por CNQX. A)** Curva I/V obtenida con 0 mM MgCl<sub>2</sub> (Control), 2 mM MβCD y 2 mM MβCD + 20 μM CNQX. **B)** Cambios en el índice de rectificación. Se grafican media ± EEM, n= 6 \**p* ≤ 0.05.

La **Figura 30** muestra una disminución en la pendiente de la curva entrada-salida con la aplicación del antagonista en comparación con solo MβCD ( $-0.2 \pm 0.01$  nA/V (Control) vs  $-0.10 \pm 0.02$  nA/V (MβCD) vs  $-0.05 \pm 0.04$  nA/V (MβCD + CNQX),  $F_{(2, 15)} = 35.1, p \leq 0.05$ ).

Con base en estos resultados se puede concluir que la perturbación de las balsas lipídicas producidas por la MβCD genera alteraciones en los componentes lentos mediados por el receptor NMDA y en los rápidos mediados por AMPA. Sin embargo, dado los cambios que produce la MβCD en la pendiente de activación, aunado a los cambios en la región de desactivación en las EPSCs y a los datos mostrados en el índice de rectificación se puede mencionar que el primer elemento que se ve afectado con la alteración de las balsas lipídicas es el componente rápido activado por AMPA.

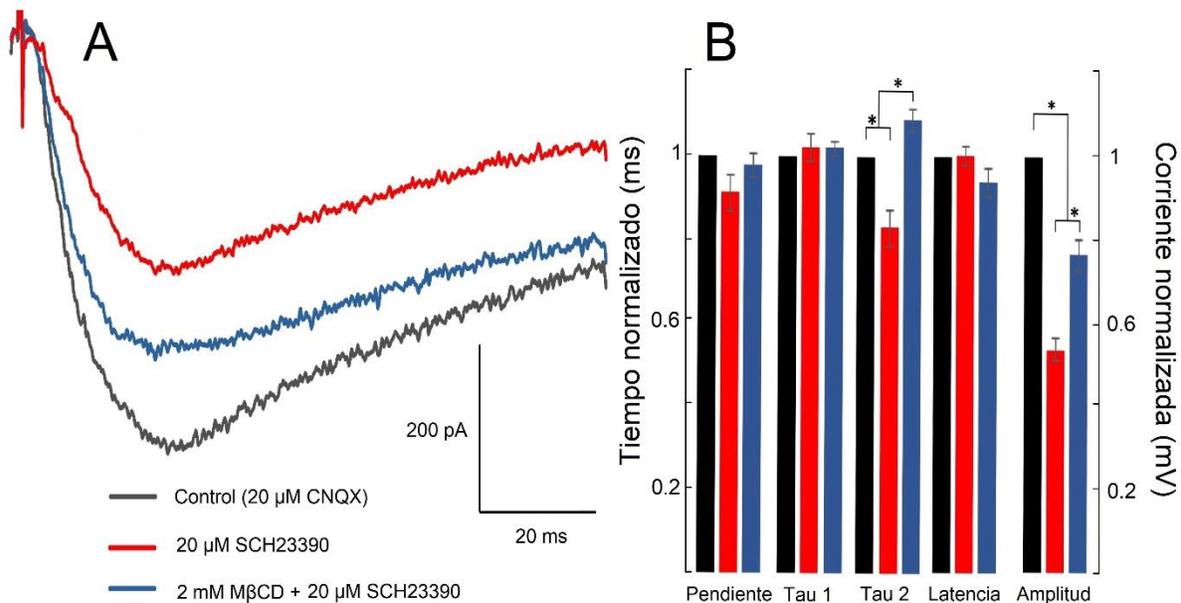


**Figura 30. La MβCD exalta la disminución de la eficiencia sináptica generada por CNQX A)** Curva E/S obtenida con 0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MβCD y 2 mM MβCD + 20μM CNQX **B)** Cambios en la pendiente. Se grafican los valores normalizados ±EEM, n= 6 \**p* ≤ 0.05.

## 7.4. Modificación de la modulación dopaminérgica con la perturbación de las balsas lipídicas

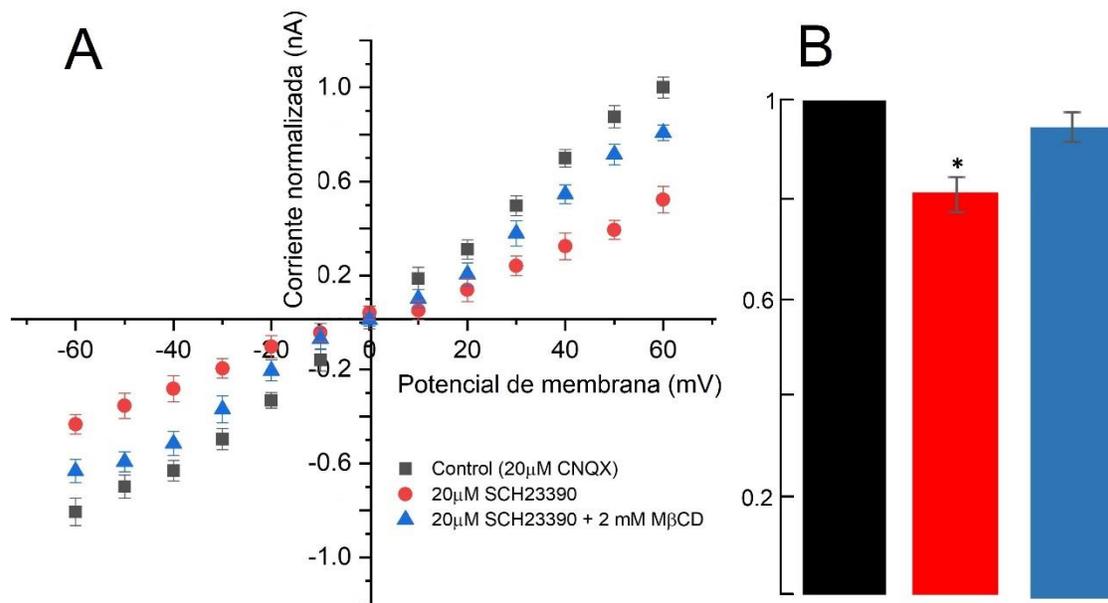
Una vez identificado el efecto funcional que tienen los receptores  $D_1$  en los receptores NMDA, así como el efecto de la alteración de las balsas lipídicas en el receptor NMDA, se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto de la perturbación de las balsas lipídicas en la modulación dopaminérgica de estas sinapsis.

Se realizaron los registros de las EPSCs en condiciones control (20  $\mu$ M CNQX), 20  $\mu$ M SCH23390 y 2 mM M $\beta$ CB + 20  $\mu$ M SCH23390. Como se puede observar en la Figura 31, la aplicación del antagonista de  $D_1$  generó una disminución en la amplitud de la corriente, pero cuando se aplica SCH23390 a las rebanadas que se incubaron con M $\beta$ CB esta disminución es menor en comparación con las no incubadas ( $-0.50 \pm 0.1$  nA (Control) vs  $-0.28 \pm 0.05$  nA (SCH) vs  $-0.39 \pm 0.03$  nA (SCH + M $\beta$ CB),  $F_{(2, 15)} = 23.52$ ,  $p \leq 0.05$ ). Cambios similares ocurrieron con el parámetro de tau 2, siendo este más cercano al presentado en el control ( $80.4 \pm 3$  ms (Control) vs  $73.1 \pm 2.1$  ms (SCH) vs  $88.15 \pm 4$  ms (SCH + M $\beta$ CB),  $F_{(2, 15)} = 46.01$ ,  $p \leq 0.05$ ).



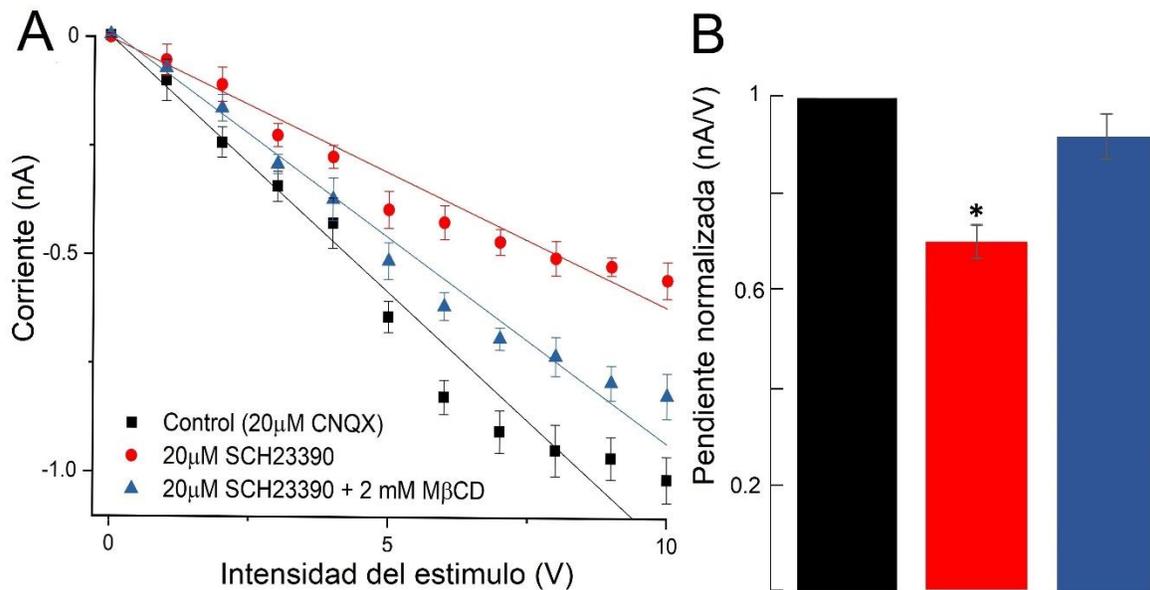
**Figura 31. El efecto SCH23390 cambia con la perturbación de las balsas lipídicas A)** Promedio de las EPSCs con 20  $\mu$ M CNQX (Control), 2 mM M $\beta$ CD y 2 mM M $\beta$ CD + 20  $\mu$ M SCH23390. **B)** Se grafican los valores normalizados  $\pm$  EEM de los valores medidos,  $n = 6$  \* $p \leq 0.05$ .

