

2ef.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA

“CONTROL HISTAMINERGICO DE LA LIBERACION DE  
GABA EN LA SUSTANCIA NIGRA DE LA RATA”

T E S I S

DE INVESTIGACION PRESENTADA POR:

FRANCISCO JAVIER PAZ BERMUDEZ

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

266639



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr Benjamín Florán Garduño más que un director, un amigo,  
por haber contribuido a mi formación profesional

Al Dr. Jorge Aceves R. por las facilidades prestadas para la  
realización de este trabajo.

A mis sinodales de tesis por su valioso tiempo dedicado a este  
trabajo, pues sus atinadas observaciones fueron consideradas

M. en C . Benita Mendiola García.

M. en C. Evangelina López Nieto.

M. C. Amada García López

Q.F.B. Estela Valencia Plata

Dr. Benjamín Florán Garduño

A todos los compañeros del laboratorio 13 del Cinvestav, a  
quienes agradezco sinseramente su colaboración.

Al Sr Constancio Franco por su gran colaboración en esta tesis.

## DEDICATORIA

A mis padres con respeto y admiración por haber sembrado  
en mí el deseo de ser mejor

A mis abuelos, heramanas por apoyarme  
incondicionalmente.

A Leonor Florán por su benevolencia y cariño recibido.

Amis tios Luist y Pedro Vargas por sus consejos y  
enseñanzas como un ejemplo de tenacidad a seguir.

## INDICE

<b>I. Introducción</b>	<b>4</b>
1. Historia de la Histamina	4
2. Química de la Histamina	5
3. Localización y Distribución	5
4. Síntesis y Metabolismo	6
5. Efectos farmacológicos	8
6. Histamina en el SNC	9
7. Receptores Histaminérgicos	14
8. Histamina en los Ganglios Básales	20
9. Dopamina en los Ganglios Básales	22
10. La Sustancia Nigra	23
11. La Enfermedad de Parkinson	24
<b>II Planteamiento del Problema</b>	<b>26</b>
<b>III Objetivos</b>	<b>27</b>
<b>IV Hipótesis</b>	<b>28</b>
<b>V Material y Métodos</b>	<b>29</b>
1. Estrategia experimental	29
2. Experimentos de liberación	30
<b>VI Resultados</b>	<b>34</b>
<b>VII Discusión</b>	<b>40</b>
<b>VIII Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>IX Bibliografía</b>	<b>43</b>

# I. INTRODUCCION

## 1. HISTORIA DE LA HISTAMINA

Los animales y vegetales contienen una sustancia orgánica que está presente en los tejidos, estimula las secreciones e interviene en la actividad de los vasos sanguíneos y se conoce como histamina. La palabra se deriva del griego. Histo, tejido, y la terminación amina : compuesto orgánico que contiene nitrógeno, es la amina de los tejidos

Estos conceptos fueron avanzando con mucha fuerza, hasta ahora, media centuria después, en que es evidente que la histamina endógena está involucrada en diversos procesos fisiológicos, aparte de la reacción alérgica y la inmunidad celular. Así la histamina participa claramente en la regulación fisiológica de secreciones gástricas y es un neurotransmisor químico que modula la actividad cerebral (Douglas, 1980).

No fue sino hasta 1927 que, Dale, Dubley y Thorpe, aislaron histamina de muestras frescas de hígado y pulmón estableciendo que es un constituyente natural del organismo demostrándose, además, su presencia en otros tejidos.

La histamina fue sintetizada en 1907 por Windaus y Vogt a partir del ácido imidazolpropiónico. Entre 1910 y 1911, Sir Henry Dale y Laidlaw, realizaron intensos estudios farmacológicos de la histamina descubriendo que estimulaba la contracción del músculo liso y que tenía una gran acción vasodepresora (Roth & Tabachnick, 1980). Durante muchos años esta amina fue el centro de estudio de la farmacología, descubriéndose que ocurre una liberación en el organismo durante una reacción de hipersensibilidad (alergia) y en la inmunidad celular.

Para llevar a cabo su función se han descrito dos tipos de receptores: los  $H_1$  (Ash and Schild, 1966, citado en Hill, 1990), y los  $H_2$  (Black et al, 1972, citado en Hill, 1990) En 1983 se agregó un tercer tipo de receptor: el  $H_3$  el cual se localiza principalmente, a nivel del sistema nervioso central y parece ser un autorreceptor (Arrang, 1983), lo mismo que se le ha asociado al control de la liberación de otros neurotransmisores (Arias Montaña y Serna, 1996).

## 2. QUIMICA DE LA HISTAMINA

La histamina tiene una fórmula ( $C_5H_9N_3$ ) y un peso molecular de 111 (ver figura 1). Cualquier modificación de la estructura de su molécula hace disminuir o suprimir la actividad farmacológica y fisiológica, así, por ejemplo, la 1-metilhistamina es ligeramente activa y la 3-metilhistamina es inactiva. Hay también una relativa pérdida de actividad de los derivados por sustitución del grupo aminado como la monometil, la dietil y la trimetil histamina (Walter, 1976).

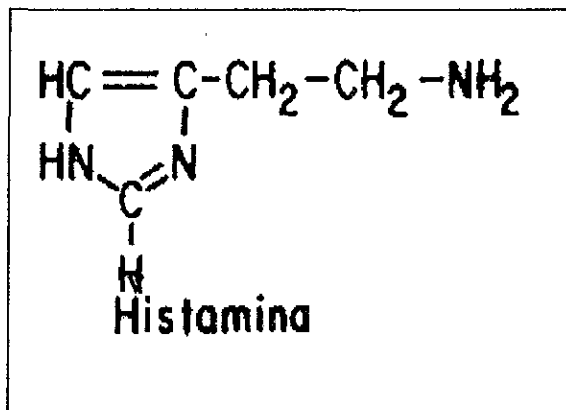


Figura 1. Fórmula estructural de la Histamina.

## 3 LOCALIZACION Y DISTRIBUCION

La histamina se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, su concentración varía en las diferentes especies; en el hombre las concentraciones más elevadas se registran en los pulmones, la piel y el estómago (ver tabla 1).

**TABLA 1**

**CONTENIDO DE HISTAMINA EN LOS TEJIDOS HUMANOS**

TEJIDO	CONTENIDO HISTAMINA ( $\mu\text{g/g}$ )	DE
Pulmón	33 $\pm$ 10*	
Mucosa (nasal)	15.6	
Estómago	14 $\pm$ 0.9*	
Duodeno	14 $\pm$ 0.9*	
Piel	6.6 (abdomen)	
	30.4 (cara)	
Bazo	3.4 $\pm$ 0.97	
Riñón	2.5 $\pm$ 1.2	
Hígado	2.2 $\pm$ 0.76	
Corazón	1.6 $\pm$ 0.07	
Tiroides	1.0 $\pm$ 0.13	
Músculo Esquelético	0.97 $\pm$ 0.13	
Tejido nervioso central	0-0.2	

Basada en datos de pp Van Arsdel y G.N. Arch Intern Med. 106; 192, 1960.

\*media error estándar.

Finalmente, en el Sistema Nervioso Central las concentraciones de la histamina son relativamente bajas en comparación con otros tejidos, la función central de ésta no está en duda y claros son los efectos que producen algunos antihistamínicos como son la somnolencia y algunos de ellos, se usan contra el vértigo, la náusea y el vómito (Douglas, 1980).



#### 4. SINTESIS Y METABOLISMO

Como puede observarse en la figura 2, dicha sustancia se forma por la descarboxilación de histidina a nivel intracelular. Esta reacción es catalizada por la enzima histidina descarboxilasa que requiere fosfato de piridoxal como coenzima y es específicamente inhibida por  $\alpha$ - metilhistidina (Walter et al., 1976).

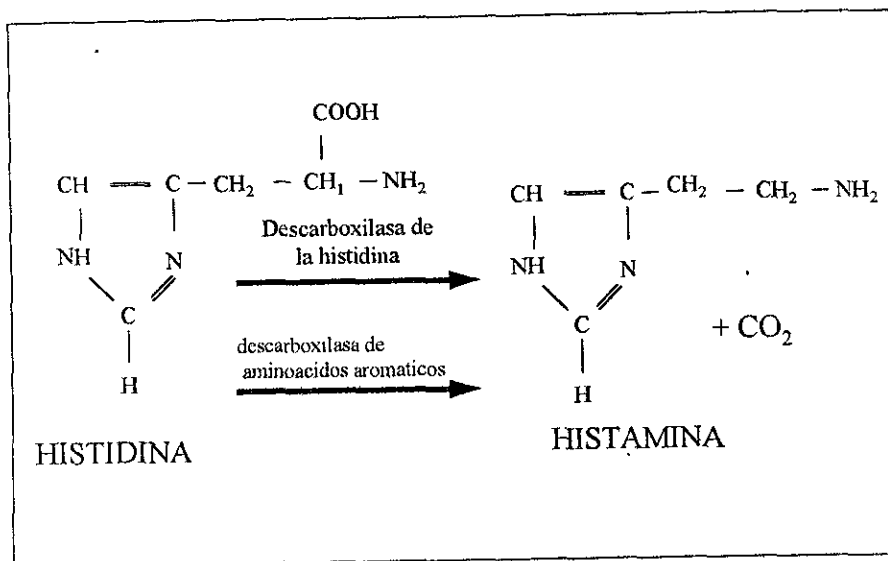


Figura 2 . Vías biosintéticas de la histamina.

La histidina descarboxilasa existe en los mamíferos en dos formas conocidas como específica e inespecífica. La primera es inhibida por la metilhistidina y se cree que es la de mayor importancia fisiológica. Estas enzimas difieren de las demás por su pH óptimo, su Km, la especificidad del sustrato y el efecto producido por inhibidores (Siegel, 1989).

Existen varias rutas de degradación de la histamina, siendo la principal de ellas la desaminación oxidativa catalizada por la diaminoxidasa. Ahora se sabe que la diaminoxidasa la convierte en imidazol-4-aldehído (reacción 1), un metabolito inestable el cual es convertido en ácido imidazol-4-acético (reacción 2) por la xantinoxidasa o la aldehído deshidrogenasa (Roth & Tabachnick, 1980). La desaminación oxidativa de la misma puede ser inhibida *in vitro* por la amino guanidina y algunos derivados hidrazínicos. En forma similar en el hombre, el catabolismo de la histamina con formación del ácido imidazol-4-acético y su derivado

1-metilado ha sido inhibido mediante aminoguanidina e iproniazina; Esto refleja la participación que en el hombre tienen las dos enzimas: la monooxidasa y la diaminooxidasa, en el catabolismo tanto de ella, como de sus derivados metílicos

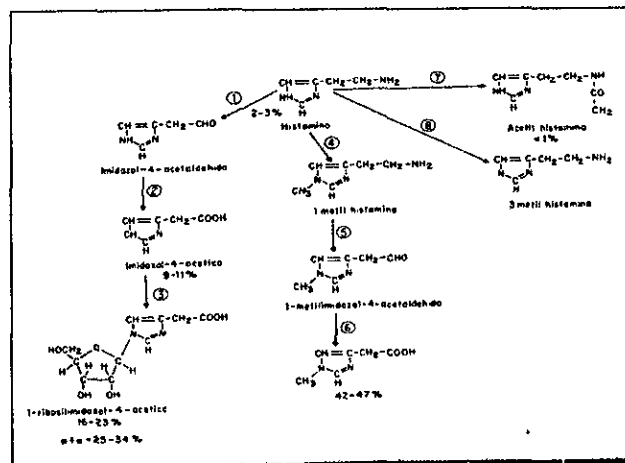


Figura 3. Rutas metabólicas de degradación de la Histamina.

## 5. EFECTOS FARMACOLOGICOS

Los efectos farmacológicos, más importantes, se observan sobre el sistema vascular, las glándulas exocrinas y las fibras musculares lisas. También es importante la acción de esta amina: sobre el corazón, la musculatura estriada, la hemodinámica renal, la reproducción, la médula suprarrenal y en la transmisión neuronal, que más adelante trataremos a fondo (Roth & Tabchnick, 1980).

