



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Interacción de los receptores a adenosina A_{2A} y a histamina H_3 en la
liberación de GABA en las terminales estriado-palidales de la rata**

Que presenta

M. en C. Guadalupe Elide Morales Figueroa

Para obtener el grado de

Doctora en ciencias

En la especialidad de Neurobiología Celular y Molecular

Director de tesis

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 37 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la tutoría del Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña.

Agradecimientos

A Conacyt por la beca de doctorado otorgada de septiembre de 2013 a agosto 2017 con el número de beca 324295.

Al Dr. José Antonio Arias Montaña, por aceptarme en su laboratorio, por el apoyo en el aspecto metodológico e intelectual, sus consejos y sobre todo, por creer en mi capacidad científica.

A los asesores, Dr. Benjamín Florán Garduño y Dr. Sergio Enrique Meza Toledo por las revisiones, las discusiones y sus aportes al desarrollo del trabajo; al Dr. Emilio Javier Galván Espinoza por permitirme trabajar en su laboratorio y la revisión de la tesis, y al Dr. Daniel Martínez Fong por su contribución y apoyo en la evaluación de la tesis.

Al Auxiliar de Investigación Dr. Juan Escamilla Sánchez y el técnico del laboratorio Raúl González, por su apoyo en la obtención de rebanadas y el desarrollo de experimentos de liberación de [³H]-GABA, y por su amistad.

María Guadalupe Figueroa Gómez y Martín José Morales Salomón, mis padres, sin ellos no habría logrado trazar y alcanzar mis metas, son mi inspiración; a mis hermanos, Claudia y Damián, por ser los principales cómplices y catalizadores de mis decisiones.

A José Daniel Coronado Velázquez, por el apoyo incondicional y estar a mi lado, por la motivación y las palabras de aliento en todo momento.

A mi abuelo Magdaleno Figueroa Cisneros por ser el mejor ejemplo de rectitud, sinceridad y amor.

A Yolanda Velázquez y Rafael León, por la motivación y el afecto.

A mis amigas Nayeli Rivera, Ana García, Alina Benítez, Gabriela Espadas, Iliana Zazueta, y amigos, que me apoyaron y escucharon siempre, que me hicieron sentir segura incluso en momentos en los que mi ánimo estaba decaído.

A mis compañeros de laboratorio por la confianza, la discusión del trabajo, y los momentos gratos de convivencia.

Abreviaturas

[³ H]-NMHA	[³ H]-N α -metil-histamina
AC	adenilil ciclasa
ADK	cinasa de adenosina (<i>adenosine kinase</i>)
AHP	corriente de post-hiperpolarización
AMPC	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BGT-1	transportador de GABA/betaína tipo 1
EC ₅₀	concentración efectiva media
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAT	transportador de GABA
GB	ganglios basales
GIRKs	canales de potasio rectificadores de entrada activados por proteínas G
GP	globo pálido
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G
GPe	globo pálido externo
GPi	globo pálido interno
GTP	trifosfato de guanosina
H ₃ R	receptor a histamina H ₃
HCN	canales activados por hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos
HFP	neuronas con disparo de alta frecuencia con periodos largos de pausa (<i>high frequency pausers</i>)
HNMT	N-metil-transferasa de histamina
IBMX	isobutil-metil-xantina
IC ₅₀	concentración inhibidora media
IIE	intervalo inter-evento

Kd	constante de disociación
KH	Krebs-Henseleit
Ki	constante de inhibición
Km	constante de Michaelis-Menten
LCRA	líquido cefalorraquídeo artificial estándar
LFB	neuronas que disparan en ráfagas de baja frecuencia (<i>low frequency bursters</i>)
MAPK	cinasas de proteína activadas por mitógenos
NEMs	neuronas espinosas medianas
NEP	núcleo entopeduncular
NST	núcleo subtalámico
PI3K	3-cinasa de fosfatidilinositol
PKA	cinasa A de proteínas
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PLC	fosfolipasa C
sIPSCs	corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas
SK	canales de potasio activados por calcio
SNC	Sistema Nervioso Central
SNc	substancia negra compacta
SNr	substancia negra reticulada

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1 Introducción	5
1.1 El globo pálido (GP)	7
1.1.1 Tipos de neuronas palidales	9
1.1.2 Transportadores de GABA en el GP	10
1.2 Sistema histaminérgico	11
1.2.1 Receptores a histamina	13
1.2.2 Receptores a histamina H ₃	13
Modulación de la liberación de GABA	18
1.3 Adenosina y receptores A _{2A}	18
2 Planteamiento del problema	23
3 Hipótesis de trabajo	25
4 Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos particulares	25
5 Metodología	27
5.1 Obtención de rebanadas y sinaptosomas	27
5.2 Ensayos de unión de radioligando a membranas sinaptosomales	28
5.2.1 Ensayos de saturación	28
5.2.2 Ensayos de inhibición	28
5.3 Liberación de [³ H]-GABA	29
5.4 Ensayos de formación de AMPc	30

5.5 Ensayos de microfluorimetría	30
5.6 Ensayos de electrofisiología	31
6 Resultados	33
6.1 Caracterización farmacológica del receptor a histamina H ₃ en membranas sinaptosomales del GP de la rata	33
6.2 Densidad de A _{2A} Rs en sinaptosomas del GP	34
6.3 Efecto de la activación del H ₃ R en la liberación de [³ H]-GABA.....	35
6.4 Un agonista del A _{2A} R modifica la afinidad del H ₃ R por immepip, y un agonista del H ₃ R modifica la afinidad del A _{2A} R por CGS-21680	37
6.5 La vía AMPc/PKA está involucrada en el efecto estimulatorio de los A _{2A} Rs	39
6.5.1 La activación del A _{2A} R incrementa la acumulación de AMPc, efecto reducido por el H ₃ R tanto en rebanadas del neostriado como del GP	39
6.5.2 El incremento del AMPc intrasinaptosomal mimetiza la facilitación en la liberación de [³ H]-GABA por el agonista del receptor A _{2A} CGS-21680, y la inhibición de la PKA previene este efecto	42
6.6 La activación del H ₃ R no previno la facilitación de la liberación de [³ H]-GABA debido incremento de AMPc sinaptosomal	42
6.7 La entrada de calcio a los sinaptosomas del GP inducida por despolarización no es modulada por la activación de los receptores A _{2A} y H ₃ , ya sea de manera independiente o conjunta	44

6.8 La liberación espontánea de GABA es modulada presinápticamente por los receptores a adenosina A _{2A} y a histamina H ₃ , y el receptor H ₃ modula postsinápticamente la excitabilidad de las neuronas palidales	46
7 Discusión	51
Regulación por receptores a adenosina A _{2A} y a histamina H ₃ de la liberación de GABA en el GP	51
Mecanismos involucrados en la regulación por receptores a denosina A _{2A} y a histamina H ₃ de la liberación de GABA en el GP	52
8 Conclusiones	59
9 Perspectivas	61
10 Bibliografía	62
11 Apéndice 1	74
12 Apéndice 2	79

Resumen

El globo pálido (GP) pertenece a los ganglios basales, un grupo de núcleos neuronales subcorticales que participan de manera crítica en el control de la conducta motora. Las principales aferentes al GP son los axones de una sub-población de neuronas espinosas medianas GABAérgicas del neostriado, que expresan una alta densidad de receptores a histamina H₃ (H₃Rs). Estas neuronas también poseen receptores a adenosina A_{2A} (A_{2A}Rs), acoplados a proteínas G α_s , y cuya estimulación facilita la liberación de GABA de sinaptosomas y rebanadas del GP. El H₃R se acopla a proteínas G $\alpha_{i/o}$, y en rebanadas del neostriado y la sustancia negra reticulada de la rata su activación disminuye la liberación de [³H]-GABA inducida por alto potasio al oponerse a la acción de los receptores a dopamina D₁, acoplados a proteínas G α_s .

En este trabajo, los ensayos de unión de radioligando confirmaron la alta densidad de H₃Rs y A_{2A}Rs en membranas de sinaptosomas del GP de la rata (1327 y 454 fmol/mg de proteína, respectivamente). La activación de los A_{2A}Rs facilitó la liberación de [³H]-GABA evocada por despolarización en sinaptosomas del GP (150% de la liberación control), y la activación del H₃R disminuyó este efecto. Se ha reportado que la facilitación por los A_{2A}Rs de la liberación de GABA depende de la vía AMPc/cinasa A de proteínas (PKA), y la forskolina, un activador de las adenilil ciclasas, así como el análogo permeante 8-Br-AMPc mimetizaron el efecto de los A_{2A}Rs, además el inhibidor de la PKA, el H-89 previno la facilitación de la liberación inducida por la activación de estos receptores. En rebanadas del GP la activación del A_{2A}R aumentó la acumulación de AMPc (295% de la formación basal), y la estimulación de los H₃Rs redujo en un 50% este efecto. Estos resultados sugerían que la acción de los H₃Rs en la facilitación por los A_{2A}Rs de la liberación de [³H]-GABA involucraba la inhibición de la vía AMPc/PKA.

Una explicación alternativa para el efecto del H₃R es la formación de heterómeros H₃R-A_{2A}R. En membranas de sinaptosomas del GP, el immepip, agonista del H₃R, redujo de manera significativa la afinidad del A_{2A}R por el agonista CGS-21680, mientras que este fármaco aumentó la afinidad del H₃R por el immepip, lo que sugiere la presencia de heterómeros. No obstante, los cambios en la afinidad fueron modestos (2 veces) y no

pueden explicar el efecto de los H₃Rs en la facilitación de la liberación de [³H]-GABA inducida por la activación de los A_{2A}Rs.

Los receptores acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ modulan la liberación de neurotransmisores al inhibir la apertura de canales de calcio activados por voltaje. Sin embargo, la activación de los A_{2A}Rs o de los H₃Rs no modificó el aumento en la concentración intracelular de calcio inducido por despolarización en sinaptosomas del GP.

En registros electrofisiológicos en rebanadas del GP de la rata (*patch clamp* en configuración de célula completa), la activación del A_{2A}R o del H₃R aumentó o disminuyó, respectivamente, la frecuencia de las corrientes post-sinápticas inhibitoras espontáneas (sIPSCs). Además, la activación del H₃R redujo la amplitud de estas corrientes, sugiriendo la presencia de H₃Rs en las neuronas palidales.

En conjunto, los resultados de esta tesis indican que los A_{2A}Rs y los H₃Rs interactúan para modular pre-sinápticamente la liberación de GABA en las terminales estriado-palidales, y que esta interacción se ejerce en la formación del segundo mensajero AMPc y la activación de la PKA.

Abstract

The globus pallidus (GP) belongs to the basal ganglia, a group of subcortical nuclei involved in the control of motor behavior. The main synaptic afferents to the GP are the axons of a subpopulation of striatal spiny GABAergic neurons, which express at high density histamine H₃ receptors (H₃Rs). Striato-pallidal neurons also express adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}Rs), coupled to G α_s proteins and whose stimulation enhances GABA release from GP synaptosomes and slices. H₃Rs couple to G $\alpha_{i/o}$ proteins, and in slices from rat striatum and substantia nigra pars reticulata their activation decreases depolarization-evoked [³H]-GABA release by opposing the action of dopamine D₁ receptors, coupled to G α_s proteins.

In this study, radioligand binding assays confirmed the high density of H₃Rs and A_{2A}Rs in membranes from rat GP synaptosomes (1327 and 454 fmol/mg protein, respectively). A_{2A}R activation enhanced depolarization-evoked [³H]-GABA release from GP synaptosomes to 150% of controls, and this effect was reduced by H₃R activation. A_{2A}R-mediated facilitation of GABA release has been shown to depend on the cAMP/protein kinase A (PKA) pathway, and both the adenylyl cyclase activator forskolin and 8-Br-AMPC mimicked the effect of A_{2A}R activation on [³H]-GABA release, additionally the PKA inhibitor (H-89), prevented this effect. Furthermore, in GP slices A_{2A}R activation increased cAMP accumulation (295% of basal) and H₃R activation reduced by 50% this effect. These results suggest that the action of H₃Rs on A_{2A}R-mediated facilitation of [³H]-GABA release relies on the inhibition of the cAMP/PKA pathway.

An alternative explanation for the H₃R effect is the formation of H₃R-A_{2A}R heteromers, and in GP synaptosomal membranes the H₃R agonist immpip reduced by 2-fold the A_{2A}R affinity for the agonist CGS-21680, whereas this drug increased H₃R affinity for the agonist immpip, suggesting that H₃R/A_{2A}R dimerization does take place. Nevertheless, the modest changes in receptor affinity do not suffice to explain the effect of H₃R activation on A_{2A}R-induced enhancement of [³H]-GABA release.

Receptors coupled to $G\alpha_{i/o}$ proteins modulate neurotransmitter release by inhibiting the opening of voltage-activated calcium channels. However, neither H_3Rs nor $A_{2A}Rs$ modified the increase in intracellular calcium in GP synaptosomes.

In electrophysiological recordings (whole-cell patch clamp) in rat GP slices, $A_{2A}R$ or H_3R activation increased or decreased, respectively, the frequency of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs). H_3R activation also reduced the amplitude of sIPSCs, suggesting the presence of postsynaptic H_3Rs in pallidal neurons.

These results indicate that $A_{2A}Rs$ and H_3Rs interact to pre-synaptically modulate GABA release from the striato-pallidal terminals, and that this interaction most likely takes place at the level of cAMP formation and PKA activation.

1. Introducción

El globo pálido (GP) es un núcleo neuronal que pertenece a los ganglios basales (GB), un conjunto de cinco núcleos subcorticales interconectados e involucrados en el control adaptativo del comportamiento motor a través de interacciones con áreas sensorio-motoras, motivacionales y cognitivas del cerebro (Graybiel et al., 1994).

El movimiento es controlado por dos sistemas: el sistema piramidal, originado en la corteza motora sensorio-motora y encargado de todas las actividades motoras voluntarias (vías cortico-bulbar y cortico-espinal), y el sistema extrapiramidal, encargado de modificar el control motor (dirección y velocidad del movimiento), la ejecución de movimientos aprendidos y los ajustes automáticos de la postura (Bruggencate, 1975; Leisman et al., 2014). Los GB forman el centro principal en el complejo extrapiramidal del sistema motor, además de estar implicados en funciones cognitivas, emocionales y mnemotécnicas. En los roedores y primates los GB están conformados por el neostriado, el globo pálido externo (GPe en primates; globo pálido en los roedores, GP), globo pálido interno (GPi; núcleo entopeduncular en los roedores, NEP), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia negra en sus partes reticulada y compacta (SNr y SNc, respectivamente). Los GB son parte de un sistema neuronal que incluye el tálamo, el cerebelo y los lóbulos frontales (Hauber, 1998).

El neostriado es la principal estructura receptora de las entradas sinápticas de la corteza cerebral a los GB, y su población neuronal se compone en su gran mayoría ($\geq 90\%$) de neuronas espinosas medianas (NEMs) GABAérgicas, con baja actividad espontánea intrínseca, mientras que el resto de las neuronas son interneuronas GABAérgicas y colinérgicas (Wilson y Groves, 1981). Las NEMs se clasifican en dos subpoblaciones de acuerdo al péptido que expresan, encefalinérgicas y dinorfinérgicas, las cuales dan lugar a dos vías eferentes que conectan al neostriado con otras estructuras de los GB (Figura 1), y que difieren en su organización anatómica y sus efectos funcionales (Kawaguchi et al., 1995; Tepper et al., 2007; Tebano et al., 2012).

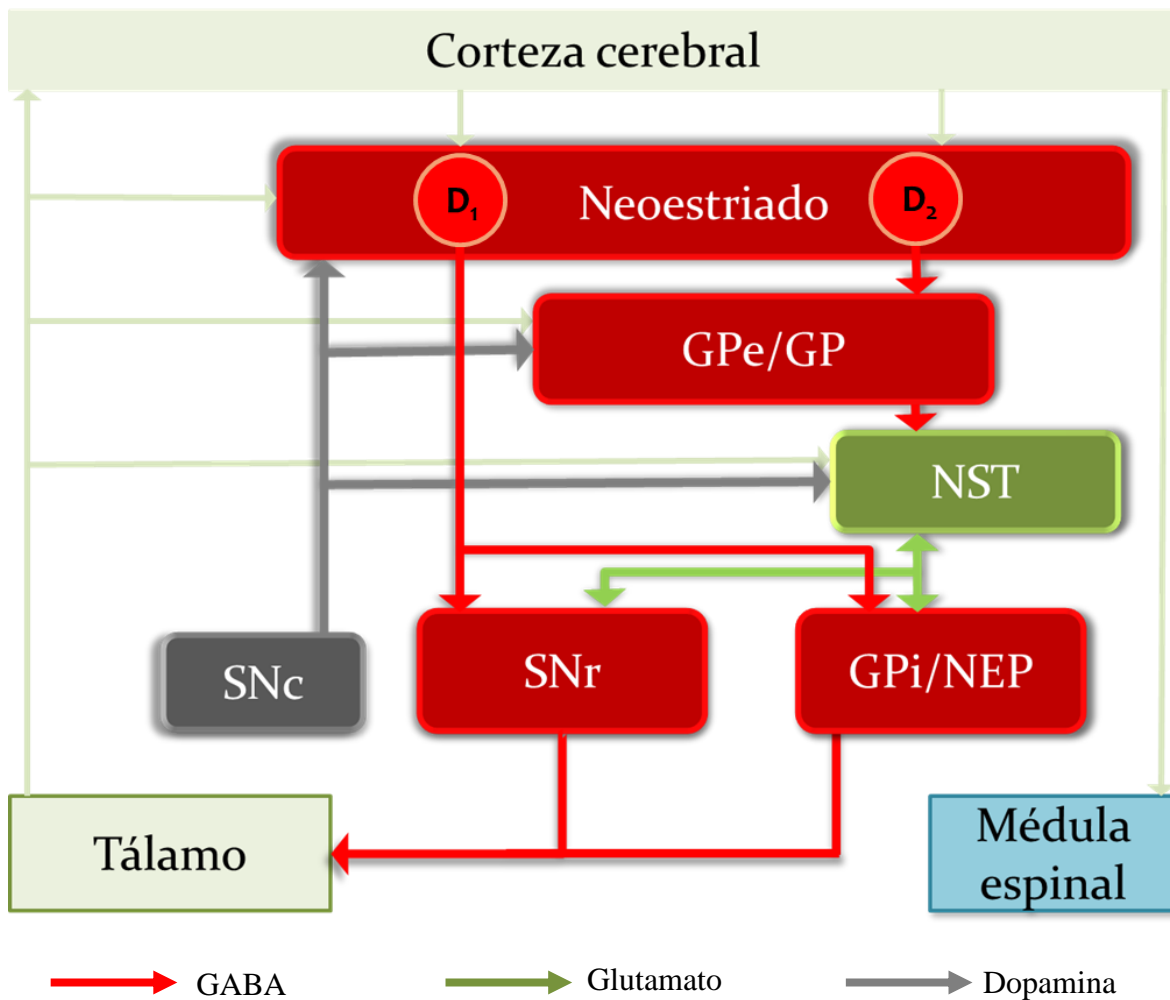


Figura 1. Esquema de los ganglios basales y sus principales conexiones sinápticas. GPe, globo pálido externo, GP, globo pálido; GPi, globo pálido interno; NEP, núcleo entopeduncular; SNr, sustancia nigra reticulada, SNc, sustancia nigra compacta.

Las neuronas GABAérgicas dinorfinérgicas proyectan a la SNr formando la llamada vía directa, y las GABAérgicas encefalinérgicas proyectan al GP, dando lugar a la vía indirecta (Schiffmann et al., 2007). Ambas vías son moduladas por la dopamina liberada por las terminales sinápticas de neuronas localizadas en la SNc, con los receptores de la familia D₁ localizados selectivamente en las neuronas de proyección estriado-nigrales, y los receptores de la familia D₂ en las neuronas estriado-palidales (Valjent et al., 2009; Bertran-Gonzalez et al., 2010).

Cuando las aferencias glutamatérgicas corticales aumentan su frecuencia de disparo excitan a las neuronas de proyección estriatales. Las neuronas estriado-nigrales envían proyecciones a las neuronas GABAérgicas de los núcleos de salida, GPi y SNr, e inhiben su actividad resultando en desinhibición de las neuronas talámicas que proyectan a la corteza cerebral. En contraste, la activación de las neuronas de la vía indirecta aumenta la inhibición de las neuronas GABAérgicas del GPe, disminuyendo su efecto inhibitorio en las neuronas glutamatérgicas del NST. La mayor actividad de estas neuronas se traduce en liberación de glutamato en los núcleos de salida, aumentando así la inhibición ejercida sobre el tálamo (Gerfen y Wilson, 1996). Ambas vías tienen así efectos antagónicos en la salida sináptica de los GB, con la vía directa ejerciendo un efecto sináptico inhibitorio en los núcleos de salida, mientras que la vía indirecta provee entradas sinápticas excitatorias (Herrero, 2002).

La actividad de las neuronas estriatales GABAérgicas es crítica para la selección e iniciación de acciones motoras y para el aprendizaje de hábitos y habilidades (Graybiel et al., 1994). La eficiencia de estos procesos dependerá de la fidelidad y el control de la neurotransmisión local, y los cambios en el balance de las vías directa e indirecta resultan en alteraciones de la conducta motora, dando lugar a hipocinesia o hipercinesia (DeLong, 1990).

1.1. El globo pálido (GP)

El GP de los roedores es el equivalente del GPe de los primates. Es un núcleo que participa de manera crítica en la modulación de la información de salida de la vía indirecta de los GB; se localiza caudomedialmente al neostriado y recibe aferencias GABAérgicas del neostriado y glutamatérgicas originadas principalmente en el NST (Gerfen y Wilson, 1996). Los axones locales colaterales de las neuronas del GP representan un 10-15% de las terminales GABAérgicas, y aún siendo menos prominentes que las terminales estriatales influyen en la excitabilidad neuronal (Sadek et al., 2007). La transmisión GABAérgica es mediada por receptores ionotrópicos GABA_A que se localizan de manera agrupada en las sinapsis simétricas y que inducen una transmisión inhibitoria rápida, y por receptores metabotrópicos GABA_B, generalmente localizados en regiones extra-sinápticas (Galván et al., 2005; Charara et al., 2005).

El GP está conformado por neuronas de proyección GABAérgicas con actividad marcapaso autónoma, es decir, que no depende de las entradas sinápticas excitatorias del NST (Nambu y Llinas, 1994; Cooper y Stanford, 2000), y diferentes patrones de disparo podrían representar distintos códigos de información, modificando la amplitud, velocidad y dirección del movimiento (Gage et al., 2010; Hegeman et al., 2016). La actividad marcapaso de las neuronas palidales se modifica en los modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Raz et al., 2000, 2001; Kita y Kita, 2011), y en primates parkinsonianos se ha mostrado que el patrón de disparo de estas neuronas está correlacionado con el temblor muscular (Bergman et al., 1998), y alteraciones similares se han observado en pacientes con la enfermedad de Parkinson (Levy et al., 2002).

El disparo autónomo de las neuronas palidales es generado por una corriente entrante persistente de sodio (Nambu y Llinas, 1994; Stanford, 2003) y depende de diversos canales iónicos, incluyendo a los canales HCN, Kv4, canales de potasio rectificadores tardíos y canales de sodio activados por voltaje (Chan et al., 2004, 2011; Mercer et al., 2007; Deister et al., 2009).

Los canales HCN (activados por hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos) son activados a potenciales de membrana alrededor de -55 mV, y su apertura permite el flujo de cationes (Na^+ y K^+), asegurando que el potencial de membrana no se estabilice por debajo del potencial necesario para activar a los canales de sodio dependientes de voltaje y mantener así el disparo rítmico (McCormick y Pape, 1990; Chan et al., 2004). La corriente de post-hiperpolarización (AHP, por sus siglas en inglés, *after-hyperpolarization*) es independiente del voltaje; se han descrito dos tipos de corrientes AHP, la rápida y la media, y a esta última se le atribuye el control del potencial de membrana cercano al ciclo oscilatorio. Permite la recuperación de la inactivación de los canales de sodio y de potasio dependientes de voltaje y está establecido que en el GP se debe a la activación de canales SK (canales de potasio activados por calcio; Deister et al., 2009). En las neuronas palidales, la AHP rápida es resultado de la activación de la familia de canales de potasio dependientes de voltaje, y tiene una fuerte influencia en la frecuencia de disparo (Baranauskas et al., 1999; Tkatch et al., 2000; Kim et al., 2005).

