



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

PARTICIPACION DE LOS RECEPTORES HISTAMINERGICOS H2 y H3 EN LA  
MODULACION DEL PATRÓN DE DISPARO DE LAS NEURONAS ESPINOSAS  
MEDIANAS EN EL NEOSTRIADO DE LA RATA

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

PRESENTA:  
RAUL AGUILAR VAZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. RODRIGO ERICK ESCARTIN PEREZ  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DR. JOSE FERNANDO PEÑA ORTEGA  
UNAM, CAMPUS JURQUILLA, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO, NOVIEMBRE DE 2018.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: **Biol. Raul Aguilar Vazquez**, cuyo título es: **“Participación de los receptores histaminérgicos H2 y H3 en la modulación del patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas en el neostriado de la rata”** se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. José Gerardo Rojas Piloni. \_\_\_\_\_

Secretario (Tutor)

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero. \_\_\_\_\_

Vocal

Dra. Ana Victoria Vega Salcedo. \_\_\_\_\_

Suplente

Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez. \_\_\_\_\_

Suplente

Dr. Luis Alberto Carrillo Reid. \_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico

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

El presente trabajo se realizó en el **laboratorio de Electrofisiología del proyecto de Neurociencias de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de las Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI) de la Universidad Nacional Autónoma de México**, bajo la dirección del **Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero**.

A lo largo de los estudios de Maestría se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de **CVU 743497**.

Parte del trabajo experimental fue financiado por los proyectos del Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero:

CONACYT: 167147

PAPIIT: IN212515

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Antonio Arias Montaña, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV por su asesoría y donación de algunos de los fármacos utilizados en este trabajo.

Al Lic. Daniel de Jesús Villarreal Hernández (Responsable de enlaces, videoconferencias y proyectos; Unidad de sistemas, Telecomunicaciones y cómputo de la FESI) y a la Lic. Ma. De Lourdes Lara Ayala (Responsable de la Unidad de Videoconferencias en el INB), por el apoyo en las clases y evaluaciones que se tomaron por videoconferencias entre ambas sedes.

A los doctores miembros del comité tutor por sus comentarios enriquecedores durante las evaluaciones semestrales en la Maestría.

A los doctores miembros del jurado calificador por la revisión del escrito y su enriquecimiento.

A los biólogos Gustavo Islas Rios, Ángel Robles, Héctor Vázquez, Carolina González y a Daniela González por su apoyo durante el aprendizaje de la técnica empleada en esta tesis, además del apoyo personal y por tan buen ambiente que hacían en el laboratorio.

Al Dr. Jaime A. Barral C. por su excelente asesoría, así como por la oportunidad laboral, pero sobre todo por su apoyo personal ante los problemas extracadémicos surgidos en el tiempo de los estudios de la Maestría.

Muchas Gracias a todos...

## **DEDICATORIAS**

Dedico este trabajo a las personas importantes en mi vida... aquellas que me ayudaron en menor o mayor medida a lograr esta meta.

En especial le dedico este trabajo:

A mi madre Guadalupe y a mi abuela Adelina

A mis hermanos, tías y sobrinos.

Y sobre todo a mi esposa Hilde Allende y a mi hijo Santy. Los amo.

## INDICE.

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>3</b>
1.1 LOS GANGLIOS BASALES.....	3
1.2 HISTAMINA. ....	6
1.2.1 Síntesis de la histamina .....	6
1.2.2 Metabolismo de la histamina.....	6
1.2.3 El sistema histaminérgico en el Sistema Nervioso Central. ....	8
1.3 RECEPTORES DE MEMBRANA PARA LA HISTAMINA EN EL SNC. ....	9
1.3.1 Receptor H1.....	10
1.3.2 Receptor H2.....	11
1.3.3 Receptor H3.....	11
1.3.4 Receptor H4.....	12
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>13</b>
2.1 ACTIVIDAD ELECTROFISIOLÓGICA EN LAS NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS (NEM).....	13
2.1.1 Propiedades electrofisiológicas de las NEM. ....	13
2.1.2 Principales conductancias asociadas a las propiedades electrofisiológicas en las NEM.....	15
2.2 HISTAMINA Y EL CUERPO ESTRIADO DORSAL. ....	18
2.2.1 Sistema histaminérgico en el cuerpo estriado dorsal. ....	18
2.2.2 Efectos fisiológicos de la histamina en los ganglios basales.....	21
<b>3. JUSTIFICACION.....</b>	<b>24</b>
<b>4. HIPOTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL:.....	25
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
6.1 ANIMALES EXPERIMENTALES Y OBTENCION DE REBANADAS DE CEREBRO.....	25
6.2 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.....	26
6.2.1 Protocolos de estimulación.....	27
6.3 EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS.....	28
6.4 ANALISIS DE DATOS.....	28

<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
7.1 CARACTERIZACION ELECTROFISIOLOGICA DE LAS NEM. ....	30
7.2 PRESENCIA FISIOLÓGICA DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA.....	32
7.2.1 Activación de receptores a histamina H2 (H2R).....	32
7.2.1 Activación de receptores a histamina H3. ....	39
7.3 CONDUCTANCIAS ASOCIADAS A LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA H2 y H3. ....	46
7.3.1 Canales Cav1 y la activación de los receptores a histamina H2. ....	46
7.3.2 Canales Cav1 y la activación de los receptores a histamina H3. ....	49
<b>8. DISCUSION .....</b>	<b>52</b>
8.2 CARACTERIZACION ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEM. ....	52
8.2 EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES A HISTAMINA EN LAS NEM.....	53
8.2.1 Activación de los H2R en las NEM.....	53
8.2.2 Activación de los H3R en las NEM.....	55
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>60</b>
<b>11. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>68</b>
11.1. FIGURAS.....	68
11.2. TABLAS.....	70



## RESUMEN

El cuerpo estriado dorsal (CED), en el sistema nervioso central de la rata, es el principal núcleo de entrada de información a los ganglios basales. Principalmente, está involucrado en el control del movimiento, seleccionando y reclutando información de programas motores. Las neuronas espinosas medianas (NEM) son la principal estirpe neuronal dentro del CED, son células cuyas propiedades electrofisiológicas ya han sido caracterizadas y se asociaron a diversas conductancias iónicas que ellas expresan.

El CED recibe aferentes del núcleo tuberomamilar (en el hipotálamo), donde se sintetiza la histamina. Se ha reportado que en esta región se expresan con gran densidad los receptores a histamina H2 y H3, mismos que modulan la actividad electrofisiológica y la excitabilidad de diversas estirpes neuronales, incluyendo a las NEM. Específicamente, la modulación de la actividad mediada por la activación de los receptores H2 y H3 se debe a la apertura o cierre de conductancias de  $Ca^{2+}$  y/o  $K^+$  alterando el patrón de disparo de las neuronas como las NEM.

En este trabajo, comparamos algunas propiedades electrofisiológicas de las NEM antes y después de activar a los receptores H2 y H3; mostrándose que dicha activación incrementa la frecuencia de los potenciales de acción (PA). Nuestros datos sugieren que el mecanismo de acción difiere entre cada receptor. Mientras que los receptores H2 alteran la entrada de  $Ca^{2+}$  que se asocia al postpotencial hiperpolarizante, mientras que los receptores H3 alteran el umbral de disparo, asociado a la activación de conductancias de  $Ca^{2+}$  y/o  $K^+$  que participan en el mantenimiento del potencial de membrana.

## **ABSTRACT**

The neostriatum (Nst), in the central nervous system of the rat, is the main nucleus of information input to the basal ganglia. Mainly, it is involved in the control of movement, selecting and recruiting information from motor programs. Medium spiny neurons (NEM) are the main neuronal lineage in the Nst, are cells whose electrophysiological properties have been characterized and associated with various expressed ionic conductances.

The NS receives afferents from the tuberomammillary nucleus (in the hypothalamus), where histamine is synthesized. It has been reported that in this region histamine H2 and H3 receptors are expressed with great density, which modulate the electrophysiological activity and the excitability of various neuronal strains, including NEM. Specifically, the modulation of the activity mediated by the activation of H2 and H3 receptors is due to the opening or closing of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  conductances altering the firing pattern of neurons such as NEM.

In this work, we compare some electrophysiological properties of the NEM before and after to active the H2 and H3 receptors; showing that increases the frequency of action potentials. Our data suggest that the mechanism of action differs between each receptor. While H2 receptors alter the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  that is associated with afterhyperpolarization, while H3 receptors alter the trigger threshold, associated with the activation of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  conductances that participate in the membrane potential.

## 1. INTRODUCCION.

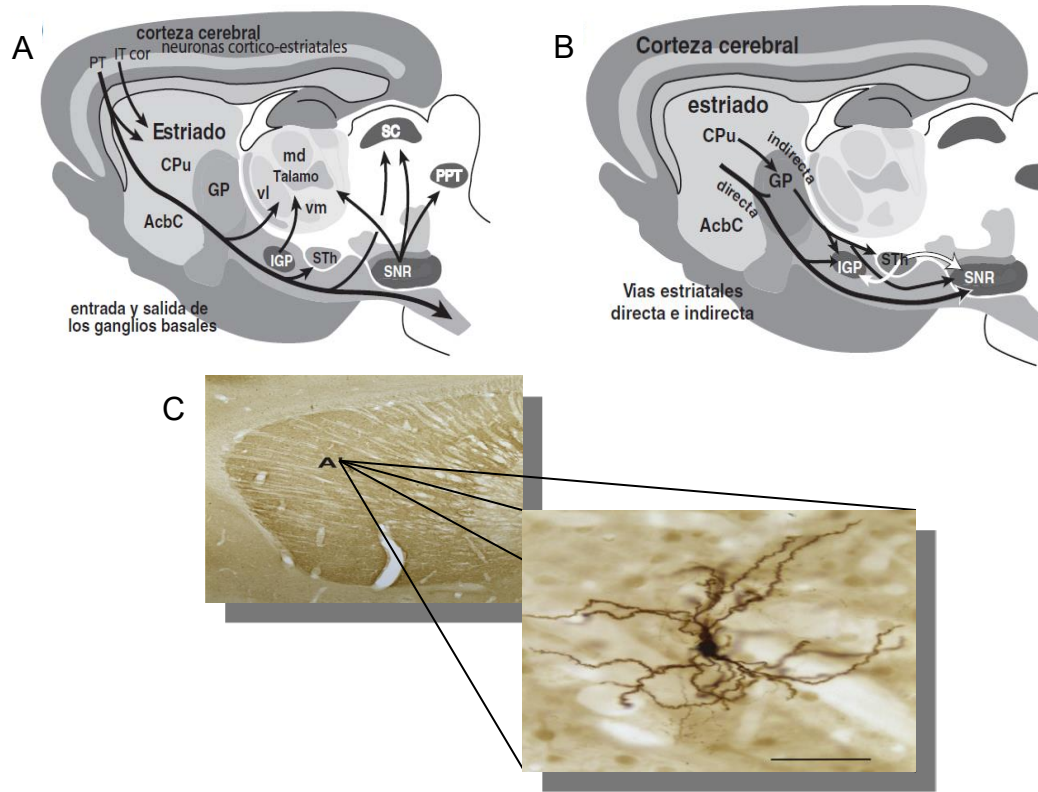
### 1.1 LOS GANGLIOS BASALES.

En el sistema nervioso central de los cordados, los ganglios basales son un conjunto de núcleos ubicados por debajo de la corteza cerebral, que se conectan sinápticamente de forma específica. Están involucrados en el control del movimiento, seleccionando y reclutando información de programas motores (Grillner, et al., 2005), así como de algunas funciones cognitivas (Graybiel, et al., 1994; Grillner, et al., 2005; Yin y Knowlton, 2006). Los ganglios basales están formados por la sustancia nigra, el área ventral tegmental y el núcleo subtalámico, además de diferentes núcleos que conforman el sistema estriato-palidal dorsal y el sistema estriato-palidal ventral (Marín, et al., 1998; Reiner, et al., 1998; Wilson, 2004). El sistema estriato-palidal dorsal incluye la región dorsal del cuerpo estriado (formado por el núcleo caudado y el putamen), además del globo pálido en su secciones interna y externa, mientras que el sistema estriato-palidal ventral es formado por la región ventral del cuerpo estriado (núcleo accumbens y parte del bulbo olfatorio), así como del globo pálido ventral (ver Figura 1; Marín, et al., 1998).

#### 1.1.2 Organización anatómica y funcional de los ganglios basales.

En el sistema nervioso de los roedores el principal núcleo de entrada de información a los ganglios basales es el neoestriado o cuerpo estriado dorsal, núcleo que recibe aferentes glutamatérgicas de la capa V de la corteza cerebral (sinapsis cortico-estriatal) y del tálamo (sinapsis tálamo-estriatal); sinapsis que ejercen un fuerte control de la conducta motora (Steiner y Tseng, 2010). En el neoestriado se encuentran diversas estirpes neuronales, entre las que destacan las neuronas espinosas medianas (NEM; Steiner y Tseng, 2010), que son de naturaleza GABAérgica y constituyen hasta el 95% de las neuronas presentes en el neoestriado y proyectan a otros núcleos en los ganglios basales. Además de las NEM en el neoestriado existen diversos tipos de interneuronas colinérgicas y/o GABAérgicas (Reiner et al., 1998; Wilson, 2004; Hammond, 2008). Las NEM en el neoestriado se dividen en dos poblaciones. Por un lado, se encuentran aquellas que

expresan a los receptores a dopamina de la familia D1 y que además proyectan al globo pálido interno (GPI) y/o a la sustancia nigra pars reticulata (SNr), formando la llamada *vía directa*. Por su parte las NEM que expresan receptores a dopamina de la familia D2 y que proyectan sus aferentes al globo pálido externo (GPe), generando la *vía indirecta* (ver Figura 1B; Reiner *et al.*, 1998; Wilson, 2004).



**Figura 1. Diagrama simplificado y modelo representativo de los ganglios basales y estructuras asociadas.**  
 A) Conexión general de los ganglios basales y su asociación con la corteza cerebral. Las neuronas piramidales de la capa V proveen la mayoría, aunque no la única conexión hacia al cuerpo estriado dorsal, que comprende los núcleos caudado-putamen (CP). Dos subtipos de neuronas corticales envían aferentes al cuerpo estriado dorsal, las neuronas interelencéfálicas (IT) y del tracto piramidal (PT). La salida de los ganglios basales surge de las neuronas GABAérgicas en el núcleo entopeduncular (EP) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr), que inhiben al tálamo, incluyendo el núcleo ventrolateral (vl), mediodorsal (md) y ventromedial (vm), así como al colículo superior (SC) y el núcleo pedunculotegmental (PPT). B) Conexiones específicas en las vías de proyección directa e indirecta del cuerpo estriado dorsal desde dos poblaciones de NEM. Las neuronas de la vía directa envían un axón principalmente al globo pálido interno (IGP) y a la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Las neuronas de la vía indirecta proyectan al globo pálido externo (GP). Estas neuronas están indirectamente conectadas a globo pálido y la sustancia nigra a través de conexiones que implican el globo pálido externo y el núcleo subtalámico (STN). C) Corte sagital del cerebro de rata, se muestra únicamente el cuerpo estriado dorsal y un acercamiento a una NEM. Modificado de Paxinos 2015.

La actividad de las NEM en la vía directa por su naturaleza inhibitoria disminuye la actividad de las neuronas del *GPi* y/o de la *SNr*, bloqueando el control GABAérgico que estos núcleos ejercen sobre el tálamo, permitiendo a este último activar a las neuronas de la corteza motora con lo que se favorece el movimiento. Por el contrario, las NEM de la vía indirecta al establecer sinapsis con las neuronas GABAérgicas del *GP<sub>e</sub>*, inhiben el disparo de las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico. Entonces las neuronas del núcleo subtalámico (Reiner, et al., 1998; revisado por Bolam y Ellender, 2015) generan *indirectamente* un aumento en la actividad de las neuronas del *GP<sub>i</sub>* y de la *SNr*, favoreciendo el control inhibitorio sobre las neuronas del tálamo y en consecuencia se disminuye el movimiento (revisado por Bolam y Ellender, 2015; Paxinos, 2015). En resumen, la vía directa facilita el movimiento, mientras que la indirecta lo inhibe, entonces, el funcionamiento de los ganglios basales ocurre al existir una actividad *balanceada* entre ambas vías (Paxinos, 2015).

Un aspecto a considerar, es que las NEM poseen actividad electrofisiológica intrínseca con la que se pueden incluso caracterizar. Dicha actividad es producto de diversas conductancias iónicas presentes en su membrana y, por si fuera poco, son susceptibles a ser moduladas por diversos compuestos o neuromoduladores (Bargas, et al., 1989; Pineda, et al., 1992; Perez-Garci, et al., 2003). La actividad de las NEM es modulada localmente por interneuronas GABAérgicas y/o colinérgicas (Kreitzer, 2009), sin embargo, el cuerpo estriado recibe aferentes de diversas regiones cerebrales que liberan en él, diversos neurotransmisores y/o neuromoduladores (como la histamina, dopamina, etc.) que activan receptores de membrana capaces de modular conductancias iónicas, alterando las propiedades electrofisiológicas de diversas neuronas (Barral et. al 2010). Específicamente, en este trabajo, presentamos aspectos de la modulación que lleva a cabo la histamina sobre las propiedades electrofisiológicas de las NEM, por lo que a continuación se describe brevemente este neurotransmisor.

## 1.2 HISTAMINA.

La histamina es una amina biogénica con peso molecular de 111 Da y su estructura molecular exhibe dos regiones, la primera formada por una amina alifática y la segunda por un anillo imidazol. Su nombre químico es [2-(4-imidazol)-etilamina] y es un compuesto sintetizado por los seres vivos a partir del aminoácido L-histidina (revisado por Bolam y Ellender, 2015). Desde su descubrimiento se involucró con diversas respuestas fisiológicas y patológicas, como, por ejemplo, la respuesta alérgica (inflamación) y del sistema inmune, la regulación de la secreción del ácido gástrico y la neurotransmisión (Jones y Kearns, 2011; revisado por Bolam y Ellender, 2015). Este compuesto se une a 4 tipos de receptores de membrana, es sintetizada en diversas células en el cuerpo, pero al no poder atravesar la barrera hematoencefálica, en el sistema nervioso central (SNC) se cuenta con un propio sistema histaminérgico, mismo que sintetiza, almacena, distribuye y libera a la histamina (Shahid, et al., 2010; Jones y Kearns, 2011).

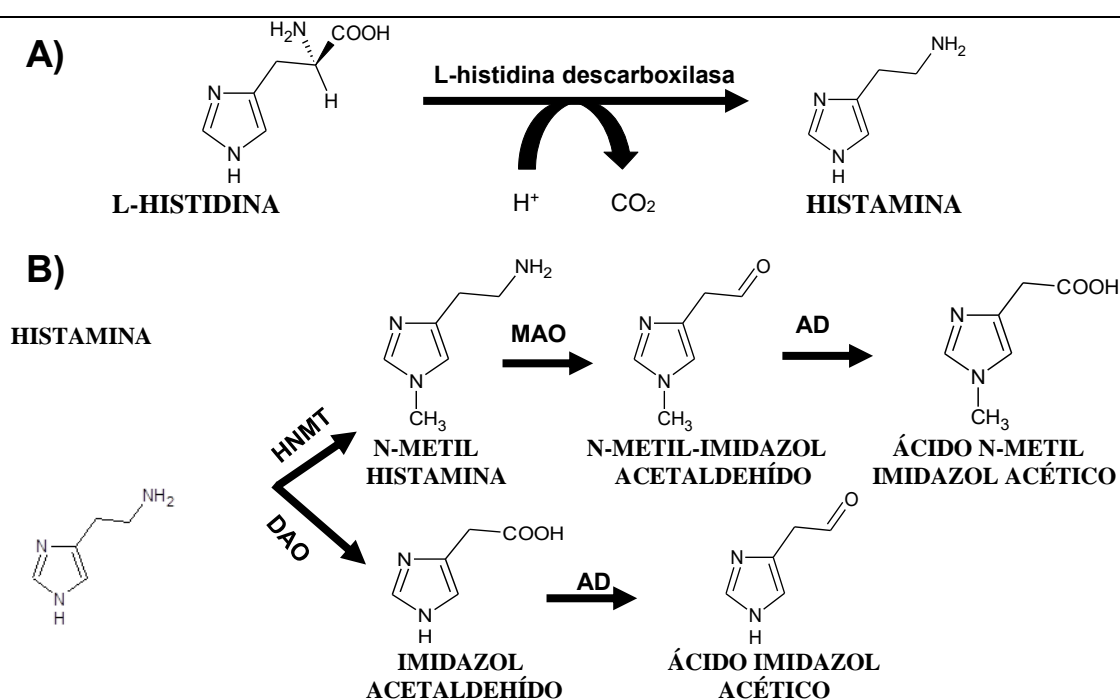
### 1.2.1 Síntesis de la histamina

La histamina es sintetizada por la enzima histidina descarboxilasa (HDC), a través de una reacción de un solo paso, en la que se extrae el grupo carboxilo del aminoácido L-histidina (Figura 2A). En el caso del SNC, la histamina es almacenada en vesículas dentro de las terminales sinápticas de las neuronas histaminérgicas y liberada por despolarización en un proceso similar a la liberación de los neurotransmisores clásicos, mientras que fuera del SNC, la histamina es sintetizada y almacenada en mastocitos y basófilos, existiendo niveles importantes en la piel y diversas mucosas del cuerpo (Ramos-Jiménez, et al., 2009).

### 1.2.2 Metabolismo de la histamina.

Existe en el SNC un sistema de desactivación de la histamina, el cual inicia con la captura del neurotransmisor en las neuronas y/o en células de la glía mediante un transportador dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Sakurai, et al., 2006; Ramos-Jiménez, et al., 2009; Yoshikawa, et al., 2013), para después ser metabolizada por

la enzima *histamina N-metiltransferasa* (HNMT) y/o la enzima *diamino oxidasa* (DAO). Por un lado, la enzima HNMT es específica, siendo la responsable de inactivar entre el 50 y el 80% de la histamina en el SNC, esto lo hace agregando un grupo metilo en el anillo imidazol de la histamina, produciendo N-metilhistamina (o tele-metilhistamina), compuesto sin actividad biológica que es metabolizado por monoácido oxidasas y aldehído deshidrogenasas en ácido n-metil-imidazol acético que finalmente será excretado en la orina (Maintz, et al., 2006; Mainz y Novak, 2007). La enzima DAO es una glicoproteína almacenada en vesículas de las células epiteliales del colon y el riñón desde donde es liberada a la circulación sanguínea donde es inactivada la histamina (pero también a otras aminas), convirtiendo a la histamina en acetaldehído imidazol que después se degrada en ácido imidazol acético que es conjugado con una ribosa fosfato para poder ser eliminado en la orina (Figura 2B; Mainz y Novak, 2007).



**Figura 2. Síntesis y degradación de la histamina.** A) Síntesis de la histamina, ocurre a partir del aminoácido L-histidina, por eliminación del grupo carboxilo mediante la enzima L-histidina descarboxilasa. B) Metabolismo de la histamina, por dos vías principales, la primera implica la metilación del grupo imidazol por la enzima Histamina N-Metil Transferasa (HNMT), que genera el compuesto sin actividad biológica N-metilhistamina y que es seguida de una serie de reacciones de oxidación y reducción por las enzimas Monoamino oxidasa (MAO) y Aldehído Deshidrogenasa (AD); la segunda vía es por desaminación oxidativa directa de su cadena lateral mediante la enzima Diamino Oxidasa (DAO) que es completa por AD, se muestran los compuestos generados en ambas vías. Ambos productos finales (el ácido n-metil-imidazol acético y el ácido imidazol acético) son excretados por vías urinarias. Modificado de Shahid, et al., 2010.

