



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Efecto de la activación del receptor a histamina H₃ en la
transmisión dopaminérgica del núcleo accumbens de la rata**

T E S I S

que presenta

PSIC. GUILLERMO AQUINO MIRANDA

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de Neurobiología Celular y Molecular

Director de Tesis

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

México D.F.

Enero 2015

Agradecimiento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría.

A mis padres...

Agradecimientos

Al Dr. José Antonio Arias Montaña por proporcionarme la oportunidad de incursionar dentro de este maravilloso mundo de las neurociencias, además el apoyo y la confianza que en mi depósito hace ya varios años. Los conocimientos que he adquirido dentro de su grupo de trabajo son la mejor recompensa de esta etapa de mi vida,

A los Dres. Benjamín Floran Garduño y Antonio Bueno Nava, por la excelente disposición y apoyo proporcionado a lo largo de este proyecto.

Al Dr. Juan Escamilla Sánchez y el Arq. Raúl González Pantoja por el apoyo y amistad brindada a lo largo de mi estancia en este centro de estudios.

A todos los miembros del laboratorio 37 de neurociencias por todos los ratos agradables que hemos compartido.

A todo el CINVESTAV y su comunidad, por ser el principal estímulo desencadenador de liberación de dopamina en mi núcleo accumbens.

A mi familia por su paciencia, comprensión y apoyo en todo trayecto de mi vida.

A María por ser la motivación que me impulsa diariamente.

Índice

I.	Abreviaturas	IX
II.	Resumen	X
III.	Abstract.....	XII
1.	Introducción.....	1
1.1	El sistema histaminérgico del sistema nervioso central (SNC).....	1
1.2	Receptores a histamina	3
1.2.1	Receptores a histamina H ₁	3
1.2.2	Receptores a histamina H ₂	5
1.2.3	Receptores a histamina H ₃	5
1.2.4	Receptores a histamina H ₄	6
1.3	Localización del receptor a histamina H ₃ en neuronas dopaminérgicas	7
1.4	El núcleo accumbens (NAcc).....	9
1.5	Transmisión dopaminérgica.....	10
1.5.1	Síntesis.....	10
1.5.2	Liberación.....	11
1.5.3	Captura.....	11
1.6	Receptor H ₃ y transmisión dopaminérgica.....	12
2.	Planteamiento del problema.....	16
3.	Hipótesis de trabajo.....	18
4.	Objetivos.....	19
4.1	Objetivo general.....	19
4.2	Objetivos específicos.....	19

5. Métodos.....	20
5.1 Obtención de rebanadas del núcleo accumbens (NAcc).....	20
5.2 Obtención de terminales nerviosas (sinaptosomas)	20
5.3 Unión de [³ H]-N-metilhistamina ([³ H]-NMHA) a membranas sinaptosomales del NAcc	20
5.4 Captura de [³ H]-dopamina por sinaptosomas.....	21
5.5 Liberación de [³ H]-dopamina por rebanadas del NAcc	22
5.6 Síntesis de L-DOPA en rebanadas del NAcc	23
5.7 Análisis por HPLC de los niveles de L-DOPA, dopamina y adrenalina. 24	
6. Resultados	25
6.1 Unión de [³ H]-NMHA a membranas sinaptosomales del NAcc de la rata 25	
6.2 Captura de [³ H]-dopamina por sinaptosomas del NAcc.....	27
6.3 Efecto de la activación del RH ₃ en la captura de [³ H]-dopamina	28
6.4 Efecto de la activación del RH ₃ en la liberación de [³ H]-dopamina en rebanadas del NAcc de la rata	29
6.5 Efecto de la activación del RH ₃ en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata.	31
7. Discusión.....	38
8. Conclusiones	45
9. Bibliografía	46

Índice de figuras

Figura 1. Metabolismo de la histamina.....	2
Figura 2. Localización de las neuronas histaminérgicas.....	2
Figura 3. Distribución de los sitios de unión a [¹²⁵ I]-Iodoproxifan y del RNAm del receptor a histamina H ₃ (RH ₃).....	7
Figura 4. Co-localización del RNAm y de la proteína del receptor a histamina H ₃ (H ₃) y de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental, VTA.....	8
Figura 5. Inhibición por la histamina y un agonista del RH ₃ (R _α MH) de la liberación de [³ H]-dopamina inducida eléctricamente en rebanadas del neostriado del ratón.....	13
Figura 6. Inhibición de la acumulación de [³ H]-DOPA inducida por despolarización por activación de RH ₃ con el agonista imnepip en rebanadas del neostriado de la rata.....	14
Figura 7. Fármacos antagonistas del RH ₃ aumentan la liberación de dopamina inducida por metanfetamina en el núcleo accumbens de la rata.....	15
Figura 8. Unión de [³ H]-NMHA a membranas del NAcc de la rata.....	26
Figura 9. Inhibición por ligandos del RH ₃ de la unión de [³ H]-NMHA a membranas del NAcc de la rata.....	26
Figura 10. Captura de [³ H]-dopamina por sinaptosomas del NAcc de la rata.....	28

Figura 11. Efecto del agonista del RH ₃ RAMH en la captura de [³ H]-dopamina por sinaptosomas del NAcc.....	29
Figura 12. Efecto del agonista del RH ₃ RAMH en la liberación de [³ H]-dopamina por rebanadas del NAcc de la rata.....	30
Figura 13. Liberación de [³ H]-dopamina por rebanadas del NAcc del ratón.....	32
Figura 14. Acumulación de L-DOPA inducida por forskolina en rebanadas del NAcc de la rata.....	33
Figura 15. Efecto del agonista del RH ₃ RAMH en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata.....	33
Figura 16. Bloqueo por ciproxifan del efecto del agonista RAMH en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata.....	34
Figura 17. Efecto de la inhibición de las fosfodiesterasas en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata.....	36
Figura 18. Efecto de la activación de los receptores a PACAP y RH ₃ en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata.....	37

I. Abreviaturas

[³ H]-NMHA	[³ H]-N-metilhistamina
aa	Amino ácido
AC	Adenilil ciclase
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
DAG	Diacilglicerol
DAT	Transportador de dopamina
EGTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
gCa ²⁺	Conductancia (canal) de Ca ²⁺
HDC	Descarboxilase de histidina
HMT	N-metiltransferase
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
K _d	Constante de disociación
pK _d	Logaritmo negativo de la constante de disociación
K _i	Constante de inhibición
pK _i	Logaritmo negativo de la constante de inhibición
KH	Krebs-Henseleit
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
MAPKs	Cinasas de proteína activadas por mitógenos
NAcc	Núcleo accumbens
NEMs	Neuronas espinosas medianas
NET	Transportador de noradrenalina
NSD-1015	m-hidroxibenzilhidrazina
PACAP	Polipéptido hipofisario activador de las adenilil ciclasas
PKA	Cinasa A de proteínas
PKC	Cinasa C de proteínas
PLC	Fosfolipasa C
RAMH	(R)-α-metilhistamina
RD ₂	Receptor a dopamina D ₂
RH ₁	Receptor a histamina H ₁
RH ₂	Receptor a histamina H ₂
RH ₃	Receptor a histamina H ₃
RH ₄	Receptor a histamina H ₄
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervioso central
TH	Hidroxilase de tirosina
VTA	Área ventral tegmental

II. Resumen

El receptor a histamina H₃ (RH₃) se encuentra acoplado a proteínas G_{ai/o}, y fue inicialmente caracterizado como el autorreceptor que inhibía la liberación y la síntesis de la histamina. Posteriormente se le identificó como un heterorreceptor que regula la liberación de otros neurotransmisores. El receptor se encuentra en diferentes áreas del cerebro de la rata, siendo el núcleo accumbens (NAcc) una de las regiones con mayor expresión del RH₃. En el Área Ventral Tegmental (VTA) de la rata se co-expresan los RNA mensajeros del RH₃ y de la hidroxilasa de tirosina (TH), la enzima limitante de la síntesis de dopamina, sugiriendo la presencia del receptor en las terminales dopaminérgicas que inervan al NAcc.

Los estudios que abordan la posible regulación por el RH₃ de la transmisión dopaminérgica son escasos. Uno de ellos indica que la activación del receptor inhibe la liberación de [³H]-dopamina en rebanadas del neostriado del ratón, y otro muestra reducción de la síntesis de dopamina en rebanadas del neostriado de la rata (Molina-Hernández, 2000). Experimentos con microdiálisis en el NAcc de la rata sugieren una posible interacción entre el RH₃ y el transportador de dopamina (DAT), ya que los antagonistas del RH₃ aumentan la liberación de dopamina inducida por metanfetamina. En esta tesis se planteó en consecuencia analizar si la activación del RH₃ regula la transmisión dopaminérgica del NAcc de la rata, estudiando el efecto en la síntesis, la liberación y la captura de dopamina.

Los ensayos de unión del agonista [³H]-N-metilhistamina en membranas de rebanadas y terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) del NAcc confirmaron de manera cuantitativa la presencia del RH₃ (270 ± 24 y 197 ± 19 fmol/mg, respectivamente), con características farmacológicas similares a las descritas previamente.

La activación del RH₃ con el agonista selectivo RAMH no modificó la captura de [³H]-dopamina por sinaptosomas del NAcc, como tampoco la liberación

de [³H]-dopamina inducida por despolarización en rebanadas del núcleo. En contraste, la síntesis de dopamina inducida por forskolina en rebanadas del NAcc (10 μM, 210.0 ± 10.4% del valor control) fue inhibida por el agonista RAMH (inhibición máxima 43.5 ± 9.1%, IC₅₀ 33 nM). El efecto del agonista (100 nM) fue prevenido por el antagonista selectivo ciproxifán (10 μM), confirmando la participación del RH₃. La síntesis de dopamina fue también estimulada por IBMX, un inhibidor de fosfodiesterasas (324 ± 53% del valor control), y este efecto fue también inhibido, de manera modesta pero significativa (14.1 ± 2.3%), por el agonista RAMH (100 nM).

En conjunto, los resultados de esta tesis indican que en NAcc de la rata la activación del RH₃ no afecta la captura o la liberación de [³H]-dopamina, pero modula de manera importante la síntesis del neurotransmisor, inhibiendo la vía de señalización AMPc/PKA que resulta en la fosforilación y mayor actividad de la enzima TH. La discrepancia de efectos podría ser explicada por la localización de los heterorreceptores H₃ distante de los canales de calcio involucrados en la exocitosis, pero cercana a las enzimas adenilil ciclasas responsables de la síntesis de AMPc.

III. Abstract

The histamine H₃ receptor (RH₃), coupled to G_{αi/o} proteins, was initially characterized as the autoreceptor inhibiting the release and synthesis of histamine, and later identified also as a heteroreceptor capable to regulate the release of other neurotransmitters. The RH₃ is expressed in different areas of the rat brain, and the nucleus accumbens (NAcc) is amongst the regions with the highest receptor levels. The co-expression in the rat Ventral Tegmental Area (AVT) of the mRNAs coding for RH₃ and tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme in dopamine synthesis, suggests a presynaptic location of the RH₃ on the dopaminergic terminals that innervate the NAcc.

Studies that address the possible regulation by the RH₃ of dopaminergic transmission are scarce. One study showed RH₃ activation to inhibit [³H]-dopamine release from mouse striatal slices, and other reported reduced dopamine synthesis in rat striatal slices. Further, microdialysis experiments suggested an interaction between the RH₃ and the dopamine transporter (DAT) in rat NAcc (rNAcc) since RH₃ antagonists increased methamphetamine-induced dopamine release. This work therefore aimed to determine whether RH₃ activation regulates rNAcc dopaminergic transmission, by analyzing the effect on dopamine synthesis, release and uptake in either isolated nerve terminals (synaptosomes) or slices.

Radioligand assays with the agonist [³H]-N-methylhistamine and membranes from rNAcc synaptosomes or slices confirmed the presence of the RH₃ (270 ± 24 and 197 ± 19 fmol/mg, respectively), with pharmacological characteristics similar to those described previously for native and cloned RH₃.

RH₃ activation with the selective agonist RAMH did not affect [³H]-dopamine uptake by rNAcc synaptosomes, nor depolarization-evoked [³H]-dopamine release from slices of this nucleus. In rNAcc slices forskolin-stimulated L-DOPA accumulation (10 μM, 210.0 ± 10.4% of control values) was reduced by RAMH (maximum inhibition 43.5 ± 9.1%, IC₅₀ 33 nM), and the action of

100 nM RAMH was prevented by the selective RH₃ antagonist ciproxifan (10 μM), confirming a receptor-mediated effect. L-DOPA accumulation was also stimulated by phosphodiesterase inhibition with 1 mM IBMX (324 ± 53% of control values), and this effect was reduced, although in a modest manner (-14.1 ± 2.3%), by 100 nM RAMH.

The results of this thesis indicate thus that in rNAcc RH₃ activation does not affect [³H]-dopamine uptake or release, but modulates neurotransmitter synthesis, most likely by inhibiting the cAMP/PKA pathway, which results in increased tyrosine hydroxylase phosphorylation and enzymatic activity. The discrepancy of effects could be explained by a differential location of the RH₃ on dopaminergic terminals, distant from calcium channels involved in exocytosis but close to the adenylyl cyclases responsible for cAMP formation.

1. Introducción

Hace poco más de un siglo se mostró que un compuesto extraído del cornezuelo de centeno podía inducir contracción y vasodilatación del músculo liso intestinal (Dale y Laidlaw, 1910), y años después al ser aislada del hígado y del pulmón se demostró que esta misma sustancia se encontraba presente en diversos tejidos (Best y cols., 1927). A partir de estos hallazgos este compuesto recibió el nombre de “histamina”, proveniente del griego “*histos*” (tejido).

La histamina pertenece a la familia de las aminas biogénicas, de las cuales también forman parte la dopamina, la noradrenalina y la serotonina. La presencia de la histamina está determinada por la biodisponibilidad de su precursor, el aminoácido L-histidina, cuya descarboxilación por la enzima descarboxilasa de L-histidina origina al transmisor (Figura 1). El principal proceso de inactivación involucra su metilación por la N-metil-transferasa de histamina (Ramos-Jiménez y cols., 2009).

1.1 El sistema histaminérgico del sistema nervioso central (SNC)

El cerebro fue uno de los últimos órganos donde fue identificado el efecto de la histamina, debido a que la amina aplicada de manera sistémica no atraviesa la barrera hemato-encefálica (Parsons y Ganellin, 2006). Estudios posteriores determinaron que la histamina presente en el SNC proviene de neuronas que se localizan exclusivamente en el núcleo tubero-mamilar del hipotálamo posterior (Figura 2), y que dan origen a una extensa red de proyecciones a casi todo el SNC (Panula y Nuutinen, 2013).

Desde etapas tempranas del desarrollo en los roedores la histamina se encuentra con abundancia en diferentes órganos y células como el hígado, el músculo estriado, el hueso, células endocrinas y el riñón. En experimentos *in vitro* la histamina induce la proliferación y la diferenciación de células madre provenientes de la corteza cerebral fetal de la rata, por lo que se considera que

esta amina tiene un papel fundamental en el desarrollo del SNC (Panula y cols., 2014).