En el cerebro humano, el GPe es una de las regiones transcripcionalmente más activas, y esta diversidad molecular da lugar a una variedad de tipos neuronales (Hawrylycz et al., 2012). Desde 1971 se identificaron por su patrón de disparo registrado *in vivo*, dos tipos de neuronas palidales, unas que disparan a alta frecuencia con largos periodos de pausa (*high frequency pausers*, HFP) y otras que disparan en ráfagas de baja frecuencia (*low frequency bursters*, LFB), características que están conservadas entre especies (DeLong, 1971; Benhamou et al., 2012). En estudios electrofisiológicos *in vitro*, se identificaron por sus diferencias en las propiedades intrínsecas de membrana tres tipos de neuronas de proyección palidales (Kita y Kitai, 1991; Cooper y Stanford, 2000) (Tabla 1), que además se diferencian en su morfología, la expresión de marcadores moleculares, factores de transcripción, y el núcleo cerebral al que proyectan (Abdi et al., 2015; Hegeman et al., 2016).

Tipo de neuronas palidales

Tipo I, A o prototípicas. Representan dos terceras partes de la población neuronal y proyectan principalmente al NST; expresan la proteína de unión a calcio parvalbúmina (PV⁺) y los factores de transcripción Nkx2-1+ (*NK2 homeobox 1 protein*) y Lhx6+ (*Lim homeobox protein 6*).

Tipo II, B o arquipalidales. Constituyen una cuarta parte de las neuronas palidales y proyectan principalmente al neostriado; expresan el neuropéptido precursor preproencefalina, y los factores de transcripción FoxP2+ (*forkhead box protein P2*) y Meis2+ (*meis homeobox 2 protein*).

Tipo III, C o colinérgicas. Representan sólo el 5% de las neuronas del GP, proyectan a la corteza cerebral, y coliberan GABA y acetilcolina; expresan la transferasa de acetilcolina (ChAT) y el marcador NK2-1+.

Tabla 1. Tipos de neuronas del GP.

Tipo de neurona	I_h	AHP bifásica	Actividad espontánea	Potencial de membrana en reposo (mV)
A	+	+	+/-	-66
B	-	-	+	-58
C	-	+	-	-67

Modificado de Cooper y Stanford, 2000.

Transportadores de GABA en el GP

En el GP la concentración extracelular de GABA depende de las tasas de liberación y de recaptura, la segunda debida a trasportadores dependientes de Na^+ y Cl^- presentes en los axones GABAérgicos y en células gliales (Galvan et al., 2005).

Existen cuatro transportadores de GABA: GAT-1, GAT-2, GAT-3 y el transportador de GABA/betaína tipo 1 (BGT-1), miembros de la gran familia de transportadores de 12 regiones transmembranales y extremos amino y carboxilo terminales intracelulares (Borden, 1996). La naturaleza electrogénica de los GATs permite que una fuerte despolarización de la membrana pueda invertir el transporte y liberar GABA al medio extracelular (Del Arco et al., 1998).

Los transportadores GAT-1 y GAT-3 son los dos principales subtipos de GATs en el Sistema Nervioso Central (SNC), y utilizando hibridación *in situ* para el RNAm del GAT-1 se observó una amplia expresión de este transportador en los GB, principalmente en los axones, mientras que el ARNm del GAT-3 se detectó predominantemente en las células gliales de diferentes núcleos, incluyendo al GP (Figura 2; Jin et al., 2011).

Para el GAT-1 se ha reportado una constante de Michaelis-Menten (Km) para GABA de 5 μM en sinaptosomas aislados del hipocampo (Cristóvão et al., 2009), y puede diferenciarse farmacológicamente de los otros transportadores mediante el bloqueador selectivo SKF-89976A, con concentraciones inhibitoras medias (IC_{50}) de 0.17-0.64 μM para GAT-1 y de 550, 1,990 y 7,210 μM para GAT-2, GAT-3 y BGT-1, respectivamente

(Kristensen et al., 2011). El fármaco SNAP-5114 es un bloqueador de GAT-2 y GAT-3 con valores de IC_{50} de ~ 20 y $5 \mu M$, respectivamente (Jin et al., 2011).

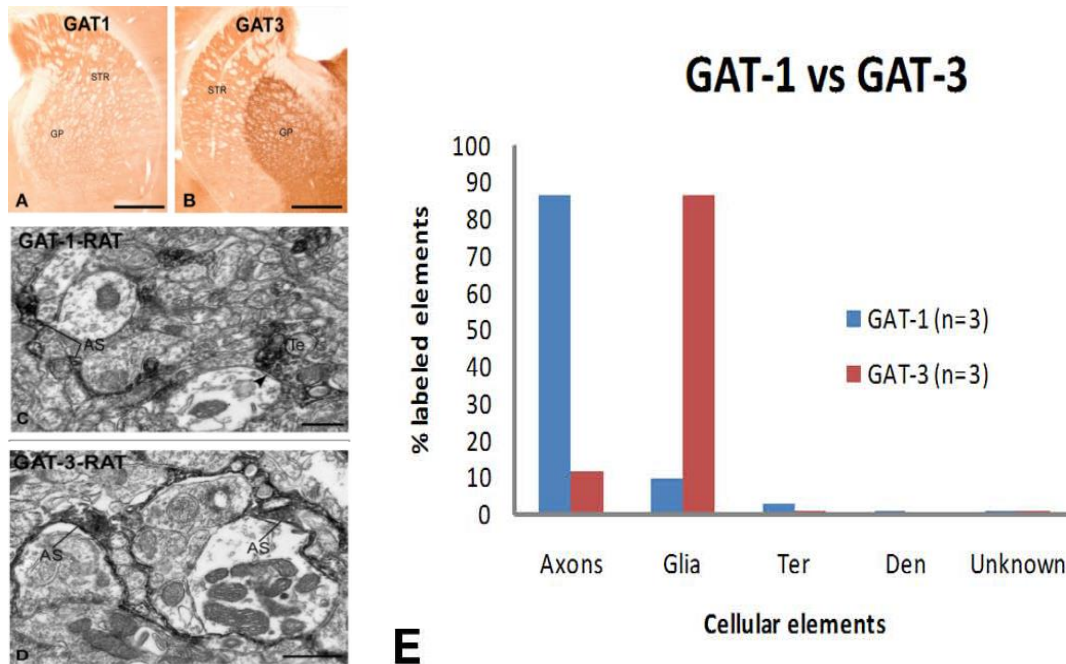


Figura 2. Micrografías de luz y electrónica de la inmunorreactividad a GAT-1 y GAT-3 en el GP de la rata. A,B. Micrografías de luz que muestran la presencia de GAT-1 y GAT-3 en el neostriado (STR) y el GP. **C.** Inmunorreactividad a GAT-1 en terminales axónicas (Te) y procesos gliales (AS) del GP de la rata. **D.** Procesos astrocíticos inmunopositivos a GAT-3 en contacto cercano con terminales y dendritas no marcadas en el GP de la rata. **E.** Cuantificación de los elementos inmunopositivos para GAT-1 o GAT-3 en el GP de la rata. Modificado de Jin et al., 2011.

1.2 Sistema histaminérgico

La histamina es una molécula hidrofílica que consiste de un anillo imidazólico y una cadena lateral etilamina (2-[4-imidazolil]etilamina), y es producto de la descarboxilación del aminoácido L-histidina, reacción catalizada por la enzima descarboxilasa de L-histidina, en la periferia por mastocitos, linfocitos, basófilos, plaquetas y células entero-cromafines de la mucosa gástrica, y en el SNC por los mastocitos y neuronas. En el

organismo, la histamina está involucrada en distintos procesos, entre ellos la respuesta inmune, la secreción de ácido gástrico, la contracción del músculo liso, el ciclo sueño vigilia, la ingesta de agua y alimentos, y la conducta motora.

La histamina es un neuromodulador, y es sintetizada por neuronas localizadas en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo posterior, las cuales envían proyecciones a prácticamente todo el SNC (Haas et al., 2008). Las fibras histaminérgicas presentan varicosidades y no establecen contactos sinápticos típicos (Takagi et al., 1986). La histamina es almacenada en vesículas y su liberación es inducida por despolarización, inhibiéndose en ausencia de Ca^{2+} o por concentraciones elevadas de Mg^{2+} , lo que indica la participación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y que el mecanismo de liberación (exocitosis) es similar al descrito para los neurotransmisores.

Las neuronas histaminérgicas tienen un cuerpo de 20-30 μm de diámetro, y la mayoría presentan tres dendritas principales que se ramifican. Tienen un potencial de membrana en reposo alrededor de -50 mV, son espontáneamente activas, con un patrón de disparo regular lento (2.1 ± 0.6 Hz), y muestran un ritmo circadiano, siendo más activas durante la vigilia en varias especies incluyendo peces, roedores y primates (Haas y Reiner, 1988; Mochizuki et al., 1992; Burns et al, 2003; Haas et al., 2008). Reciben inervación glutamatérgica de la corteza cerebral y del hipotálamo (área preóptica lateral), y GABAérgica de diversas áreas del hipotálamo, principalmente del área preóptica ventrolateral, cuyas neuronas tienen una alta actividad durante la etapa de sueño y suprimen la actividad espontánea de las neuronas histaminérgicas.

La concentración de la histamina liberada al medio sináptico es regulada principalmente por la degradación en el medio extracelular por la enzima N-metil-transferasa de histamina (HNMT; White, 1959; Barnes y Hough, 2002). A la fecha no se descrito un mecanismo de recaptura de alta afinidad; sin embargo, los astrocitos capturan histamina a través del transportador de monoaminas plasmático (PMAT) y el transportador catiónico orgánico 3 (OCT-3), aunque con muy baja afinidad (K_m 0.56 mM y 4.0 mM, respectivamente; Yoshikawa et al., 2013).

1.2.1 Receptores a histamina

Los efectos funcionales de la histamina se deben a la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés), y cuatro de estos receptores han sido clonados a la fecha (H₁, H₂, H₃ y H₄; Bakker, 2004; Nieto-Alamilla et al., 2016). La Tabla 2 describe la localización, funciones principales y la proteína G a la que se acoplan los cuatro receptores (Ramos-Jiménez et al., 2009).

Tabla 2. Características generales de los receptores metabotrópicos a histamina.

Receptor	Proteína G	Localización	Función principal
H ₁	G α_{q11}	Músculo liso, células endoteliales, médula de las glándulas suprarrenales, corazón y SNC	Respuestas alérgicas, contracción del músculo liso, liberación de hormonas, regulación del ciclo vigilia-sueño
H ₂	G α_s	Células gástricas parietales, músculo liso, células supresoras T, neutrófilos, corazón, útero y SNC	Estimulación de la secreción de ácido gástrico, relajación del músculo liso
H ₃	G $\alpha_{i/o}$	SNC y nervios simpáticos y parasimpáticos del corazón y tracto gastrointestinal	Inhibición de la síntesis y liberación de la histamina y otros neurotransmisores
H ₄	G $\alpha_{i/o}$	Médula ósea, leucocitos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y pulmón	Respuestas inmunes

Modificada de Ramos-Jiménez et al., 2009.

1.2.2 Receptor a histamina H₃ (H₃R)

El H₃R pertenece a la familia de los GPCRs, consta de siete dominios transmembranales, con el extremo amino terminal extracelular y el extremo carboxilo terminal intracelular, tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. Se acopla a proteínas G $\alpha_{i/o}$, cuyas

subunidades $G\alpha$ inhiben a las adenilil ciclasas, disminuyendo la concentración intracelular de AMPc (Ramos-Jimenez et al., 2009), y reducen la actividad del intercambiador sodio/protón (Na^+/H^+ exchanger, NHE) (van Willigen et al., 2000; Silver et al., 2001). Las subunidades $G\beta\gamma$ inhiben la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje, y activan canales de potasio rectificadores de entrada (GIRKs), a la fosfolipasa A_2 (PLA_2), a la fosfolipasa C (PLC), a la 3-cinasa de fosfatidilinositol (PI3K) y a las cinasas de proteína activadas por mitógenos, MAPKs (Bongers et al., 2007; Nieto-Alamilla et al., 2016).

El H_3R fue descrito inicialmente como un autorreceptor que modulaba la síntesis y la liberación de la histamina, y posteriormente se mostró que inhibe pre-sinápticamente la liberación de otros neurotransmisores y neuromoduladores como GABA, noradrenalina, serotonina, dopamina, glutamato, acetilcolina y sustancia P (Nieto-Alamilla et al., 2016). Es expresado principalmente en neuronas y en muy baja densidad en células gliales (Arrang et al., 1987; Ferreira et al., 2012).

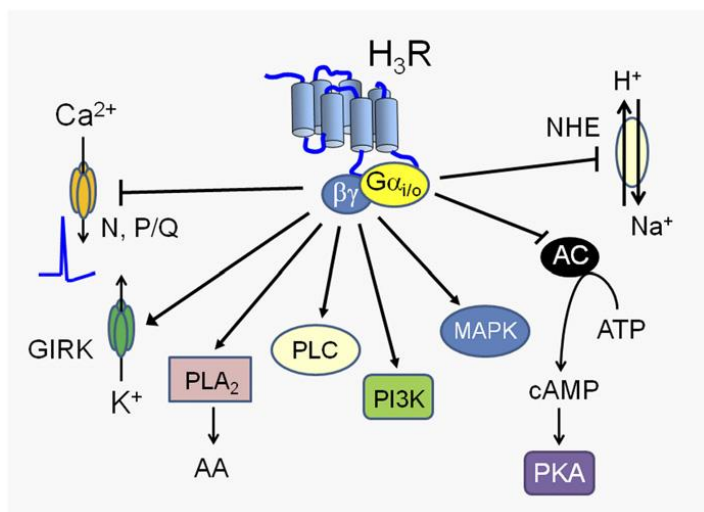


Figura 3. Vías de señalización del receptor H_3 . El receptor activa o modula diferentes vías a través de la subunidad $G\alpha$ y los complejos $G\beta\gamma$ de proteínas $G\alpha_{i/o}$. Modificado de Nieto-Alamilla et al., 2016.

En el humano, el gen que codifica para el H_3R se localiza en el cromosoma 20 y se generan 20 isoformas por procesamiento alternativo del RNAm correspondiente. La denominada isoforma completa contiene 445 aminoácidos (aa), fue la primera en ser clonada (Lovenberg et al., 1999) y es la de mayor expresión en el cerebro. Posteriormente

se reportó que las isoformas de 415, 365, 329 y 326 aa también se expresan de manera abundante en distintas regiones del SNC. La isoforma de 365 aa carece de 80 residuos en la tercera asa intracelular, y se ha reportado que puede tener una mayor afinidad por los agonistas con respecto a la isoforma de 445 aa (Bongers et al., 2007b). Sin embargo, otros trabajos (Cogé et al., 2001; García-Gálvez et al., 2018) no reportan diferencias significativas en la afinidad de los receptores humanos de 445 y 365 aa por diferentes agonistas y antagonistas, lo que podría deberse al sistema de expresión heteróloga empleado.

En la rata también se generan diversas isoformas del H₃R, siendo funcionales las isoformas H_{3A}, H_{3B} y H_{3C}, que difieren en la longitud de la tercera asa intracelular y que muestran una distribución heterógena en el cerebro, pero no diferencias significativas en su afinidad por distintos ligandos (ver Tabla 3; Drutel et al., 2001). Las secuencias que codifica el H₃R completo de la rata, el mono, el cobayo y el ratón han sido clonadas y comparten un 93% de identidad con el H_{3R}₄₄₅ humano (Lovenberg et al., 2000; Tardivel-Lacombe et al., 2000; Chen et al., 2003; Yao et al., 2003).

El H₃R puede adoptar un estado conformacional activo en ausencia de ligando, es decir, tiene actividad constitutiva, la cual depende del número de conformaciones activas espontáneamente y de la eficacia de estas conformaciones para acoplarse y activar a las proteínas G $\alpha_{i/o}$. La actividad constitutiva del H₃R fue demostrada inicialmente en sistemas de expresión heteróloga, en los cuales dicha actividad dependió de la especie del receptor (rata y humano), la isoforma, la línea celular empleada y la vía de señalización estudiada (Arrang et al., 2007). Posteriormente se demostró la actividad constitutiva del receptor nativo de la rata, mediante ensayos *in vitro* (sinaptosomas) e *in vivo* en los que un antagonista aumentó la liberación de histamina, comportándose como un agonista inverso (Morisset et al., 2000).

Tabla 3. Afinidad por agonistas y antagonistas selectivos de las isoformas funcionales del H₃R de la rata expresadas en células COS-7.

	Valores de pKi				
	Agonistas			Antagonistas	
	histamina	immepip	RAMH	clobenpropit	tioperamida
H _{3A}	5.7 ± 0.15	7.5 ± 0.08	6.4 ± 0.20	8.3 ± 0.02	7.2 ± 0.08
H _{3B}	6.2 ± 0.10	8.0 ± 0.06	6.9 ± 0.08	8.6 ± 0.10	7.5 ± 0.15
H _{3C}	6.3 ± 0.07	8.0 ± 0.10	7.1 ± 0.14	8.5 ± 0.03	7.6 ± 0.06

Los valores se expresan como el Log₁₀ de la constante de inhibición, Ki. Modificado de Drutel et al., 2001.

Se ha reportado también la expresión post-sináptica del H₃R en el neostriado, la corteza cerebral, el hipocampo y el núcleo accumbens (Pillot et al., 2002; González-Sepúlveda et al., 2013; Parks et al., 2014). En el hipocampo de la rata, la activación de estos receptores activa a las MAPKs e induce mejoría de la memoria (Giovannini et al., 2003). En las células que producen la hormona concentradora de melanina, el H₃R activa GIRKs inhibiendo el disparo neuronal (Parks et al., 2014). Por su localización y sus efectos funcionales, el interés por el H₃R ha aumentado considerablemente dado su potencial para el tratamiento de la obesidad, la epilepsia, el desorden de hiperactividad y déficit de atención, y las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson (Nieto-Alamilla et al., 2016).

Estudios con autorradiografía de la distribución del H₃R en el cerebro de la rata revelaron una alta densidad de sitios de unión en la corteza cerebral, el núcleo olfatorio anterior, el núcleo accumbens, los GB (neostriado, GP y SNr), el tubérculo olfatorio, la amígdala, y el núcleo tuberomamilar (Cumming et al., 1991; Pillot et al., 2002). En el GP, y en contraste con la unión de radioligando, la expresión del RNAm del receptor es muy baja, lo cual sugiere fuertemente que en este núcleo los H₃Rs se localizan en las terminales de las

neuronas espinosas medianas de proyección del neostriado, donde existe una alta expresión del RNAm del H₃R (Figura 4C). La alta densidad del H₃R en el GP del humano fue mostrada empleando el ligando fluorescente Bodilisant (Tomasch et al., 2012), sugiriendo un efecto funcional importante en este núcleo (Figura 4A y 4B).

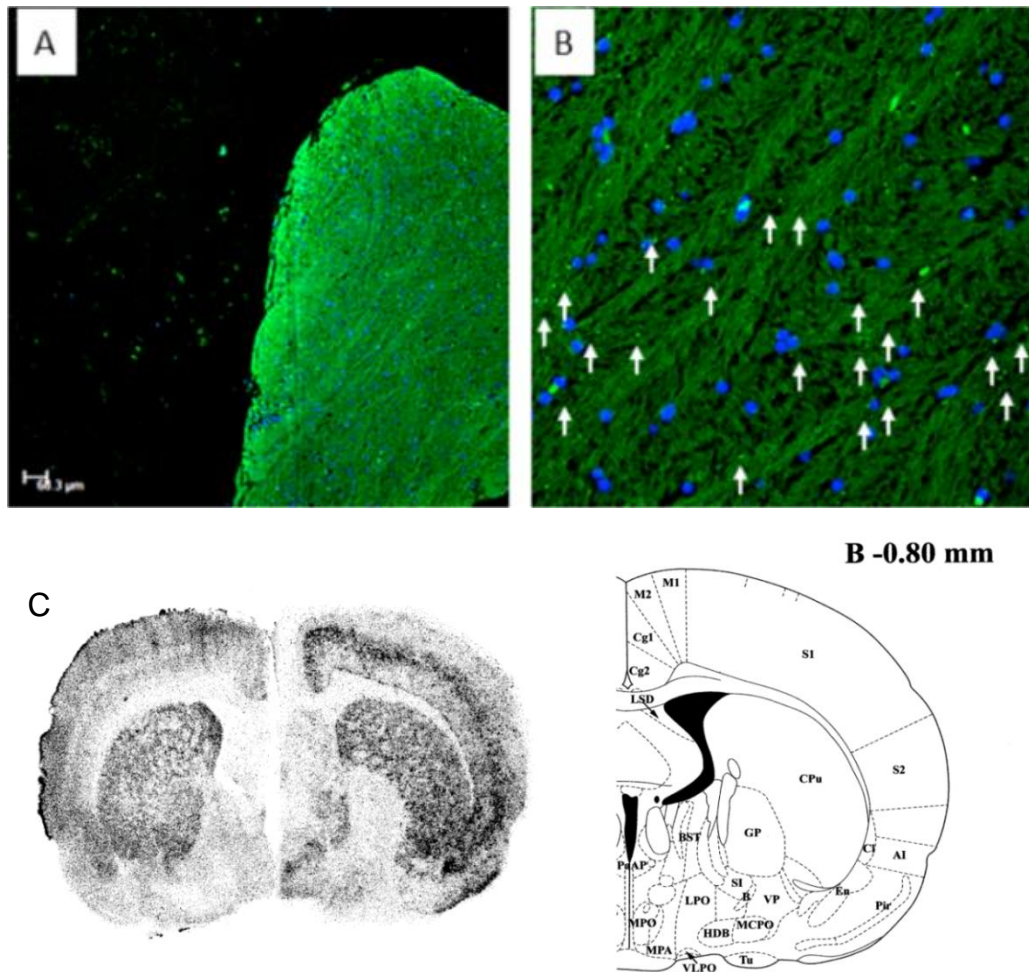


Figura 4. Detección del H₃R en el cerebro humano y de la rata. A, B. Detección con el ligando fluorescente Bodilisant en rebanadas del GP humano. Las áreas verdes indican los H₃R y las flechas indican algunas fibras histaminérgicas (Tomasch et al., 2012). C. Distribución del H₃R y el RNAm correspondiente en el cerebro de la rata. Los sitios de unión (izquierda) y el RNAm (derecha) fueron visualizados usando [¹²⁵I]-iodoproxyfan o una ribosonda antisentido marcada con ³³P, respectivamente. Tomado de Pillot et al., 2002.

Modulación de la liberación de GABA

El H₃R expresado en las terminales GABAérgicas inhibe la liberación de GABA, ya sea de manera directa o funcionando como un metamodulador. En experimentos *in vivo* en ratas se mostró que la activación directa del H₃R en el núcleo vestibulo medial inhibe la liberación de GABA, lo que también se observó en experimentos en cultivos primarios de neuronas corticales y neuronas disociadas del núcleo ventromedial del hipotálamo de la rata (Jang et al., 2001; Bergquist et al., 2006; Dai et al., 2007).

Para dos núcleos de los GB de la rata, neostriado y SNr, se ha reportado que la activación del H₃R inhibe selectivamente el efecto facilitador de los receptores a dopamina D₁ en liberación de GABA, mediante la inhibición de canales de calcio activados por voltaje tipo P/Q (García et al., 1997; Arias-Montaña et al., 2001, 2007).

