

**Inhibición de la síntesis de neurotransmisor
en neuronas dopaminérgicas de los ganglios
basales. Localización celular del receptor H₃
de histamina.**

Marta González Sepúlveda

Universidad Autónoma de Barcelona, Junio 2011

Inhibición de la síntesis de neurotransmisor en neuronas dopaminérgicas de los ganglios basales. Localización del receptor H₃ de histamina.

Memoria presentada por Marta González Sepúlveda, Licenciada en Bioquímica y Biología Molecular, para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Bioquímica de la Facultad de Medicina del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, bajo la dirección del Doctor Jordi Ortiz de Pablo.

Dr. Jordi Ortiz de Pablo

Marta González Sepúlveda

Universidad Autónoma de Barcelona, Junio 2011

"Demasiado conocimiento nunca facilita soluciones sencillas."

Raphael Corrino (Brian Herbert)

AGRADECIMIENTOS

Todo tiene un principio, pero el de esta tesis no habría sido posible si el Dr. Jordi Ortiz no hubiese confiado en mí allá en el 2005 (sí que pasa rápido el tiempo) permitiéndome formar parte de su grupo. Por ello y por todo lo que me has enseñado en estos años, muchas gracias.

También quiero agradecer a la Dra. Pepi Sabrià su apoyo y esas largas charlas examinando los detalles hasta que quedaban claros. Además, quiero agradecerle los buenos ratos pasados organizando las prácticas de ayuno que han hecho que le empiece a coger el gusto a eso de dar clase.

A vosotros chicos: David y Santi por estos años de frente común contra el HPLC. Ya en serio, gracias por enseñarme tantas cosas y por ayudarme cuando lo necesitaba. Y a vosotras: Noora y Guofen, thank you for all those happy lunch times, even though they were at 12:00. Sin olvidarme de ti Mar, que tanta paciencia has tenido conmigo entre el criostato y microscopio, a ver si nos encontramos de nuevo en Avelmar.

Finalmente, a mi familia que siempre me ha apoyado y animado a pesar de la distancia que nos separa y a ti Alex, siempre centrado en la meta evitando así que me quedase por el camino. A todos vosotros, gracias.

Es mucha la gente que me ha ayudado a lo largo de estos años haciendo posible que finalmente haya terminado la tesis. Por eso, gracias a todos y sabed que aunque no os haya nombrado, no os olvido.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	pag. 1
INTRODUCCIÓN	pag. 3
1. Estructura y función de los ganglios basales	pag. 5
1.1. Subestructuras y tipos neuronales del cuerpo estriado	pag. 5
1.1.1. Neuronas GABAérgicas de proyección	pag. 6
1.1.2. Interneuronas	pag. 8
1.1.2.1. Interneuronas colinérgicas	pag. 9
1.1.2.2. Interneuronas GABAérgicas	pag. 9
1.1.3. Astrocitos	pag. 10
1.2. Tipos neuronales de la substantia nigra	pag. 11
1.2.1. Neuronas dopaminérgicas de la SN	pag. 12
1.2.2. Neuronas GABAérgicas de la SN	pag. 12
1.3. Circuito motor de los ganglios basales	pag. 13
1.3.1. Participación de los ganglios basales en el movimiento voluntario	pag. 14
1.4. Circuito límbico de los ganglios basales	pag. 15
1.4.1. Estructura y tipos neuronales del córtex medial prefrontal	pag. 16
1.4.1.1. Neuronas glutamatérgicas excitadoras	pag. 17
1.4.1.2. Neuronas GABAérgicas inhibitoras	pag. 17
1.4.2. Estructura y tipos neuronales del área tegmental ventral	pag. 18
1.4.2.1. Neuronas GABAérgicas de la VTA	pag. 19
2. Sistemas neuronales dopaminérgicos	pag. 20
2.1. Vías de proyección dopaminérgicas	pag. 20
2.2. Metabolismo de la dopamina	pag. 21
2.2.1. Características y regulación de la tirosina hidroxilasa	pag. 23
2.2.1.1. Regulación de la TH por fosforilación	pag. 24

2.2.1.2. Regulación de la TH por retroinhibición	pag. 25
2.3. Receptores de dopamina	pag. 26
2.3.1. Familia D ₁ de receptores de dopamina	pag. 27
2.3.2. Familia D ₂ de receptores de dopamina	pag. 27
2.4. Funciones de la dopamina	pag. 28
2.4.1. Papel de la dopamina en la locomoción	pag. 28
2.4.1.1. Patología asociada: Parkinson	pag. 29
2.4.2. Papel de la dopamina en el mecanismo de la recompensa	pag. 30
2.4.2.1. Patología asociada: adicción	pag. 31
2.4.2.2. Patología asociada: esquizofrenia	pag. 33
3. El sistema histaminérgico	pag. 34
3.1. Vías de proyección	pag. 34
3.2. Metabolismo de la histamina	pag. 35
3.3. Receptores de histamina	pag. 35
3.3.1. Receptor H ₁ de histamina	pag. 36
3.3.2. Receptor H ₂ de histamina	pag. 37
3.3.3. Receptor H ₃ de histamina	pag. 37
3.3.4. Receptor H ₄ de histamina	pag. 38
3.4. Funciones de la histamina	pag. 38
3.4.1. La histamina en el Parkinson	pag. 39
3.4.2. La histamina en la adicción	pag. 40
3.4.3. La histamina en la esquizofrenia	pag. 41
 OBJETIVOS GENERALES	 pag. 43
1. Objetivos generales	pag. 44
METODOLOGÍA	pag. 47
1. Animales	pag. 49
2. Histoquímica	pag. 49
2.1. Reactivos y materiales	pag. 49

2.2.Sondas de cRNA	pag. 49
2.3.Inmunofluorescencia	pag. 51
2.3.1. Sistema de amplificación de la TSA	pag. 52
2.4.Congelado, corte y recuperación de secciones de cerebro de 10µm de espesor	pag. 53
2.5.Doble hibridación in situ fluorescente	pag. 54
2.5.1. Prehibridación	pag. 54
2.5.2. Hibridación de las sondas de cRNA	pag. 55
2.5.3. Posthibridación	pag. 55
2.5.4. Detección de la FISH	pag. 56
2.6. Hibridación in situ radioactiva (³³ P)	pag. 57
2.6.1. Prehibridación	pag. 57
2.6.2. Hibridación de las sondas de cRNA	pag. 57
2.6.3. Posthibridación	pag. 57
2.6.4. Exposición	pag. 57
2.6.5. Revelado	pag. 58
2.6.6. Cuantificación	pag. 58
2.7. Doble inmunohistoquímica fluorescente	pag. 58
2.7.1. Bloqueo e incubación con los anticuerpos primarios	pag. 58
2.7.2. Detección de la inmunohistoquímica fluorescente	pag. 59
2.8.Fotografiado	pag. 60
3. Autoadministración de cocaína en rata	pag. 60
3.1.Reactivos y materiales	pag. 60
3.2.Animales	pag. 61
3.3.Cámaras de autoadministración operante	pag. 61
3.4.Entrenamiento de refuerzo por sacarosa	pag. 62
3.5.Implantación quirúrgica del catéter	pag. 63
3.6.Autoadministración de cocaína	pag. 63
3.6.1. Grupo experimental del procedimiento de autoadministración	pag. 64