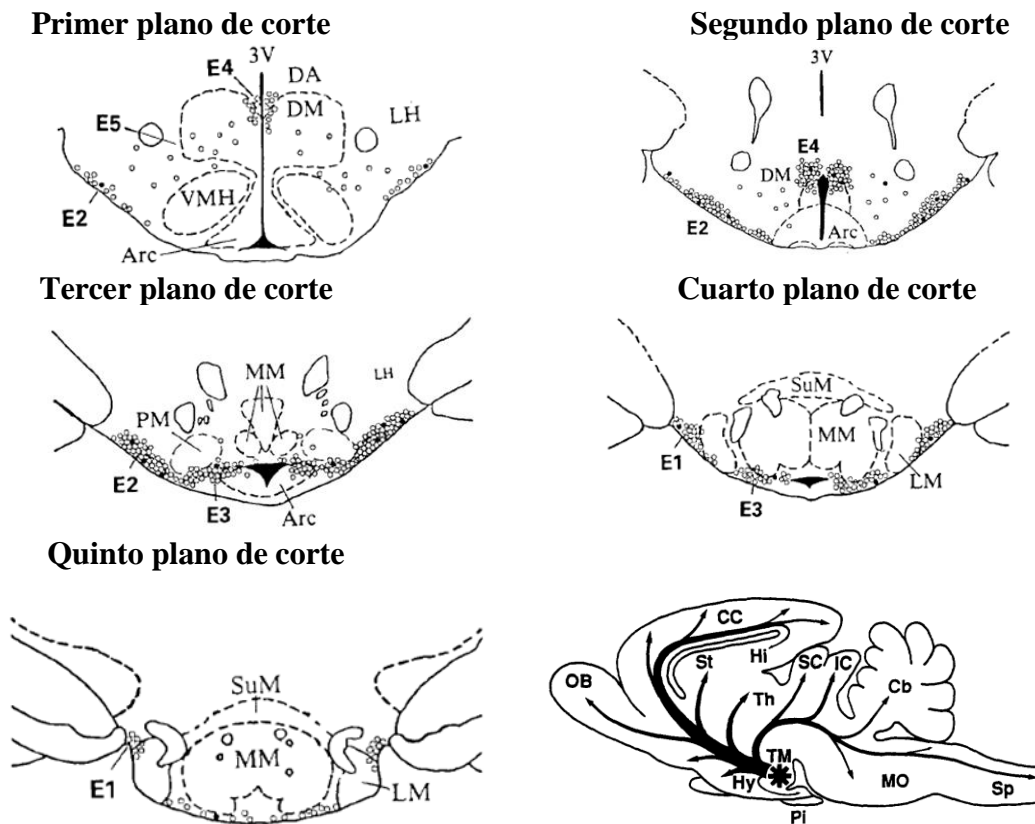
### 1.2.3 El sistema histaminérgico en el Sistema Nervioso Central.

La existencia de la histamina en el SNC fue reportada hace más de 70 años (Takagi, et al., 1985). Sin embargo, fue recientemente y con el empleo de anticuerpos específicos para la enzima HDC que se demostró la existencia de un sistema histaminérgico en el SNC (revisado por Arias-Montaño y Guerrero-Serna, 1995). Actualmente se sabe que las neuronas histaminérgicas son células que miden entre 25 y 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y además de la histamina sintetizan otras moléculas neuroactivas (o al menos las enzimas que los sintetizan) como el GABA, la adenosina, encefalinas, galanina y sustancia P (Brown, et al., 2000).

El soma de las neuronas histaminérgicas se localiza en el núcleo tuberomamilar (NTM), que se encuentra en el hipotálamo posterior (revisado por Bolam y Ellender, 2015) y se concentran en 5 grupos (Figura 3; Inagaki, et al., 1990). Además, estas neuronas reciben aferentes de la corteza prefrontal, del área preóptica media y del septum, áreas que liberan diversos neurotransmisores o neuromoduladores como el glutamato, la noradrenalina, la serotonina, la sustancia P y el neuropéptido Y (Arias-Montaño y Guerrero-Serna, 1995).

A pesar de que las neuronas histaminérgicas se dividen anatómicamente en grupos, la liberación de la histamina se orquesta como si solo fuese un grupo. Sus aferentes forman 2 grupos de fibras ascendentes presentes en el haz medial del cerebro anterior y en la superficie ventral del hipotálamo, además de un grupo de fibras que descienden por la sustancia gris central del cerebro medio y la zona dorsal del rombencéfalo, por lo que las neuronas histaminérgicas inervan de una forma heterogénea a prácticamente todo el SNC, desde el bulbo olfatorio, pasando por diversos núcleos en los ganglios basales e incluso la médula espinal (ver Figura 3; Wada, et al., 1991).





**Figura 3. Localización topográfica de los grupos de neuronas histaminérgicas (E1 a E5) e innervación de axones a través del SNC.** Representación esquemática de cinco cortes coronales consecutivos del hipotálamo posterior en la rata donde se muestra la distribución de las neuronas histaminérgicas. Abreviaturas: 3V, tercer ventrículo; Arc, núcleo hipotalámico arqueado; DA, núcleo hipotalámico dorsal; DM, núcleo hipotalámico dorsomedial; LH, núcleo hipotalámico lateral; MM, núcleo mamilar medial; PM, núcleo premamilar; SuM, núcleo supramamilar; VMH, núcleo hipotalámico ventromedial. Modificado de Inagaki et al. 1990. Además, se muestra la ubicación del núcleo tuberomamilar y de las neuronas histaminérgicas se marca en el asterisco. Abreviaturas: OB, bulbo olfatorio; MO, bulbo raquídeo; Cb, cerebelo; IC, colículo inferior; SC, colículo superior; CC, corteza cerebral; St, cuerpo estriado dorsal; Hi, hipocampo; Hy, hipotálamo; Sp, médula espinal; Th, tálamo; TM, núcleo tuberomamilar. Modificado de Wada et al. 1991.

### 1.3 RECEPTORES DE MEMBRANA PARA LA HISTAMINA EN EL SNC.

Se han descrito 4 tipos de receptores de membrana para la histamina (H1, H2, H3 y H4) y, como ocurrió con otros receptores su descripción fue paralela al desarrollo de fármacos con acción específica. Los receptores a histamina pertenecen a la super familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR por sus siglas en inglés), todos unen en su estructura a la histamina, pero su afinidad difiere entre ellos, siendo más afín la histamina por los

receptores H3 y/o H4 y menos afín por los receptores H1 y/o H2 (revisado por Panula, et al., 2015). Los GPCR son nombrados así, porque se asocian a proteínas G heterotriméricas (formadas por subunidades “ $\alpha$ ”, “ $\beta$ ” y “ $\gamma$ ”), y tienen la capacidad de hidrolizar GTP en GDP. Las proteínas G son capaces de modular la apertura o el cierre de canales iónicos y/o la actividad de enzimas que sintetizan mensajeros secundarios que permiten que la señal se propague hacia el interior de las células (Nestler et al. 2009). Otro aspecto que considerar es que los 4 receptores a histamina poseen baja homología entre sus secuencias de aminoácidos (revisado por Bolam y Ellender, 2015). Sin embargo, su estructura proteica se constituye por un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular, el resto de la cadena generan siete segmentos transmembranales, unidos mediante asas intra y extracelulares, conociéndose también como receptores a histamina de siete dominios transmembranales (Nestler et al. 2009).

### 1.3.1 Receptor H1.

El receptor a histamina H1 (H1R) fue identificado al estudiar el efecto de la histamina sobre la respuesta alérgica en el cuerpo. Se observó que se expresa en células del músculo liso, en las vías aéreas y en vasos sanguíneos, además de hepatocitos, condrocitos, células endoteliales, neutrófilos, monocitos, linfocitos B y T, además está demostrada su expresión en el SNC (revisado por Panula, et al., 2015). Asimismo, el H1R es una glicoproteína de 56 KDa (Ramos-Jiménez, et al., 2009; Shahid, et al., 2010) cuya activación en el SNC se asocia principalmente al control del ciclo sueño-vigilia (Ramos-Jiménez, et al., 2009; Thakkar, 2011). El H1R se acopla a una proteína  $G_{q/11}$  (ver Figura 4) desencadenando la acción de enzimas del grupo de fosfolipasa C (PLC) involucrada en la síntesis de los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Por un lado, el IP3 detona una rápida liberación de  $Ca^{2+}$  de depósitos intracelulares (el aparato de Golgi y/o el retículo endoplásmico) y el DAG activa a la proteína quinasa C (PKC), enzima que fosforila los aminoácidos serina y treonina en diversos receptores, enzimas, canales iónicos o proteínas que generan diversas respuestas celulares (Nestler, et al., 2009; Ramos-Jiménez, et al., 2009; Shahid, et al., 2010; revisado por Panula, et al., 2015).

### 1.3.2 Receptor H2.

El receptor a histamina H2 (H2R) es una glicoproteína de 359 aminoácidos con un peso de 40 kDa (Shahid, et al., 2010). Al igual que el primer receptor descrito, el H2R se expresa en una gran diversidad de células y tejidos, como la mucosa gástrica, el músculo liso, en el SNC, en adipocitos y en algunas células del sistema inmune (revisado por Panula, et al., 2015). Este H2R se asocia a funciones como la regulación de la secreción del ácido gástrico (revisado por Panula, et al., 2015), además su activación disminuye la proliferación celular de carcinomas y/o presenta una función reguladora del sistema inmune, inhibiendo la quimiotaxis de neutrófilos y basófilos (Del Valle y Gantz, 1997). Los H2R se acoplan a proteínas  $G_s$  y su activación estimula la formación de AMPc a través de la enzima adenilil-ciclasa de varios tejidos, como el cerebro, corazón, pulmón y la mucosa gástrica (Leurs, et al., 1995; revisado por Panula, et al., 2015). El AMPc activa a la enzima proteína cinasa A (PKA) que a su vez fosforila residuos de serina y treonina de diversas proteínas, como las proteínas de unión a CRE (CREB), proteínas nucleares que se unen a promotores de genes, activando su transcripción (Ramos-Jiménez, et al., 2009). Además, se ha reportado que la activación del H2R en sistemas de expresión heteróloga disminuye la liberación de ácido araquidónico e incluso son capaces de unirse a proteínas  $G_{q/11}$  (Leurs, et al., 1995; Ramos-Jiménez, et al., 2009; revisado por Panula, et al., 2015).

### 1.3.3 Receptor H3.

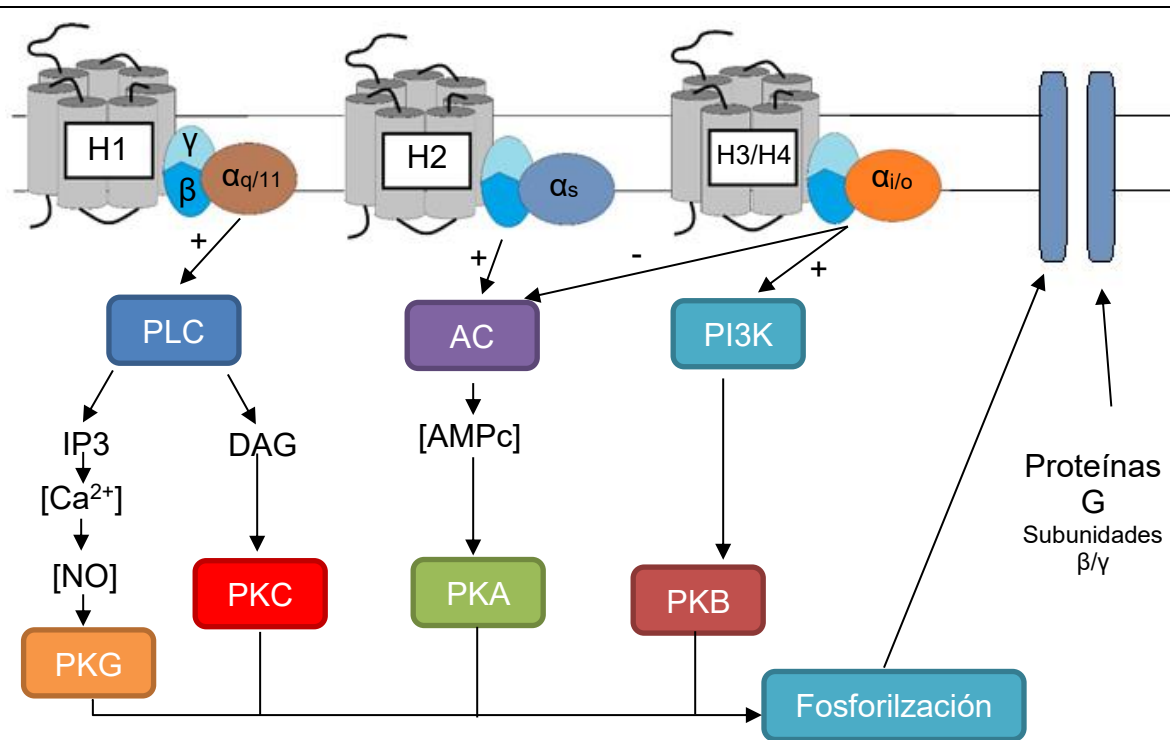
El receptor a histamina H3 (H3R) posee un peso de 49 kDa, tiene cerca de 445 aminoácidos y el gen codificante se encuentra en el cromosoma 20 en el ser humano. A diferencia de los anteriores, el H3R se ha reportado que en ratones y en el ser humano existen 3 isoformas originadas por el corte alternativo de su ARNm (Ramos-Jiménez, et al., 2009). Los H3R se expresan principalmente en células del sistema nervioso, donde inhibe principalmente la liberación de la histamina y de otros neurotransmisores como la dopamina, la serotonina, la noradrenalina y la acetilcolina (Arrang, et al., 1983; Arias-Montaña, et al., 2001).

Mediante ensayos de unión de radioligando, se han identificado sitios de unión al H3R en otras células y tejidos periféricos, aunque son cuantitativamente menos abundantes que los sitios de unión a los H1R y H2R (Lázár-Molnár, 2004). La actividad de los H3R se ha implicado en el control de procesos cognitivos y memoria (Esbenshade, et al., 2008), así como en funciones cerebrales como la regulación del ciclo sueño-vigilia (Lin, et al., 2011) y la ingesta de alimento (Passani y Blandina, 2011; Tiligada, et al., 2009). Además, el H3R se acopla a una proteína  $G_{i/o}$  (ver Figura 4), que disminuye la producción de AMPc en las células; inhibiendo eventos celulares corriente abajo, como la transcripción de genes activada por proteínas CREB. Los H3R, además generan la acumulación de  $Ca^{2+}$  en el interior celular y la activación de la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK; Leurs, et al., 1995; Ramos-Jiménez, et al., 2009).

#### 1.3.4 Receptor H4

Se ha reportado la expresión del receptor a histamina H4 (H4R) en células de la médula ósea, en basófilos, eosinófilos, monocitos y células T (Zampeli y Tiligada, 2009). Al igual que el H3R, el H4R está acoplado a una proteína  $G_{i/o}$ , por lo que actúa principalmente inhibiendo la actividad de la enzima adenililciclase (Lázár-Molnár, 2004; ver figura 4). El H4R fue descrito a partir de un análisis de la secuencia codificante del H3R, por lo que está tanto estructural como farmacológicamente relacionado con dicho receptor (37 a 43 % de homología).

El H4R Es una proteína de 390 aminoácidos y su peso molecular es de 44 kDa, el gen codificante para el H4R se encuentra en el cromosoma 18 en el ser humano (Igaz y Hegyesi, 2004). Hasta el momento el H4R se ha relacionado en fenómenos de inflamación como el asma, el prurito y algunos tipos de alergias, sugiriendo que el H4R desempeña funciones en el sistema inmune (Cowden, et al., 2010; Zhang, et al., 2007).



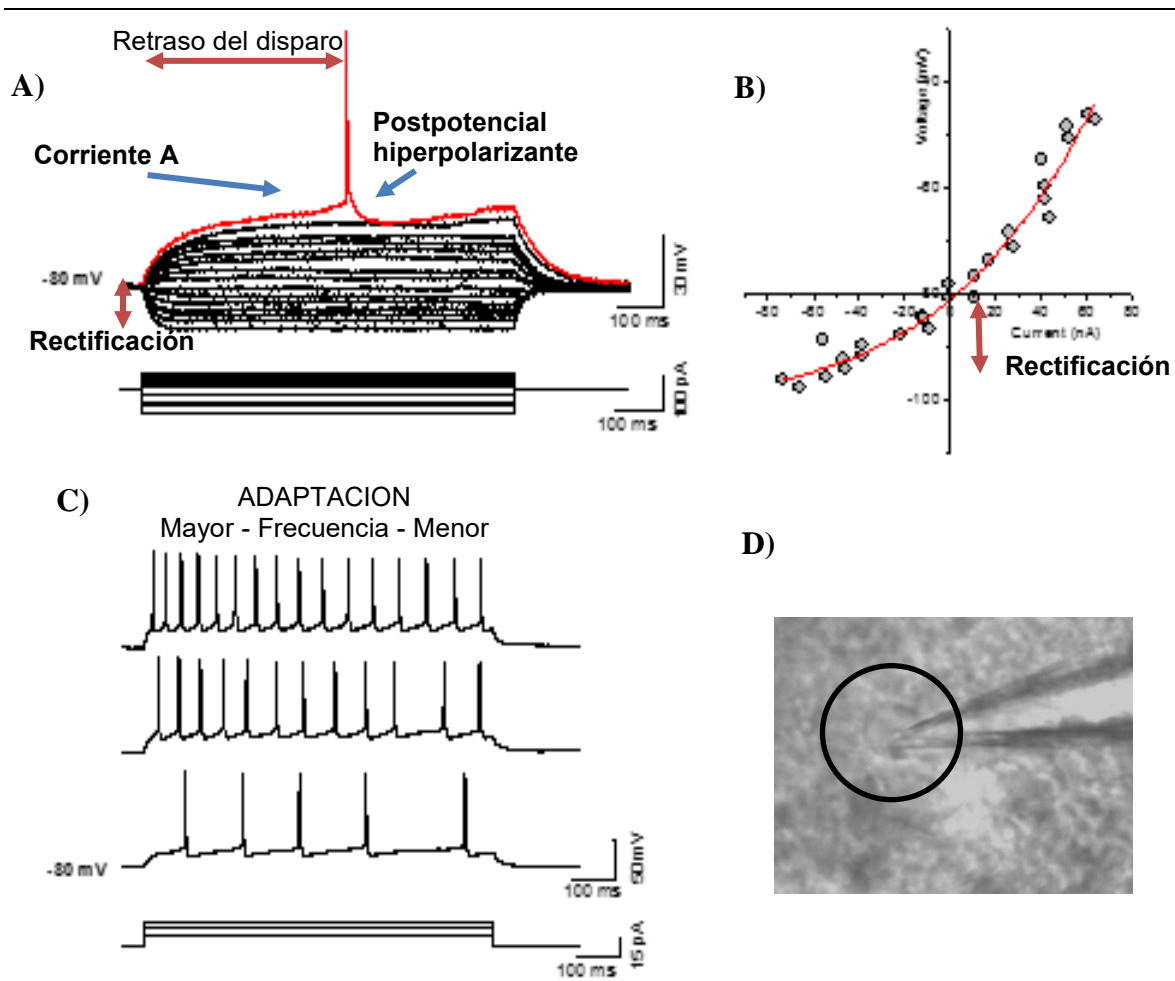
**Figura 4. Receptores para histamina y principales vías de transducción asociadas.** Diagrama representativo de los distintos tipos de receptores para histamina conocidos, todos son receptores acoplados a proteínas G, por lo que se indica la principal vía de señalización asociada a su activación. Los receptores H3 y H4 debido a que se acoplan a proteínas Gi/o se esquematizan juntos. Los signos representan activación (+) o inactivación (-) de la vía señalada. Abreviaturas: PLC, fosfolipasa C; IP3, inositol 3-fosfato; DAG, diacilglicerol; NO, óxido nítrico; AC, adeniliclasa; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinasa, PK fosfocinasa (A, B, C y/o G). Modificado de Panula, et al., 2015.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 ACTIVIDAD ELECTROFISIOLÓGICA EN LAS NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS (NEM).

#### 2.1.1 Propiedades electrofisiológicas de las NEM.

Las NEM tienen un potencial de membrana en reposo hiperpolarizado y una baja resistencia de entrada, así como varios tipos de conductancias iónicas que dan forma a un patrón de disparo característico (Kreitzer, 2009). En condiciones *in vitro* si a las NEM se les aplica pulsos de corriente tanto hiperpolarizantes como despolarizantes se puede obtener la relación entre la corriente aplicada y el voltaje obtenido (Curva I/V). En las NEM la curva I/V se describe como una relación que no es lineal, rectificando hacia potenciales hiperpolarizados (Figura 5).



**Figura 5. Propiedades electrofisiológicas de las NEM.** A) Registro representativo de una NEM (arriba) producto de la aplicación de pulsos de corrientes hiperpolarizantes y despolarizantes (abajo). B) Curva I/V. C) Trenes de disparo de la NEM a tres distintas amplitudes de corriente (abajo), D) Fotomicrofotografía de la célula analizada. Se señalan las propiedades del disparo de una NEM: Corriente A, postpotencial hiperpolarizante, rectificación y la adaptación. (Modificado de Gonzalez, 2016).

Por otro lado, cuando a las NEM se le aplica corriente suficiente para alcanzar el umbral del primer potencial de acción (PA), se observa que este aparece con un retraso de al menos 500 ms después de iniciar el estímulo. Los PA en las NEM son de al menos 50 mV de amplitud y tienen poca duración (~2 ms) y al final del PA presentan una caída por debajo de su umbral seguida de una recuperación en el voltaje denominado postpotencial hiperpolarizante (PPH; Kreitzer, 2009). Al aplicar corriente positiva superior al umbral del disparo hay un aumento de la frecuencia con la que aparecen los PA en las NEM que es proporcional al incremento en la

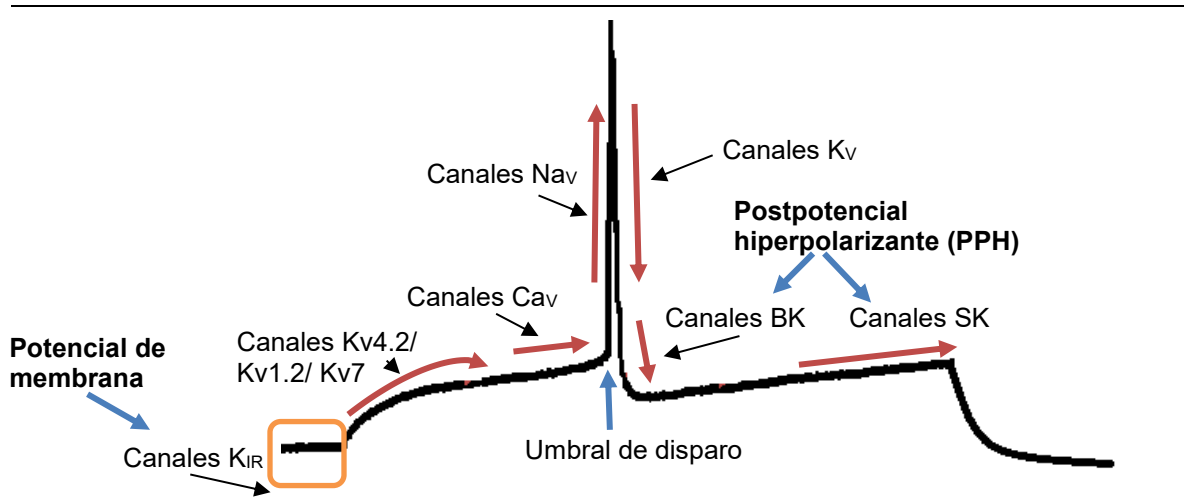
estimulación aplicada. Además, las NEM poseen adaptación lenta, ya que al registrarse trenes de disparo de PA se observa una mayor frecuencia al inicio que al final de un estímulo. En condiciones *in vivo* las NEM presentan una frecuencia de disparo baja, sin embargo, son capaces de disparar trenes de potenciales de acción con una duración de entre 1 y 2 segundos. Además, se observa que el potencial de membrana de las NEM puede oscilar entre dos estados, uno hiperpolarizado (down state) y otro despolarizado (up state), dicha oscilación puede ocurrir como respuesta a las aferencias excitatorias que reciben (Hammond, 2008; Wilson, 2004).

### 2.1.2 Principales conductancias asociadas a las propiedades electrofisiológicas en las NEM.

Las propiedades electrofisiológicas de las NEM son producto de diversas conductancias iónicas que expresan en su membrana. Durante el potencial de reposo las NEM poseen principalmente activos canales de  $K^+$  rectificadores entrantes (Canales Kir) que contribuyen al mantenimiento del potencial de reposo y a su baja resistencia de entrada (Mermelstein, et al., 1998; Nisenbaum, et al., 1996; Uchimira, et al., 1989). Cuando se aplican pulsos de corriente positivos, la despolarización de la membrana inactiva a los canales Kir y activa diversas corrientes de potasio que generan la llamada corriente de  $K^+$  tipo A (principalmente por canales rápidos  $Kv4.2$ ), así como canales de inactivación lenta  $Kv1.2$  y canales persistentes del tipo  $Kv7$  (Shen, et al., 2004; Tkatch, et al., 2000; Nisenbaum, et al., 1996). La activación de estas conductancias de potasio induce una resistencia a la despolarización que genera cierta inclinación en los registros, con lo que se origina el retraso en la aparición del primer potencial de acción (Kita, et al., 1985). A pesar de observarse dicha resistencia al cambio en el potencial de membrana, si la despolarización alcanza el umbral se activan corrientes entrantes de sodio (canales  $Nav$ ) que detonan el disparo del primer potencial de acción (revisado de Kreitzer, 2009; Nisenbaum, et al., 1994, 1995, 1996; Bargas, et al., 1989).