1.3 Adenosina y receptores A_{2A}

La adenosina es una molécula de purina que funciona como neuromodulador en el SNC. La noción aceptada es que no se sintetiza y/o almacena en vesículas y que no se libera de terminales nerviosas en respuesta a la despolarización y la entrada de calcio. Es producida por dos mecanismos principales, el catabolismo extracelular por ectonucleotidasas del ATP liberado por neuronas y glía, y la producción intracelular y el transporte al medio extracelular (Figura 5). La presencia de adenosina en el espacio extracelular plantea que en el SNC puede funcionar como una molécula de señalización no sináptica que difunde lejos de las células que la originaron y que influencia tónicamente la transmisión química (Wall et al., 2007).

La adenosina tiene una función importante en la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica y no sináptica del hipocampo y los GB (Moore et al., 2003; Sperlágh y Vizi, 2011). La concentración extracelular de adenosina es mantenida por su degradación y transporte, y en el medio extracelular es degradada a inosina por la desaminasa de adenosina, o bien puede ser transportada al medio intracelular por los transportadores de nucleósidos, para posteriormente ser fosforilada para formar 5'-AMPC por la cinasa de

adenosina (ADK, por sus siglas en inglés *adenosine kinase*), siendo ésta la principal enzima que regula los niveles de adenosina (Boison, 2008).

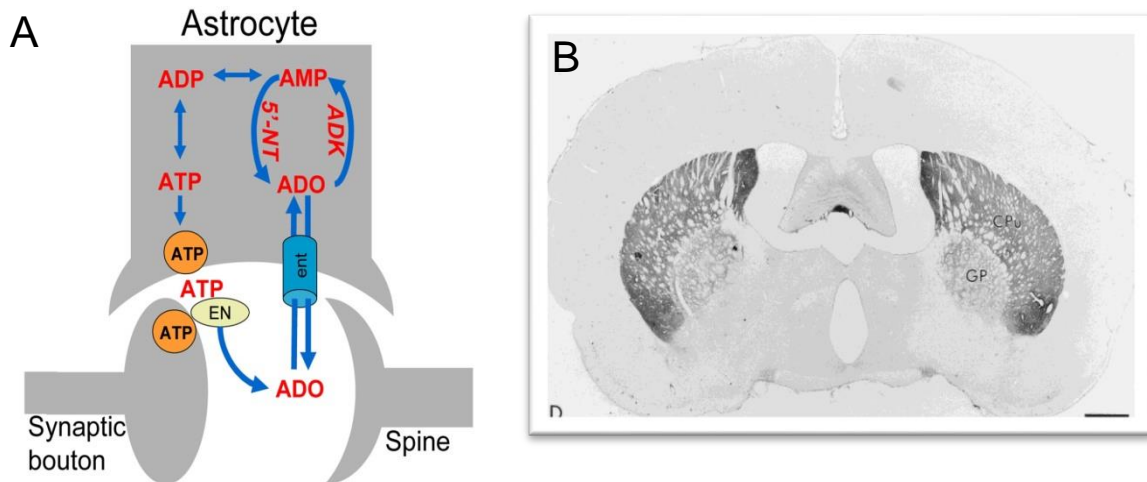


Figura 5. Síntesis de la adenosina y expresión del receptor A_{2A} en los GB. **A.** La adenosina se forma por degradación del ATP coliberado por exocitosis de las terminales nerviosas y de los astrocitos al medio extracelular y la hendidura sináptica, donde es procesado por ectonucleotidasas (EN). Modificado de Boison, 2008. **B.** Expresión del receptor a adenosina A_{2A} en el neostriado y el GP de la rata, detectado con un anticuerpo contra el receptor, mostrando una alta densidad en ambos núcleos. Modificado de Rosin et al., 1998.

La adenosina activa a cuatro subtipos de receptores acoplados a proteínas G: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 . Los receptores A_1 y A_3 están acoplados a proteínas $G\alpha_{i/o}$ y los A_2 a proteínas $G\alpha_s$. En los GB se expresan de manera abundante los receptores A_1 y A_{2A} , y evidencias electrofisiológicas y neuroquímicas muestran que la activación de receptores A_1 pre-sinápticos reduce la liberación de distintos neurotransmisores en varias regiones del SNC, incluyendo los GB (Svenningsson et al., 1999).

El efecto de la activación de los receptores A_{2A} puede ser diferencial o incluso opuesto, aún en la misma región cerebral. Estas funciones contradictorias parecen deberse a la localización del receptor (pre- o post-sináptica), así como a interacciones funcionales y moleculares con otros receptores (a adenosina A_1 , a glutamato metabotrópico 5, a dopamina D_2 , y a cannabinoides CB_1). El receptor A_{2A} se distribuye de manera heterogénea en el cerebro, y se concentra mayormente en regiones que reciben inervación dopaminérgica,

siendo el neocórtex, el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio las regiones con mayor expresión de este receptor, observándose una menor densidad en el hipocampo, la corteza y el mesencéfalo (Rosin et al., 1998). El efecto del A_{2A}R observado generalmente es la facilitación de la liberación de los neurotransmisores acetilcolina, glutamato, aspartato y dopamina.

En el neocórtex se encuentran los niveles de expresión más altos del A_{2A}R, con diversas funciones en condiciones fisiológicas y patológicas (Tebano et al., 2012; Chen et al., 2007; Popoli et al., 2007). El A_{2A}R se expresa principalmente en las NEMs encefalinérgicas (Schiffmann et al., 1991; Augood y Emson, 1994), que envían axones al GP, núcleo con una densidad moderada de A_{2A}Rs y una baja expresión del RNAm (Rosin et al., 1998). Incluso, estudios de RT-PCR de célula única reportan que las neuronas palidales no expresan el RNAm de este receptor (Shindou et al., 2003), indicando que el A_{2A}R se localiza en las terminales de las aferencias al GP, principalmente de las neuronas estriatales. Estudios en rebanadas del GP muestran que la activación del receptor A_{2A} aumenta la liberación de GABA inducida por despolarización química (Floran et al., 2005) y eléctrica (Mayfield et al., 1993; Dayne et al., 1996), efecto corroborado por estudios electrofisiológicos, que mostraron además la participación de la formación de AMPc en el efecto (Shindou et al., 2002).

Sinaptosomas del GP

En la tesis de maestría se corroboró la presencia de sinaptosomas en la preparación obtenida con el método descrito en la sección de Metodología. La Figura 6A ilustra la disección del GP de las rebanadas coronales del cerebro de la rata, y en las Figuras 6B y 6C se muestran micrografías electrónicas de la preparación sinaptosomal. Se observan numerosas estructuras que poseen las características de las terminales nerviosas, es decir, vesículas sinápticas, mitocondrias, y una región electrodensa que correspondería a la zona activa.

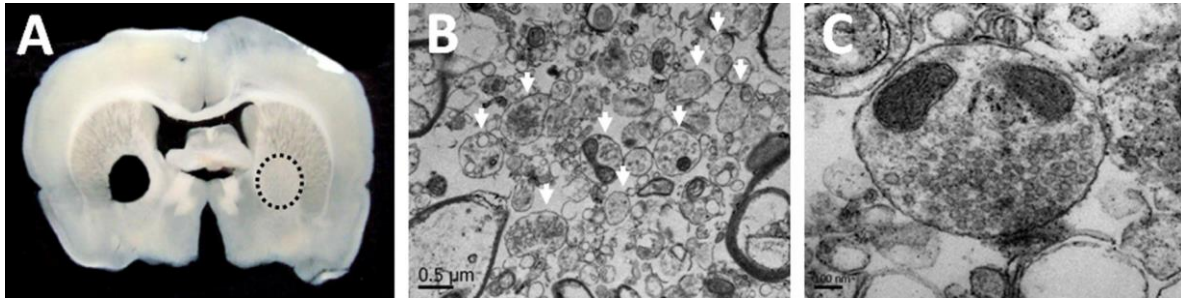


Figura 6. Sinaptosomas del globo pálido de la rata. **A.** Ilustración de la disección del GP (círculo punteado) a partir de rebanadas coronales del cerebro. **B.** Micrografía de la preparación sinaptosomal (x20,000). Existen numerosas estructuras redondeadas intactas (flechas) de distinto tamaño con las características de las terminales nerviosas. **C.** Micrografía de la preparación sinaptosomal (x50,000) mostrando un sinaptosoma aislado.

Efecto de la activación del receptor A_{2A} en la liberación de [3 H]-GABA

La Figura 7A muestra un experimento de liberación de [3 H]-GABA por sinaptosomas del GP de la rata, inducida por despolarización con alto potasio (20 mM) y en presencia del CGS-21680, agonista selectivo del $A_{2A}R$, para ilustrar la metodología utilizada.

El efecto de la activación del $A_{2A}R$ en la liberación de [3 H]-GABA inducida por despolarización se evaluó con cuatro concentraciones del agonista CGS-21680 (3, 10, 30 y 300 nM). En concentraciones de 3 y 10 nM, el CGS-21680 aumentó de manera significativa la liberación de [3 H]-GABA a $159.9 \pm 20.3\%$ y $143.3 \pm 9.4\%$ de la liberación control (razón S2/S1: control 0.426 ± 0.029 , 3 nM CGS-21680 0.699 ± 0.099 , 10 nM CGS-21680 0.670 ± 0.051 , promedios \pm error estándar, SEM, tres experimentos; $P < 0.05$ para ambas concentraciones, Figura 7B).

Para confirmar la participación del $A_{2A}R$ en el efecto estimulador de la liberación de [3 H]-GABA, se utilizó el antagonista selectivo ZM-241385 (100 nM). La Figura 7C muestra que no existió diferencia estadísticamente significativa entre la condición control y en presencia del agonista y el antagonista (CGS-21680 $135.2 \pm 5.9\%$ del control, CGS-21680 y ZM-241385 $104.9 \pm 10.0\%$ del control; razón S2/S1: control 0.535 ± 0.041 ; CGS-21680 0.750 ± 0.022 , $P < 0.05$; CGS-21680 y ZM-241385 0.578 ± 0.047 , $P > 0.05$, tres experimentos). La Figura 7D muestra que en una serie diferente de experimentos la

perfusión con CGS-2168 en concentraciones de 30 y 300 nM no modificó de manera significativa la liberación de [³H]-GABA (razón S2/S1: control 0.656 ± 0.040, 30 nM de CGS-21680 0.662 ± 0.039; 300 nM de CGS-21680 0.601 ± 0.036; *P* < 0.05 para ambas concentraciones).

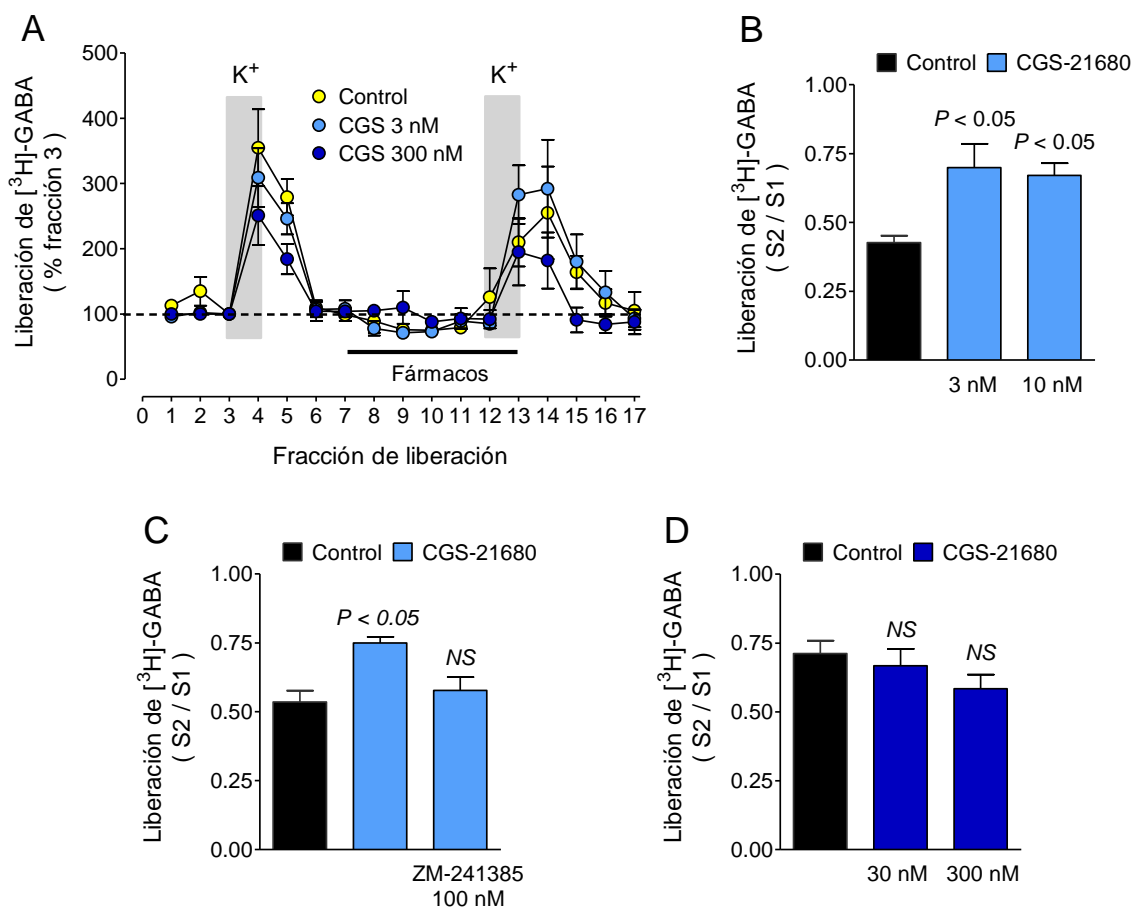


Figura 7. Efecto de la activación del A_{2A}R en la liberación de [³H]-GABA inducida por alto potasio en sinaptosomas del globo pálido de la rata. A. Experimento representativo. Las barras grises muestran los estímulos con 20 mM de potasio (1 min). La barra negra indica la perfusión con el agonista CGS-21680. Los valores son el promedio ± SEM de determinaciones por cuadruplicado. B. Análisis de tres experimentos con 3 y 10 nM de CGS-21680. Los valores corresponden a la media ± SEM. C. Bloqueo por el antagonista del A_{2A}R ZM-241385 (100 nM) del efecto de CGS-21680 (3 nM). D. Análisis de tres experimentos con 30 y 300 nM de CGS-21680. Los valores corresponden a la media ± SEM. Para los paneles B, C y D el análisis estadístico se realizó con ANOVA y la prueba de Dunnett. NS, sin diferencia significativa.

2. Planteamiento del problema

El GABA es el principal neurotransmisor utilizado por las neuronas de los GB, siendo necesaria una regulación fina de la transmisión GABAérgica, ya que un desbalance en esta regulación origina trastornos motores y cognitivos (DeLong, 1990; Gerlach et. al., 1996; Leisman y Melillo, 2013). El GP tiene una participación crítica en la función de los GB, posee inervación histaminérgica y una alta densidad de H₃Rs, localizados primariamente en las terminales estriado-palidales.

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que en las terminales estriado-nigrales la activación del H₃R disminuye la liberación de GABA, y que este efecto se opone a la acción estimuladora del receptor a dopamina D₁ (García y cols., 1997; Arias-Montaña et al., 2001). Por otra parte, el receptor a adenosina A_{2A} (A_{2A}R) se expresa en alta densidad en los GB (Schiffmann et al., 1991) y estudios de co-expresión con técnicas de hibridación *in situ* revelaron que las neuronas que expresan al A_{2A}R son las estriado-palidales y no las estriado-nigrales (Augood y Emson, 1994) o las neuronas GABAérgicas intrínsecas del GP (Shindou et. al., 2003). Utilizando rebanadas del GP Shindou y cols. (2002) mostraron que la activación del A_{2A}R aumenta la transmisión GABAérgica y que este efecto está mediado por la vía de señalización AMPc/PKA.

Así, las neuronas espinosas medianas estriado-palidales expresan tanto al H₃R como al A_{2A}R, los cuales pueden regular a nivel pre-sináptico los niveles de GABA en las sinapsis. Estos receptores están acoplados a diferentes proteínas G (Gα_{i/o} y Gα_s, respectivamente) y por lo tanto inciden de manera diferente en la señalización intracelular, particularmente en la formación del segundo mensajero AMPc y la activación subsecuente de la cinasa A de proteínas (PKA), con efectos inhibitorios y estimulatorios, respectivamente.

En virtud de su acople a proteínas Gα_{i/o} el efecto inhibitorio del H₃R en la liberación de neurotransmisores involucra principalmente la reducción de la entrada de calcio inducida por la despolarización, vía la acción del complejo Gβγ en la subunidad α_{1A} que forma el poro del canal de los canales de calcio activados por voltaje tipo N y P/Q. Sin embargo, la activación del receptor también regula la vía AMPc/PKA mediante la inhibición de las adenilil ciclasas, efecto mediado por la subunidad Gα_{i/o}, lo que puede reducir la

fosforilación por la PKA de blancos importantes en la maquinaria de exocitosis. Por su parte, el A_{2A}R puede facilitar la liberación de GABA mediante la vía AMPc/PKA, ya que la PKA fosforila canales de calcio dependientes de voltaje, aumentando el tiempo de apertura, así como proteínas de la maquinaria de exocitosis.

El proyecto de doctorado continúa la tesis de maestría, en la que se presentaron datos que indicaban que el H₃R participa en la modulación de la comunicación sináptica GABAérgica del GP, funcionando como un metamodulador que inhibe de manera selectiva la facilitación de la liberación de GABA debida a la activación de los A_{2A}Rs. Para la tesis doctoral se planteó profundizar el estudio de la interacción funcional de los receptores H₃ y A_{2A} en la liberación de GABA en el GP de la rata, y se planteó analizar los mecanismos intracelulares involucrados en dicha interacción, específicamente una posible interacción directa entre ambos receptores, los efectos respectivos en la vía de señalización AMPc/PKA, y el efecto de esta vía y de los canales de calcio N y P/Q en la liberación de GABA.

3. Hipótesis de trabajo

La activación del receptor a histamina H₃ inhibe la liberación de GABA en las terminales palidales, efecto que se opone a la facilitación debida a la activación de receptores a adenosina A_{2A}, mediante la inhibición de la vía de señalización AMPc/PKA y/o de canales de calcio dependientes de voltaje involucrados en la exocitosis.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar si la activación del receptor a histamina H₃ modula la liberación de GABA en sinaptosomas del GP, si el efecto se opone a la acción de los receptores a adenosina A_{2A}, y establecer en su caso los mecanismos celulares responsables.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la activación del H₃R en la liberación de [³H]-GABA inducida por despolarización, y en su caso evaluar la interacción de la activación de los receptores A_{2A} y H₃.
2. Confirmar la participación de la vía AMPc/PKA en el efecto modulador de los A_{2A}Rs en la liberación de [³H]-GABA, analizando la formación de AMPc y utilizando análogos del AMPc permeantes así como inhibidores de la PKA en rebanadas y en sinaptosomas.
3. Determinar si el efecto de la activación de los H₃Rs en la liberación de [³H]-GABA inducida por los A_{2A}Rs se ejerce en la vía AMPc/PKA, analizando la inhibición de la formación de AMPc y utilizando análogos del AMPc permeantes y forskolina en ensayos de liberación en rebanadas y sinaptosomas.

4. Determinar si la modulación por el H₃R de la liberación de [³H]-GABA involucra la inhibición de canales de calcio activados por voltaje mediante ensayos de microfluorometría en sinaptosomas del GP.

5. Metodología

5.1 Obtención de rebanadas y sinaptosomas

Se utilizaron ratas Wistar macho (250-300 g), las cuales se sacrificaron por decapitación. Se extrajo rápidamente el encéfalo, y se depositó sobre una placa metálica colocada a su vez sobre hielo, para obtener un bloque que contiene el núcleo de interés. El bloque se fijó con cianoacrilato a la base de la cámara en un vibratomo y se sumergió en solución Krebs-Henseleit (KH) a 4°C gaseada con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ (4°C, pH 7.4), para obtener rebanadas coronales de 300 µm de grosor, de las cuales se disecó el GP de ambos hemisferios cerebrales. Las rebanadas se depositaron en la solución KH, y una vez disecados los núcleos de todas las ratas se procedió a homogenizar el tejido. Todos los procedimientos posteriores se realizaron a 4°C. La composición de la solución KH fue (mM): NaCl 116, KCl 3, MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, D-glucosa 11.

Las rebanadas se homogenizaron en 10 ml de solución de sacarosa 0.32 M/Hepes 10 mM (pH 7.4) conteniendo EDTA (1 mM) y albúmina sérica bovina (BSA, 1 mg/ml), utilizando un homogenizador de vidrio y un vástago de teflón (10 golpes a 400 rpm). El homogenado se centrifugó a 1,500xg, a 4°C y por 10 min (3,000 rpm, centrifuga Beckman GS6-6R, rotor GH 3-8). Se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 14,000xg durante 12 min a 4°C (10,850 rpm, centrifuga Sorvall RC-5, rotor SS-34). Se descartó el sobrenadante y se utilizó una pipeta Wilson de 1 ml para resuspender la pastilla en 5 ml de solución de Percoll (45%) en solución Krebs-Henseleit-Ringer (KHR; composición en mM: NaCl 140, Hepes 10, D- glucosa 5, KCl 5, EDTA 1, pH 7.3 con NaOH).

La suspensión se centrifugó a 14,000xg durante 2 min (4°C), y se colectó la fase superior la cual se depositó en un tubo de centrifuga, agregando 20 ml de solución KHR para después centrifugar a 20,000xg durante 20 min. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante dado que la pastilla no es muy compacta, y la pastilla se resuspendió en un volumen suficiente de la solución adecuada para el ensayo a realizar.

5.2 Ensayos de unión de radioligando a membranas sinaptosomales

Los sinaptosomas se colocaron en 30 ml de una solución hipotónica (10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 4°C) y se lisaron con un Polytron (3 ciclos de 5 segundos). La suspensión se centrifugó a 32,000xg por 20 min a 4°C y la pastilla (membranas sinaptosomales) se resuspendió en solución de incubación (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4).

5.2.1 Ensayos de saturación

Para determinar la densidad de A_{2A}Rs las membranas se incubaron (120 min, 25°C) con [³H]-CGS-21680 (0.6-150 nM), y la unión no específica se definió en presencia de ZM-241385 (10 μM). La incubación se detuvo filtrando las muestras (colector automático Brandel) a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) incubados con polietilenimina (0.3%, 2 h). Después de tres lavados con 1 ml de solución Tris-HCl (50 mM, pH 7.4, 4°C) los filtros se colocaron en viales de plástico y se adicionaron 3 ml de líquido de centelleo para determinar la radiactividad unida a los receptores presentes en las membranas sinaptosomales retenidas en los filtros. Los valores de la constante de disociación (K_d) y de la unión máxima (B_{max}) se determinaron por regresión no lineal con el programa Prisma (GraphPad 6.0).

5.2.2 Ensayos de inhibición

Alícuotas de la suspensión membranal (5 μg de proteína) se dividieron en dos grupos, con y sin preincubación con desaminasa de adenosina (2 U/ml, 15 min a 30°C). Posteriormente se incubaron (60 min, 30°C) con una concentración fija del radioligando del H₃R [³H]-NMHA (~2 nM) y concentraciones crecientes del agonista immpip, y de los antagonistas/agonistas inversos clobenpropit y A-331440 (10⁻¹²-10⁻⁵ M). En una serie diferente de experimentos se adicionó CGS-21680 (3 o 6 nM). Para el A_{2A}R, las alícuotas de la suspensión membranal se dividieron también en dos grupos, se incubaron (120 min, 25°C) con una concentración fija de [³H]-CGS-21680 (~4 nM) y concentraciones crecientes de CGS-21680 (10⁻¹⁰-10⁻⁵). En una serie adicional de experimentos, el segundo grupo se incubó en presencia de immpip (30 nM). La incubación se detuvo filtrando las muestras y se cuantificó como se describió anteriormente. Los valores de K_i se determinaron por regresión no lineal con el programa Prisma (GraphPad).