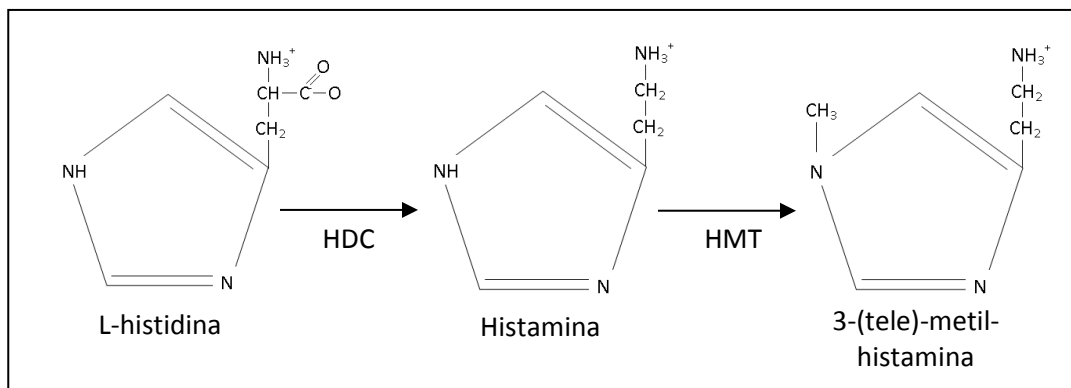


Figura 1. Metabolismo de la histamina. La histamina es sintetizada a partir del aminoácido L-histidina por la acción de la enzima descarboxilasa de histidina (HDC). La amina es degradada por la acción de la enzima N-metiltransferasa (HMT) dando como producto final a la 3-(tele)-metil-histamina. Modificado de Ramos-Jiménez y cols., 2009.

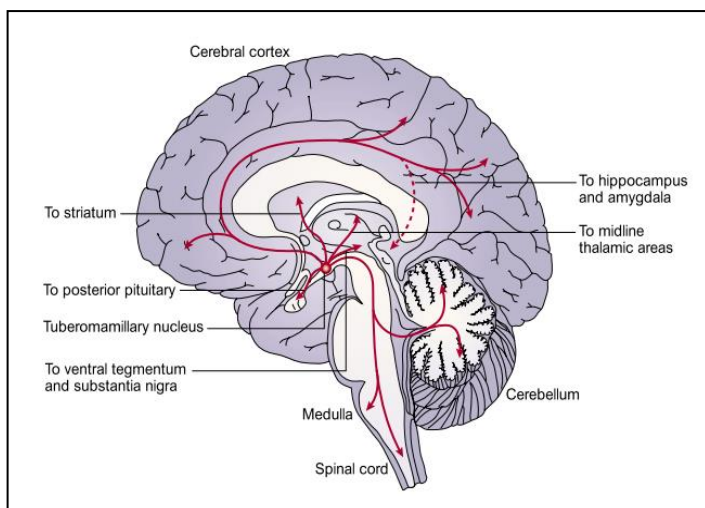


Figura 2. Localización de las neuronas histaminérgicas. Las neuronas que sintetizan histamina se localizan en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo posterior. Desde este núcleo envían proyecciones a prácticamente todo el SNC (Hass y Panula, 2003).

La histamina regula diversas funciones del SNC, teniendo una participación directa en la vigilia, en las funciones endocrinas modulando la liberación de algunas hormonas, y en la actividad motora mediante receptores presentes en

los ganglios basales. Por otra parte, se ha planteado que la histamina tiene un papel fundamental en procesos como el aprendizaje, la memoria y la atención, debido a su acción en el sistema límbico (Hass y Panula, 2003).

1.2 Receptores a histamina

Los efectos de la histamina en los organismos son mediados por cuatro receptores descubiertos hasta el momento (H_1 , H_2 , H_3 y H_4), los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Passani y Blandina, 2011). Tres de los cuatro receptores (H_1 , H_2 , H_3), han sido identificados en el SNC.

1.2.1 Receptores a histamina H_1 .

El receptor a histamina H_1 (RH_1) se encuentra acoplado a proteínas $G_{\alpha q/11}$, y se expresa en diferentes tipos de tejidos, como el músculo liso, los linfocitos y en el intestino, aunque también se expresa de manera abundante en el SNC, principalmente en el tálamo, la corteza cerebral, la amígdala, y con una menor expresión en la médula espinal y el cerebelo.

Este receptor tiene una función importante en el sistema inmune y el SNC. En el sistema inmune los RH_1 se encuentran relacionados con reacciones alérgicas, como la urticaria y la rinitis alérgica estacional, y en el SNC estos receptores tienen una función clave en la regulación del ciclo sueño-vigilia (Krystal y cols., 2013).

La afinidad que tiene el RH_1 por la histamina es mayor comparada con la del RH_2 , sin embargo es mucho menos afín (hasta dos órdenes de magnitud) cuando se le compara con los otros dos miembros de la familia de receptores de histamina conocidos hasta el momento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de los receptores a histamina.

	Receptor			
	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄
Proteínas G	G $\alpha_{q/11}$	G α_s	G $\alpha_{i/o}$	G $\alpha_{i/o}$
Señalización	<p>↑PLC → ↑IP₃ → ↑Ca²⁺ ↑DAG → ↑PKC</p>	<p>↑AC → ↑AMPc → ↑PKA</p>	<p>↓AC → ↓AMPc → ↓PKA G$\beta\gamma$ → ↓gCa²⁺</p>	<p>↓AC → ↓AMPc → ↓PKA</p>
Localización	SNC, músculo liso, glándulas suprarrenales (médula), corazón, células endoteliales	SNC, neutrófilos, músculo liso, corazón, útero, células gástricas, células supresoras T	SNC, nervios simpáticos y parasimpáticos del corazón, tracto gastrointestinal	Médula ósea, leucocitos, neutrófilos, mastocitos, pulmón
Afinidad por la histamina (K_i)	1.26 μ M	1.99 μ M	10 nM	15 nM
Función	Contracción del músculo liso, respuestas alérgicas, regulación del ciclo sueño-vigilia	Relajación del músculo liso, secreción ácido gástrico	Inhibición de la síntesis y liberación de la histamina y de otros neurotransmisores	Producción de citocinas y quimiocinas, respuestas inmunes

AC, adenilil ciclasa; AMPc, 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina; DAG, diacilglicerol; gCa²⁺, conductancia (canal) de Ca²⁺; IP₃, 1,4,5-trifosfato de inositol; PKA, cinasa de proteínas A; PKC, cinasa de proteínas C; PLC, fosfolipasa C; SNC, sistema nervioso central; ↑, activación o formación; ↓, inhibición o reducción; → inducción. Modificado de Ramos-Jiménez y cols., 2009.

1.2.2 Receptores a histamina H₂

El receptor a histamina H₂ (RH₂) está acoplado a proteínas del tipo G_{αs}, por lo que uno de los principales efectos de su activación es el aumento en la formación de AMPc.

El RH₂ se expresa en el SNC, principalmente en los núcleos caudado y putamen, la corteza cerebral, y de manera modesta en el hipocampo y el núcleo dentado (Honrubia y cols., 2000). En tejidos periféricos el receptor se encuentra primordialmente en el corazón, el útero y las células parietales. En comparación con los otros receptores a histamina conocidos, el RH₂ es el que posee una menor afinidad por la histamina (cuadro 1).

1.2.3 Receptores a histamina H₃

El receptor a histamina H₃ (RH₃) se encuentra mayoritariamente en el SNC, por lo cual ha sido considerado blanco terapéutico en algunas enfermedades neurodegenerativas, como las de Parkinson, Alzheimer y algunas psiquiátricas (Aquino-Miranda y Arias-Montaña, 2012; Naddafi y Mirshafiey, 2013; Jin y cols., 2009). Existe un particular interés en este receptor ya que su activación tiene repercusión directa en la liberación de varios neurotransmisores como GABA (ácido γ -aminobutírico), glutamato, dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina y sustancia P (Aquino-Miranda y cols., 2012a).

La mayoría de los RH₃ se encuentran en las terminales nerviosas de las neuronas del SNC, aunque también se ha inferido su presencia en cuerpos celulares y dendritas (Panula y Nuutinen, 2013), y en menor medida en el sistema nervioso periférico, específicamente en las terminales nerviosas del tracto gastrointestinal (Coruzzi y cols., 2001) y del corazón (Hashikawa y cols., 2012). También se ha propuesto su presencia en células pancreáticas (Nakamura y cols., 2013).

El RH₃ fue identificado por primera vez por J. M. Arrang en el año de 1983, como un autorreceptor capaz de inhibir la liberación de histamina en rebanadas

de la corteza cerebral de la rata. Años más tarde se reportó que inhibía también la síntesis de histamina (Arrang y cols., 1987), y posteriormente que se encontraba presente como heterorreceptor en las terminales nerviosas de otras neuronas donde inhibía la liberación de diversos transmisores (Panula y Nuutinen, 2013). En el año de 1999 se clonó el ADN complementario (ADNc) del RH₃ humano (Lovenberg y cols., 1999), mostrándose que codificaba una proteína de 445 aminoácidos (aa). Posteriormente se describe que este gen se encuentra en el cromosoma 20 en la posición 20q13.33, y que puede originar hasta 20 isoformas por procesamiento alternativo (*splicing*) del RNAm correspondiente (Bongers y cols., 2007).

El RH₃ está acoplado a proteínas G_{ai/o}, siendo por lo tanto sensible a la acción de la toxina de *Bordetella pertussis* (Clark y cols., 1993). Al ser activada la proteína G_{ai/o} la subunidad α inhibe la actividad de las enzimas adenilil ciclasas (ACs), lo que tiene como consecuencia una menor formación de AMPc y por lo tanto una disminución de la actividad de la cinasa A de proteínas (PKA). Por su parte, el complejo G $\beta\gamma$ inhibe canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje del tipo N y P/Q (Tedford y Zamponi, 2006), lo que resulta en disminución de la liberación por exocitosis de varios neurotransmisores. Otros efectos intracelulares de la activación del RH₃ son la inhibición del intercambiador Na⁺/H⁺ (Silver y cols., 2001), la activación de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos, MAPKs (Drutel y cols., 2001) y la liberación de ácido araquidónico por activación de la fosfolipasa A₂ (Gbahou y cols., 2010).

1.2.4 Receptores a histamina H₄

Los receptores a histamina H₄ (RH₄) han sido identificados principalmente en tejidos periféricos (Zampeli y Tiligada, 2009), aunque algunos reportes los han identificado también en el SNC. Estos receptores se encuentran acoplados, al igual que los RH₃, a proteínas del tipo G_{ai/o}, por lo cual uno de los principales efectos de su activación es la disminución de la formación de AMPc (Leurs y cols., 2009).

La afinidad de este receptor por la histamina es menor que la del RH₃; sin embargo, la diferencia es mínima (Cuadro 1). Por otra parte, algunos fármacos que inicialmente fueron dirigidos al RH₃ fueron posteriormente identificados como ligandos del RH₄; tal es el caso del clobenpropit y la tioperamida. Las semejanzas que se presentan entre estos receptores ha dificultado su diferenciación, y por lo tanto su estudio en algunos reportes (Leurs y cols., 2009).

1.3 Localización del receptor a histamina H₃ en neuronas dopaminérgicas

El RH₃ y el RNAm correspondiente han sido identificados en diversas regiones del cerebro de la rata (Pillot y cols., 2002), con las densidades más altas tanto del receptor como del RNAm en la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, el neostriado y el núcleo accumbens (NAcc, Figura 3).

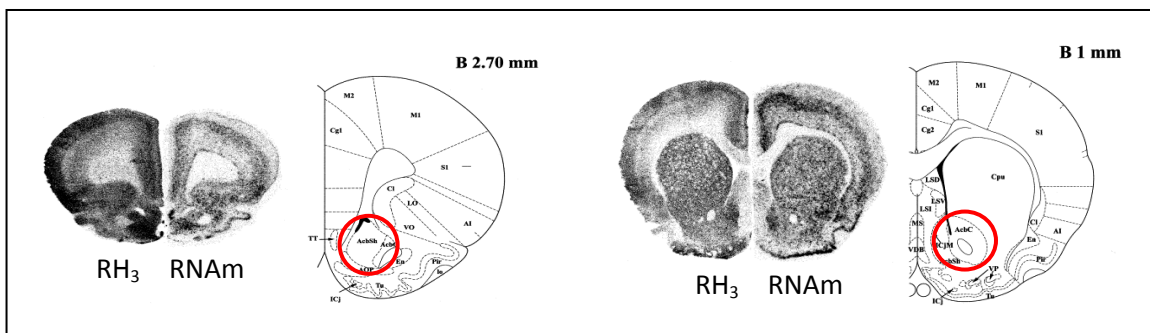


Figura 3. Distribución de los sitios de unión a [¹²⁵I]-Iodoproxifan y del RNAm del receptor a histamina H₃ (RH₃). Se muestran cortes coronales del cerebro de la rata con respecto a las coordenadas de Bregma AP (B). En el círculo rojo se observa la ubicación del núcleo accumbens. Tomado de Pillot y cols., 2002.

Se ha reportado que el RH₃ modula la síntesis y la liberación de dopamina en rebanadas del neostriado de la rata y del ratón (Molina-Hernández y cols., 2000; Schlicker y cols., 1993), y existe RNAm del receptor en las neuronas de la sustancia negra pars compacta (Pillot y cols., 2002), origen de las

proyecciones dopaminérgicas nigro-estriatales. Sin embargo, no se había detectado ni el RNAm ni la proteína traducida en el Área Ventral Tegmental (VTA, Pillot y cols., 2002), una región rica en neuronas dopaminérgicas que proyectan a la corteza prefrontal y en menor medida al neostriado, por lo que no se consideraba la presencia del RH₃ en las terminales dopaminérgicas del NAcc.

En el NAcc existen niveles altos tanto del RH₃ como de su RNAm (Pillot y cols., 2002), y recientemente mediante inmunodetección con un fluoróforo acoplado a un sistema de amplificación (TSA-Cy3, *tyramide signal amplification*) se ha detectado al RNAm tanto del RH₃ como de la enzima hidroxilasa de tirosina (TH) en neuronas del VTA. Además, se identificó la co-expresión del RH₃ y de la TH en el NAcc (Figura 4; González-Sepúlveda y cols., 2013), lo que sugiere que el RH₃ se encuentra también en las terminales dopaminérgicas del NAcc que provienen del VTA. En este sentido, un trabajo reciente indica que en el NAcc de la rata el RH₃ regula procesos de memoria a corto plazo al modular la liberación de glutamato y de acetilcolina (Kraus y cols., 2013). Sin embargo, experimentos de microdiálisis no apoyan la función del RH₃ como autorreceptor (Giannoni y cols., 2010; Munari y cols., 2013), y no se ha abordado su posible función como heterorreceptor en las aferentes que inervan al NAcc.