La repolarización de la membrana ocurre por la participación de diversas conductancias de potasio (revisado de Kreitzer, 2009; Nisenbaum, et al., 1994, 1995, 1996; Bargas, et al., 1989). Durante el postpotencial hiperpolarizante (PPH)

se observan dos componentes, el postpotencial hiperpolarizante rápido y el lento, y es generado por canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ). Por un lado, el PPH rápido es originado por canales del tipo BK (canales con cinética de activación e inactivación relativamente rápida) y se asocia a la repolarización del potencial de membrana después de la aparición de un potencial de acción, además posee una duración entre 1 y 10 ms. El PPH lento es generado por canales SK (canales con cinética de activación e inactivación relativamente lenta) al que se les han atribuido la función de limitar la frecuencia de disparo y la adaptación mencionadas previamente (Pineda, et al., 1992; Faber y Sah, 2003). Un resumen de las conductancias que participan en las propiedades electrofisiológicas de las NEM se esquematiza en la Figura 6.

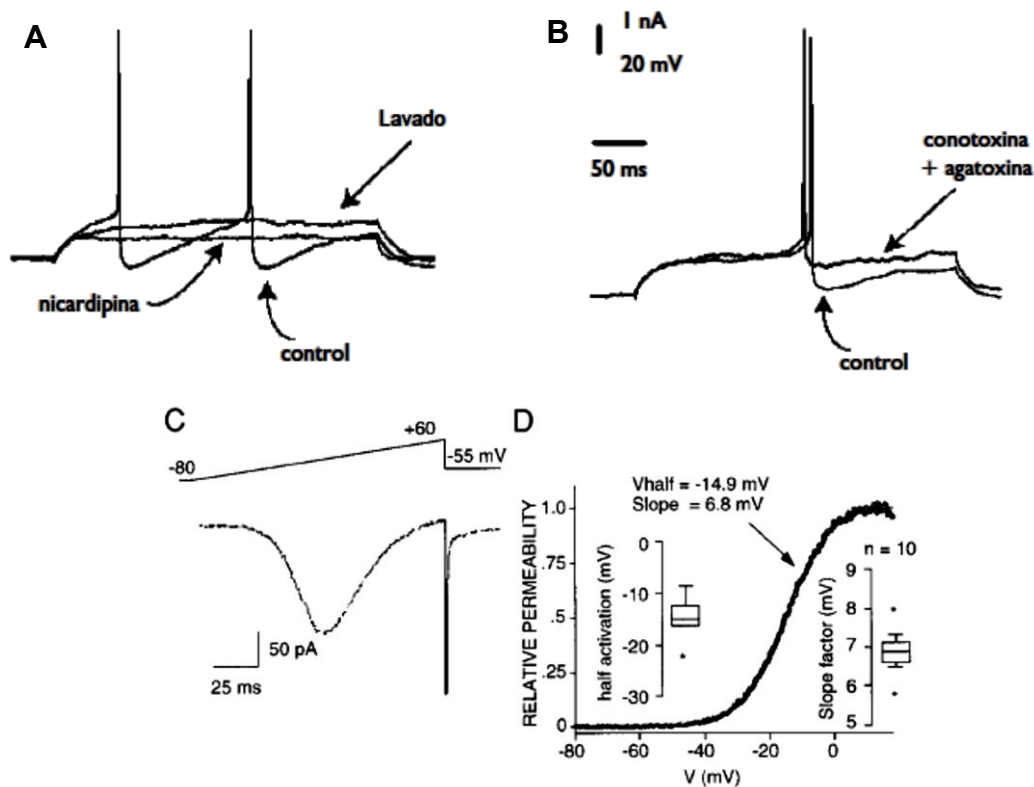


**Figura 6.** Conductancias asociadas a las propiedades electrofisiológicas de las NEM. Se muestra el acercamiento de un potencial de acción de una NEM (línea negra gruesa), al que se le asocian algunos de los canales iónicos que las producen (flechas rojas y caja anaranjada).

De los canales de  $Ca^{2+}$  operados por voltaje ( $Ca_v$ ), las NEM expresan únicamente a los canales  $Ca_v$  conocidos como de alto umbral (HVA o canales  $Ca_v1$ ,  $Ca_v2.1$ ,  $Ca_v2.2$  y  $Ca_v2.3$ ). En estas neuronas se ha descartado la expresión de canales  $Ca_v$  de bajo umbral (LVA), tipo T o  $Ca_v3$  (Foehring et al., 2000; Perez-Garci, et al., 2003; Hernández-López, et al., 1997). Particularmente, se ha observado que el bloqueo específico de los canales  $Ca_v1$  genera en las NEM la disminución de la frecuencia de disparos de PA, siendo un efecto atribuido a que dichos canales  $Ca_v1$



contribuyen en mantener el potencial de membrana en el que se montan los trenes de disparo de los PA (ver Figura 7A; Perez-Garci, et al., 2003; Hernández-López, et al., 1997). Asimismo, fue reportado que el bloqueo de los canales Cav2.1 y Cav2.2 aumenta la frecuencia de los disparos de los PA en las NEM (ver Figura 7B; Perez-Garci, et al., 2003) y su participación recae en que el Ca<sup>2+</sup> que es introducido en las NEM a través de ellos es utilizado por los canales K<sub>Ca</sub> involucrados en generar el PPH, limitando indirectamente la frecuencia de disparo de las NEM (Perez-Garci, et al., 2003; Bargas, et al., 1999). Las NEM además expresan canales Cav2.3 siendo los únicos canales Cav que se activan a potenciales subumbrales al PA y al parecer no ha sido evaluado cabalmente su participación en las propiedades de disparo de las NEM (ver Figura 7C y 7D; Foehring et al., 2000).



**Figura 7. Presencia de los Canales Cav en las NEMs.** A) Registros representativos de una NEM, se muestra el registro control, el registro después del bloqueo de canales Cav1 (nifedipina) y el registro después de un lavado. Se observa que la nifedipina hiperpolariza la respuesta del voltaje. B) Registros representativos de una NEM, en la que se muestra el registro control y el registro después del bloqueo de canales Cav2 (trazo conotoxina y agatoxina), se observa la participación de los canales Cav2 sobre la amplitud del postpotencial hiperpolarizante. C) Experimento para obtener la dependencia al voltaje de activación de los canales Cav2.3 (al bloquear canales Cav1, Cav2.1 y Cav2.2) en una NEM. D) Permeabilidad relativa vs voltaje aplicado, obsérvese que ~ -50 mV empieza a registrarse permeabilidad en los canales (A y B modificados de Perez-Garci, et al., 2003; C y D modificados de Foehring et al., 2000).

## 2.2 HISTAMINA Y EL CUERPO ESTRIADO DORSAL.

Hace más de 40 años, se reportó una de las primeras evidencias que sugirieron que la histamina puede controlar conductas motoras involucrando a los ganglios basales. En ese trabajo, los autores aplicaron por microdiálisis histamina en el ventrículo lateral del cerebro de ratas y observaron que la histamina disminuye o genera la pérdida del movimiento (Nowak et al., 1977). Posteriormente, se observó una disminución del movimiento similar, pero que es seguida por un aumento en la locomoción al aplicar histamina directamente en el cuerpo estriado (Bristow y Bennett, 1988). Desde entonces se ha desarrollado conocimiento que permite demostrar la participación del sistema histaminérgico en el cuerpo estriado dorsal, que a continuación se describe brevemente.

### 2.2.1 Sistema histaminérgico en el cuerpo estriado dorsal.

Mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas, se demostró que la enzima HDC y la histamina están presentes en neuronas en el NTM, desde las cuales proyectan aferentes a la mayoría de las regiones del encéfalo. Además, se observó una gran cantidad de aferentes histaminérgicas que se encuentran en el cuerpo estriado dorsal y la corteza cerebral (Takagi et al., 1985). Previo a conocer la ubicación de los receptores a histamina y para confirmar el papel fisiológico de la histamina, con técnicas de microdiálisis, se confirmó que existe liberación de histamina en el cuerpo estriado dorsal (Adachi, et al., 1992). En consistencia con lo anterior, se observó que la histamina es liberada desde varicosidades de los axones del NTM de manera difusa y que el efecto depende del tipo de receptor que es activado (Schwartz, et al., 1991). Con el desarrollo de ligandos radiactivos de gran afinidad, se estudió la distribución de los receptores a histamina en el SNC. Asimismo, el desarrollo de técnicas como la hibridación *in situ*, permitió además del mapeo de la expresión de las proteínas de los receptores, también marcar la expresión del ARNm que codifica a las proteínas, particularmente, de los H2R y H3R en el cerebro de roedores como la rata y el cobayo (Pillot *et al.*, 2002; Vizquete *et al.*, 1997). En la rata, se ha reportado una alta densidad de H1R en regiones del sistema neuroendocrino como el núcleo periventricular, supraquiasmático y

ventromedial en el hipotálamo, diversos núcleos colinérgicos y aminérgicos en el tallo cerebral, el tálamo y la corteza cerebral, una menor densidad se observa en el tálamo y los colículos superior e inferior, aunque en el cuerpo estriado dorsal se reportó poca o nula la expresión del H1R (Wada, et al., 1991; Palacios, et al., 1981; revisado por Panula, et al., 2015).

En el caso de los H2R se encuentran prácticamente en todo el SNC, aunque la cantidad expresada es bastante heterogénea, existiendo regiones como la corteza cerebral, el cuerpo estriado dorsal y ventral que concentran gran cantidad de este receptor, mientras que en menor cantidad se observa en los colículos superior e inferior, el tálamo y el hipotálamo (Vizueté, et al., 1997). Algo similar fue reportado para el H3R, que se concentran en regiones como la corteza cerebral, el cuerpo estriado dorsal, la sustancia nigra, el bulbo olfatorio, el hipocampo, el tálamo y en el propio NTM (Pillot et al., 2002). Actualmente se sabe que los H1R, H2R y H3R están presentes en todas las regiones cerebrales, sin embargo, existen diferencias en la concentración y su ubicación, variando según la especie reportada. Además, fue planteada la idea que los H1R y H2R son receptores postsinápticos, mientras que los H3R al inhibir la síntesis y liberación de histamina se ubican en las terminales sinápticas funcionando también como autorreceptor (Arias-Montaña y Guerrero-Serna, 1995; Wada, et al., 1991). Otra observación que demuestra la participación del sistema histaminérgico en el cuerpo estriado dorsal es que, esta es una región que recibe una alta densidad de fibras histaminérgicas provenientes del NTM (ver tabla 1; Wada, et al., 1991).

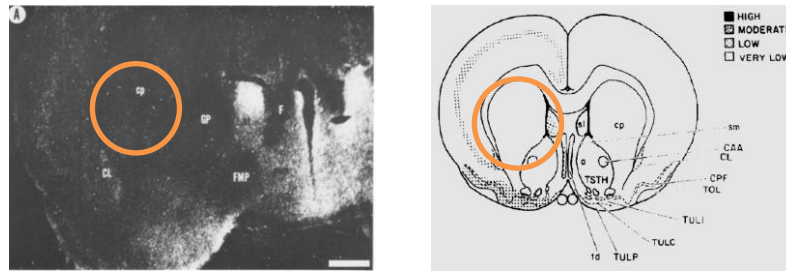
**Tabla 1. Expresión relativa de los receptores a histamina H1, H2, H3 y fibras provenientes del NTM presentes en algunos núcleos de los ganglios basales.**

	Fibras histaminérgicas	Receptores a histamina		
		H1	H2	H3
Ganglios Basales:				
<b>C. estriado dorsal</b>	<b>++ a +++</b>	<b>0 a +</b>	<b>++ a +++</b>	<b>++ a +++</b>
Globo pálido	++	0 a +	ND	++ a +++
N. accumbens	ND	0 a +	++ a +++	+++
Sustancia nigra	0 a +	0 a +	+	++ a +++
N. subtálamico	ND	ND	ND	+ a ++

ND, no determinado; 0 no detectado; + densidad baja; ++ media; +++ alta. Tomado de Arias-Montaña y Guerrero-Serna, 1995.

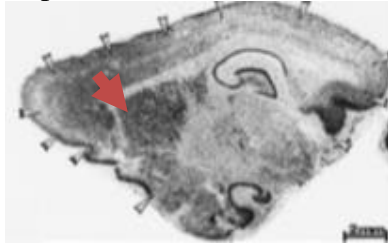
---

**A. Expresión de las proteínas de los receptores H1 (Palacios *et al.* 1981).**

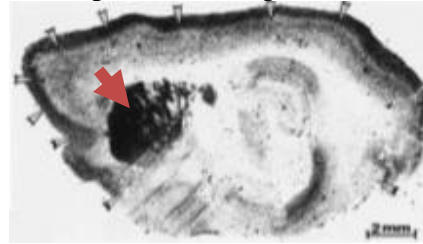


**B. Expresión del ARNm y proteínas de los receptores H2 (Vizuete *et al.* 1997)**

Expresión del ARNm de H2



Expresión de la proteína H2

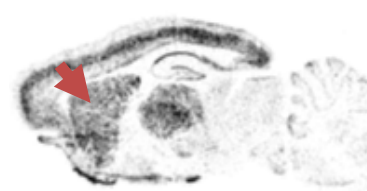


**C. Expresión del ARNm y proteínas de los receptores H3 (Pillot *et al.* 2002)**

Expresión del ARNm de H3



Expresión de la proteína H3



---

**Figura 8. Expresión de receptores a histamina en el cuerpo estriado dorsal.** A. Izquierda: fotografía representativa de la expresión de los receptores H1 en el cuerpo estriado dorsal de rata (aprox. en círculo). Derecha: Atlas de cerebro de rata, el autor marca en diferentes tonos la expresión del receptor H1, nótese que se menciona que en caudado-putamen (cuerpo estriado dorsal) es muy leve a nula la expresión. B. Expresión del ARNm (izquierda) y proteína (derecha) del receptor H2 en el cuerpo estriado dorsal (flecha). C. Expresión del ARNm (izquierda) y proteína (derecha) del receptor H3 en el cuerpo estriado dorsal (flecha). Nota: Por la naturaleza del marcaje y la forma de obtención de las imágenes, en A. a mayor oscuridad de la imagen, menor expresión de la proteína, mientras que, en B. y C. a mayor oscuridad de la imagen mayor expresión del ARNm y/o de la proteína.

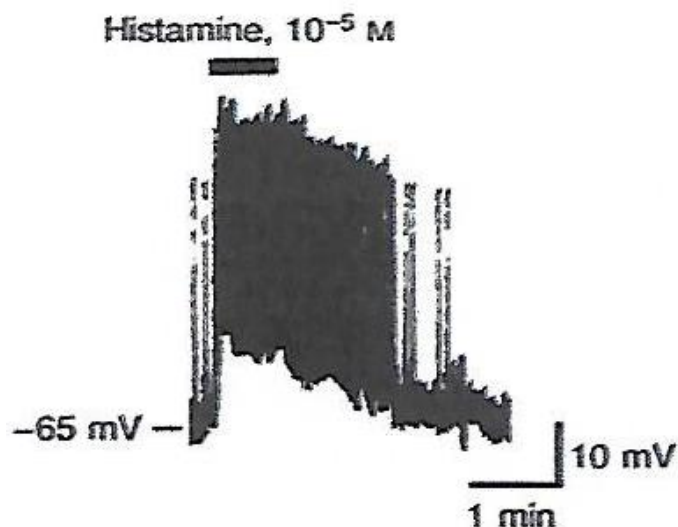
---

La alta densidad del H3R (Figura 8), permite suponer que estos receptores no se ubican únicamente sobre las terminales axónicas histaminérgicas del NTM, debido a que se sabe que el H3R actúa también como heteroreceptor inhibiendo la liberación de otros neurotransmisores en rebanadas que contienen el cuerpo estriado dorsal, aunque con estos hallazgos no se puede descartar su presencia en el soma de las NEM (Doreulee, *et al.*, 2001; González-Sepúlveda, *et al.*, 2013). Dado que el cuerpo estriado dorsal recibe densa inervación del NTM (revisado por

Bolam y Ellender, 2015) se piensa que los efectos fisiológicos atribuidos a la histamina en esta región del encéfalo son generados principalmente por los H2R y/o H3R (Pillot et al., 2002; Schwartz, et al., 1991; Wada, et al., 1991; Palacios, et al., 1981), aunque no se descartada la presencia del H1R (Munaka y Akaibe, 1994).

### 2.2.2 Efectos fisiológicos de la histamina en los ganglios basales.

La administración local de la histamina modifica la actividad de distintas regiones en el cerebro, por ejemplo, al aplicarla directamente en el cuerpo estriado dorsal se induce catalepsia, que es un trastorno nervioso caracterizado por la pérdida momentánea de la movilidad y de la sensibilidad en el cuerpo, efecto suprimido por la administración de antagonistas para receptores a histamina (Munaka y Akaibe, 1994). A nivel neuronal, se demostró que la histamina ejerce distintos efectos, que van desde modular la liberación de diversos neurotransmisores en las terminales sinápticas, modificar la actividad eléctrica intrínseca de las neuronas, alterando el patrón y la frecuencia en el disparo de potenciales de acción entre otros, e incluso es capaz de generar cambios en rutas metabólicas de las células (revisado por Bolam y Ellender, 2015). Asimismo, en los GB, la histamina inhibe la transmisión sináptica regulando negativamente la liberación de GABA en las NEM, esto se observó en preparaciones que solo contenían las terminales estriato-nigrales (Garcia, et al., 1997), o en preparaciones que incluyeron el cuerpo estriado dorsal completo (Arias-Montaña et al., 2001). Además, la histamina reduce la liberación de glutamato en sinaptosomas obtenidos aislando el cuerpo estriado dorsal (Molina-Hernández, et al., 2001) y también reduce la respuesta de campo glutamatérgico provocado en rebanadas en las que se estimuló la sinapsis cortico-estriatal mediante la activación de los H3R (Sergeeva, et al., 2005; Doreulee et al., 2001). Por último, existe evidencia que sugiere que la histamina actúa modulando la actividad de estirpes neuronales ubicadas en el cuerpo estriado dorsal, específicamente cambiando el potencial de membrana (despolarizándolo) en interneuronas colinérgicas (Figura 9), efecto originado por la disminución de conductancias de potasio generado al activar específicamente por H1R (Munakata y Akaike, 1994).

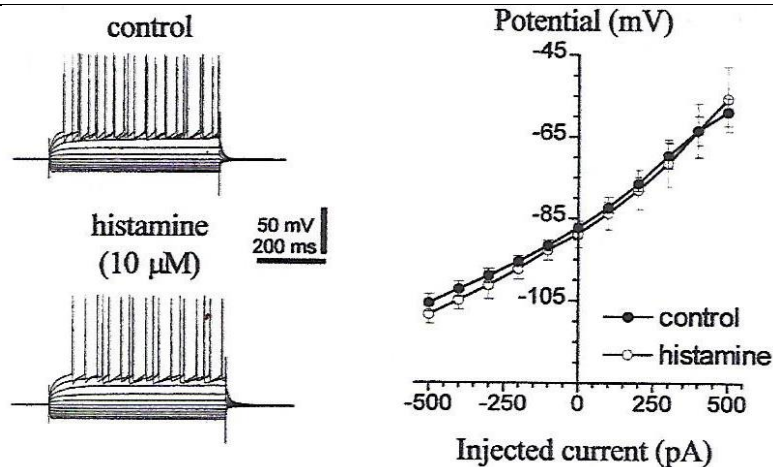


---

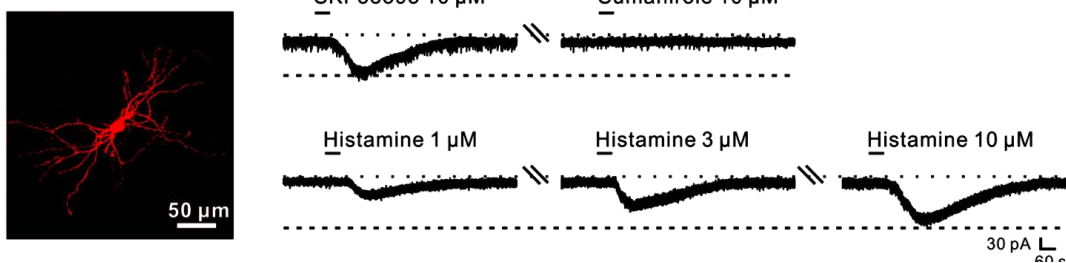
*Figura 9. Respuesta electrofisiológica inducida por la histamina en neuronas colinérgicas del cuerpo estriado dorsal (CED). Respuesta inducida en una interneurona colinérgica del CED a la administración de histamina (100  $\mu$ M). Se observa registro de voltaje, al aplicar histamina se genera una despolarización capaz de inducir disparo repetitivo en la célula representativa (Tomado de Munaka y Akaibe, 1994).*

---

Al aplicar histamina y registrar la actividad de las NEM, fue reportado que esta no genera cambios significativos sobre el potencial de membrana y/o la resistencia de entrada en las células registradas (ver Figura 10A; Doreulee et al., 2001), por lo que en ese trabajo no se evaluó su participación en el disparo. A su vez, se observó que la administración local de histamina en el cuerpo estriado altera la frecuencia de los disparos de PA (incrementando o disminuyendo) de neuronas ubicadas en el cuerpo estriado dorsal en el cerebro de ratas anestesiadas, por lo que este efecto no puede atribuirse exclusivamente a la actividad de las NEM presentes en este núcleo (Sitting y Davidowa, 2001). Recientemente empleando técnicas electrofisiológicas fue reportado que la histamina induce una corriente entrante dependiente de la concentración utilizada, y fue un efecto atribuido a la acción de los H1R y/o H2R en NEM caracterizadas tanto de la vía directa como de la indirecta (ver Figura 10B; Zhuang, et al., 2018).



**D1-expressing MSN**



**Figura 10. Acción de la histamina en las NEM del cuerpo estriado dorsal.** Registro intracelular de una NEM, en el que el autor indica que no existe una diferencia significativa del potencial de membrana (curva I/V; Tomado de Doreulee et al. 2001). B) Respuesta inducida por la administración de histamina (1, 3 y 10  $\mu\text{M}$ ) en condiciones de "patch clamp" sobre una NEM tipo D1 (identificada farmacológicamente con la aplicación de SKF38393 10  $\mu\text{M}$ ). Se observa registro de corriente entrante al aplicar histamina (Tomado de Zhuang et al. 2018; se reporta un efecto similar en las NEM tipo D2 por lo que se descartan los trazos).

El cuerpo estriado dorsal recibe aferencias histaminérgicas que se origina en el NTM y aunque la mayoría de estudios sobre modulación histaminérgica en el estriado se encamina a entender su papel sobre la modulación presináptica de la liberación de diversos neurotransmisores (por H3R), no hay descripciones claras de la participación de los receptores a histamina sobre la actividad directa de las NEM. Previamente, se describieron las principales conductancias iónicas que participan en la actividad intrínseca de estas células (como el patrón de disparo, rectificación, etc), siendo estas, posibles blancos de la activación de los receptores a histamina expresados en las NEM. Debido a lo anterior, nos cuestionamos si la activación de los H2R y H3R podrían modular el patrón de disparo de las NEM en el cuerpo estriado dorsal.

### **3. JUSTIFICACION.**

Como ya se mencionó los GB expresan altas densidades de los H2R y los H3R, sin embargo, su función específica no ha sido plenamente dilucidada (Brown, et al., 2000). Dada la importancia de los GB en la sintomatología de diversas patologías (revisado de Bolam y Ellender, 2015; Aquino-Miranda, 2012) el estudio de la función de los receptores H2R y los H3R en las NEM, es relevante debido a que permitirá entender el papel neuromodulador de la histamina en la actividad de este circuito neuronal.

El funcionamiento del cuerpo estriado dorsal y en general de los GB se ha conocido en gran parte a la observación de diversas enfermedades o trastornos neurológicos, dado que alteran la función global del circuito que controla el movimiento voluntario. Más aún, actualmente el sistema histaminérgico ha sido involucrado en procesos fisiológicos y patológicos en enfermedades que atañen a los GB. Por ejemplo, en pacientes con enfermedad de Parkinson la liberación de histamina en el putamen, la sustancia nigra y el globo pálido aumenta significativamente, además se ha reportado que existe una mayor expresión de H3R en el globo pálido (revisado por Bolam y Ellender, 2015 y por Panula, et al., 2015). Sin embargo, en pacientes con la enfermedad de Huntington el nivel de expresión del ARNm de la enzima HDC incrementa mientras que los niveles de ARNm de los H2R y H3R disminuye (revisado por Bolam y Ellender, 2015 y por Panula, et al., 2015).

### **4. HIPOTESIS.**

Dado que los H2R y los H3R están presentes en las NEM, entonces su activación podría modular conductancias intrínsecas que modificarán las propiedades de disparo nativas a una NEM.



## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL:**

Describir los efectos de la activación de los receptores a histamina H2 (H2R) y H3 (H3R) sobre las propiedades de disparo de neuronas espinosas medianas (NEM) en el cerebro de la rata (*Rattus norvegicus* variedad Wistar).

### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.**

- a) Demostrar electrofisiológicamente la expresión de los receptores a histamina H2 y H3 en el soma de las NEM.
- b) Determinar si la activación de los receptores a histamina H2 en las NEM afectan las propiedades de disparo de estas neuronas.
- c) Analizar si la activación de los receptores a histamina H3 en las NEM modifican las propiedades de disparo de estas neuronas.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1 ANIMALES EXPERIMENTALES Y OBTENCION DE REBANADAS DE CEREBRO.**

Se utilizaron ratas machos (*R. norvegicus*), cepa Wistar de entre 14 y 16 días producidas en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI). Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la FESI de acuerdo con la Guía para el uso de animales en investigación de neurociencias de la *Society for Neuroscience* y la declaración de Helsinki. Los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina/xilazina (40-90/5-10 mg/Kg) y se infundió vía intracardíaca solución salina de perfusión (en mM: 2.49 KCl, 28 NaHCO<sub>3</sub>, 1.43 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 glucosa, 233 sacarosa, 0.1 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub> y 3.6 piruvato sódico), con la finalidad de limpiar el tejido de restos de sangre, evitando

su degradación y para mejorar la observación en el microscopio. Posteriormente los animales fueron decapitados y se les extrajo el cerebro completo, separándose ambos hemisferios cerebrales, los cuales se colocaron en un vibratomo (EasiSlicer, Ted Pella, Inc., Redding, California, USA). Se hicieron cortes sagitales del tejido de 200 a 250  $\mu\text{m}$ , durante todo el proceso, el tejido se mantuvo en solución salina Krebs a 4°C (en mM: 125 NaCl, 3 KCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 25  $\text{NaHCO}_3$ , 0.2 ácido ascórbico, 0.2 tiourea, 11 glucosa a pH de 7.4) con oxigenación constante (con carbógeno: Mezcla  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  de 95% y 5%).

## 6.2 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.

Se usó la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (“patch clamp”) en la configuración de célula completa (“whole cell”). Se colocó una rebanada de cerebro en el sistema de registro, haciéndole circular solución Krebs a temperatura ambiente a un flujo de  $\sim 1$  mL/min, con oxigenación constante. Los electrodos de registro se hicieron a partir de capilares de vidrio (World Precisión Instruments, Inc), asimismo se estiraron y forjaron a una resistencia de entre 3 y 5  $\text{M}\Omega$  (estirador de pipetas Modelo P87, Sutter Instrument Co., Novato CA, USA y microforja MF-830 Narishige, Amityville NY, USA) y se llenaron con solución interna (en mM: 115  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 NaCl, 1.1 EGTA, 10 HEPES, 1  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 2 ATP-Mg, 0.3 GTP-Na a un pH de 7.3 y  $290 \pm 5$  mOsm/L).

Las neuronas fueron visualizadas usando microscopía de interferencia diferencial (Nikon Instruments, Melville, NY), eligiéndose células viables ubicadas dentro del cuerpo estriado dorsal, a cada neurona se les acercó la punta de un electrodo hasta tocar su membrana y se generó un sello con una resistencia de al menos  $10^9 \Omega$  (1 gigasello). La formación del sello fue favorecida por la aplicación de presión negativa. El potencial de membrana fue llevado y mantenido a  $-80$  mV, y se aplicó una segunda succión a través del electrodo con la finalidad de romper la membrana dentro de dicho electrodo, estableciendo un continuo entre el interior de la neurona y el interior del electrodo, característica de la configuración de célula completa (Hamill *et al.*, 1981). Durante todo el proceso de registro y almacenamiento

de los datos en una CPU, se usó el software FSIENN creado por el Dr. Jesús Pérez Ortega (obtenido por cortesía del Dr José Bargas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM), software creado en ambiente LabView™ (National Instruments, Austin, TX, USA). Además, se usó un amplificador BVC-700A (DAGAN, Minneapolis, USA), y los datos fueron filtrados y digitalizados mediante la tarjeta PCI-6221 (National Instruments, Austin, TX, USA).

#### 6.2.1 Protocolos de estimulación.

A toda neurona ubicada dentro del cuerpo estriado dorsal se le aplicaron los protocolos de estimulación. La caracterización de las propiedades electrofisiológicas de las NEM inicialmente se realizó de forma cualitativa (durante su adquisición) mediante la observación en los registros de un evidente retraso en la aparición del primer PA, además se observó la presencia del PPH y con el apoyo del software de adquisición se revisó la relación entre la corriente inyectada y el potencial obtenido permitiéndonos observar si la neurona rectifica el potencial. El análisis cuantitativo (ver ANALISIS DE DATOS) de los registros electrofisiológicos se hizo posterior a la adquisición de los experimentos.

El primer protocolo que se aplicó a las neuronas fue llamado *Curvas corriente-voltaje* (o curva I/V), que consistió en enviar (desde la CPU) una serie de pulsos cuadrados de corriente tanto despolarizantes como hiperpolarizantes de 800 ms de duración. Asimismo, posteriormente se aplicó un protocolo denominado *Curvas corriente-frecuencia* (o curva I/F) que consistió en enviar únicamente pulsos cuadrados despolarizantes sub y supraumbrales de 800 ms de duración para registrar disparos de potenciales de acción en las células, en todos los experimentos el potencial de mantenimiento de estos protocolos fue de -80 mV. A un total de 6 células que fueron caracterizadas como NEM (3 para evaluar a los H2R y 3 para los H3R) se les aplicó un protocolo de corriente en rampa (Figueroa, et al., 2002). Este protocolo consistió en mantener a un potencial de -80 mV a las NEM y a una tasa no mayor de 0.1 mV/ms se llevó el potencial a -100 mV para después llevar el potencial a un voltaje cercano al umbral (entre -45 mV y -40 mV).

### 6.3 EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS.

Después de grabar un registro control aplicando los protocolos descritos previamente se disolvió el o los fármacos en la solución salina Krebs (ver Tabla 2). Se hizo un monitoreo cada 5 minutos aplicando nuevamente los protocolos de estimulación.

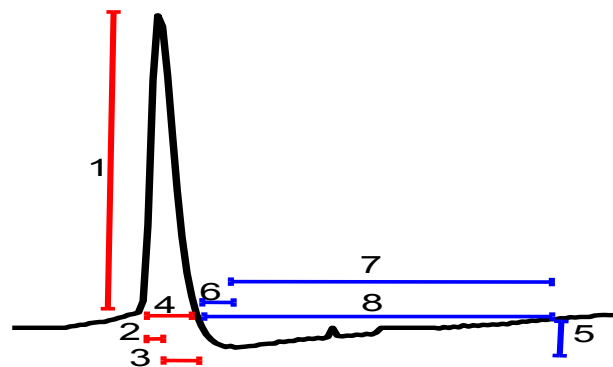
**Tabla 2. Fármacos utilizados.**

<b>FARMACOS</b>	<b>CONCENTRACION DE USO</b>	<b>CARACTERISTICA</b>
Dimaprit	10 $\mu$ M	Agonista de H2R
Immepip	1 $\mu$ M	Agonista de H3R
Cadmio	25 $\mu$ M	Bloqueador inespecífico de canales $Cav$
Nifedipina	10 $\mu$ M	Bloqueador específico de canales $Cav1$

### 6.4 ANALISIS DE DATOS.

Debido a que el análisis de los registros electrofisiológicos es un proceso posterior al grabado de estos, a toda neurona ubicada anatómicamente en el cuerpo estriado dorsal se le aplicaron los protocolos de estimulación previamente descritos. Sin embargo, los registros fueron considerados de una NEM solo si presentaban (1) el retraso en la aparición del primer potencial de acción y la presencia del PPH; (2) la rectificación a potenciales hiperpolarizados y (3) el proceso de adaptación, por lo que aquellos registros de neuronas que no cumplieron con las características descritas se descartaron para el presente reporte. Para evaluar el retraso en el disparo se cuantificó el tiempo de aparición del primer potencial de acción. Asimismo, se midió la duración y/o amplitud tanto del PA como del PPH de las NEM (de acuerdo a la Figura 11). Por otro lado, la evaluación del proceso de rectificación se hizo con los registros obtenidos al aplicar los protocolos de curvas I/V e inyección de corriente en rampa, con estos se construyeron gráficas de la corriente aplicada vs voltaje obtenido (I/V), cuyos puntos se ajustaron a una curva exponencial. En dichas curvas I/V la rectificación se observa como la disminución en la pendiente a potenciales por debajo de -80 mV.

Además, el proceso de adaptación de la frecuencia de disparo de PA se evaluó electrofisiológicamente a partir de los registros obtenidos al aplicar el protocolo de curvas I/F, en los cuales se graficó tanto la frecuencia inicial (tiempo de aparición de los potenciales de acción por unidad de tiempo) de los primeros 4 PA de cada registro como la frecuencia final obtenida de los últimos 4 PA. La adaptación se reporta como la disminución de la frecuencia inicial al compararla contra la frecuencia final. Después de la caracterización cuantitativa de las NEM se compararon los datos obtenidos de los registros control y los diversos registros experimentales, reportándose sólo las diferencias entre ambos registros. Además, debido a que las conductancias intrínsecas de las NEM alteran la frecuencia de aparición (generando la adaptación a la frecuencia de disparo) cambiando las dimensiones (amplitud y/o la duración) tanto del PA como del PPH, solo se comparó la frecuencia inicial y las dimensiones del primer potencial de cada registro. Por último, con los datos obtenidos se aplicaron pruebas estadísticas (*t* de student para datos apareados), reportándose promedios y su respectivo error estándar. Todos los análisis se llevaron a cabo con el uso de diversos programas estadísticos como OriginPro 8 (OriginLab Co, Massachusetts, USA), Sigma Plot 10 (Systat Software Inc, California, USA) y/o Excel (Microsoft Corporation, Seattle, USA).



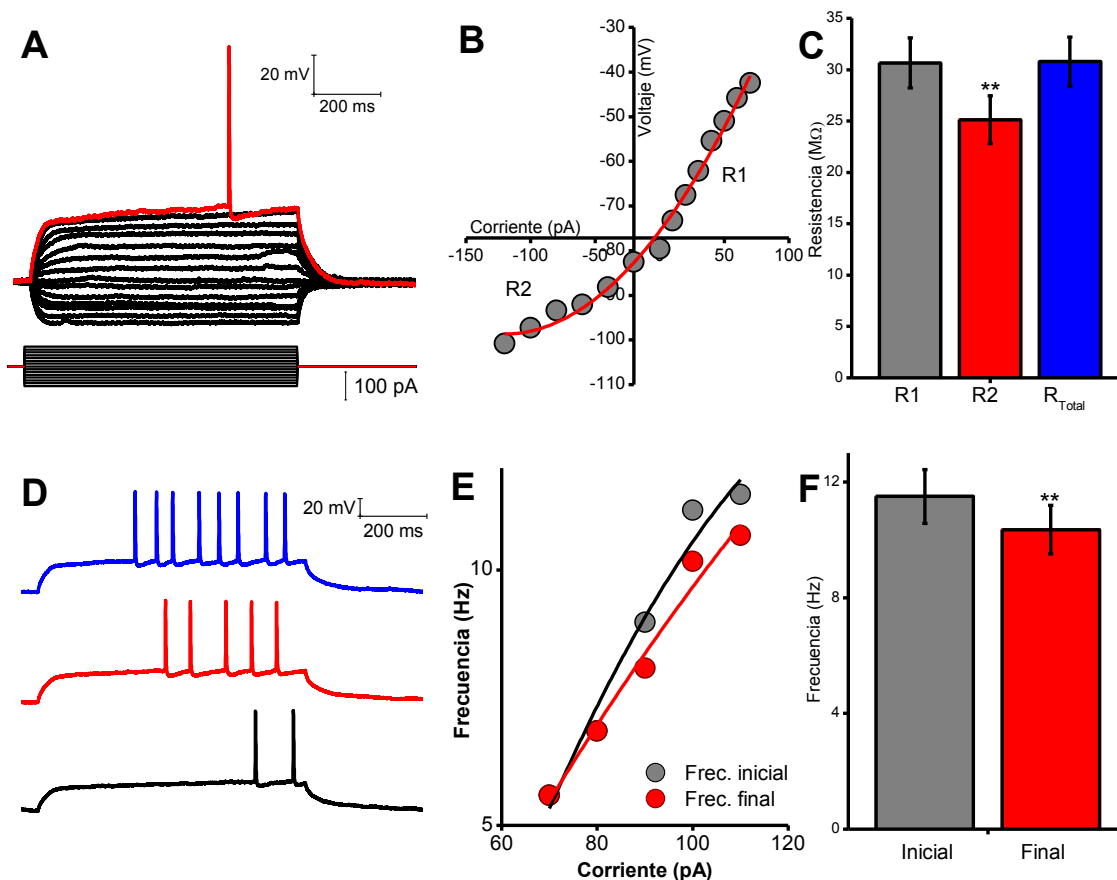
**Figura 11. Obtención de datos en el potencial de acción (amplitudes y duración).** Registro de un potencial de acción en la que se marcaron los parámetros que se midieron rutinariamente en cada experimento. 1) Amplitud del potencial de acción (PA), se mide la diferencia del voltaje entre el umbral y el pico del PA; 2) Duración de la subida del PA, se mide el tiempo que le toma al PA llegar del umbral al pico; 3) Duración de la caída del PA, se mide el tiempo que le toma al PA a su base; 4) Duración total del PA. Es la suma de la medición 2 y 3; 5) Amplitud del Postpotencial hiperpolarizante (PPH). Se mide la diferencia del potencial desde el umbral del PA y el pico del PPH; 6) Duración de caída del PPH. Se mide el tiempo desde la base del PA hasta el pico del PPH; 7) Duración de la recuperación del PPH. Si mide el tiempo que le lleva al PPH alcanzar el potencial de membrana; 8) Duración total del PPH. La suma de las mediciones 6 y 7.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1 CARACTERIZACION ELECTROFISIOLOGICA DE LAS NEM.

Se registró un total de 41 neuronas ubicadas en el cuerpo estriado dorsal de la rata, de las cuales 35 fueron identificadas como NEM por sus propiedades electrofisiológicas, la Figura 12 muestra el registro una célula representativa, en donde desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, se obtiene una familia de curvas a partir de pulsos cuadrados de corriente, tanto despolarizantes como hiperpolarizantes con las que se estimuló a cada NEM. En la NEM representativa se aprecia que al alcanzar con la estimulación el umbral del primer disparo de PA (trazo de color rojo) aparece con un retraso que en promedio fue de  $615.51 \pm 34.7$  ms. Con la familia de curvas se construyó la curva I/V, que se observa que no es lineal (Figura 12B), dado que rectifica en los potenciales hiperpolarizados. La rectificación se reporta como la disminución significativa en la resistencia en los potenciales por debajo de -80 mV ( $R1 = 30.65 \pm 2.4 \text{ M}\Omega$  vs  $R2 = 25.12 \pm 2.3 \text{ M}\Omega$ ,  $n = 35$ ,  $p = 0.0002$ ; ver Figura 12C).

Además, al aumentar la intensidad de la estimulación en las NEM, se incrementó la frecuencia de disparo (Figura 12D), existiendo mayor frecuencia al inicio que al final de los registros (frecuencia Inicial =  $11.5 \pm 0.93 \text{ Hz}$  vs frecuencia final =  $10.35 \pm 0.84$ ,  $n = 35$ ,  $p = 0.0001$ ; ver Figuras 12E y 12F), evidenciando con esto la adaptación de la frecuencia de disparo en las NEM registradas.



**Figura 12. Propiedades electrofisiológicas de las NEM registradas.** A) Registro representativo de una NEM a la que se aplicaron pulsos cuadrados de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes (gráfica inferior). B) Curva I/V de la neurona representativa, se obtuvo al graficar la corriente de estimulación vs el potencial obtenido entre los 600 y 700 ms, los puntos se ajustaron a una curva (línea roja), a partir de la que se calculó la resistencia de acceso de la NEM (medida como la pendiente de la curva) a potenciales por arriba de -80 mV (R1) y/o por debajo de -80 mV (R2) C) Gráfica de barras que representa los valores de resistencia obtenidos del total de neuronas registradas, se aprecia una disminución significativa en la resistencia a potenciales por debajo de -80 mV respecto a aquellos tomados por arriba de -80 mV, indicándonos la presencia de la rectificación en las NEM registradas. D) Registros representativos supraumbrales a partir de 3 estímulos de magnitud creciente (registro color negro estimulado con 80 pA, rojo con 90 pA y azul con 100 pA) E) Curvas I/F de la neurona representativa, se obtuvo al graficar la corriente de estimulación vs la frecuencia inicial (primeros 4 potenciales de acción o PA) y/o final (últimos 4 PA) de un tren de disparos PA. F) Gráfica de barras que representa los valores de frecuencia tanto inicial como final obtenidos del total de neuronas registradas (n=35, p=0.0001), se evidencia el proceso de adaptación de la frecuencia de disparo de PA, como una menor frecuencia al final respecto al inicio de un tren de disparos de PA.

## 7.2 PRESENCIA FISIOLÓGICA DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA.

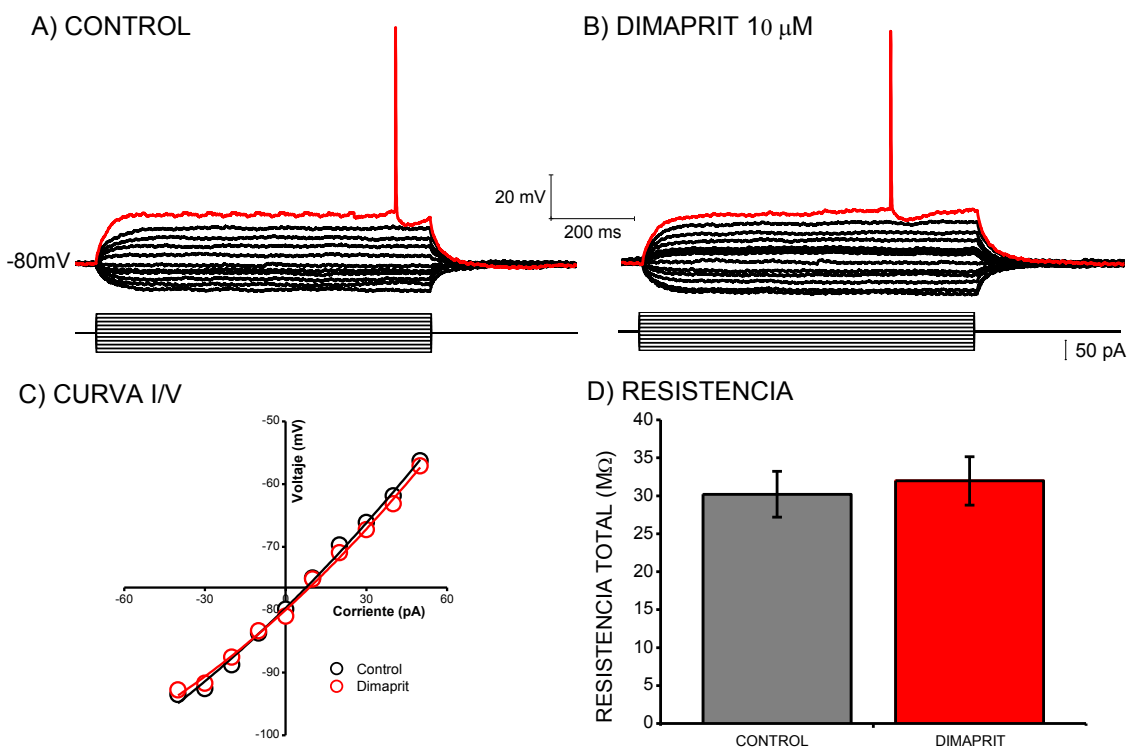
### 7.2.1 Activación de receptores a histamina H2 (H2R).

En 14 neuronas ubicadas dentro del cuerpo estriado dorsal se evaluó la presencia del H2R, para ello se disolvió en la solución externa Krebs el agonista específico para estos receptores dimaprit a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (Figuras 13 a 18). Del total de neuronas, 12 cumplieron cabalmente con las propiedades de las NEM, de las cuales a 9 se les aplicó tanto el protocolo Curva I/V como el de Curva I/F, mientras que a 3 de ellas se les aplicó el protocolo de Curva I/V y el de Rampa de corriente (ver Materiales y Métodos). Asimismo, las NEM presentaron previo a la aplicación de dimaprit un retraso de  $685.1 \pm 54.7$  ms en la aparición del primer PA, mientras que después de activar a los H2R en las NEM disminuyó en promedio el tiempo del retraso a  $647.3 \pm 34.2$  ms, aunque la diferencia no fue significativa ( $n = 12$ ,  $p = 0.82$ ).

En la Figura 13 se muestra el registro representativo de una NEM, además se presenta la comparación de la curva I/V, antes y después de activar a los H2R, que denota que no existe un desplazamiento del potencial de mantenimiento ( $-79.51 \pm 0.7$  mV contra  $-79.25 \pm 0.3$  mV con dimaprit  $n = 9$ ,  $p > 0.05$ ). En todas las NEM se observó la rectificación del potencial de membrana ante estímulos hiperpolarizantes, esto antes y después de activar a los H2R. Por otro lado, al observar las curvas I/V se torna evidente que no existe un cambio significativo en la pendiente de las curvas I/V control vs experimental ( $30.2 \pm 3.0$  M $\Omega$  en el control contra  $31.96 \pm 3.2$  M $\Omega$  con dimaprit,  $n = 14$ ,  $p = 0.3$ ), resultados que sugieren que no se alteran conductancias iónicas asociadas al mantenimiento del potencial de membrana ( $V_m$ ), así como de aquellas que generan la resistencia de entrada en las NEM. Aunado a lo anterior, el umbral del primer disparo de las NEM fue un parámetro evaluado en las NEM registradas, observándose que tampoco tuvo un cambio significativo pasando únicamente de  $-46.07 \pm 1.3$  mV en el control a  $-47.63 \pm 1.48$  con dimaprit ( $n=9$ ,  $p=0.8$ ), esto resultados son similares a lo reportado previamente al aplicar en las NEM directamente histamina (Doreulee, et al., 2001),



Además, previamente se reportó que la aplicación de agonistas para histamina produce cambios en el  $V_m$  por activación de diversas conductancias de potasio (Munaka y Akaibe, 1994), por esta razón se monitoreo la corriente inyectada a las NEM para mantenerlas a un potencial de -80 mV (ver tabla 3). Los resultados anteriores sugieren que las NEM no expresan el H2R en su membrana.

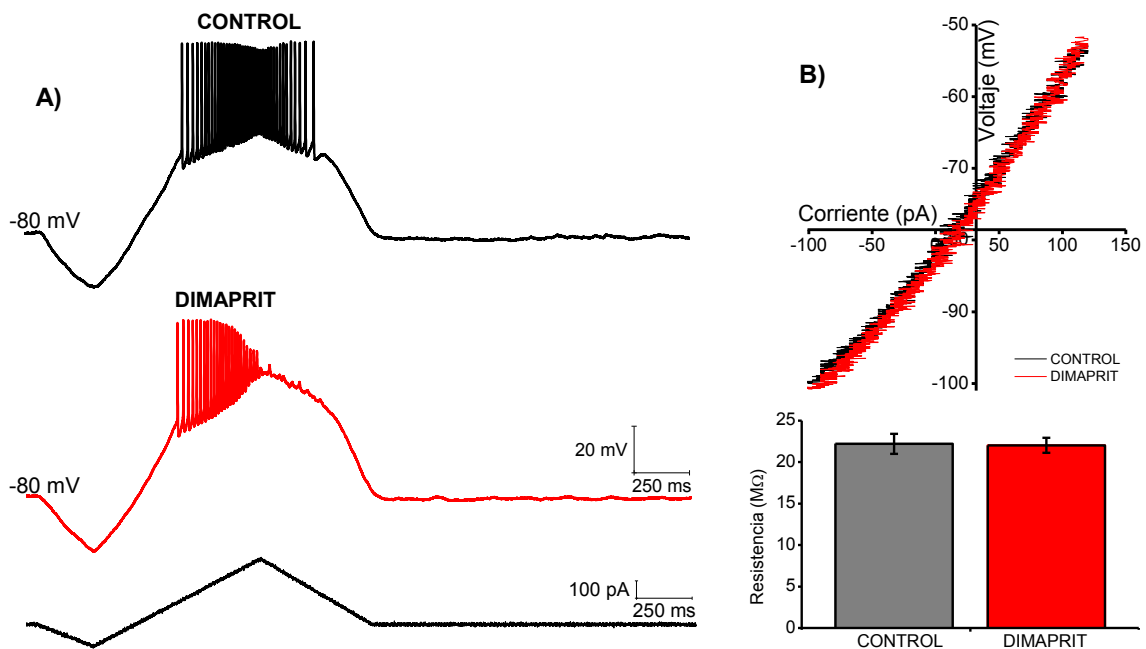


**Figura 13. Relación Corriente-Voltaje entre el control y el agonista de receptores a histamina H2.** A) Trazos representativos de la condición control (sin fármaco) y B) experimental usando Dimaprit (10  $\mu$ M), ambos trazos fueron obtenidos usando un protocolo de pulsos cuadrados de corriente tanto despolarizantes como hiperpolarizantes (gráfica inferior). C) Curva I/V de la NEM representativa ajustada a una curva exponencial D) Comparación de la relación Corriente-Voltaje de la condición control y experimental, diferencia no significativa.