La histamina administrada por vía oral no ejerce prácticamente ningún efecto, pues ésta es alterada por las bacterias de la pared intestinal y el hígado; Sin embargo, si es aplicada por vía intravenosa en una dosis de 0.1mg/kg de peso, de fosfato de histamina, provoca una súbita disminución de la presión arterial, aceleración de la frecuencia cardíaca, elevación de la presión del líquido cefalorraquídeo, enrojecimiento de la cara y cefaleas. Asimismo, se produce una estimulación de la secreción gástrica de ácido clorhídrico. Todos estos efectos persisten sólo unos minutos (Goth, 1980).

### 5.1 NEUROTRANSMISION Y SISTEMA NERVIOSO

Hasta este momento se está estudiando su papel en el proceso de la transmisión nerviosa. Existen evidencias de la existencia de neuronas histaminérgicas, se ha demostrado un efecto alertante, excitante o despertador generalizado (Walter, 1976).

Es probable que la histamina desempeñe un papel importante en la función neural. El cerebro tiene receptores para esta amina y también posee enzimas para su síntesis e inactivación mediante metilación. Se ha demostrado un efecto estimulante sobre la actividad de las neuronas ganglionares ( Arias Montañó & Serna, 1996). Asimismo, se sabe que libera catecolaminas en el feocromocitoma. Los fármacos usados para el parkinsonismo y los antidepresivos tricíclicos son antihistamínicos potentes (Richardson & Adams, 1987 ).

## *5.2 SENSIBILIDAD Y TOLERANCIA*

En los animales los efectos de la histamina varía según la especie y las diferentes acciones. El hombre es extremadamente susceptible a sus efectos y no existen pruebas de que la administración repetida de ésta modifique la respuesta original a esta sustancia pues no altera la secreción gástrica, la motilidad intestinal o presión sanguínea (Bowman & Rand, 1985).

## *5.3 TOXICIDAD*

Los síntomas de la intoxicación histamínica pueden predecirse con facilidad, tomando en consideración los efectos farmacodinámicos. El resultado es una caída violenta de la presión arterial, la cual se acompaña de vasodilatación generalizada con aumento de la temperatura de la piel, cefalalgia y trastornos visuales. La estimulación de la musculatura lisa trae como consecuencia constricción bronquial, disnea y diarrea, vómito y un sabor metálico en la boca. En los casos críticos, puede producirse también un estado de choque, siendo indispensable tomar medidas oportunas para contrarrestar esta complicación. En general, si no se llega al estado de choque, el mejor tratamiento es la administración de adrenalina. En los casos graves los antihistamínicos no confieren una protección adecuada, sin embargo es poco tóxica cuando es administrada por vía bucal. Aunque la histamina es absorbida rápidamente, se detoxifica por acetilación, así como por algunos de los otros caminos metabólicos antes descritos.

## *5.4 USOS TERAPEUTICOS*

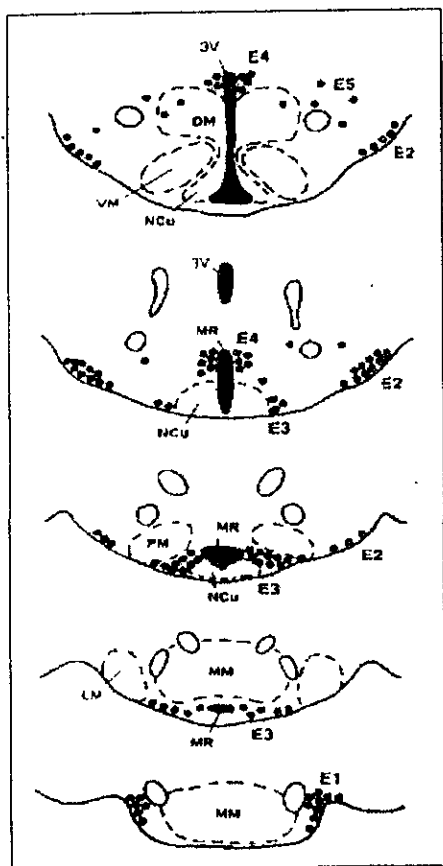
La amplia distribución de la histamina en los diferentes tejidos del organismo, sugiere que desempeña alguna función y que pequeñas cantidades de esta amina podrían tener algún efecto terapéutico. Esto sería especialmente cierto si existiese una deficiencia de ella en los tejidos, en el caso de que se pudiera comprobar. Se ha utilizado este procedimiento en el tratamiento de varios trastornos reumatoides, así como enfermedades del sistema esquelético, otro uso ha sido en la cefalalgia, se alivia después de una serie de tratamientos con esta amina. También han sido tratados, con histamina pacientes esquizofrénicos, manícodepresivos y psicóticos involuntivos.

Los antihistamínicos tienen un amplio uso terapéutico. Estos van desde el tratamiento sintomático de los padecimientos de las vías aéreas superiores, la úlcera péptica, hasta los daños centrales como son: el vértigo de Menier y la enfermedad de Parkinson.

## 6. HISTAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La presencia y síntesis de histamina en el Sistema Nervioso Central (SNC) fueron reportadas por Kwiatoski y White en 1943 y 1959; respectivamente. Sin embargo, fue hasta fechas recientes cuando se demostró la existencia de un sistema histaminérgico en éste, utilizando anticuerpos específicos que corroboraron la presencia de la histamina y de la enzima responsable de su síntesis, la descarboxilasa de histidina (DCH) en numerosas áreas cerebrales (Panula et al., 1990). Estos hallazgos fueron después confirmados mediante hibridación *in situ* con oligonucleótidos complementarios para el RNAm de la DCH (Arias Montaña & Serna, 1996).

### 6.1 INERVACION HISTAMINERGICA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL



Las neuronas histaminérgicas, a semejanza de los sistemas noradrenérgicos y serotoninérgicos que tienen un origen preciso en el locus coeruleus y en los núcleos del raqué respectivamente, tienen sus cuerpos celulares localizados en una reducida área del cerebro y el núcleo tuberomamilar del hipotálamo.

En el cerebro de la rata, donde se ha estudiado con mayor detalle su distribución, las neuronas histaminérgicas se encuentran localizadas en cinco grupos, denominados: E1 a E5. Los grupos E1 y E2 se ubican en la región lateral del núcleo tuberomamilar; el grupo E1 está situado caudalmente respecto al E2. El grupo E3 se localiza en la región ventromedial y el E4 en la dorsomedial del mismo núcleo, en tanto que el grupo E5 está conformado por neuronas dispersas entre los grupos E2 y E4 (Wada, 1991) (Ver figura 4).

**Figura 4. Localización hipotalámica de los principales grupos de neuronas histaminérgicas.**

## 6.2 VIAS AFERENTES Y EFERENTES DEL SISTEMA HISTAMINERGICO.

Las neuronas histaminérgicas reciben aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral prefrontal, asimismo son originadas en el área preóptica media y el séptum. Entre los neurotransmisores de las fibras provenientes de estas dos últimas áreas se encuentran: el ácido glutámico, la noradrenalina, la serotonina, la sustancia P y el neuropéptido Y.

Por otra parte, las neuronas histaminérgicas proyectan a prácticamente todo el SNC, desde el bulbo olfatorio hasta la médula espinal. Esta inervación se debe a fibras ascendentes presentes en el haz medial del cerebro anterior y en la superficie ventral del hipotálamo, así como a fibras que descienden por la materia gris del cerebro medio y la zona dorsal del rombencéfalo (Arias Montaña & Serna, 1996).

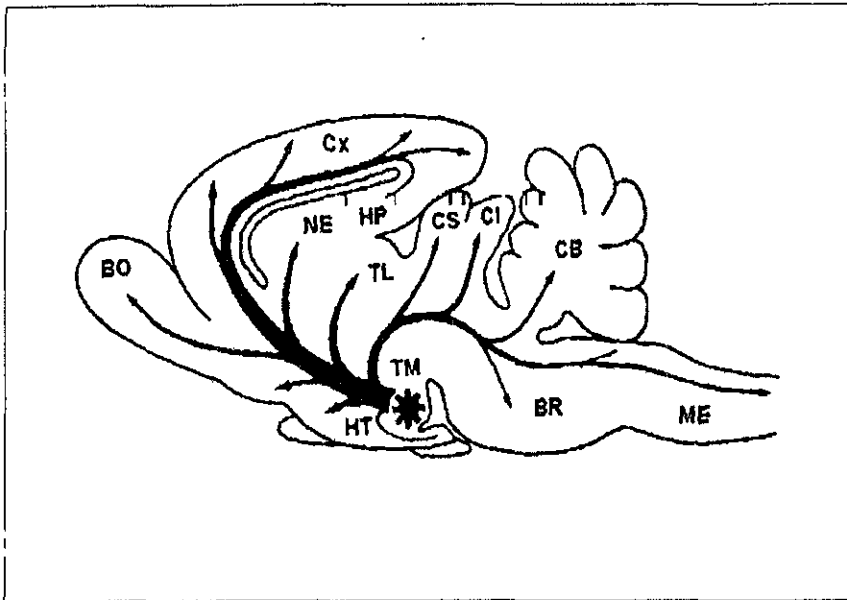
Aunque la inervación histaminérgica de las diversas zonas del cerebro es muy heterogénea puede establecerse el siguiente orden en base al número de fibras nerviosas presentes en ellas: hipotálamo>séptum y tálamo>corteza cerebral > ganglios basales > complejo amigdalino, colículos inferior y superior> bulbo olfatorio, hipocampo, tegmento, bulbo raquídeo, cerebelo y médula espinal (ver tabla 2).

Tabla 2

### DISTRIBUCION DE LAS FIBRAS HISTAMINERGICAS EN EL CEREBRO DE LA RATA Y DEL COBAYO

	RATA	COBAYO
Bulbo olfatorio	+	++
Corteza cerebral	++	++
Hipocampo	+	++
Ganglios basales	++	++
Complejo amigdalino	++	++
Séptum	++	+++
Tálamo	++ a +++	++
Hipotálamo	+++	+++
Colículo superior	++	++
Colículo inferior	++	++
Tegmento	+	++
Bulbo raquídeo	+ a +++	+ a +++
Cerebelo	+	+
Médula espinal	+	+ a +++

+ Densidad baja; ++ Densidad media; +++Densidad alta. (Wada et al., 1991).



**Figura 5. Distribución de los principales axones histaminérgicos en el sistema nervioso central. Tomado de Wada et al., 1991.**

Los axones histaminérgicos poseen múltiples varicosidades, la mayoría de los cuales no rodean a las otras células neurales, sino que se encuentran diseminadas de manera azarosa y difusa en el tejido cerebral. Mediante estudios de microscopía electrónica se ha observado que algunas de ellas establecen contacto con neuronas (somatas, axones o terminales), pero sólo unos cuantos de estos contactos muestran las características estructurales de una sinapsis química, esta carencia de contacto sináptico ha llevado a postular que en el SNC la histamina es un neuromodulador y no un neurotransmisor.

### **6.3 HISTAMINA COMO NEUROMODULADOR CENTRAL**

Un neuromodulador, (histamina), es liberado al espacio extracelular por la terminal nerviosa y se difunde hacia las células vecinas activando receptores presentes en un número variable de neuronas u otras células. En el caso de un neurotransmisor, la información se transmite entre una terminal nerviosa y una célula postsináptica única. En consecuencia, el neuromodulador no produce por sí mismo una respuesta postsináptica que conduzca a la generación y propagación de potenciales de acción, sino que modula, ya sea facilitando o inhibiendo los efectos trans-sinápticos de los neurotransmisores que actúan sobre la misma célula. Otra diferencia importante es

que la concentración de histamina (o de cualquier otro neuromodulador) que estaría en contacto con sus receptores y podrían ser también mucho menor a la concentración de neurotransmisor, presente en la hendidura sináptica, por lo que los fenómenos de neuromodulación, probablemente, requieren de una mayor densidad y/o afinidad de los receptores respectivos así como de procesos de degradación menos eficientes

Las varicosidades de las fibras histaminérgicas establecen también contactos con células gliales, vasos sanguíneos de pequeño calibre y capilares, lo que indica que los efectos de la histamina pueden ejercerse de manera simultánea a sus acciones neuronales sobre células gliales y musculares lisas, en las que se ha demostrado la presencia de los receptores para este neuromodulador. En el sistema nervioso central se sintetiza HDC específica y se degrada principalmente, por la vía de la diaminoxidasa, presentes ambas en el tejido neural involucrado. La acción enzimática de esta descarboxilasa específica es inhibida por la (s)- $\alpha$ -fluorometilhistidina, utilizada, como una herramienta experimental a fin de estudiar el efecto de la denervación histaminérgica sobre diversas funciones del SNC (Siegel, 1989)

En tejidos cerebrales *in vitro* (usando sinaptosomas y rebanadas) se observa liberación de la histamina en respuesta a la despolarización producida con estimulación eléctrica o con concentraciones elevadas de ion  $K^+$  (Arrang et al., 1987). En estas condiciones, la liberación depende de la concentración extracelular de iones  $Ca^{2+}$ , así como de la temperatura. También es inhibida por iones  $Mg^{2+}$  lo que indica que la exocitosis es el principal mecanismo responsable de la liberación del neuromodulador. La liberación de histamina endógena en respuesta a despolarización por alto  $K^+$  ha sido también demostrada *in vivo* utilizando microdiálisis cerebral en el hipotálamo de conejo y gato (Hill, 1990).