La aplicación de SCH23390 generó una disminución en la corriente en cada potencial de membrana, en cambio cuando se aplicó el antagonista en las rebanadas incubadas con M $\beta$ CD la disminución de la corriente fue menor (**Figura 32**). El índice de rectificación mostró una disminución de la participación de los receptores NMDA con la aplicación de SCH23390 en comparación al control, mientras que cuando es aplicado con M $\beta$ CD la contribución de estos receptores aumenta, esto sugerido por el aumento en el índice de rectificación en esta condición ( $-1.25 \pm 0.03$  (Control) vs  $-1.11 \pm 0.01$  (SCH) vs  $-1.22 \pm 0.02$  (SCH + M $\beta$ CD)  $F_{(2,15)} = 47.37$ ,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 32. La aplicación de SCH23390 cuando las balsas lipídicas están perturbadas genera un aumento de la corriente substancialmente a potenciales de membrana positivos. A)** Curva I/V obtenida con 20  $\mu$ M CNQX (Control), 20  $\mu$ M SCH23390 y 2 mM M $\beta$ CD + 20  $\mu$ M SCH23390 en cada potencial de membrana. **B)** Cambios en el índice de rectificación. Se grafican media  $\pm$  EEM,  $n = 6$  \* $p \leq 0.05$ .

De igual modo, se generaron cambios en las pendientes de las rectas ajustadas en la curva de E-S entre el control y SCH23390 ( $-0.06 \pm 0.001$  nA/V (Control) vs  $-0.04 \pm 0.004$  nA/V (SCH) vs  $-0.06 \pm 0.002$  nA/V (SCH + M $\beta$ CD),  $F_{(2,15)} = 76.55$ ,  $p \leq 0.05$ ), pero no entre el control y M $\beta$ CD (**Figura 33**), lo que implicaría que los cambios en la eficiencia sináptica generados por la modulación del receptor dopaminérgico son menores cuando se encuentran perturbadas las balsas lipídicas.



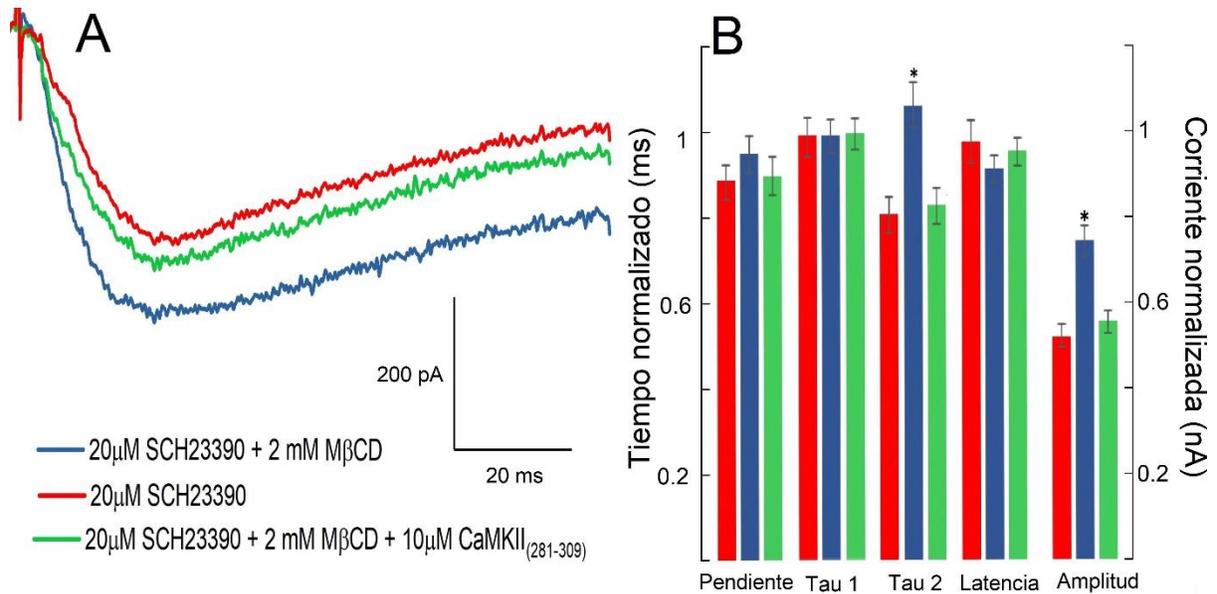
**Figura 33. La aplicación de SCH23390 cuando las balsas lipídicas están perturbadas genera un aumento en la eficiencia sináptica. A)** Curva E/S obtenida con 20µM CNQX, 20µM SCH23390 y 2 mM MβCD + 20µM SCH23390 **B)** Cambios en la pendiente. Se grafican los valores normalizados ±EEM, n= 6 \*p ≤ 0.05.

Estos resultados sugieren que la perturbación de las balsas lipídicas impide la interacción entre los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos, por lo tanto, la modulación funcional que existe entre ellos. Un elemento que podría explicar el aumento en la corriente observada con MβCD y SCH23390 es CaMKII, proteína cinasa que tiene un papel importante en el aumento de la respuesta glutamatérgica vinculada a la modulación dopaminérgica (Leonard *et al.*, 1999; Nai *et al.*, 2010).

Para identificar si esta proteína cinasa tiene una influencia en los resultados previamente descritos, se utilizó CaMKII<sub>(281-309)</sub>, un inhibidor de CaMKII cuya acción radica en bloquear la activación de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina y el sitio activo de la enzima, treonina 286 (Thr286).

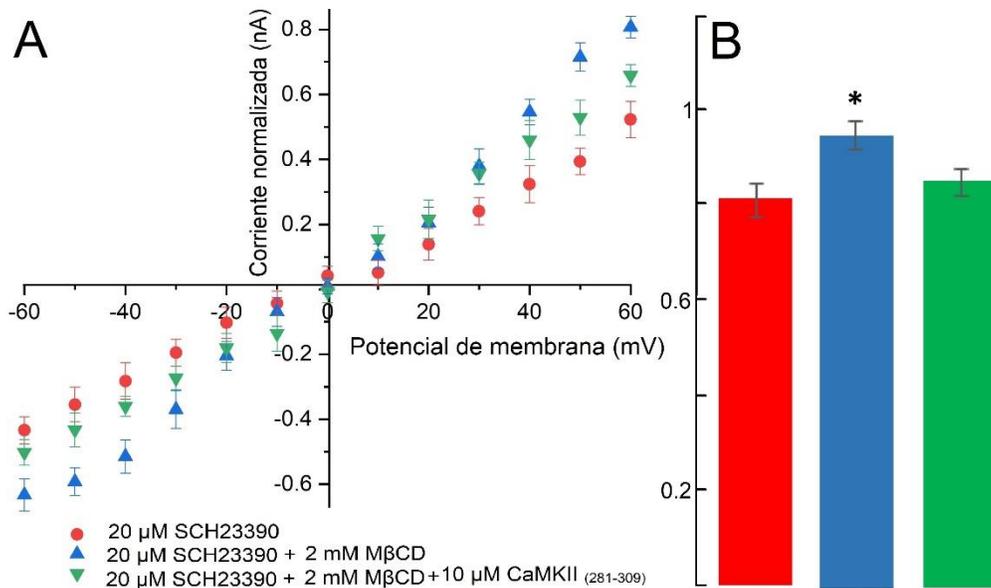
Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente (SCH23390 y MβCD + SCH23390) y se añadió una tercera condición en la que se colocó 10 µM de CaMKII<sub>(281-309)</sub> en la pipeta de registro. En la **Figura 34** se puede observar que la inhibición de CaMKII generó una disminución en tau 2 en comparación con 20 µM SCH23390 + 2 mM MβCD, tomando valores cercanos a los mostrados en la condición con solo SCH23390 (80.4 ± 3 ms (Control) vs 73.1 ± 2.1 ms (SCH) vs 88.15 ± 4 ms (SCH + MβCD) vs 74.1 ± 2.3 ms (CaMKII<sub>(281-309)</sub>), F<sub>(3, 20)</sub> =

41.71,  $p \leq 0.05$ ). Esto también ocurrió con la amplitud de la corriente ( $-0.50 \pm 0.1$  nA (Control) vs  $-0.28 \pm 0.05$  nA (SCH) vs  $-0.39 \pm 0.03$  nA (SCH + M $\beta$ CD) vs  $-0.31 \pm 0.02$  nA (CaMKII<sub>(281-309)</sub>),  $F_{(3, 20)} = 24.20$ ,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 34. La CaMKII participa en los cambios en la modulación dopaminérgica de las EPSCs con las balsas lipídicas perturbadas. A)** Promedio de las EPSCs obtenidas con 2 mM M $\beta$ CD, 20  $\mu$ M SCH23390 y 10  $\mu$ M CaMKII<sub>(281-309)</sub>. **B)** Se grafican los valores normalizados  $\pm$  EEM de los valores medidos,  $n = 6$  \* $p \leq 0.05$ .