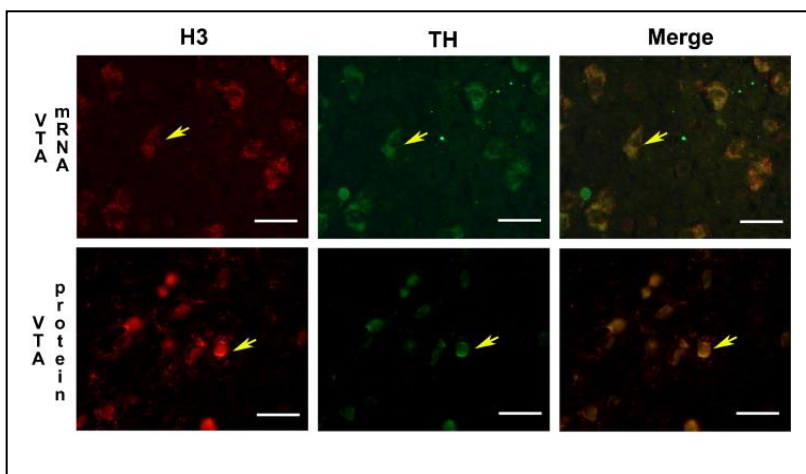


Figura 4. Co-localización del RNAm y de la proteína del receptor a histamina H₃ (H3) y de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental, VTA. Tomado de González-Sepúlveda y cols., 2013.

1.4 El núcleo accumbens (NAcc)

El NAcc es un núcleo neuronal que forma parte de los ganglios basales, los cuales están relacionados de manera directa con la conducta motora, aunque también se ha relacionado al NAcc con el sistema límbico (Pierce y Kumaresan, 2006). Se ha involucrado a este núcleo con los comportamientos dirigidos a objetivos, es decir, conductas motivadas a la obtención de un estímulo reforzante, por lo que se le identifica como una región altamente activa en la adquisición, mantenimiento y recaída de las adicciones (Koob y Volkow, 2010).

El NAcc se divide en dos secciones, denominadas central (*core*) y coraza (*shell*), caracterizadas por las distintas aferencias a cada una de ellas y por su funcionalidad. Sin embargo, ambas áreas están conformadas casi en su totalidad por el mismo tipo de neuronas e inter-neuronas (Humphries y Prescott, 2010). El NAcc se encuentra constituido, al igual que el neocórtex, hasta en un 95% por neuronas espinosas medianas (NEMs) GABAérgicas, pero también se encuentran presentes interneuronas GABAérgicas y colinérgicas. Al córtex dorsal se le denomina neocórtex (nuevo córtex) y al NAcc se le conoce como paleocórtex (viejo córtex), debido a los procesos funcionales en los cuales participa cada uno de ellos.

A semejanza del neocórtex, el NAcc recibe inervación dopaminérgica y glutamatérgica; sin embargo, las aferencias dopaminérgicas del NAcc provienen del VTA, región importante del circuito meso-córtico-límbico implicado en el control de las emociones y de la recompensa, y cuyo nombre se debe a la sobre-posición de las neuronas de las vías meso-límbica y meso-cortical (Fields y cols., 2007). Las aferencias glutamatérgicas que recibe el NAcc tienen origen en la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo (Wolf, 2010).

La actividad del NAcc ha sido analizada con estudios de imagenología (como la resonancia magnética funcional), los cuales muestran que el aumento en

la actividad de áreas específicas del NAcc puede ser relacionada con comportamientos particulares, como es el caso del uso de redes sociales, en el cual la activación de una pequeña área del NAcc del hemisferio izquierdo anticipa el uso de sitios *web* (Meshi y cols., 2013).

1.5 Transmisión dopaminérgica

La dopamina es un neurotransmisor importante en el SNC de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones, como la conducta motora, el sueño, el aprendizaje, la memoria y los mecanismos de recompensa (Aquino-Miranda y cols., 2012a; Lazarus y cols., 2012; Baudonnat y cols., 2013).

1.5.1 Síntesis. La dopamina es sintetizada por dos reacciones químicas secuenciales, la primera a partir del aminoácido L-tirosina, que es hidroxilado por la enzima hidroxilasa de tirosina (TH) generando L-DOPA, la que es descarboxilada por la enzima descarboxilasa de L-DOPA para formar a la dopamina (Daubner y cols., 2011). La presencia de la TH y su RNAm sirve como marcador de las neuronas catecolaminérgicas en el SNC (Dunkley y cols., 2004).

Se ha identificado a la TH como la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas. Esta enzima, al igual que las hidroxilasas de fenilalanina y de triptófano, depende de tetrahidrobiopterina (BH₄) como co-factor. La TH posee 4 sitios de fosforilación en su dominio regulador: las Serinas 8, 19, 31 y 40, siendo esta última la de mayor importancia, ya que su fosforilación aumenta de manera significativa la actividad de la TH. La fosforilación de la Serina³¹ también aumenta la actividad de la enzima; sin embargo, esta activación es menor que la ocasionada por la fosforilación de la Serina⁴⁰. Por otra parte, la fosforilación de la Serina¹⁹ no aumenta la actividad catalizadora de la enzima, pero si aumentan la probabilidad de que se fosforile la Serina⁴⁰, conociéndose este mecanismo como fosforilación jerárquica (Bobrovskaya y cols., 2004).

Debido a que la concentración en el líquido céfalo-raquídeo del sustrato L-tirosina satura a la enzima, la formación de dopamina dependerá casi de manera exclusiva de los niveles de TH activa que se encuentren en las terminales nerviosas dopaminérgicas (Dunkley y cols., 2004).

1.5.2 Liberación. Una vez sintetizada en el citosol de la terminal nerviosa, la dopamina es transportada al interior de vesículas sinápticas por un transportador (VAMT2), que utiliza al gradiente electroquímico generado por una bomba de protones (H^+). Posteriormente la dopamina es liberada por exocitosis inducida por la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje (Südhof, 2013).

La liberación de dopamina es regulada por autorreceptores, los cuales pertenecen a la familia D_2 (RD_2). Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas $G_{ai/o}$, teniendo como algunos de sus principales efectos inhibir la entrada de Ca^{2+} por medio de los complejos $G\beta\gamma$ y reducir la formación de AMPc por medio de la subunidad $G\alpha$ (Rice y cols., 2011). La inhibición de la entrada del catión Ca^{2+} reduce por lo tanto la liberación por exocitosis. La liberación de la dopamina también puede ser modulada por heterorreceptores, y en particular la activación del RH_3 , también acoplado a proteínas $G_{ai/o}$, inhibe la liberación del transmisor en rebanadas del neostriado del ratón (Schlicker y cols., 1993).

Las metanfetaminas inducen la liberación de dopamina en distintos núcleos del cerebro de los roedores (Bustamante, y cols., 2002; Lominac, y cols., 2012), debido a la interacción directa que tienen estas drogas con el transportador de dopamina y la facilitación de la liberación del neurotransmisor que se encuentra en las vesículas de la terminales nerviosas (Niwa y Nabeshima, 2011).

1.5.3 Captura. La dopamina liberada ve terminada su acción principalmente por su captura por un transportador selectivo (DAT, *dopamine transporter*), presente en las mismas terminales nerviosas de las cuales fue liberada. Este transportador pertenece a la familia de transportadores dependientes de

Na^+/Cl^- de 12 dominios transmembranales, y permite la captura de dopamina por medio del co-transporte de Na^+ y Cl^- con una estequiometría de 2 cationes y 1 anión por cada molécula de dopamina interiorizada (Borowsky y Hoffman, 1995). Existen inhibidores selectivos del DAT, como el GBR-12909, y es también inhibido, aunque con menor eficacia, por antidepresivos tricíclicos como la nomifensina y la desipramina. El DAT puede transportar otras monoaminas con menor afinidad, y su inhibición se refleja en un aumento en la concentración extracelular de dopamina extracelular (Torres y cols., 2003).

Los heterorreceptores pueden regular la transmisión dopaminérgica a nivel de transportador, y se ha reportado que antagonistas del RH_3 pueden aumentar la liberación de dopamina inducida por metanfetaminas, indicando una posible interacción entre el RH_3 y el DAT (Munzar y cols., 2004).

Se ha reportado una interacción entre los complejos $\beta\gamma$ de las proteínas $\text{G}\alpha_{i/o}$ y el extremo carboxilo terminal del DAT en el neostriado del ratón (García-Olivares y cols., 2013). En este mismo estudio se mostró que la sobreexpresión de complejos $\beta\gamma$ en células HEK-293 inhibe la captura de dopamina y que un activador de estos mismos complejos (mSIRK) también inhibe la captura.

1. 6 Receptor H_3 y transmisión dopaminérgica.

En 1993 Schlicker y cols. mostraron que la activación del RH_3 inhibía la liberación de dopamina en rebanadas del neostriado del ratón (Figura 5); este efecto fue potenciado por el bloqueo de los autorreceptores a dopamina D_2 con el antagonista haloperidol, indicando que en las terminales dopaminérgicas del neostriado del ratón existe modulación de la liberación de dopamina tanto por autorreceptores como por heterorreceptores (RH_3).

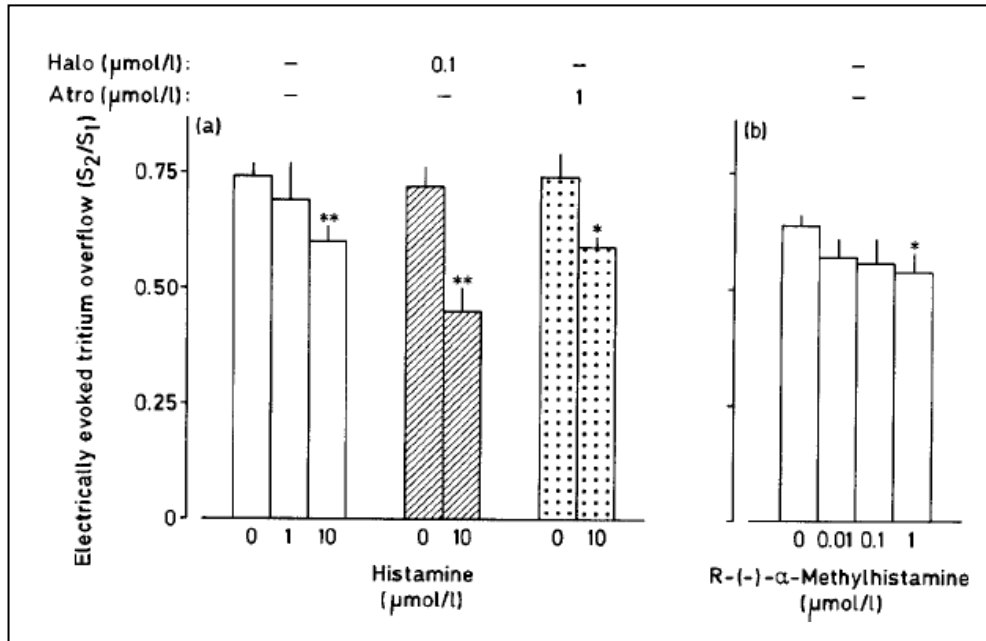


Figura 5. Inhibición por la histamina y un agonista del RH_3 ($\text{R}\alpha\text{MH}$) de la liberación de $[\text{}^3\text{H}]$ -dopamina inducida eléctricamente en rebanadas del neostriado del ratón. El bloqueo de los autorreceptores D_2 por haloperidol potencia el efecto inhibitorio de la activación del RH_3 . Tomado de Schlicker y cols., 1993.

Posteriormente nuestro grupo reportó un efecto inhibitorio de la activación del RH_3 en la síntesis de dopamina en rebanadas del neostriado de la rata (Molina-Hernández y cols., 2000), al inhibir la actividad de la enzima DOPA-d Descarboxilasa con el fármaco NSD-1015 (Figura 6). En ambos casos (Schlicker y cols., 1993; Molina-Hernández y cols., 2000), los resultados sugieren que el RH_3 estaría presente en las terminales nerviosas de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la sustancia negra parte compacta.

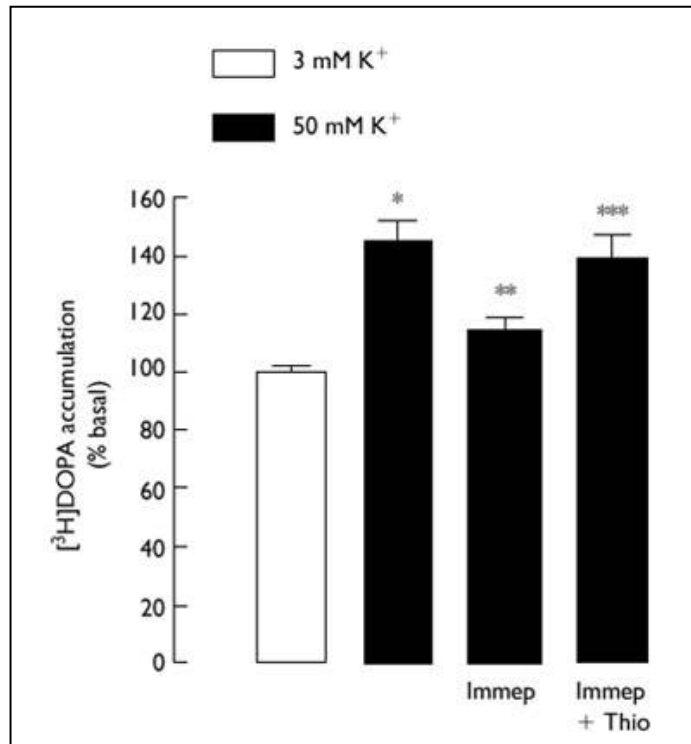


Figura 6. Inhibición de la acumulación de [³H]-DOPA inducida por despolarización por activación de RH₃ con el agonista immepip en rebanadas del neostriado de la rata. El efecto inhibitorio fue prevenido por el antagonista tioperamida. Tomado de Molina-Hernández y cols., 2000.

En este contexto, los antagonistas del RH₃ potencian la liberación de dopamina inducida por metanfetamina en el NAcc de la rata (Munzar y cols., 2004), lo que apoya que el receptor podría estar presente en las terminales nerviosas del NAcc de la rata y existir una interacción directa con el DAT para regular la transmisión dopaminérgica en este núcleo (Figura 7).

Como se mencionó antes, García-Olivares y cols. (2013) reportaron una interacción entre los complejos Gβγ de las proteínas Gα_{i/o} y el extremo carboxilo terminal del DAT, y en células HEK-293 la sobre-expresión de los dímeros Gβγ disminuye de manera significativa la captura de dopamina. Además, en terminales nerviosas del neostriado del ratón la activación de los complejos Gβγ inhibe la captura de dopamina. Dado que los RH₃ se encuentran acoplados

a proteínas $G\alpha_{i/o}$, los complejos $\beta\gamma$ liberados por la activación de este receptor podrían también interactuar con el DAT.