**Tabla 3. Corriente inyectada para mantener el potencial a -80 mV.**

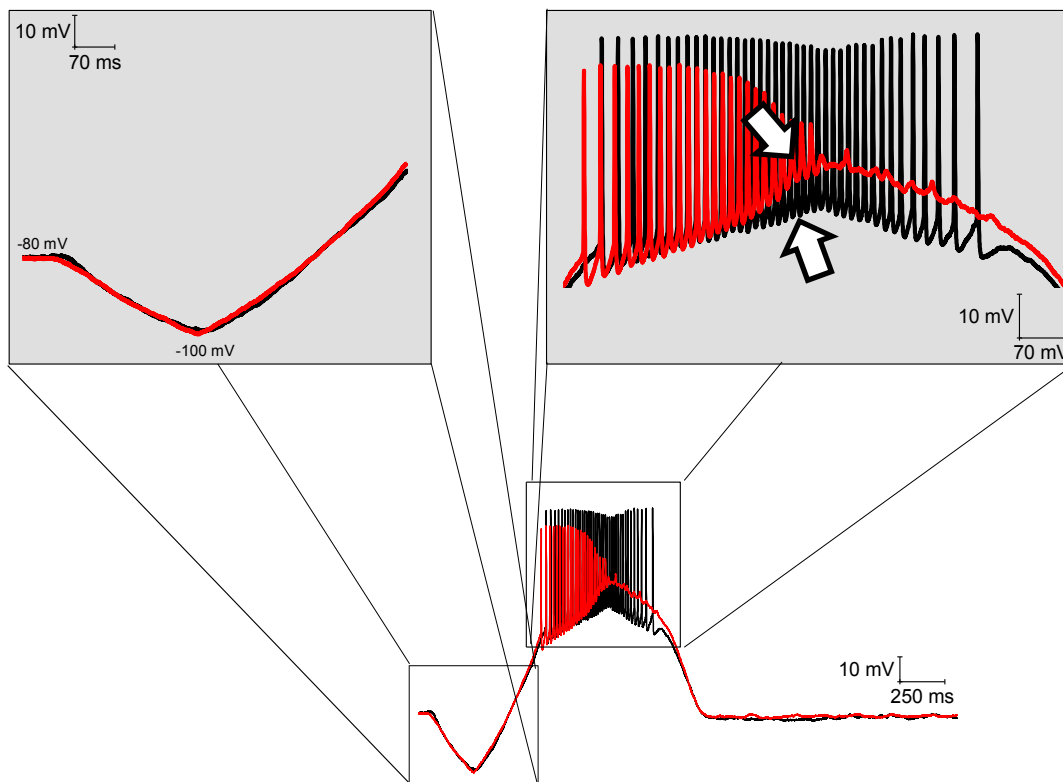
FARMACO	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min
<b>Dimaprit</b>	83.1 $\pm$ 9.7 pA	83.7 $\pm$ 9 pA	80 $\pm$ 8.4 pA	80 $\pm$ 8.3 pA	80.2 $\pm$ 8.4 pA
<b>Immpip</b>	87.1 $\pm$ 10.1 pA	90.6 $\pm$ 14.4 pA	92.4 $\pm$ 8.5 pA	87 $\pm$ 14.7 pA	95.4 $\pm$ 9.9 pA

Los parámetros comparados hasta el momento sólo evidencian la participación de conductancias iónicas en las NEM que se activan a potenciales por debajo del umbral de disparo de los PA, a partir de lo anterior, se aplicó un protocolo de rampa de corriente para explorar la acción de los H2R en el rango de voltaje tanto subumbral, pero sobre todo supraumbral al disparo de PA, determinando posibles cambios sobre el voltaje registrado. Entonces, en la Figura 14 se muestra 2 registros representativos obtenidos con este protocolo junto a la respectiva comparación de las curvas I/V antes y después de la aplicación del agonista dimaprit, al igual que con las curvas I/V mostradas en la Figura 13 no se pudo observar un cambio significativo sobre la pendiente de la curva ( $n=3$ ,  $p>0.05$ ).



**Figura 14. Propiedad de la membrana subumbral de la activación de receptores histaminérgicos H2.** A) Serie de registros representativos de la condición control (registro negro superior) y después de la aplicación de dimaprit  $10 \mu\text{M}$  (trazo rojo) al inyectar el protocolo de rampa de corriente (Trazo negro inferior). B) Comparación de la relación Corriente-Voltaje de la condición control y experimental. Arriba. Curva I/V representativa obtenidos de los registros en A. Abajo. Gráfica de barras del total de NEM a las que se aplicó el protocolo de corriente en rampa, diferencia no significativa.

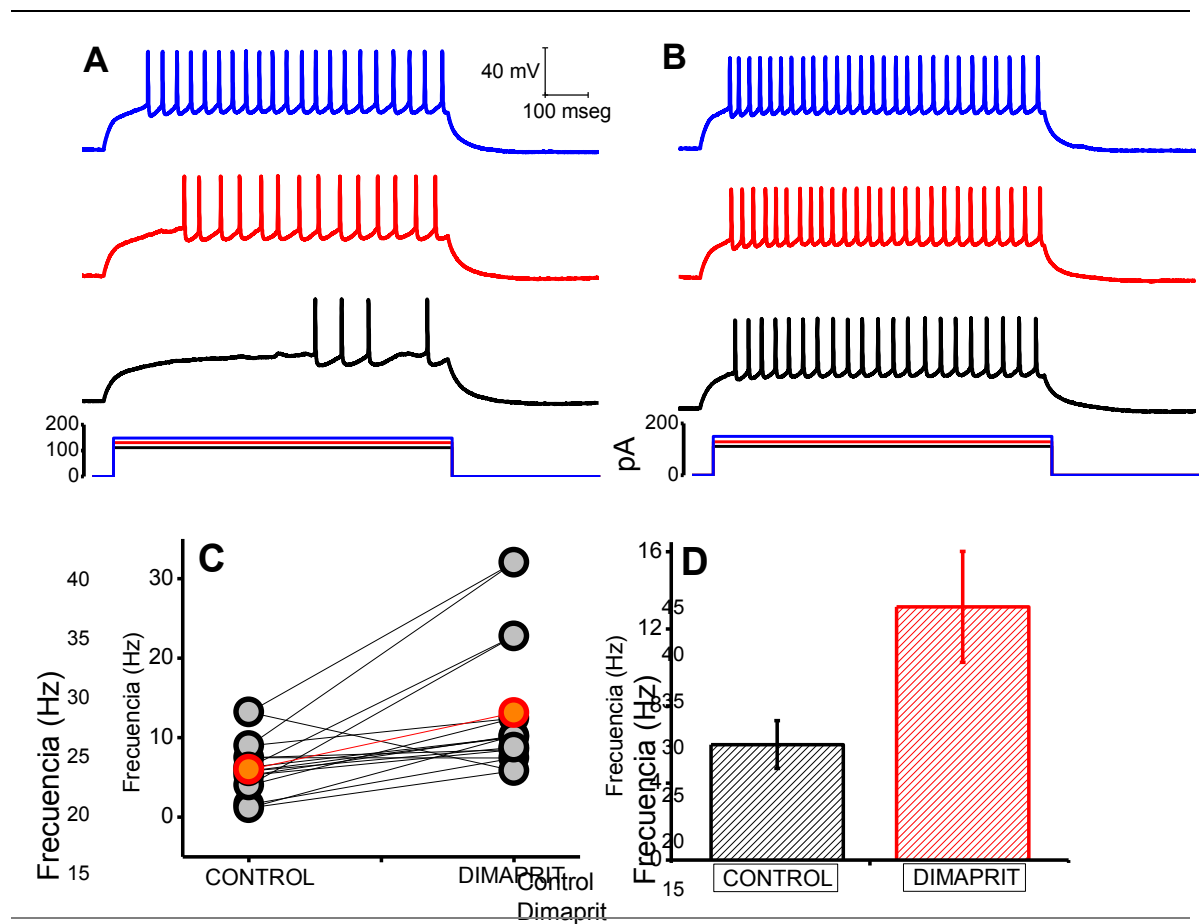
Al superponer los registros antes y después de la aplicación de dimaprit, se puede apreciar que cuando el potencial ( $V_m$ ) se lleva de aproximadamente  $-100$  mV hasta un potencial previo al umbral de disparo del primer PA no provoca ningún cambio, mientras que a potenciales por arriba al umbral de disparo la aplicación de dimaprit desenmascara un cambio en la respuesta de voltaje alterando la pendiente del potencial de membrana en el cual se establecen los trenes de disparo (marcado con flechas en la Figura 15).



**Figura 15. Comparación de registros obtenidos mediante la rampa de corriente.** Superposición y acercamiento de los registros mostrados en la Figura 14, en negro es el registro control y en rojo el experimental. En la región subumbral (superior izquierda) los trazos se sobreponen, mientras que en la región supraumbral (superior derecha) se observa un cambio en el potencial de membrana en el que se establece el tren de disparos de potenciales de acción (marcado con flechas).

Previamente se mencionó, que en las NEM el potencial de membrana en el que se establecen los trenes de disparo de los PA es una propiedad asociada a la activación de los canales Cav1 (Perez-Garci et al., 2003), por lo que la separación en el potencial observada al activar a los H2R (Figura 15) sugiere la participación

de los canales Cav1. Además, el hecho de que la separación en el potencial inicie muy cercano al umbral de disparo del primer PA permite suponer que las conductancias que son moduladas por la activación de los H2R también participan en la generación o el mantenimiento de dicho disparo. Con base en lo anterior, se analizó el cambio de la frecuencia de disparo de los PA, observándose que después de la activación de los H2R hay un aumento significativo de  $28.02 \pm 0.5\%$  en la frecuencia de disparo, esto respecto al control (n=9, p=0.01; Figura 16).



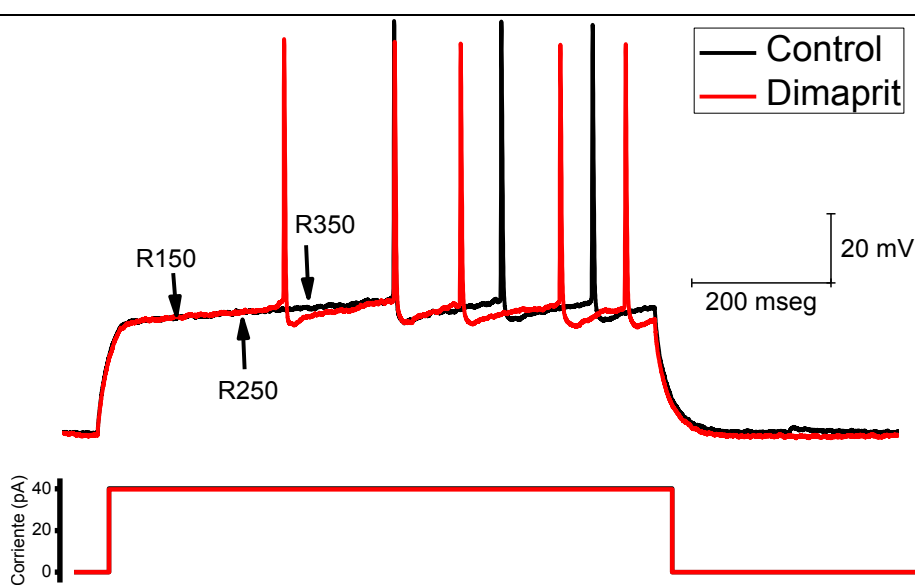
**Figura 16. Efecto de la aplicación de Dimaprit (10 μM) en NEMs.** A) y B) Trazos representativos de la condición control (sin Dimaprit) y Dimaprit (10 μM) respectivamente, registrándose a 3 intensidades de corriente (pA) similares, ambos fueron evocados usando un protocolo de pulsos cuadrados de corriente despolarizantes, se observa que ante estímulos similares, aumenta la cantidad de disparos de potenciales de acción. C) Comparación de la relación frecuencia obtenida entre la condición control y experimental. Los puntos de color naranja representan los valores promedio. D) Gráfica de barras de los experimentos sobre el aumento en la frecuencia de disparo.

La modulación de la frecuencia de disparo en las NEM depende de las múltiples conductancias presentes en su membrana. Para evaluar la participación de las conductancias que se activan durante la despolarización de las NEM (por ejemplo, la corriente de potasio tipo A), se compararon los registros bajo la misma estimulación y se observó que no existen diferencias en el cambio de voltaje previo a la aparición del primer potencial de acción, que se ve reflejado al comparar el potencial obtenido a los 150, 250 y 350 milisegundos (ver Figura 17 y Tabla 4).

**Tabla 4. Relación del potencial obtenido a los 150, 250 y 350 ms.**

	R150	R250	R350
<b>DIMAPRIT</b>	0.99 ± 0.03	1.00 ± 0.03	0.95 ± 0.06
<b>IMMEPIP</b>	0.98 ± 0.07	0.96 ± 0.05	0.93 ± 0.06

Nota: Los datos representan el promedio ± EEM.

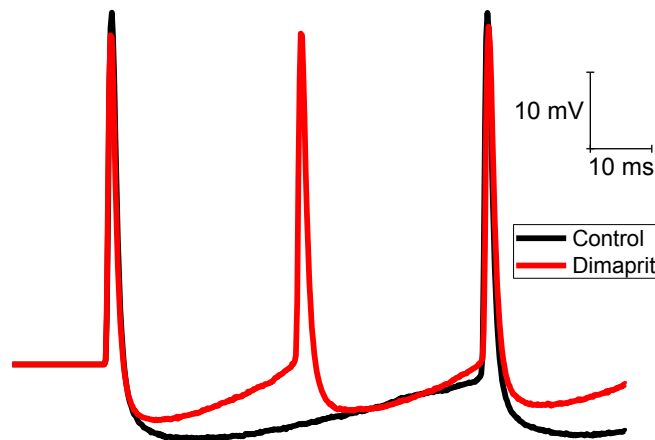


**Figura 17. Efecto de la aplicación de Dimaprit (10  $\mu$ M) sobre el cambio de voltaje generado por la corriente de  $K^+$  tipo IA.** Alineamiento de 2 trazos representativos, ambos fueron estimulados a la misma corriente (40pA). Se observa un incremento en el número de potenciales de acción (3 disparos en el control y 5 después de aplicar dimaprit), además el cambio en el voltaje inicial se superpone entre ambas condiciones. Se muestran los puntos utilizados para obtener la relación (R) entre el potencial obtenido a los 150, 250 y 350 ms reportados en la tabla 4.

Nuestros datos sugieren (1) que la activación de los H2R no posee como efector algún canal (o canales) que se activen durante la despolarización de la membrana y (2) que el incremento en la frecuencia observado se debe a la participación de conductancias involucradas directamente en el disparo. Al respecto, se evaluó la duración y amplitud tanto del disparo del primer PA como de su PPH, observándose que después de la activación de los H2R no existe una diferencia significativa en las dimensiones del PA, y que prácticamente estos se pueden superponer entre ellos, sin embargo, como se podría esperar el aumento en la frecuencia de disparo genera un PPH significativamente con menor duración ( $p < 0.05$ ), particularmente al medir el tiempo de recuperación del PPH (ver Figura 18 y Tabla 5).

**Tabla 5. Efecto de la activación de receptores H2 sobre la amplitud y duración del potencial de acción y el postpotencial hiperpolarizante.**

	CONTROL	DIMAPRIT	Prueba <i>t</i> .
<b>Potencial de Acción (PA)</b>			
Amplitud del PA (mV)	60.1 ± 2.9	62.9 ± 3.2	n=9, p=0.09
Tiempo de subida del PA (ms)	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	n=9, p=0.18
Tiempo de bajada del PA (ms)	5.3 ± 0.7	6.1 ± 0.9	n=9, p=0.71
Duración total del PA (ms)	6.8 ± 1.1	7.7 ± 0.9	n=9, p= 0.64
<b>Postpotencial hiperpolarizante (PPH)</b>			
Amplitud del PPH (mV)	-3.7 ± 1.2	-5.6 ± 0.6	n=9, p=0.34
Tiempo de bajada del PPH (ms)	17.9 ± 2.5	16.4 ± 2.3	n=9, p=0.38
<i>Tiempo de recuperación del PPH (ms)</i>	<i>92.9 ± 14</i>	<i>80.9 ± 15</i>	<i>n=9, p=0.04</i>
<i>Duración total del PPH (ms)</i>	<i>109.9 ± 16</i>	<i>97.1 ± 14</i>	<i>n=9, p=0.02</i>

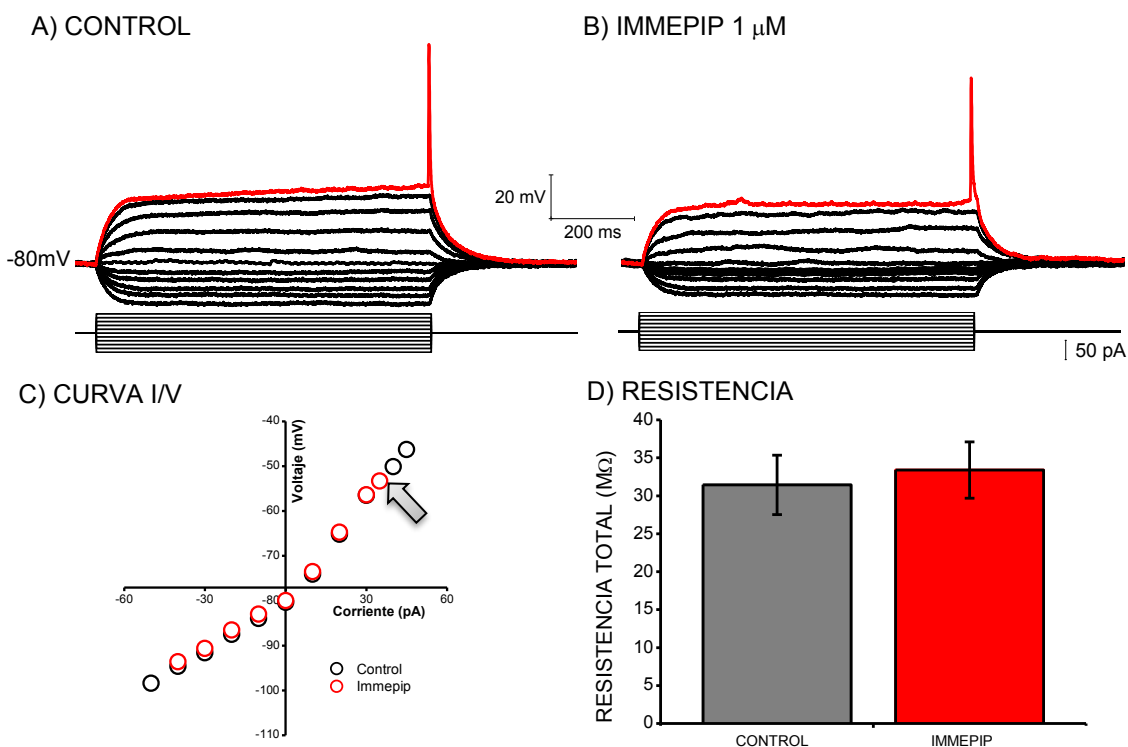


**Figura 18.** Efecto de la aplicación de dimaprit ( $10 \mu\text{M}$ ) sobre el disparo de las NEM. Sobreposición de dos trazos representativos, iniciando en el umbral de disparo del primer potencial de acción (PA), antes y después de la aplicación de dimaprit, se identificó un aumento, nótese que mientras en el control (trazo negro) solo aparecen 2 disparos de similar amplitud y duración, en el experimental (en rojo) y en el mismo lapso aparecen 3 disparos.

### 7.2.1 Activación de receptores a histamina H3.

De un total de 17 neuronas ubicadas dentro del cuerpo estriado dorsal sólo 15 tuvieron las propiedades de las NEM, a 12 de ellas se le aplicó tanto el protocolo Curva I/V como el de Curva I/F, mientras que a 3 de ellas se les aplicó el protocolo de Curva I/V y el protocolo de Rampa de corriente. Para determinar los cambios que produce la activación de los H3R sobre las propiedades electrofisiológicas de las NEM, se utilizó el agonista específico immepip a  $1 \mu\text{M}$ . En las NEM, se observó que a potenciales hiperpolarizantes (debajo de  $-80 \text{ mV}$ ), y después de la activación de los H3R no se generó un cambio significativo sobre la resistencia de entrada ( $31.43 \pm 3.9 \text{ M}\Omega$  en el control, contra  $33.39 \pm 3.7 \text{ M}\Omega$  con immepip,  $n=12$ ,  $p=0.18$ ; ver Figura 19). Tampoco existió algún desplazamiento del potencial de mantenimiento ( $-79.87 \pm 0.18 \text{ mV}$  en el control, y  $-80.26 \pm 0.36 \text{ mV}$  con immepip,  $n=12$ ,  $p=0.6$ ). Además, al igual que con el agonista de H2R, se hizo la medición de la corriente inyectada a las NEM para mantenerlas a un potencial de  $-80 \text{ mV}$  (Tabla 3). Al no observarse diferencias significativas sobre los parámetros anteriores, consideramos que la activación de los H3R no actúe sobre efectores o conductancias que participan en el mantenimiento del potencial de membrana. Sin embargo, conviene mencionar

que al construir las curvas I/V, únicamente se utilizaron los datos necesarios para obtener el primer disparo de PA, siendo importante porque en la curva I/V representativa, el último punto graficado difiere entre ambas condiciones experimentales (marcado con una flecha en la Figura 19C), aspecto no observado al activar a los H2R (Figura 13).



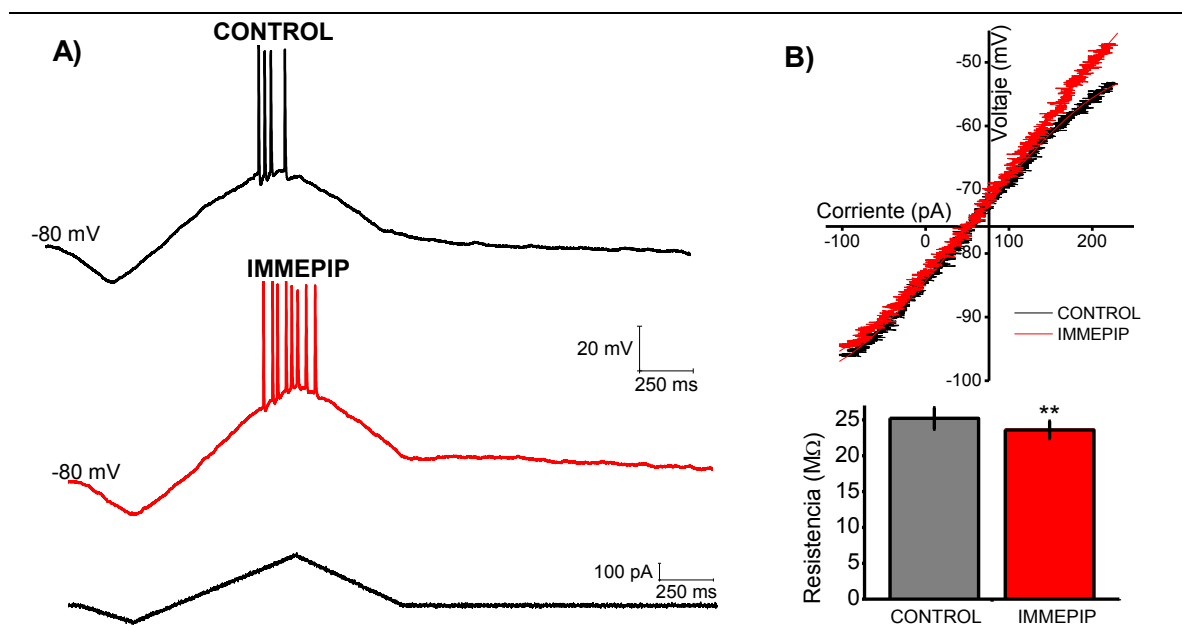
**Figura 19. Relación Corriente-Voltaje entre el control y el agonista de receptores H3.** Registros representativos antes (A) y después (B) de la aplicación de *immePIP* (1 μM), ambos trazos fueron evocados usando un protocolo de pulsos cuadrados de corriente tanto despolarizantes como hiperpolarizantes (gráfica inferior). C) Curva I/V de la NEM representativa ajustada a una curva exponencial, la flecha marca el punto de aparición del primer potencial de acción al aplicar *immePIP*. D) Comparación de la relación Corriente-Voltaje de la condición control y experimental, diferencia no significativa.