Efecto del GTP γ S en la unión de [3 H]-CGS-21680

Alícuotas de la suspensión membranal (5 μ g de proteína) se dividieron en dos grupos, con y sin preincubación con desaminasa de adenosina (2 U/ml, 15 min a 30°C), y posteriormente se incubaron (60 min, 30°C) con una concentración fija del radioligando. La unión de [3 H]-CGS-21680 (5 nM) en membranas de sinaptosomas del GP se analizó en presencia o ausencia de GTP γ S (30 μ M), un análogo no hidrolizable del GTP. La unión no específica se definió en presencia de ZM-241385 (10 μ M). La incubación se detuvo filtrando las muestras y se cuantificó como se describió anteriormente. Los valores de K_i se determinaron por regresión no lineal con el programa Prisma (GraphPad 6).

5.3 Liberación de [3 H]-GABA

Los sinaptosomas se incubaron durante 30 min a 37°C en solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH) conteniendo ~80 nM de [3 H]-GABA, 3 μ M de GABA, 1 U/ml de ADA y 10 μ M de ácido amino-oxiacético. La suspensión distribuyó en 12 o 15 cámaras (120 μ l) de un sistema de perfusión, y los sinaptosomas se perfundieron durante 20 min con solución KRH normal (1 ml/min) para eliminar el [3 H]-GABA no incorporado. Posteriormente se colectaron 15-17 fracciones de 1 min (1 ml).

La liberación de [3 H]-GABA se indujo introduciendo una solución con alto potasio (20 mM) en las fracciones 2 (S1) y 11 (S2), regresando a la solución normal entre estas dos fracciones y después del estímulo S2 (fracciones 3-10). Los fármacos de interés estuvieron presentes 5 min antes y durante el estímulo S2 (fracciones 5-11), a excepción del antagonista del receptor A_{2A} , presente después del primer estímulo (fracciones 3-11). La composición de la solución KRH fue (mM): Hepes 20, NaCl 118, NaHCO₃ 25, D-glucosa 15, KCl 4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, pH 7.4 con NaOH. La composición de la solución KRH con alto potasio fue (mM): Hepes 20, KCl 18.8, NaHCO₃ 25, D-glucosa 15, NaCl 99, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, pH 7.4 con NaOH.

A cada fracción colectada se le agregaron 3 ml de líquido de centelleo. Los sinaptosomas fueron recuperados de las cámaras y fueron lisados con 0.5 ml de HCl 1 N (1 h a temperatura ambiente), antes de añadir 5 ml de líquido de centelleo. La cantidad de

radiactividad (expresada como liberación fraccional) liberada en cada pulso de potasio (S1 y S2) fue determinada integrando el área de las curvas de liberación (fracciones 1-6 y 10-15), una vez sustraída la liberación basal. El efecto de los fármacos fue estimado comparando la razón S2/S1 con las curvas control correspondientes.

5.4 Ensayos de formación de AMPc

Se utilizaron rebanadas del GP o del neoestriado. Para colocar la misma cantidad de tejido por condición, en las rebanadas de 300 o 400 μm de grosor, respectivamente, se disecó el núcleo de interés utilizando sacabocados de 2 o 3 mm de diámetro. Las rebanadas se mantuvieron en solución KH fría (sin CaCl_2), y una vez obtenidas las rebanadas de todas las ratas, se incubaron por 30 min a 37°C con solución KH conteniendo 1.8 mM de CaCl_2 . Las rebanadas se incubaron (15 min, 37°C) en solución KH conteniendo desaminasa de adenosina (0.5 U/ml) e isobutil-metil-xantina (IBMX, 1 mM). Se adicionaron los fármacos de interés y se mantuvo la incubación por 30 min. La reacción fue detenida adicionando 1 ml de solución KH fría, los tubos se depositaron sobre hielo, se retiró la solución y se adicionaron 25 μl de HCl (1 M) frío. Después de 30 min a 4°C , se neutralizó el pH a 7.0 con 25 μl de NaOH (1 M) y 100 μl de solución Tris-HCl (1 M, pH 7.0) y se centrifugó a $15,000\times g$ (3 min, 4°C).

Para el ensayo de competencia entre el AMPc formado y el [^3H]-AMP por los sitios de unión de la PKA, se colocaron 50 μl de la muestra, 50 μl de solución de [^3H]-AMPc (20 nM) y 25 μl de PKA (0.1 U/muestra). Se incubó durante 2.5 h a 4°C y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) incubados con polietilenimina (0.3%, 2 h). Después de tres lavados con 1 ml de agua (4°C), los filtros se colocaron en viales de plástico y se adicionaron 3 ml de líquido de centelleo para determinar la radiactividad unida a la subunidad reguladora de la PKA retenida en los filtros.

5.5 Ensayos de microfluorimetría

Los sinaptosomas fueron resuspendidos en solución KRH, se colocaron en cámaras de registro previamente cubiertas con concanavalina (2 mg/ml) y se incubaron por 60 min a

37°C en ausencia de luz con el indicador de calcio Fura 2-AM (1 μ M) y 3% de BSA. Después de la incubación se lavó con solución KRH para eliminar el indicador no incorporado.

Las cámaras fueron colocadas en un microscopio invertido TMD (Nikon, Japón) acoplado a un microfluorómetro RF-F3010 (Photon Technology International, South Brunswick, NJ, USA). Los cambios en la concentración intrasinaptosomal de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) fueron evaluados determinando la razón de la fluorescencia (510 nm) después de la excitación con una longitud de onda de 340 o 380 nm. Los registros fueron adquiridos a una frecuencia de 20 Hz y en áreas de la cámara sin sinaptosomas se determinó la fluorescencia de fondo a 340 y 380 nm. Los sinaptosomas se perfundieron con solución KRH con un flujo de 1 ml/min, y se utilizó un protocolo de doble pulso en el cual se cambió la solución KRH con 3 mM de potasio a una solución KRH con 25 mM de potasio (substitución equimolar del NaCl, para mantener la osmolaridad de la solución) dos veces durante 20 s. El tiempo entre el primero y el segundo estímulos fue 4 min y 40 s, y los fármacos fueron perfundidos 3 min antes y durante el segundo pulso.

5.6 Ensayos de electrofisiología

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho (3-4 semanas), las cuales se anestesiaron con fentobarbital (60 mg/kg, ip) y se decapitaron. Se extrajo rápidamente el encéfalo, y se depositó sobre una placa colocada a su vez sobre hielo, para obtener un bloque que contenía el núcleo de interés. El bloque se fijó con cianoacrilato a la base de un microtomo VT1000S (Leica, Nussloch, Alemania) y se sumergió en solución de corte de sacarosa (ver abajo) gaseada con una mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2 (pH 7.4), para obtener rebanadas coronales de 350 μ m de grosor. Las rebanadas se depositaron en la solución de incubación por 30 min a 33°C, y posteriormente se estabilizaron por 1 h a temperatura ambiente.

Para el registro de las neuronas palidales, las rebanadas se transfirieron a una cámara de inmersión, y se perfundieron con la solución de líquido cefalorraquídeo artificial estándar (LCRA) a un flujo de 3.5-4 ml/min a 33°C (TC-324C, Warner Instruments). Los cuerpos celulares fueron localizados e identificados con un microscopio infrarrojo y contraste de

interferencia diferencial. Las pipetas de registro fueron obtenidas de capilares de vidrio de borosilicato, tuvieron resistencias eléctricas de 3-6 M Ω , y se llenaron con la solución interna. Los registros en fijación de voltaje o corriente fueron obtenidos con un amplificador Axoclamp-1D (Axon Instruments).

El potencial de membrana en reposo fue determinado después de romper la membrana celular, fue estabilizado en fijación de corriente, y se inyectaron pulsos de corriente entrante y saliente (1 s, incrementos de 50 pA a 0.2 Hz) a través de la pipeta en configuración de célula completa para medir la amplitud de los potenciales de acción, el umbral y la amplitud de la corriente después de la hiperpolarización (AHP).

Los registros de las corrientes post-sinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs) GABAérgicas fueron adquiridos en modo fijación de voltaje, registrados a 0 mV en presencia de ácido quinurénico (2 mM, inhibidor general de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos). Los agonistas de los receptores A_{2A} (CGS-21680 1 μ M) y H₃ (immepip 1 μ M) fueron perfundidos por 5 min, posteriormente se lavó el fármaco y se realizó de nuevo el protocolo de pulsos de corriente en la modalidad de fijación de corriente para confirmar la viabilidad de la neurona.

La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

Solución de corte (mM): sacarosa 210, KCl 2.8, MgSO₄ 2, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, MgCl₂ 6, CaCl₂ 1 y 10 D-glucosa

Solución de incubación (mM): NaCl 125, KCl 2.5, Na₂HPO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, ácido ascórbico 0.4 y D-glucosa 10.

LCRA (mM): NaCl 125, KCl 3, Na₂HPO₄ 1, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 2.5, y D-glucosa 10.

Solución interna (mM): MSK 135, KCl 10, NaCl 5, EGTA 1, Hepes 10, Mg-ATP 2, Na₂GTP 0.4, y fosfocreatina 10.

6. Resultados

6.1 Caracterización farmacológica del receptor a histamina H₃ (H₃R) en membranas sinaptosomales del GP de la rata

La Figura 8A muestra que en membranas sinaptosomales del GP la unión específica del radioligando [³H]-NMHA, agonista selectivo del H₃R, fue inhibida de manera dependiente de la concentración por los agonistas immepip y RAMH, así como por los antagonistas/agonistas inversos clobenpropit, ciproxifan y A-331440. A partir de 3 determinaciones se obtuvieron los valores de la constante de inhibición (K_i) que se presentan en la Tabla 4.

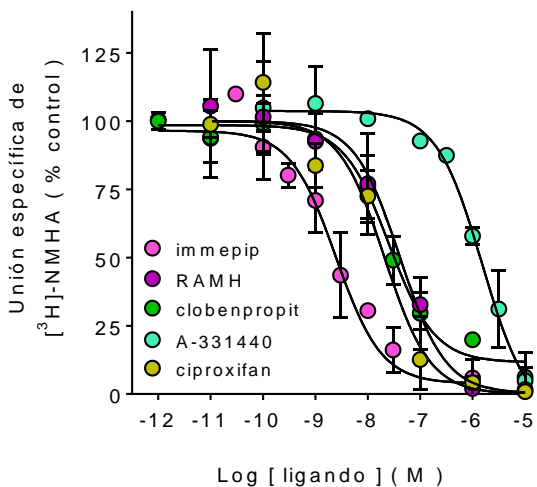


Figura 8. Inhibición por ligandos selectivos del H₃R de la unión de [³H]-NMHA en membranas de sinaptosomas del GP de la rata. Los valores muestran la unión específica, expresada como porcentaje de la unión control, y son el promedio \pm SEM de determinaciones por triplicado de un experimento representativo. El experimento se repitió tres veces con resultados similares. Los valores del $-\text{Log}_{10}$ (pK_i) de la constante de inhibición (K_i) se muestran en la Tabla 4.

	pK _i	K _i (nM)
Immepip	9.55 \pm 0.20	0.28
Clobenpropit	8.07 \pm 0.21	8.53
A-331440	6.50 \pm 0.04	316
RAMH	8.27 \pm 0.36	5.37
Ciproxifan	8.74 \pm 0.25	1.82

Tabla 4. Valores de pK_i y K_i de ligandos selectivos del H₃R. Los valores de pK_i son el promedio \pm SEM de tres experimentos.

6.2 Densidad de A_{2A}Rs en sinaptosomas del GP

La Figura 9A muestra un experimento representativo de la unión específica de [³H]-CGS21680, agonista selectivo del A_{2A}R, a membranas de sinaptosomas del GP. A partir de cinco experimentos se determinaron una unión máxima de 454 ± 77 fmol/mg proteína y una constante de disociación (K_d) de 4.1 ± 1.0 nM. Al aumentar la concentración del radioligando hasta 100 nM, se observó una posible segunda población de receptores. La Figura 9B muestra el análisis de Scatchard de un experimento representativo, ajustándose los datos a dos pendientes diferentes, indicando la presencia de dos poblaciones de receptores con diferente afinidad. La población de menor afinidad podría corresponder a receptores no acoplados a proteínas G, ya que el GTP γ S, que desacopla a los GPCRs de las proteínas G correspondientes, disminuyó la unión de [³H]-CGS-21680 (5 nM) a $41.8 \pm 2.2\%$ de la unión específica control (Figura 9C).

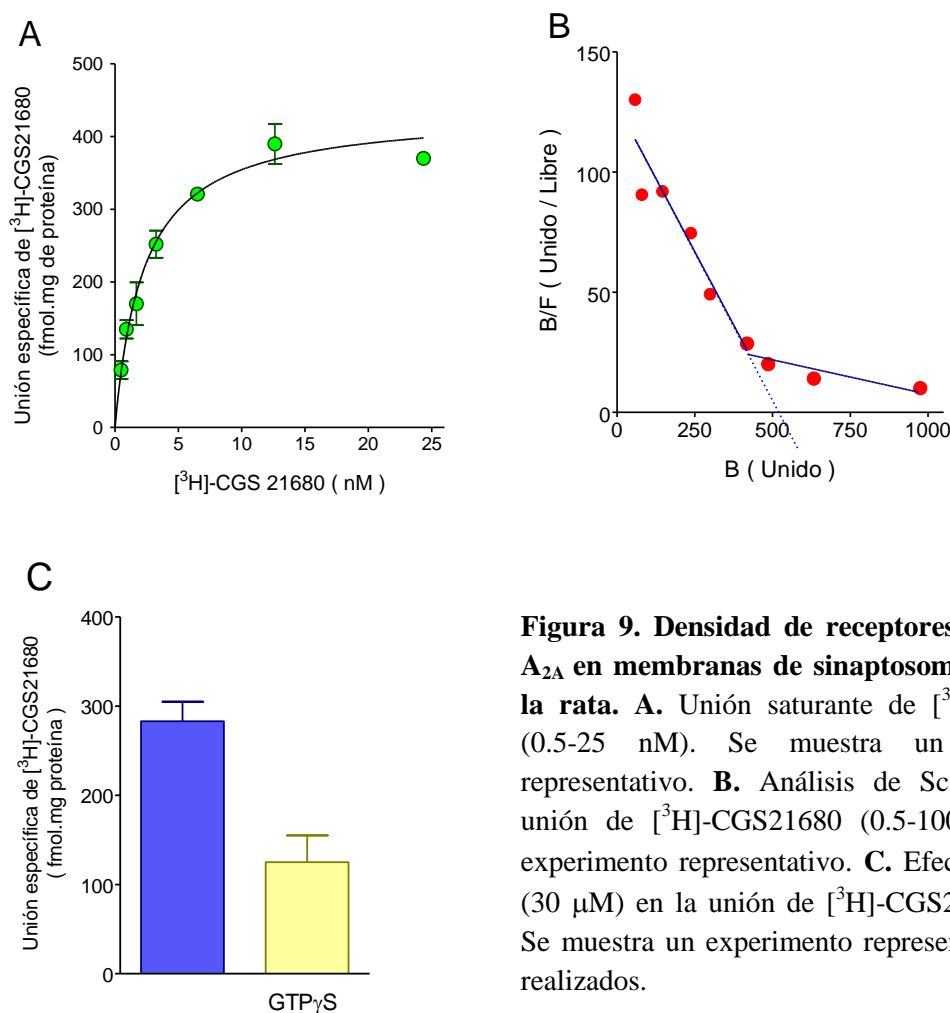


Figura 9. Densidad de receptores a adenosina A_{2A} en membranas de sinaptosomas del GP de la rata. **A.** Unión saturante de [³H]-CGS21680 (0.5-25 nM). Se muestra un experimento representativo. **B.** Análisis de Scatchard de la unión de [³H]-CGS21680 (0.5-100 nM) en un experimento representativo. **C.** Efecto del GTP γ S (30 μ M) en la unión de [³H]-CGS21680 (5 nM). Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

6.3 Efecto de la activación del H₃R en la liberación de [³H]-GABA

Inicialmente se analizó el efecto que por sí mismos podrían ejercer en la liberación de [³H]-GABA los ligandos del H₃R, utilizando un agonista selectivo (immepip, 100 nM) y un antagonista/agonista inverso (clobenpropit, 3 μM). La Figura 10A muestra que estos fármacos no modificaron la liberación de [³H]-GABA.

Para la evaluación de la interacción de los receptores A_{2A} y H₃ se utilizó una concentración (3 nM) del agonista del A_{2A}R CGS-21680, la cual aumentó de manera significativa la liberación de [³H]-GABA, y al agonista del H₃R immepip a 100 nM, concentración calculada para ocupar el 99% de los receptores presentes con base en la K_i obtenida en los ensayos de inhibición de la unión de [³H]-NMHA (0.27 nM). La Figura 10B muestra que la perfusión con immepip previno el efecto estimulador del agonista del A_{2A}R en la liberación de [³H]-GABA. La Figura 10C muestra que el antagonista clobenpropit (3 μM) previno de manera significativa, aunque parcial, el efecto de la activación del H₃R. El bloqueo por el clobenpropit del efecto del immepip correspondió a 47.2 ± 4.1%, valor en el rango de la inhibición teórica calculada (45.5-54.0%), considerando el valor de K_i del antagonista (10.1 nM). Este resultado apoya un efecto mediado por el H₃R.

El efecto inhibitorio de la activación de H₃Rs de la facilitación de la liberación de [³H]-GABA debida a la estimulación de A_{2A}Rs en sinaptosomas del GP dependió de la concentración del agonista immepip (Figura 11), y el análisis de cinco experimentos indicó una concentración inhibidora media (IC₅₀) de 5.2 nM.

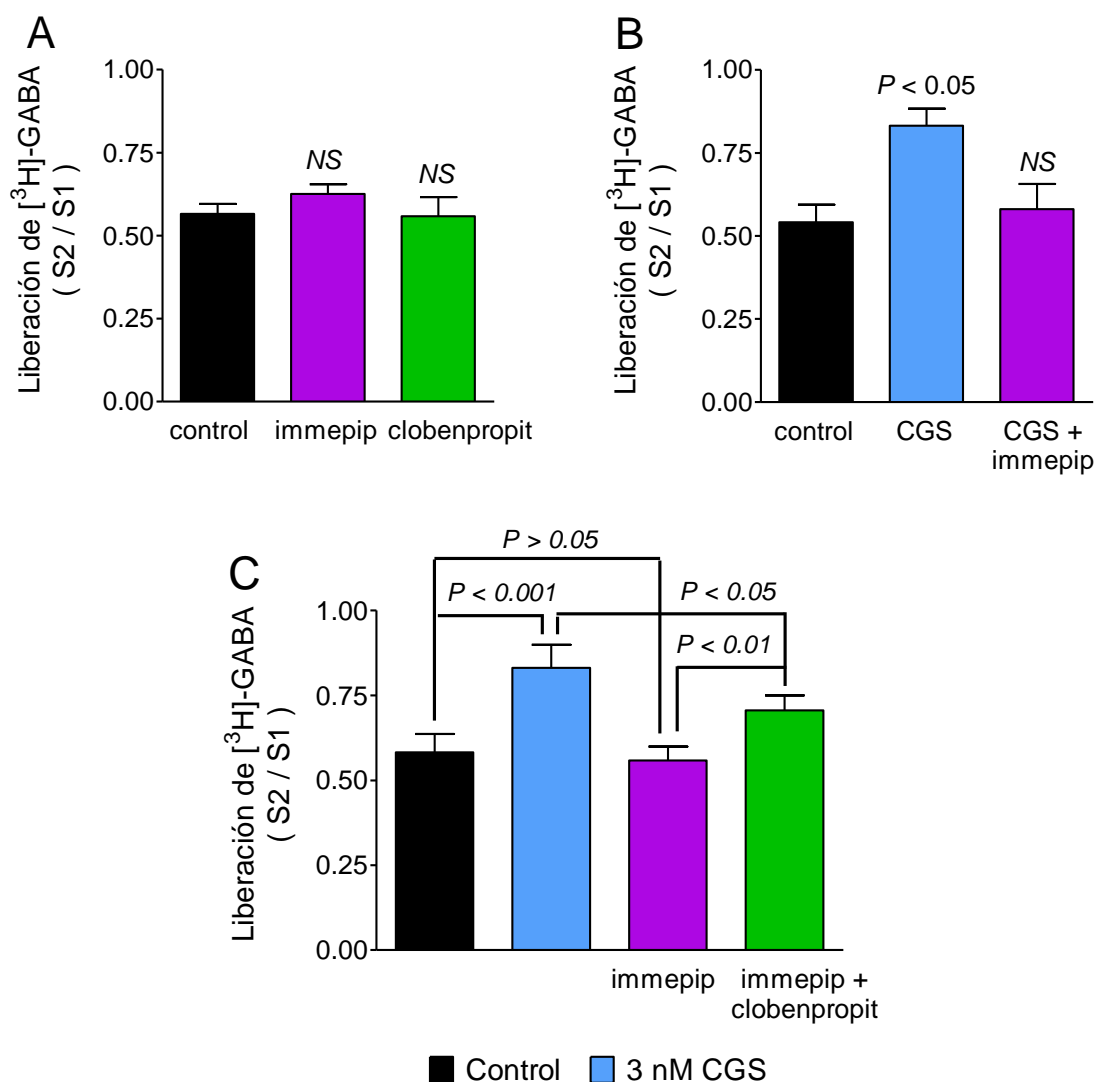


Figura 10. Efecto de la activación del H₃R en el efecto estimulador del A_{2A}R en la liberación de [³H]-GABA inducida por despolarización en sinaptosomas del GP de la rata. **A.** Efecto del agonista del H₃R imnepip (100 nM) o del antagonista/agonista inverso clobenpropit (3 μM). Los valores son promedios ± SEM de tres experimentos. NS, sin diferencia estadística con respecto a la liberación control. **B.** Inhibición por imnepip (100 nM) del efecto del agonista del A_{2A}R CGS-21680 (3 nM). Los valores corresponden al promedio ± SEM de 3 experimentos. Los fármacos estuvieron presentes 5 min (CGS-21680) o 8 min (imnepip) antes y durante el segundo pulso. NS, sin diferencia estadística de la liberación control. **C.** Bloqueo por clobenpropit (3 μM) del efecto inhibitorio del imnepip (100 nM). Los valores corresponden al promedio ± SEM. El análisis estadístico se realizó con ANOVA y las pruebas de Dunnett (A y B) o Tukey (C).

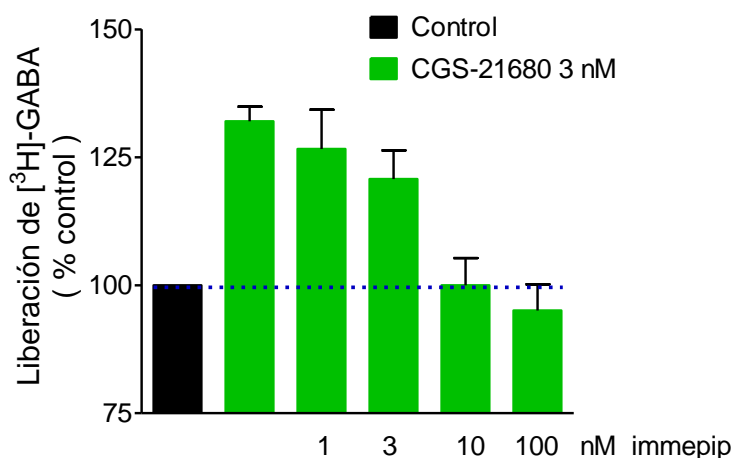


Figura 11. Dependencia de la concentración del efecto inhibitorio del agonista del H₃R immepip en la acción estimuladora del agonista del A_{2A}R CGS-21680 en la liberación de [³H]-GABA. Los valores se expresan como porcentaje de la razón S2/S1 de la liberación control (CGS-21680 3 nM) y son el promedio ± SEM de cinco experimentos. El valor de la concentración inhibidora media, IC₅₀, se proporciona en el texto.

6.4 Un agonista del A_{2A}R modifica la afinidad del H₃R por immepip, y un agonista del H₃R modifica la afinidad del A_{2A}R por CGS-21680

El efecto inhibitorio del H₃R en la acción estimuladora de los A_{2A}Rs en la liberación de [³H]-GABA podría ser explicado por una interacción física delimitada por la membrana, es decir, la formación de heterómeros. Como primer abordaje se realizaron ensayos de inhibición de la unión de [³H]-NMHA con immepip o clobenpropit en presencia de desaminasa de adenosina (ADA, 2 U/ml) o del agonista del A_{2A}R CGS-21680 (3 y 6 nM). El CGS-21680 modificó de manera modesta, pero significativa, la afinidad del H₃R por sus ligandos, aumentando la afinidad por el agonista y disminuyéndola para el antagonista (Figura 12A y Tabla 5). Por otra parte, el agonista del H₃R immepip (30 nM) disminuyó la afinidad del A_{2A}R por el agonista CGS-21680 (Figura 12B y Tabla 6).