En los estudios realizados en rebanadas y sinaptosomas cerebrales, sometidos a despolarización, han demostrado que tanto la síntesis como la liberación de esta son inhibidas por el propio neuromodulador a través de la activación de receptores pertenecientes al subtipo  $H_3$  presentes en las terminales histaminérgicas, sugiriendo la existencia de mecanismos de autorregulación.

A diferencia de lo que ocurre con otros neurotransmisores y neuromoduladores, no existe un sistema de recaptura de alta afinidad para la histamina, ya sea en los cuerpos de las neuronas histaminérgicas o bien en sus terminales. Esto sugiere que una vez liberada al espacio extracelular, la acción de éste se ve terminada de manera exclusiva por captura y degradación de la amina, por neuronas postsinápticas y por células gliales en las que se encuentran presentes enzimas metiltransferasa de histamina.

## 7. RECEPTORES HISTAMINERGICOS

### ASPECTOS GENERALES

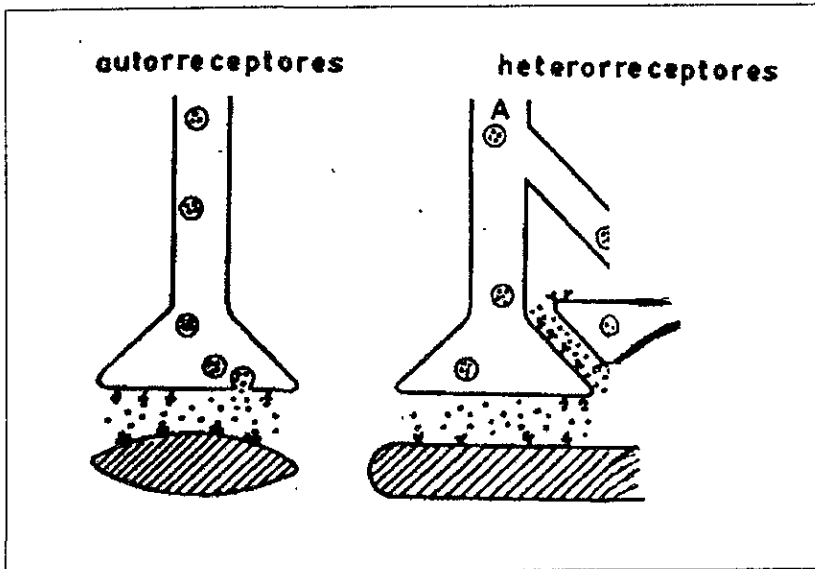


Figura 6. Ilustración esquemática de los dos tipos de modulación presináptica. La mediada por autorreceptores y la mediada por heterorreceptores.

En el sistema nervioso hay dos mecanismos mediante los cuales las neuronas se comunican, entre sí y son de naturaleza química y eléctrica; siendo el primero el más común para la fisiología neuronal (Ottoson et al., 1983). La comunicación de naturaleza química se da por medio de receptores ( complejos proteínicos) situados en la membrana de la neurona blanco, y el resultado de esta unión puede ser una excitación o bien una inhibición de la actividad neuronal, además se encuentran en soma, dendritas y terminales axónicas. Se puede clasificar en dos grandes grupos: el primero lo forman los receptores somato-dendríticos que se localizan en el soma y en las dendritas que al ser activados modifican la síntesis de proteínas y/o la generación de potenciales de acción. El segundo grupo lo integran los receptores presinápticos que se ubican en las terminales axónicas que cuando son activados pueden modular la liberación del neurotransmisor, su síntesis (Starke, 1981).

La cantidad de neurotransmisor liberado puede ser modulada por despolarización local de las terminales nerviosas, así como por otros factores que influyen sobre el



potencial de membrana de estas terminales tales como: hormonas, nucleótidos de adenosina, anestésicos, etc. (Kats and Milide, 1969).

En su origen el concepto de modulación de la liberación y síntesis de neurotransmisores mediados por receptores presinápticos (que ha recibido amplia atención desde la década de los setenta), surge como una hipótesis para explicar resultados farmacológicos obtenidos del sistema nervioso periférico. El primer candidato para determinar el efecto fue el neurotransmisor noradrenalina (Chesselet, 1984)

Los receptores modulados por el neurotransmisor liberado, por la propia neurona, se les ha denominado "autorreceptores presinápticos", el primer término nos indica que es sensible al neurotransmisor liberado por la propia neurona y el segundo nos señala que se localizan en las terminales nerviosas de la misma neurona. La liberación de un neurotransmisor puede ser modulada por otros que activan receptores presinápticos, a los cuales se les llama "heterorreceptores". La activación de autorreceptores conduce a una inhibición de la liberación del propio neurotransmisor neural. Los heterorreceptores pueden aumentar o inhibir la liberación del neurotransmisor (Langer, 1981) (figura 6).

Los receptores histaminérgicos presentes en el SNC han sido clasificados en tres subtipos ( $H_1$ ,  $H_2$ , y  $H_3$ ), en base a criterios farmacológicos. El desarrollo de ligandos radiactivos selectivos y de alta afinidad, para dichos subtipos, ha permitido estudiar su distribución regional en el SNC.

Los receptores  $H_1$  han sido identificados mediante el uso de [ $^3H$ ] - mepiramina y [ $^{125}I$ ] - yodobolpiramina, en tanto que los compuestos [ $^{125}I$ ] - yodoaminopotentidina y [ $^3H$ ] - a - metilhistamina han permitido identificar a los receptores  $H_2$  y  $H_3$  respectivamente. La distribución de los receptores  $H_1$  ha sido también estudiada in vivo en humanos y en animales utilizando tomografía de emisión de positrones y los ligandos [ $^{11}C$ ] - mepiramina y [ $^{11}C$ ] - doxepina (Hill, 1996).

Como se muestra en la tabla 3, los tres subtipos se encuentran presentes en prácticamente, todas las regiones cerebrales estudiadas, pero existen diferencias importantes en cuanto a la densidad y proporción de los mismos (Wada et al., 1991).

**Tabla 3**

**DISTRIBUCION DE DOS RECEPTORES HISTAMINERGICOS EN EL CEREBRO DE LA RATA**

	<i>Receptor H<sub>1</sub></i>	<i>Receptor H<sub>2</sub></i>
Bulbo olfatorio	+	+++
Corteza cerebral	++	+++
Hipocampo	++ a +++	+++
Ganglios basales	0 a +	+++
Complejo A.	++ a +++	ND
Séptum	0 a +	+++
Tálamo	0 a +	++
Hipotálamo	0 a +	++
Cerebelo	0	+
Médula cspinal	++	ND
Bulbo raquídeo	+ a +++	+

+, densidad baja ++, densidad intermedia +++, densidad alta, 0, ND, no detectable. Tomado de Wada, 1991.

**7.1 RECEPTORES H<sub>1</sub>**

En 1991 Yamashita y colaboradores (citado por Arias y Serna, 1996), reportaron la clonación del receptor H<sub>1</sub> del cerebro de bovino. El DNA complementario (DNAc) corresponde a una proteína de 491 aminoácidos, con peso molecular de 56,000 Daltones y siete dominios transmembranales (como los receptores acoplados a proteínas G).

El receptor de la histamina H<sub>1</sub> es responsable de la transmisión de la contracción del músculo liso, la mediación del proceso inflamatorio, la secreción de varias hormonas y la glicólisis (ambos directa e indirectamente, vía amplificaciones de la actividad de otros receptores). Este receptor esta muy extendido, con el uso de mepiramina marcada con tritio, un agonista selectivo de histamina H<sub>1</sub>. Fue descubierto en todos los tejidos como son: el cerebro del mamífero (incluyendo astrocitos celulares), muchas clases de músculos lisos e hígado (Kees et al., 1994).

*Agonistas y antagonistas.* El principal antagonista es el compuesto mepiramida, debido a su alta afinidad ( $K_D = 0.8nM$ ) y selectividad, su escasa unión a los otros tipos de receptores. Otros antagonistas H<sub>1</sub> con menor selectividad, tales como la prometazina y la difenhidramina, se unen a receptores para la acetilcolina del tipo muscarínicos, lo que explica sus efectos antagonistas sobre el sistema parasimpático cuando son administrados sistémicamente.

Otros antagonistas  $H_1$  de relevancia clínica son: la terfenadina, la mequitazina, el astemizol y la temelastina. Estos compuestos no cruzan la barrera hematoencefálica, lo que evita su acción sobre receptores presentes en el SNC. Y, por lo tanto, no producen sedación, un efecto colateral frecuente de la administración de antagonistas  $H_1$  (Hill, 1990, Gibson et al., 1994).

Mecanismo de traducción de señales. La activación de receptores  $H_1$  produce incremento en la concentración intracelular de iones  $Ca^{2+}$ . La unión del agonista al receptor activa una proteína G (generalmente Gq) cuya subunidad estimula la actividad de una fosfolipasa asociada a la membrana celular (fosfolipasa C), esta enzima hidroliza al 4,5-bisfosfolipasa inositol ( $PIP_2$ ) generando 1,4,5-trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) y diacil glicerol (DAG). El  $IP_3$  (hidrosoluble) difunde al interior de la célula y se une a los receptores específicos localizados en depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$ . El receptor para  $IP_3$  es en sí mismo, un canal permeable a  $Ca^{2+}$  que al unirse al ligando permite la salida de los iones  $Ca^{2+}$  contenidos en el interior del depósito intracelular. (Haaksma et al., 1990).

El segundo producto de la hidrólisis del  $PIP_2$ , el DAG, es también importante para los efectos de la histamina debido a la activación de receptores  $H_1$ . Asimismo, es el principal activador de la cinasa de proteína C al incrementar la afinidad de las enzimas por iones  $Ca^{2+}$ . Diversas proteínas, entre las que se incluyen canales iónicos, receptores y otras enzimas, son sustratos de la acción de la cinasa de proteína C.

Distribución. Se han encontrado receptores  $H_1$  en prácticamente todo el SNC, aunque la densidad de los mismos difiere de manera importante entre estas áreas cerebrales estudiadas. Niveles elevados de éstos se encuentran en el hipotálamo, la corteza cerebral, el complejo amigdalóide y la médula espinal. Regiones del SNC con menor densidad de receptores  $H_1$  incluyen al tálamo y los colículos. Sin embargo, cabe destacar que existen también diferencias marcadas entre especies.

Existen evidencias de la presencia de receptores  $H_1$  tanto en neuronas como en células gliales, así como en vasos sanguíneos de pequeño calibre, si bien en éstos últimos éstos representan sólo una pequeña proporción (menos del 1%) del total de receptores.

## **7.2 RECEPTORES $H_2$**

La mayor respuesta funcional a la estimulación de los receptores  $H_2$  es la secreción de ácido gástrico que puede ser un efecto directo o indirecto de histamina por un aumento en la liberación de la acetilcolina, relajación de varios músculos lisos,

también tiene en el músculo cardíaco y modulación de la respuesta inmune. (Kees et al, 1994).

**Agonistas, antagonistas y radioligandos.** El desarrollo relativamente reciente del compuesto [<sup>125</sup>I] yodoaminopotentidina, un agonista potente ( $K_D = 0.3nM$ ) y selectivo, ha permitido estudiar la distribución de los receptores H<sub>2</sub>. Otros fármacos que muestran selectividad por éstos, son los antagonistas burimamida, metiamida, tiotidina, cimetidina y ranitidina. (Hill, 1990).