El resultado de que se requiere menor estimulación para alcanzar el umbral de disparo después de activar a los H3R sugiere que estos receptores, pueden modular la excitabilidad de las NEM. Bajo esta premisa se observó que el umbral del primer potencial de acción difiere entre cada condición experimental. Mientras que en el control se registró en promedio a  $-46.6 \pm 2.1$  mV, al activar a los H3R se desplazó significativamente el umbral a  $-49.7 \pm 1.6$  mV ( $n=12$ ,  $p=0.02$ ). Asimismo,



se midió el tiempo en la aparición del primer disparo, observándose un retraso promedio de  $545.8 \pm 61.2$  ms (control), contra  $537.9 \pm 54.8$  ms después de activar a los H3R, aunque la diferencia no fue significativa ( $n=12$ ,  $p=0.7$ ).

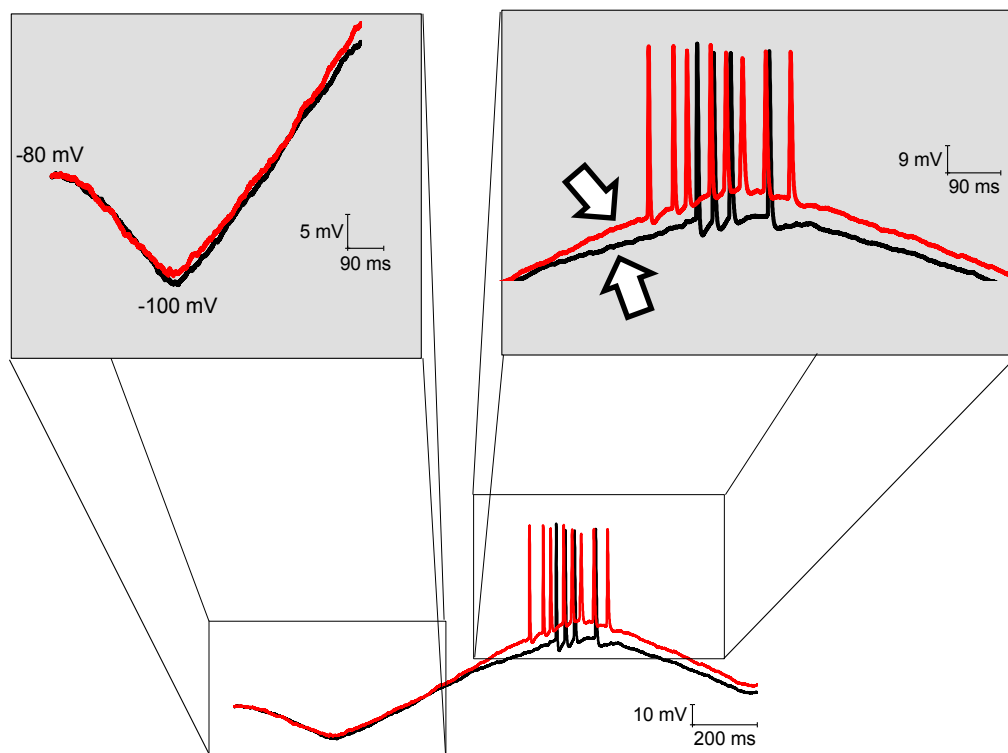
Por otro lado, al aplicar el protocolo de rampa de corriente para establecer la participación de la activación de los H3R sobre las conductancias subumbrales y supraumbrales al disparo del PA, se muestra el registro obtenido antes y después de la aplicación de immePIP, que evidencia una ligera pero significativa disminución de la  $R_e$  pasando de  $25.2 \pm 1.5$  M $\Omega$  a  $23.6 \pm 1.2$  M $\Omega$  después de activar a los H3R ( $n=3$ ,  $p=0.03$ ), que se observa en los análisis como una separación entre las curvas I/V control y la experimental (Figura 20), que también se observa como un cambio en el potencial de membrana registrado previo al umbral de disparo (Figura 21).



**Figura 20. Propiedad de la membrana subumbral de la activación de receptores a histamina H3.** A) Serie de registros representativos de la condición control (registro negro superior) y después de la aplicación de immePIP  $1 \mu\text{M}$  (trazo rojo) al inyectar el protocolo de corriente en rampa (trazo negro inferior). B) Comparación de la relación Corriente-Voltaje de la condición control y experimental. Arriba. Curva I/V representativa obtenidos de los registros en A. Abajo. Gráfica de barras del total de NEM a las que se aplicó el protocolo de corriente en rampa.

Posteriormente se construyó la curva I/V llevando el potencial de membrana de -100 mV a cerca de -50 mV, potencial previo al umbral de disparo de los potenciales de acción, al sobreponer los registros control y experimental se denota

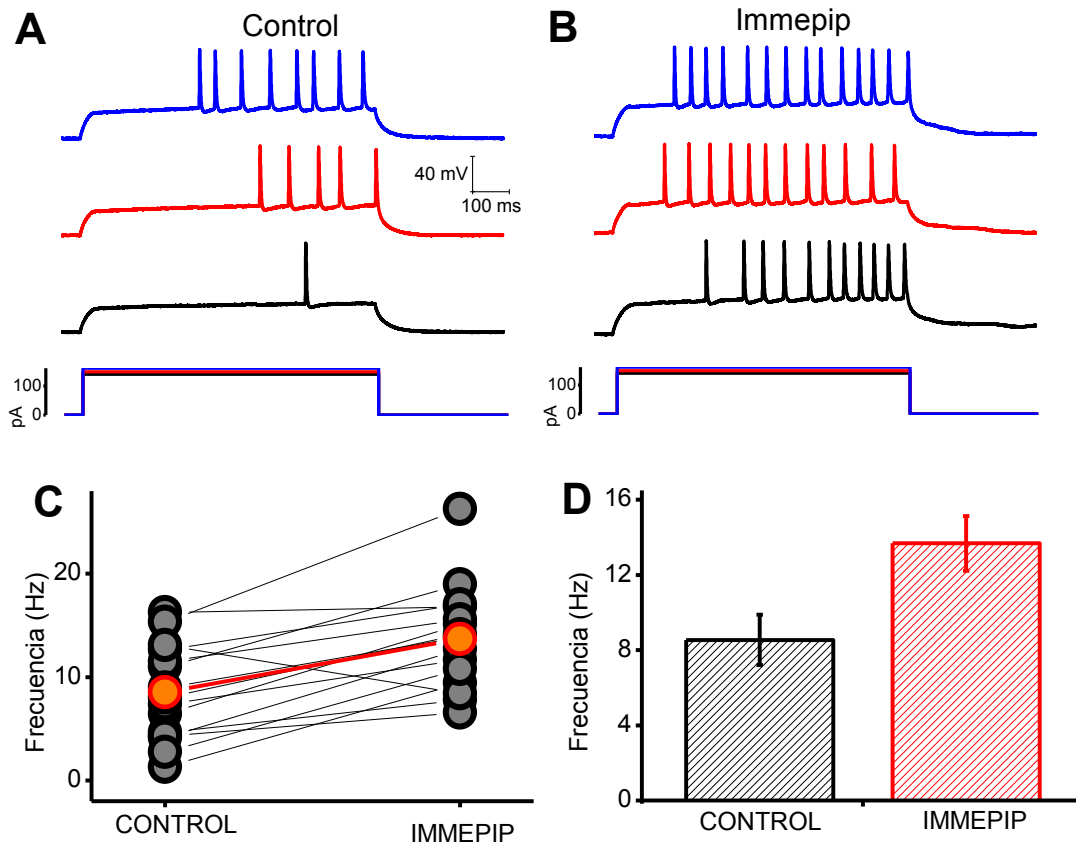
que los trazos se superponen en las regiones subumbrales hasta cerca de los -60 mV (previo al disparo del primer PA), explicando porque no existe un cambio en la pendiente de la curva I/V realizada aplicando el protocolo de pulsos cuadrados de corriente de la Figura 19, sin embargo, esta superposición muestra que hay una clara separación de los trazos previa a la aparición del primer potencial de acción (Figura 21). Este resultado propone que la activación de los H3R pudiese tener como efector alguna conductancia involucrada en el mantenimiento del potencial de membrana subumbral al disparo del PA.



**Figura 21. Comparación de registros obtenidos mediante la rampa de corriente.** Alineamiento y acercamiento de los registros mostrados en la Figura 20, en negro es el registro control y en rojo el experimental. En la región subumbral (superior izquierda) los trazos se superponen, mientras que en la región supraumbral (superior derecha) se observa una separación en el potencial de membrana previo a la aparición del primer potencial de acción (marcado con flechas).

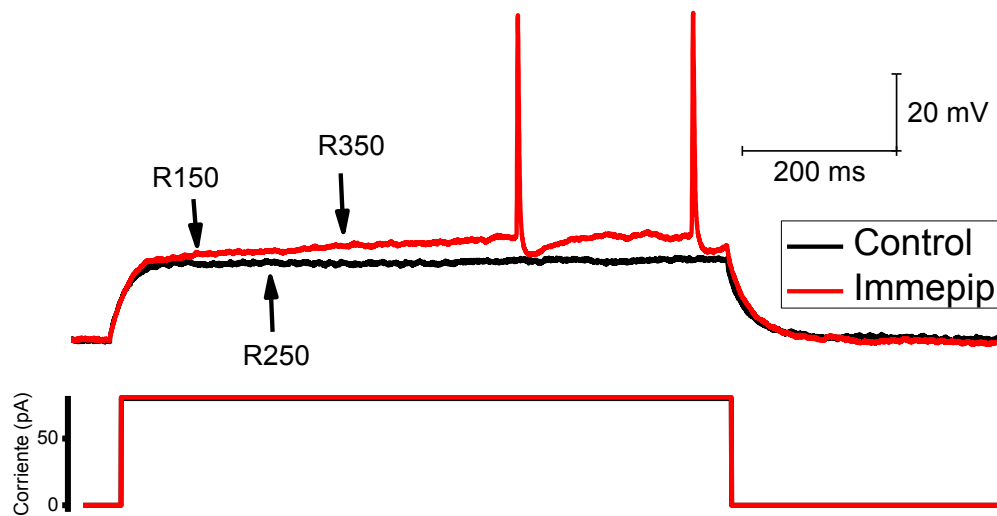
Adicionalmente, el análisis sobre el cambio en la frecuencia muestra que el immpip, ante una estimulación similar aumenta la frecuencia de disparo de las NEM. Este resultado se observó en todas las células registradas encontrándose un aumento promedio de  $19.12 \pm 2.7 \%$  ( $n=15$ ,  $p=0.001$ ) respecto a la condición control

(Figura 22), este hallazgo confirma la expresión de los H3R y su participación en la modulación de las propiedades electrofisiológicas de las NEM, demostrando que estos receptores no sólo actúan como receptores presinápticos, modulando la liberación de diversos neurotransmisores sino, que también tienen efecto postsináptico como se contempló en otras estirpes neuronales (Park, et al., 2014).



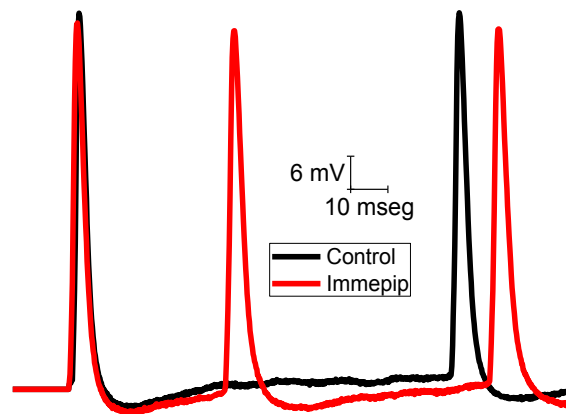
**Figura 22. Efecto de la aplicación de immepip sobre la frecuencia de disparo en las NEM de la rata. A) y B) Trazos representativos de la condición control (sin fármaco) y usando immepip (1 μM) respectivamente, registrándose a 3 intensidades similares, ambos fueron evocados usando un protocolo de pulsos cuadrados de corriente despolarizantes, se observa que ante estímulos similares, aumenta la cantidad o la frecuencia de disparos de potenciales de acción. C) Resumen de los experimentos sobre la frecuencia obtenidos. Los puntos naranjas representan el promedio de todos los datos. D) Grafica de barras de los experimentos mostrando el aumento en la frecuencia de disparo (n=15, p=0.001).**

A partir de la superposición de la respuesta de voltaje ante la misma estimulación, en todas las células estimuladas con immepip se observó que se produce al menos un PA, lo que no ocurrió en las células control. Cuando se midió el potencial de membrana a los 150, 250 y 350 milisegundos y se calculó la relación entre ellos, se encontró una diferencia del 3 al 8% entre sus dimensiones (Figura 23 y Tabla 4).



**Figura 23.** Efecto de la aplicación de immepip ( $1 \mu\text{M}$ ) sobre el cambio de voltaje generado por la corriente de  $\text{K}^+$  tipo IA. Alineamiento de dos trazos representativos, ambos fueron estimulados a corriente similar ( $80 \text{ pA}$ ). Se observa una separación entre los trazos de voltaje desde el inicio de la mesera de potencial que permite que al aplicar immepip aparezcan dos potenciales de acción.

El incremento en la frecuencia debida a immepip disminuye la duración del PPH, a diferencia de lo visto al aplicar el agonista de los H2R, cuando se superponen los trazos no hay una alteración aparente sobre la pendiente del periodo de recuperación del PPH, en lo que parece ser que el periodo refractario entre el primer y segundo disparo sólo disminuye su duración (Figura 24 y Tabla 6).



**Figura 24.** Efecto de la aplicación de *immePIP* ( $1 \mu\text{M}$ ) sobre el disparo de las NEM. Superposición de dos trazos representativos, iniciando en el umbral de disparo del primer potencial de acción (PA), antes y después de la aplicación de *immePIP*, se identificó un aumento, nótese que mientras en el control (trazo negro) solo aparecen 2 disparos de similar amplitud y duración, en el experimental (en rojo) y en el mismo lapso aparecen 3 disparos.

**Tabla 6.** Efecto de la activación de receptores H3 sobre la amplitud y duración del potencial de acción y el postpotencial hiperpolarizante.

	CONTROL	IMMEPIP	Prueba <i>t</i>
<b>Potencial de Acción (PA)</b>			
Amplitud del PA (mV)	$59.6 \pm 2.9$	$57 \pm 2.9$	n=12, p=0.1
Tiempo de subida del PA (ms)	$1.9 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.2$	n=12, p=0.13
Tiempo de bajada del PA (ms)	$8.7 \pm 2$	$7.2 \pm 1.2$	n=12, p=0.31
Duración total del PA (ms)	$10.7 \pm 2$	$9.4 \pm 1.2$	n=12, p=0.36
<b>Postpotencial hiperpolarizante (PPH)</b>			
Amplitud del PPH (mV)	$-3.9 \pm 0.8$	$-4.2 \pm 0.7$	n=12, p=0.31
Tiempo de bajada del PPH (ms)	$17.3 \pm 3.5$	$15.8 \pm 2.6$	n=12, p=0.5
Tiempo de recuperación del PPH (ms)	$104.4 \pm 26.1$	$63 \pm 16.1$	n=12, p=0.05
Duración total del PPH (ms)	$121.7 \pm 27.3$	$78.8 \pm 18.1$	n=12, p=0.04

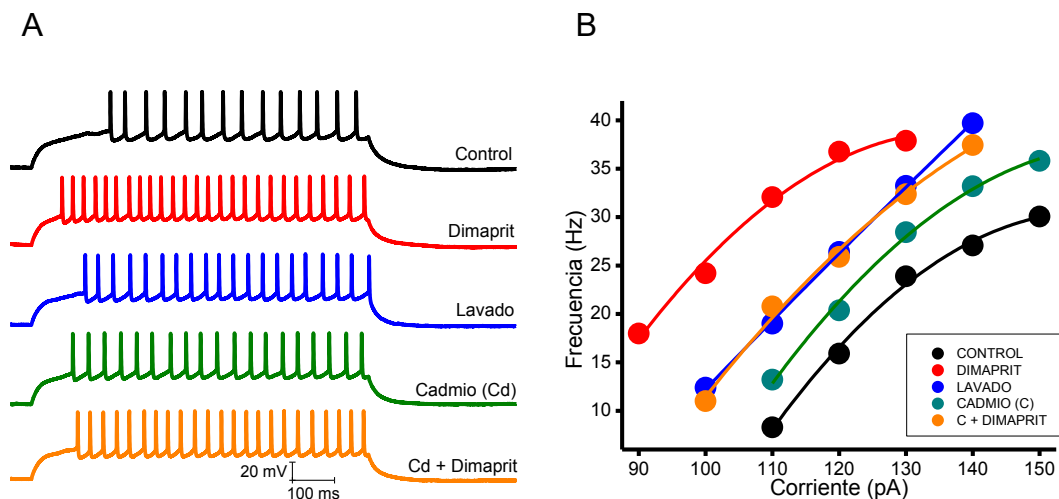
### 7.3 CONDUCTANCIAS ASOCIADAS A LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA H2 y H3.

En las neuronas los trenes de potenciales de acción son el medio por el cual se codifica un mensaje que será transmitido hacia sus axones (Pineda, et al., 1992), por lo que no debe sorprendernos que la activación de los H2R y H3R en las NEM detone un aumento en la frecuencia de disparos de sus PA. Sin embargo, parece ser que el mecanismo por el cual actúan los receptores difiere entre ellos, por un lado, la activación de los H2R, alteró la meseta en la que se monta el tren de disparo, disminuyendo además la duración del PPH, por otro lado, la activación de los H3R generó un cambio sobre la respuesta previa al umbral de disparo.

#### 7.3.1 Canales Cav1 y la activación de los receptores a histamina H2.

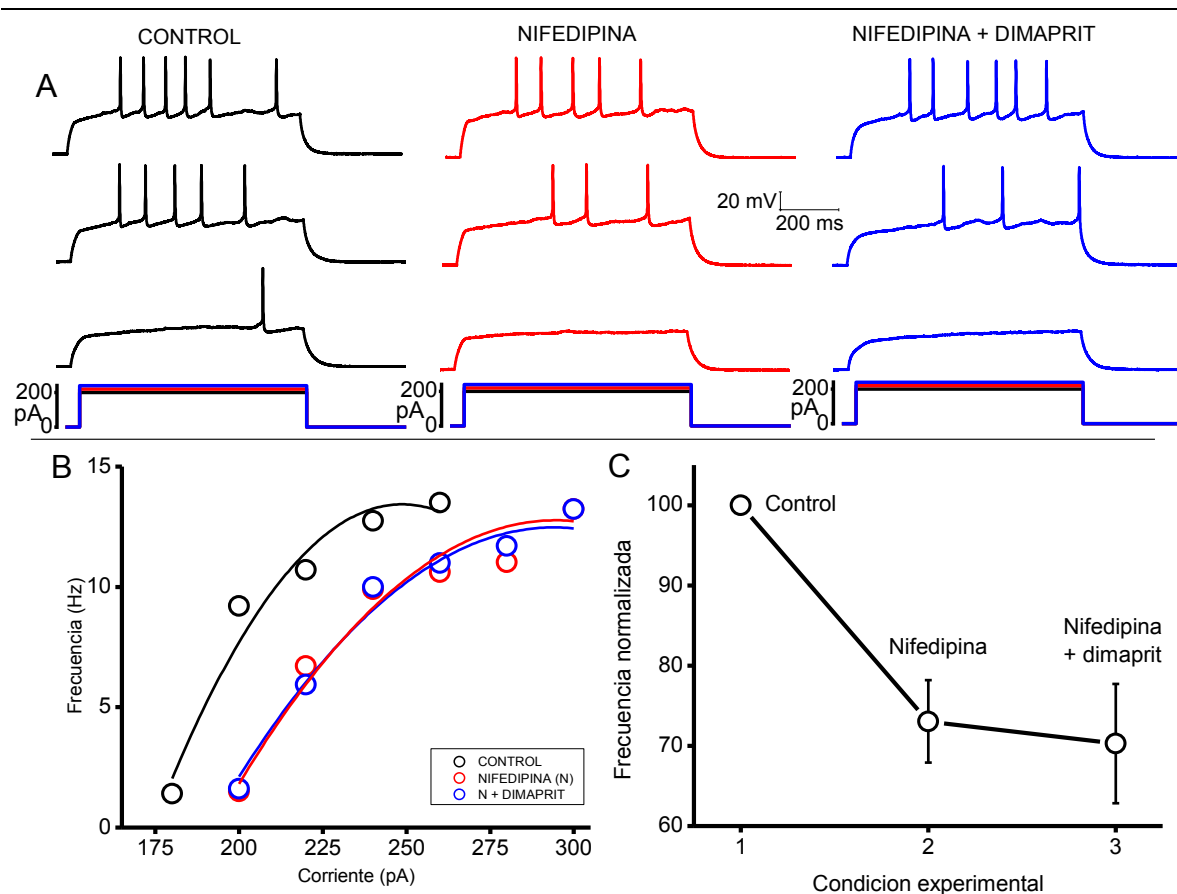
El resultado de la activación de los H2R fue aumentar la frecuencia de potenciales de acción generando una disminución en la duración de la recuperación del PPH, por lo que es posible que los H2R modulen la actividad de los canales de  $K_{Ca}$  que se expresan en las NEM, efecto que ha sido reportado en otras estirpes neuronales (Faber y Sah, 2003). Sin embargo, al observar los registros obtenidos con el protocolo de rampa de corriente (Figura 15) se aprecia que la activación de H2R modifica el voltaje en el cual se montan los trenes de PA, involucrando también a los canales Cav1 (Perez-Garci, et al., 2003). De acuerdo con lo anterior, si se bloquea la entrada de  $Ca^{2+}$  a las NEM podríamos disminuir o incluso impedir el incremento en la frecuencia inducido por la activación de los H2R, por lo que se diseñó el siguiente experimento. (1) Observar el incremento en la frecuencia activando a los H2R; (2) lavar el efecto del dimaprit con Krebs sin fármaco; (3) bloquear la entrada de  $Ca^{2+}$  a las NEM (con cadmio a  $25\mu M$ ) y finalmente (4) activar de nuevo los H2R. La función de este experimento (Figura 25) fue discernir sobre que conductancias de  $Ca^{2+}$  y/o  $K^+$  es más probable que la activación de los H2R utilice como efector, debido a lo anterior sólo se describe cualitativamente el resultado de una sola NEM.

Como era de esperarse en la NEM analizada, se aprecia un incremento en la frecuencia de disparos después de activar a los H2R. Este incremento es observado como un desplazamiento de los puntos hacia la izquierda, posteriormente al tratar de recuperar la frecuencia control con Krebs sin fármacos esperábamos un desplazamiento de los puntos hacia la derecha, sin embargo, a pesar de que, si se existió dicho desplazamiento, esté no alcanzo el nivel de la condición control (puntos azules), posiblemente se necesitó mayor tiempo para el lavado. De hecho, al bloquear a los canales  $Ca_V$  con cadmio ( $25 \mu\text{M}$ ) en la solución externa y al compararse con el control se generó, como era de esperarse (Pineda et al., 1992) un aumento en la frecuencia de disparo, que no fue tan marcado como en los puntos del dimaprit solo (puntos rojos), por último, cuando se aplicó de nuevo el agonista dimaprit se observa un desplazamiento hacia la izquierda (incremento en la frecuencia, Figura 25B).



**Figura 25. Efecto del bloqueo inespecífico de los canales  $Ca_V$  sobre la activación de los receptores H2.** A) Serie de trazos obtenidos durante el procedimiento experimental estimulando a  $120 \text{ pA}$ . B) Curva en la que se usa la corriente inyectada a una NEM contra su frecuencia tomando 5 valores supraumbrales para cada condición del procedimiento experimental. El procedimiento experimental consistió en (1) tomar los registros control (trazos y puntos en color negro) para después activar los receptores a histamina H2 (2) agregando dimaprit ( $10 \mu\text{M}$ ) a la solución Krebs externa (trazos o puntos en color rojo), después se cambió la solución externa por aquella que no contiene ningún fármaco y se puso en contacto haciendo un lavado (3) por 30 min (trazos o puntos de color azul); se bloquearon los canales  $Ca_V$  con cadmio (3) a una concentración de  $25 \mu\text{M}$  por 15 min (trazos o puntos color verde), para nuevamente agregar dimaprit (trazos o puntos en color naranja).