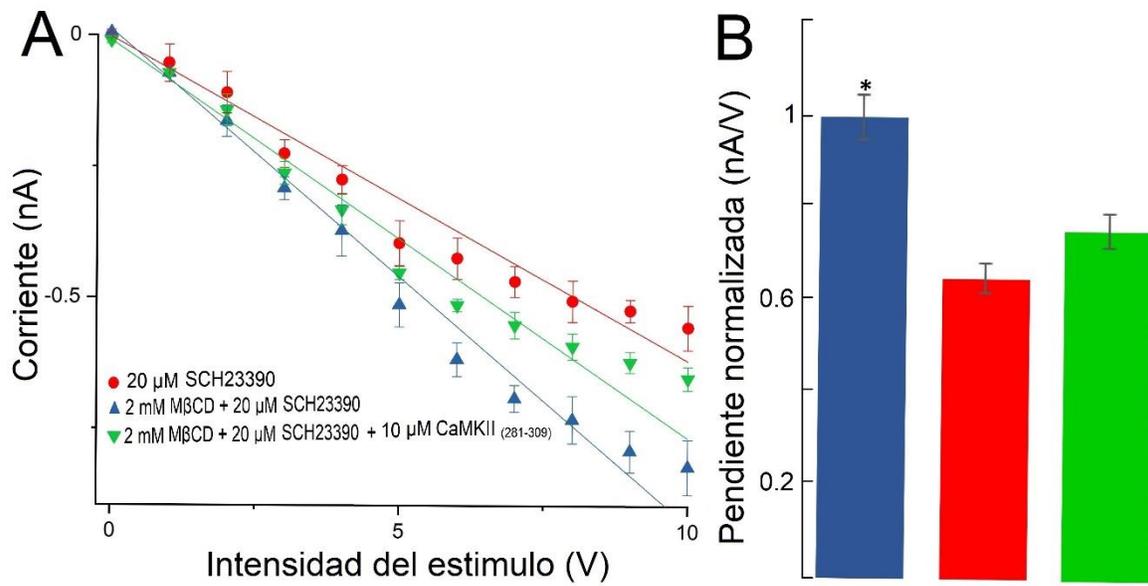
En la relación corriente-voltaje (**Figura 35**) se observó un resultado similar, el aumento de la corriente en cada potencial de membrana registrado en la condición con 2 mM M $\beta$ CD disminuye con la administración de CaMKII<sub>(281-309)</sub>, principalmente a potenciales despolarizantes, por lo que el índice de rectificación disminuyó significativamente tomando valores cercanos a los obtenidos en ausencia de M $\beta$ CD ( $-1.25 \pm 0.03$  (Control) vs  $-1.11 \pm 0.01$  (SCH) vs  $-1.22 \pm 0.02$  (SCH + M $\beta$ CD) vs  $-1.13 \pm 0.02$  (CaMKII<sub>(281-309)</sub>),  $F_{(3, 20)} = 45.44$ ,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 35. La inhibición de CaMKII impide el aumento en el índice de rectificación generado por SCH23390 cuando las balsas lipídicas están perturbadas. A)** Curva I/V obtenida con 2 mM M $\beta$ CD, 20  $\mu\text{M}$  SCH23390 y 10  $\mu\text{M}$  CaMKII<sub>(281-309)}</sub> en cada potencial de membrana. **B)** Cambios en el índice de rectificación. Se grafican media  $\pm$  EEM,  $n=6$  \* $p \leq 0.05$ .

En términos de eficiencia sináptica (**Figura 36**), CaMKII<sub>(281-309)}</sub> generó una disminución en el valor de la pendiente con respecto al valor de la condición con M $\beta$ CD ( $-0.06 \pm 0.001$  nA/V(Control) vs  $-0.04 \pm 0.004$  nA/V (SCH) vs  $-0.06 \pm 0.002$  nA/V (SCH + M $\beta$ CD) vs  $-0.04 \pm 0.001$  nA/V (CaMKII<sub>(281-309)}</sub>),  $F_{(3, 20)} = 84.76$ ,  $p \leq 0.05$ ), por lo que mostró una eficiencia sináptica similar a la observada con SCH23390, ya que no se encontraron diferencias significativas en sus pendientes de la curva entrada-salida.

Con base en los resultados obtenidos en estas condiciones, con los tres protocolos utilizados podemos mencionar que CaMKII sí participa en el aumento de la respuesta glutamatérgica cuando la M $\beta$ CD perturba la interacción entre los receptores D<sub>1</sub> y NMDA.



**Figura 36. La inhibición de CaMKII genera una eficiencia sináptica similar a la observada con la aplicación de SCH23390 sin la depleción de las balsas lipídicas. A)** Curva E/S obtenida con 2 mM M $\beta$ CD, 20  $\mu$ M SCH23390 y 10  $\mu$ M CaMKII<sub>(281-309)</sub>. **B)** Cambios en la pendiente. Se grafican los valores normalizado  $\pm$ EEM,  $n=6$  \* $p \leq 0.05$ .

## 8. Discusión

Las sinapsis glutamatérgicas en el hipocampo son importantes para procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Huang y Kandel, 1995). Uno de sus principales componentes son los receptores NMDA, los cuales participan en procesos de plasticidad sináptica y excitotoxicidad (Michaelis, 1998).

Debido a la importancia de estas sinapsis, se tuvo como primer objetivo dividir sus componentes con la finalidad de caracterizar los relacionados con los receptores NMDA. La caracterización que se obtuvo de estas sinapsis fue reproducible y coincidente con lo reportado en trabajos previos (Mayer y Westbrook, 1984; Randall *et al.*, 1990).

Una de las peculiaridades más importantes de los receptores NMDA son sus patrones de rectificación que se deben al bloqueo generado por el  $Mg^{2+}$  de forma dependiente de voltaje (Adult, 1980; Nowak *et al.*, 1984). Se pudo observar un cambio en estos patrones de rectificación conforme se reducía la concentración de  $MgCl_2$  de la solución externa, en especial a potenciales de membrana hiperpolarizantes. Siendo este resultado compatible con las características de los receptores NMDA descritas en otros trabajos (Randall *et al.*, 1990).

La disminución de la participación del componente rápido de estas sinapsis, receptores AMPA, por medio de un antagonista selectivo (CNQX), nos permitió observar las características cinéticas lentas de las EPSCs propias de los receptores NMDA (Chen *et al.*, 2008; Erreger *et al.*, 2007) como la disminución en la pendiente de activación, aumentos en la latencia al pico de la corriente y en el componente lento, tau 2, de la desactivación de la corriente.

Por otro lado, la curva corriente-voltaje y el índice de rectificación obtenidos en presencia del antagonista de AMPA, comprueba lo descrito en otros trabajos (Randall *et al.*, 1990) en los que se muestra que CNQX tiene un efecto principalmente a potenciales hiperpolarizantes, ya que es en esta región donde predomina la actividad de los receptores AMPA.

Uno de los factores que modifican estas sinapsis son los cambios en el ambiente lipídico de la membrana como el colesterol de las balsas lipídicas que ocurre en procesos patológicos como la isquemia cerebral, el síndrome metabólico y en la demencia de tipo Alzheimer (Besshoh *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 2016). Por esta razón, se identificaron los efectos de la perturbación de las

balsas lipídicas en las propiedades de las sinapsis glutamatérgicas y en particular de los receptores NMDA.

Un primer paso fue establecer la eficiencia del agente utilizado para perturbar las balsas lipídicas, la M $\beta$ CD, en vista de que en el trabajo de Choi y colaboradores (2015) no encontraron cambios en el colesterol ni en marcadores de las balsas lipídicas con la incubación de neuronas hipocampales con 0.38 mM M $\beta$ CD durante dos horas. La cuantificación del colesterol en la membrana plasmática realizada nos mostró que la M $\beta$ CD sí tiene la capacidad de disminuir de forma dependiente de la concentración la cantidad de colesterol en la membrana. La cantidad de M $\beta$ CD utilizada por los autores reduce aproximadamente un 3% del colesterol de la membrana, esto explicaría el que no hayan encontrado cambios en el colesterol ni en los marcadores de las balsas lipídicas. Esta cuantificación del colesterol nos permitió determinar las dosis de M $\beta$ CD a utilizar en los registros electrofisiológicos, teniendo la certeza de perturbar las balsas lipídicas a partir de eliminar su elemento principal, el colesterol.

Por otro lado, se ha reportado (Koudinov y Koudinova, 2005) que la disminución del colesterol de las balsas lipídicas afecta la respuesta sináptica por medio de mecanismos presinápticos. Sin embargo, el protocolo de facilitación por pulsos pareados en presencia de M $\beta$ CD no mostró un efecto a nivel presináptico, por lo que podemos considerar sus efectos a nivel postsináptico, principalmente en sus dos elementos, los receptores AMPA y NMDA.

Estudios previos que han utilizado la misma estrategia para estudiar el efecto de la perturbación de las balsas lipídicas en la respuesta glutamatérgica han sido más concluyentes sobre los efectos en los receptores AMPA (Frank *et al.*, 2008; Hering *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2008), mientras que los efectos sobre los receptores NMDA han resultado más contradictorios (Abulrob *et al.*, 2005; Antonini *et al.*, 2018; Frank *et al.*, 2004).

Los cambios en las condiciones evaluadas en este trabajo nos permiten sugerir que ambos elementos (AMPA y NMDA) se ven afectados por la acción de la M $\beta$ CD.

Por una parte, las curvas I-V realizadas con M $\beta$ CD consistentemente mostraron una mayor disminución de la corriente a potenciales de membrana hiperpolarizantes, potenciales de membrana en los que la actividad de los receptores AMPA predomina (Randall *et al.*, 1990). Así mismo, en presencia M $\beta$ CD hay una disminución en la pendiente de activación, lo que muestra una disminución en la actividad de los receptores AMPA. Sin embargo, con M $\beta$ CD se conservan

el resto de los componentes rápidos relacionados con este receptor, lo que se hace más evidente cuando se reduce su acción por medio de CNQX.

Respecto a los receptores NMDA y los componentes asociados a este, se generaron disminuciones en los tiempos de desactivación lentos, sin embargo, la aplicación de CNQX aumentó estos tiempos de desactivación en contraste con solo M $\beta$ CD. Adicionalmente, cuando las rebanadas se incubaron con 2 mM de M $\beta$ CD y se registraron en condiciones libres de MgCl<sub>2</sub> se generó un aumento en el pico de corriente máxima en comparación con el obtenido con 2 mM M $\beta$ CD y 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Esto muestra que la participación de los receptores NMDA se conserva aún con la perturbación de las balsas lipídicas.

Estos resultados muestran que los componentes activados por NMDA y AMPA se mantienen aún con la perturbación de las balsas lipídicas. Sin embargo, se encontraron una mayor cantidad de elementos que indican que el receptor afectado es el AMPA. En este sentido existe una concordancia con el trabajo de Hou y colaboradores (2008) en el que plantean que el primer elemento afectado son los receptores AMPA y posteriormente los receptores NMDA.

El siguiente objetivo fue determinar el efecto que ejerce la DA en las sinapsis glutamatérgicas del hipocampo. Se encontró que el antagonista selectivo de D<sub>1</sub>, disminuye la respuesta sináptica a través de disminuir la actividad de los receptores NMDA. Esto sugerido por los cambios en la constante de tiempo tau 2, lo cual implica que la desactivación de la corriente se volvió más rápida. Además, en la curva corriente-voltaje se generó una mayor reducción de la corriente a potenciales de membrana despolarizantes, región donde predomina la actividad de los receptores NMDA (Mayer y Westbrook, 1984).