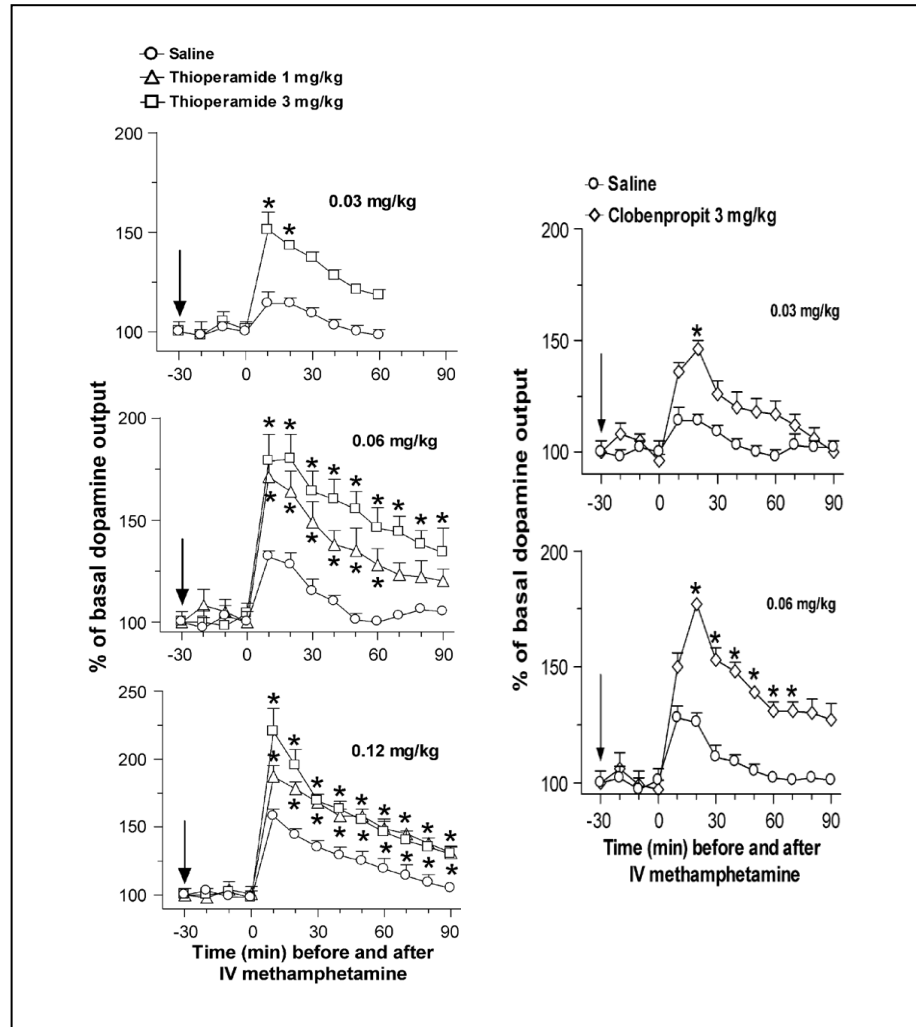


Figura 7. Fármacos antagonistas del RH_3 aumentan la liberación de dopamina inducida por metanfetamina en el núcleo accumbens de la rata. Se muestran experimentos de microdiálisis, utilizando a los antagonistas tioperamida y clobenpropit. Tomado de Munzar y cols., 2004.

2. Planteamiento del problema.

De acuerdo al estudio de Pillot y cols. (2002) el RNAm del RH₃ no se expresa en el VTA, sugiriendo que las neuronas dopaminérgicas que proyectan al NAcc no serían reguladas por la activación del RH₃. Sin embargo, un trabajo reciente (González-Sepúlveda y cols., 2013) indica que el RH₃ puede expresarse en las terminales dopaminérgicas del NAcc, al mostrar co-localización del RNAm del receptor y de la enzima TH en neuronas del VTA, así como co-localización en el NAcc de la proteína del RH₃ y de la TH.

Surge así la pregunta origen de esta tesis: ¿la activación de los receptores a histamina H₃ modula la transmisión dopaminérgica en las terminales nerviosas del núcleo accumbens provenientes del área ventral tegmental del cerebro de la rata?

Se ha mostrado que la activación del RH₃ inhibe la liberación de [³H]-dopamina inducida por estimulación eléctrica en rebanadas del neocórtex del ratón (Schlicker y cols., 1993). Sin embargo, datos de nuestro laboratorio y de Smits y cols. (1991) indican que la activación del RH₃ no modifica la liberación de [³H]-dopamina inducida por despolarización con alto K⁺ en rebanadas del neocórtex de la rata y del conejo, respectivamente.

Por otra parte, la activación de este mismo receptor inhibe la síntesis de dopamina inducida por despolarización química en rebanadas del neocórtex de la rata (Molina-Hernández y cols., 2000), efecto también observado en el estudio de González-Sepúlveda y cols. (2013). Además, el estudio de García-Olivares y cols. (2013) plantea la posibilidad de una interacción entre los complejos Gβγ, que en las terminales dopaminérgicas del NAcc provendrían de las proteínas Gα_{i/o} activadas por estimulación del RH₃, y el DAT, lo que resultaría en inhibición de la captura de dopamina.

Dado que no se dispone de información para el NAcc, en este trabajo planteamos analizar si la activación del RH₃ regula la transmisión dopaminérgica del núcleo, estudiando el posible efecto en la síntesis, la liberación y la captura de dopamina.

3. Hipótesis de trabajo.

Este proyecto se basó en la siguiente hipótesis:

La activación del RH₃ regula la transmisión dopaminérgica del núcleo accumbens de la rata, modulando la síntesis, la liberación y/o la captura de dopamina.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo general

Determinar si la activación del RH₃ modula la síntesis, la liberación y/o la captura de dopamina en el núcleo accumbens de la rata.

4.2 Objetivos específicos

1. Confirmar la presencia del RH₃ en membranas del núcleo accumbens de la rata, y determinar su afinidad por ligandos selectivos del RH₃.
2. Determinar el efecto de la activación del RH₃ en la captura de dopamina por terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) del núcleo accumbens.
3. Determinar el efecto de la activación del RH₃ en la liberación de [³H]-dopamina inducida por despolarización en rebanadas del núcleo accumbens.
4. Determinar el efecto de la activación del RH₃ en la síntesis de dopamina en rebanadas del núcleo accumbens.

5. Métodos.

5.1 Obtención de rebanadas del núcleo accumbens (NAcc)

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g; 4-6 ratas por experimento) las cuales fueron decapitadas para extraer rápidamente el encéfalo del cráneo. Con un vibratomo se obtuvieron rebanadas coronales de 300 μm de grosor, de las cuales se disecó el NAcc bajo inspección con un microscopio.

5.2 Obtención de terminales nerviosas (sinaptosomas)

Las rebanadas del NAcc se homogenizaron en una solución de sacarosa (0.32 M) amortiguada con Hepes (5 mM, pH 7.4 a 4°C) utilizando un homogenizador de vidrio (10 golpes, 400 rpm). El homogenado se centrifugó a 1,000xg por 10 min y el sobrenadante fue centrifugado a 20,000xg por 20 min. La pastilla se resuspendió en 8 ml de la solución de homogenización, los cuales se depositaron sobre 20 ml de una solución de sacarosa (0.8 M) y Hepes (5 mM; pH 7.4 a 4°C). Después de centrifugar a 20,000xg durante 20 min, la pastilla resultante (sinaptosomas) se re-suspendió en la solución correspondiente a cada ensayo.

5.3 Unión de [³H]-N-metilhistamina ([³H]-NMHA) a membranas sinaptosomales del NAcc

Los sinaptosomas fueron lisados por incubación (15 min, 4°C) en una solución hipotónica (10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, pH 7.4). La suspensión fue centrifugada a 20,000xg por 20 min, y la pastilla resultante (membranas sinaptosomales) fue resuspendida en la solución de incubación (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4).

El análisis de saturación se llevó a cabo en 100 μ l de solución de incubación conteniendo [3 H]-NMHA (0.05-8 nM) y ~20 μ g de proteína. Después de 60 min a 30°C, la incubación fue terminada por filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B remojados (2 h) en 0.3% de polietilenimina. La unión no específica se determinó en presencia de histamina (10 μ M). El contenido de tritio fue determinado por centellometría, y la unión específica se calculó al sustraer la unión no específica de la unión total. Los datos se ajustaron a una hipérbola con el programa Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego CA).

Para el análisis de inhibición las membranas (~20 μ g de proteína) se incubaron en 100 μ l de solución de incubación conteniendo [3 H]-NMHA (3 nM), y concentraciones crecientes de ligandos del RH₃ (RAMH, ciproxifan y clobenpropit). Después de 60 min a 30°C la incubación se terminó como se describió antes. Los datos obtenidos se ajustaron a una ecuación logística (ecuación de Hill) con el programa Prism 5. Las constantes de inhibición (K_i) fueron determinadas con la ecuación $K_i = IC_{50} / 1 + \{D/K_d\}$, donde D es la concentración de [3 H]-NMHA presente en el ensayo y K_d es la constante de disociación obtenida de los experimentos de saturación.

5.4 Captura de [3 H]-dopamina por sinaptosomas

Los sinaptosomas fueron resuspendidos en solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH) y alícuotas de la suspensión (140 μ l) se colocaron en tubos de plástico. Los inhibidores de captura o el agonista del RH₃ (RAMH) fueron adicionados en un volumen de 10 μ l. Después de incubar durante 10 min a 37°C se adicionaron 50 μ l de la solución KRH conteniendo [3 H]-dopamina para obtener una concentración final de 30 nM. La incubación se continuó por 30 min a 37°C y se terminó por filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B remojados previamente en 0.3% de polietilenimina. Los filtros se lavaron 3 veces con 1 ml de la solución KRH fría antes de ser colocados en 3 ml de líquido de centelleo. La captura no específica fue determinada en muestras

incubadas a 4°C o en presencia de GBR-12909 (1 µM). La composición de la solución KRH fue (mM): NaHCO₃ 25, KCl 3, MgCl₂ 1, KH₂PO₄ 1, CaCl₂ 1.8, D-glucosa 11, Hepes 20; pH 7.4 con NaOH.

5.5 Liberación de [³H]-dopamina por rebanadas del NAcc

Las rebanadas del NAcc fueron lavadas y estabilizadas durante 30 min a 37°C en solución Krebs-Henseleit (KH) normal (en mM: NaCl 126, KCl 3, MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 1.8, D-glucosa 11; pH, 7.4 después de saturar con O₂/CO₂, 95:5%). Posteriormente las rebanadas fueron colocadas en 2 ml de solución KH conteniendo [³H]-dopamina (50 nM) e incubadas por 30 min a 37°C. Para inhibir la degradación de la [³H]-dopamina, la solución contuvo 200 µM de pargilina y 200 µM de ácido ascórbico. Para prevenir la captura por las terminales noradrenérgicas y serotoninérgicas se agregaron desipramina y fluoxetina, ambas a una concentración de 1 µM (ver resultados).

Después del periodo de marcado las rebanadas fueron lavadas con solución KH para eliminar la [³H]-dopamina no capturada, y se colocaron en las cámaras de un equipo de perfusión (de 10 a 15 cámaras por experimento con 2 o 3 rebanadas cada una) para ser perfundidas con medio KH (1 ml/min) conteniendo GBR-12909 (1 µM). Después de 20 min se colectaron 15 muestras de 1 ml cada una. La liberación de [³H]-dopamina fue inducida cambiando la solución de perfusión a una solución KH con una alta concentración de K⁺ (30 mM). Los fármacos bajo estudio estuvieron presentes 5 min antes y durante la segunda estimulación con K⁺. En los experimentos de dependencia de Ca²⁺ el protocolo fue el de una sola estimulación de 1 min con alto K⁺, y las rebanadas fueron perfundidas con solución KH normal (1.8 mM CaCl₂) o solución sin la adición de CaCl₂.

El tritio contenido en cada una de las muestras fue determinado por centellometría después de agregar 3 ml de líquido de centelleo. Se recuperaron las rebanadas al final del experimento y se les agregó 0.5 ml de HCl (1 M) para

determinar el contenido remanente de tritio después de 1 h. Los valores de cada una de las muestras fueron normalizados con respecto a la cantidad de [³H]-dopamina remanente en las rebanadas, y posteriormente con base en el valor de la primera muestra basal. Se determinó el área bajo las curvas de las 2 estimulaciones con 30 mM de K⁺, y el efecto de los fármacos se analizó mediante el cociente entre la liberación inducida por la segunda despolarización (S2) y la liberación inducida por el primer estímulo (S1), de manera tal que cada muestra es el control de sí misma. El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 5.

5.6 Síntesis de L-DOPA en rebanadas del NAcc

Las rebanadas del NAcc fueron lavadas con solución KH normal e incubadas durante 30 min a 37°C en la misma solución. Posteriormente 2 ó 3 rebanadas (~300 µg de proteína) fueron colocadas en 250 µl de solución KH conteniendo L-tirosina (200 µM) y NSD-1015 (m-hidroxibenzilhidrazina, 1 mM). Después de 10 min a 37°C se colocaron los ligandos del RH₃, y 5 min después se agregaron 250 µl de solución KH con o sin 20 µM de forskolina. La incubación fue terminada 15 min después con 1 ml de KH a 4°C. Se aspiró el medio de cada muestra y se colocaron 250 µl de HClO₄ (0.4 M, 0.2% EGTA, 0.05% NA₂S₂O₂). Después de 60 min a 4°C se agregaron 50 pmoles de adrenalina por muestra como estándar interno, y las rebanadas fueron homogenizadas con un homogenizador de vidrio. Los homogenados se centrifugaron a 15,000xg durante 10 min a 4°C, el sobrenadante fue filtrado a través de filtros Millex-GV de 0.22 µm de poro, y las muestras obtenidas fueron procesadas por HPLC para determinar la presencia de L-DOPA, dopamina y adrenalina. Las pastillas resultantes de la última centrifugación fueron incubadas con NaOH (0.1 N) durante 24 h para determinar los niveles de proteína por el método de BCA, utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

5.7 Análisis por HPLC de los niveles de L-DOPA, dopamina y adrenalina.

Los niveles de L-DOPA, dopamina y adrenalina fueron analizados usando cromatografía líquida de alta resolución (Altech, bomba HPLC, Modelo: 626) acoplada a un detector electroquímico (ESA, Modelo: Coulochem III). Los parámetros utilizados durante la detección fueron los siguientes: celda guardia +350 mV (ESA 5020); celda analítica (ESA 5011A) con potenciales E1 +200 mV y E2 -200 mV. Los picos obtenidos en los cromatogramas de las muestras fueron interpolados con base en una curva patrón obtenida con 5 estándares de L-DOPA, dopamina y adrenalina. Se utilizó una columna analítica microboro (BASi) de 100 x 2 mm y de 3 μm de tamaño de partícula. La fase móvil consistió de una solución amortiguadora de fosfato monosódico (29 mM, pH 3) conteniendo octil-sulfato de sodio (3.5 mM), EDTA (0.43 mM), tetrahidrofurano (0.6 mM) y metanol (16.5% v/v). El flujo fue 0.3 ml/min.

6. Resultados

6.1 Unión de [³H]-NMHA a membranas sinaptosomales del NAcc de la rata

Los ensayos de saturación en membranas de rebanadas y sinaptosomas del NAcc de la rata (Figura 8) indicaron valores de unión máxima (B_{max}) de 270 ± 24 fmol/mg y 197 ± 19 fmol/mg, respectivamente (promedio ± error estándar, s.e.m., de 3 ó 4 determinaciones).

Los valores de la constante de disociación (K_d) fueron 0.76 nM (pK_d 9.117 ± 0.0062) y 1.33 nM (pK_d 8.876 ± 0.088) para membranas de rebanadas y sinaptosomas, respectivamente, sin diferencia estadística entre ellos (*P* = 0.069, prueba *t* de Student).