4. Determinación de la síntesis de [³H]-Dopamina en miniprismas de estriado	pag. 65
4.1.Reactivos y materiales	pag. 65
4.1.1. Tampones y fases móviles	pag. 65
4.2.Purificación de la L-[3-5- ³ H]-tirosina comercial	pag. 66
4.3.Obtención de los miniprismas de estriado de rata	pag. 66
4.4.Incubación de las muestras para la síntesis de [³ H]-DA	pag. 67
4.5.Desproteización y preparación de las muestras	pag. 68
4.6.Determinación de la cantidad de proteína	pag. 69
4.7.Purificación de la [³ H]-DA por HPLC	pag. 69
4.8.Determinación de las dpm [³ H]-DA	pag. 71
4.9.Cálculos del porcentaje de [³ H]-DA sintetizada	pag. 71
5. Determinación de la síntesis de ³H-L-DOPA en homogenado de estriado	pag. 73
5.1.Reactivos y materiales	pag. 73
5.1.1. Tampones y fases móviles	pag. 73
5.2.Incubación y homogenización de las muestras	pag. 73
5.3.Desproteización y preparación de las muestras	pag. 74
RESULTADOS	pag. 75
Capítulo 1: Distribución del receptor H₃ de histamina en el núcleo estriado y mesencéfalo	pag. 77
1.1. Objetivos	pag. 77
1.2. Resultados	pag. 79
1.2.1. Controles negativos para el procedimiento de inmunohistoquímica fluorescente	pag. 79

1.2.2. ARTÍCULO 1: Cellular distribution of the Histamine H ₃ receptor in the basal ganglia: functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission	pag. 80
1.3. Conclusiones del capítulo 1	pag. 111
Capítulo 2: Efectos de la autoadministración crónica de cocaína en rata sobre la expresión de los mRNA del H₃R y la TH.	pag. 113
2.1. Objetivos	pag. 113
2.2. Resultados	pag. 114
2.2.1. Efecto sobre el número de neuronas TH positivas	pag. 114
2.2.2. Efecto sobre el porcentaje de colocación de los mRNA de TH y H ₃ en la región del mesencéfalo	pag. 114
2.2.3. Efecto sobre la cuantificación del mRNA del H ₃ R en córtex y cuerpo estriado.	pag. 115
2.3. Discusión	pag. 116
2.4. Conclusiones del capítulo 2	pag. 118
Capítulo 3: Regulación de la tirosina hidroxilasa por retroinhibición de la dopamina en miniprismas de núcleo estriado	pag. 119
3.1. Objetivos	pag. 119
3.2. Resultados	pag. 120
3.2.1. La degradación por acción de la MAO no es responsable de la disminución de la velocidad de síntesis de DA durante el tiempo de incubación	pag. 120
3.2.2. ARTÍCULO 2: Dual regulation of brain striatal dopamine synthesis by enzymatic end-product feedback inhibition.	pag. 122
3.3. Conclusiones del capítulo 3	pag. 141
DISCUSIÓN GENERAL	pag. 145
CONCLUSIONES GENERALES	pag. 155
BIBLIOGRAFÍA	pag. 159
APÉNDICE	pag. 175

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Localización del estriado dorsal y ventral en el cerebro de rata	pag. 5
FIGURA 2. Vías de proyección directa e indirecta de las MSN	pag. 7
FIGURA 3. Down- y Up-state de las MSN	pag. 8
FIGURA 4. Interneuronas colinérgicas	pag. 9
FIGURA 5. Interneuronas GABAérgicas	pag. 10
FIGURA 6. Localización de la <i>substantia nigra</i> en el cerebro de rata	pag. 11
FIGURA 7. Organización general de las estructuras implicadas en el control motor	pag. 13
FIGURA 8. Circuito motor de los ganglios basales	pag. 14
FIGURA 9. Circuito límbico de los ganglios basales.	pag. 16
FIGURA 10. Localización del córtex medial prefrontal en el cerebro de rata.	pag. 16
FIGURA 11. Diferentes estructuras somáticas de las interneuronas GABAérgicas del córtex.	pag. 18
FIGURA 12. Localización del área tegmental ventral en el cerebro de rata.	pag. 18
FIGURA 13. Morfología y tamaño de los somas neuronales de la VTA	pag. 19
FIGURA 14. Principales aferentes y eferentes de la VTA	pag. 20
FIGURA 15. Esquema de un cerebro de rata mostrando en el plano sagital las principales vías dopaminérgicas	pag. 21
FIGURA 16. Metabolismo de la dopamina	pag. 22
FIGURA 17. Proteín quinasas y fosfatasas que regulan la actividad de la tirosina hidroxilasa <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	pag. 24
FIGURA 18. Respuesta del sitio de baja afinidad al nivel citosólico de dopamina	pag. 26
FIGURA 19. Clasificación, localización y caracterización de los receptores de dopamina	pag. 28