**Mecanismo de traducción de señales.** La activación de receptores H<sub>2</sub> se encuentra asociada, tanto al SNC como a los tejidos periféricos, a la producción y la formación de AMPc, se debe a la activación de una adenilciclasa en un proceso en el que interviene una proteína G (perteneciente a la familia de proteínas G estimuladoras) (Gs). El aumento de la concentración de AMPc conduce a la apertura de canales iónicos de Ca<sup>2+</sup> es el mecanismo responsable de la mayor parte de los fenómenos fisiológicos asociados a la activación de receptores H<sub>2</sub>.

**Distribución.** En el SNC de la rata y el cobayo, los receptores H<sub>2</sub> se encuentran presentes en numerosas áreas cerebrales, si bien muestran heterogeneidad en su distribución. Una alta densidad de éstos se observan en la mayor parte de la corteza cerebral, en el neocórtex y en el núcleo acumbens, en tanto que densidades intermedias se advierten en los colículos superiores e inferiores, el tálamo y el hipotálamo. La mayor parte de ellos se encuentran en neuronas, aunque existen éstos en células gliales y en vasos sanguíneos de pequeño calibre.

### **7.3 RECEPTORES H<sub>3</sub>**

La existencia de éstos fue postulada en 1983 y confirmada en 1987, es un auto y heteroreceptor presináptico. La estimulación de este receptor histamínico H<sub>3</sub> es parte de un sistema de Feedback negativo.

**Agonistas y antagonistas.** La R-( $\alpha$ )-metil- histamina es un agonista selectivo de alta afinidad ( $K_D = 0.3nM$ ), cuya forma tritizada ha permitido caracterizar la presencia de receptores H<sub>3</sub> en el SNC. Funcionalmente, la caracterización de respuestas mediadas por receptores H<sub>3</sub> ha involucrado también la utilización de tioperamida (Yanai, K et al, 1994, Schilerker E., 1989). Recientemente se han sintetizado otros fármacos que muestran también selectividad por los receptores H<sub>3</sub>, entre los que se incluyen el imepip y el imetit como agonistas y el clorobenpropit como antagonista (Arranga et al, 1987).

Mecanismo de traducción de señales. Los agonistas  $H_3$  inhiben la liberación de histamina inducida por  $K^+$  o por veratridina en rebanadas de la corteza cerebral, neocóstriado, hipocampo y tálamo. El efecto inhibitor de éstos disminuye si se incrementa la magnitud del estímulo o si se eleva la concentración extracelular de iones  $Ca^{2+}$  lo que sugiere que la regulación de los canales de  $Ca^{2+}$  son activados por voltaje (presumiblemente)

A través de una proteína G inhibitora ( $G_i$ ) es el mecanismo responsable de la modulación de la liberación tanto de histamina como de otros neurotransmisores. Sin embargo, no puede descartarse que otros mecanismos tales como la apertura de canales de  $K^+$  o la inhibición de la actividad de la adenilciclase, puedan estar involucrados en dicho efecto.

*Distribución.* Estudios de autorradiografía empleando [ $^3H$ ]-R- metil-histamina han demostrado la presencia de receptores  $H_3$  en diversas áreas, en particular, en la corteza cerebral, el neocóstriado, la **sustancia negra**, el bulbo olfatorio, el hipocampo y el tálamo así como en el núcleo tuberomamilar, en donde se localizan las neuronas histaminérgicas. (Pollard et al., 1993, Cumming et al., 1991).

Un número importante de receptores  $H_3$  se encuentran en las propias terminales histaminérgicas, aunque éstos se observan también en fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas, así como en vasos de pequeño calibre.

En cuanto a la localización celular puede señalarse que los receptores  $H_1$  y  $H_2$  son postsinápticos, en tanto que los  $H_3$  presinápticos y se encuentran en las terminales nerviosas, tanto de las propias células histaminérgicas como de neuronas que liberan otro neurotransmisor.

#### 7.4 FUNCION DE LA HISTAMINA EN EL SNC

Las principales funciones del SNC en las que se ha implicado a la histamina se indican en la tabla 4. Algunas de las funciones mencionadas y los mecanismos involucrados se discuten a continuación.

**Tabla 4**

#### **EFEECTO DE LA HISTAMINA SOBRE DIVERSAS FUNCIONES CEREBRALES**

<i>FUNCIÓN</i>	<i>EFEECTO DE LA HISTAMINA</i>
Estado de alerta	Incremento del estado de vigilia y reducción del sueño de ondas lentas
Metabolismo energético	Estimulación de la hidrólisis de glucógeno
Conducta	Aumento de la actividad motora Inhibición de la gestión de alimentos
Neuroendocrina	Estimulación de la ingestión de agua Aumento de la liberación de las hormonas adrenocorticotrópica, luteinizante, prolactina y vasopresina.
Funciones autónomas	Aumento de la presión arterial Aumento de la concentración de glucosa plasmática
Funciones vestibulares	Disminución de la temperatura corporal
Percepción del dolor	Regulación Analgesia.

Tomado de Wada et al., 1991.

Como puede observarse las funciones en las que se involucra a la histamina son variadas, sin embargo, los mecanismos y receptores involucrados están aún por dilucidarse. En este estudio, destacaremos los efectos, que la histamina tiene sobre la conducta motora que, en general, consisten en un incremento asociado del estado de alerta y que parece estar relacionada con la fisiología de los ganglios basales.

## **8. LA HISTAMINA EN LOS GANGLIOS BASALES**

Los ganglios basales son núcleos de la base del cerebro relacionados con el control motor, particularmente regulan: la iniciación, focalización y fineza (tuning) de los movimientos coordinados (Dray, 1980). Los núcleos involucrados incluyen el estriado, el globo pálido (Interno Gpi o núcleo entopeduncular externo), la sustancia negra (SN) (en sus dos porciones la pars compacta y la reticulata) y el subtalámico (Thal). Estos se organizan básicamente en dos circuitos conocidos como vía directa e indirecta, respectivamente, y cuya activación produce efectos opuestos sobre el control del movimiento, al facilitar o bloquear la corteza motora, (Carpenter, 1984). (ver figura 7).

De acuerdo al modelo propuesto por Penny y Young (1983), los ganglios basales se organizan anatómicamente en circuitos de retroalimentación, en los que participan también la corteza y el tálamo (Garret et al., 1990). Las conductas motoras generadas en la corteza, son focalizadas y facilitadas por los ganglios basales, en ellos la sustancia nigra es una estación o núcleo de salida de información dirigida a núcleos premotores (Floran, 1989).

Una buena proporción de fibras histaminérgicas proyectan a el estriado y la sustancia negra (Arias-Montaña et al., 1995). Existiendo particularmente, receptores H<sub>3</sub> en las terminales estriado-nigrales; sin embargo, a pesar de esto se desconoce el papel de la histamina sobre las conductas motoras reguladas por los ganglios basales. La histamina sistémica produce cambios de la conducta motora generalizados por un lado hay una hiperactividad inicial seguida de una disminución del movimiento, en la primera fase se involucran los H<sub>1</sub> y en la segunda los H<sub>2</sub> (Hill, 1990). Aunque este no reporta la participación de receptores H<sub>3</sub>, recientemente Clapham y Kilpatrick (1994), han observado que éstos inhiben el incremento de la actividad motora inducida por anfetamina (droga que moviliza dopamina de compartimentos endógenos la que es un neurotransmisor de los ganglios basales).

Este último estudio es importante porque involucra directamente a los ganglios basales en las conductas mediadas por histamina. Por último, es importante notar que los fármacos antihistamínicos han sido usados ampliamente en la terapia de la enfermedad de Parkinson (Goth, 1980).

## 9. DOPAMINA EN LOS GANGLIOS BASALES

La dopamina es un importante neurotransmisor en la fisiología de los ganglios basales pues su ausencia por degeneración de las neuronas que las contienen hace perder la facilitación de la iniciación del movimiento, la fineza y, en general, el control motor; desorden que se conoce como enfermedad de Parkinson. El sistema dopaminérgico o nigroestriatal se origina en la pars compacta de la sustancia nigra y sus axones se proyectan al cuerpo estriado principalmente. Sin embargo, estudios neuroquímicos han demostrado que el sistema es más difuso y alcanza, el globo pálido (en sus dos segmentos), el subtálamo y la propia sustancia nigra pars reticulata a través de dendritas que se proyectan de una parte a otra y son capaces de capturar y liberar dopamina al igual que las terminales.

### 9.1 Receptores

Actualmente se conoce la existencia de dos subtipos de receptores de la dopamina, la base de su clasificación está en sus propiedades farmacológicas y la consecuencia bioquímica de su activación, y son: el D1 y el D2 (Kebabian and Calne).

#### *Receptores D1*

Al ser activados estimulan la actividad de la adenilato ciclasa y en consecuencia, incrementa la producción de AMPc. Se cuenta actualmente con agonista farmacológicos específicos como es el SKF38393 y de antagonistas selectivos como el SCH23390.



## *Receptores D2*

La activación de receptores D2 conlleva a una reducción importante de la actividad de adenilato ciclasa y, como consecuencia, a una disminución de la formación de AMPc. Los agonistas para este receptor son quinpirole y como antagonista el l-sulpiride son los principales (Kebabian & Calne).

Entre el sistema dopaminérgico y el GABAérgico de los circuitos neuronales de los ganglios basales existe una estrecha relación y se ha postulado una regulación recíproca entre éstos. Las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta ofrecen un sistema de control local fino que modula la liberación de los neurotransmisores de una u otra vía de manera opuesta. Los receptores del tipo D1 facilitan la liberación de GABA en la vía directa y los del tipo D2 inhiben en la indirecta (Kebabian & Calne).

## **10. LA SUSTANCIA NIGRA**

Debe su nombre a la gran cantidad de melanina contenida en sus células y se distinguen en ella dos partes. la pars compacta y la reticulata. Tiene tres tipos de neuronas: grandes con diámetros entre 45 y 74  $\mu\text{M}$ , medianas de 19 a 25  $\mu\text{M}$  y pequeñas de menos de 20 $\mu\text{M}$  y con árbol dendrítico muy pequeño y axón corto (Juraska et al., 1977).

La pars compacta es una región rica en células que contienen melanina y se localiza dorsalmente, a la reticulata que es de menor densidad de células las que, a su vez, contienen sales de hierro y que forma la mayor parte del núcleo. En la compacta predominan las neuronas dopaminérgicas, en tanto que en la reticulata las GABAérgicas, la pars lateralis es una región poco desarrollada y está integrada tanto por células de la pars compacta como de la reticulata. Asimismo, está formada en su mayor parte de neuronas de tamaño mediano en un 90% y pequeñas en un 10%. Son neuronas ovoides, poligonales o fusiformes, con tres o seis dendritas primarias de una de las cuales emergen un axón fino (0.5 $\mu\text{M}$  de diámetro) y que no emite colaterales en su trayecto, estas neuronas forman dos subcapas La subcapa más dorsal está constituida por neuronas dopaminérgicas fusiformes, con árboles dendríticos que se extienden medio lateralmente, continuándose con el área ventral tegmental adyacente y sus axones proyectan al cuerpo estriado. La subcapa más ventral es de mayor densidad y está formada por neuronas piramidales con dendritas varicosas que se proyectan a la pars reticulata.

La pars reticulata está constituida por neuronas grandes en un 60 % e interneuronas en un 40%; las neuronas presentan árboles dendríticos con orientación rostro-caudal y perpendiculares a las de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta Son en su

mayoría neuronas de proyección que a diferencia de las dopaminérgicas emiten colaterales recurrentes que se arborizan y terminan en la pars compacta.

Las neuronas de la pars reticulata son GABAérgicas y proyectan sus terminales a los núcleos premotores (Tálamo, colículo superior, etc.), en ésta se encuentran los procesos dendríticos de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta, estas dendritas hacen sinapsis con las terminales GABAérgicas que vienen del estriado (Wassef, 1981) y como sus axones estriatales liberan dopamina. Dado que no se han encontrado vesículas sinápticas en los procesos dendríticos, se piensa que la dopamina liberada de las dendritas proviene del sistema retículo endoplasmático (Dray, 1980).

Fisiológicamente la pars compacta, es pues, el proveedor de dopamina a los ganglios basales, en tanto que la reticulata es el relevo de salida de la información hacia los núcleos premotores.