La unión específica de [³H]-NMHA fue inhibida por los ligandos selectivos del RH₃ RAMH, clobenpropit y ciproxifan de manera dependiente de la concentración, tanto en membranas de rebanadas del NAcc como en membranas provenientes de sinaptosomas del NAcc (Figura 9). Los logaritmos negativos de las constantes de inhibición (pK_i) se muestran y se comparan en la Tabla 1. El análisis estadístico mostró diferencia significativa para los valores de pK_i del antagonista/agonista inverso del RH₃ ciproxifan entre las membranas de rebanadas y las membranas de sinaptosomas, sin diferencia para el agonista RAMH y el antagonista/agonista inverso clobenpropit.

En conjunto, estos experimentos confirmaron la presencia del RH₃ en las terminales nerviosas del NAcc de la rata y permitieron determinar su afinidad por los ligandos a emplear en los ensayos funcionales.

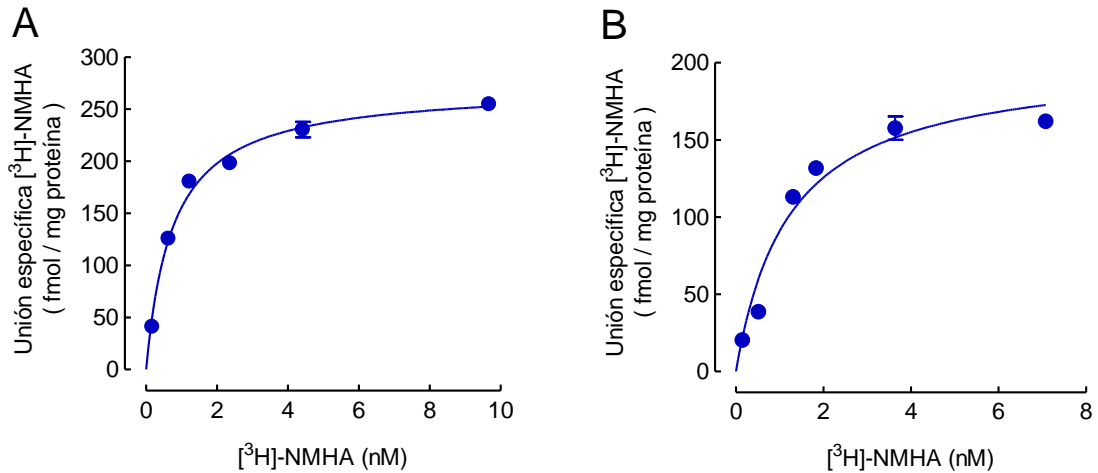


Figura 8. Unión de [³H]-NMHA a membranas del NAcc de la rata. Las membranas se incubaron con las concentraciones indicadas de [³H]-NMHA y la unión específica se determinó sustrayendo la unión en presencia de 10 μ M de histamina de la unión total. A) Membranas obtenidas de rebanadas del NAcc. B) Membranas obtenidas de sinaptosomas del núcleo. Los valores son el promedio \pm error estándar (s.e.m.) de determinaciones por triplicado de experimentos representativos, repetidos 3 veces. La línea es el mejor ajuste a una hipérbola. Los valores de Bmax y KD se indican en el texto.

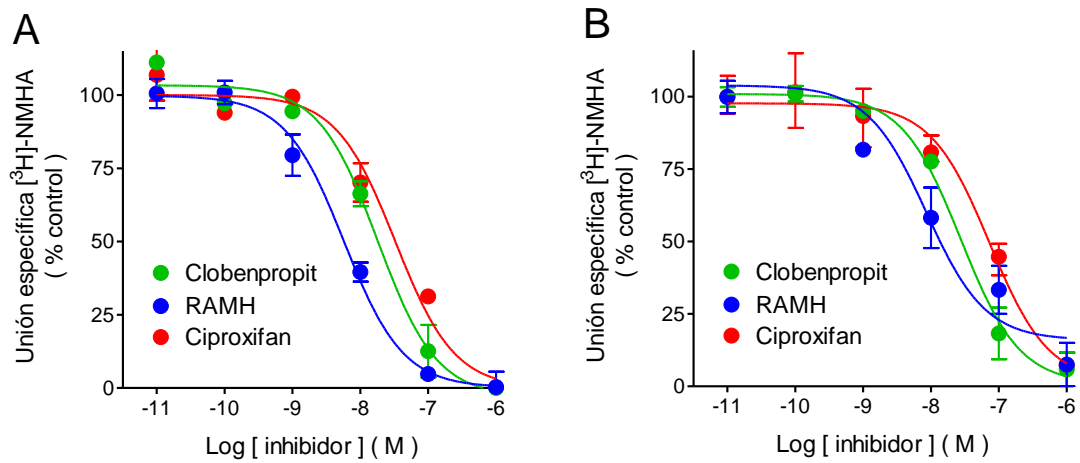


Figura 9. Inhibición por ligandos del RH₃ de la unión de [³H]-NMHA a membranas del NAcc de la rata. Las membranas fueron incubadas en presencia de [³H]-NMHA (3 nM) y las concentraciones indicadas de los fármacos. A) Membranas obtenidas de rebanadas del NAcc. B) Membranas obtenidas de sinaptosomas del núcleo. Las líneas son el mejor ajuste a una ecuación logística para un modelo de un sitio. Se muestran experimentos representativos. Los valores de pKi se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Afinidad por ligandos selectivos del receptor a histamina H₃ del núcleo accumbens de la rata.

	pKi Membranas de rebanadas (n)	pKi Membranas de sinaptosomas (n)	<i>P</i>
Clobenpropit	8.427 ± 0.195 (4)	8.345 ± 0.106 (3)	0.753
RAMH	9.169 ± 0.179 (4)	8.712 ± 0.072 (3)	0.092
Ciproxifan	8.569 ± 0.082 (3)	7.798 ± 0.074 (4)	0.001

Los valores son el promedio ± s.e.m. del número indicado de experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.2 Captura de [³H]-dopamina por sinaptosomas del NAcc

La Figura 10 muestra que la captura de [³H]-dopamina por sinaptosomas del NAcc fue inhibida de manera dependiente de la concentración por GBR-12909 (un bloqueador selectivo del DAT), así como por desipramina y fluoxetina, inhibidores selectivos de los transportadores de noradrenalina (NET) y de serotonina (SERT), respectivamente. Sin embargo, la comparación de las potencias de los inhibidores (GBR-12909: pKi 8.62 ± 0.15; desipramina: pKi 5.03 ± 0.30; fluoxetina: pKi 5.41 ± 0.11) indica que la captura de [³H]-dopamina se debe primordialmente a las terminales nerviosas dopaminérgicas.

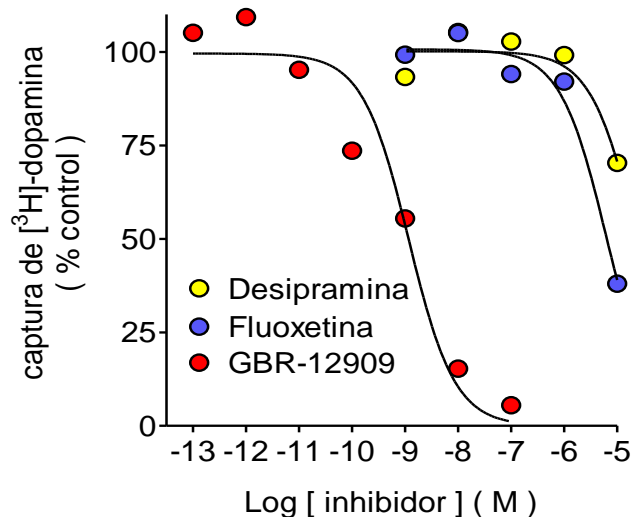


Figura 10. Captura de $[^3\text{H}]$ -dopamina por sinaptosomas del NAcc de la rata. Los sinaptosomas fueron incubados (30 min, 37°C) con $[^3\text{H}]$ -dopamina (30 nM), en ausencia o presencia de los inhibidores indicados, adicionados 10 min antes. La captura de $[^3\text{H}]$ -dopamina se expresa como porcentaje del control después de la sustracción de la captura no específica, determinada a 4°C . La línea es el mejor ajuste a una ecuación logística para un modelo de un sitio. Se muestra un experimento representativo. Los valores son el promedio de determinaciones por duplicado.

6.3 Efecto de la activación del RH_3 en la captura de $[^3\text{H}]$ -dopamina

La captura de $[^3\text{H}]$ -dopamina por los sinaptosomas del NAcc de la rata no se vio afectada de manera significativa por la presencia de RAMH, un agonista selectivo del RH_3 (Figura 11). A las concentraciones más altas (0.1 y $1\ \mu\text{M}$), se aprecia una disminución modesta, pero no significativa, de la captura.

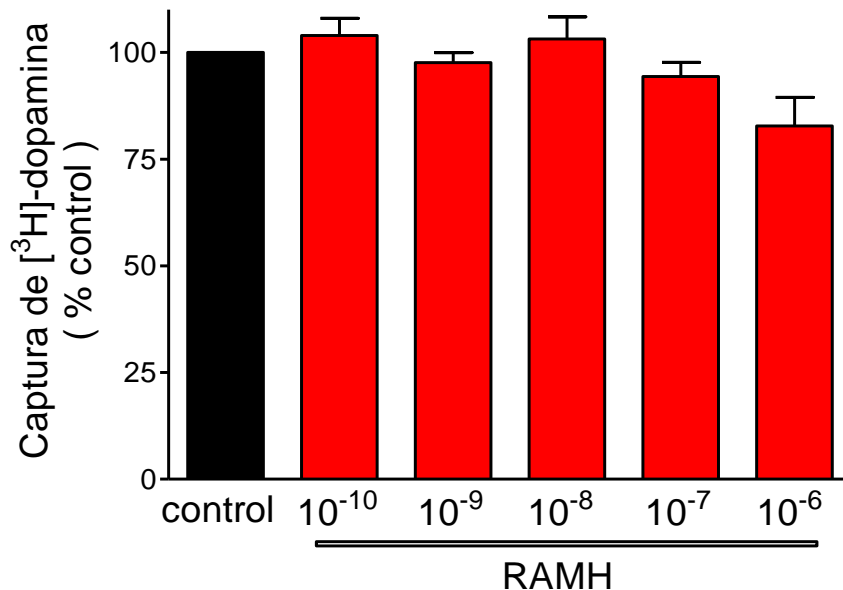


Figura 11. Efecto del agonista del RH₃ RAMH en la captura de [³H]-dopamina por sinaptosomas del NAcc. Los sinaptosomas fueron incubados por 30 min con [³H]-dopamina (30 nM), ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de RAMH, adicionada 10 min antes. La captura de [³H]-dopamina se expresa como porcentaje del control y los valores son el promedio \pm s.e.m. de 3 experimentos. Ninguno de los valores en presencia de RAMH fue estadísticamente diferente del control (ANOVA de una vía y prueba de Dunnett).

6.4 Efecto de la activación del RH₃ en la liberación de [³H]-dopamina en rebanadas del NAcc de la rata

La despolarización con 30 mM de K⁺ indujo la liberación de [³H]-dopamina en rebanadas del NAcc de la rata, la cual fue reducida en $89.4 \pm 1.2\%$ en un medio sin CaCl₂ (Figura 12A), indicando que la liberación se debe primariamente a exocitosis.

El agonista del RH₃ RAMH (1 μ M) inhibió de manera modesta la liberación de [³H]-dopamina inducida por K⁺ ($91.4 \pm 4.5\%$ del control), pero este efecto no fue estadísticamente significativo (Figura 12B).

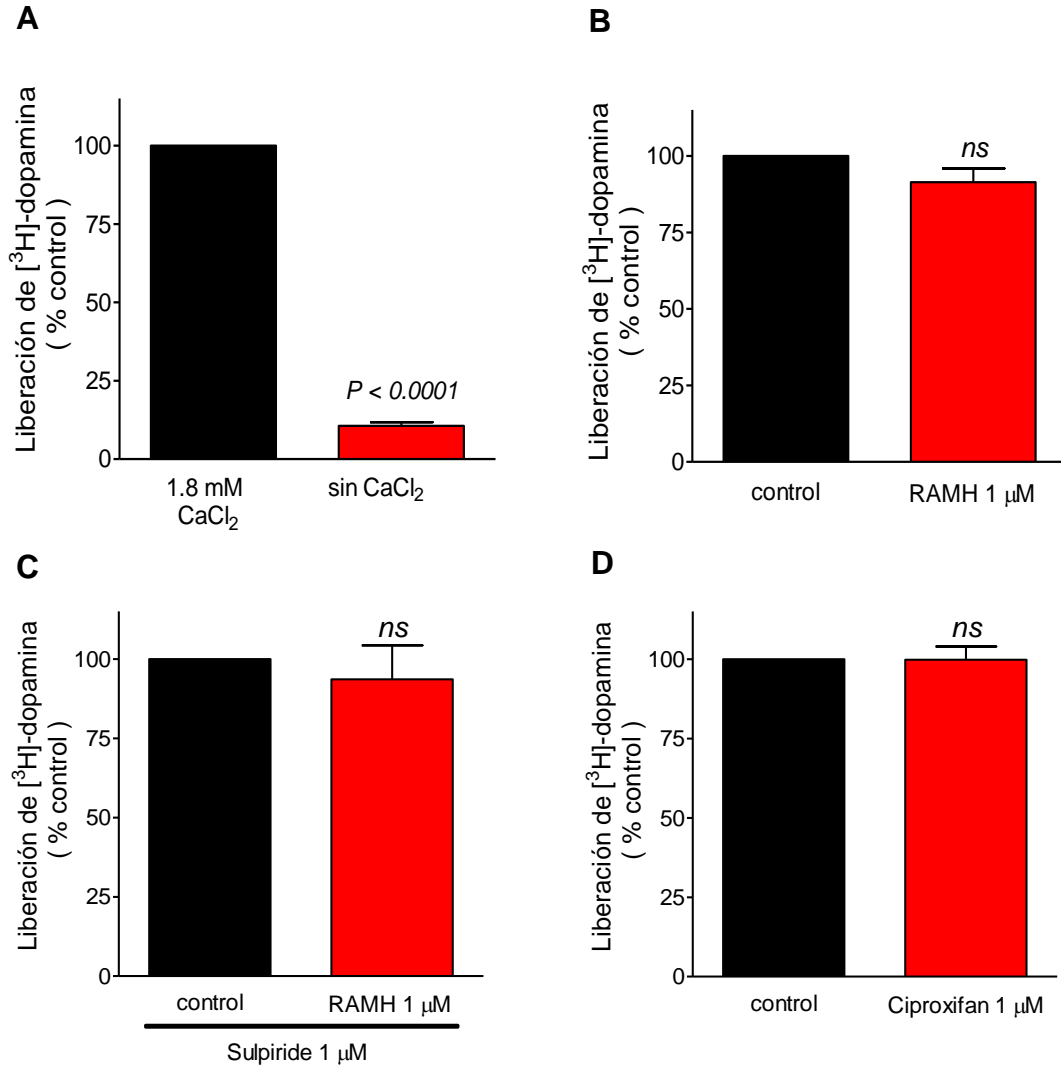


Figura 12. Efecto del agonista del RH₃ RAMH en la liberación de [³H]-dopamina por rebanadas del NAcc de la rata. Las rebanadas fueron marcadas con 50 nM de [³H]-dopamina y perfundidas con solución KH normal (4 mM K⁺). La liberación del neurotransmisor fue inducida con un pulso (dependencia de Ca²⁺) o con un doble pulso despolarizante con una solución KH con alto K⁺ (30 mM). A) Dependencia del Ca²⁺ de la liberación de [³H]-dopamina. Promedios ± s.e.m. de 3 experimentos. B) Ausencia de efecto del agonista RAMH. Promedios ± s.e.m. de 8 experimentos. C) Ausencia de efecto del agonista RAMH en presencia de un antagonista de los receptores D₂ (sulpiride). Promedio ± s.e.m. de 3 experimentos. D) Ausencia de efecto del antagonista/agonista inverso ciproxifan. Promedios ± s.e.m. de 3 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

En rebanadas del neostriado del ratón, la inhibición por activación del RH₃ de la liberación de [³H]-dopamina fue potenciada por el bloqueo de los autorreceptores D₂ (Schlicker y cols., 1993). En experimentos con rebanadas del NAcc de la rata la presencia de sulpiride, un antagonista de los receptores D₂, indujo un aumento en la liberación de [³H]-dopamina (168.8 ± 15.5% de los valores control, 3 experimentos), pero no se observó un efecto significativo del agonista del RH₃ RAMH (93.6 ± 10.7% del control, Figura 12C).