FIGURA 20. Esquema del efecto hipoquinético causado por la degeneración de las neuronas de la vía nigrostriatal debido al Parkinson	pag. 30
FIGURA 21. Flujo y transformación de la señal codificada por el sistema dopaminérgico	pag. 31
FIGURA 22. Acción de diversas drogas de abuso en el circuito de la recompensa	pag. 32
FIGURA 23. Vías de proyección histaminérgicas en el SNC humano	pag. 34
FIGURA 24. Metabolismo de la histamina	pag. 35
FIGURA 25. Señalización de los receptores de histamina	pag. 36
FIGURA 26. Localización de las isoformas activas del H ₃ R de rata	pag. 37
FIGURA 27. Funciones de los receptores de histamina	pag. 39
FIGURA 28. Secuencia de cDNA del H ₃ R complementaria a la de la sonda utilizada	pag. 50
FIGURA 29. Secuencia de cDNA de la PE complementaria a la de la sonda utilizada	pag. 50
FIGURA 30. Secuencia de cDNA de la SP complementaria a la de la sonda utilizada	pag. 51
FIGURA 31. Secuencia de cDNA de la TH complementaria a la de la sonda utilizada	pag. 51
FIGURA 32. Inmunofluorescencia	pag. 52
FIGURA 33. Sistema de amplificación de la TSA	pag. 53
FIGURA 34. Corte del cerebro de rata en el interior del criostato	pag. 53
FIGURA 35. Método de Nissl para la obtención del corte de nivel.	pag. 54
FIGURA 36. Cámara de condicionamiento operante.	pag. 62
FIGURA 37. Implantación quirúrgica del catéter.	pag. 63
FIGURA 38. Autoadministración de cocaína	pag. 63
FIGURA 39. Estabilidad de la autoadministración de cocaína	pag. 64
FIGURA 40. Grupo experimental del procedimiento de autoadministración.	pag. 65

FIGURA 41. Obtención de miniprismas de estriado de rata.	pag.67
FIGURA 42. Diseños experimentales para la determinación de la síntesis de dopamina en miniprismas de estriado de rata.	pag. 68
FIGURA 43. Esquema del sistema de purificación por HPLC	pag. 69
FIGURA 44. Esquema del mecanismo de retención de la columna cromatográfica del sistema de HPLC	pag. 70
FIGURA 45. Cromatograma típico de la dopamina sintetizada en una muestra de estriado de rata	pag. 70
FIGURA 46. Esquema temporal de la radioactividad presente a lo largo de un cromatograma de dopamina.	pag. 71
FIGURA 47. Cálculo del porcentaje de [³ H]-DA sintetizada en miniprismas de estriado de rata	pag. 72
FIGURA 48. Diseño experimental para la determinación de la síntesis de L-DOPA en homogenados de estriado de rata.	pag. 74
FIGURA 49. Controles negativos para el procedimiento de inmunohistoquímica fluorescente	pag. 79
FIGURA 50. La autoadministración de cocaína no produce cambios en el número de neuronas TH positivas de la SNc y VTA	pag. 114
FIGURA 51. La autoadministración de cocaína no produce cambios en el porcentaje de colocalización H ₃ R -TH en neuronas de la SNc y VTA entre animales control y animales que se autoadministran cocaína.	pag. 115
FIGURA 52. La autoadministración de cocaína provoca una disminución de un ≈10% de la expresión del mRNA del H ₃ R en mPFC y cuerpo estriado.	pag. 116
FIGURA 53. La degradación por acción de la MAO no es responsable de la disminución de la velocidad de síntesis de dopamina.	pag. 121
Tabla 1. Anticuerpos primarios del procedimiento de inmunohistoquímica.	pag. 59
Tabla 2. Sistemas de detección del procedimiento de inmunohistoquímica.	pag. 59

ABREVIATURAS

AC: ademilato ciclasa

Acb: nucleus accumbens

BH₄: tetrahidrobiopterina

CHAT: colina acetiltransferasa

DA: dopamina

FISH: hibridación in situ fluorescente

FR: razón fija

GABA: ácido γ -aminobutírico

GAD: ácido glutámico deshidrogenasa

GFAP: proteína acídica fibrilar glial

GPe: globus pallidus segmento externo

GPI: globus pallidus segmento interno

H₃R: receptor H₃ de histamina

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina

MAO: monoamino oxidasa

mPFC: córtex medial prefrontal

MSN: médium spiny neurons

NSD1015: 5-hidroxibenzilhidracina

PD: enfermedad de Parkinson

PE: proencefalina

SNc: substantia nigra pars compacta

SNI: substantia nigra pars lateralis

SNr: substantia nigra pars reticulata

SP: substancia P

SSC: sodium saline citrate

TBS: tampón tris salino

TCA: ácido tricloroacético

TCP: tranylcypromine

TH: tirosina hidroxilasa

TKR: tampón Krebbs-Ringer

TM: núcleo tuberomamilar

TSA: tyramide signal amplification

VGLUT: transportador vesicular de glutamato

VMAT2: transportador vesicular de monoaminas 2

VTA: área tegmental ventral

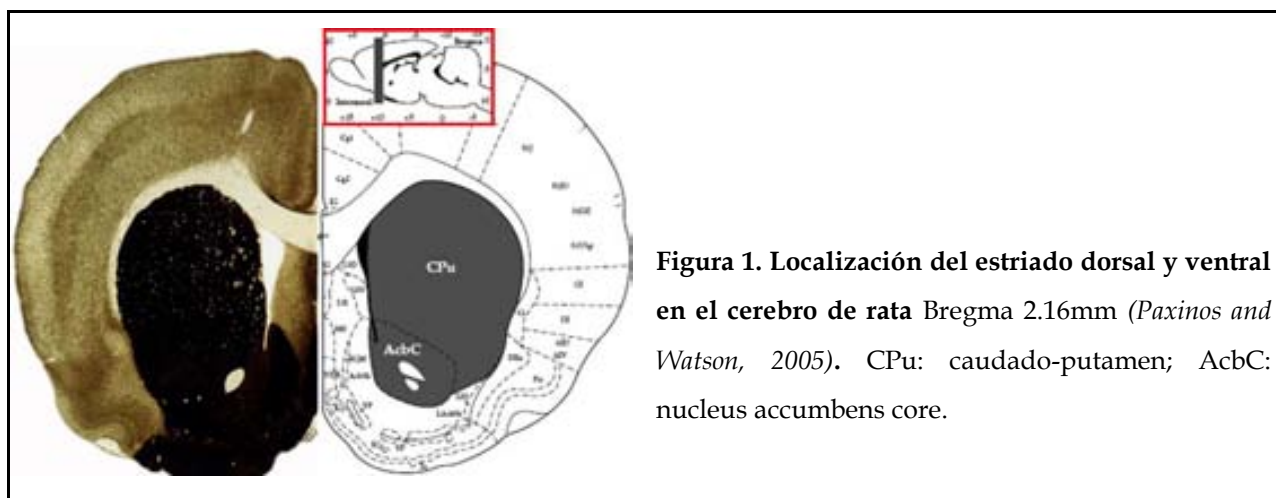
INTRODUCCIÓN

1. Estructura y función de los ganglios basales.

Los ganglios basales constituyen una gran estructura subcortical cuya principal función es la de conectar el córtex cerebral con los sistemas neurales que efectuarán la conducta. Está compuesta por núcleos interconectados, incluyendo: el estriado (caudado, putamen y *accumbens*, Acb), el núcleo subtalámico, el *globus pallidus* (segmentos interno, GPi, externo, GPe, y pálido ventral) y la sustancia nigra (*pars compacta*, SNc, o *pars reticulata*, SNr).