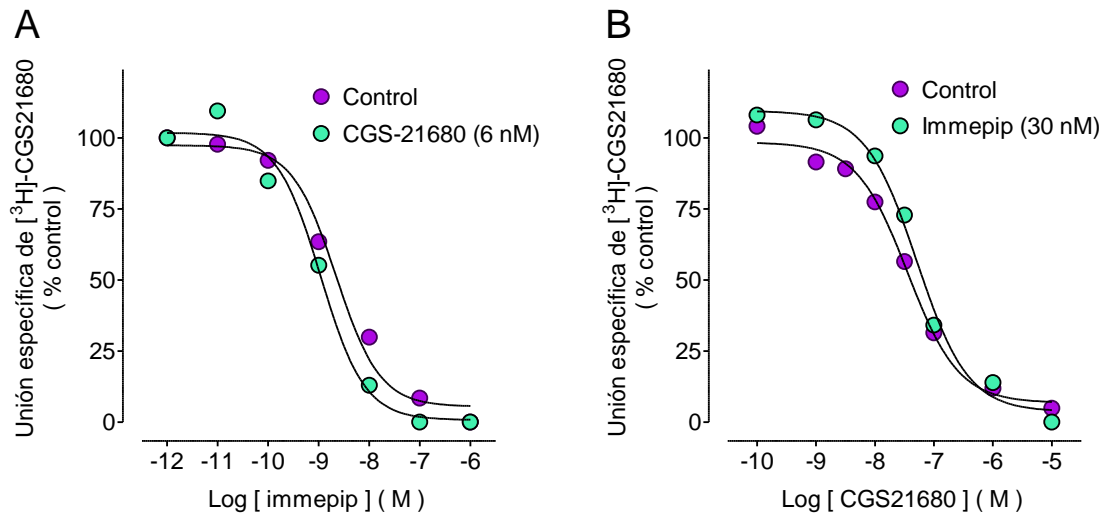


Figura 12. Efecto del agonista del A_{2A}R CGS-21680 en la inhibición por el agonista del H₃R Immeipip de la unión de [³H]-NMHA (A) y del Immeipip en la inhibición por el CGS-21680 de la unión de [³H]-CGS 21680 en membranas de sinaptosomas del globo pálido de la rata. Los valores se expresan como porcentaje de la unión específica de cada radioligando, y son el promedio de determinaciones por duplicado. El experimento se repitió cinco veces con resultados similares. Los valores de la constante de inhibición, K_i, se proporcionan en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Efecto del agonista del A_{2A}R CGS-21680 en la constante de inhibición (pK_i y K_i) del Immeipip y clobenpropit.

Condición	Immeipip		Clobenpropit	
	pK _i	K _i (nM)	pK _i	K _i (nM)
ADA (2 U/ml)	9.20 ± 0.01	0.63	8.35 ± 0.05	4.46
CGS-21680 (3 nM)	9.30 ± 0.02*	0.50	7.73 ± 0.18 (P = 0.019)	18.62
CGS-21680 (6 nM)	9.58 ± 0.02***	0.26	--	--

Los valores son el promedio ± SEM de cuatro experimentos. *P < 0.05; ***P < 0.001, Anova y prueba de Dunnett. Para el efecto del clobenpropit el análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

Tabla 6. Efecto del agonista del receptor H₃ immepip en la constante de inhibición del CGS-21680.

CGS-21680	pKi	Ki (nM)
ADA (2 U/ml)	8.34 ± 0.10	4.53
Immepip (30 nM)	8.03 ± 0.07	9.32
	P = 0.0024	

Los valores son el promedio ± SEM de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.5 La vía AMPc/PKA está involucrada en el efecto estimulador de los A_{2A}Rs

6.5.1 la activación del A_{2A}R incrementa la acumulación de AMPc, efecto reducido por el H₃R en rebanadas del neostriado y del GP

Los ensayos de formación de AMPc realizados en rebanadas del neostriado (Figura 13A) mostraron un efecto estimulador de la activación de los A_{2A}Rs con el agonista selectivo CGS-21680, y este efecto fue prevenido por el agonista del H₃R immepip (171.3 ± 5.7 y 100.0 ± 15.5% de la formación basal, respectivamente). En dos experimentos realizados en rebanadas del GP se observó también el efecto estimulador de la activación del A_{2A}R (~300% de la formación basal; Figura 13B).

En rebanadas del GP, se evaluó la dependencia de la concentración del CGS-21680 en la acumulación de AMPc. A partir de cinco experimentos se obtuvo una concentración efectiva media (EC₅₀) de 3.1 nM (Figura 14A), confirmando que el aumento en la acumulación de AMPc depende de la concentración del agonista del A_{2A}R. Además, se realizaron ensayos de acumulación de AMPc en sinaptosomas del GP, determinándose una EC₅₀ de 2.6 nM (Figura 14C). En ambas preparaciones, concentraciones bajas del agonista CGS-21680 inducen un aumento significativo de este segundo mensajero. El efecto estimulador debido a la activación del A_{2A}R (CGS-21680, 10 nM) en rebanadas del GP fue reducido de manera dependiente de la concentración por immepip, agonista del H₃R, con una inhibición de 74.5% con 100 nM del agonista y una IC₅₀ de 8.6 nM (Figura 14B).

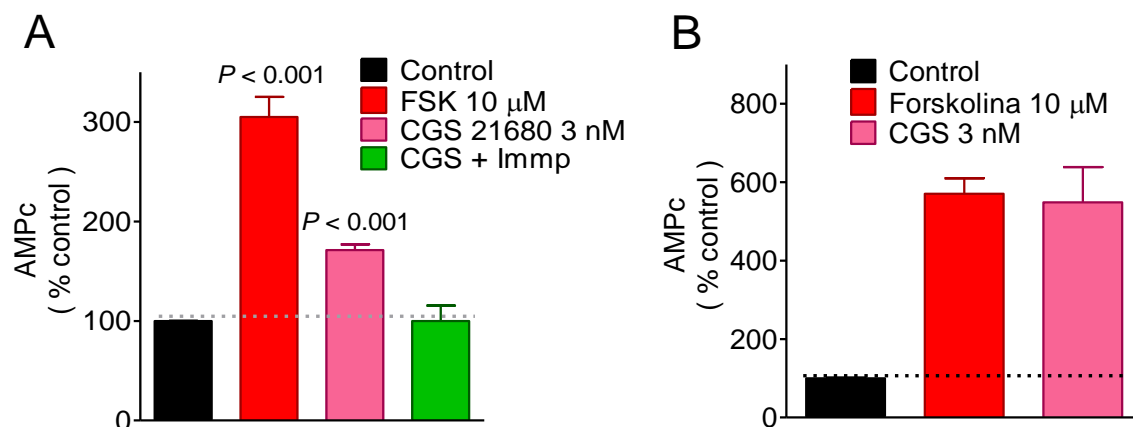


Figura 13. Formación de AMPc en rebanadas del neostriado (A) o del globo pálido (B) de la rata. Las rebanadas fueron incubadas durante 15 min con IBMX (1 mM) antes de exponerlas durante 30 min a forskolina (10 μ M) o CGS 21680 (3 nM), CGS 21680 (3 nM) e immpip (100 nM). El análisis estadístico del panel A se realizó con ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett (cuatro experimentos).

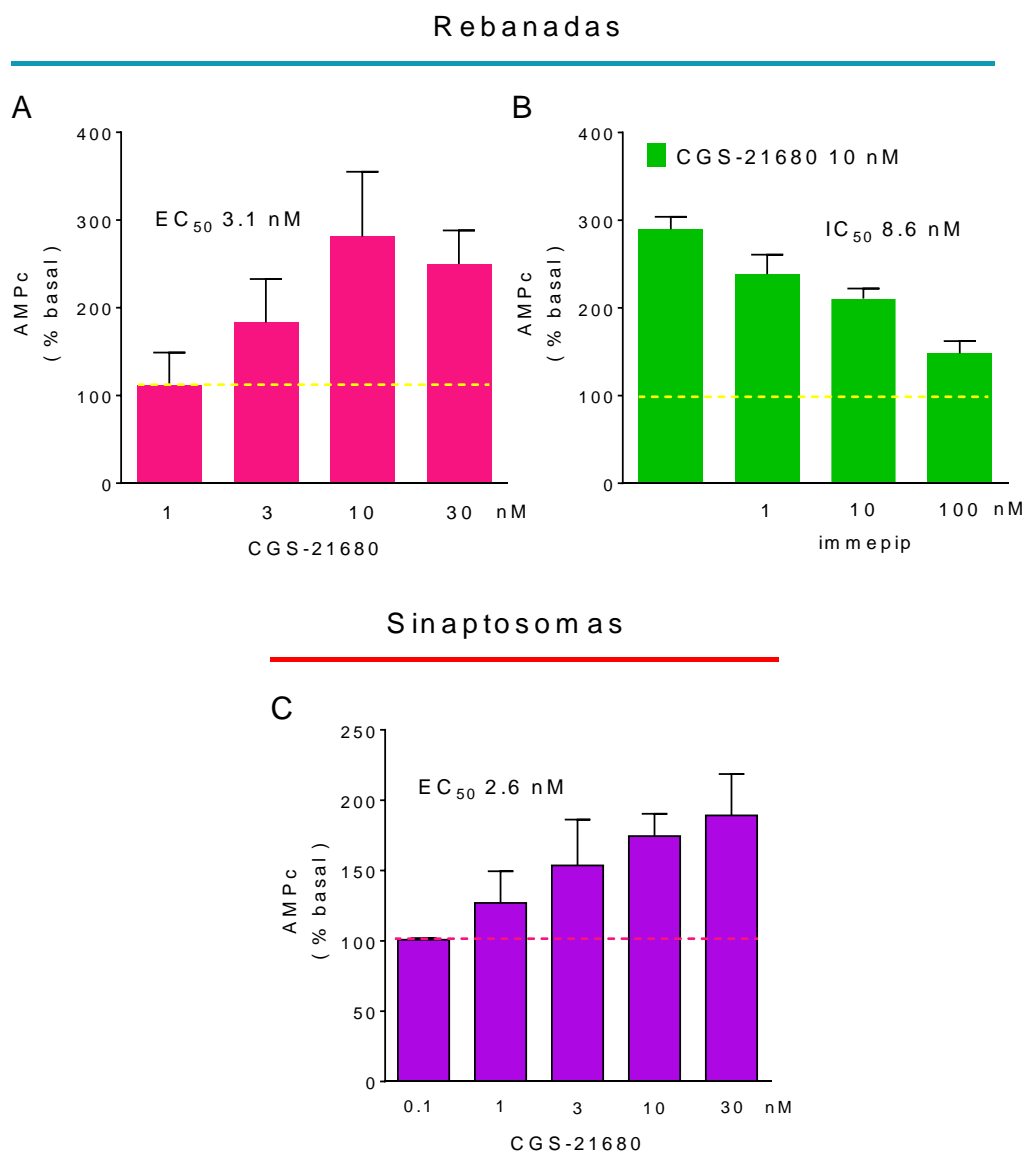


Figura 14. Formación de AMPc en rebanadas y sinaptosomas del globo pálido de la rata. Las rebanadas fueron incubadas durante 15 min con IBMX (1 mM) y desaminasa de adenosina (ADA, 0.5 U/ml) antes de exponerlas durante 15 min al agonista del $A_{2A}R$ CGS-21680 (1-30 nM; Panel **A**) o CGS-21680 (10 nM) e immapip (1-100 nM; panel **B**). **C.** Formación de AMPc en sinaptosomas del GP, incubados con IBMX (1 mM) y ADA (2 U/ml) por 15 min antes de exponerlos a CGS-21680 (0.1-30 nM). Los valores de EC_{50} e IC_{50} se obtuvieron con regresión no lineal en el programa GraphPad Prism 6.

6.5.2 El incremento del AMPc intrasinaptosomal mimetiza la facilitación en la liberación de [³H]-GABA por el agonista del A_{2A}R CGS-21680, y la inhibición de la PKA previene este efecto

La perfusión con forskolina (3 o 10 μ M), un activador directo de las adenilil ciclasas, o con 8-Bromo-AMPC (0.5 mM, análogo permeante del AMPc) aumentaron la liberación de [³H]-GABA, mimetizando el efecto de la activación del A_{2A}R, y sugiriendo por lo tanto que la facilitación de la liberación se debe a un aumento en la concentración intra-sinaptosomal de AMPc (Figura 15C). Adicionalmente, se empleó un inhibidor de la PKA (H-89, 10 μ M), presente tres minutos previos a la perfusión con CGS-21680 (3 nM). La Figura 15A muestra un experimento representativo, observándose que la facilitación de la liberación de [³H]-GABA inducida por la activación del A_{2A}R se previno al inhibir a la PKA (AUC, como porcentaje del control, CGS-21680 130.4 ± 3.57 ; H-89 + CGS-21680 88.38 ± 7.76 ; Figura 15 B). En conjunto estos resultados indican que la vía AMPc/PKA está implicada en el aumento de la liberación de [³H]-GABA en los sinaptosomas del GP de la rata.

6.6 La activación del H₃R no previno la facilitación de la liberación de [³H]-GABA debido al incremento de AMPc sinaptosomal

La Figura 16 muestra un experimento representativo de tres realizados, en el cual la forskolina aumentó la liberación de [³H]-GABA, pero la activación del H₃R por immepip no previno el efecto de la forskolina (S2/S1 control 0.8192 ± 0.09 , forskolina 1.51 ± 0.16 , forskolina + immepip 1.48 ± 0.12). La ausencia de efecto del immepip podría deberse a la concentración de la forskolina, y/o a la activación de adenilil ciclasas insensibles a la inhibición por las proteínas G $\alpha_{i/o}$ (ACs 2, 4 y 7). Si en estas terminales la acción del H₃R se debe a la inhibición por las subunidades G $\beta\gamma$ de canales de calcio activados por voltaje, el efecto en la liberación debería observarse a pesar del aumento del AMPc intrasinaptosomal. Estos resultados sugieren en consecuencia un mecanismo diferente.

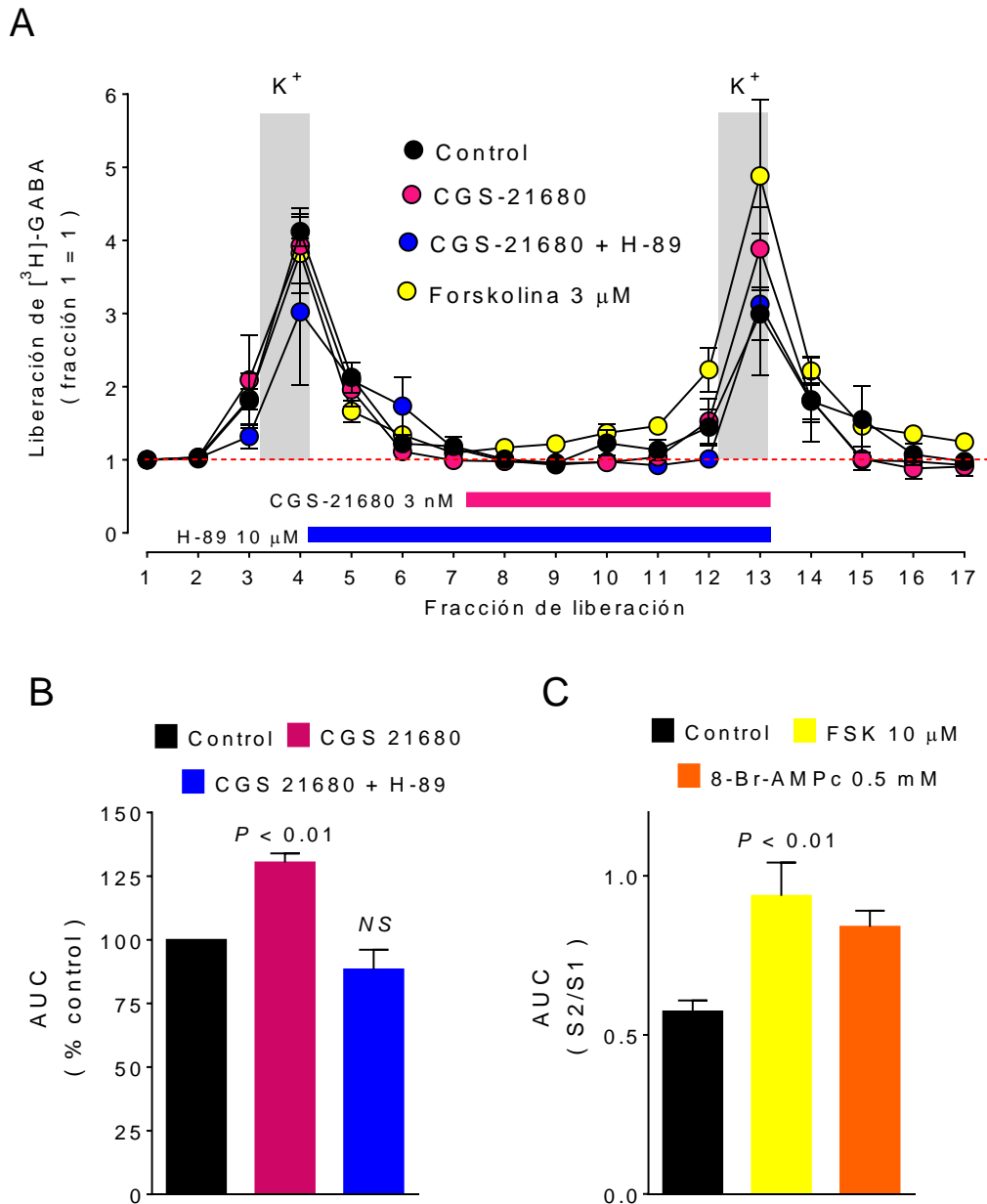


Figura 15. La facilitación de la liberación de $[^3\text{H}]\text{-GABA}$ inducida por los $\text{A}_{2\text{A}}\text{Rs}$ involucra la vía AMPC/PKA . **A.** Experimento representativo. **B.** Análisis de tres experimentos en presencia de CGS-21680 (3 nM), mostrando la prevención de la facilitación por el inhibidor de la PKA, H-89 (10 μM). **C.** Análisis de cuatro experimentos en presencia de un activador directo de las adenilil ciclasas (forskolina, 10 μM) o el análogo permeable del AMPc (8-Br-AMPC, 0.5 mM). Ambos fármacos mimetizaron el efecto de la activación del $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$. Los valores son promedios \pm SEM. NS, sin diferencia significativa. Anova de una vía y prueba de Dunnet.

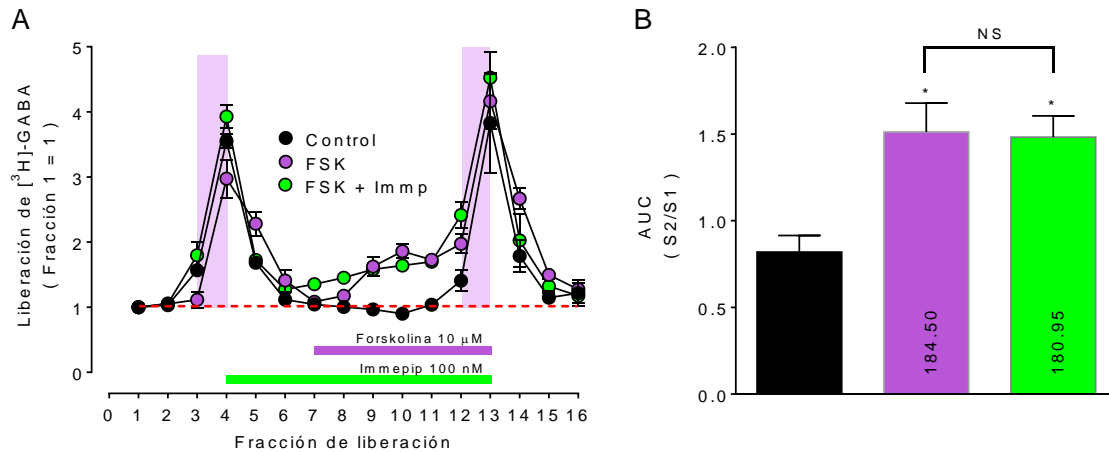


Figura 16. La activación del H₃R no afecta la facilitación de la liberación de [³H]-GABA inducida por forskolina. **A.** Experimento representativo. **B.** Análisis de tres experimentos en presencia de forskolina (10 μM) e immepip (100 nM). Los valores son promedios ± SEM. NS, sin diferencia significativa. Anova de una vía y prueba de Dunnet.

6.7 La entrada de calcio a los sinaptosomas del GP inducida por despolarización no es modulada por la activación de los receptores A_{2A} y H₃

Mediante microfluorimetría se determinó el influjo de Ca²⁺ en sinaptosomas palidales cargados con el indicador de calcio Fura2-AM, induciendo la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje con despolarización química al aumentar la concentración de K⁺ de 3 a 25 mM en la solución de perfusión. Se empleó un protocolo de doble pulso, con duración de los pulsos de 20 s, e intervalo entre los pulsos de 280 s. Tres minutos antes y durante el segundo pulso los sinaptosomas se perfundieron con agonistas del A_{2A}R (CGS-21680, 10 nM), del H₃R (immepip, 100 nM) o ambos.

La perfusión con CGS-21680 no modificó significativamente la entrada de calcio (razón S2/S1 control 0.98 ± 0.008; CGS-21680 0.9786 ± 0.009). De manera similar, el immepip no produjo cambios significativos en la razón S2/S1, como tampoco lo hizo la co-activación de los receptores A_{2A} y H₃, sugiriendo que los efectos moduladores de estos

receptores en la liberación de GABA no se debe a la facilitación por el $A_{2A}R$ o la inhibición por el H_3R de la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje.

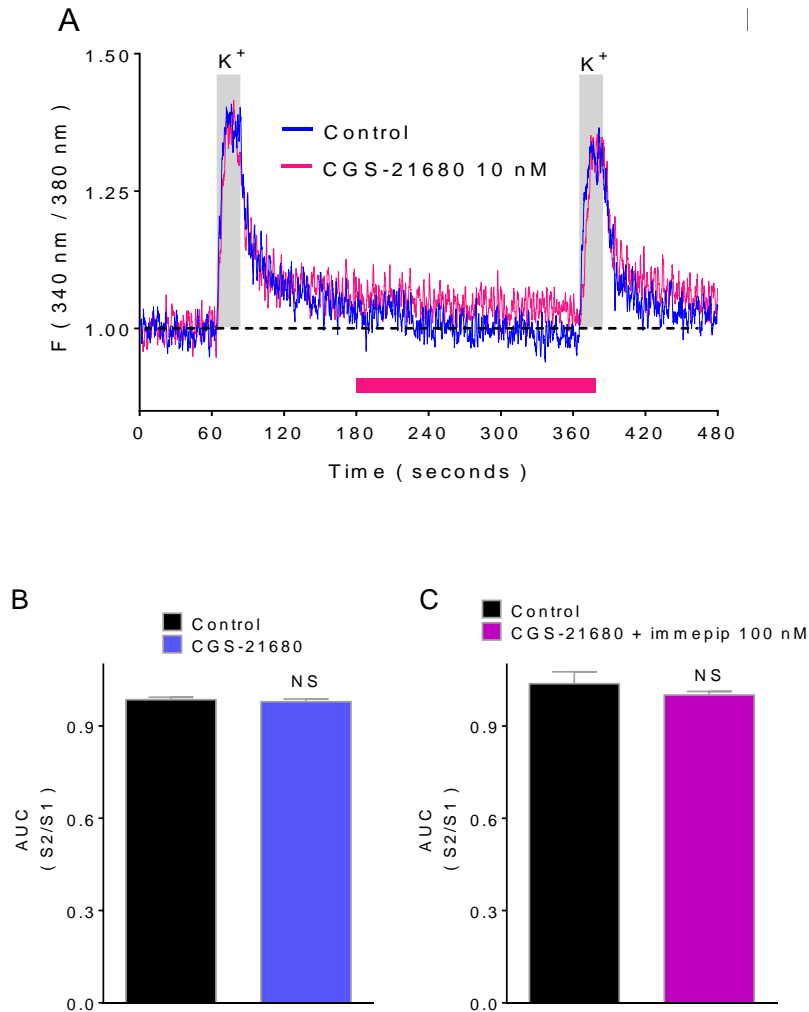


Figura 17. La activación del $A_{2A}R$ no modifica la entrada de calcio inducida por despolarización. **A.** Experimento representativo. Las barras grises representan los pulsos despolarizantes con 25 mM de potasio, y la barra rosa indica el periodo de perfusión con el agonista del $A_{2A}R$. **B.** Análisis de la razón S2/S1 en presencia del CGS-21680 (10 nM); promedios \pm SEM de cuatro experimentos. **C.** Análisis de la razón S2/S1 en presencia de immapip (100 nM); promedios \pm SEM de cuatro experimentos. El análisis estadístico en A y B se realizó con la prueba *t* de Student.