Una posible explicación para la ausencia de efecto del agonista del RH₃ sería una alta actividad constitutiva del receptor (Arrang y cols., 2007). Sin embargo, en 3 experimentos el ciproxifan, un potente agonista inverso del RH₃, no modificó la liberación de [³H]-dopamina (99.8 ± 4.1% del valor control, Figura 12D).

Como se mencionó antes, los resultados de Schlicker y cols. (1993; ver Figura 5) fueron obtenidos en rebanadas del neostriado del ratón, por lo que se realizaron experimentos con rebanadas del NAcc de esta especie. La Figura 13 muestra que liberación de [³H]-dopamina inducida por despolarización no fue afectada de manera significativa por el agonista RAMH (1 µM), ni por los antagonistas/agonistas inversos ciproxifan (5 µM) y A-331440 (1 µM).

6.5 Efecto de la activación del RH₃ en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata.

Una vez sintetizada la dopamina es transportada al interior de las vesículas presentes en las terminales nerviosas (Bahena-Trujillo y cols., 2000), por lo que existe dopamina almacenada en estas vesículas. Para determinar la síntesis del transmisor sin que la dopamina ya formada interfiriera en esta medición, se evaluó la acumulación de L-DOPA como un indicador de la síntesis de dopamina al inhibir a la enzima descarboxilasa de L-DOPA con el fármaco NSD-1015 (Molina-Hernández, 2000).

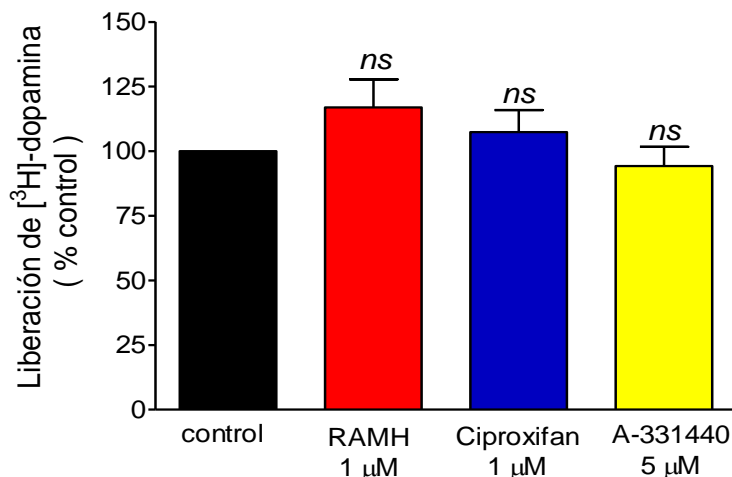


Figura 13. Liberación de [3H]-dopamina por rebanadas del NAcc del ratón. Las rebanadas fueron incubadas con 50 nM de [3H]-dopamina y perfundidas con solución KH normal (4 mM K⁺) en presencia o ausencia de los ligandos indicados del RH₃. La liberación fue inducida al aumentar la concentración de K⁺ a 30 mM. Los valores son el promedio ± s.e.m de 3 experimentos. El análisis estadístico se realizó con Anova de una vía y la prueba de Tukey.

La activación de las enzimas adenilil ciclasas (ACs) aumenta la síntesis de dopamina en el NAcc de la rata (Moser y cols., 1999; Onali y Olanas 1989). Las ACs forman AMPc a partir del ATP, y el aumento en la concentración intracelular del segundo mensajero resulta en incremento de la actividad de la PKA, la cual fosforila y activa a la TH induciendo una mayor síntesis del transmisor (Daubner y cols., 2011). La forskolina es un activador directo de las ACs y, como muestra la Figura 14, a una concentración de 10 μM aumentó la acumulación de L-DOPA a 210.0 ± 10.4% del valor control.

La Figura 15A ilustra que concentraciones de 1 a 10 nM del agonista del RH₃ RAMH no modificaron la acumulación de L-DOPA, pero que concentraciones mayores (100 nM y 1 μM), inhibieron de manera significativa dicha acumulación (-41.1 ± 6.5% y -43.5 ± 9.1%, respectivamente). El análisis de la curva concentración-respuesta indicó una IC₅₀ de 33.2 nM (Figura 15B), 20 veces mayor que la Ki obtenida para el agonista RAMH (1.62 nM) en los ensayos de unión de radioligando (ver Tabla 1).

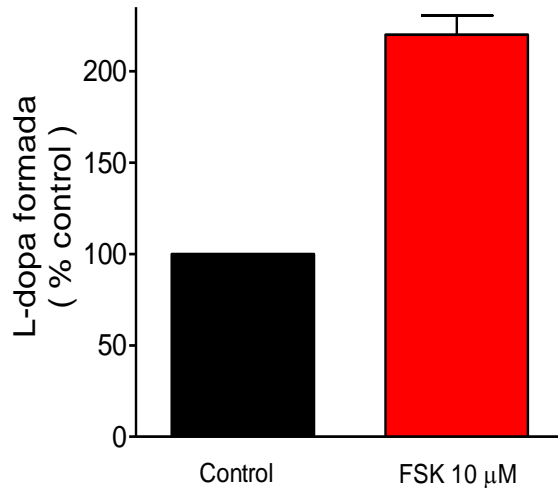


Figura 14. Acumulación de L-DOPA inducida por forskolina en rebanadas del NAcc de la rata. Las rebanadas fueron incubadas con forskolina (10 μ M, 15 min, 37°C), en presencia de L-tirosina (200 μ M) y NSD-1015 (1 mM), adicionados 15 min antes. La formación de L-DOPA se expresa como porcentaje del control. Los valores son el promedio \pm s.e.m. de 12 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

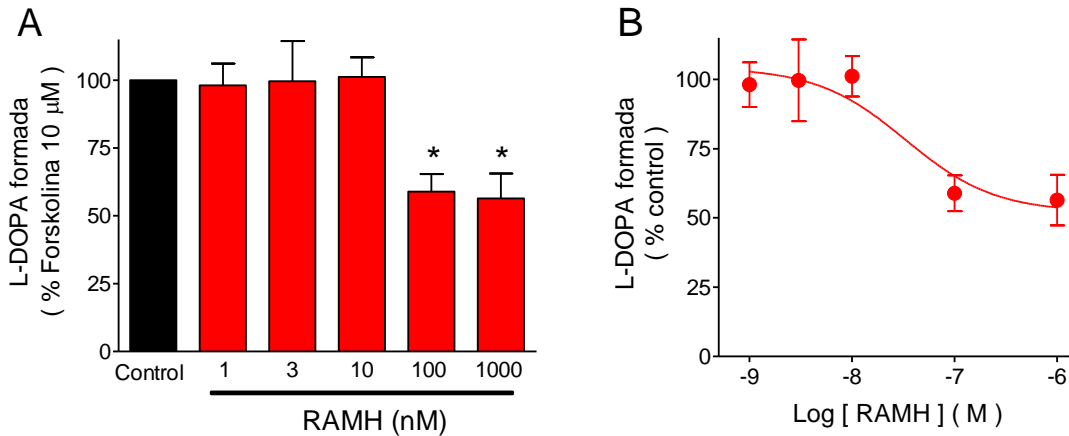


Figura 15. Efecto del agonista del RH₃ RAMH en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata. Las rebanadas fueron incubadas durante 15 min en solución KH conteniendo 200 μ M de L-tirosina y 1 mM de NSD-1015. La formación de L-DOPA se estimuló con forskolina (10 μ M, 15 min) en presencia o ausencia de RAMH a las concentraciones indicadas, adicionada 5 min antes. A) La acumulación de L-DOPA se expresa como porcentaje del efecto de la forskolina (basal sustraída). Los valores son el promedio \pm s.e.m. de 4 experimentos. * $P < 0.05$; ANOVA y prueba de Tukey. B) Análisis de de la curva concentración respuesta. Los valores son el promedio \pm s.e.m. de los datos de 4 experimentos.

La inhibición por RAMH (100 nM) de la acumulación de L-DOPA inducida por forskolina fue prevenida por el antagonista/agonista inverso del RH₃ ciproxifan (10 μM; Figura 16). Este resultado indica que el efecto inhibitorio de la RAMH se debe a la activación del RH₃ y no a efectos inespecíficos del fármaco. Por sí mismo el antagonista/agonista inverso ciproxifan (10 μM), no tuvo efecto significativo en la formación de L-DOPA (Figura 8), indicando que el RH₃ presente en las terminales dopaminérgicas del NAcc no presenta actividad constitutiva.

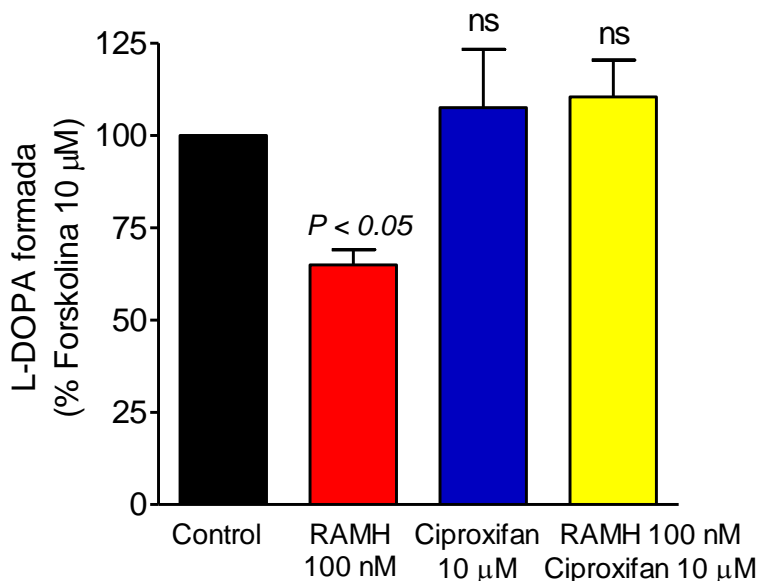


Figura 16. Bloqueo por ciproxifan del efecto del agonista RAMH en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata. La formación de L-DOPA se indujo con forskolina (10 μM; 15 min) en presencia o ausencia del agonista del RH₃ RAMH (100 nM) y/o del antagonista/agonista inverso ciproxifan (10 μM), adicionados 5 y 10 min previos a la estimulación. Los valores son el promedio ± s.e.m. de 5 experimentos. El análisis estadístico se realizó con Anova de una vía y la prueba de Tukey.

Las ACs pueden tener actividad tónica que resulta en la formación de AMPc, y la concentración de AMPc está también regulada por la actividad de las fosfodiesterasas (Sunahara y Taussing, 2002). En rebanadas del NAcc la incubación con IBMX, un inhibidor de fosfodiesterasas, aumentó de manera significativa la acumulación de L-DOPA ($324 \pm 53\%$ del valor control; Figura 17A), indicando que las ACs que se encuentran en el NAcc de la rata tienen actividad constitutiva que podría modular la síntesis de dopamina. La activación del RH₃ con el agonista RAMH (100 nM) inhibió de manera modesta pero significativa ($-14.1 \pm 2.3\%$) la acumulación de L-DOPA inducida por IBMX (1 mM; Figura 17B). La activación de los receptores a dopamina D₂ con el agonista quinpirole (10 μ M) inhibió marcadamente la acumulación de L-DOPA inducida por IBMX ($-76.3 \pm 11.5\%$; Figura 17C).

El polipéptido hipofisario activador de las adenilil ciclasas (PACAP, *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*) se expresa abundantemente en los sistemas nerviosos central y periférico (Vaudry y cols., 2000). Los receptores a este péptido (VPAC₁, VPAC₂ y PAC₁) se acoplan a proteínas G α_s , y por lo tanto su activación aumenta los niveles intracelulares de AMPc (Thomas y cols., 2013). En el cerebro de la rata, y específicamente en el NAcc, existe una abundante expresión tanto del PACAP como de los receptores VPAC₂ y PAC₁ (Ghatei y cols., 1993; Hashimoto y cols., 1996), y la activación de los estos receptores aumenta la actividad de la enzima TH a través de la vía AMPc/PKA (Moser y cols., 1999). En este trabajo, la incubación de rebanadas del NAcc con PACAP-27 (1 μ M) aumentó la acumulación de L-DOPA de manera significativa ($148.9 \pm 10.0\%$ del valor control, Figura 18). La activación del RH₃ con el agonista RAMH (100 nM) inhibió por completo el efecto del PACAP-27 ($107.2 \pm 16.1\%$ del valor control, Figura 18).