1.1. Subestructuras y tipos neuronales del cuerpo estriado

El estriado, en la rata, es una gran masa grisácea que ocupa la parte más profunda del hemisferio cerebral. Su principal función es la de actuar como filtro de numerosos *inputs* corticales topográficamente organizados y de una batería de aferentes subcorticales. Está constituido por el estriado dorsal y el estriado ventral (**Fig. 1**).



El **estriado dorsal o neostriado** es la parte motora del cuerpo estriado, relacionada con las funciones motoras voluntarias. Participa en la iniciación y producción de la conducta motora entre otras funciones y en el desarrollo de la adicción. Comprende los núcleos caudado y putamen que en roedores constituyen una única estructura, el caudado-putamen. Es inervado principalmente por los córtex motor primario, anterior premotor y cingulado, la SNc y el núcleo retrorubral. A su vez, proyecta al GP, la SN y al núcleo retrorubral (David et al 2005).

El **estriado ventral** está formado principalmente por el núcleo accumbens, el cual puede dividirse a su vez en dos grandes regiones: el *core* (de carácter motor) y la *shell* (de carácter límbico). Constituye la parte límbica del cuerpo estriado y actúa como una interfaz entre los sistemas límbico y motor, pues juega un papel crucial en las conductas motivadas así como en el desarrollo y expresión de la adicción. Recibe *inputs* de numerosas áreas prefrontales, del hipocampo, de la amígdala, del área tegmental ventral (VTA) y del núcleo retrorubral. Envía sus proyecciones al pálido ventral, a la SN, al núcleo retrorubral, a la VTA y al hipotálamo (David et al 2005).

Aunque ambas divisiones difieren en el tipo de información procesada y la topografía particular de sus eferentes, comparten numerosas características neuroquímicas y de citoarquitectura, de tal modo que tanto en el estriado dorsal como en el ventral podemos encontrar las siguientes poblaciones celulares: neuronas GABAérgicas de proyección, interneuronas y astrocitos.

1.1.1. Neuronas GABAérgicas de proyección (MSN)

Se trata del grupo más numeroso, pues constituyen el 90-95% del total de neuronas estriatales. Su cuerpo celular mide unas 10-20 μ m de diámetro y tienen largos árboles dendríticos. Utilizan ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor y liberan diferentes tipos de neuropéptidos. Así pues, en función de su diana de proyección y las proteínas que expresan, se pueden diferenciar en al menos dos grandes poblaciones morfológicamente indistinguibles que no se encuentran topográficamente segregadas (**Fig. 2**).

Las **MSN estriatopalidales** están enriquecidas en el neuropéptido encefalina y los receptores D₂ de dopamina y A_{2a} de adenosina. Sus proyecciones constituyen la “vía indirecta” pues la SNr es alcanzada a través de relevos sinápticos en el GPe (núcleo al que proyectan) y en el núcleo subtalámico. (Sonomura 2007).

Las **MSN estriatonigrales** expresan los neuropéptidos dinorfina, sustancia P y los receptores D₁ de dopamina y M₄ de acetilcolina. Proyectan sin relevos a la SNr y al GPi en la comúnmente llamada “vía directa”.

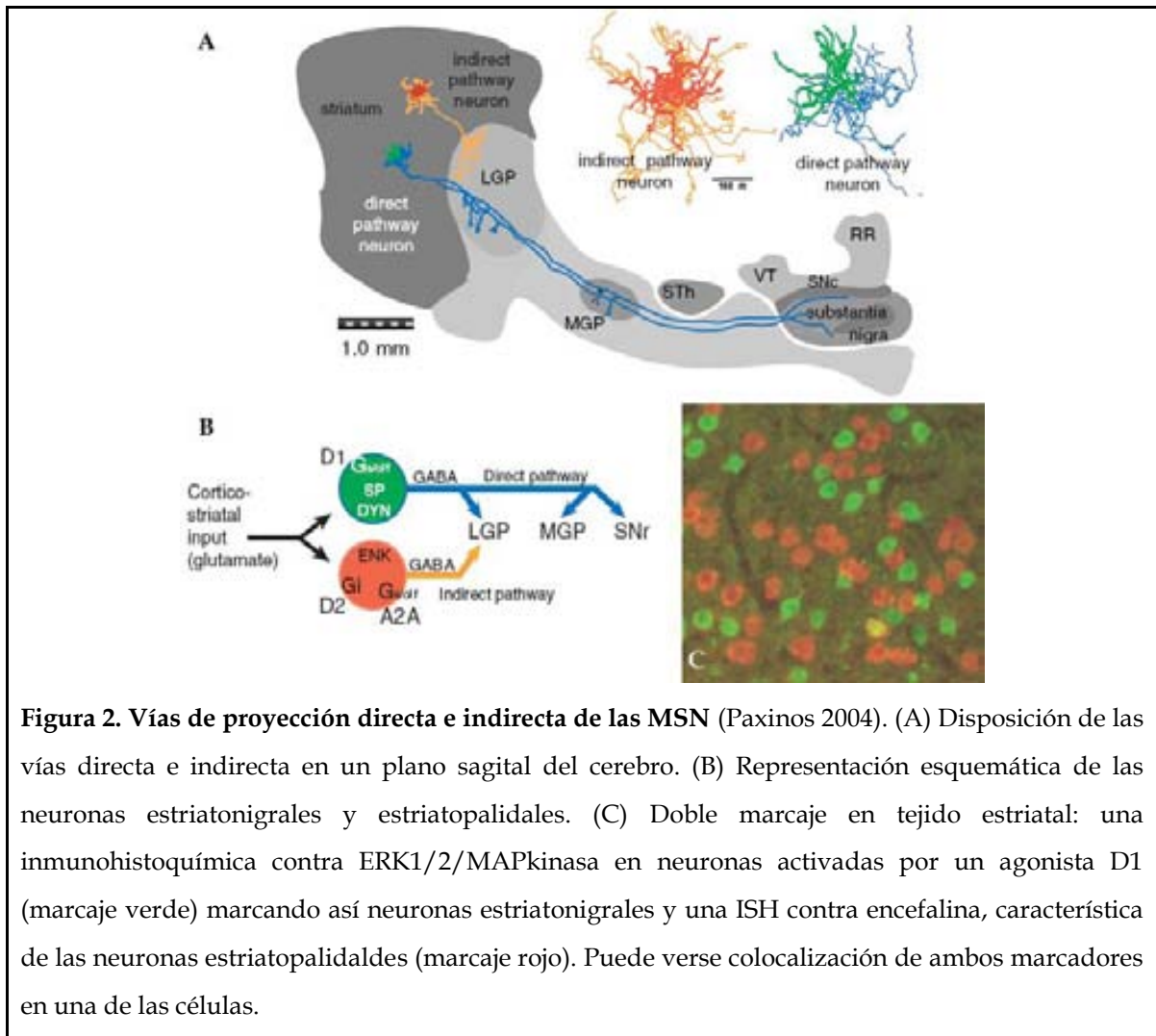
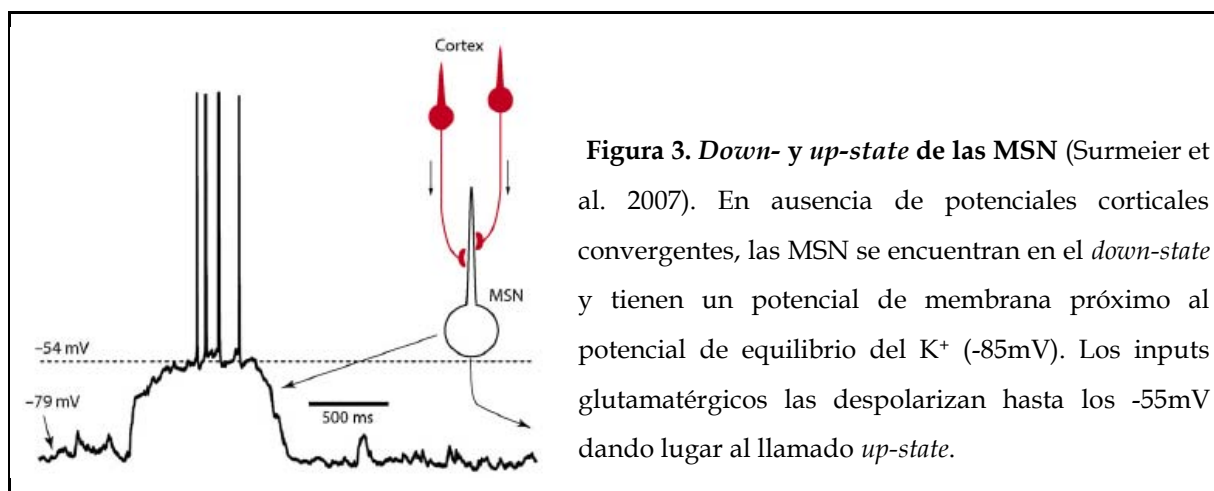