## 11. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita, por primera vez, en 1817 como "parálisis agitante" por James Parkinson, médico inglés, quien dio una definición completa de la enfermedad:

"Movimientos temblorosos involuntarios con disminución de la fuerza muscular, en zonas que no están en actividad e incluso cuando se les ayuda, propensión a inclinar el tronco hacia adelante y a pasar de la marcha a la carrera, mientras que los sentidos y el intelecto permanece inalterado" (Harrison's).

Actualmente se ha definido a la EP como un desorden neurodegenerativo, caracterizado principalmente por temblor de reposo, bradicinesia, rigidez e inestabilidad postural, además de disturbios cognitivos sensoriales.

Su incidencia se incrementa con la edad avanzada del individuo es raro que se presente antes de los 30 años, usualmente se manifiesta después de los 55 años y su prevalencia no difiere significativamente entre hombre y la mujer, se ha encontrado más frecuencia en Europa y Norteamérica, así como mayor riesgo en la raza blanca.

La EP ocurre como resultado de la destrucción de las células nerviosas que contienen dopamina en la sustancia nigra. Se le ha conceptualizado como la aceleración del proceso normal de envejecimiento de las células de la SN, sin embargo, esto no explica la enfermedad. Un concepto alternativo se ha descrito como al daño tóxico

durante etapas tempranas de la vida, lo que disminuye con la edad el número de células de la SN y presentándose, posteriormente, los síntomas de la enfermedad

Los cambios patológicos de la EP son más complejos que la simple pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la SN, ya que recientes estudios han demostrado que ciertas poblaciones de neuronas es más vulnerable que otra a la degeneración, por ejemplo, la parte ventrolateral de la SN que proyecta principalmente al putamen, está más afectada que la parte dorsal. También existe una disminución del contenido estriatal y nigral de dopamina, de la actividad de la enzima sintetizante del GABA en los Ganglios basales y la SN., de la concentración de GABA en los Ganglios basales y líquido céfalo-raquídeo, incremento del número de receptores dopaminérgicos en el estriado, disminución de los sitios receptores para GABA SN, asociados a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Floran, 1989).

La EP es un síndrome clínico que se caracteriza por cuatro síntomas principales

bradicinesia (lentitud y pobreza de movimiento), rigidez muscular (percibida por aumento de la resistencia de los músculos al movimiento pasivo), temblor en reposo (que usualmente se calma con el movimiento voluntario) y anormalidades de la postura y la marcha. Las características clínicas neurológicas principales de la EP producen diversas incapacidades funcionales que incluyen la de caminar, alteraciones en el habla, así como en actividades delicadas como escribir e incluso comer. Sin tratamiento, la etapa terminal es un estado acinético de rigidez, en el cual los pacientes son incapaces de atenderse y la muerte se produce por complicaciones de la inmovilidad, como embolia pulmonar o neumonía aspirativa.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como indicamos, anteriormente, aunque hay datos sugestivos del papel de la histamina en el control motor y específicamente, en la fisiología de los ganglios basales, cuyos mecanismos no están adecuadamente esclarecidos. El hecho de que éstos posean una gran inervación histaminérgica es por sí solo sugerente y motivo de estudio (Onodera et al., 1994), más aún, el hecho de que los receptores  $H_3$  se localicen en las terminales estriado-nigrales indica una relación estrecha entre el sistema GABAérgico estriado-nigral y el histaminérgico central (Arias-Montaña & Serna 1996). Una primera hipótesis sugeriría que la histamina por sí misma, controla la liberación de GABA de estas terminales, y de esta manera, al igual que la dopamina, el tráfico de impulsos en la vía directa. Una segunda hipótesis surge del hecho de que se conoce que el principal regulador de la vía directa es la dopamina a través de receptores  $D_1$  localizados en las terminales estriado-nigrales, si este es el principal mecanismo regulador, entonces la acción de la histamina dependería de la activación de este sistema y no de manera directa y, además, puede ser más plausible en virtud de que las acciones de los agonistas  $H_3$  se observan sobre conductas motoras evocadas por la amfetamina. Este proyecto pretende evaluar estas dos hipótesis, conocer si la activación de los receptores  $H_3$  modula la liberación de GABA en las terminales estriado nigrales de manera directa o requiere de la participación de la dopamina y cuál es la consecuencia de esta activación.

### III. OBJETIVOS

#### *General*

Contribuir al entendimiento del papel de la histamina en las conductas motoras mediadas por los ganglios basales a través del esclarecimiento de la participación de los receptores  $H_3$  en el control de la liberación de GABA en las terminales estriado nigrales.

#### *Específicos*

Conocer si la histamina modula la liberación de GABA en las terminales estriado-nigrales.

Conocer si la acción de la histamina es directa o requiere de la activación de los receptores dopaminérgicos D1.

Determinar farmacológicamente si el receptor involucrado es del tipo  $H_3$ .

## **IV. HIPOTESIS DE TRABAJO**

La histamina actúa como un neuromodulador en el SNC, que controla la liberación de GABA en las terminales estriado nigrales de la sustancia nigra. Esta modulación requiere de la activación de los receptores dopaminérgicos del tipo D1 que se conocen y estimulan la liberación de este neurotransmisor.

## V. MATERIAL Y METODOS

### 1. Estrategia Experimental

Se estudió la liberación de GABA radioactivo en el modelo "in vitro" de rebanadas de cerebro, específicamente de sustancia nigra pars reticulata de rata, que se describe abajo. La estrategia para estudiar las acciones de la histamina fue agregar las drogas o sus agonistas antes y durante la estimulación con alto  $K^+$  que induce la liberación de la marca radioactiva. Para estudiar si la acción de la histamina requiere de la activación de receptores dopaminérgicos del tipo  $D_1$ , éstos serán activados indirectamente al bloquear la acción de los receptores  $D_2$  (autorreceptores) que controlan la liberación de la misma dopamina y que se activan durante la despolarización de la rebanadas, según el esquema mostrado a continuación y experimentalmente validado por Floran y Cols. (Floran et al., 1989).

De acuerdo con el esquema, al bloquearse la acción, de los autorreceptores por drogas específicas como el l-sulpiride se aumenta, la dopamina disponible y la liberación del GABA, estudiada por activación de los receptores  $D_1$  (ver figura 8). Para determinar el subtipo de receptor histaminérgico involucrado se agregará el agonista farmacológico específico y se tratará de bloquear el efecto con el antagonista específico, lo mismo que para la histamina. Por último, se intentará establecer la relación dosis respuesta de estos compuestos en el sistema.

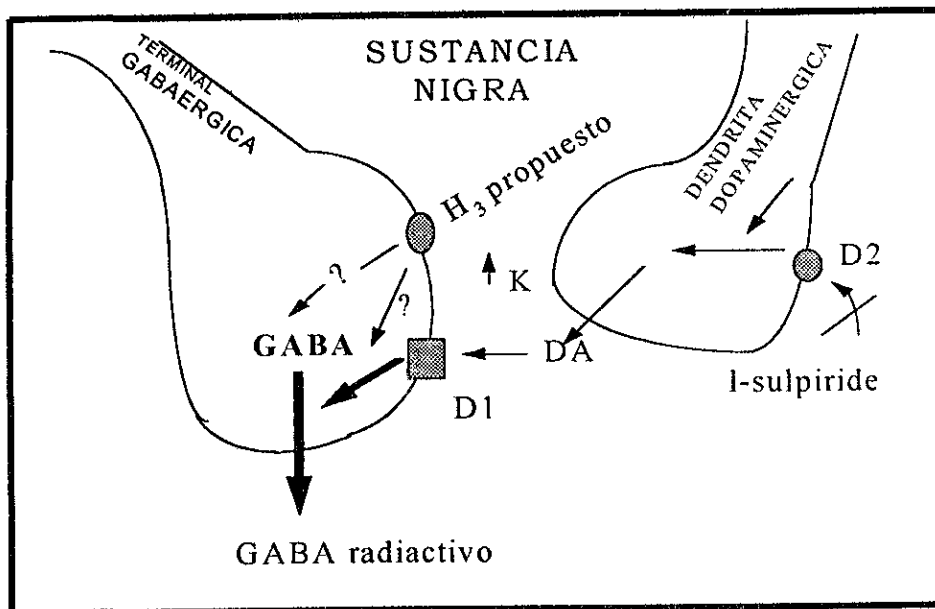
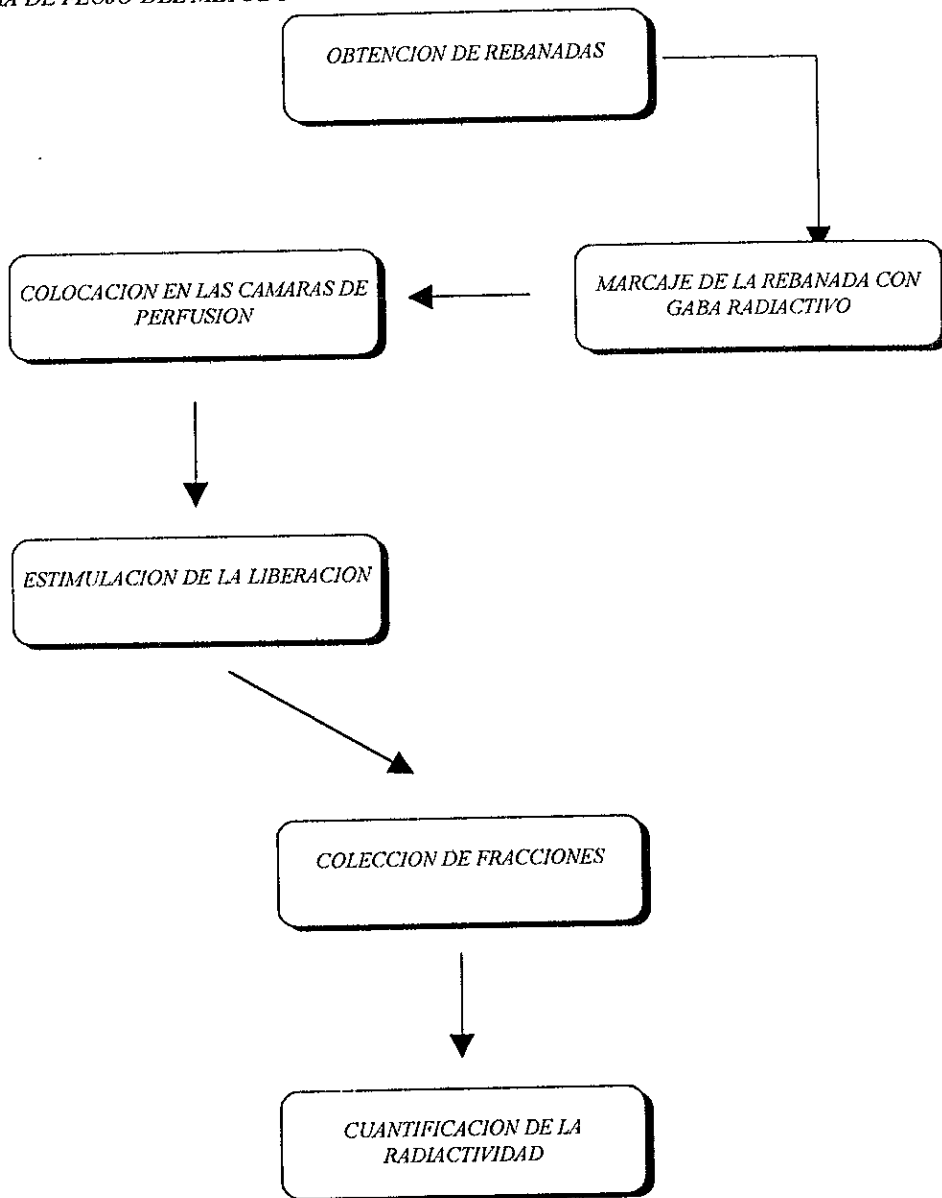


Figura 8. Representación esquemática de las probables alternativas de acción histaminérgica sobre la liberación de GABA según la hipótesis de trabajo.

## 2. Experimentos de liberación de GABA

### DIAGRAMA DE FLUJO DEL METODO





### *Obtención de rebanadas de cerebro.*

Se seleccionaron ratas macho de entre 250 y 300 gramos de peso, las cuales se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo el cerebro completo de la cavidad craneal. Este es sumergido en una solución de Krebs-Hanseleit a 4 grados centígrados. Del cerebro se cortó un bloque que incluye el núcleo a diseccionar y se fijó a un soporte metálico que se monta en un vibrátomo, donde se obtuvieron rebanadas de 300 micras de espesor.