Este resultado confirma lo reportado en otros trabajos en los que también han observado una disminución en la actividad de los receptores NMDA con el bloqueo de los receptores D<sub>1</sub> por medio de antagonistas selectivos como SCH23390 (Frey *et al.*, 1991; Hagen y Manahan-Vaughan, 2016; Huang y Kandel, 1995; Papaleonidopoulos *et al.*, 2018, Yan *et al.*, 2000).

Algunos trabajos (Castro *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2006) han considerado que este resultado se debe a un efecto directo en el canal NMDA, al unirse al poro y generar un bloqueo dependiente de voltaje. Sin embargo, en los resultados de la curva corriente-voltaje obtenida en estas condiciones no se observó un cambio en la rectificación a potenciales negativos con la administración del antagonista (SCH23390), por lo que se puede descartar que el efecto observado se deba a un bloqueo directo en el canal, considerando que una característica de este

tipo de bloqueo es una rectificación a potenciales de membrana negativos observadas en una relación corriente-voltaje. Este resultado coincide con el estudio de Tong y colaboradores (2018) en el que tampoco encuentran que agonistas o antagonistas dopaminérgicos tengan un efecto directo en el canal de NMDA.

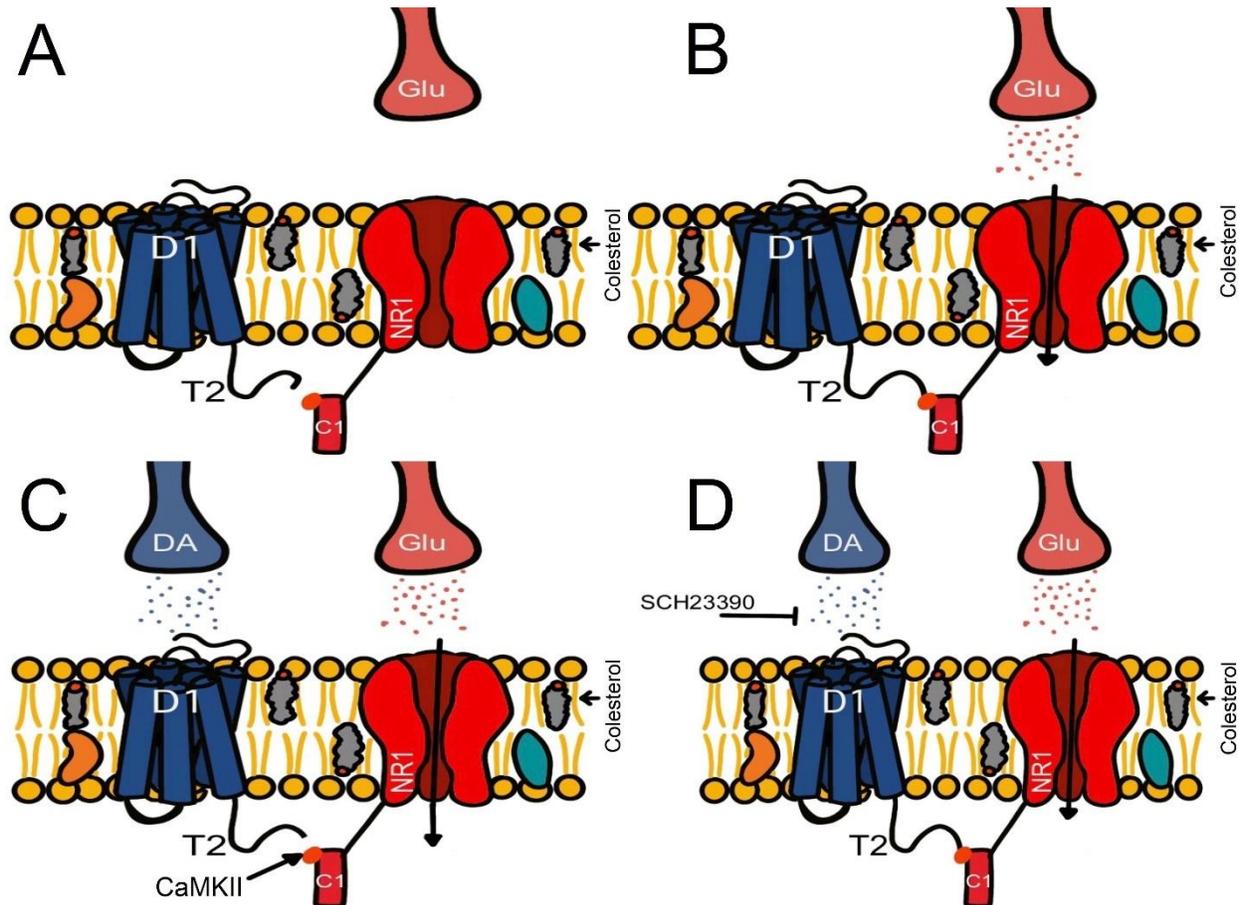
Otro elemento que ha sido implicado en la modulación ejercida por la DA en la sinapsis glutamatérgicas son los canales de calcio tipo L, debido a que se ha descrito que su actividad aumenta con la activación de los receptores D<sub>1</sub> (Hernández-López *et al.*, 1997; Surmeier *et al.*, 1995) y porque en condiciones en las que se bloquean estos canales el aumento en la respuesta glutamatérgica por la activación de D<sub>1</sub> se reduce en neuronas del estriado (Cepeda *et al.*, 1998; Surmeier *et al.*, 1995) y en neuronas corticales (Gonzalez-Islas y Hablitz, 2003; Wang, 2001).

No obstante, cuando se bloquean estos canales no se elimina la modulación ejercida por la DA (Cepeda *et al.*, 1998). Asimismo, en trabajos en los que se minimiza su contribución no se encuentra que la modulación dopaminérgica se afecte de manera importante, en otras palabras no parecieron tener un papel significativo en la mejora o disminución de las corrientes activadas por NMDA (Flores-Hernández *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). Adicionalmente, esta modulación ha sido principalmente descrita en regiones no hipocámpales como el estriado y la corteza.

Desde otro punto de vista, también se ha considerado que la modulación dopaminérgica genera cambios en la densidad de los receptores NMDA por medio de mecanismos de internalización dependiente de proteínas tirosinas cinasas (src) (Oh *et al.*, 2006; Sala y Segal, 2014; Tong *et al.*, 2018). No obstante, la eliminación de Fyn, un miembro de las tirosinas cinasas, reduce la fosforilación basal de las tirosinas pero no la fosforilación basal de serinas de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, por lo que no sería un mecanismo que participe exclusivamente en la modulación dopaminérgica (Dunah, 2004). Esto propone cambios en el número de receptores NMDA en la membrana por acción de la DA, pero los resultados obtenidos en las curvas corriente-voltaje, particularmente los cambios en la pendiente reflejan cambios en la conductancia del canal más que un cambio en el número de receptores NMDA, lo que sería dependiente de serinas y no de tirosinas cinasas.

Otra posible explicación para este resultado se basa en interacciones directas proteína a proteína entre estos receptores. Se ha propuesto que la disminución de la actividad de los receptores D<sub>1</sub>, por medio de antagonistas, favorece la interacción que mantiene a partir de su región T2 con la región carboxilo terminal C1 de la subunidad NR1 (Lee *et al.*, 2002). Esto

impediría que factores como CaMKII actúen sobre la subunidad NR1, ya que se uniría al mismo sitio ocupado por la región de T2 del receptor D<sub>1</sub>, lo que provocaría reducciones en la actividad de los receptores NMDA (Nai *et al.*, 2010). Tomando en cuenta este mecanismo propuesto y los resultados obtenidos en este trabajo, se propone un modelo sobre el efecto de antagonistas selectivos de D<sub>1</sub> como SCH23390 en la respuesta glutamatergica en el hipocampo (**Figura 37**).



**Figura 37. Efecto de los antagonistas de D<sub>1</sub> sobre la actividad del receptor NMDA.**

- El receptor NMDA tienen una actividad basal. En este nivel de actividad los receptores NMDA se encuentran separados de los receptores D<sub>1</sub>.
- Cuando la actividad del receptor NMDA aumenta los receptores D<sub>1</sub> se unen a través de su región T2 a la región C1 de la cola carboxilo terminal de la subunidad NR1. Esto funciona como un freno a la actividad de NMDA, lo que impide que se produzca excitotoxicidad.
- Cuando ocurre un incremento simultáneo en la actividad del receptor NMDA y de D<sub>1</sub> se produce una separación entre las unidades enlazadas. Esto permite que factores como CaMKII fosforile a la subunidad NR1 y se produzca un incremento en la actividad del receptor NMDA.
- La aplicación de un antagonista como SCH23390 impide que se produzca la separación de los receptores, lo que genera una disminución de la respuesta del receptor NMDA. Modificado de Lee *et al.*, 2002 y Nai *et al.*, 2010.

Considerando que esta modulación dopaminérgica ocurre por medio de interacciones directas, se determinó el papel de las balsas lipídicas en estas interacciones en el hipocampo. En estas condiciones se observó que la depleción de las balsas lipídicas, en presencia del antagonista selectivo de D<sub>1</sub>, aumenta la respuesta glutamatérgica en los tres protocolos utilizados.

Debido a que estos experimentos se llevaron a cabo en ausencia del componente rápido se pudo determinar que el aumento de la respuesta se debía a cambios en el receptor NMDA. Esto se observó principalmente por los cambios en la constante de tiempo tau 2, la cual regresó a valores cercanos al control tras haber disminuido con la aplicación de SCH23390. Asimismo, el aumento en el índice de rectificación mostró una mayor participación de los receptores NMDA con la aplicación de M $\beta$ CD. Por lo que los cambios en la eficiencia sináptica encontrados podrían deberse a estos cambios en el receptor NMDA.