Figura 2. Vías de proyección directa e indirecta de las MSN (Paxinos 2004). (A) Disposición de las vías directa e indirecta en un plano sagital del cerebro. (B) Representación esquemática de las neuronas estriatonigrales y estriatopalidales. (C) Doble marcaje en tejido estriatal: una inmunohistoquímica contra ERK1/2/MAPkinasa en neuronas activadas por un agonista D1 (marcaje verde) marcando así neuronas estriatonigrales y una ISH contra encefalina, característica de las neuronas estriatopalidales (marcaje rojo). Puede verse colocalización de ambos marcadores en una de las células.

El grado de segregación de estas dos poblaciones ha sido muy cuestionado, pues en numerosos estudios se discute acerca del nivel variable de colocalización entre los receptores D₁ y D₂ de dopamina (Nieoullon 2002). Actualmente, se acepta la existencia de una tercera población de MSN que expresa conjuntamente ambos receptores (Aizman et al. 2000, Wise et al. 2002) y que constituye del 5 al 15% de las neuronas del estriado dorsal (Valjent et al 2009) y que también está presente en el estriado ventral (Perreault et al. 2010). Por otro lado, se ha detectado la presencia de dos poblaciones adicionales: (1) una que proyecta principalmente a la SNc y donde la sustancia P (SP) y la proencefalina (PE) colocalizan (Wang 2007), que podría corresponder o no a aquella donde colocalizan D₁ y D₂ y (2) otra que proyecta a la sustancia innominata y que produce neurokinina B en lugar de SP o PE (Sonomura 2007).

Las MSN constituyen el *output* del estriado, enviando proyecciones axonales al GP y SN. Además presentan numerosas colaterales axónicas locales que inhiben a las neuronas vecinas pero que ocasionalmente viajan cierta distancia dentro del estriado (Kawaguchi 1990). Por este motivo, poseen características tanto de neuronas de proyección como de interneuronas.

Normalmente se mantienen en un estado hiperpolarizado (llamado *Down-state*) debido a canales de K^+ rectificadores de corriente que se mantienen abiertos en condiciones de hiperpolarización. Sin embargo, un estado intermedio más despolarizado (llamado *Up-state*) puede ser alcanzado por medio de *inputs* corticales y talámicos sincronizados, de carácter glutamatérgico (Surmeier et al. 2007) (**Fig. 3**). Una vez en este estado, estímulos excitadores adicionales pueden alcanzar el umbral de disparo y activar la neurona. Esto implica que la mayoría de las señales débiles y asincrónicas procedentes de diversas áreas corticales serán filtradas mientras que las señales más fuertes y sincronizadas pasarán a través del estriado a los núcleos efectores de los ganglios basales. Además, la actividad de las MSN es modulada por la actividad de las interneuronas GABAérgicas y colinérgicas y por las proyecciones dopaminérgicas procedentes de la SNc.