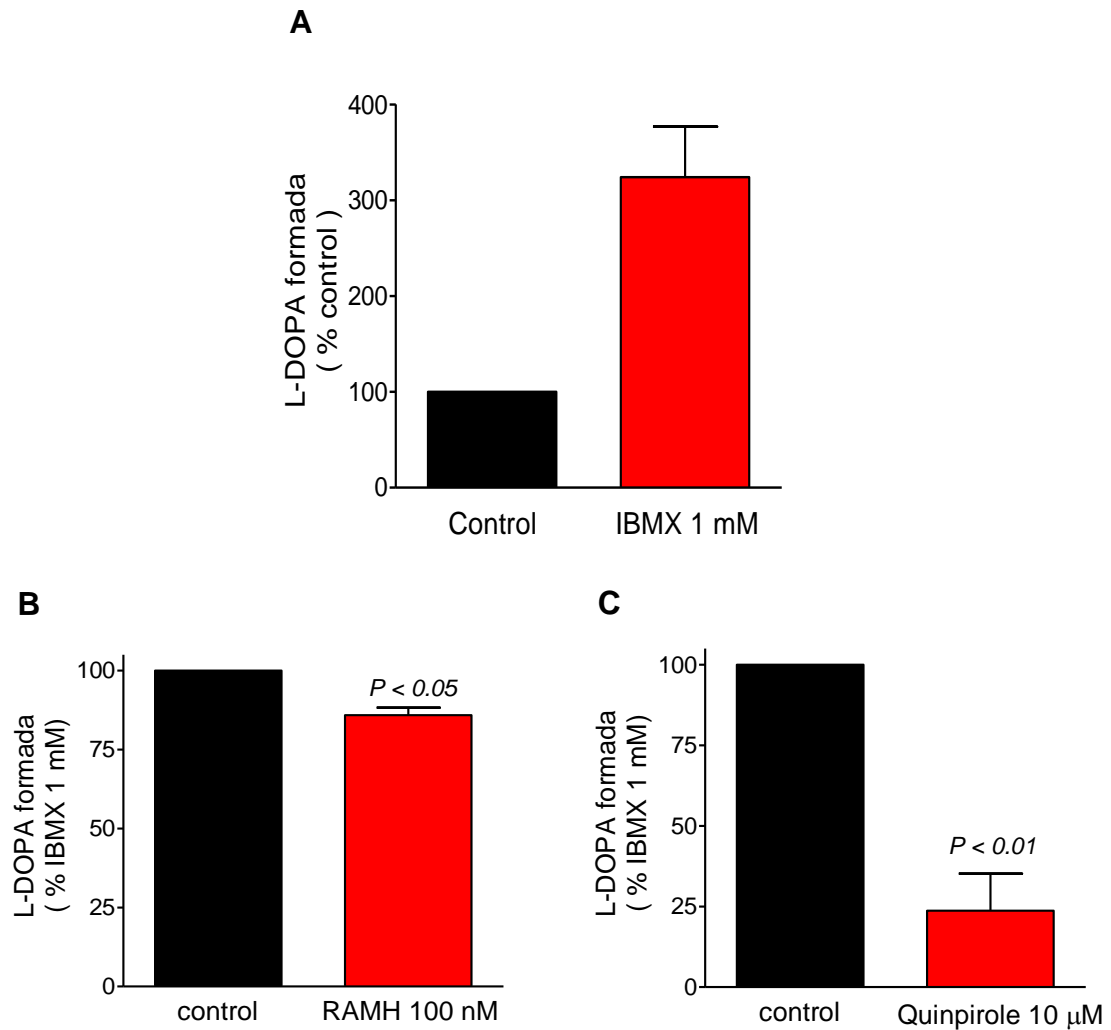


Figura 17. Efecto de la inhibición de las fosfodiesterasas en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata. Las rebanadas fueron incubadas con IBMX (1 mM, 15 min, 37°C), en presencia de L-tirosina (200 μM) y NSD-1015 (1 mM), adicionados 15 min antes. A) Acumulación de L-DOPA inducida por IBMX. La formación de L-DOPA se expresa como porcentaje del control. Los valores son el promedio ± s.e.m. de 3 experimentos. B) Efecto del agonista del RH₃ RAMH en la acumulación de L-DOPA inducida por IBMX. La formación de L-DOPA se expresa como porcentaje del efecto del IBMX (basal sustraída). Los valores son el promedio ± s.e.m. de 4 experimentos. C) Efecto del agonista del receptor a dopamina D₂ quinpirole en la acumulación de L-DOPA inducida por IBMX. Los valores son el promedio ± s.e.m. de 3 experimentos. El análisis estadístico para las 3 series de experimentos se realizó con la prueba *t* de Student.

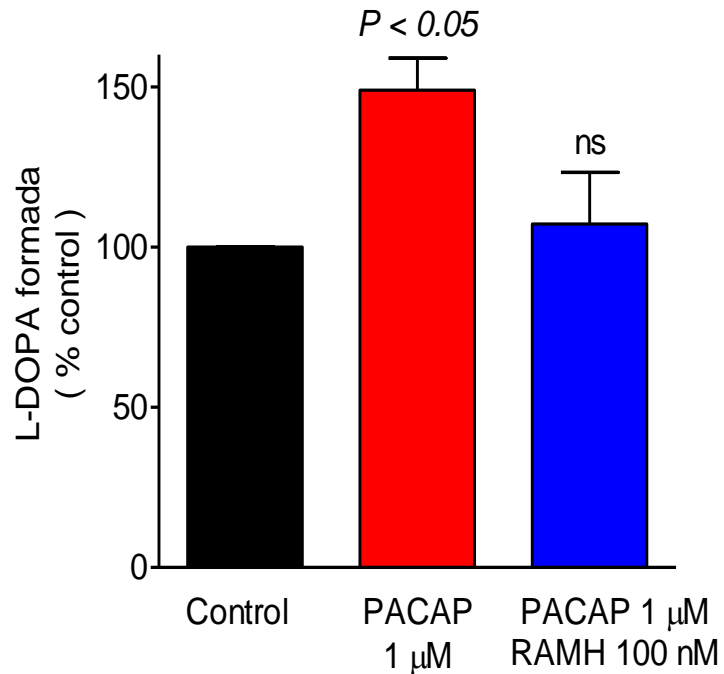


Figura 18. Efecto de la activación de los receptores a PACAP y RH₃ en la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata. Las rebanadas fueron incubadas con PACAP-27 (1 μM, 30 min, 37°C), en un medio conteniendo L-tirosina (200 μM) y NSD-1015 (1 mM), y en presencia o ausencia del agonista del RH₃ RAMH, adicionados 5 min antes del PACAP. La formación de L-DOPA se expresa como porcentaje del control, y los valores son el promedio ± s.e.m. de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con Anova de una vía y la prueba de Tukey.

7. Discusión

7.1 Caracterización de los RH₃ presentes en las terminales nerviosas del NAcc de la rata

El estudio de Pillot y cols. (2002) reportó la presencia del RH₃ en el NAcc de la rata, y un trabajo reciente (González-Sepúlveda y cols., 2013) muestra la presencia del RNAm del RH₃ y de la enzima TH en el VTA, así como co-localización de las proteínas de la TH y del RH₃ en el NAcc de la rata, sugiriendo la presencia del receptor en las terminales dopaminérgicas del NAcc provenientes del VTA.

En nuestro trabajo los datos de unión de [³H]-NMHA indicaron una densidad de RH₃ para membranas de sinaptosomas del NAcc de 196 ± 27 fmol/mg de proteína, mayor a la encontrada para el bulbo olfatorio de la rata (106 ± 19 fmol/mg proteína; Aquino-Miranda y cols., 2012b), pero menor a la reportada para el neostriado y el globo pálido (358 ± 15 y $1,327 \pm 79$ fmol/mg proteína, respectivamente; Molina-Hernández y cols., 2000; Morales-Figueroa y cols., 2014). Estos datos indican una expresión importante del RH₃ en las terminales nerviosas del NAcc de la rata, y la afinidad del RH₃ presente en los sinaptosomas del NAcc por ligandos selectivos concuerda con reportes previos (ver por ejemplo Aquino-Miranda y cols., 2012b).

En relación a la afinidad de los RH₃ presentes en las membranas de rebanadas o de sinaptosomas del NAcc, no existió diferencia significativa para el agonista RAMH o para el antagonista/agonista inverso clobenpropit (Tabla 1). Sin embargo, la afinidad por el antagonista/agonista inverso ciproxifan fue estadísticamente diferente (K_i 2.69 nM y 15.92 nM, respectivamente). Existen diferentes isoformas del RH₃ originadas por *splicing* alternativo, y se ha propuesto que la isoforma de 413 aa representaría el autorreceptor H₃ en la corteza cerebral de la rata, mientras que los heterorreceptores corresponderían principalmente a la isoforma de 445 aa (Gbahou y cols., 2012). Por lo tanto, y

de manera interesante, la diferencia en la afinidad por el ciproxifan podría deberse a la presencia y diferente afinidad de estas dos isoformas.

7.2 Efecto de la activación del RH₃ en la captura de dopamina por sinaptosomas del NAcc de la rata

La captura de [³H]-dopamina por sinaptosomas fue inhibida por GBR-12909, un bloqueador selectivo del DAT (Figura 2), y el valor de pKi (8.62 ± 0.15; Ki 2.4 nM) concuerda con lo reportado en la literatura (Andersen, 1989), indicando que la captura se debe principalmente a la terminales dopaminérgicas. La función del DAT depende de la temperatura y requiere energía en forma de ATP (Borowsky y Hoffman, 1995), por lo que estos datos confirman también que los sinaptosomas son metabólicamente funcionales.

Estudios con microdiálisis (Munzar y cols., 2004) muestran que antagonistas del RH₃ potencian el aumento en los niveles de dopamina inducido por metanfetamina en el NAcc de la rata. Este efecto puede deberse a acciones del RH₃ en la liberación del neurotransmisor, pero también en la captura del mismo. Recientemente se mostró que los complejos βγ de las proteínas G_{ai/o} interactúan con el DAT inhibiendo la captura de dopamina en células HEK-293 y que también inhiben la captura de este neurotransmisor en sinaptosomas del neocórtex de la rata (García-Olivares, 2013). Así, existe evidencia de una interacción funcional entre el RH₃ y el DAT. Sin embargo, en nuestros experimentos la captura de [³H]-dopamina por sinaptosomas del NAcc no fue afectada significativamente por el agonista del RH₃ RAMH (Figura 11).

7.3 Efecto de la activación del RH₃ en la liberación de [³H]-dopamina inducida por despolarización en rebanadas del NAcc.

En experimentos con rebanadas marcadas con [³H]-dopamina la liberación de la misma inducida por despolarización química (30 mM de K⁺) fue reducida de manera importante (-89.4 ± 1.2%) en un medio sin CaCl₂, confirmando la participación mayoritaria de la exocitosis en este proceso. Sin embargo, el agonista RAMH tuvo un efecto inhibitorio modesto, pero no significativo, en la liberación de [³H]-dopamina (91.4 ± 4.5% del control; Figura 12B). El bloqueo de los autorreceptores D₂ con sulpiride aumentó la liberación de [³H]-dopamina, pero en contraste a lo reportado por Schlicker y cols. (1993), no potenció el posible efecto inhibitorio de la RAMH (Figura 12D).

Los experimentos de Schlicker y cols. fueron realizados con rebanadas del neocórtex de otra especie (ratón), por lo que se realizó una serie de experimentos en el NAcc del ratón para poder evidenciar diferencias inter-especie; sin embargo, en estos experimentos tampoco se observó efecto del agonista RAMH o de antagonistas/agonistas inversos del RH₃ en la liberación de [³H]-dopamina inducida por despolarización (Figura 13), lo que descarta dichas diferencias como explicación de la ausencia de efecto de la activación del RH₃ en la liberación de [³H]-dopamina en el NAcc de la rata.

7.4 Efecto de la activación del RH₃ en la síntesis de dopamina inducida por forskolina en rebanadas del NAcc de la rata.

Las evidencias experimentales disponibles indican que el RH₃ se encuentra en las terminales dopaminérgicas del NAcc provenientes del VTA (González-Sepúlveda y cols., 2013), pero nuestros datos no mostraron efecto en la captura y/o liberación de [³H]-dopamina. Otro aspecto importante en la regulación de la transmisión dopaminérgica es la síntesis del neurotransmisor, y en el neocórtex de la rata la activación del RH₃ modula la síntesis de

dopamina inducida por despolarización (Molina-Hernández y cols., 2000), por lo que decidimos abordar la posible modulación en la síntesis del transmisor por la activación del RH₃. Para este fin se empleó un diseño experimental basado en el estudio de Molina-Hernández y cols. (2000), determinando la acumulación de L-DOPA como un indicador de la síntesis de dopamina, utilizando HPLC para su detección.

Existe evidencia de que la activación de las ACs aumenta la síntesis de dopamina en el NAcc de la rata (Onali y Olanas, 1989; Moser y cols., 1999), y en rebanadas del NAcc de la rata, la forskolina, un activador de las ACs, aumentó de manera importante la acumulación de L-DOPA (210% del control; Figura 14). La activación del RH₃ por el agonista RAMH inhibió la acumulación de L-DOPA (figura 15A), con un efecto estadísticamente significativo a las concentraciones de 100 nM y 1 µM (-41.1% y -43.5% respectivamente). La curva concentración-respuesta para la RAMH indicó una IC₅₀ de 33.2 nM (Figura 15B), diferente en 50 veces de la Ki (0.68 nM) de este mismo fármaco en los ensayos de inhibición de la unión de [³H]-NMHA a membranas de sinaptosomas del NAcc. La diferencia entre los valores obtenidos para la IC₅₀ y la Ki podría deberse principalmente a que los experimentos funcionales fueron realizados en rebanadas completas del NAcc, mientras que los datos de Ki corresponden a preparaciones membranales, y en consecuencia a la presencia de barreras para la difusión del fármaco presentes en las rebanadas pero no en las membranas.

En otra serie de experimentos, la activación del RH₃ con RAMH (100 nM) inhibió la acumulación de L-DOPA en rebanadas del NAcc de la rata y este efecto fue prevenido por el antagonista/agonista inverso ciproxifan, sugiriendo un efecto mediado por receptor y no debido a efectos inespecíficos de los fármacos. Estos resultados concuerdan con evidencia previa del efecto antagónico del ciproxifan en el efecto inhibitorio de RAMH en la liberación de [³H]-noradrenalina inducida por despolarización estudiada en rebanadas del bulbo olfatorio de la rata (Aquino-Miranda y cols., 2012b).

La forskolina induce la formación de AMPc a partir de ATP por activación directa de las ACs (Alasbahi y Melzig, 2012), y el aumento en la síntesis de dopamina por este fármaco se debe a la activación y efecto de la PKA. La PKA fosforila a la TH en un sitio crítico (Serina⁴⁰) para la regulación de la síntesis de dopamina (Dunkley y cols., 2004). Una de las vías de señalización del RH₃ es la inhibición de las ACs por medio de la subunidad G α i/o (Aquino-Miranda y cols., 2012c). Por lo tanto, la activación del RH₃ inhibiría la vía AMPc/PKA y por ende la síntesis de dopamina inducida por forskolina.

La inhibición de las fosfodiesterasas aumenta la concentración intracelular de AMPc (Martínez y Gil, 2014) y nuestros resultados (Figura 17C) muestran que el inhibidor IBMX aumenta de manera importante la acumulación de L-DOPA, la cual es inhibida en forma modesta pero significativa ($-14.1 \pm 2.3\%$) por la activación del RH₃, y de forma marcada por activación de los autorreceptores D₂ con el agonista quinpirole ($-76.3 \pm 11.5\%$). Estos datos indican que las ACs presentes en las terminales dopaminérgicas del NAcc tienen actividad tónica que presumiblemente participa en la regulación de la síntesis de dopamina. La diferencia en la magnitud de inhibición debida a los receptores H₃ y D₂ puede deberse a los diferentes niveles de expresión de los receptores, o bien a la localización diferencial de los mismos en las regiones donde se encuentren presentes las ACs.

7.5 Efecto de la activación del RH₃ en la síntesis de dopamina inducida por estimulación de receptores al polipéptido hipofisario activador de la adenilil ciclasa (PACAP).

Reportes previos indican que la activación de los receptores a PACAP aumenta la actividad de la enzima TH (Moser y cols., 1999). Los receptores a PACAP que se expresan en el NAcc son VPAC₂ y PAC₁, ambos acoplados a proteínas G α _s (Thomas y cols., 2013), lo que indica que el aumento en la actividad de la enzima TH se debe a la vía AMPc/PKA. Nuestros datos confirmaron que en

rebanadas del NAcc de la rata la activación de los receptores a PACAP con el agonista PACAP-27 aumenta de manera significativa la acumulación de L-DOPA, y muestran además que la activación de los RH₃ inhibe el efecto del PACAP-27, lo cual sugiere que ambos receptores se expresan en las terminales dopaminérgicas del NAcc. Estos resultados indican que las proteínas G $\alpha_{i/o}$ activadas por los RH₃ se oponen al efecto activador de las proteínas G α_s en las ACs, y por ende en la síntesis de dopamina en las terminales dopaminérgicas del NAcc de la rata.