De acuerdo con trabajos previos (Lee *et al.*, 2002; Nai *et al.*, 2010) este resultado podría deberse a que la depleción de las balsas lipídicas impide la interacción entre los receptores NMDA y D<sub>1</sub>, de forma similar a como lo haría un agonista dopaminérgico, el cual promueve la separación de este complejo heteroreceptor (Lee *et al.*, 2002). Esta separación favorecería que elementos como CaMKII actúen sobre la subunidad NR1 del receptor NMDA y se genere un aumento en su respuesta sináptica (Nai *et al.*, 2010).

Es importante destacar que no se observó un aumento en la respuesta sináptica semejante al control, debido a que la perturbación de las balsas lipídicas podría estar afectando más componentes y no solo al complejo heteroreceptor, ya que incluso en estas condiciones se observa una disminución en la corriente.

Considerando que estos trabajos proponen a CaMKII como uno de los factores involucrados en el aumento de la respuesta glutamatérgica tras la separación del complejo, se realizaron experimentos para comprobar la participación de esta proteína cinasa en estas condiciones. Se encontró que la eliminación de esta proteína cinasa por medio de CaMKII<sub>(281-309)</sub> generó una reducción en el aumento de la respuesta del receptor NMDA tras haberse producido la depleción de las balsas lipídicas con M $\beta$ CD en presencia de SCH23390.

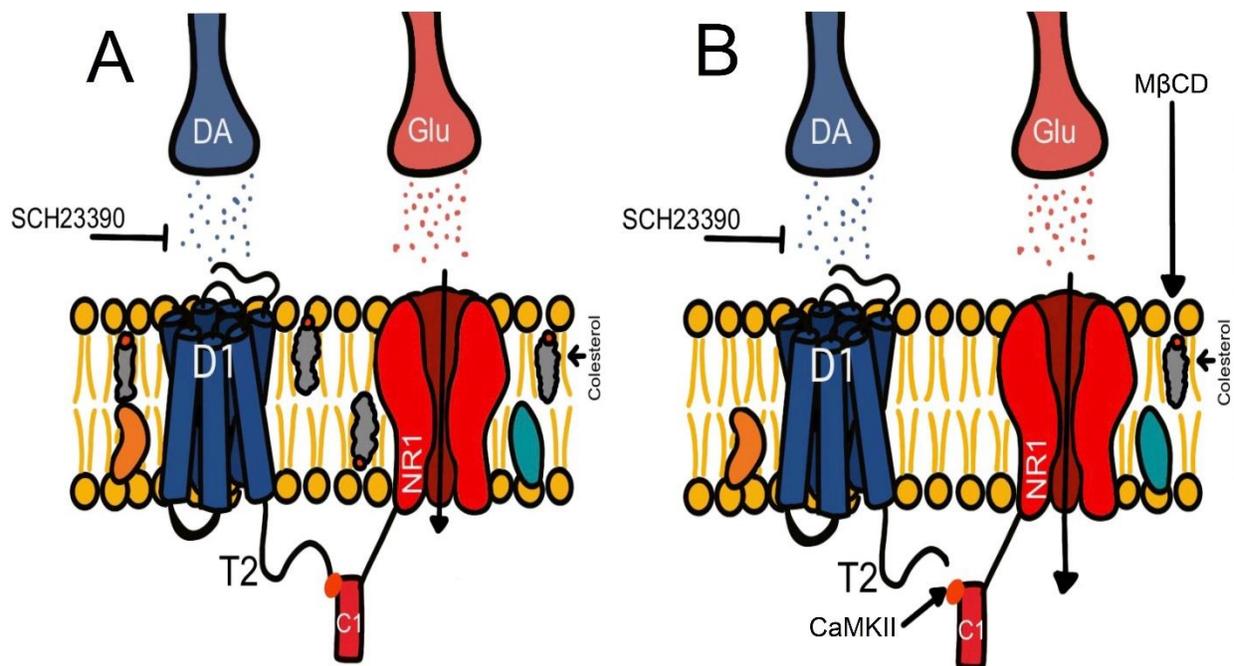
Con lo que podemos sugerir que CaMKII participa en el aumento de la respuesta de NMDA tras su separación del receptor D<sub>1</sub> generada por la perturbación del ambiente lipídico en

el que se encuentran. Resultados similares se obtuvieron generando la separación del complejo heteroreceptor por medio de agonistas dopaminérgicos (Nai *et al.*, 2010).

Es importante señalar que no se encontró que CaMKII<sub>(281-309)</sub> limitara por completo el aumento de la respuesta del receptor NMDA, lo que muestra que la perturbación de las balsas lipídicas afecta a más elementos y no solo al complejo NMDA-D<sub>1</sub>. Además, existe la posibilidad de que otros factores como DARPP-32 y proteínas tirosinas cinasas participen en esta modulación.

Los resultados de este trabajo muestran que la perturbación del ambiente lipídico de la membrana, como el colesterol de las balsas lipídicas, reduce la modulación que genera la DA por medio de interacciones directas entre su receptor de tipo D<sub>1</sub> y el receptor NMDA. Esto podría ser un mecanismo que contribuya al deterioro cognitivo en patologías como el síndrome metabólico y la demencia de tipo Alzheimer puesto que la reducción de esta modulación podría llevar a la célula a procesos de excitotoxicidad debido al aumento incontrolado en la actividad del receptor NMDA.

A manera de resumen y a la luz de los resultados obtenidos en estos experimentos se propone el siguiente modelo (**Figura 38**).



**Figura 38. Efecto de la MβCD en la modulación dopaminérgica** **A)** El antagonista dopaminérgico (SCH23390) favorece la unión entre los receptores D<sub>1</sub> y NMDA. Esto impide la fosforilación de la subunidad NR1 por medio de CaMKII, lo que produce una disminución de la actividad del receptor NMDA. **B)** La perturbación de las balsas lipídicas por medio de la MβCD limita la interacción entre los receptores, lo que permite que la CaMKII actúe sobre el receptor NMDA y se genere un aumento en su actividad.

## **9. Conclusión**

La disminución de la actividad de los receptores D<sub>1</sub> favorece la unión entre los receptores D<sub>1</sub> y NMDA, lo que impide la fosforilación de la subunidad NR1 por medio de CaMKII, generando una disminución de la actividad del receptor NMDA. Por otro lado, la perturbación de las balsas lipídicas por medio de M $\beta$ CD limita la interacción entre estos receptores, lo cual permite que CaMKII actúe sobre el receptor NMDA y se genere un aumento en su actividad.

## 10. Referencias

- Abulrob, A., Tauskela, J. S., Mealing, G., Brunette, E., Faid, K., & Stanimirovic, D. (2005). Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: A role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *Journal of Neurochemistry*, 92(6), 1477–1486. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03001.x>
- Adult, B. E. R. H. (1980). Selective depression of excitatory amino acid induced depolarizations by magnesium. *Physiology*, 2, 447–474.
- Al-Hallaq, R. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., & Wenthold, R. J. (2007). NMDA Di-Heteromeric Receptor Populations and Associated Proteins in Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 27(31), 8334–8343. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2155-07.2007>
- Albensi, B. C. (2007). *The NMDA Receptor / Ion Channel Complex : A Drug Target for Modulating Synaptic Plasticity and Excitotoxicity. 1*, 3185–3194.
- Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., & Rasenick, M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2), 128–140. <https://doi.org/10.1038/nrn2059>
- Andersen, P. H., Gingrich, J. A., Bates, M. D., Dearry, A., Falardeau, P., Senogles, S. E., & Caron, M. G. (1990). Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11(6), 231–236. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90249-8](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90249-8)
- Antonini, A., Caioli, S., Saba, L., Vindigni, G., Biocca, S., Canu, N., & Zona, C. (2018). Membrane cholesterol depletion in cortical neurons highlights altered NMDA receptor functionality in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(2), 509–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.008>
- Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., Mchugh, S. B., Rawlins, J. N. P., Monyer, H., & Seeburg, P. H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/nrn3677>
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Bergles, D. E., Diamond, J. S., & Jahr, C. E. (1999). Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(3), 293–298. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)80043-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80043-9)
- Besshoh, S., Bawa, D., Teves, L., Wallace, M. C., & Gurd, J. W. (2005). Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 93(1), 186–194. <https://doi.org/10.1111/j.1471->