De forma similar se evaluó la participación de los canales Cav1 sobre la modulación ejercida por los H2R, utilizando nifedipina 10  $\mu$ M. Se observó que la frecuencia de disparo de los PA (frecuencia normalizada) disminuyó de manera significativa del 100% a  $73.03 \pm 5.1\%$  ( $n=3$ ,  $p=0.001$ ) en presencia de nifedipina de acuerdo a lo esperado (Perez-Garci, et al., 2003) y la aplicación de dimaprit ya no produjo el aumento significativo en la frecuencia de disparo de PA, pasando de  $73.0 \pm 5.1\%$  a  $70.2 \pm 7.4\%$  ( $n=3$ ,  $p=0.08$ ). Este hallazgo indica que el efecto del dimaprit fue ocluido por el bloqueo previo de los canales Cav1 (Figura 26).



**Figura 26. Efecto del bloqueo específico de los canales Cav1 sobre la activación de los receptores H2.**

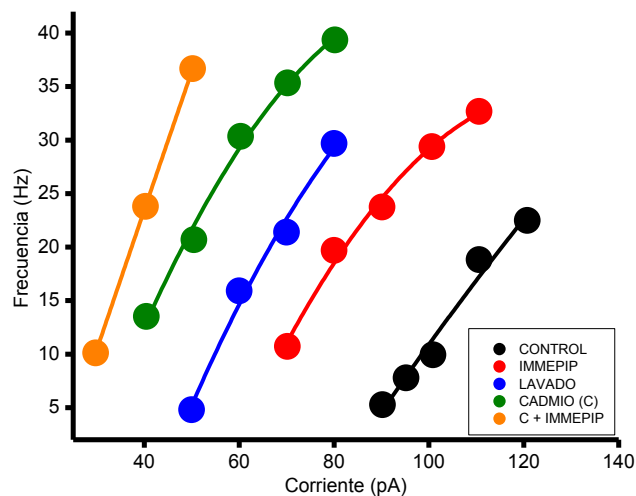
A) Serie de registros representativos de una NEM, antes (columna "control"), durante el bloqueo de los canales Cav1 (columna "nifedipina") o en conjunto con la activación de los receptores H2 (columna "nifedipina + dimaprit") obtenidos a 3 intensidades crecientes e iguales. B) Curva I-F de la NEM en A) en la que se graficó la corriente inyectada contra la frecuencia obtenida tomando 4 o 5 valores supraumbrales para cada condición, se observa un desplazamiento de la curva control (en negro) hacia la derecha indicando una disminución de la frecuencia de los potenciales de acción después de aplicar nifedipina (en rojo) que no es recuperado después de agregar dimaprit (en azul). C. Gráfica comparativa de la frecuencia normalizada (controles al 100%), se observa que el dimaprit no es capaz de aumentar la frecuencia en presencia de nifedipina.



### 7.3.2 Canales Cav1 y la activación de los receptores a histamina H3.

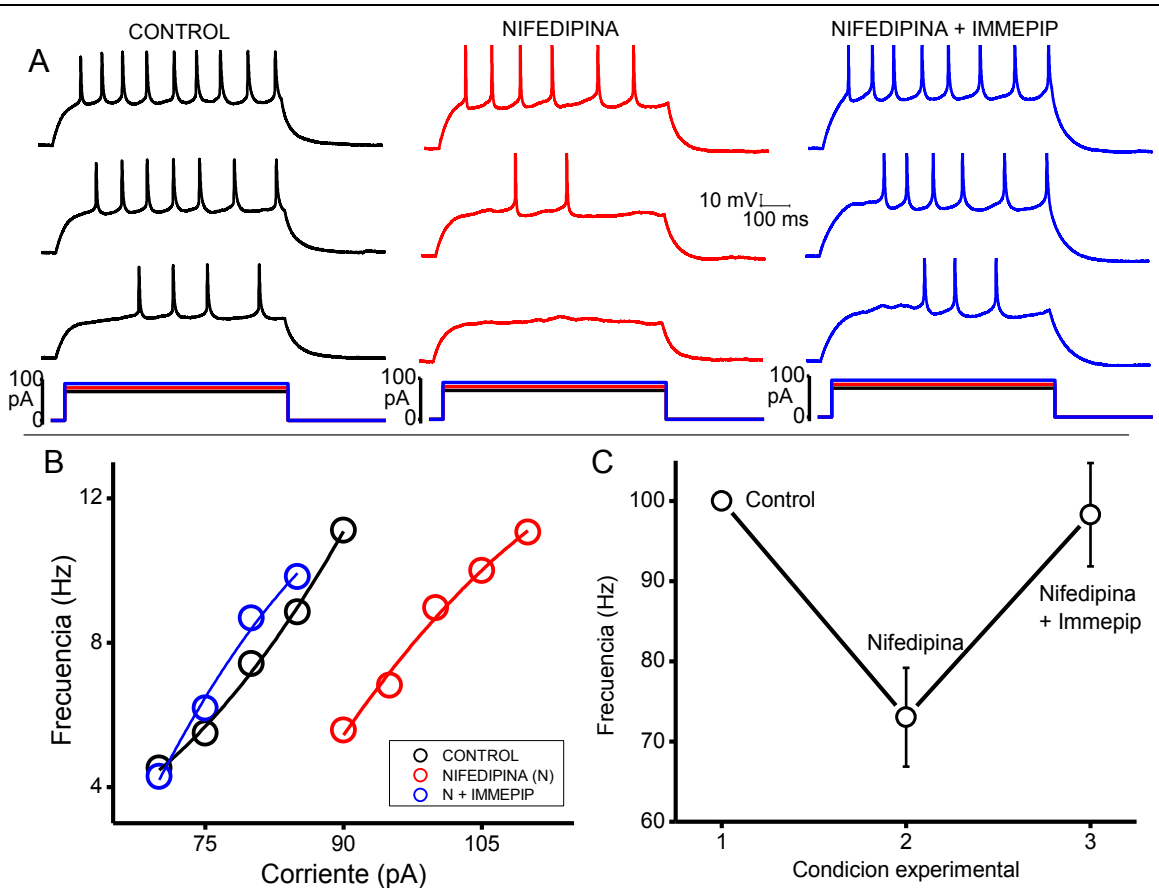
El resultado evidente de la activación de los H3R también fue aumentar la frecuencia de los PA, pero a diferencia de la activación de los H2R no involucró un cambio evidente en las dimensiones del disparo del PA. Al contrario de lo observado al activar a los H2R, el efecto de la activación de los H3R repercute en conductancias que generan en las NEM cambios previos al umbral de disparo. Al observar detenidamente los registros obtenidos con el protocolo de corriente en rampa (Figura 20 y 21), se pudo apreciar que la activación de los H3R modifica la meseta de voltaje en el cual se montan los potenciales de acción, pero este cambio ocurre previo a la aparición del primer PA y probablemente involucran a conductancias como la corriente de K<sup>+</sup> tipo A y/o a los canales Cav. De acuerdo con lo anterior, se evaluó de forma específica e inespecífica la participación de los canales Cav1 en la activación de los H3R.

De forma similar a lo observado en los experimentos donde se activó a los H2R y como se aprecia en la figura 27, en una NEM (1) se midió el incremento en la frecuencia de disparos de PA después de la activación de los H3R, observándose un desplazamiento de la curva hacia la izquierda; (2) al tratar de recuperar la frecuencia control cambiando la solución externa por solución fresca y después de 20 min obtuvimos que la NEM siguió incrementando la frecuencia desplazando nuevamente los puntos hacia la izquierda (Figura 27). Para entender el efecto anteriormente descrito hay que recordar que los H3R poseen actividad constitutiva (Shahid, et al., 2010) posiblemente sólo la incrementamos con el immpip y durante el lavado no fue restablecida a la actividad basal, (3) cualquiera que sea el caso resulta que al bloquear de forma inespecífica los canales Cav (4) la NEM analizada sigue desplazando los puntos hacia la izquierda, lo que podría indicar que la activación de los H3R no involucra la participación de los canales Cav (Figura 27).



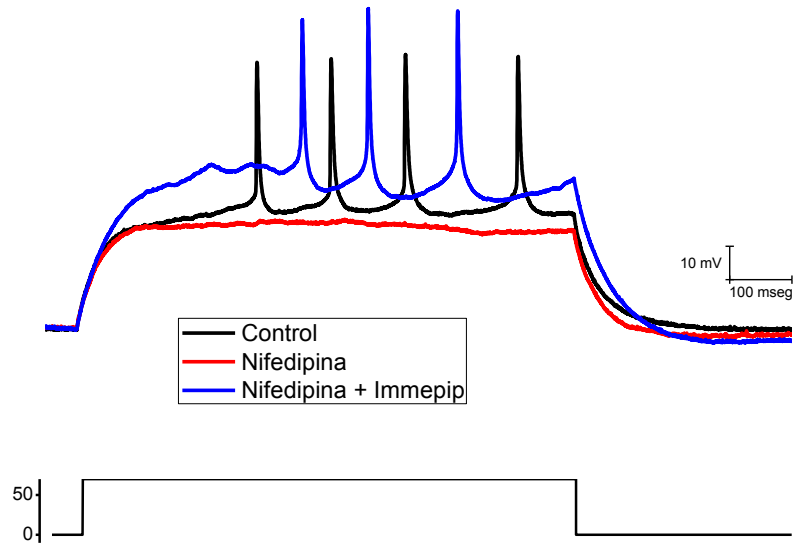
**Figura 27. Efecto del bloqueo inespecífico de los canales  $Ca_v$  sobre la activación de los receptores H2.** Serie de curvas en la que se usa la corriente inyectada a una NEM contra su frecuencia tomando de 3 a 5 valores supraumbrales para cada condición del procedimiento experimental. El procedimiento experimental consistió en (1) tomar los registros control (puntos y/o curvas en color negro) para después activar los receptores H3 (2) agregando *immepip* ( $1 \mu\text{M}$ ) a la solución Krebs externa (color rojo), después se cambió la solución externa por aquella que no contiene ningún fármaco y se puso en contacto haciendo un lavado (3) por 20 min (color azul); se bloquearon los canales  $Ca_v$  con cadmio (3) a una concentración de  $25 \mu\text{M}$  por 15 min (color verde), para nuevamente agregar *immepip* (color naranja).

Sin embargo, al igual que con la activación con los H2R se evaluó la participación de los canales  $Ca_v1$  sobre la modulación ejercida por la activación de los H3R, encontrando que cuando los canales  $Ca_v1$  son bloqueados (con nifedipina) la frecuencia disminuye del 100% a  $73.0 \pm 6.1\%$  ( $n=3$ ,  $p=0.001$ ) como se vio previamente, pero después de la aplicación de *immepip* (en presencia de nifedipina), la frecuencia de disparo de los PA aumenta a un valor cercano al control pasando de  $73.0 \pm 6.1\%$  a  $98.2 \pm 6.4\%$  ( $n=3$ ,  $p=0.002$ ), indicándonos que la modulación en las NEM de los H3R no parece actuar sobre los canales  $Ca_v1$  (Fig. 28).



**Figura 28. Efecto del bloqueo específico de los canales Cav1 sobre la activación de los receptores H3.** A) Serie de registros representativos de una NEM, antes (columna “control”), durante el bloqueo de los canales Cav1 (columna “nifedipina”) o en conjunto con la activación de los receptores H3 (columna “nifedipina + immePIP”) obtenidos a 3 intensidades crecientes. B) Curva I-F de la NEM mostrada en B) en la que se graficó la corriente inyectada contra la frecuencia obtenida tomando 4 o 5 valores supraumbrales para cada condición en la que se observa un desplazamiento de la curva control (en negro) hacia la derecha indicando una disminución de la frecuencia de los potenciales de acción después de aplicar nifedipina (en rojo) que es recuperado después de agregar immePIP (en azul). C. Gráfica comparativa de la frecuencia normalizada (controles al 100%), antes de algún fármaco, después de aplicar nifedipina y/o nifedipina con immePIP, se observa que el immePIP aumenta la frecuencia en presencia de nifedipina.

Asimismo, la superposición de los trazos mostrados en la figura 28 obtenidos a la menor estimulación (70 pA), observamos que la nifedipina disminuye la meseta en la que se montarían los trenes de disparos de potenciales de acción y que la aplicación de immePIP genera una depolarización del potencial de membrana de dicha meseta (Figura 29).



**Figura 29. Efecto del bloqueo de los canales *Cav1* sobre la activación de los receptores *H3*.** Alineamiento de tres trazos representativos, ambos fueron estimulados a la misma corriente (70 pA). Se observa que la nifedipina disminuye la amplitud de la meseta en la que se montan los trenes de disparo de potenciales de acción mientras que el immepip desplaza el voltaje a valores más positivos.

## 8. DISCUSION

### 8.2 CARACTERIZACION ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEM.

Desde un punto de vista anatómico y fisiológico, existen mecanismos relacionados a la transmisión sináptica y a su modulación que se han dividido en pre- y postsinápticos, dependiendo del componente de la sinapsis que se ve afectado. Aquellos mecanismos que se relacionan con la liberación de los neurotransmisores son parte del elemento presináptico, mientras que aquellos que se relacionan con la respuesta de las neuronas forman parte del elemento postsináptico (Hammond, 2008). Para evaluar la modulación por la acción de H2R y H3R en las propiedades de disparo de las NEM en el cerebro de la rata, fue necesario registrar la actividad intrínseca de la NEM y así separarla de la actividad de otras neuronas presentes en el cuerpo estriado dorsal. Sabemos que la población neuronal presente en el cuerpo estriado dorsal es heterogénea, morfológica y electrofisiológicamente, de hecho, a la fecha se han descrito a la NEM como la única neurona de proyección en este núcleo y al menos 5 tipos de

interneuronas (Kita, et al., 1984, 1985; Kreitzer, 2009), permitiendonos garantizar que el efecto de la activación de receptores a histamina es reportado sobre las NEMs y no sobre las interneuronas.

En primer lugar, se describieron las propiedades electrofisiológicas de las NEM donde se muestran registros antes y después de las manipulaciones experimentales con las características intrínsecas a las NEM del cuerpo estriado dorsal (proceso de rectificación, retraso en la aparición del primer disparo, aumento en la frecuencia de disparo, proceso de adaptación, postpotencial hiperpolarizante, etc.), todas descritas previamente (Kita, et al., 1984, 1985; Nisenbaum, et al., 1996; Barral, et al., 2010). El hecho de que podamos caracterizar a las NEM por sus propiedades sugiere que su actividad es conservada evolutivamente (Reiner, et al., 1998), siendo necesaria en la transmisión de información entre las NEM y los núcleos con los que se conectan, entonces, su excitabilidad neuronal definida como el patrón de disparos de potenciales de acción a lo largo del tiempo se convierte en la información transmitida hacia las terminales nerviosas (Wilson, 2004). Asimismo, las propiedades y la excitabilidad neuronal se deben a las proteínas que expresan en la membrana, aunque es principalmente debido a sus canales iónicos, que las neuronas cuentan con una gran cantidad de mecanismos que, ante procesos metabólicos o farmacológicos podrían alterarse generando cambios en la duración de los potenciales de acción, en la frecuencia de disparo etc. (Kita, et al., 1984, 1985; Nisenbaum, et al., 1996), como lo observado al activar los H2R y H3R en las NEMs.

## 8.2 EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES A HISTAMINA EN LAS NEM.

### 8.2.1 Activación de los H2R en las NEM.

La respuesta biológica de la activación del H2R que mejor se conoce es el incremento de AMPc, mismo que ocasiona a su vez un aumento en la excitabilidad de las neuronas que lo expresan. Por ejemplo, el aumento del AMPc en las neuronas del núcleo ventromedial del hipotálamo por la activación de H2R genera la despolarización del potencial de membrana, haciendo más excitable a estas

neuronas, efecto que probablemente se debe al bloqueo de canales de  $K^+$  de fuga o de dos poros (Zhou, et al., 2007). Por su parte en las neuronas mientéricas se reportó que el mismo aumento de AMPc suprime corrientes de  $K^+$  (posiblemente corriente de  $K^+$  tipo IA) que favorece la excitabilidad en estas neuronas (Starodub y Wood, 2000).

Por otro lado, en diversas áreas del cerebro, la activación de los H2R conduce a la disminución de la actividad neuronal y aunque es menos conocida la naturaleza de esta inhibición, parece ser una acción indirecta regulada por la excitación de neuronas GABAérgicas cercanas a las terminales axónicas (Brown, et al., 2000). No obstante lo anterior, la actividad electrofisiologica observada en las NEM no parece corresponder a ninguno de los casos anteriores. De hecho, el efecto observado involucra a los canales  $Ca_v1$ , que en las NEM modulan el potencial o la meseta en la cual se monta el tren de disparos de potenciales de acción (Perez-Garci, et al., 2003), explicando con esto, porque la activación de los H2R altera esa característica después de aplicar el protocolo de rampa de corriente (Figura 14 y 15). De hecho, el aumento en la frecuencia de disparo observada al inducir la activación de los H2R en las NEM parece deberse a una alteración en el postpotencial hiperpolarizante (PPH). Además, al no existir ninguna alteración en el cambio del potencial de membrana antes de la aparición del primer potencial de acción a los 150, 250 y 350 ms, ni en la pendiente de las curvas I/V. Lo anterior permite descartar la participación de la corriente de  $K^+$  tipo IA o de los canales  $K_{ir}$ , relacionados a dicho cambio en el potencial (Kita, et al., 1984 y 1985; Nisenbaum, et al., 1996).

Sin embargo, se observó que la activación de los H2R produjo cambios en la duración del PPH, cambiando incluso la pendiente de la recuperación del PPH. Justamente, en las NEM el PPH es el principal mecanismo para controlar la frecuencia de disparo de los potenciales de acción por lo que su modulación por la activación de H2R no debe sorprendernos, el PPH es una característica generada por los canales de potasio activados por calcio ( $K_{Ca}$ ) específicamente de los tipos BK y SK, (Bargas, et al., 1989; Pineda, et al., 1992). Del mismo modo en células

piramidales del hipocampo y células granulares del giro dentado, la histamina modifica las dimensiones del PPH, pero a diferencia de lo visto en las NEM parece actuar directamente sobre los canales  $K_{Ca}$ , al ser un efecto que no es inhibido cuando se bloquea la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior de las neuronas y sólo cuando hay un bloqueo directamente de los canales de  $K^+$  (Brown, et al., 2000).

En las NEM se ha demostrado que el  $Ca^{2+}$  que activa a los canales  $K_{Ca}$  proviene principalmente de los canales de  $Ca^{2+}$  de alto umbral operados por voltaje, específicamente por la activación de los canales  $Cav2.1$  y/o  $Cav2.2$ , (Vilchis, et al., 2000). Llama la atención entonces, que la activación de los H2R en las NEM alteró las dimensiones del PPH y que además implicó la participación de los canales  $Cav1$  y no de los canales  $Cav2.1$  y  $Cav2.2$  (Figura 25 y 26), sin embargo, se sabe que el bloqueo específico de los canales  $Cav1$  no reduce significativamente la amplitud del PPH (Vilchis, et al., 2000). No obstante, en las NEM de la vía directa la activación de los receptores dopaminérgicos del tipo D1 (acoplado a proteínas  $G_s$  como los H2R) de forma similar a lo visto en este estudio modifica las dimensiones del PPH actuando sobre canales  $Cav1$  (Hérendez-López, et al., 1996 y 1997). Así que no debe sorprendernos que el incremento de la actividad de los canales  $Cav1$  debida a la activación de los H2R genere un aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular capaz de activar a los canales  $K_{Ca}$  que puede modificar las dimensiones del PPH, e incluso este mecanismo podría explicar por qué el bloqueo de los canales  $Cav2.1$  y  $Cav2.2$  de acuerdo con Vilchis, et al. 2000, no disminuyen el 100% de la amplitud del PPH.

### 8.2.2 Activación de los H3R en las NEM.

Aunque el PPH es el principal regulador de la frecuencia de disparo de los PA en las NEM, en el caso de la activación de H3R, el PPH parece no ser afectado ni su amplitud o su duración. De hecho, nuestros datos sugieren que la activación del H3R produce un cambio en el potencial de membrana previo al disparo de los potenciales de acción, cambio que además hace más excitable a las NEM, lo anterior se observa claramente cuando se aplica el protocolo de rampa de corriente. Recientemente se ha descrito la presencia de los H3R en el soma y las dendritas de las NEM e interneuronas del cuerpo estriado dorsal (González-Sepúlveda, et al.,

2013), así como en otras estirpes neuronales (Park, et al., 2014). Al relacionar a los H3R con la actividad inhibitoria de las presinapsis donde se expresan hubiéramos esperado que su activación en el soma de las NEM generase una disminución de su actividad (Schlicker, et al., 1993; Arias-Montaño, et al., 2001; Molina-Hernández, et al., 2001; Aquino-Miranda, et al., 2012), por lo que nuestros resultados además de demostrar la participación fisiológica de los H3R en las NEM permiten suponer que la vía de señalización difiere a la utilizada en la presinapsis. Otra idea que sustenta lo anterior es el hecho que los H2R y H3R se acoplan a proteínas G de los cuales su principal efector es la enzima adenilil ciclasa, solo que una favorece su activación ( $G_s$  en los H2R) y la otra la inhibe ( $G_{i/o}$  en los H3R) por lo que si compartieran la vía de señalización podríamos haber generado eventos contrastantes entre ellos (Zhou, et al., 2007; Shahid, et al., 2010; revisado por Bolam y Ellender, 2015).

Explicar como la actividad aparentemente *contrastante* en la enzima adenilil ciclasa únicamente produce un incremento en la frecuencia de disparo, resulta complicado e implica establecer previamente algunos supuestos: (1) si los H2R y H3R se encuentren en NEM diferentes (quizá en neuronas de la vía directa o indirecta) permite plantear que el aumento del AMPc generado por los H2R y que la disminución del AMPc ocasionado por la activación de los H3R active o inactive la misma vía de señalización. Algo a considerar es que prácticamente toda NEM analizada en esta tesis tuvo un incremento en la frecuencia de disparos de potenciales de acción sin importar que receptor a histamina se haya activado, siendo poco probable que exista una distribución diferencial de los H2R y H3R entre las NEM del cuerpo estriado dorsal. (2) Es posible suponer entonces que las NEM pueden expresar ambos tipos de receptores en su membrana y de hecho al observar que el efecto ocurre sobre diferentes propiedades electrofisiológicas (el PPH durante el disparo al activar los H2R y/o el cambio en el voltaje previo al umbral al activar los H3R) y sobre todo que parecen actuar sobre distintas conductancias iónicas, dichos receptores a histamina se ubiquen en compartimientos separados entre ellos (el soma, las dendritas y/o el axón), con lo que el aumento o la disminución de AMPc sería un evento local sobre diferentes compartimientos



celulares que no necesariamente detonaría un efecto contrastante. En el caso específico de la activación de los H3R se sabe que además de inhibir la actividad de la enzima adenilil ciclasa genera acumulación de  $Ca^{2+}$  en el interior celular vía señalización por diacilglicerol cinasa (DAG-cinasa) y existe evidencia de que los H3R se involucran en procesos de diferenciación y crecimiento celular por activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK; Leurs, et al., 1995; Ramos-Jiménez, et al., 2009) por lo que otra opción sería (3) que la activación de los H3R desencadene en las NEM vías de señalización diferentes a la de la enzima adenilil ciclasa.

Cualquiera que sea la vía activada por los H3R, sus efectores generan cambios en las propiedades electrofisiológicas en las NEM, cambiando tanto el potencial previo al umbral de disparo, el umbral de disparo, e incrementando posiblemente la frecuencia de disparos de los PA. Recordando que en las NEM el retraso en la aparición del primer potencial de acción (Kita, et al., 1985) es producto de la activación espacial y temporal de corrientes entrantes (canales  $Nav$  y  $Cav$ ) y de corrientes salientes de  $K^+$  (corriente de  $K^+$  tipo IA; Nisenbaum, et al., 1994, 1995, 1996; Bargas, et al., 1989), estos son blancos directos o indirectos del efecto observado por la activación de H3R. Sin embargo, la aplicación de histamina en las NEM que expresan tanto receptores a dopamina del tipo D1 (NEM de la vía directa) o del tipo D2 (NEM de la vía indirecta) se reportó, que genera corrientes entrantes cuya amplitud y/o duración depende de la concentración de histamina utilizada (Zhuang, et al., 2018), esto permite suponer que el efecto de la activación de los receptores ocurre sobre canales  $Cav$ . Ciertamente el  $Ca^{2+}$  es un ión que dependiendo el canal  $Cav$  por el que sea introducido a las NEM puede aumentar o disminuir su excitabilidad, de hecho, estas neuronas expresan canales  $Cav1$  (tipo L),  $Cav2.1$  (tipo P/Q),  $Cav2.2$  (tipo N) y  $Cav2.3$  (Tipo R) que contribuyen de forma importante en la generación de corrientes de  $Ca^{2+}$  en el soma de estas neuronas (Foehring et al., 2000; Vilchis et.al., 2000; Perez-Garci, et al., 2003).