7.6 Efecto diferencial de la activación del RH₃ en la captura, liberación y síntesis de dopamina.

Finalmente, cabe destacar que a semejanza del neostriado de la rata, en el NAcc de la misma especie la activación del RH₃ resulta en inhibición de la síntesis de dopamina pero no tiene efecto en la liberación del neurotransmisor. La activación del RH₃ resulta en dos efectos intracelulares principales, la reducción de la formación de AMPc mediante la acción de las subunidades G $\alpha_{i/o}$ y la inhibición de canales de calcio activados por voltaje, debida a los dímeros G $\beta\gamma$. Dado que en las rebanadas del NAcc de la rata el efecto inhibitorio del RH₃ en la síntesis de dopamina parece depender de la inhibición de la formación de AMPc, la discrepancia con la liberación de dopamina podría ser explicada por una localización de los heterorreceptores H₃ distante de los canales de calcio involucrados en la exocitosis, pero cercana a las ACs responsables de la síntesis de AMPc.

Una explicación alternativa para este efecto diferencial sería la presencia del RH₃ en neuronas que no utilizan a la dopamina como su neurotransmisor principal, pero que son capaces de sintetizarla. En este contexto, la síntesis de dopamina podría ocurrir en las terminales histaminérgicas del NAcc de la rata provenientes del núcleo tuberomamilar (Yanovsky y cols., 2011), en las que el RH₃ funciona como autorreceptor. Sin embargo, también existe evidencia que

indica que las terminales histaminérgicas del NAcc de la rata no poseen autorreceptores, ya que en experimentos de microdiálisis el RH₃ no modula la liberación de histamina en este núcleo (Giannoni y cols., 2010; Munari y cols., 2013).

8. Conclusiones

- La activación del RH_3 no modula la captura de [3H]-dopamina en sinaptosomas del NAcc de la rata.
- La activación del RH_3 no regula la liberación de [3H]-dopamina inducida por despolarización en rebanadas del NAcc de la rata.
- La activación del RH_3 modula la síntesis de dopamina en rebanadas del NAcc de la rata, efecto debido a la inhibición de la vía AMPc/PKA.

9. Bibliografía

- Andersen, P.H. (1989) The dopamine uptake inhibitor GBR 12909: selectivity and molecular mechanism of action. *Eur J Pharmacol.* 166, 493–504.
- Alasbahi, R.H., Melzig, M.F. (2012) Forskolin and derivatives as tools for studying in the role of cAMP. *Pharmazie.* 67, 5-13.
- Aquino-Miranda, G., Molina-Hernández, A., Arias-Montaña, J.A. (2012a) Regulación por receptores H₃ a histamina de la liberación de neurotransmisores en los ganglios basales: implicaciones para la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. *Gac Med Mex.* 148, 467-475.
- Aquino-Miranda, G., Osorio, E.A., Escamilla, J., González, P.R., Ortiz, J., Arias-Montaña, J.A. (2012b) Histamine H₃ receptors modulate depolarization-evoked [³H]-noradrenaline release from rat olfactory bulb slices. *Neuropharmacology.* 62, 1127–1133.
- Aquino-Miranda, G., Arias-Montaña, J.A. (2012c) Neuromodulación e histamina: regulación de la liberación de neurotransmisores por receptores H₃. *Salud Mental.* 35, 345–352.
- Arrang, J.M., Garbarg, M., Schwartz, J.C. (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class H₃ of histamine receptor. *Nature.* 302, 832-837.
- Arrang, J.M., Garbarg, M., Schwartz, J.C. (1987) Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H₃ receptors. *Neuroscience.* 23,149-157.
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., Arias-Montaña, J.A. (2000) Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Rev Biomed.* 11, 39-60.
- Baudonnat, M., Huber, A., David, V., Walton, M. E. (2013) Heads for learning, tails for memory: reward, reinforcement and a role of dopamine in determining behavioral relevance across multiple timescales. *Front Neurosci.* 7, 175.

- Best, C.H., Dale, H.H., Dudley, H.W., Thorpe, W.V. (1927) The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. *J Physiol.* 62, 397-417.
- Bobrovskaya, L., Dunkley, P.R., Dickson, P.W. (2004) Phosphorylation of Ser19 increases both Ser40 phosphorylation and enzyme activity of tyrosine hydroxylase in intact cells. *J Neurochem.* 90, 857-864.
- Bongers, G., Bakker, R., Leurs, R. (2007) Molecular aspects of the histamine H₃ receptor. *Biochem Pharmacol.* 73, 1195–1204.
- Borowsky, B., Hoffman, J.B. (1995) Neurotransmitter transporters : molecular biology, function, and regulation. *Int Rev Neurobiol.* 38, 139-199.
- Bustamante, D., You, Z.B., Castel, M.N., Johansson, S., Goiny, M., Terenius, L., Hökfelt, T., Herrera-Marschitz, M. (2002) Effect of single and repeated methamphetamine treatment on neurotransmitter release in substantia nigra and neostriatum of the rat. *J Neurochem.* 83, 645-654.
- Clark, M.A., Korte, A., Egan, R. W. (1993) Guanine nucleotides and pertussis toxin reduce the affinity of histamine H₃ receptors on AtT-20 cells. *Agents Actions.* 40, 129-134.
- Coruzzi, G., Morini, G., Adami, M., Grandi D. (2001) Role of histamine H₃ receptors in the regulation of gastric functions. *J Physiol Pharmacol.* 52, 539-553.
- Dale, H.H., Laidlaw, P.P. (1910) The physiological action of beta-aminazolyethylamine. *J Physiol.* 41, 318-344.
- Daubner, S.C., Le, T., Wang, S. (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 508, 1-12
- Drutel, G., Peitsaro, N., Karlstedt, K., Wieland, K., Smit, M. J., Timmerman, H., Panula, P., Leurs, R. (2001) Identification of rat H₃ receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol.* 59, 1–8.

- Dunkley, P.R., Bobrovskaya, L., Graham, M. E., von Nagy-felsobuki, E. I., Dickson, P. W. (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation : regulation and consequences. *J Neurochem.* 91, 1025-1043.
- Fields, H.L., Hjelmstad, G.O., Margolis, E.B., Nicola, S.M. (2007) Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci.* 30, 289–316.
- García-Olivares, J., Torres-Salazar, D., Owens, W.A., Baust, T., Siderovski, D.P., Amara, S.G., Zhu, J., Daws, L.C., Torres, G.E. (2013) Inhibition of dopamine transporter activity by G proteins $\beta\gamma$ subunits. *PLoS One*, 1-9.
- Gbahou, F., Davenas, E., Morisset, S., Arrang, J. (2010) Effects of betahistine at histamine H₃ receptors : mixed inverse agonism/agonism in vitro and partial inverse agonism in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 334, 945–954.
- Gbahou, F., Rouleau, A., Arrang, J.M. (2012) The histamine autoreceptor is a short isoform of the H₃ receptor. *Br J Pharmacol.* 166, 1860-1871.
- Ghatei, M.A., Takahashi, K., Suzuki, Y., Gardiner, J., Jones, P.M., Bloom, S.R., (1993) Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursorencoding messenger RNA in human and rat tissues. *J Endocrinol.* 136, 159-166.
- Giannoni, P., Medhurst, A. D., Passani, M. B., Giovannini, M. G., Ballini, C., Corte, L.D., Blandina, P. (2010). Regional differential effects of the novel histamine H₃ hydrochloride (GSK189254) on histamine release in the central nervous system of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 332, 164–172.
- González-Sepúlveda, M., Rosell, S., Hoffmann, H. M., Castillo-Ruiz, M.D.M., Mignon, V., Moreno-Delgado, D., Vignes, M., Diaz J., Sabria, J., Ortiz, J. (2013) Cellular distribution of the histamine H₃ receptor in the basal ganglia: functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia.* 3, 109–121.
- Haas, H., Panula, P. (2003) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 4, 121–130.
- Hashikawa-Hobara, N., Yan-Ki, C.N., Levi, R. (2012) Histamine 3 receptor activation reduces the expression of neuronal angiotensin II type 1 receptors in the heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 340, 185–191.

- Hashimoto, H., Nogi, H., Mori, K., Ohishi, H., Shigemoto, R., Yamamoto, K., Matsuda, T., Mizuno, N., Nagata, S., Baba, A. (1996) Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 371, 567–577
- Honrubia, M.A., Vilaró, M.T., Palacios, J.M., Mengod, G. (2000) Distribution of the histamine H₂ receptor in monkey brain and its mRNA localization in monkey and human brain. *Synapse.* 1, 343-354.
- Humphries, M.D., Prescott, T.J. (2010) The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Prog Neurobiol.* 90, 385–417.
- Jin, C.Y., Anichtchik, O., Panula, P. (2009) Altered histamine H₃ receptor radioligand binding in post-mortem brain samples from subjects with psychiatric diseases. *Br J Pharmacol.* 157, 118–129.
- Koob, G.F., Volkow, N.D. (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology.* 35, 217–238.
- Kraus, M.M., Prast, H., Philippu, A. (2013) Facilitation of short-term memory by histaminergic neurons in the nucleus accumbens is independent of cholinergic and glutamatergic transmission. *Br J Pharmacol.* 170, 214–221.
- Krystal, A.D., Richelson, E., Roth, T. (2013) Review of the histamine system and the clinical effects of H₁ antagonists: basis for a new model for understanding the effects of insomnia medications. *Sleep Med Rev.* 17, 263-272
- Lazarus, M., Huang, Z.L., Lu, J., Urade, Y., Chen, J.F. (2012) How do the basal ganglia regulate sleep-wake behavior? *Trends Neurosci.* 35, 723–732.
- Leurs R, Chazot PL, Shenton FC, Lim HD, de Esch IJP. (2009) Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H₄ receptor. *Br J Pharmacol.* 157,14–23.

- Lominac, K.D., Sacramento, A.D., Szumlinski, K.K., Kippin, T.E. (2012) Distinct neurochemical adaptations within the nucleus accumbens produced by a history of self-administered vs non-contingently administered intravenous methamphetamine. *Neuropsychopharmacology* 37, 707-722
- Lovenberg, W.T., Roland, L.B., Wilson, J.S., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, R.M., Erlander, M.G. (1999) Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol Pharmacol.* 55, 1101–1107.
- Martinez, A., Gil, C. (2014) cAMP-specific phosphodiesterase inhibitors: promising drug for inflammatory and neurological diseases. *Expert Opin. Ther Pat.* 4, 1-11.
- Meshi, D., Morawetz, C., Heekeren, H.R. (2013) Nucleus accumbens response to gains in reputation for the self relative to gains for others predicts social media use. *Front Hum Neurosci.* 7, 1-11
- Molina-Hernández, A., Nuñez, A., Arias-Montaña, J.A. (2000) Histamine H₃ receptor activation inhibits dopamine synthesis in rat striatum. *Neuroreport.* 11, 163–166.
- Moreno-Delgado, D., Gómez-Ramirez, J., Torrent-Moreno, A., González-Sepulveda, M., Blanco, I., Ortiz, J. (2009) Different role of cAMP dependent protein kinase and CaMKII in H₃ receptor regulation of histamine synthesis and release. *Neuroscience.* 164, 1244–1251.
- Moser, A., Scholz, J., Gänslé, A. (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-27) enhances tyrosine hydroxylase activity in the nucleus accumbens of the rat. *Neuropeptides.* 33, 492-497.
- Munari, L., Provensi, G., Passani, M.B., Blandina, P. (2013) Selective brain region activation by histamine H₃ receptor antagonist/inverse agonist ABT-239 enhances acetylcholine and histamine release and increases c-Fos expression. *Neuropharmacology.* 70, 131–140.
- Munzar, P., Tanda, G., Justinova, Z., Goldberg, S.R. (2004) Histamine H₃ receptor antagonists potentiate methamphetamine self-administration and methamphetamine-induced accumbal dopamine release. *Neuropsychopharmacology.* 29, 705–717.
- Naddafi, F., Mirshafiey, A. (2013) The neglected role of histamine in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 28, 327–336.

- Nakamura, T., Yoshikawa, T., Noguchi, N., Sugawara, A., Kasajima, A., Sasano, H., Yanai, K. (2014) The expression and function of histamine H₃ receptors in pancreatic beta cells. *Br J Pharmacol.* 171, 171–185.
- Niwa, M., Nabeshima, T. (2011) Roles of a novel molecule "shati" in the development of methamphetamine-induced dependence. *Curr Neuropharmacol.* 9, 104-108.
- Onali, P., Olanas, M.C. (1989) Involvement of adenylate cyclase inhibition in dopamine autoreceptor regulation of tyrosine hydroxylase in rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett.* 102, 91-96.
- Panula, P., Sundvik, M., Karlstedt, K. (2014) Developmental roles of brain histamine. *Trends Neurosci.* 37, 159-168.
- Panula, P., Nuutinen, S. (2013) The histaminergic network in the brain : basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci.* 14, 472-487.
- Parsons, E.M., Ganellin, C.R. (2006) Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 147, 127-135.
- Passani, M.B., Blandina, P. (2011) Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci.* 32, 242–249.
- Pierce, R.C., Kumaresan, V. (2006) The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev.* 30, 215–238.
- Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J.C., Arrang, J.M. (2002) A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience.* 114, 173–193.
- Ramos-Jiménez, J., Garduño-Torres, B., Arias-Montaña, J.A. (2009) Histamina y comunicación intercelular : 99 años de historia. *Rev Biomed.* 20, 100–126.

- Rice, M.E., Patel, J.C., Cragg, S.J. (2011) Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198,112–137.
- Schlicker, E., Fink, K., Detzner, M., Göthert M. (1993) Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H₃ receptors. *J Neural Transm Gen Sect.* 93, 1-10.
- Silver, R.B., Mackins, C.J., Smith, N.C., Koritchneva, I.L., Lefkowitz, K., Lovenberg, T.W., Levi, R. (2001) Coupling of histamine H₃ receptors to neuronal Na⁺/H⁺ exchange: a novel protective mechanism in myocardial ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 2855–2859.
- Südhof, T.C. (2013) Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron.* 80, 675–690.
- Sunahara, R.K., Taussig, R. (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv.* 2, 168-184.
- Tedford, H.W., Zamponi, G.W. (2006) Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev.* 58, 837–862.
- Thomas, R.L., Crawford, N.M., Grafer, C.M., Halvorson, L.M. (2013) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: a review of the literature. *Reprod Sci.* 20, 857-871.
- Torres, E.G., Gainetdinov, R.R., Caron, G.M. (2003) Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci.* 4, 13–25.
- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., Vaudry, H. (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev.* 52, 269–324
- Wolf, M. E. (2010) The bermuda triangle of cocaine-induced neuroadaptations. *Trends Neurosci.* 33, 391–398.
- Yanovsky, Y., Li, S., Klyuch, B.P., Yao, Q., Bladina, P., Passani, M.B., Lin, J.S., Haas, H.L., Sergeeva, O.A. (2011) L-dopa activates histaminergic neurons. *J Physiol.* 15, 1349-1366.

Zampeli E, Tiligada E. (2009) The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *Br J Pharmacol.* 157, 24–33.