6.8 La liberación espontánea de GABA es modulada pre-sinápticamente por los receptores a adenosina A_{2A} y a histamina H₃, y el receptor H₃ modula post-sinápticamente la excitabilidad de las neuronas palidales

El efecto de la modulación de la liberación a nivel pre-sináptico se ve reflejado en un aumento o disminución de la excitabilidad de la membrana post-sináptica. Así, la facilitación pre-sináptica de la liberación de GABA por las terminales estriado-palidales (vía indirecta) debería reflejarse en un aumento en las corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSC, *inhibitory postsynaptic currents*) registradas en las neuronas del GP, células que se clasifican en tres tipos, siendo las prototípicas (70%) y las arquipalidales (25%) las más abundantes.

Se obtuvieron registros de célula completa con la técnica de *patch clamp* de 25 neuronas del GP con un potencial de membrana de reposo más negativo que -40 mV y que generaran potenciales de acción con una amplitud mayor de 50 mV. Las neuronas registradas disparan a alta frecuencia sin presentar el fenómeno de acomodación al inyectar corriente despolarizante.

El 77% de las neuronas registradas exhibió una corriente catiónica activada por la inyección de corriente hiperpolarizante (I_h), que se observa como un cambio del potencial de membrana (*sag*) hacia valores más positivos (Figura 18). Considerando los antecedentes, estos resultados indican que se registraron los tipos de neuronas principales en el GP (Tabla 1). Una vez identificadas, se perfundieron las rebanadas con ácido quinurénico (2 mM, inhibidor general de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos), y se fijó el voltaje a 0 mV para aislar las corrientes GABAérgicas.

La Figura 19 muestra que la activación del A_{2A}R disminuyó el intervalo inter-evento (IIE), es decir, aumentó la frecuencia de las IPSCs espontáneas (sIPSCs, control 0.3255 ± 0.02 Hz, CGS-21680 0.3987 ± 0.02 Hz; n=7), sin modificar la amplitud de las sIPSCs (control 29.35 ± 0.70 pA, CGS-21680 29.11 ± 0.69 pA), y confirmando que el efecto del

receptor se ejerce pre-sinápticamente, aumentando la probabilidad de liberación espontánea.

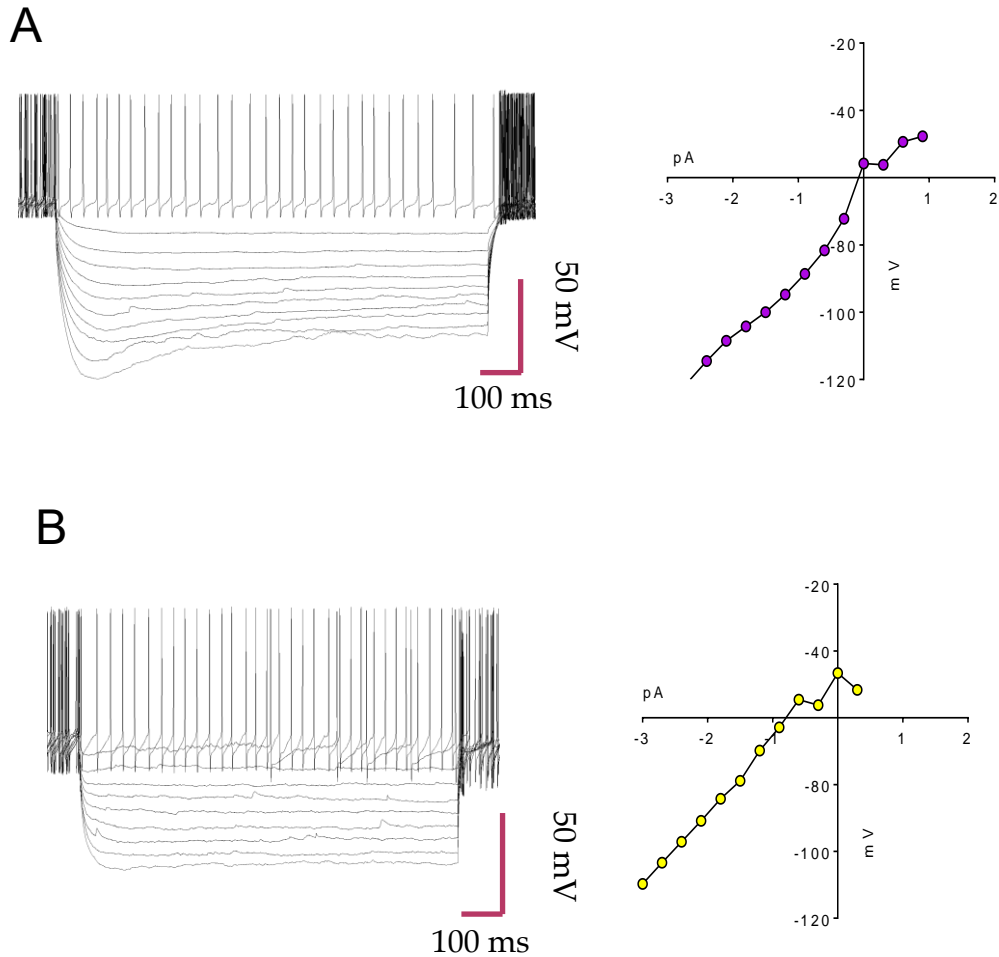
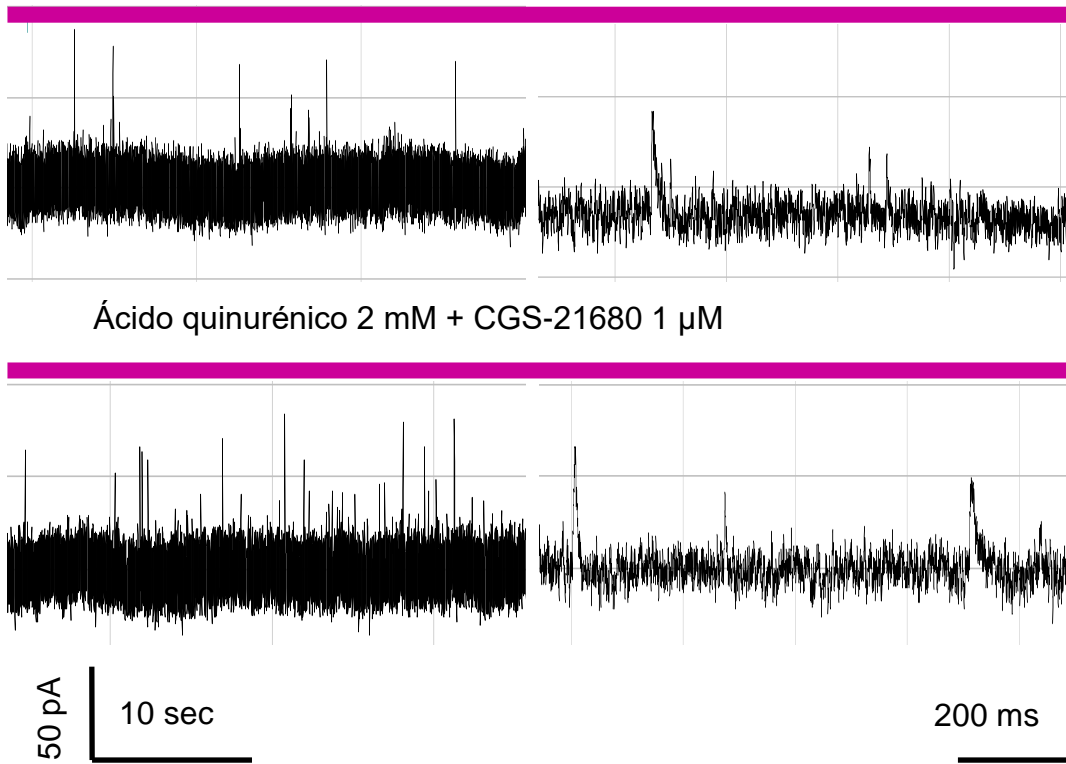
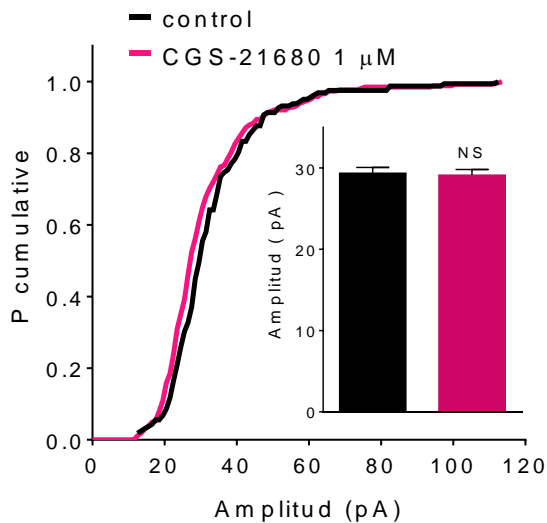


Figura 18. Relación corriente-voltaje (IV) de neuronas del GP. Los registros electrofisiológicos se obtuvieron en la modalidad de célula completa. **A.** Registro de una neurona prototípica o tipo I, que correspondió a 17 de las 22 neuronas registradas (77%). **B.** Registro de una neurona arquipalidal o tipo II, observado en 5 de las 22 neuronas registradas (23%).

A Ácido quinurénico 2 mM



B



C

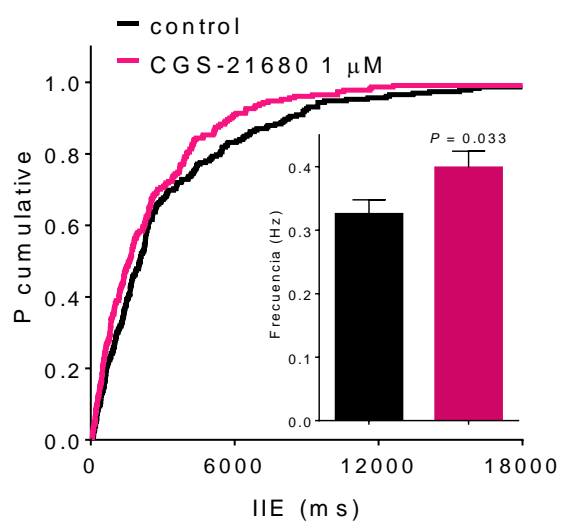


Figura 19. Efecto de la activación del $A_{2A}R$ en las sIPSCs registradas en neuronas palidales. **A.** Registro representativo y expansión de las sIPSCs control (trazo superior) y en presencia de CGS-21680 (1 μ M; trazo inferior). **B.** Distribución acumulada de la amplitud de las sIPSCs y análisis de la amplitud. **C.** Distribución acumulada del IIE y análisis de la frecuencia. Prueba de Kolmogorov-Smirnov y prueba *t* de Student.

La perfusión con immepip aumentó el intervalo inter-evento (IIE), es decir, disminuyó la frecuencia de las sIPSCs (control 1.200 ± 0.087 , immepip 0.914 ± 0.069 ; $n=7$; Figuras 20A y 20C), indicando que la activación del H₃R inhibe pre-sinápticamente la liberación espontánea de GABA. De manera no esperada, el immepip también disminuyó de manera modesta, pero significativa, la amplitud de las sIPSCs (control 37.86 ± 0.61 pA, immepip 32.26 ± 0.72 pA; $n=7$; Figuras 20A y 20B), indicando un efecto post-sináptico. No obstante la baja expresión del RNAm reportada para el GP (Pillot et al., 2002), este resultado indica que también a nivel post-sináptico el H₃R modula la excitabilidad de las neuronas palidales.

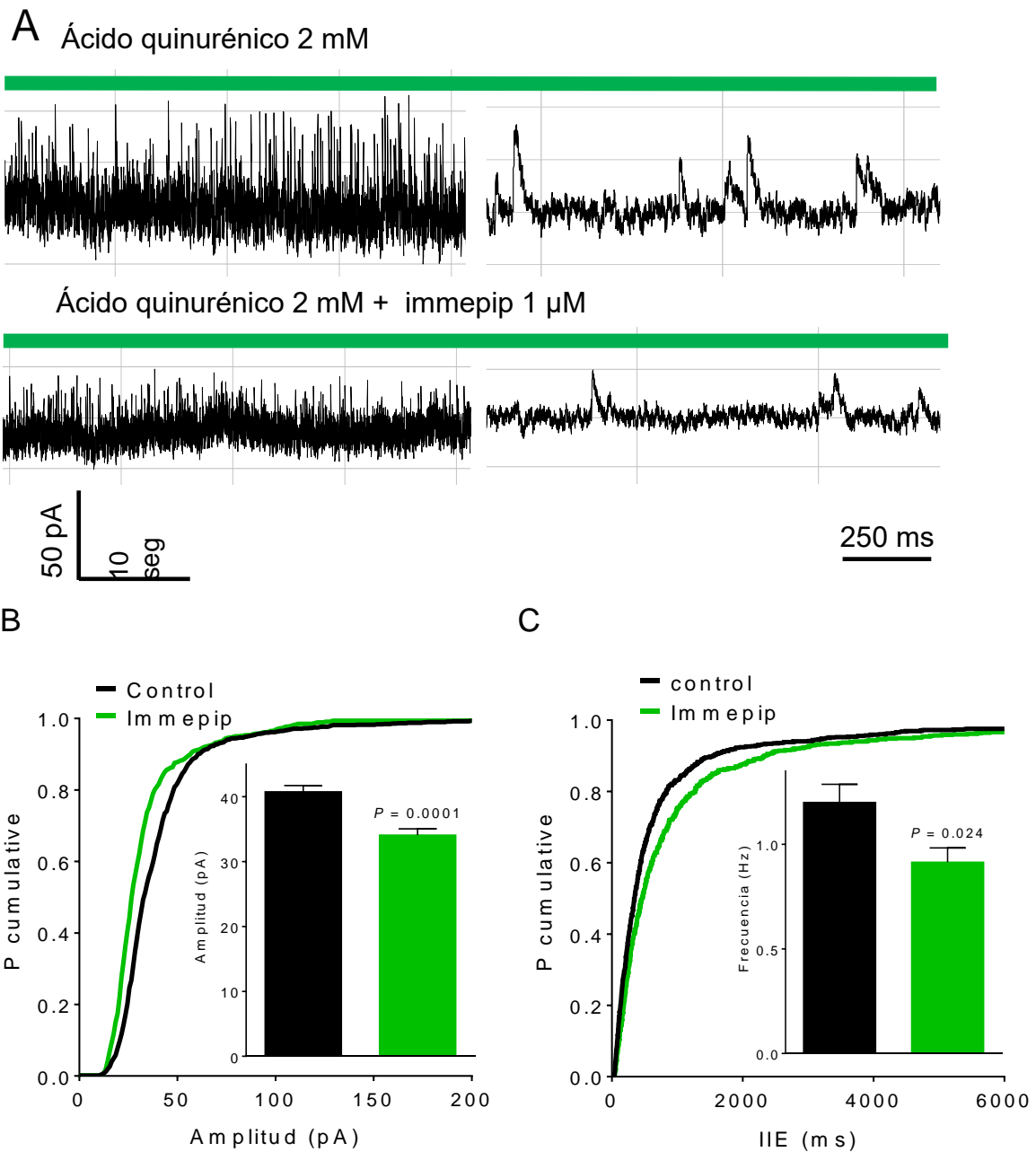


Figura 20. Efecto de la activación del H₃R en las sIPSCs registradas en neuronas palidales. A. Registro representativo y expansión de las sIPSCs control (trazo superior) y en presencia de imnepip (1 μM; trazo inferior). B. Distribución acumulada de la amplitud de las sIPSCs y análisis de la amplitud. C. Distribución acumulada del IIE y análisis de la frecuencia. Prueba Kolmogorov-Smirnov y prueba *t* de Student.

7. Discusión

El globo pálido (GP) es un núcleo crítico para el procesamiento de la información sináptica en los GB, y la actividad de las neuronas de este núcleo depende del equilibrio entre la excitación y la inhibición generadas por los neurotransmisores que se liberan en el GP. Las NEMs de la vía indirecta del neostriado son la fuente principal de GABA en el GP y la transmisión GABAérgica depende de las tasas de liberación y recaptura.

La adenosina es un neuromodulador importante en los GB, y en el GP estimula la liberación de GABA mediante la activación de A_{2A} Rs (Mayfield et. al., 1993; Dyane Mayfield et al., 1996; Ochi et al., 2000; Florán et al., 2005; Shindou et al., 2002, 2003). Para membranas totales del GP, Mayfield y cols. (1996) reportaron una densidad de A_{2A} Rs de 270 ± 20 fmol/mg de proteína, y nuestros datos confirman la presencia abundante de dichos receptores en las terminales palidales, indicando además la existencia de dos sub-poblaciones de A_{2A} Rs, con alta y baja afinidad por el agonista CGS-21680. Estas poblaciones están definidas presumiblemente por su acople a proteínas G, ya que el desacople de los receptores de las proteínas G inducido por el $GTP\gamma S$ disminuyó en ~60% la unión de [3H]-CGS-21680 a los receptores presentes en las membranas de las terminales nerviosas palidales.

Para la población de interés para este estudio, la de alta afinidad por agonistas que representarían los A_{2A} Rs funcionales, se determinó una densidad de 454 ± 77 fmol/mg proteína, con valores muy similares de K_d para [3H]-CGS-21680 (4.1 nM) y de K_i para CGS-21680 (4.53 nM), aunque menores al valor de K_i (15 nM) reportada para el receptor presente en membranas de la corteza cerebral de la rata (Klotz, 2000). La diferencia en afinidad podría explicarse por el predominio de receptores pre-sinápticos en nuestra preparación, aunado a una mayor fracción de receptores acoplados a proteínas G.

Regulación por receptores a adenosina A_{2A} y a histamina H_3 de la liberación de GABA en el GP

En la tesis de maestría se confirmó que la activación del A_{2A} R presente en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) del GP facilita la liberación de GABA evocada por despolarización con alto potasio con concentraciones bajas del agonista CGS-21680 (3 y 10

nM). Este efecto se bloqueó con el antagonista selectivo ZM-241385 (100 nM), confirmando la participación de A_{2A}Rs. Sin embargo, concentraciones mayores del CGS-21680 (30 y 300 nM) no afectaron significativamente la liberación con respecto al control, y cabe destacar que en tres de cinco experimentos se observó una disminución de la liberación con la concentración de 300 nM. Este efecto podría involucrar la activación de receptores a adenosina A₁ presentes en alta densidad en el GP, que pueden ser activados por altas concentraciones de CGS-21680 y que inhiben la liberación de varios neurotransmisores, incluyendo al GABA, mediante la activación de proteínas G $\alpha_{i/o}$ cuyas subunidades G $\beta\gamma$ inhiben la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje involucrados en la exocitosis.

También se determinó una densidad muy alta de H₃Rs en las terminales nerviosas aferentes del GP, y de manera novedosa se mostró que la facilitación de la liberación de GABA debida a la activación de los A_{2A}Rs es prevenida al co-activar a los H₃Rs con el agonista immepip. A su vez, el efecto del immepip fue prevenido parcialmente por el antagonista clobenpropit, aunque el grado de inhibición concuerda con las afinidades relativas del H₃R por el agonista y el antagonista determinadas en este estudio. No se utilizaron concentraciones mayores de 3 μ M del antagonista, debido al efecto inhibitorio directo de los compuestos con un anillo imidazólico, como el clobenpropit, en los canales de calcio dependientes de voltaje (Milhaud et al., 2002). Una alternativa sería el uso de un antagonista no imidazólico, como el A-331440; sin embargo, los H₃Rs presentes en las terminales nerviosas del GP tienen baja afinidad por este antagonista (K_i 316 nM).

Mecanismos involucrados en la regulación por receptores a adenosina A_{2A} y a histamina H₃ de la liberación de GABA en el GP

En relación a los mecanismos que podrían estar involucrados en la modulación de la liberación de GABA por los receptores A_{2A} y H₃ se plantearon tres posibilidades para su abordaje experimental: 1) La formación de heterómeros, que afecte las propiedades de unión de sus agonistas y/o las vías de señalización respectivas, 2) la oposición de las vías de señalización, en particular en la vía AMPc/PKA, y 3) un efecto directo de los H₃Rs en canales de calcio dependientes de voltaje que podrían ser modulados por los A_{2A}Rs mediante la vías de señalización AMPc/PKA o diacilglicerol/Ca²⁺/PKC.

Como un primer abordaje para evaluar la formación de heterómeros A_{2A}R/H₃R, se realizaron ensayos de inhibición de la unión de ligandos selectivos para cada uno de los receptores en presencia del agonista del otro receptor. Los resultados indican que la activación del A_{2A}R aumenta la afinidad del H₃R por el agonista immepip, y que de manera opuesta, la activación del H₃R disminuye la afinidad del A_{2A}R por el agonista selectivo CGS-21380. Estos datos sugieren la presencia de heterómeros A_{2A}R/H₃R en las terminales estriado-palidales. Sin embargo, aún cuando la modificación de la afinidad de los receptores es significativa, el efecto es modesto (diferencia de 2 veces), por lo que no se puede atribuir solamente a esta interacción el efecto inhibitorio de los H₃Rs en la acción estimuladora de los A_{2A}Rs en la liberación de GABA.

Las principales vías de señalización de los receptores A_{2A} y H₃ son en principio opuestas, ya que la activación de los A_{2A}Rs conduce, mediante las subunidades Gα_s, a la activación de las adenilil ciclasas y en consecuencia al aumento de los niveles intracelulares de AMPc y a la activación de la PKA, mientras que los H₃Rs inhiben, mediante las subunidades Gα_{i/o}, a las adenilil ciclasas. La activación de la vía AMPc/PKA puede estimular la liberación de GABA mediante la fosforilación de canales de calcio dependientes de voltaje (Gubitz et. al., 1996) o de proteínas involucradas en la exocitosis como sinapsina 1, SNAP-25, rabfilina 3A, syntaxina y RIM1a/2a (Seino y Shibasaki, 2005; Matsumoto et al., 2014). Así, un mecanismo relativamente directo para el efecto inhibitorio del H₃R sería la inhibición de las adenilil ciclasas que son estimuladas por los A_{2A}Rs.

Nuestros datos muestran que la activación de los A_{2A}Rs aumenta de manera significativa la formación de AMPc en rebanadas del neostriado y del GP de la rata, así como en sinaptosomas del GP, indicando que las adenilil ciclasas son activadas cuando se estimula al A_{2A}R. Utilizando el mismo abordaje metodológico, se mostró que en rebanadas del GP la activación del H₃R reduce la acumulación de AMPc inducida por la activación de los A_{2A}Rs, es decir, que en las terminales estriado-palidales, en las que principalmente se expresan ambos receptores, la formación de AMPc está regulada de manera opuesta por los A_{2A}Rs y los H₃Rs.