Cada una de las corrientes de  $Ca^{2+}$  se ha asociado a propiedades electrofisiológicas diferentes en las NEM. Como se menciono anteriormente, entre

el 50 y 70% del  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a las NEM lo hace a través de los canales Cav2.1 y Cav2.2 modulando a su vez la amplitud del PPH (Vilchis et al., 2000; Perez-Garci, et al., 2003) y su bloqueo desencadena un aumento en la frecuencia de disparo en la NEM. Por otro lado, la activación de los canales Cav1 modula principalmente al potencial en el que se montan los trenes de disparo de los potenciales de acción (Perez-Garci, et al., 2003), y al observar nuestros resultados parece que también modulan la duración del PPH, además su bloqueo genera una disminución de la frecuencia de disparo de potenciales de acción en las NEM (Perez-Garci, et al., 2003). A partir de lo anterior, nuestros datos sugieren que la activación de los H3R no actuó por medio de los canales Cav1, dado que su bloqueo con nifedipina no ocluyó el efecto sobre el incremento de la frecuencia de disparo y dado que la activación de los H3R no altera la amplitud del PPH podría descartarse la participación de los canales Cav2.1 y Cav2.2.

Por otro lado, datos generados por nuestro equipo de trabajo han mostrado que en la presinapsis, la activación de los H3R disminuye la liberación de los neurotransmisores en la hendidura sináptica, básicamente por dos métodos, el primero de ellos implica el bloqueo de conductancias de  $\text{Ca}^{2+}$  involucradas directamente en la liberación de los neurotransmisores y el segundo mecanismo, se asocia a la activación de diversas conductancias de  $\text{K}^+$  cuya función es evitar el cambio abrupto en el potencial de membrana durante la llegada de un PA al botón sináptico, evitando indirectamente la apertura de los canales Cav y con ello disminuir la liberación de los neurotransmisores (Arias-Montaña, et al., 2001; Adachi, et al., 1992; Arrang, et al., 1983). De acuerdo con lo anterior, de las conductancias de  $\text{Ca}^{2+}$ , la de los canales Cav2.3 (canales tipo R) podría ser la única que tiene actividad sobre un potencial subumbral al disparo PA, esto porque las NEM no expresan canales Cav3 (tipo T o LVA; Foehring et al., 2000) y retomando que el retraso en la aparición del primer PA es un efecto que depende de diversas conductancias entrantes y salientes, el posible bloqueo de los canales Cav2.3 por la activación de los H3R no permite explicar el incremento en la frecuencia observada. El hallazgo de que con la activación de los H3R en las NEM se generó un cambio en el potencial de membrana que despolariza aproximadamente -50 mV y la posible eliminación de

la corriente entrante del canal Cav2.3 o de cualquier corriente entrante, lo que generaría es que aquellas corrientes salientes (de K<sup>+</sup> principalmente) rectificuen el potencial, con lo que hiperpolarizaría la membrana, generando un efecto distinto al observado (Hammond, 2008). En este momento el o los efectores finales de la activación de los H3R no se ha caracterizado, entonces se vuelve especulativo sobre que conductancia actúan estos receptores. Sin embargo, existen dos posibles respuestas que debe tener las NEM ante el cambio en el potencial reportado que explicarían el efecto observado. Por su naturaleza inhibitoria, que el bloqueo de un posible efector final, debe implicar en lugar del bloqueo de conductancias entrantes (hiperpolarizando a la membrana), se bloqueen conductancias salientes (despolarizando a la membrana), mientras que otra opción es que los H3R utilicen una vía de señalización diferente a la proteína G<sub>i</sub> (posiblemente G<sub>o</sub>) que en lugar de inactivar conductancias entrantes las active (Nestler, et al., 2009; Hammond, 2008).

## 9. CONCLUSIONES

A partir de los resultados mostrados en el presente trabajo se proponen las siguientes conclusiones:

1. La respuesta electrofisiológica (medida como el aumento en la frecuencia de disparo) de las NEM permite demostrar la expresión de los receptores a histamina H2 y H3 en estas neuronas.
2. El receptor a histamina H3 al modular la frecuencia de disparo, actúa como un receptor postsináptico en las NEM.
3. La activación de receptores a histamina H2 en las NEM aumenta la frecuencia de disparo, alterando las dimensiones del postpotencial hiperpolarizante.
4. La activación de receptores a histamina H2 modula la actividad en las NEM por la participación de canales Cav1.

5. La activación de receptores a histamina H3 en las NEM genera un aumento en la frecuencia de disparo modificando la respuesta previa al umbral del potencial de acción.

6. La activación de receptores a histamina H3 modula su actividad en las NEM por la participación de conductancias diferentes a los canales Cav1.

## 10. LITERATURA CITADA

Adachi N., Itoh Y., Oishi R. y Saeki K., 1992. Direct evidence for increased continuous histamine release in the striatum of conscious freely moving rat produced by middle cerebral artery occlusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism.*, Issue 12, pp. 477-483.

Aquino-Miranda G., Molina-Hernández A. y Arias-Montaña JA. 2012. Regulación por receptores H3 a histamina de la liberación de neurotransmisores en los ganglios basales: implicaciones para la fisiología de la enfermedad de Parkinson. *Gaceta Médica de México.*, Volumen 148, pp. 467-75.

Arias-Montaña JA., Floran B., García M. y Aceves J. 2001. Histamine H3 receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D1 receptor-dependent release of [H3]-gamma-aminobutyric acid from rat striatal slices. *Br. J. Pharmacol.*, Issue 1.

Arias-Montaña JA. y Guerrero-Serna M.G., 1995. Neuromodulación: una nueva función para la histamina. *Rev Biomed*, Issue 6, pp. 222-236.

Bargas J. Ayala G.X., Vilchis C., Pineda J.C. y Galarraga E. 1999. Ca<sup>2+</sup>-activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience*, Issue 62, pp. 479-488.

Bargas J., Galarraga E. y Aceves J, 1989. An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Expe Brain Res.*, Issue 1, pp. 159-163.

Barral J. Galarraga E., Tapia D., Flores-Barrera E., Reyes A. y Bargas J. 2010. Dopaminergic modulation of spiny neurons in turtle striatum. *Cell Mol Neurobiol*, Issue 30, pp. 743-750.

- Bender K.J, Ford C.P. y Trussell L.O. 2010. Dopaminergic modulation of axon initial segment calcium channels regulates action potential initiation. *Neuron Cell Press.*, Issue 68, pp. 500-511.
- Bolam J. y Ellender T., 2015. Histamine and the striatum. *Neuropharmacology*, Volumen XXX, pp. 1-11.
- Brown R., Stevens D. y Hass H., 2000. The physiology of brain histamine. P. in *Neurobiology*, Issue 63, pp. 637-672.
- Cowden J., Zhang M., Dunford P. y Thurmond R., 2010. The histamine H4 receptor mediates inflammation and pruritus in Th2-dependent dermal inflammation. *Journal of Invest. Dermatology*, Volumen 130, pp. 1023-1034.
- Del Valle J. y Gantz I., 1997. Novel insights into histamine H2 receptor biology. *Am J Physiol*, Issue 273, pp. G987-996.
- Doreulee N., Yanovsky Y., Flahmeyer I., Stevens D.R., Haas H.L. y Brown R.E. 2001. Histamine H3 receptors depress synaptic transmission in the corticostriatal pathway. *Neuropharmacology*, Issue 40, pp. 106-113.
- Esbenshade T., Browman K.E., Bitner R.S., Strakhova M., Cowart M.D. y Brioni J.D. 2008. The histamin H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *British Journal of Pharmacology.*, Issue 154, pp. 1166-1181.
- Faber L. y Sah P. 2003. Calcium-activated potassium channels: Multiple contributions to neuronal function. *The neuroscientist.*, 9(3), pp. 181-194.
- Figuroa A., Galarraga E. y Bargas J. 2002. Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons. *Synapse.*, Issue 46, pp. 215-223.
- Foehring R.C., Mermelstein P.G., Song W.J. Ulrich S. y Surmeier D.J. 2000. Unique properties of R-type calcium currents in neocortical and neostriatal neurons. *Jn physiology*, pp. 2225-2236.
- García M., Floran B., Arias-Montaña J.A., Young, J.M. y 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*, Issue 80, pp. 241-249.

- Gonzalez, C., 2016. Tesis de Maestría: Canales de potasio que participan en la modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas al estriado por activación de receptores GABAérgicos. Mexico: UNAM.
- González-Sepúlveda M., Rosell S., Hoffmann H.M., Castillo-Ruiz M.M., Mignon V., Moreno-Delgado D., Vignes M., Díaz J., Sabriá J. y Ortiz J. 2013. Cellular distribution of the histamine H3 receptor in the basal ganglia: functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia*, Issue 3, pp. 109-121.
- Graybiel A., Aosaki T., Flaherty A. y Kimura M. 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, Volumen 265, pp. 1826-1831.
- Grillner S., Hellegren J., Menard A., Saitoh K. y Wikström M.A. 2005. Mechanisms for selection of basic motor program - roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci*, Volumen 28, pp. 364-370.
- Hammill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. y Sigwort F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluger Arch*. 391:85-100.
- Hammond C., 2008. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 3<sup>a</sup> ed. Academic Press.
- Hernández-López S., Bargas J., Reyes A. y Galarraga E. 1996. Dopamine modulates the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *Neuroreport*. 31; 7 (2): 454-456.
- Hernández-López S., Bargas J., Surmeier D.J. Reyes A. y Galarraga E. 1997. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J Neurosci*, 17(9), pp. 3334-3342.
- Hill S.J., Ganellin C.R., Timmerman H., Schwartz J.C., Shankley N.P., Young J.M., Schunack W., Levi R. y Haas L. 1997. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev*, 49, pp. 253-278.
- Igaz P., Hegyesi H. 2004. Histamine receptors: H1, H2, H3, H4 and the putative "Hic" (intracellular) receptor. Coding genes and gene products, "in silico" an experimental data. In: *Histamine: Biology and Medical Aspects*. Budapest, Basel: Karger, Springer Med Publishing. 69–77

- Inagaki N., Toda K., Taniuchi I., Panula P., Yamatodani A., Tohyama M., Watanabe T. y Wada H. 1990. An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the rat. *Exp Brain Res*, Issue 80, pp. 374-380.
- Jones B. y Kearns G. 2011. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clin. Pharmacol Ther*, Issue 89, pp. 189-197.
- Kandel ER. 2013. *Principles of the neural science*. 5ta edición. Mc Graw Hill.
- Kita T., Kita H. y Kitai S. 1984. Passive electrical membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res.*, Issue 300, pp. 129-39.
- Kita T., Kita H. y Kitai S. 1985. Effects of 4-Aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Research*, Issue 261, pp. 10-18.
- Kravitz A., Tye L. y Kreitzer A. 2012. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience*, 15, pp. 816-818.
- Kreitzer A.C. 2009. Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu. Rev. Neurosci.*, Issue 32, pp. 127-147.
- Lázár-Molnar E. 2004. Signal transduction pathways of histamine receptors. En: Falus A. (ed); Grosman N., Darvas Z (co-eds). *Histamine: Biological and Medical aspects*. SpringerMed publishing Ltd. 89-96
- Leurs R., Smith M. y Timmerman H. 1995. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther*, Issue 66, pp. 413-463.
- Lin J., Anaclet C., Sergeeva O. y Haas H., 2011. The waking brain: an update. *Cell. Mol. Life Sci.*, Issue 68, pp. 2499-2512.
- Maintz L., Kohei Y. y Yoh-Ichi S. 2006. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine system: organic cation transporter as a histamine transporter and histamine metabolism. *J Pharmacol Sci*, Issue 101, pp. 24-30.
- Maintz L. y Novak N. 2007. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr*, Issue 85, pp. 1185-1193.
- Marín O., Smeets W. y González A., 1998. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *TINS*, 21(11), pp. 487-494.

- Mermelstein P.G., Song W.J., Tkatch T., Yan Z. y Surmeier D.J. 1998. Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunits expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J. Neurosci.*, Issue 18, pp. 6650-6661.
- Miller, R.J. 1998. Presynaptic receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 201-227.
- Molina-Hernández A., Nuñez A., Sierra J.J. y Arias-Montaña J.A. 2001. Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology*, Issue 41, pp. 928-934.
- Munakata M. y Akaike N. 1994. Regulation of K<sup>+</sup> conductance by histamine H1 and H2 receptors in neurones dissociated from rat neostriatum. *J. Physiol.*, Issue 480 (Pt 2), pp. 233-245.
- Nestler E., Hyman S. y Malenka R., 2009. *Molecular neuropharmacology. A foundation for clinical neuroscience.* 2da edición ed. McGraw Hill.
- Nisenbaum E.S., Wilson C.J. y Surmeir D.J. Depolarization evokes a slowly-activating K<sup>+</sup> current in rat striatal neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 20. 564.
- Nisenbaum E.S. y Wilson C.J. 1995. Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J. Neurosci.* 15: 4449-4463.
- Nisenbaum E.S., Wilson, C.J., Foehring, R.C. y Surmeir, D.J. 1996. Isolation and characterization of a persistent potassium current in neostriatal neurons. *J. Neurosci.*, Issue 15, pp. 1180-1196.
- Otsu H., 2010. Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice. *Adv Exp Med Biol*, Issue 709, pp. 21-31.
- Palacios J.M., Wamsley J.K. y Kuhar M.J. 1981. The distribution of histamine H1 receptors in the rat brain: an autoradiographic study. *Neuroscience*, Volumen 6, pp. 15-37.
- Panula P., Chazot P.L., Cowart M., Gutzmer R., Leurs R., Liu W.L.S., Stark H., Thurmond R.L. y Haas H.L. 2015. *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors.* *Pharmacol. Rev.*, Issue 67, pp. 601-655.



- Park G.S., Olivas N.D., Ikrar T., Sanathara N.M., Wang L., Whang Z., Civelli O. y Xu X. 2014. Histamine inhibits the melanin-concentrating hormone system: implications for sleep and arousal. *J Physiol.*, Issue 592, pp. 2183-2196.
- Passani M. y Blandina P. 2011. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Cell Press*, 32(4), pp. 242-249.
- Paxinos G., 2015. *The rat nervous system*. 4ta ed. Londres. Academic press.
- Pérez-Garci E., Bargas J. y Galarraga E. 2003. The role of Ca<sup>2+</sup> in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport*, Issue 9, pp. 1253-1256.
- Peters A. y Palay S., 1996. *The morphology of synapses*. *Journal of Neurocytology*, Volumen 25, pp. 687-700.
- Pillot C., Heron A., Cochois V., Tardivel-Lacombe J., Ligneau X., Schwartz J.C. y Arrang J.M. 2002. A detailed mapping of the histamine H<sub>3</sub> receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*, Issue 114, pp. 173-193.
- Pineda J.C., Galarraga E., Bargas J., Cristancho M y Aceves J. 1992. Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *Journal of neurophysiology.*, 68(1), pp. 287-294.
- Ramos-Jiménez J., Garduño-Torres B. y Arias-Montaña J.A. 2009. Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed*, Issue 20, pp. 100-126.
- Reiner A., Medina L. y Veenman C., 1998. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res. Rev*, Volumen 114, pp. 235-285.
- Rollenhagen A. y Lübke J.H.R. 2006. The morphology of excitatory central synapses: From structure to function. *Cell Tissue Res.* Volumen 326, pp. 221-237.
- Sakurai, E. Sakurai E., Orelan L., Nishiyama S., Katto M., Watanabe T. y Yanai K. 2006. Evidence for the presence of histamine uptake into the synaptosomes of rat brain. *Pharmacology*, Issue 78, pp. 72-80.
- Saper C. y Lowell B. 2014. The hypothalamus. *Current Biology*, 24(3), pp. R1111-R1116.

- Schlicker E., Fink K., Detzner M. y Göthert M. 1993. Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H3 receptors. *Journal of Neural Transmission*. Issue 93, pp. 1-10.
- Schwartz J.C., Arrang J.M., Garbarjg M., Pollard H. y Ruat M. 1991. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev*, Issue 71, pp. 1-51.
- Sergeeva, O.A. Schulz D. Doreulee N., Ponomarenko A.A. Selbach O. Borsch E. Kircheis G., Huston J.P. Häussinger D. y Haas H.L. 2005. Deficits in corticostriatal synaptic plasticity and behavioral habituation in rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience*, Ponomarenko (134), pp. 1091-1098.
- Shahid M., Kardori N., Khan R. y Tripathi T. 2010. *Biomedical aspects of histamine. Current perspectives*. New York, USA.: Springer.
- Shen W., Hernandez-Lopez S., Tkatch T., Held J.E. y Surmeier D.J. 2004. Kv1.2-containing K<sup>+</sup> channels regulate subthreshold excitability of striatal medium spiny neurons. *Nat. Neurosci.*, Issue 10, pp. 1337-1349.
- Sitting N. y Davidowa H. 2001. Histamine reduces firing and bursting of anterior and intralaminar thalamic neurons and activates striatal cells in anesthetized rats.. *Behavioural Brain Research.*, Issue 124, pp. 137-143.
- Starodub A. y Wood J. 2000. Histamine suppresses A-type potassium current in myenteric neurons from guinea pig small intestine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294(2), pp. 555-561.
- Steiner H. y Tseng K., 2010. *Handbook of basal ganglia structure and function*. Academic Press.
- Takagi, H., Morishia Y., Matsuyama T., Hayashi H., Watanabe T. y Wada H. 1985. Histaminergic axons in the neostriatum and cerebral cortex of the rat: a correlated light and electron microscopin immunocytochemical study using histidine decarboxylase as a marker. *Brain Research*. Issue 364, pp. 114-123.
- Thakkar M.M. 2011. Histamine in the regulation of wakefulness. *Sleep Med Rev*, Issue 15, pp. 65-74.
- Theis A.K., Rózsa B., Katon G., Schmitz D. y Jochenning F.W. 2018. Voltage gated calcium channel activation by backpropagating action potential downregulates NMDAR function. *Front. Cell. Neurosci.*, 12(109), pp. 1-14.

- Thurmond R., Gelfand E. y Dunford P. 2008. The role of histamine H1 a H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov*, Issue 7, pp. 41-53.
- Tiligada E., Zampeli E., Sander K. y Stark H., 2009. Histamine H3 y H4 receptors as novel drug targets. *Expert Opin. Invest. Drugs.*, 18(10), pp. 1518-1533.
- Tkatch T., Baranauskas G. y Surmeier D., 2000. Kv4.2 mRNA abundance and A-type K(+) current amplitude are linearly related in basal ganglia and basal forebrain neurons. *J Neurosci*, Issue 20, pp. 579-588.
- Togias A., 2003. H1-receptor: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol*, Issue 112, pp. S60-68.
- Uchimira N., Cherubini E. y North R. 1989. Inward rectification in rat nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol.*, Issue 62, pp. 1280-1286.
- Vilchis C., Bargas J., Ayala G.X., Galván E. Galarraga E. 2000. Ca<sup>2+</sup> channels that activate Ca<sup>2+</sup>- dependent K<sup>+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience*, 552(1), pp. 745-752.
- Vizuete M.L., Traiffort E., Bouthenet M.L., Ruat M., Souil E., Tardivel-Lacombe J y Schwartz J.C. 1997. Detailed mapping of the histamine H2 receptor and its gene transcripts in guinea-pig brain. *Neuroscience*, (80), pp. 321-343.
- Wada H., Inagaki N., Yamatodani A. y Watanabe T. 1991. Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole brain activity? *Tren Neurosci*, Issue 14, pp. 415-418.
- Wilson, C., 2004. *Basal Ganglia*. 5ta Edición. University Press.
- Yin H. y Knowlton B., 2006. The role of basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurisci.*, Volumen 7, pp. 464-476.
- Yoshikawa, T., Naganuma F., Lida T., Nakamura., Harada R., Mohsen A.S., Kasajima A., Sasano H. Yanai K .2013. Molecular mechanism of histamine clearance by prymary human astrocytes. *Glia*, Issue 61, pp. 905-916.
- Zampeli E. y Tiligada E. 2009. The role of histamine H4 receptor in inmune and inflammatory disorders. *Br J Pharmacol*. 157: 24-33.

- Zhang M., Thurmond R.L. y Dunford P.J. 2007. The histamine H4 receptor: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Pharm and Therapeutics*, Issue 113, pp. 594-607.
- Zhou J., Lee A.W., Devidze N., Zhang Q., Kow L.M. Pfaff D.W. 2007. Histamine-induced excitatory responses in mouse ventromedial hypothalamic neurons: Ionic Mechanisms and estrogenic regulation. *J. Neurophysiol*, Issue 98, pp. 3143-3152.
- Zhuang Q.X., Xu H.T., Lu X.J., Li B., Young W.H., Wang J.J. y Zhu J.N. 2018. Histamine excites striatal dopamine D1 and D2 receptor-expressing neurons via postsynaptic H1 y H2 receptors. *Molecular Neurobiology*, pp. 1-12.

## 11. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

### 11.1. FIGURAS

Figura 1. Diagrama simplificado y modelo representativo de los ganglios basales y estructuras asociadas..	4
Figura 2. Síntesis y degradación de la histamina..	7
Figura 3. Localización topográfica de los grupos de neuronas histaminérgicas (E1 a E5) e inervación de axones a través del SNC..	9
Figura 4. Receptores para histamina y principales vías de transducción asociadas..	13
Figura 5. Propiedades electrofisiológicas de las NEM..	14
Figura 6. Conductancias asociadas a las propiedades electrofisiológicas de las NEM..	16
Figura 7. Presencia de los Canales Cav en las NEMs..	17
Figura 8. Expresión de receptores a histamina en el cuerpo estriado dorsal..	20
Figura 9. Respuesta electrofisiológica inducida por la histamina en neuronas colinérgicas del cuerpo estriado dorsal (CED)..	22
Figura 10. Acción de la histamina en las NEM del cuerpo estriado dorsal..	23

Figura 11. Obtención de datos en el potencial de acción (amplitudes y duración)..	29
Figura 12. Propiedades electrofisiológicas de las NEM registradas.....	31
Figura 13. Relación Corriente-Voltaje entre el control y el agonista de receptores a histamina H2..	33
Figura 14. Propiedad de la membrana subumbral de la activación de receptores histaminérgicos H2.....	34
Figura 15. Comparación de registros obtenidos mediante la rampa de corriente..	35
Figura 16. Efecto de la aplicación de Dimaprit (10 $\mu$ M) en NEMs.....	36
Figura 17. Efecto de la aplicación de Dimaprit (10 $\mu$ M) sobre el cambio de voltaje generado por la corriente de K <sup>+</sup> tipo IA..	37
Figura 18. Efecto de la aplicación de dimaprit (10 $\mu$ M) sobre el disparo de las NEM..	39
Figura 19. Relación Corriente-Voltaje entre el control y el agonista de receptores H3.....	40
Figura 20. Propiedad de la membrana subumbral de la activación de receptores a histamina H3..	41
Figura 21. Comparación de registros obtenidos mediante la rampa de corriente..	42
Figura 22. Efecto de la aplicación de immpip sobre la frecuencia de disparo en las NEM de la rata..	43
Figura 23. Efecto de la aplicación de immpip (1 $\mu$ M) sobre el cambio de voltaje generado por la corriente de K <sup>+</sup> tipo IA..	44
Figura 24. Efecto de la aplicación de immpip (1 $\mu$ M) sobre el disparo de las NEM..	45
Figura 25. Efecto del bloqueo inespecífico de los canales Cav sobre la activación de los receptores H2..	47
Figura 26. Efecto del bloqueo específico de los canales Cav1 sobre la activación de los receptores H2..	48
Figura 27. Efecto del bloqueo inespecífico de los canales Cav sobre la activación de los receptores H2..	50

Figura 28. Efecto del bloqueo específico de los canales Cav1 sobre la activación de los receptores H3.. .....	51
Figura 29. Efecto del bloqueo de los canales Cav1 sobre la activación de los receptores H3.....	52

## 11.2. TABLAS

Tabla 1. Expresión relativa de los receptores a histamina H1, H2, H3 y fibras provenientes del NTM presentes en algunos núcleos de los ganglios basales.....	19
Tabla 2. Fármacos utilizados.....	28
Tabla 3. Corriente inyectada para mantener el potencial a -80 mV.....	33
Tabla 4. Relación del potencial obtenido a los 150, 250 y 350 ms.....	37
Tabla 5. Efecto de la activación de receptores H2 sobre la amplitud y duración del potencial de acción y el postpotencial hiperpolarizante.....	38
Tabla 6. Efecto de la activación de receptores H3 sobre la amplitud y duración del potencial de acción y el postpotencial hiperpolarizante.....	45