Las rebanadas se colocaron en un portaobjetos frío y se diseccionó el núcleo bajo microscopio estereotáxico. Una vez obtenidas las muestras microdiseccionadas se colocaron en un tubo de ensayo con 2 ml de solución de Krebs a 37 grados centígrados por 30 minutos (Floran et al., 1989)

### *Incubación en la marca radioactiva.*

Pasado el período de equilibrio, la solución se reemplaza por una fresca que contiene  $2 \times 10^{-8}$  M de  $^3\text{H}$ -GABA (65 Si/mmol) y  $\beta$ -alanina [1 mM] (para bloquear la captura glial de la marca) El período de incubación duro 30 minutos, al cabo del cual las rebanadas son lavadas con solución de Krebs normal tres veces para eliminar el exceso de marca no capturado presente en el espacio extracelular. Después son transferidas a las cámaras de perfusión para el experimento (Aceves et al., 1981).

### *Procedimiento experimental.*

El sistema de perfusión consta de 20 cámaras en paralelo; las rebanadas se distribuyen al azar colocando, aproximadamente, 6-8 rebanadas. La velocidad es de 0.5 ml por minuto con Krebs normal el cual contiene  $10^{-5}$  M de ácido nípecótico para bloquear la recaptura (Krogsgaard-Larsen et al., 1975) y se mantiene por 30 minutos antes de la colección de las muestras (fracciones) del GABA tritiado superfusado. Al cabo de este período se colectan cinco muestras de cuatro minutos cada una para evaluar la liberación basal, luego las rebanadas se despolarizan elevando (a 15 mM) la concentración de  $\text{K}^+$ , la solución con alto potasio se mantiene por 24 minutos, lo que permite colectar seis fracciones más. La despolarización tiene por objeto abrir los canales de calcio y promover la entrada de los iones de calcio para inducir la liberación excitotóxica (este proceso se lleva a cabo en la sinapsis debida a la depolarización de la membrana y dando como resultado la salida del neurotransmisor) (Jahn, 1994) del neurotransmisor radioactivo.

La evaluación de la liberación puede dividirse en dos períodos: en el primero (de control), se toman cinco fracciones. Desde la fracción tres, al grupo experimental se agrega la droga para su estudio. El segundo (de prueba) dura seis fracciones en el cual se añade el potasio con el agonista o el antagonista farmacológico del receptor que se desea estudiar. Finalmente, las rebanadas se extraen de las cámaras de perfusión y se transfieren a

“viales” en donde se solubilizan con HCL 0.1 N para recuperar la marca radioactiva contenida en el tejido. Las muestras colectadas son también transferidas a viales, y a todos se les agrega líquido de centelleo para la cualificación de la radioactividad por métodos convencionales.

### 3. Evaluación de resultados

La radioactividad de cada muestra o fracción se expresa como la fracción de radioactividad liberada con respecto a la radioactividad total contenida en el tejido en el momento de colectar la fracción correspondiente. La fracción de liberación (F.R.) está pues definida por la siguiente fórmula (se haya o no expuesto a potasio), mediante el cociente..

#### RADIOACTIVIDAD PRESENTE EN UNA FRACCION

$F.R = \frac{\text{RADIOACTIVIDAD PRESENTE EN UNA FRACCION}}{\text{RADIOACTIVIDAD PRESENTE EN EL TEJIDO}}$

#### RADIOACTIVIDAD PRESENTE EN EL TEJIDO

La curva de F.R se obtendrá en cada condición experimental por evaluar. Con fines de normalizar los resultados de las fracciones de liberación de cada cámara, se toma la fracción 5 previa a la estimulación con  $K^+$  como control y se realiza el cociente de las fracciones de liberación antes y después de ésta, resultado que se muestra en las gráficas.

### 4. Soluciones y drogas empleadas.

#### i) Solución de Krebs-Hanseleit normal (mM/l)

NaCl	134.00
KCl	5.00
CaCl <sub>2</sub>	2.00
MgSO <sub>4</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25
NaHCO <sub>3</sub>	25.00
Glucosa	10.00
Ac. amino-oxiacético	0.01

La solución se prepara a partir de stock. El pH se mantiene en 7.4 mediante el burbujeo de la misma con una mezcla de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> al 5%.

ii) Solución de Krebs despolarizante (15mM de potasio). Para tal solución la concentración es el producto  $[K][Cl]$  de la misma se mantuvo constante con respecto a la solución de Krebs normal, disminuyendo de Cl<sup>-</sup>, y sustituyéndolo con S en la forma de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La osmolaridad (300 miliosmoles/litro) se mantuvo añadiendo sacarosa. La solución se prepara a partir de soluciones stock. El pH se mantiene en 7.4

mediante el burbujeo de la misma con una mezcla de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> al 5%. La composición final fue:

NaCl	55.58
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	39.21
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.87
CaCl <sub>2</sub>	2.00
MgSO <sub>4</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25
GLUCOSA	10.00
Ac. amino-oxiacético	0.01

iii) Líquido de centelleo (Por litro de solución)

Tolueno	667.0 ml
Tritón X-100	333.0 ml
* P.P.O.	40 mg
** P.O.P.O	200.0 mg

- 2,5 difeniloxazol

\*\* 1,4-bis-2-(5-feniloxazol)-benceno

iv) Drogas

[<sup>3</sup>H]-GABA 80-90 mCi/Mmol (Proveedor: Amersham Inc.)

β-alanina (Sigma Labs).

Acido Nipecótico (Sigma Labs).

Histamina (RBI Inc.)

Tioperamida (RBI Inc.)

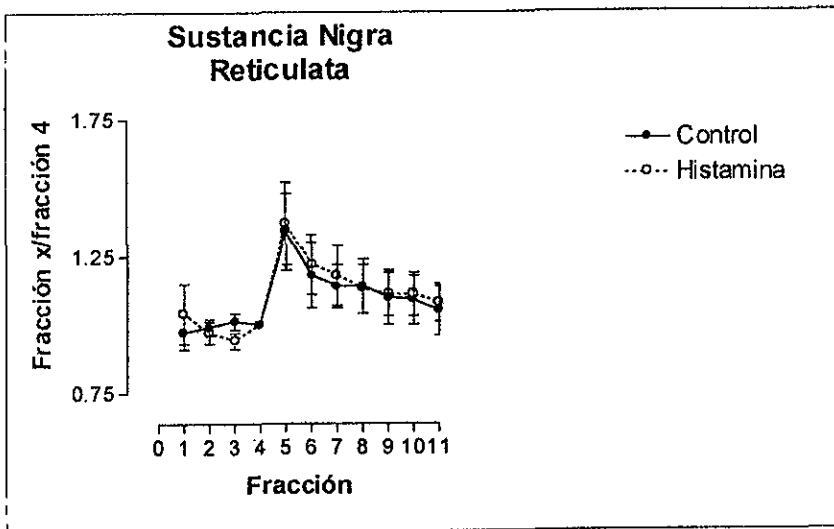
l-sulpiride (RBI Inc.)

Imepip (RBI Inc.)

## VI. RESULTADOS

1. Efecto de la histamina sobre la liberación de GABA radioactivo inducida por una alta concentración de  $K^+$  en el pars reticulada de la sustancia negra.

Como se planteó en la hipótesis, el primer tipo de experimentos está encaminado a conocer si la histamina tiene un efecto directo sobre la liberación de GABA de las terminales estriado-nigrales. Los resultados de estos estudios se presentan en la gráfica 1. En ellos se procedió a dividir las cámaras en un grupo de control y otro experimental; al experimental se adiciona 100  $\mu M$  de histamina dos fracciones antes de la estimulación con alto K. Nótese como la histamina no modifica la liberación fraccional de GABA, ni antes ni después de la estimulación, lo que indica que en esta condición la histamina por sí misma, aparentemente, es incapaz de modular la liberación de GABA.



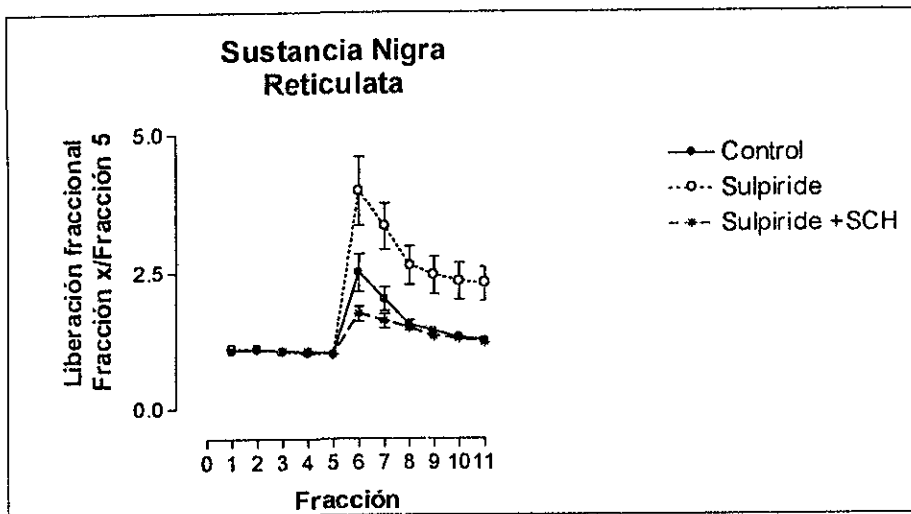
Gráfica 1

**Efecto de la histamina sobre la liberación fraccional de GABA inducida por alto  $K^+$  en la pars reticulada de la sustancia negra de la rata.**

Los experimentos se realizaron de rebanadas de sustancia nigra de ratas macho Wistar de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología. La histamina 100  $\mu M$  se adicionó dos fracciones antes de la estimulación con alto K. En el eje de la X se representa la fracción correspondiente y en el eje de las Y, se graficó el cociente de la fracción de liberación de la fracción X dividido por el valor de la fracción de liberación inmediatamente antes de la estimulación con  $K^+$  con fines de normalización de datos. Se representa el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos con seis determinaciones en cada uno ( $n=18$ ).

2. Consecuencia de la activación de receptores dopaminérgicos  $D_1$  sobre la liberación fraccional de GABA en la pars reticulada de la sustancia negra.

Dado que la histamina por sí sola no ejerce ningún efecto sobre la liberación de GABA en la sustancia negra, se procedió a probar si se requiere o no de la activación de los receptores  $D_1$ . Para ello, primeramente, procedimos a realizar experimentos de control en los que mostráramos la activación de los receptores  $D_1$  en estas condiciones experimentales, y cuya activación se conoce estimula la liberación de GABA (Floran et al, 1996). De acuerdo al esquema la activación de los receptores  $D_1$  requiere de dopamina endógena liberada al medio por las dendritas dopaminérgicas. Esta proveniente de las dendritas, a su vez, está regulada por la activación de autorreceptores del tipo  $D_2$ , esto durante la estimulación con alto  $K^+$ . En estos experimentos procedimos al bloqueo selectivo de los receptores  $D_2$  mediante la adición del l-sulpiride (un antagonista selectivo de receptores  $D_2$ ). En la gráfica 2 se muestra el efecto del Sulpiride sobre la liberación de GABA, la cual presenta un incremento durante la estimulación con alto  $K^+$ , comparado con el grupo control, al cual no se le agregó ninguna droga. El efecto del Sulpiride se bloquea completamente con la adición conjunta de 0.1  $\mu M$  de SCH 23390 (un antagonista selectivo de los receptores  $D_1$ )



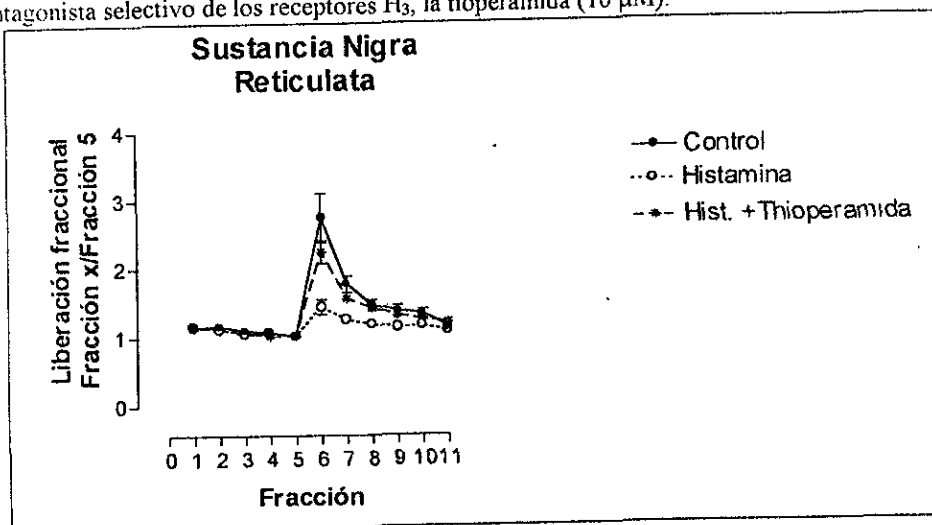
Gráfica 2

**Consecuencia de la activación de receptores  $D_1$  sobre la liberación fraccional de GABA en la pars reticulada de la sustancia negra de la rata**

Se representa el efecto del bloque selectivo de los receptores  $D_2$  con l-sulpiride 10  $\mu M$  sobre la liberación de GABA comparado con el control el cual no se agregó ninguna droga. Complementariamente la adición de un antagonista selectivo de receptores  $D_1$  SCH 23390 (0.1  $\mu M$ ) bloqueó el efecto del Sulpiride sugiriendo que el efecto del Sulpiride se debe a la activación de estos receptores. Se representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 18 determinaciones en tres experimentos cada una.