Por otra parte, en los experimentos de liberación de [³H]-GABA el efecto estimulatorio del A_{2A}R se evaluó el efecto de dos análogos permeables del AMPc (dibutiril-AMPc y 8-Bromo-AMPc) y de la forskolina, un activador directo de las adenilil ciclasas. En cinco experimentos el análogo dibutiril-AMPc no modificó la liberación de [³H]-GABA con respecto a los valores control. Sin embargo, recientemente Vardjan et al. (2013) reportaron que el dibutiril-AMPc activa un biosensor intracelular con una constante de tiempo (τ) de 563 s (poco más de 9 min), indicando una baja permeabilidad. En nuestros experimentos, el fármaco estuvo presente 5 min antes y durante el segundo pulso despolarizante de 1 min, para un total de 6 min, tiempo menor a la constante de tiempo, por lo que la ausencia de efecto del dibutiril-AMPc podría deberse a que la concentración intracelular alcanzada no fue suficiente para activar a la PKA. En contraste, el 8-Bromo-AMPc y la forskolina indujeron un aumento importante de la liberación de [³H]-GABA inducida por despolarización, apoyando la participación de la vía AMPc/PKA.

El AMPc formado puede unirse a diferentes efectores; sin embargo, el blanco principal de este segundo mensajero es la PKA, cuya activación aumenta la liberación de diferentes neurotransmisores por fosforilación de diferentes blancos, entre ellos proteínas de la maquinaria de exocitosis y canales de calcio dependientes de voltaje N y P/Q (Seino y Shibasaki, 2005). Para evaluar la participación de esta cinasa, se realizaron ensayos de liberación en presencia de H-89, un inhibidor de la PKA, el cual previno la facilitación de la liberación de [³H]-GABA en los sinaptosomas del GP. Este resultado confirma que la modulación de la liberación de GABA por los A_{2A}Rs implica la activación de la vía AMPc/PKA, lo que había sido observado en los experimentos de electrofisiología de Shindou et al., en los que la facilitación de la liberación de GABA, inducida o espontánea, implica la activación de dicha vía (Shindou et al., 2001, 2002 y 2008).

La facilitación de la liberación inducida por forskolina no se previno por activación de los H₃Rs con el agonista immpip. La forskolina activa a los nueve subtipos de adenilil ciclasas membranales, incluso aquellas insensibles a las subunidades G $\alpha_{i/o}$ (Sunahara et al., 1996), por lo que puede sugerirse que el efecto de la forskolina en el AMPc intrasinaptosomal no fue inhibido de manera completa por la activación de los H₃Rs, que inhiben a las adenilil ciclasas 1, 3, 5, 6 y 8, sensibles a las subunidades G $\alpha_{i/o}$.

De manera relevante, este resultado también indica que el efecto inhibitorio de la activación de los H₃Rs en facilitación de la liberación de [³H]-GABA por los A_{2A}Rs no se ejerce en los canales de calcio dependientes de voltaje, regulados directamente por la interacción las subunidades Gβγ de la proteína G con la subunidad α₁ de los canales. Si la acción de los H₃Rs involucrara la inhibición de estos canales, aún con el incremento del AMPc se observaría inhibición de la liberación de [³H]-GABA ya que el efecto del H₃R se ejercería corriente debajo de la formación del segundo mensajero. Por otra parte, en experimentos preliminares, la activación de los H₃Rs no afectó la facilitación de la liberación de [³H]-GABA inducida por el análogo permeante 8-Bromo-AMPc, apoyando que la modulación por los receptores se debe a la inhibición de la formación de AMPc.

La entrada de calcio a la zona activa es esencial para la exocitosis del GABA, y la activación de la PKA puede facilitar la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. En este trabajo se utilizó microfluorimetría empleando el indicador fluorescente Fura 2 (Grynkiewicz et al., 1985) para evaluar la modulación de estos canales por la activación de los receptores A_{2A} y H₃. Los resultados indican que en los sinaptosomas del GP la entrada de calcio evocada por despolarización química no es modificada por la activación de los receptores A_{2A} o H₃.

En conjunto, los datos mencionados indican que en las terminales estriado-palidales, la activación del A_{2A}R induce la acumulación de AMPc y la activación de la PKA, pero que los canales de calcio dependientes de voltaje involucrados en la exocitosis de GABA no son el blanco de esta cinasa.

Los resultados obtenidos de los experimentos de electrofisiología indicaron que la liberación espontánea de GABA es modulada por los receptores A_{2A} y H₃. El agonista del A_{2A}R CGS-21680 aumentó la frecuencia de las sIPSCs sin modificar la amplitud, confirmando un efecto pre-sináptico, de manera similar a lo observado por Shindou et al. (2002). Un estudio reciente (Diao et al., 2017) reportó la modulación por los A_{2A}Rs de la liberación de GABA en el GP, mostrando que el agonista CGS-21680 disminuye el disparo espontáneo de las neuronas palidales de rata *in vivo*; sin embargo, los autores sugieren que el receptor se localiza a nivel post-sináptico y que regula la excitabilidad de las neuronas

palidales (parvalbúmina positivas y negativas), mediante la inhibición del transportador de GABA GAT-1.

Los efectos funcionales de la activación de los A_{2A}Rs son diferenciales e incluso opuestos, incluso en la misma región cerebral. Estas funciones contradictorias pueden depender de la localización del receptor (pre- o posts-ináptica), así como de las interacciones funcionales y moleculares que establece con otros receptores. El efecto de la activación de los A_{2A}Rs en las terminales nerviosas del neostriado y el GP parece depender del protocolo experimental empleado, con reportes de estimulación por los A_{2A}Rs de la liberación de distintos neurotransmisores, y otros estudios indicando un efecto inhibitorio. Kurokawa et al. (1994) mostraron que en terminales nerviosas del neostriado y del GP la activación del A_{2A}R inhibe la liberación de GABA inducida por despolarización con 15 mM de K⁺; sin embargo, estos autores reportan que el efecto depende del estímulo, es decir, de la concentración de K⁺, ya que al aumentar la concentración a 30 mM, no observaron efecto del agonista del A_{2A}R CGS-21680.

Algunos estudios muestran que las neuronas palidales no expresan el RNAm del A_{2A}R, sugiriendo que el receptor identificado en este núcleo se encuentra en las terminales nerviosas de las NEM encefalinérgicas (Augood y Emson, 1994; Shindou et al., 2002). Esta información apoya un efecto pre-sináptico del A_{2A}R en la liberación de GABA reportada en este trabajo. Además, la facilitación de la liberación de GABA inducida por activación del A_{2A}R fue evidenciada por dos técnicas diferentes (neuroquímica y electrofisiología), confirmando un efecto modulador que facilita la liberación del neurotransmisor por las terminales GABAérgicas que inervan al GP.

Nuestros resultados concuerdan con los observados al estimular los A_{2A}Rs en el neostriado, que resulta en disminución del movimiento sugiriendo un aumento en la actividad de la vía indirecta, es decir un incremento en la liberación de GABA de las neuronas estriado-palidales (Hauber y Mönkle, 1997). En contraste, los antagonistas del A_{2A}R, empleados para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, estimulan el movimiento, consistente con inhibición de la vía indirecta (Hauber et al., 1998; Huang et al., 2005).

El H₃R es expresado principalmente a nivel pre-sináptico, y su activación modula la liberación de distintos neurotransmisores, función observada tanto *in vivo* como *in vitro*. Estudios de electrofisiología en la corteza insular de la rata muestran que la activación del H₃R disminuye la liberación espontánea de GABA y de glutamato, evidenciado por la reducción de la frecuencia de corrientes miniatura espontáneas inhibitorias (mIPSCs) o excitatorias (mEPSCs), respectivamente (Takei et al., 2017). De manera similar, en este trabajo la activación del H₃R con el agonista immpip moduló la liberación espontánea de GABA en el GP de la rata, disminuyendo la frecuencia de las corrientes post-sinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs). Cabe destacar que en los experimentos de liberación de [³H]-GABA no se advirtió efecto de la activación del H₃R en la liberación basal, lo que puede explicarse por la diferente sensibilidad y resolución temporal de la técnica. Por otra parte y de manera interesante, en los experimentos electrofisiológicos se observó que el agonista del H₃R immpip también modificó la amplitud de las sIPSCs, sugiriendo que el receptor también se localiza a nivel post-sináptico donde modula la excitabilidad de las neuronas palidales.

El mecanismo propuesto en esta tesis para la interacción de los receptores A_{2A} y H₃ en la modulación pre-sináptica de la liberación del GABA en el GP es la oposición de efectos en la vía de señalización AMPc/PKA. Una posibilidad considerada inicialmente fue efectos moduladores en los canales de calcio involucrados en la exocitosis, lo cual fue descartado ya que los experimentos de microfluorimetría no mostraron cambios en el influjo calcio en terminales aisladas. Un mecanismo alternativo sería la formación de heterómeros A_{2A}R/H₃R, y aunque los cambios en la afinidad por agonistas selectivos inducidos por la activación del segundo receptor apoya la idea de una interacción física, los cambios fueron modestos (~2 veces) y por lo tanto no explicarían los efectos observados en los experimentos de liberación.

Se ha reportado que la facilitación por activación de los A_{2A}Rs de la liberación de noradrenalina (Matsumoto et al., 2014) y de acetilcolina (Oliveira et al., 2015) involucra la redistribución de las vesículas sinápticas, movilizandolas de la poza de reserva a la poza de vesículas listas para ser liberadas en la zona activa, proceso debido a la fosforilación por la PKA de la proteína Sinapsina I. Por lo tanto, proponemos que el efecto

de los $A_{2A}R$ s en las terminales estriado-nigrales también involucra este mecanismo y que la activación del H_3R se opone a la activación de la vía AMPc/PKA y por lo tanto a la redistribución de las vesículas sinápticas.

8. Conclusiones

1. La activación del receptor a adenosina A_{2A} facilita la liberación de GABA inducida por despolarización en sinaptosomas del globo pálido, y este efecto involucra la vía AMPc/PKA.
2. El receptor a histamina H_3 se expresa con alta densidad en las terminales nerviosas del globo pálido, y su activación inhibe el efecto estimulador del receptor A_{2A} en la liberación de GABA.
3. La interacción funcional entre los receptores A_{2A} y H_3 radica en sus efectos opuestos sobre las adenilil ciclasas, y no involucra la regulación de la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje.
4. La liberación espontánea de GABA es facilitada por el receptor A_{2A} e inhibida por el receptor H_3 .
5. El receptor H_3 modula la excitabilidad de las neuronas palidales a nivel post-sináptico.

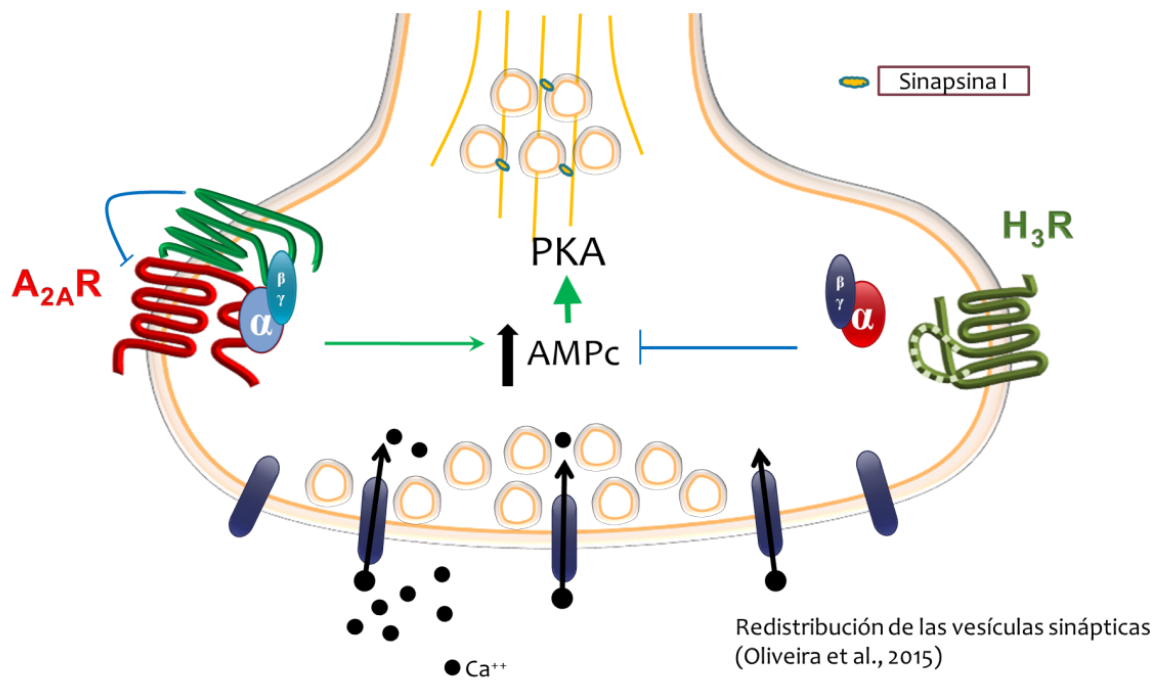


Figura 21. Modelo propuesto para la interacción entre los receptores a adenosina A_{2A} y a histamina H₃ en la modulación de la liberación de GABA por las terminales estriado-nigrales. PKA, cinasa A de proteínas.

9. Perspectivas

1. Confirmar si la vía AMPc/PKA participa en el efecto modulador de los receptores a adenosina A_{2A} en la liberación espontánea de GABA utilizando análogos del AMPc permeantes e inhibidores de la PKA en rebanadas del GP.
2. Determinar si el efecto de la activación de los receptores H_3 en la liberación de GABA inducida por los receptores A_{2A} involucra la redistribución de las vesículas sinápticas y la fosforilación de proteínas de la maquinaria de exocitosis.

10. Bibliografia

- Abdi A, Mallet N, Mohamed FY, Sharott A, Dodson PD, Nakamura KC, Suri S, Avery SV, Larvin JT, Garas FN, Garas SN, Vinciati F, Morin S, Bezard E, Baufreton J, Magill PJ, 2015. Prototypic and arkypallidal neurons in the dopamine-intact external globus pallidus. *J Neurosci.* 35: 6667-6688.
- Airaksinen MS, Paetau A, Paljärvi L, Reinikainen K, Riekkinen P, Suomalainen R, Panula P, 1991. Histamine neurons in human hypothalamus: anatomy in normal and Alzheimer diseased brains. *Neuroscience.* 44: 465-481.
- Arias-Montano J-A, Floran B, Floran L, Aceves J, Young JM, 2007. Dopamine D₁ receptor facilitation of depolarization-induced release of gamma-amino-butyric acid in rat striatum is mediated by the cAMP/PKA pathway and involves P/Qtype calcium channels. *Synapse.* 61: 310-319.
- Arias-Montano J-A, Floran B, García M, Aceves J, Young J-M, 2001. Histamine H₃ receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D₁ receptor-dependent release of [³H]-gamma-aminobutyric acid from rat striatal slices. *Br J Pharmacol.* 133: 165-171.
- Arrang JM, Garbarg M, Lancelot JC, Lecomte JM, Pollard H, Robba M, Schunack W, Schwartz JC, 1987. Highly potent and selective ligands for histamine H₃-receptors. *Nature.* 327: 117-123.
- Augood SJ, Emson PC, 1994. Adenosine A_{2A} receptor mRNA is expressed by enkephalin cells but not by somatostatin cells in rat striatum: a co-expression study. *Brain Res Mol Brain Res.* 204-210.
- Bakker RA, 2004. Histamine H₃-receptor isoforms. *Inflamm Res.* 53: 509-516.
- Baranauskas G, Tkatch T, Surmeier DJ, 1999. Delayed rectifier currents in rat globus pallidus neurons are attributable to Kv2.1 and Kv3.1/3.2 K⁺ channels. *J Neurosci.* 19: 6394-6404.
- Barnes WG, Hough LB, 2002. Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine. *J Neurochem* 82: 1262-1271.
- Benhamou L, Bronfeld M, Bar-Gad I, Cohen D, 2012. Globus Pallidus external segment neuron classification in freely moving rats: a comparison to primates. *PLoS One.* 7: e45421.

- Bergman H, Feingold A, Nini A, Raz A, Slovín H, Abeles M, Vaadia E., 1998. Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci.* 21:32-38.
- Bergquist F, Ruthven A, Ludwig M, Dutia MB, 2006. Histaminergic and glycinergic modulation of GABA release in the vestibular nuclei of normal and labyrinthectomised rats. *J Physiol.* 577:857-868.
- Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Girault JA, Valjent E, 2010. What is the degree of segregation between striatonigral and striatopallidal projections?. *Front Neuroanat.* 4: 1-9.
- Boison D, 2008. The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis. *Prog Neurobiol.* 84:249-262.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD, 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196: 527-542
- Bongers G, Bakker RA, Leurs R, 2007A. Molecular aspects of the histamine H₃ receptor. *Biochem Pharmacol.* 73: 1195-1204.
- Bongers G, Krueger KM, Miller TR, Baranowski JL, Estvander BR, Witte DG, Strakhova MI, van Meer P, Bakker RA, Cowart MD, Hancock AA, Esbenshade TA, Leurs R, 2007B. An 80-amino acid deletion in the third intracellular loop of a naturally occurring human histamine H₃ isoform confers pharmacological differences and constitutive activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 323:888-898.
- Borden LA, 1996. GABA transporter heterogeneity: pharmacological and cellular localization. *Neurochem.* 29: 335-356.
- Bruggencate G., 1975. Functions of extrapyramidal systems in pathways motor control. II. Cortical and subcortical. *Pharmacol Ther B.* 1: 611-672.
- Burns TA, Huston JP, Spieler RE, 2003. Circadian variation of brain histamine in goldfish. *Brain Res Bull* 59: 299-301.
- Chan CS, Glajch KE, Gertler TS, Guzman JN, Mercer JN, Lewis AS, Goldberg AB, Tkatch T, Shigemoto R, Fleming SM, Chetkovich DM, Osten P, Kita H, Surmeier DJ, 2011. HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 14: 85-92.
- Chan CS, Shigemoto R, Mercer JN, Surmeier DJ, 2004. HCN2 and HCN1 channels govern the regularity of autonomous pacemaking and synaptic resetting in globus pallidus neurons. *J Neurosci.* 24: 9921-9932.

- Charara A, Pare JF, Levey AI, Smith Y, 2005. Synaptic and extrasynaptic GABA-A and GABA-B receptors in the globus pallidus: an electron microscopic immunogold analysis in monkeys. *Neuroscience*. 131: 917-933.
- Chen J, Liu C, Lovenberg TW, 2003. Molecular and pharmacological characterization of the mouse histamine H₃ receptor . *Eur J Pharmacol*. 467: 57-65.
- Chen J, Rinaldo L, Lim SJ, Young H, Messing RO, Choi DS, 2007. The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates anxiety-like behavior in mice. *Genes Brain Behav*. 6: 776-783.
- Cooper AJ, Stanford IM, 2000. Electrophysiological and morphological characteristics of three subtypes of rat globus pallidus neurone *in vitro*. *J Physiol*. 2: 291-304.
- Cristóvão-Ferreira S, Navarro G, Brugarolas M, Pérez-Capote K, Vaz SH, Fattorini G, Conti F, Lluís C, Ribeiro JA, McCormick PJ, Casadó V, Franco R, Sebastião AM, 2011. Modulation of GABA transport by adenosine A₁R-A_{2A}R heteromers, which are coupled to both G_s- and G_{i/o}-proteins. *J Neurosci*. 31: 15629-15639.
- Cumming P, Shaw C, Vincent SR, 1991. High affinity histamine binding is the H₃ receptor: characterization and autoradiographic localization in rat brain. *Synapse* 8: 144-151.
- Cunha RA, 2005. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signal*. 1: 111-134.
- Dai H, Fu Q, Shen Y, Hu W, Zhang Z, Timmerman H, Leurs R, Chen Z, 2007. The histamine H₃ receptor antagonist clobenpropit enhances GABA release to protect against NMDA-induced excitotoxicity through the cAMP/protein kinase A pathway in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol*. 563: 117-123.
- Dayne Mayfield R, Larson G, Orona RA, Zahniser NR, 1996. Opposing actions of adenosine A_{2a} and dopamine D₂ receptor activation on GABA release in the basal ganglia: evidence for an A_{2a}/D₂ receptor interaction in globus pallidus. *Synapse*. 22: 132-138.
- Deister CA, Chan CS, Surmeier DJ, Wilson CJ, 2009. Calcium-activated SK channels influence voltage-gated ion channels to determine the precision of firing in globus pallidus neurons. *J Neurosci*. 29: 8452-8461.
- Del Arco A, Castañeda TR, Mora F, 1998. Amphetamine releases GABA in striatum of the freely moving rat: involvement of calcium and high affinity transporter mechanisms. *Neuropharmacology*. 37: 199-205.
- DeLong MR, 1971. Activity of pallidal neurons during movement. *J Neurophysiol*. 34: 414-427.

- DeLong MR, 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13: 281-285.
- Diao HL, Xue Y, Han XH, Wang SY, Liu C, Chen WF, Chen L, 2017. Adenosine A_{2A} receptor modulates the activity of globus pallidus neurons in rats. *Front Physiol.* 8: 897.
- Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, 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.
- Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR, 1997. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci.* 17: 7673-7682.
- Fedele DE, Koch P, Scheurer L, Simpson EM, Möhler H, Brüstle O, Boison D, 2004. Engineering embryonic stem cell derived glia for adenosine delivery. *Neurosci Lett.* 370:160-165.
- Ferreira R, Santos T, Gonçalves J, Baltazar G, Ferreira L, Agasse F, Bernardino L, 2012. Histamine modulates microglia function. *J Neuroinflammation.* 9: 1-16.
- Feuerstein TJ, 2008. Presynaptic receptors for dopamine, histamine, and serotonin. *Handb Exp Pharmacol.* 184:289-338.
- Floran B, Gonzalez B, Floran L, Erlij D, Aceves J, 2005. Interactions between adenosine A_{2A} and dopamine D₂ receptors in the control of [³H]-GABA release in the globus pallidus of the rat. *Eur J Pharmacol.* 520: 43-50.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J, 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 53: 527-552.
- Gage GJ, Stoetzner CR, Wiltschko AB, Berke JD, 2010. Selective activation of striatal fast-spiking interneurons during choice execution. *Neuron.* 67: 466-479.
- Galvan A, Villalba RM, West SM, Maidment NT, Ackerson LC, Smith Y, Wichmann T, 2005. GABAergic modulation of the activity of globus pallidus neurons in primates: *in vivo* analysis of the functions of GABA receptors and GABA transporters. *J Neurophysiol.* 94: 990-1000.
- García-Gálvez AM, Escamilla-Sánchez J, Flores-Maldonado C, Contreras RG, Arias JM, Arias-Montañón JA, 2018. Differential homologous desensitization of the human histamine H₃ receptors of 445 and 365 amino acids expressed in CHO-K1 cells. *Neurochem Int.* 112: 114-123.