- Bethus, I., Tse, D., & Morris, R. G. M. (2010). Dopamine and Memory: Modulation of the Persistence of Memory for Novel Hippocampal NMDA Receptor-Dependent Paired Associates. *Journal of Neuroscience*, *30*(5), 1610–1618. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2721-09.2010>
- Bibb, J. A., Snyder, G. L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Flenberg, A. A., Tsai, L. H., Kwon, Y. T., Girault, J. A., Czernik, A. J., Haganir, R. L., Hemmings, H. C., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1999). Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*, *402*(6762), 669–671. <https://doi.org/10.1038/45251>
- Blank, T., Nijholt, I., Teichert, U., Kugler, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(26), 14859–14864. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14859>
- Broussard, J. I., Yang, K., Levine, A. T., Tsetsenis, T., Jenson, D., Cao, F., García, I., Arenkiel, B. R., Zhou, F. M., De Biasi, M., & Dani, J. A. (2016). Dopamine Regulates Aversive Contextual Learning and Associated In Vivo Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.070>
- Brown, D. A., & Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, *68*(3), 533–544. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90189-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90189-J)
- Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E., & Sakmann, B. (1995). Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *The Journal of Physiology*, *485*(2), 403–418. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020738>
- Burnashev, Nail, & Szepietowski, P. (2017). *NMDA receptors*.
- Calabresi, P., Mercuri, N., Stanzione, P., Stefani, A., & Bernardi, G. (1987). Intracellular studies on the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons in vitro: Evidence for D1 receptor involvement. *Neuroscience*, *20*(3), 757–771. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90239-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90239-9)
- Castner, S. A., & Williams, G. V. (2007). Tuning the engine of cognition: A focus on NMDA/D1 receptor interactions in prefrontal cortex. *Brain and Cognition*, *63*(2), 159–187. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2006.11.001>
- Castro, N. G., De Mello, M. C. F., De Mello, F. G., & Aracava, Y. (1999). Direct inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptor channel by dopamine and (+)-SKF38393. *British Journal of Pharmacology*, *126*(8), 1847–1855. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702479>
- 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*, *90*(20), 9576–9580. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.1.82>
- Cepeda, Carlos, 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. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.1.82>
- Cepeda, Carlos, & Levine, M. S. (1998). Dopamine and N-Methyl-D- Aspartate Receptor Interactions in the Neostriatum. *Developmental Neuroscience*, *20*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1159/000017294>
- Chazot, P. L., Coleman, S. K., Cik, M., & Stephenson, F. A. (1994). Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in mammalian cells yields evidence for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor molecule. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(39), 24403–24409.
- Chen, H. S. V., & Lipton, S. A. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*, *97*(6), 1611–1626. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03991.x>
- Chen, L., & Yang, C. R. (2002). Interaction of Dopamine D1 and NMDA Receptors Mediates Acute Clozapine Potentiation of Glutamate EPSPs in Rat Prefrontal Cortex. *Journal of Neurophysiology*, *87*(5), 2324–2336. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.5.2324>
- Chen, N., Luo, T., & Raymond, L. A. (1999). Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *Journal of Neuroscience*, *19*(16), 6844–6854. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-16-06844.1999>
- Choi, T. Y., Jung, S., Nah, J., Ko, H. Y., Jo, S. H., Chung, G., Park, K., Jung, Y. K., & Choi, S. Y. (2015a). Low levels of methyl  $\beta$ -cyclodextrin disrupt GluA1-dependent synaptic potentiation but not synaptic depression. *Journal of Neurochemistry*, *132*(3), 276–285. <https://doi.org/10.1111/jnc.12995>
- Choi, T. Y., Jung, S., Nah, J., Ko, H. Y., Jo, S. H., Chung, G., Park, K., Jung, Y. K., & Choi, S. Y. (2015b). Low levels of methyl  $\beta$ -cyclodextrin disrupt GluA1-dependent synaptic potentiation but not synaptic depression. *Journal of Neurochemistry*, *132*(3), 276–285. <https://doi.org/10.1111/jnc.12995>
- Ciliax, B., Nash, N., Heilman, C., & Sunahara, R. (2000). Dopamine D 5 receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse*, *145*(July 1999), 125–145. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(200008\)37](https://doi.org/10.1002/1098-2396(200008)37)
- Clements, J. D., Lester, R. A. J., Tong, G., Jahr, C. E., Westbrook, G. L., Series, N., Nov, N., & Clements, J. D. (2007). The Time Course of Glutamate in the Synaptic Cleft The Time Course of Glutamate in the Synaptic Cleft. *Science*, *258*(5087), 1498–1501.
- Collingridge, G. L., Volianskis, A., Bannister, N., France, G., Hanna, L., Mercier, M., Tidball, P., Fang, G., Irvine, M. W., Costa, B. M., Monaghan, D. T., Bortolotto, Z. A., Molnár, E., Lodge, D., & Jane, D. E. (2013). The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. In *Neuropharmacology*.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.051>

- Colwell, C., & Levine, M. (2018). Excitatory synaptic transmission in neostriatal neurons: regulation by cyclic AMP-dependent mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, *15*(3), 1704–1713.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-03-01704.1995>
- Cui, C., Xu, M., & Atzori, M. (2006). Voltage-dependent block of N-methyl-D-aspartate receptors by dopamine D1 receptor ligands. *Molecular Pharmacology*, *70*(5), 1761–1770. <https://doi.org/10.1124/mol.106.028332>
- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. *Science Signaling*, *2004*(255), re16–re16. <https://doi.org/10.1126/stke.2552004re16>
- Delint-Ramírez, I., Salcedo-Tello, P., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *Journal of Neurochemistry*, *106*(4), 1658–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05523.x>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, *51*(1), 7–61.
- Du, F., Saitoh, F., Tian, Q. B., Miyazawa, S., Endo, S., & Suzuki, T. (2006). Mechanisms for association of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II with lipid rafts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *347*(3), 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.162>
- Dunah, A. W. (2004). Dopamine D1-Dependent Trafficking of Striatal N-Methyl-D-aspartate Glutamate Receptors Requires Fyn Protein Tyrosine Kinase but Not DARPP-32. *Molecular Pharmacology*, *65*(1), 121–129. <https://doi.org/10.1124/mol.65.1.121>
- F. Traynelis, S., P. Wollmuth, L., J. McBain, C., S. Menniti, F., M. Vance, K., K. Ogden, K., B. Hansen, K., Yuan, H., J. Myers, S., & Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function Stephen. *Pharmacological Reviews*, *62*, 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451.405>
- Fields, H. L., Hjelmstad, G. O., Margolis, E. B., & Nicola, S. M. (2007). Ventral Tegmental Area Neurons in Learned Appetitive Behavior and Positive Reinforcement. *Annual Review of Neuroscience*, *30*(1), 289–316. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094341>
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M., & Missale, C. (2003). Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(22), 20196–20202. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213140200>
- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., Greengard, P., & Levine, M. S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: Role of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology*, *88*(6), 3010–3020. <https://doi.org/10.1152/jn.00361.2002>

- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., Greengard, P., & Levine, M. S. (2006). Dopamine Enhancement of NMDA Currents in Dissociated Medium-Sized Striatal Neurons: Role of D1 Receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology*, *88*(6), 3010–3020. <https://doi.org/10.1152/jn.00361.2002>
- Frank, C., Rufini, S., Tancredi, V., Forcina, R., Grossi, D., & D’Arcangelo, G. (2008). Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Experimental Neurology*, *212*(2), 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.04.019>
- Frank, Claudio, Giammarioli, A. M., Peponi, R., Fiorentini, C., & Rufini, S. (2004). Cholesterol perturbing agents inhibit NMDA-dependent calcium influx in rat hippocampal primary culture. *FEBS Letters*, *566*(1–3), 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.113>
- Freund, T. F., Powell, J. F., & Smith, A. D. (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*, *13*(4), 1189–1215. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90294-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90294-X)
- Frey, U., Matthies, H., Reymann, K. G., & Matthies, H. (1991). The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region in vitro. *Neuroscience Letters*, *129*(1), 111–114. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90732-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90732-9)
- Frey, U., Schroeder, H., & Matthies, H. (1990). Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Research*, *522*(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91578-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91578-5)
- Gangarossa, G., Longueville, S., De Bundel, D., Perroy, J., Hervé, D., Girault, J. A., & Valjent, E. (2012). Characterization of dopamine D1 and D2 receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus*, *22*(12), 2199–2207. <https://doi.org/10.1002/hipo.22044>
- Gaudreault, S. B., Chabot, C., Gratton, J. P., & Poirier, J. (2004). The Caveolin Scaffolding Domain Modifies 2-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole Propionate Receptor Binding Properties by Inhibiting Phospholipase A2 Activity. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(1), 356–362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304777200>
- George, S. R., O’Dowd, B. F., & Lee, S. P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *1*(10), 808–820. <https://doi.org/10.1038/nrd913>
- Gonzalez-Islas, C., & Hablitz, J. J. (2003). Dopamine enhances EPSCs in layer II-III pyramidal neurons in rat prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, *23*(3), 867–875. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-03-00867.2003>
- Greengard, P. (1976). Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. *Nature*, *262*(1), 774–776.

- Greengard, P. (2001). *The Neurobiology of Slow Synaptic Transmission*. 294(November).
- Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B., & Zheng, J. Q. (2004). <1-s2.0-S0896627304001576-main.pdf>. 42, 51–62.
- Hagena, H., & Manahan-Vaughan, D. (2016). Dopamine D1/D5, But not D2/D3, receptor dependency of synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses that is enabled by patterned afferent stimulation, or spatial learning. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00031>
- Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., & Traynelis, S. F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *Journal of General Physiology*, 150(8), 1081–1105. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812032>
- Hansen, N., & Manahan-Vaughan, D. (2014). Dopamine D1/D5 receptors mediate informational saliency that promotes persistent hippocampal long-term plasticity. *Cerebral Cortex*, 24(4), 845–858. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs362>
- Hasselmo, M. E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(6), 710–715. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.09.002>
- Hemmings, H. C., Greengard, P., Tung, H. Y. L., & Cohen, P. (1984). DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature*, 310(5977), 503–505. <https://doi.org/10.1038/310503a0>
- Hering, H., Lin, C.-C., & Sheng, M. (2003). Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), 3262–3271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716933>
- Herman, M. A., & Jahr, C. E. (2007). Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *Journal of Neuroscience*, 27(36), 9736–9741. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3009-07.2007>
- Hernández-Echeagaray, E., Starling, A. J., Cepeda, C., & Levine, M. S. (2004). Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: Are dendrites necessary? *European Journal of Neuroscience*, 19(9), 2455–2463. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03344.x>
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., & Galarraga, E. (1997). Receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *Journal of Neuroscience*, 17(9), 3334–3342. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-09-03334.1997>
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A QUANTITATIVE DESCRIPTION OF MEMBRANE CURRENT AND ITS APPLICATION TO CONDUCTION AND EXCITATION IN NERVE. *Philosophische En Theologische Faculteiten Der Nederlandsche Jezuiten*, 117(2), 500–544. <https://doi.org/10.1080/00062278.1939.10600645>

- Hou, Q., Huang, Y., Amato, S., Snyder, S. H., Haganir, R. L., & Man, H. Y. (2008). Regulation of AMPA receptor localization in lipid rafts. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 38(2), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.02.010>
- Huang, E. P. (1998). Synaptic plasticity: Going through phases with LTP. *Current Biology*, 8(10), R350–R352. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70219-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70219-2)
- Huang, Y. Y., & Kandel, E. R. (1995). D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2446–2450. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2446>
- Ito, H. T., & Schuman, E. M. (2012). Functional division of hippocampal area CA1 via modulatory gating of entorhinal cortical inputs. *Hippocampus*, 22(2), 372–387. <https://doi.org/10.1002/hipo.20909>
- Johnson, J. W., & Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. In *Nature* (Vol. 325, Issue 6104, pp. 529–531). <https://doi.org/10.1038/325529a0>
- Kaczmarczyk, M. M., Machaj, A. S., Chiu, G. S., Lawson, M. A., Gainey, S. J., York, J. M., Meling, D. D., Martin, S. A., Kwakwa, K. A., Newman, A. F., Woods, J. A., Kelley, K. W., Wang, Y., Miller, M. J., & Freund, G. G. (2013). Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. *Psychoneuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.01.004>
- Kara, E., Lin, H., & Strange, P. G. (2010). Co-operativity in agonist binding at the D2 dopamine receptor: Evidence from agonist dissociation kinetics. *Journal of Neurochemistry*, 112(6), 1442–1453. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06554.x>
- Kauer, J. A., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron*, 1(10), 911–917. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90148-1)
- Kebabian, Jonh, Calne, D. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277(11).
- Kempadoo, K. A., Mosharov, E. V., Choi, S. J., Sulzer, D., & Kandel, E. R. (2016). Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(51), 14835–14840. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616515114>
- Kerr, J. N. D., & Wickens, J. R. (2001). Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. *J. Neurophysiol.*, 85(1), 117–124. //000166319300013
- Kilsdonk, E. P. C., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C., & Rothblat, G. H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 270, Issue 29, pp. 17250–17256). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17250>
- Kim, E., Cho, K. O., Rothschild, A., & Sheng, M. (1996). Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering

- activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron*, 17(1), 103–113.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80284-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80284-6)
- Kleckner, N. W., & Dingledine, R. (2016). *Requirement for Glycine in Activation of NMDA-Receptors Expressed in Xenopus Oocytes*. Author(s): Nancy W. Kleckner and Raymond Dingledine. Published by: American Association for the Advancement of Science. Stable URL: [http://www.jstor.org/stable/170202.241\(4867\)](http://www.jstor.org/stable/170202.241(4867)), 835–837.
- Köhler, C., Ericson, H., & Radesäter, C. (1991). Different laminar distributions of dopamine D1 and D2 receptors in the rat hippocampal region. *Neuroscience Letters*, 126(2), 107–109.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1833671>
- Kong, M. M. (2006). Agonist-induced Cell Surface Trafficking of an Intracellularly Sequestered D1 Dopamine Receptor Homo-oligomer. *Molecular Pharmacology*, 70(1), 78–89. <https://doi.org/10.1124/mol.105.021246>
- Kornhuber, J., & Kornhuber, M. E. (1983). Axo-axonic synapses in the rat striatum. *European Neurology*, 22(6), 433–436. <https://doi.org/10.1159/000115598>
- Koudinov, A. R., & Koudinova, N. V. (2005). Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 229–230, 233–240.  
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.11.036>
- Krupp, J. J., Vissel, B., Heinemann, S. F., & Westbrook, G. L. (1998). N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. *Neuron*, 20(2), 317–327. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80459-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80459-6)
- Kruusmägi, M., Kumar, S., Zelenin, S., Brismar, H., Aperia, A., & Scott, L. (2009). Functional differences between D1 and D5 revealed by high resolution imaging on live neurons. *Neuroscience*, 164(2), 463–469.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.052>
- Kulla, A., & Manahan-Vaughan, D. (2000). Depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats is modulated by D1/D5 dopamine receptors. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 10(6), 614–620.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/10.6.614>
- Lachowicz, J. E., & Sibley, D. R. (1997). Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors. *Pharmacology and Toxicology*, 81(3), 105–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1997.tb00039.x>
- Ladepêche, L., Dupuis, J. P., Bouchet, D., Doudnikoff, E., Yang, L., Campagne, Y., Bezard, E., Hosy, E., & Groc, L. (2013). Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine D1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44), 18005–18010.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1310145110>
- Lee, F. J. S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Ch??ry, N., Wang, Y., Wang, Y. T., Niznik, H. B., Yu, X. min, & Liu, F.

- (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*, *111*(2), 219–230. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00962-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00962-5)
- Lee, H. K., Takamiya, K., Han, J. S., Man, H., Kim, C. H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Gallagher, M., & Huganir, R. L. (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*, *112*(5), 631–643. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00122-3)
- Lemon, N., & Manahan-Vaughan, D. (2006). Dopamine D1/D5 Receptors Gate the Acquisition of Novel Information through Hippocampal Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1454-06.2006>
- Leonard, a S., Lim, I. a, Hemsworth, D. E., Horne, M. C., & Hell, J. W. (1999). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N- methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(6), 3239-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3239>
- Levine, M. S., Altemus, K. L., Cepeda, C., Cromwell, H. C., Crawford, C., Ariano, M. a, Drago, J., Sibley, D. R., & Westphal, H. (1996). Modulatory actions of dopamine on NMDA receptor-mediated responses are reduced in D1A-deficient mutant mice. *J Neurosci*, *16*(18), 5870–5882. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-18-05870.1996>
- Lisman, J. (1989). A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(23), 9574–9578. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9574>
- Lisman, J. E., & Grace, A. A. (2005). The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, *46*(5), 703–713. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.002>
- Lisman, John, Grace, A. A., & Duzel, E. (2011). A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends in Neurosciences*, *34*(10), 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.07.006>
- Liu, J. C., DeFazio, R. A., Espinosa-Jeffrey, A., Cepeda, C., De Vellis, J., & Levine, M. S. (2004). Calcium Modulates Dopamine Potentiation of N-Methyl-D-Aspartate Responses: Electrophysiological and Imaging Evidence. *Journal of Neuroscience Research*, *76*(3), 315–322. <https://doi.org/10.1002/jnr.20079>
- Liu, X. Y., Chu, X. P., Mao, L. M., Wang, M., Lan, H. X., Li, M. H., Zhang, G. C., Parelkar, N. K. K., Fibuch, E. E., Haines, M., Neve, K. A., Liu, F., Xiong, Z. G., & Wang, J. Q. (2006). Modulation of D2R-NR2B Interactions in Response to Cocaine. *Neuron*, *52*(5), 897–909. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.011>
- Lussier, M. P., Sanz-Clemente, A., & Roche, K. W. (2015). Dynamic regulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by posttranslational modifications. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(48), 28596–28603. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.652750>

- MacDonald, J. F., & Wojtowicz, J. M. (1980). Two conductance mechanisms activated by applications of L-glutamic, L-aspartic, DL-homocysteic, N-methyl-D-aspartic, and DL-kainic acids to cultured mammalian central neurones. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, *58*, 1393–1397.
- Man, H. Y., Wang, Q., Lu, W. Y., Ju, W., Ahmadian, G., Liu, L., D'Souza, S., Wong, T. P., Taghibiglou, C., Lu, J., Becker, L. E., Pei, L., Liu, F., Wymann, M. P., MacDonald, J. F., & Wang, Y. T. (2003). Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, *38*(4), 611–624. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00228-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00228-9)
- Mayer, M. L., & Westbrook, G. L. (1984). Mixed-agonist action of excitatory amino acids on mouse spinal cord neurones under voltage clamp. *The Journal of Physiology*, *354*(1), 29–53. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015360>
- Medina, I., Filippova, N., Charton, G., Rougeole, S., Ben-ari, Y., Khrestchatisky, M., & Bregestovski, P. (1995). *Calcium-dependent expressed*. 567–573.
- Michaelis, E. K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, *54*(4), 369–415. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00055-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00055-5)
- Millan, M. J. (2002). Differential Actions of Antiparkinson Agents at Multiple Classes of Monoaminergic Receptor. I. A Multivariate Analysis of the Binding Profiles of 14 Drugs at 21 Native and Cloned Human Receptor Subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *303*(2), 791–804. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.039867>
- Milligan, G. (2004). G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Molecular Pharmacology*, *66*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1124/mol.104.000497>
- Missale, C., Russel Nash, S., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, *78*(1), 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, *256*(5060), 1217–1221. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1217>
- Morin, J. P., Díaz-Cintra, S., Bermúdez-Rattoni, F., & Delint-Ramírez, I. (2016). Decreased levels of NMDA but not AMPA receptors in the lipid-raft fraction of 3xTg-AD model of Alzheimer's disease: Relation to Arc/Arg3.1 protein expression. *Neurochemistry International*, *100*, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.09.013>
- Mu, Y., Zhao, C., & Gage, F. H. (2011). Dopaminergic Modulation of Cortical Inputs during Maturation of Adult-Born Dentate Granule Cells. *Journal of Neuroscience*, *31*(11), 4113–4123. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4913-10.2011>

- Müller, B. M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W. J., Kuhlendahl, S., Fenster, S. D., Lau, L. F., Veh, R. W., Haganir, R. L., Gundelfinger, E. D., & Garner, C. C. (1996). SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron*, *17*(2), 255–265. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80157-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80157-9)
- Murphy, J. A., Stein, I. S., Lau, C. G., Peixoto, R. T., Aman, T. K., Kaneko, N., Aromolaran, K., Saulnier, J. L., Popescu, G. K., Sabatini, B. L., Hell, J. W., & Zukin, R. S. (2014). Phosphorylation of Ser1166 on GluN2B by PKA Is Critical to Synaptic NMDA Receptor Function and Ca<sup>2+</sup> Signaling in Spines. *The Journal of Neuroscience*, *34*(3), 869–879. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4538-13.2014>
- Nagai, T., Takuma, K., Kamei, H., Ito, Y., Nakamichi, N., Ibi, D., Nakanishi, Y., Murai, M., Mizoguchi, H., Nabeshima, T., & Yamada, K. (2007). Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learning and Memory*, *14*(3), 117–125. <https://doi.org/10.1101/lm.461407>
- Nai, Q., Li, S., Wang, S. H., Liu, J., Lee, F. J. S., Frankland, P. W., & Liu, F. (2010). Uncoupling the D1-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Complex Promotes NMDA-Dependent Long-Term Potentiation and Working Memory. *Biological Psychiatry*, *67*(3), 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.011>
- Nieto Mendoza, E., & Hernández Echeagaray, E. (2015). Dopaminergic modulation of striatal inhibitory transmission and long-term plasticity. *Neural Plasticity*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/789502>
- Niznik, H. B., & Van Tol, H. H. (1992). Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, *17*(4), 158–180.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1188440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, *307*(5950), 462–465. <https://doi.org/10.1038/307462a0>
- Oh, M. C., Derkach, V. A., Guire, E. S., & Soderling, T. R. (2006). Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(2), 752–758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509677200>
- Otmakhova, N. a., & Lisman, J. E. (1996). D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(23), 7478–7486. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/npp.2014.281>
- Otmakhova, N. a., & Lisman, J. E. (1998). D1/D5 dopamine receptors inhibit depotentiation at CA1 synapses via cAMP-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(4), 1270–1279.
- Ouimet, C. C., Miller, P. E., Hemmings, H. C., Ivar Walaas, S., & Greengard, P. (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions.

*The Journal of Neurosci Ence*, 4(1), 111–124.

Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience*, 33(8), 1351–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x>

Papaleonidopoulos, V., Kouvaros, S., & Papatheodoropoulos, C. (2018). Effects of endogenous and exogenous D1/D5 dopamine receptor activation on LTP in ventral and dorsal CA1 hippocampal synapses. *Synapse*. <https://doi.org/10.1002/syn.22033>

Parfitt, K. D., Van Doze, A., Madison, D. V., & Browning, M. D. (1992). Isoproterenol increases the phosphorylation of the synapsins and increases synaptic transmission in dentate gyrus, but not in area CA1, of the hippocampus. *Hippocampus*, 2(1), 59–64. <https://doi.org/10.1002/hipo.450020108>

Pei, L. (2004). Regulation of Dopamine D1 Receptor Function by Physical Interaction with the NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience*, 24(5), 1149–1158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3922-03.2004>

Pignatelli, M., & Bonci, A. (2015). Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron*, 86(5), 1145–1157. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.015>

Randall, A. D., Schofield, J. G., & Collingridge, G. L. (1990). Whole-cell patch-clamp recordings of an NMDA receptor-mediated synaptic current in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters*, 114(2), 191–196. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90070-P](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90070-P)

Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratyck, C., & Sweatt, J. D. (1999). The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 19(11), 4337–4348. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-11-04337.1999>

Rosen, Z. B., Cheung, S., & Siegelbaum, S. A. (2015). Midbrain dopamine neurons bidirectionally regulate CA3-CA1 synaptic drive. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.4152>

Rumbaugh, G., Prybylowski, K., Wang, J. F., & Vicini, S. (2000). Exon 5 and spermine regulate deactivation of NMDA receptor subtypes. *Journal of Neurophysiology*, 83(3), 1300–1306. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.3.1300>

Sala, C., & Segal, M. (2014). Dendritic spines: The locus of structural and functional plasticity. *Physiological Reviews*, 94(1), 141–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2013>

Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y.-X., Ii, J. B., Hell, J. W., & Wenthold, R. J. (1996). for review, see Sheng. *The Journal of Neuroscience*, 20(3), 1260–1271. <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/20/3/1260.full.pdf>

Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: Many regulators, many consequences. *Neuroscientist*, 19(1), 62–75. <https://doi.org/10.1177/1073858411435129>

- Sarantis, K., Matsokis, N., & Angelatou, F. (2009). Synergistic interactions of dopamine D1 and glutamate NMDA receptors in rat hippocampus and prefrontal cortex: Involvement of ERK1/2 signaling. *Neuroscience*, *163*(4), 1135–1145. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.056>
- Schneggenburger, R. (1996). Simultaneous measurement of Ca<sup>2+</sup> influx and reversal potentials in recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophysical Journal*, *70*(5), 2165–2174. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79782-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79782-5)
- Scott, L., Kruse, M. S., Forssberg, H., Brismar, H., Greengard, P., & Aperia, a. (2002). Selective up-regulation of dopamine D1 receptors in dendritic spines by NMDA receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(3), 1661–1664. <https://doi.org/10.1073/pnas.032654599>
- Scott, L., Zelenin, S., Malmersjo, S., Kowalewski, J. M., Markus, E. Z., Nairn, A. C., Greengard, P., Brismar, H., & Aperia, A. (2006). Allosteric changes of the NMDA receptor trap diffusible dopamine 1 receptors in spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(3), 762–767. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505557103>
- Seamans, J. K., & Yang, C. R. (2004). The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology*, *74*(1), 1–57. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.05.006>
- Seung, H. J., Hyeong, S. C., Ki, J. K., Qing, Z. L., & Sung, K. W. (2009). Electrophysiological characterization of AMPA and NMDA receptors in rat dorsal striatum. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, *13*(3), 209–214. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2009.13.3.209>
- Sharma, G., & Stevens, C. F. (2002). Interactions between two divalent ion binding sites in N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(24), 14170–14175. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.14170>
- Shivarama Shetty, M., Gopinadhan, S., & Sajikumar, S. (2016). Dopamine D1/D5 receptor signaling regulates synaptic cooperation and competition in hippocampal CA1 pyramidal neurons via sustained ERK1/2 activation. *Hippocampus*, *26*(2), 137–150. <https://doi.org/10.1002/hipo.22497>
- Simons, K., & Vaz, W. L. C. (2004). Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *33*(1), 269–295. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803>
- Smith, C. C., & Greene, R. W. (2012). CNS Dopamine Transmission Mediated by Noradrenergic Innervation. *Journal of Neuroscience*, *32*(18), 6072–6080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6486-11.2012>
- Snyder, G. L., Fienberg, A. A., Haganir, R. L., & Greengard, P. (1998). A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society*

for *Neuroscience*, 18(24), 10297–10303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9852567>

- Sorkina, T., Hoover, B. R., Zahniser, N. R., & Sorkin, A. (2005). Constitutive and protein kinase C-induced internalization of the dopamine transporter is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Traffic*, 6(2), 157–170. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00259.x>
- Strange, P. G. (2005). Oligomers of D 2 Dopamine Receptors. *Journal of Molecular Neuroscience*, 26, 177–184. <https://doi.org/10.1385/JMN/26>
- Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings, H. C., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, 14(2), 385–397. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90294-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90294-5)
- Suzuki, T., Du, F., Tian, Q. B., Zhang, J., & Endo, S. (2008). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II $\alpha$  clusters are associated with stable lipid rafts and their formation traps PSD-95. *Journal of Neurochemistry*, 104(3), 596–610. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05035.x>
- Tong, L., Prieto, G. A., & Cotman, C. W. (2018). *IL-1 $\beta$  suppresses cLTP-induced surface expression of GluA1 and actin polymerization via ceramide-mediated Src activation*. 1–14.
- Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J., & Johnson, E. M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends in Neurosciences*, 25(8), 412–417. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02215-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02215-4)
- Vance, K. M., Hansen, K. B., & Traynelis, S. F. (2012). GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *Journal of Physiology*, 590(16), 3857–3875. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.234062>
- Vicini, S., Wang, J. F., Li, J. H., Zhu, W. J., Wang, Y. H., Luo, J. H., Wolfe, B. B., & Grayson, D. R. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Neurophysiology*, 79(2), 555–566. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.2.555>
- Villarroel, A., Regalado, M. P., & Lerma, J. (1998). Glycine-independent NMDA receptor desensitization: Localization of structural determinants. *Neuron*, 20(2), 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80460-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80460-2)
- Volianskis, A., France, G., Jensen, M. S., Bortolotto, Z. A., Jane, D. E., & Collingridge, G. L. (2015). Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research*, 1621, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.016>
- Wang, J. (2001). D1 Dopamine Receptors Potentiate NMDA-mediated Excitability Increase in Layer V Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons. *Cerebral Cortex*, 11(5), 452–462. <https://doi.org/10.1093/cercor/11.5.452>
- Wang, M., Wong, A. H., & Liu, F. (2012). Interactions between NMDA and dopamine receptors: A potential therapeutic target. *Brain Research*, 1476, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.029>

- Wei, X., Ma, T., Cheng, Y., Huang, C. C. Y., Wang, X., Lu, J., & Wang, J. (2018a). Dopamine D1 or D2 receptor-expressing neurons in the central nervous system. *Addiction Biology*, *23*(2), 569–584. <https://doi.org/10.1111/adb.12512>
- Wei, X., Ma, T., Cheng, Y., Huang, C. C. Y., Wang, X., Lu, J., & Wang, J. (2018b). Dopamine D1 or D2 receptor-expressing neurons in the central nervous system. *Addiction Biology*. <https://doi.org/10.1111/adb.12512>
- Werlen, E., & Jones, M. W. (2015). Modulating the map: Dopaminergic tuning of hippocampal spatial coding and interactions. In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 219). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.03.002>
- Williams, K. (1996). Separating dual effects of zinc at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience Letters*, *215*(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)12924-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)12924-4)
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(6), 483–494. <https://doi.org/10.1038/nrn1406>
- Wyllie, D. J. A., Béhé, P., & Colquhoun, D. (1998). Single-channel activations and concentration jumps: Comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *Journal of Physiology*, *510*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.001bz.x>
- Yang, S. N. (2000). Sustained enhancement of AMPA receptor- and NMDA receptor-mediated currents induced by dopamine D1/D5 receptor activation in the hippocampus: an essential role of postsynaptic Ca<sup>2+</sup>. *Hippocampus*, *10*(1), 57–63. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(2000\)10:1<57::AID-HIPO6>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:1<57::AID-HIPO6>3.0.CO;2-0)
- Yu, P., Yang, Z., Jones, J. E., Wang, Z., Owens, S. A., Mueller, S. C., Felder, R. A., & Jose, P. A. (2004). *D1 dopamine receptor signaling involves caveolin-2 in HEK-293 cells*. *66*, 2167–2180.
- Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M., Rondi-Reig, L., Philpot, B. D., Miyakawa, T., Bear, M. F., & Tonegawa, S. (2001). Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell*, *107*(5), 617–629. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00585-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00585-2)
- Zhang, J., Xu, T.-X., Hallett, P. J., Watanabe, M., Grant, S. G. N., Isacson, O., & Yao, W.-D. (2009). PSD-95 Uncouples Dopamine-Glutamate Interaction in the D1/PSD-95/NMDA Receptor Complex. *Journal of Neuroscience*, *29*(9), 2948–2960. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4424-08.2009>
- Zhang, Ji-chuan, Lau, P., & Bi, G. (2009). *Gain in sensitivity and loss in temporal contrast of STDP by dopaminergic modulation at hippocampal synapses*. 1–6.
- Zheng, P., Zhang, X. X., Bunney, B. S., & Shi, W. X. (1999). Opposite modulation of cortical N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses by low and high concentrations of dopamine. *Neuroscience*, *91*(2), 527–535. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00604-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00604-6)