3. Efecto de la histamina sobre la liberación fraccional de GABA estimulada por la activación de receptores  $D_1$  en la pars reticulada de la sustancia negra de la rata

Una vez que contamos con un modelo experimental para ver la activación de los receptores  $D_1$ , procedimos a probar si la histamina, en esta condición modifica la liberación fraccional de GABA. De acuerdo a los datos anteriores en esta serie de experimentos activamos indirectamente los receptores  $D_1$  con l-sulpiride (ahora grupo control) y probamos el efecto de la histamina. Los resultados se muestran en la gráfica 3. Nótese cómo la histamina (100  $\mu M$ ) produce una inhibición de la liberación de GABA inducida por el alto  $K^+$  y el sulpiride, este efecto de la histamina es bloqueado por el antagonista selectivo de los receptores  $H_3$ , la tioperamida (10  $\mu M$ ).

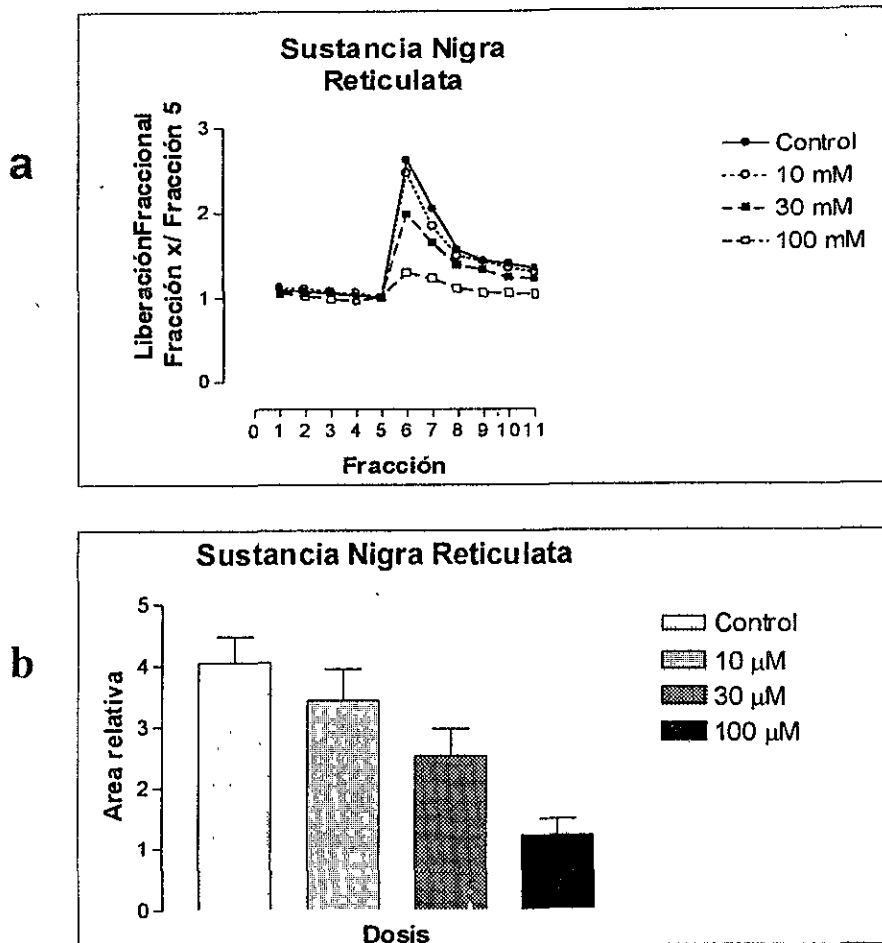


**Gráfica 3**

**Efecto de la histamina sobre la liberación fraccional de GABA inducida por alto  $K^+$  y activación de los receptores  $D_1$  dopaminérgicos**

Nótese cómo la histamina (100  $\mu M$ ) inhibe la liberación de GABA, y que su efecto es bloqueado completamente por la adición conjunta del antagonista selectivo de los receptores  $H_3$  la tioperamida. Se representa el promedio de 18 determinaciones  $\pm$  error estándar en tres experimentos.

4. Uno de los requisitos indispensables, para atribuir un efecto a una droga mediada por receptores, es que sea dependiente de la dosis. En la gráfica 4 probamos el efecto de al menos tres dosis de histamina sobre la liberación de GABA



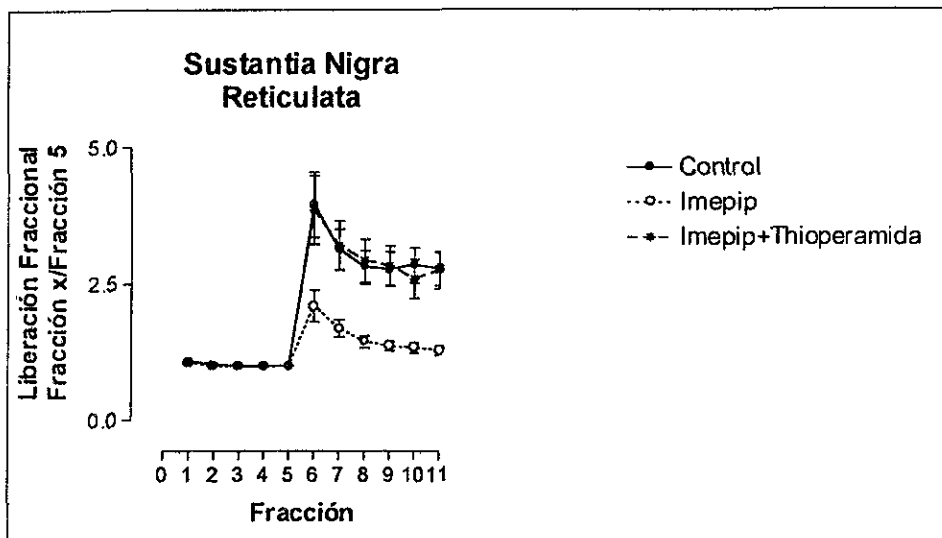
**Gráfica 4.**

**Dependencia de la dosis de la respuesta de dopamina sobre la liberación fraccional de GABA estimulada por alto  $K^+$  y activación conjunta de receptores  $D_1$ .**

En la gráfica superior A, se muestra el curso de la liberación fraccional de GABA inducida por una alta concentración de  $K$  y estimulación de receptores  $D_1$  sometida a tres diferentes concentraciones de histamina. En la porción inferior B se muestran lo mismo pero expresado como el área bajo la curva relativa de la porción superior. En la gráfica el promedio de 18 determinaciones  $\pm$  el error estándar por punto de tres experimentos

5. Efecto del Imepip sobre la liberación fraccional de GABA inducida por activación de receptores  $D_1$  y alto  $K^+$  en la pars reticulada de la sustancia negra de la rata.

El efecto de la histamina sobre la liberación de GABA está, aparentemente, mediado por la activación de receptores  $H_3$ , juzgado por la acción de la tioperamida. Sin embargo, para ahondar en este efecto decidimos probar el agonista farmacológico de este tipo de receptores. Seleccionamos al Imepip, como agonista y probamos su efecto. Los resultados se muestran en la gráfica 5. Nótese como al igual que la histamina el Imepip ( $10 \mu M$ ) inhibe la liberación de GABA inducida por  $K^+$  y activación de receptores  $D_1$ . El efecto es bloqueado completamente mediante la adición de tioperamida el antagonista selectivo



**Gráfica 5**

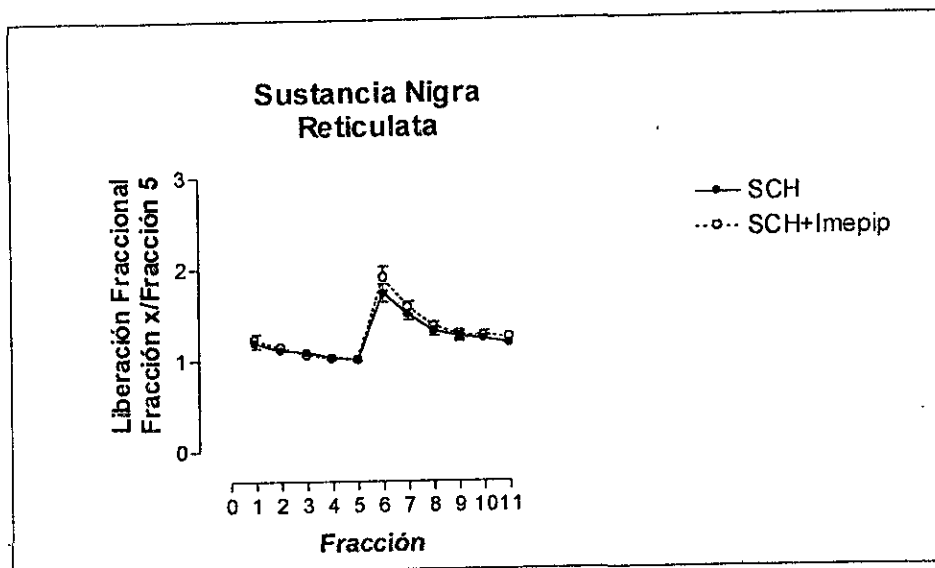
**Efecto del Imepip sobre la liberación fraccional de GABA inducida por  $K^+$  y estimulación de los receptores  $D_1$ . Antagonismo por tioperamida.**

La gráfica muestra el efecto del agonista selectivo de receptores  $H_3$  sobre la liberación fraccional de GABA inducida por  $K^+$  y activación de receptores  $D_1$ , nótese la inhibición de la liberación similar a la histamina, y su bloqueo completo por el antagonista de los receptores  $H_3$  la tioperamida. Se representa el promedio de 18 determinaciones en cada punto  $\pm$  el error estándar de tres experimentos por separado.



6 Efecto del Imepip sobre la liberación fraccional de GABA en presencia de SCH 23390.

El efecto de la activación de los receptores  $H_3$  sobre la liberación de GABA requiere de la activación de los receptores  $D_1$ . Para corroborar aún más esta afirmación, realizamos experimentos en los que bloqueamos selectivamente la activación de los receptores  $D_1$  con SCH 23390 ( $0.1 \mu M$ ) (un antagonista farmacológico selectivo de los receptores  $D_1$ ) y probamos el efecto del Imepip. Los resultados se muestran en la gráfica 5. Nótese como en esta condición la droga no es capaz de inhibir la liberación de GABA, sugiriendo que si los receptores  $D_1$  no están activos, el agonista no tiene ningún efecto.



**Gráfica 6**

**Efecto del bloqueo selectivo de los receptores  $D_1$  sobre el efecto de la activación de receptores  $H_3$  y la liberación de GABA en la pars reticulada de la sustancia negra.** Se muestra el promedio de 18 determinaciones en tres experimentos en los que a un grupo se añadió el SCH 23390 ( $0.1 \mu M$ ) antes y durante la estimulación con alto  $K^+$  y al otro, además, se agregó el agonista de receptores  $H_3$  Imepip, nótese que el efecto de la droga desaparece en esta condición.

## VII. DISCUSION

Los datos mostrados sugieren principalmente dos afirmaciones. Primeramente que la activación de los receptores del tipo  $H_3$  localizados en las terminales estriato-nigrales (Pollard et al 1993) están involucrados en el control de la liberación de GABA. Sin embargo y en segundo término, esta acción requiere de la activación de los receptores dopaminérgicos del tipo  $D_1$ .

Para el segundo caso, el hecho de que la histamina por sí misma no ejerza ningún efecto sobre la liberación de GABA, daría la apariencia de que estos receptores, a pesar de que su existencia ya ha sido demostrada, no tienen ninguna acción en el control de transmisión a ese nivel, lo cual es por sí mismo es extraño. Sin embargo, es importante mencionar que de acuerdo a los esquemas modernos de fisiología de los ganglios basales, la dopamina es el principal modulador de la transmisión GABAérgica (Gerfen and Wilson, 1996), de ahí que cualquier efecto modulador sobre ella, pareciera ser estar dado vía la activación de los receptores  $D_1$  que se sabe coexisten en esta terminal (Floran et al 1996). Antes de discutir los principales resultados de este trabajo recordaremos, que conductualmente ya se había sugerido una relación entre neuromoduladores similar, pues la disminución de la actividad locomotora de las ratas producida por la histamina, depende de estimular esta actividad por medio de la anfetamina (una droga que moviliza dopamina de sus compartimentos endógenos), es decir, aumentar el tono dopaminérgico (Clapham & Kilpatrick 1994). La transmisión GABAérgica estriato-nigral tiene por función eliminar la inhibición tónica que las neuronas de la sustancia nigra ejercen sobre la transmisión tálamo-cortical, facilitando la ejecución de los movimientos (Parent 1993). En este contexto, la dopamina, vía la activación de receptores  $D_1$  estimula la liberación de GABA lo que conlleva a reforzar la transmisión estriato-nigral y así reforzar la ejecución de los movimientos (Gerfen & Wilson 1996). De esta manera la hiperactividad locomotora de las ratas se puede producir al movilizar dopamina de sus compartimentos endógenos. Para que la histamina pudiera disminuir esta actividad locomotora debe de existir alguna manera de bloquear ya sea la liberación de dopamina endógena o bien los efectos que tiene dicha dopamina. Interesantemente, como mencionamos esta dopamina tienen por función activar los receptores  $D_1$ , por lo que es probable que la histamina tuviera su efecto sobre la activación de estos receptores

Esto último parece ser el caso, según los resultados mostrados en estos experimentos. Por un lado falta del efecto directo de la histamina y por el otro requerimiento de la activación de los receptores  $D_1$  para inhibir la liberación de GABA. Los experimentos de la fig. 2 muestran por un lado una corroboración del esquema funcional mostrado en la pag 56 para el control de la liberación de GABA por receptores  $D_1$ , una vez que se activa el receptor, la histamina en estas condiciones ahora si inhibe la liberación de GABA como se esperaba. Esta acción histaminérgica depende de la activación de los receptores  $H_3$  basados en criterios farmacológicos, probados en las figuras 3, 4 y 5 ya que el efecto de la histamina es el siguiente 1) depende de la dosis, 2) es bloqueado por el

antagonista selectivo de los receptores  $H_3$ , 3) es mimetizado por el agonista de los receptores  $H_3$  el Imepip y 4) es antagonizado por la tioperamida (antagonista selectivo). Por último para reafirmar más aún la hipótesis de la requerida activación de receptores  $D_1$ , la falta de efecto del Imepip en presencia de bloqueo de los  $D_1$  contribuye a esta hipótesis (Fig. 6). Por otro lado que los receptores sean del subtipo  $H_3$  es concordante con lo ya reportado. (Pollard et al 1996).

Naturalmente que tomándolo con las reservas, la implicación funcional y farmacológica del hallazgo de esta interacción es importante. Funcionalmente describe la interacción entre dos moduladores, en los que para ver el efecto de la activación de uno se requiere de la activación del otro, en este caso para ver efecto de la activación de los receptores  $H_3$  se requiere de la activación de los  $D_1$ , esto significa que la acción moduladora de la histamina requiere la facilitación de la dopamina, caso poco reportado en la literatura. Por demás es también importante desde el punto de vista fisiopatológico, pues en el Parkinson donde hay una pérdida de la innervación dopaminérgica a los ganglios basales y una disminución del número de receptores  $D_1$  (García et al 1996), la acción inhibitoria de la histamina por su parte ahora tendería a agudizar el efecto de la falta de dopamina. De esta segunda especulación es que resulta la importancia farmacológica del hallazgo, ya que en algún tiempo los fármacos antihistamínicos fueron usados como antiparkinsonianos conjuntamente con l-dopa. Esto cuya base teórica no es clara, puede estar explicado por nuestros resultados. Primeramente la l-dopa parece estimular la activación de receptores  $D_1$  similar a la dopamina sobre un receptor supersensibilizado en su respuesta (Floran et al 1996). La histamina por su lado al inhibir la liberación activada por receptores  $D_1$  parecería contribuir poco a la acción de la l-dopa o cualquier otro fármaco que tendiera a restablecer el adecuado flujo de impulsos, por lo que los antihistamínicos en este caso favorecerían bloqueando la acción de la histamina. Naturalmente que este tipo de especulaciones requieren de mayor estudio para establecer los roles de la transmisión histaminérgica en el Parkinson y de ahí inferir la mejor alternativa terapéutica.

En resumen, nuestros experimentos muestran el inicio de las aproximaciones del estudio de la interacción entre los sistemas histaminérgicos y dopaminérgicos que pueden ser relevantes para el adecuado entendimiento de la fisiología de los ganglios basales, así como de la fisiopatología del Parkinson y sus alternativas terapéuticas basadas en la farmacología.

## VIII. CONCLUSIONES

1. La activación de receptores dopaminérgicos del tipo  $D_1$  estimula la liberación de GABA en la sustancia nigra de la rata.
2. La histamina, parece inhibir la liberación de GABA, estimulada por los receptores  $D_1$ .
3. El tipo de receptor involucrado es del tipo  $H_3$

## IX. BIBLIOGRAFIA

Aceves, J. and Cuello C. Dopamine release by electrical stimulation of microdissected caudate-putamen and substantia nigra of the rat brain. *Neurosci.* 1981, 6, 2068-2069.

Arias Montaña, J.A, and Guerrero Serna, G. Neuromodulación: Una nueva función para la Histamina. 1996, *Revista Biomedica. Univ. Yucatan* .

Arrang, J.-M. Garbarg, M. Lancelot, J.-C. Lecomte, J.-M. Pollard, H. Robba, M. Schunack, W. And Schwartz J.-C. Highly potent and selective ligands for histamine H<sub>3</sub> receptors. 1987 *Nature*, 327,117-122.

Arrang, J.-M. Garbarg, M. And Schwartz, J.-C. Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H<sub>3</sub>-receptors 1987, *Neuroscience*,23,1 ,149-157.

Arrang, JM. Garbarg, M. And Schwartz, JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H<sub>3</sub>) of histamine receptor. 1983, *Nature* 302,28, 832-837

Bowman W. and Rand M. *Farmacologia . Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas Interamericana Mexico* , 1985

Carpenter, M. *Interconnection between the corpus striatum*. Edited by J. McKenzie R E kern plenum press 1987, 27, 1-67.

Clapham, J. And Kilpatrick G. Thioperamide, the selective histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist, attenuates stimulant-induced locomotor activity in the mouse. 1994 *European J. of Pharmacology* ,259, 107-114.

Cumming, P. Shaw, C. And Vicent, S. High affinity histamine binding site is the H<sub>3</sub> receptors Characterization and autoradiographic localization in rat brain. 1991 *Synapse*, 8, 144-151.

Chesselet, M.-F. Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain. 1984, *Nueroscience* 12,2,347-375.

Douglas, W.W. Autacoids. In Godman, and Gillman. *The pharmacological basis of therapeutics*. 6<sup>a</sup> Edition Mc Millan Publishing Co. USA, 1980, 608-646.

Dray, A *The phisiology and pharmacology of mammalian basal ganglia* . 1980 *Progress in Neurobiology*, 14, 221-335.

Floran, B., *Modulación presináptica de la liberación de ácido  $\gamma$ -amino butírico en la sustancia negra de la rata*

Garrett, A. And Crutcher, M. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. 1990 TINS, 13,7, 266-270.

Gibson, W. Roques, T. And Young, J. Modulation of antagonist binding to histamine H1-receptors by sodium ions and by 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol HCl. 1994 Br. J. Pharmacol, 111, 1262-1268.

Goth, A. Histamina. En Goth. -Farmacología Medica 11ª Edición Ediciones DOYMA 1980, 193-207.

Haaksman, E. Leurs, R. And timmerman, H. Histamine receptors: subclasses and specific ligands. 1990 Pharmac. Ther., 47, 73-104.

Hill, S. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. 1990 Pharmacological 42,1, 45-83.

Janh, R. And Südhof, T. Synaptic vesicles and exocytosis. 1994 Annu. Rev. Neurosci., 17, 219-246.

Jenner, P. What process causes nigral cell death in Parkinson's disease ? 1992 Neurologic.clinics 12, 387-403.

Juraska, J. Wilson, C. And Groves, P. The substantia nigra of the rat: a golgi study 1977 J.comp.Neur., 172, 585-600.

Kats, B. And Milide, R. Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium ringers 1969. J. Physiol. Lond 203, 689-706.

Kebabian, J. and Calne, D. Multiple receptors for dopamine 1979. Nature 277, 93-96.

Kees, R. Characterisation of the histamine H1 receptors on U373-MG cells and guinea pig cerebellum University of Cambridge, June 1994.

Krogsgaard-larsen, P. And Johnston, G. Inhibition of GABA uptake in rat brain slices by nifedipine, flunarizine and related compounds 1975 J. Neurochem. 25, 797-802

Langer, S. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. 1981 Pharmacological reviews, 32,4, 337-355.

Onodera, K. Yamatodani, A. Watanabe, Y. And Wada, H. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders 1994 Progress in Neurobiology, 42, 685-702.

Ottoson, D. Physiology of the nervous system. 1983 Ed. The Macmillan press LTD. Hong kong 29-39.

Panula, P., Airaksien, M.S., Pirvola, U., and Kotilainen, E. A Histamine – containing neuronal system in the human brain. 1990, *Neuroscience*, 34, 127-132.

Pollard, H. Moreau, J. Arrang, J-M. And Schwartz, J-C. A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. 1993 *Neuroscience*, 52,1, 169-189.

Richardson, E. And adams, R. Degenerative diseases of the nervous system In Harrison's principle of internal medicine.

Roth, F E, y Tabachnick, I. A. Histamina y Antihistaminicos, En: *Drill. Farmacologia Medica* 2ª. Edición Prensa Medica Mexicana 1980, 977-996.

Schlicker, E. Fink, K. Hinterthaler, M. And Göthert, M. Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H3 receptors. 1989 *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340, 633-638.

Siegel, G. Histamine. In Siegel G. *Basic Neurochemistry* Raven Press New York 1989, 4ª Edition 254-269.

Starke, K. Presynaptic receptors. 1981, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21, 7-30

Surmeier, D.J., Reiner, A., Levine, M.S., and Ariano, M.A. Are Neostriatal dopamine receptor co-localized? 1993. *TINS*, 16, 299-305.

Wada, H., Inagaki, N., Yamatodani, A. And Watanabe, T. Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole – brain activity?. 1991, *TINS* 14, 415-418.

Walter, M. Histamine. In *Watter applied phamacology*. American Edition, Toronto, 1976, 142-149.

Wassef, M. And Sotelo, C. Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra, and their striatal input combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. 1981 *Neurosc.* 6, 2125-2138.

Yanai, K. Ryu, J. Sakai, N. Takahashi, T. Iwata, R. Ido, T. Murakami, K. And Watanabe, T. Binding characteristics of a histamine H3-receptor antagonist, [3H]-methylthioperamide: comparison with [3H] (R)- $\alpha$ -methylhistamine binding to rat tissues. 1994 *Jpn.J.Pharmacol.* 65, 107-112.