- Garcia M, Floran B, Arias-Montaña JA, Young JM, Aceves J, 1997. Histamine H₃ receptor activation selectively inhibits dopamine D₁ receptor-dependent [³H]-GABA release from depolarization stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*. 80: 241-249.
- Gerfen CR, Wilson Charles J., 1996. Chapter II The basal ganglia. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. 12: 371-468
- Gerlach M, Gsell W, Kornhuber J, Jellinger K, Krieger V, Pantucek F, Vock R, Riederer P, 1996. A post mortem study on neurochemical markers of dopaminergic, GABA-ergic and glutamatergic neurons in basal ganglia-thalamocortical circuits in Parkinson syndrome. *Brain Res*. 741: 142-152.
- Giovannini MG, Efoudebe M, Passani MB, Baldi E, Bucherelli C, Giachi F, Corradetti R, Blandina P, 2003. Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *J Neurosci*. 23: 9016-9023.
- González-Sepúlveda M, Rosell S, Hoffmann H, Castillo-Ruiz MM, Mignon V, MorenoDelgado D, Vignes M, Díaz J, Sabriá 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.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M, 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*. 265: 1826-1831.
- Grillner S, Hellgren J, Ménard A, Saitoh K, Wikström MA, 2005. Mechanisms for selection of basic motor programs-roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci*. 7: 364-370.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY, 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 260: 3440-3450.
- Gubitz AK, Widdowson L, Kurokawa M, Kirkpatrick KA, Richardson PJ, 1996. Dual signalling by the adenosine A_{2A} receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *J Neurochem*. 67: 374-381.
- Haas HL, Reiner PB, 1988. Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurones of the rat hypothalamus *in vitro*. *J Physiol* 399: 633-646.
- Haas HL, Sergeeva OA, and Selbach O. 2008. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev*. 88: 1183-1241

- Hauber W, Mönkle M, 1997. Motor depressant effects mediated by dopamine D₂ and adenosine A_{2A} receptors in the nucleus accumbens and the caudate-putamen. *Eur J Pharmacol.* 323: 127-131.
- Hauber W, Nagel J, Sauer R, Müller CE, 1998. Motor effects induced by a blockade of adenosine A_{2A} receptors in the caudate-putamen. *Neuroreport.* 9: 1803-1806.
- Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA, van de Lagemaat LN, Smith KA, Ebbert A, Riley ZL, Abajian C, Beckmann CF, Bernard A, Bertagnolli D, Boe AF, Cartagena PM, Chakravarty MM, Chapin M, Chong J, Dalley RA, David Daly B, Dang C, Datta S, Dee N, Dolbear TA, Faber V, Feng D, Fowler DR, Goldy J, Gregor BW, Haradon Z, Haynor DR, Hohmann JG, Horvath S, Howard RE, Jeromin A, Jochim JM, Kinnunen M, Lau C, Lazarz ET, Lee C, Lemon TA, Li L, Li Y, Morris JA, Overly CC, Parker PD, Parry SE, Reding M, Royall JJ, Schulkin J, Sequeira PA, Slaughterbeck CR, Smith SC, Sodt AJ, Sunkin SM, Swanson BE, Vawter MP, Williams D, Wohnoutka P, Zielke HR, Geschwind DH, Hof PR, Smith SM, Koch C, Grant SGN, Jones AR, 2012. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature.* 489: 391-399.
- Hegeman DJ, Hong ES, Hernández VM, Chan CS, 2016. The external globus pallidus: progress and perspectives. *Eur J Neurosci.* 43:1239-1265.
- Hernández VM, Hegeman DJ, Cui Q, Kelver DA, Fiske MP, Glajch KE, Pitt JE, Huang TY, Justice NJ, Chan CS., 2015. Parvalbumin⁺ Neurons and Npas¹⁺ Neurons Are Distinct Neuron Classes in the Mouse External Globus Pallidus. *J Neurosci.* 35:11830-11847.
- Herrero MT, Barcia C, Navarro JM, 2002. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst.* 18:386-404.
- Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O, 2005. Adenosine A_{2A}, but not A₁, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci.* 8: 858-859.
- Jacobson KA, Gao ZG, 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 5: 247-261.
- Jang IS, Rhee JS, Watanabe T, Akaike N, Akaike N, 2001. Histaminergic modulation of GABAergic transmission in rat ventromedial hypothalamic neurones. *J Physiol.* 534: 791-803.
- Jin X-T, Galvan A, Wichmann T, Smith Y, 2011. Localization and Function of GABA Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Basal Ganglia. *Front Systems Neurosci.* 5: 1-9.

- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC., 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18: 527-535.
- Kim J, Wei DS, Hoffman DA, 2005. Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol.* 569: 41-57.
- Kita H, Kita T, 2011. Role of Striatum in the Pause and Burst Generation in the Globus Pallidus of 6-OHDA-Treated Rats. *Front Syst Neurosci.* 8: 5-42.
- Kita H, Kitai ST, 1991. Intracellular study of rat globus pallidus neurons: membrane properties and responses to neostriatal, subthalamic and nigral stimulation. *Brain Res.* 564: 296-305.
- Kita H, Kitai ST, 1994. The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain Res.* 636: 308-319.
- Klotz KN, 2000. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 362: 382-391.
- Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, Strømgaard K, Gether U, 2011. SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev.* 63: 585-640.
- Kurokawa M, Kirk IP, Kirkpatrick KA, Kase H, Richardson PJ, 1994. Inhibition by KF17837 of adenosine A_{2A} receptor-mediated modulation of striatal GABA and ACh release. *Br J Pharmacol.* 113: 43-48.
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H, 2008. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res.* 334: 199-217.
- Langer SZ, 2008. Presynaptic autoreceptors regulating transmitter release. *Neurochem Int.* 52: 26-30.
- Leisman G, Braun-Benjamin O, Melillo R., 2014. Cognitive-motor interactions of the basal ganglia in development. *Front Syst Neurosci.* 13: 8-16.
- Leisman G, Melillo R, 2013. The basal ganglia: motor and cognitive relationships in a clinical neurobehavioral context. *Rev Neurosci.* 24: 9-25.
- Levy R, Hutchison WD, Lozano AM, Dostrovsky JO, 2002. Synchronized neuronal discharge in the basal ganglia of parkinsonian patients is limited to oscillatory activity. *J Neurosci.* 22: 2855-2861.

- Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG, 1999. Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol Pharmacol.* 55: 1101-1107.
- Matsumoto JP, Almeida MG, Castilho-Martins EA, Costa MA, Fior-Chadi DR, 2014. Protein kinase A mediates adenosine A_{2A} receptor modulation of neurotransmitter release via synapsin I phosphorylation in cultured cells from medulla oblongata. *Neurosci Res.* 85: 1-11.
- Mayfield R, Suzuki F, Zahniser NR, 1993. Adenosine A_{2A} receptor modulation of electrically evoked endogenous GABA release from slices of rat globus pallidus. *J Neurochem.* 60: 2334-2337.
- McCormick DA, Pape HC, 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol.* 431: 291-318.
- Mercer JN, Chan CS, Tkatch T, Held J, Surmeier DJ, 2007. Nav1.6 sodium channels are critical to pacemaking and fast spiking in globus pallidus neurons. *J Neurosci.* 27: 13552-13566.
- Milhaud D, Fagni L, Bockaert J, Lafon-Cazal M, 2002. Inhibition of voltage-gated Ca²⁺ channels by antazoline. *NeuroReport.* 13: 1711-1714.
- Mochizuki T, Yamatodani A, Okakura K, Horii A, Inagaki N, Wada H, 1992. Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. *Physiol Behav.* 51: 391-394.
- Momiyama T, Koga E. 2001. Dopamine D₂-like receptors selectively block N-type Ca²⁺ channels to reduce GABA release onto rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol* 533: 479-492.
- Moore KA, Nicoll RA, Schmitz D. 2003. Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14397-14402.
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM, 2000. High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature.* 408: 860-864.
- Nambu A, Llinás R, 1997. Morphology of globus pallidus neurons: its correlation with electrophysiology in guinea pig brain slices. *J Comp Neurol.* 377: 85-94.
- Nieto-Alamilla G, Márquez-Gómez R, García-Gálvez AM, Morales-Figueroa GE, Arias-Montaño JA., 2016. The histamine H₃ receptor: structure, pharmacology, and function. *Mol Pharmacol.* 90: 649-673.

- Nini A, Feingold A, Slovin H, Bergman H, 1995. Neurons in the globus pallidus do not show correlated activity in the normal monkey, but phase-locked oscillations appear in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol.* 74:1800-1805.
- Ochi M, Koga K, Kurokawa M, Kase H, Nakamura J, Kuwana Y, 2000. Systemic administration of adenosine A_{2A} receptor antagonist reverses increased GABA release in the globus pallidus of unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: a microdialysis study. *Neuroscience.* 100: 53-62.
- Oliveira L, Costa AC, Noronha-Matos JB, Silva I, Cavalcante WL, Timóteo MA, Corrado AP, Dal Belo CA, Ambiel CR, Alves-do-Prado W, Correia-de-Sá P, 2015. Amplification of neuromuscular transmission by methylprednisolone involves activation of presynaptic facilitatory adenosine A_{2A} receptors and redistribution of synaptic vesicles. *Neuropharmacology.* 89: 64-76.
- Osorio-Espinoza A, Alatorre A, Ramos-Jiménez J, Garduño-Torres B, García-Ramírez M, Querejeta E, Arias-Montaña JA, 2011. Pre-synaptic histamine H₃ receptors modulate glutamatergic transmission in rat globus pallidus. *Neuroscience.* 176: 20-31.
- Panula P, Nuutinen S, 2013. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci.* 14: 472-487.
- Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen, MS, 1989. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience.* 28: 585-610.
- Parks GS, Olivas ND, Ikrar T, Sanathara NM, Wang L, Wang Z, Civelli O, Xu X, 2014. Histamine inhibits the melanin-concentrating hormone system: implications for sleep and arousal. *J Physiol.* 592: 2183-96.
- Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM, 2002. A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience.* 114: 173-193.
- Popoli P, Blum D, Martire A, Ledent C, Ceruti S, Abbracchio MP, 2007. Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A_{2A} receptors in Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 81: 331-348.
- Ramos-Jiménez J, Garduño-Torres B, Arias-Montaña JA, 2009. Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed.* 20: 100-126.
- Raz A, Frechter-Mazar V, Feingold A, Abeles M, Vaadia E, Bergman H, 2001. Activity of pallidal and striatal tonically active neurons is correlated in MPTP-treated monkeys but not in normal monkeys. *J Neurosci.* 21: RC128 1-5.

- Raz A, Vaadia E, Bergman H, 2000. Firing patterns and correlations of spontaneous discharge of pallidal neurons in the normal and the tremulous 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine vervet model of parkinsonism. *J Neurosci.* 20: 8559-8571.
- Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J, 1998. Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 401: 163-186.
- Sadek AR, Magill PJ, Bolam JP, 2007. A single-cell analysis of intrinsic connectivity in the rat globus pallidus. *J Neurosci.* 27: 6352-6362.
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S, 2007. Adenosine A_{2A} receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol.* 83: 277-292.
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S., 2007. Adenosine A_{2A} receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol.* 83:277-292.
- Schiffmann SN, Jacobs O, Vanderhaeghen JJ, 1991. Striatal restricted adenosine A₂ receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. *J Neurochem.* 57: 1062-1067.
- Scimemi A, 2014. Structure, function, and plasticity of GABA transporters. *Front Cell Neurosci.* 8: 1-14.
- Seino S, Shibasaki T, 2005. cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev.* 85: 1303-1342.
- Shindou T, Arbuthnott GW, Wickens JR, 2008. Actions of adenosine A_{2A} receptors on synaptic connections of spiny projection neurons in the neostriatal inhibitory network. *J Neurophysiol.* 99: 1884-1889.
- Shindou T, Mori A, Kase H, Ichimura M., 2001. Adenosine A_{2A} receptor enhances GABAA-mediated IPSCs in the rat globus pallidus. *J Physiol.* 532: 423-434.
- Shindou T, Nonaka H, Richardson PJ, Mori A, Kase H, Ichimura M, 2002. Presynaptic adenosine A_{2A} receptors enhance GABAergic synaptic transmission via a cyclic AMP dependent mechanism in the rat globus pallidus. *Br J Pharmacol.* 136: 296-302.
- Shindou T, Nonaka H, Richardson PJ, Mori A, Kase H, Ichimura M, 2003. Adenosine modulates the striatal GABAergic inputs to the globus pallidus via adenosine A_{2A} receptors in rats. *Neurosci Lett.* 352: 167-170.
- Silver RB, Mackins CJ, Smith NC, Koritchneva IL, Lefkowitz K, Lovenberg TW, 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.

- Sperlágh B, Vizi ES, 2011. The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and Basal Ganglia: pharmacological and clinical aspects. *Curr Top Med Chem.* 11:1034-1046.
- Stanford IM, 2003. Independent neuronal oscillators of the rat globus pallidus. *J Neurophysiol.* 89: 1713-1717.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC, 2002. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem.* 277: 10482-10488.
- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG, 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36: 461-480.
- Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB, 1999. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. *Prog Neurobiol.* 59:355-96.
- Takagi H, Morishima Y, Matsuyama T, Hayashi H, Watanabe T, Wada H, 1986. Histaminergic axons in the neostriatum and cerebral cortex of the rat: a correlated light and electron microscopic immunocytochemical study using histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.* 364: 114-123.
- Takei H, Yamamoto K, Bae YC, Shirakawa T, Kobayashi M, 2017. Histamine H₃ heteroreceptors suppress glutamatergic and gabaergic synaptic transmission in the rat insular cortex. *Front Neural Circuits.* 9: 11-85.
- Tardivel-Lacombe J, Morisset S, Gbahou F, Schwartz JC, Arrang JM, 2001. Chromosomal mapping and organization of the human histamine H₃ receptor gene. *Neuroreport.* 12: 321-324.
- Tebano MT, Martire A, Popoli P, 2012. Adenosine A_{2A}-cannabinoid CB₁ receptor interaction: an integrative mechanism in striatal glutamatergic neurotransmission. *Brain Res.* 1476: 108-118.
- Tepper JM, Abercrombie ED, Bolam JP., 2007. Basal ganglia macrocircuits. *Prog Brain Res.* 160: 3-7.
- Tkatch T, Baranauskas G, Surmeier DJ, 2000. Kv4.2 mRNA abundance and A-type K⁺ current amplitude are linearly related in basal ganglia and basal forebrain neurons. *J Neurosci.* 20: 579-88.
- Tomasch M, Schwed JS, Paulke A, Stark H, 2013. Bodilisant-a novel fluorescent, highly affine histamine H₃ receptor ligand. *ACS Med Chem Lett.* 4: 269-273.

- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Fisone G, Girault JA., 2009. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32: 538-47.
- van Willigen G, Nieuwland R, Nürnberg B, Gorter G, Akkerman JW, 2000. Negative regulation of the platelet Na⁺/H⁺ exchanger by trimeric G-proteins. *Eur J Biochem.* 267: 7102-7108.
- Vardjan N, Kreft M, Zorec R, 2014. Dynamics of β -adrenergic/cAMP signaling and morphological changes in cultured astrocytes. *Glia.* 62: 566-79.
- Wall MJ, Dale N, 2007. Auto-inhibition of parallel fibre-Purkinje cell synapses by activity dependent adenosine release. *J Physiol.* 581: 553-65.
- White T, 1959. Formation and catabolism of histamine in brain tissue *in vitro*. *J Physiol.* 149: 34-42.
- Wilson CJ, Groves PM., 1981. Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Res.* 220: 67-80.
- Yao BB, Sharma R, Cassar S, Esbenshade TA, Hancock AA, 2003. Cloning and pharmacological characterization of the monkey histamine H₃ receptor. *Eur J Pharmacol.* 482: 49-60.
- Yoshikawa T, Naganuma F, Iida T, Nakamura T, Harada R, Mohsen AS, Kasajima A, Sasano H, Yanai K, 2013. Molecular mechanism of histamine clearance by primary human astrocytes. *Glia.* 61: 905-916.

11. Apéndice 1

Como producto directo de los resultados de la tesis se publicó el artículo:

Morales-Figueroa GE, Márquez-Gómez R, González-Pantoja R, Escamilla-Sánchez J, Arias-Montaño JA., 2014. Histamine H₃ receptor activation counteracts adenosine A_{2A} receptor-mediated enhancement of depolarization-evoked [³H]-GABA release from rat globus pallidus synaptosomes. *ACS Chem Neurosci*. 5:637-645.

Además, se participó en la publicación de un artículo de revisión y un capítulo de libro:

Nieto-Alamilla G, Márquez-Gómez R, García-Gálvez AM, **Morales-Figueroa GE**, Arias-Montaño JA., 2016. The histamine H₃ receptor: structure, pharmacology, and function. *Mol Pharmacol*. 90:649-673

Márquez-Gómez R., García-Gálvez AM, **Morales-Figueroa GE**, Arias-Montaño JA., 2016. Chapter 11: Modulation by Histamine H₃ Receptors of Neurotransmitter Release in the Basal Ganglia. 28:265-293. Patrizio Blandina, Maria Beatrice Passani (Eds.). *Histamine Receptors, Preclinical and Clinical Aspects*. Springer.

Histamine H_3 Receptor Activation Counteracts Adenosine A_{2A} Receptor-Mediated Enhancement of Depolarization-Evoked [3H]-GABA Release from Rat Globus Pallidus Synaptosomes

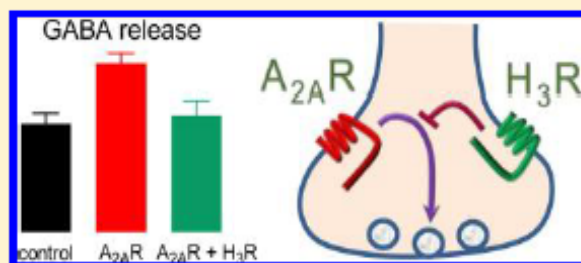
Guadalupe-Elide Morales-Figueroa, Ricardo Márquez-Gómez, Raúl González-Pantoja, Juan Escamilla-Sánchez, and José-Antonio Arias-Montaño*

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Zacatenco, 07360 México, D.F., México

ABSTRACT: High levels of histamine H_3 receptors (H_3Rs) are found in the globus pallidus (GP), a neuronal nucleus in the basal ganglia involved in the control of motor behavior. By using rat GP isolated nerve terminals (synaptosomes), we studied whether H_3R activation modified the previously reported enhancing action of adenosine A_{2A} receptor ($A_{2A}R$) stimulation on depolarization-evoked [3H]-GABA release. At 3 and 10 nM, the $A_{2A}R$ agonist CGS-21680 enhanced [3H]-GABA release induced by high K^+ (20 mM) and the effect of 3 nM CGS-21680

was prevented by the $A_{2A}R$ antagonist ZM-241385 (100 nM). The presence of presynaptic H_3Rs was confirmed by the specific binding of $N\text{-}\alpha$ -[methyl- 3H]-histamine to membranes from GP synaptosomes (maximum binding, B_{max} , 1327 ± 79 fmol/mg protein; dissociation constant, K_d , 0.74 nM), which was inhibited by the H_3R ligands immpip, clobenpropit, and A-331440 (inhibition constants, K_i , 0.28, 8.53, and 316 nM, respectively). Perfusion of synaptosomes with the H_3R agonist immpip (100 nM) had no effect on K^+ -evoked [3H]-GABA release, but inhibited the stimulatory action of $A_{2A}R$ activation. In turn, the effect of immpip was blocked by the H_3R antagonist clobenpropit, which had no significant effect of its own on K^+ -induced [3H]-GABA release. These data indicate that H_3R activation selectively counteracts the facilitatory action of $A_{2A}R$ stimulation on GABA release from striato-pallidal projections.

KEYWORDS: Adenosine A_{2A} receptor, histamine, histamine H_3 receptor, globus pallidus, basal ganglia, GABA release



The Receptors 28

Patrizio Blandina
Maria Beatrice Passani *Editors*

Histamine Receptors

Preclinical and Clinical Aspects

 Humana Press

Chapter 11

Modulation by Histamine H₃ Receptors of Neurotransmitter Release in the Basal Ganglia

Ricardo Márquez-Gómez, Ana-Maricela García-Gálvez, Guadalupe-Elide Morales-Figueroa, and José-Antonio Arias-Montaño

Abstract Among the four G-protein coupled receptors (H₁-H₄) identified as the mediators of the biological effects of histamine, the H₃ receptor (H₃R) distinguishes for its almost exclusive expression in the nervous system and its dual function as auto- and hetero-receptor that enables H₃Rs to modulate the histaminergic and other neurotransmitter systems. The basal ganglia are neuronal nuclei that form a sub-cortical circuitry responsible for integrating motor and sensorial information originated in the cerebral cortex and the thalamus. The abundant presence of H₃Rs in the basal ganglia confers these receptors a preferential and strategic position to modulate both the incoming and the outgoing synaptic information. In this chapter we review the control by H₃Rs of the release of the neurotransmitters involved in the basal ganglia circuitry.

Keywords Acetylcholine • Basal ganglia • Calcium channels • Cerebral cortex • Central nervous system • GABA • G protein-coupled receptors • Dopamine • Globus pallidus • Glutamate • Histamine • Histamine H₃ receptors • Hypothalamus • Neurotransmitter release • Neuromodulation • Noradrenaline • Serotonin (5-Hydroxytryptamine) • Striatum • Substantia nigra • Subthalamic nucleus • Thalamus

MINIREVIEW—A LATIN AMERICAN PERSPECTIVE ON G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

The Histamine H₃ Receptor: Structure, Pharmacology, and Function

Gustavo Nieto-Alamilla, Ricardo Márquez-Gómez, Ana-Maricela García-Gálvez, Guadalupe-Elide Morales-Figueroa, and José-Antonio Arias-Montaña

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav-IPN), Zacatenco, Ciudad de México, México

Received April 15, 2016; accepted August 24, 2016

ABSTRACT

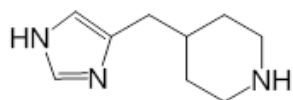
Among the four G protein-coupled receptors (H₁–H₄) identified as mediators of the biologic effects of histamine, the H₃ receptor (H₃R) is distinguished for its almost exclusive expression in the nervous system and the large variety of isoforms generated by alternative splicing of the corresponding mRNA. Additionally, it exhibits dual functionality as autoreceptor and heteroreceptor, and this enables H₃Rs to modulate the histaminergic and other neurotransmitter systems. The cloning of the H₃R cDNA in 1999 by Lovenberg et al. allowed for detailed studies of its molecular aspects. In this work, we review the

characteristics of the H₃R, namely, its structure, constitutive activity, isoforms, signal transduction pathways, regional differences in expression and localization, selective agonists, antagonists and inverse agonists, dimerization with other neurotransmitter receptors, and the main presynaptic and postsynaptic effects resulting from its activation. The H₃R has attracted interest as a potential drug target for the treatment of several important neurologic and psychiatric disorders, such as Alzheimer and Parkinson diseases, Gilles de la Tourette syndrome, and addiction.

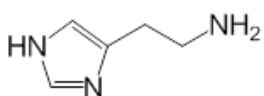
12. Apéndice 2

Estructura química de los ligandos del receptor a histamina H₃ utilizados en este trabajo

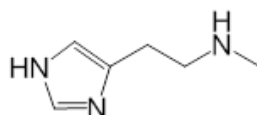
Agonistas



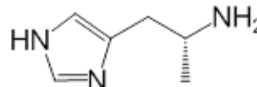
Immepip



Histamina

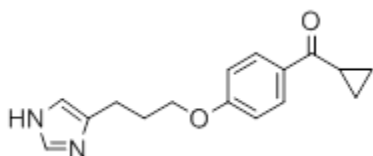


*N*α-metilhistamina (NMHA)

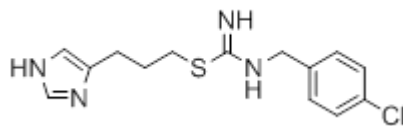


*R*α-metilhistamina (RAMH)

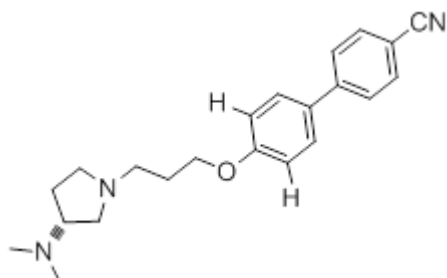
Antagonistas



Ciproxifan



Clobenpropit



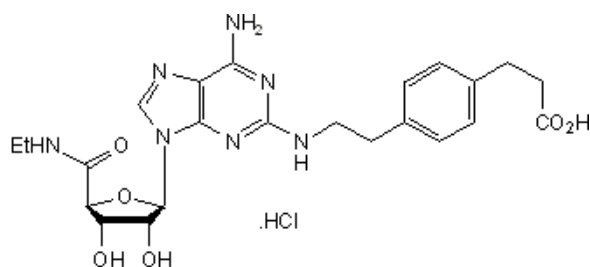
A-331440

Estructura química de los ligandos del receptor a adenosina A_{2A} utilizados en este trabajo

Agonista

CGS-21680

4-[2-[[6-Amino-9-(*N*-ethyl-β-D-ribofuranuronamidosyl)-9*H*-purin-2-yl]amino]ethyl]benzenepropanoic acid hydrochloride



Antagonista

ZM-241385

4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol