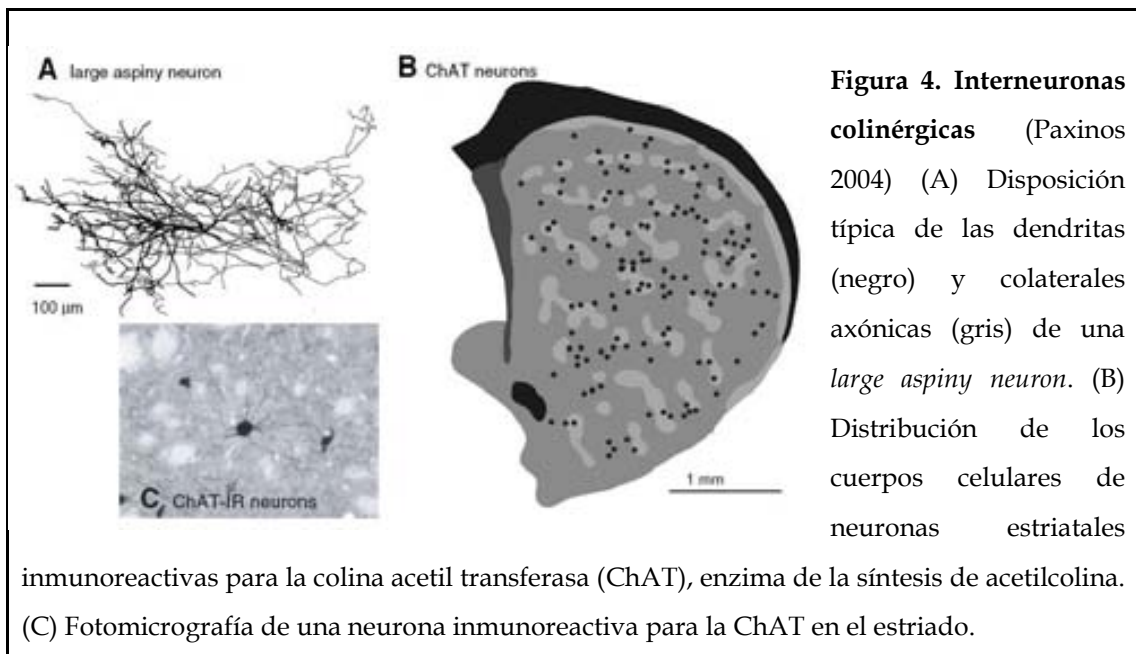
1.1.2. Interneuronas

A pesar de ser infrecuentes (en su conjunto sólo constituyen el 5-10% del total de neuronas del estriado), comprenden dos tipos morfológica, histoquímica y neuroquímicamente definidos (Kawaguchi 1993). No tienen axones que

proyecten fuera del estriado pero sí distribuyen sus axones a lo largo de dicha región haciendo contacto, en su mayoría, con las MSN.

1.1.2.1. Interneuronas colinérgicas (*large aspiny neurons*)

Interneuronas que usan acetilcolina como neurotransmisor y que constituyen el 1-2% del total de neuronas estriatales en la rata aunque su número varía en función de la subregión estriatal (**Fig. 4**). Tienen un soma muy grande, de unas 20-50 μm de diámetro, desde el que se extienden de dos a cinco largas dendritas sin espinas sin una orientación aparente (Kawaguchi 1997). Además, presentan extensas colaterales axónicas en el estriado que terminan en las MSN de las que reciben, a su vez, un *input*. Por otra parte, también reciben aferentes corticales (Centonze et al 1999), talámicas y dopaminérgicas por lo que se ha sugerido que juegan un papel importante en la integración de las aferentes estriatales y en la modulación del *output* estriatal.

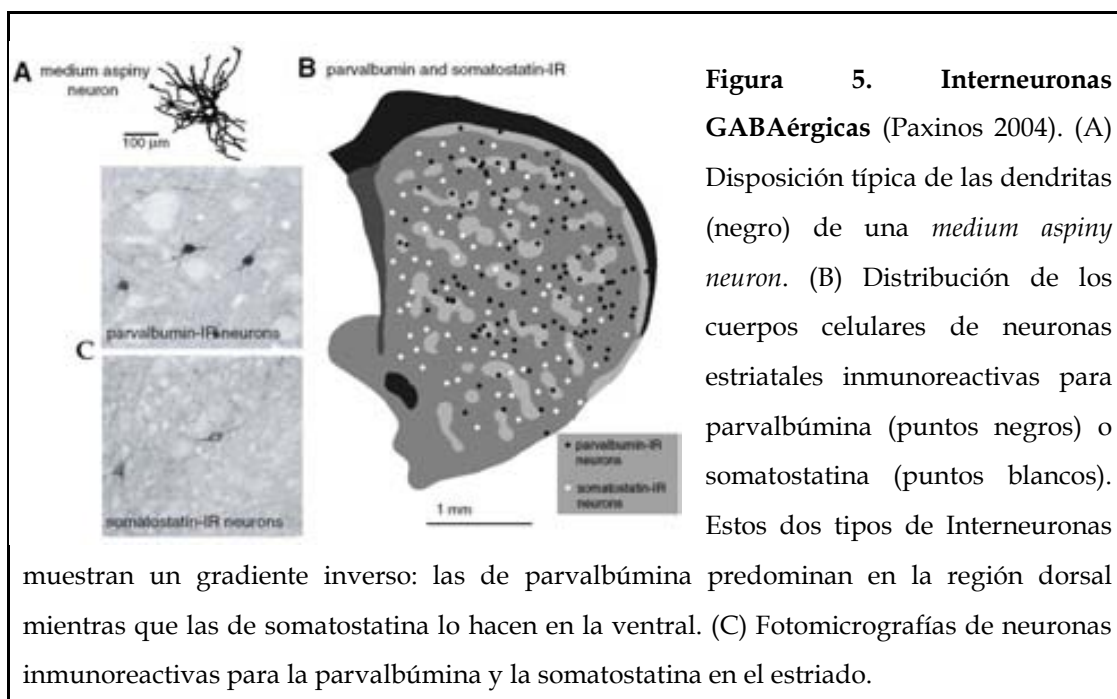


1.1.2.2. Interneuronas GABAérgicas (*medium aspiny neurons*)

Constituyen el segundo mayor grupo de interneuronas estriatales y presentan un soma fusiforme o poligonal de tamaño medio, 10-35 μm de

diámetro. A pesar de que también utilizan GABA como neurotransmisor principal, difieren de las MSN en la isoforma del enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) utilizada: mientras las neuronas de proyección emplean la isoforma GAD65, las interneuronas utilizan la GAD67. Pueden diferenciarse dos tipos principales (Kawaguchi 1997) (**Fig. 5**):

- 1- Las que expresan proteínas de unión a calcio como la parvalbúmina.
- 2- Las que liberan óxido nítrico, somatostatina y neuropéptido Y.



1.1.3. Astrocitos

Los astrocitos son las células más abundantes del sistema nervioso central y son cruciales para su correcto funcionamiento pues, entre otras funciones, proporcionan a las neuronas substratos energéticos y producen precursores de neurotransmisores (Kirchhoff 2001). Al mismo tiempo expresan receptores funcionales de neurotransmisores, como: glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos, muscarínicos e histaminérgicos, los cuales permiten a los astrocitos responder a la actividad neuronal (Shelton and McCarthy 1999, 2000).

Morfológicamente pueden distinguirse dos tipos principales de astrocitos: fibrosos y protoplásmicos. Los **astrocitos protoplásmicos** se encuentran en la

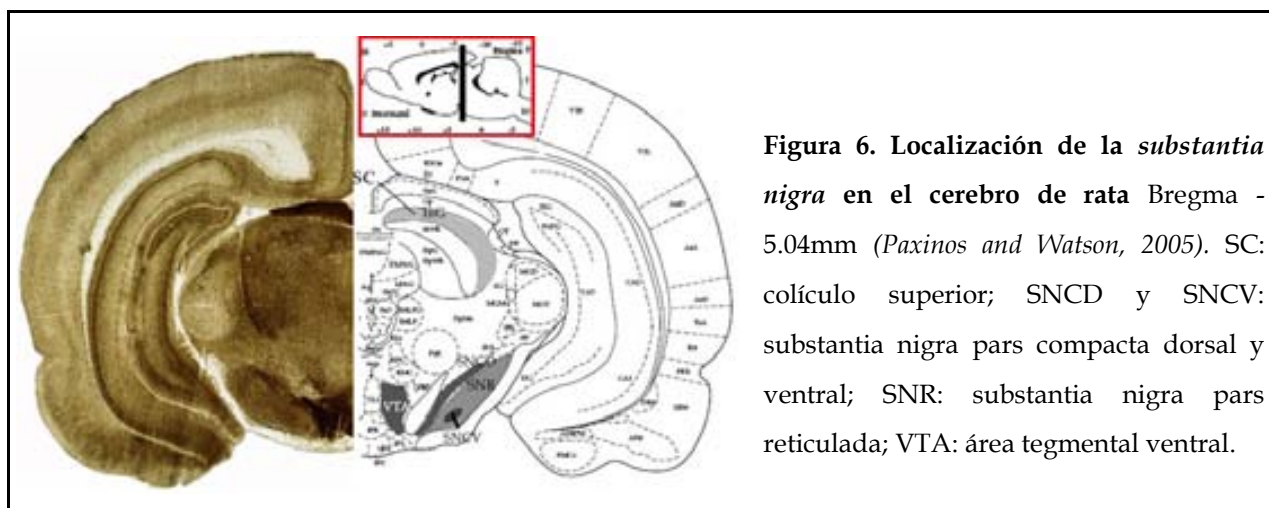
substancia gris y su morfología muestra procesos cortos muy ramificados distribuidos de un modo globoide uniforme.

Los **astrocitos fibrosos** se encuentran en la substancia blanca y se presentan menos procesos poco ramificados en comparación con los protoplasmáticos pero más largos y grandes que se extienden simétricamente desde el cuerpo celular.

Ambos tipos contienen ovillos de filamentos intermedios, compuestos principalmente por proteína ácida fibrilar glial (GFAP), aunque estos son más numerosos en los astrocitos fibrosos (Panickar and Norenberg 2005), motivo por el cual la GFAP se ha establecido como marcador tradicional de astrocitos. Sin embargo, la GFAP se encuentra normalmente (en condiciones no patológicas) expresada a bajos niveles por lo que no permite la detección del número total de astrocitos (Savchenko et al. 2000). Dado que la GFAP es esencial para los procesos de astrogliosis reactiva y de formación de la cicatriz glial (Sofroniev and Vinters 2010), su nivel se ve incrementado convirtiéndola así en un buen marcador para el estudio de lesiones.

1.2. Tipos neuronales de la substancia nigra.

La SN (**Fig. 6**) es probablemente el área más estudiada de los ganglios basales. Está compuesta por diversos elementos neuroquímicos y funcionalmente interrelacionados: la *substancia nigra pars compacta*, la *pars reticulata* y la *pars lateralis* (SNl).



Las neuronas que la constituyen no pueden distinguirse morfológicamente y, en general, tienen un soma irregular de tamaño medio-grande del que radian de 2 a 4 dendritas principales (que se dividirán en ramas secundarias y terciarias cubriendo así un gran área). Estas neuronas, sin embargo, sí pueden diferenciarse en función del neurotransmisor que emplean, dando lugar a dos tipos principales: las dopaminérgicas y las GABAérgicas.

1.2.1. Neuronas dopaminérgicas de la SN.

Aunque se pueden encontrar agrupaciones en la SNr ($8\pm 5\%$ del total de neuronas, Margolis et al. 2006) o en la SNl, las neuronas dopaminérgicas se encuentran principalmente en la SNc ($88\pm 2\%$, Margolis et al. 2006) donde están altamente empaquetadas y se conocen como la población A9. Se caracterizan por tener amplios potenciales de acción, una lenta conducción axonal, una baja tasa de disparo y por una corriente de cationes inespecífica tras la hiperpolarización (I_h) (Fields et al. 2007). Proyectan al caudado-putamen (constituyendo la vía nigrostriatal) con una topografía inversa dorsal-ventral (Haber 2000), por lo que se encuentran en posición de modular la actividad entre circuitos. Se consideran cruciales para la adquisición de nuevas conductas aprendidas (Yamaguchi and Kobayashi 1998).

1.2.2. Neuronas GABAérgicas de la SN.

Se encuentran principalmente en la SNr, no tan densamente empaquetadas como las neuronas de la SNc. Se caracterizan por tener un potencial de acción más corto, una más rápida conducción axonal, una elevada tasa de disparo y carecer de I_h (Fields et al. 2007). Proporcionan sinapsis inhibitoras locales a la SNr y a la SNc y envían proyecciones inhibitoras al tálamo y al colículo superior (Lin et al 2010). A su vez reciben *inputs* inhibitoras GABAérgicas del estriado y del globo pálido lateral e *inputs* excitadores glutamatérgicos del núcleo subtalámico.

1.3. Circuito motor de los ganglios basales

Los circuitos neurales responsables del control del movimiento pueden organizarse en cuatro subsistemas distintos pero altamente interrelacionados (**Fig. 7**):

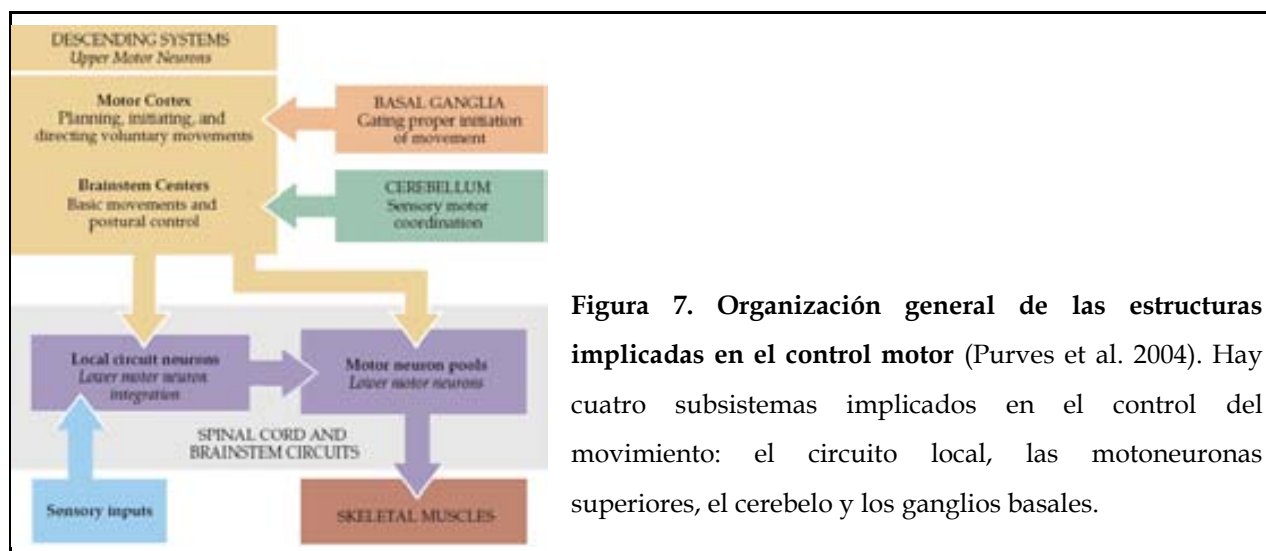


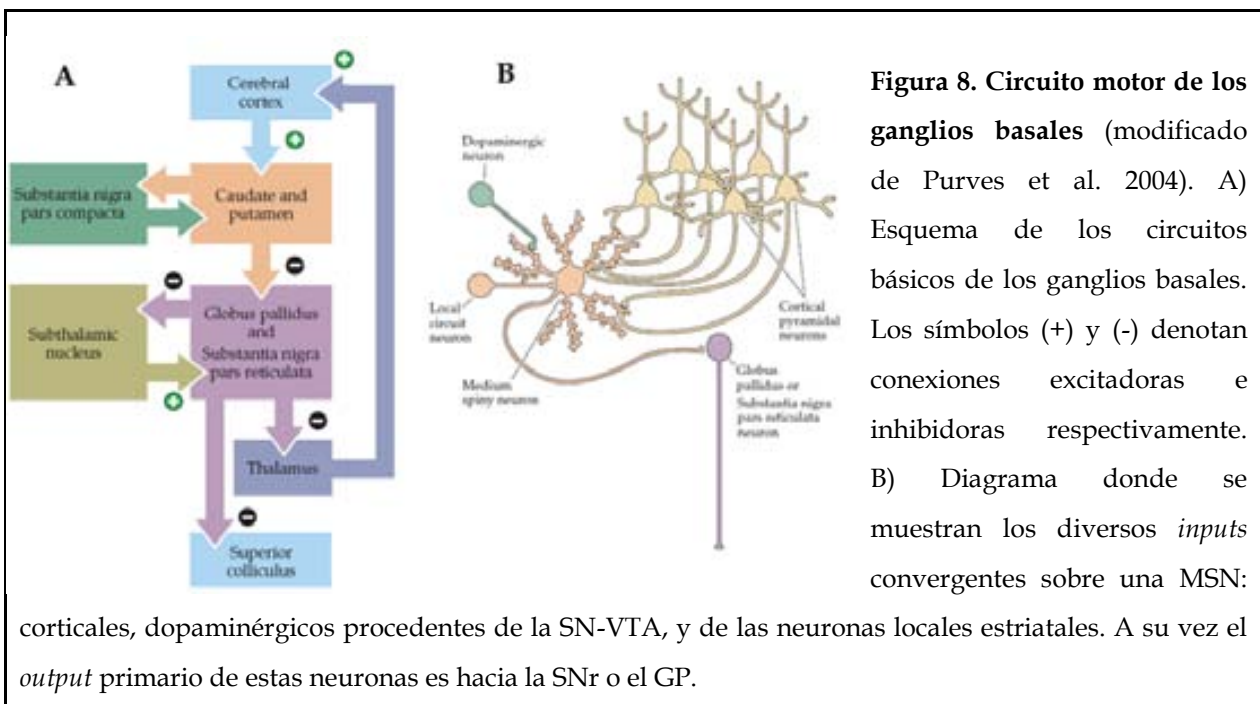
Figura 7. Organización general de las estructuras implicadas en el control motor (Purves et al. 2004). Hay cuatro subsistemas implicados en el control del movimiento: el circuito local, las motoneuronas superiores, el cerebelo y los ganglios basales.

1. El **circuito local** en la sustancia gris de la médula espinal y su circuito análogo en el tronco encefálico. Incluye las motoneuronas inferiores cuyos axones inervan el músculo esquelético y las neuronas de los circuitos locales que son la mayor fuente de *input* sináptico de las motoneuronas inferiores. Este circuito es la vía final para el movimiento sobre la que actúan el resto de circuitos.
2. Las **motoneuronas superiores** cuyos somas se encuentran en el córtex o en el tronco encefálico y cuyos axones descienden para inervar las neuronas de los circuitos locales o, más raramente, a las motoneuronas inferiores directamente. Aquellas originadas en el córtex son esenciales para la planificación, iniciación y dirección de los movimientos voluntarios y para secuencias espaciotemporales complejas del movimiento. Por su parte, las del bulbo raquídeo son responsables de la regulación del tono muscular y de los movimientos simples.

3. El **cerebelo** actúa por medio de eferentes a las motoneuronas superiores detectando la diferencia entre el movimiento planeado y el realmente realizado y actuando en consecuencia para disminuir este error en tiempo real y a largo plazo.
4. Los **ganglios basales** se describirán en el apartado siguiente.

1.3.1. Participación de los ganglios basales en el movimiento voluntario.

Los ganglios basales suprimen los movimientos no deseados y preparan a las motoneuronas superiores para la iniciación de los movimientos. Los componentes motores de los ganglios basales junto con la sustantia nigra y el núcleo subtalámico crean un circuito subcortical (**Fig. 8**) que conecta la mayor parte de las regiones del cortex con las motoneuronas superiores en los cortex promotor y motor primario y el tronco encefálico. Las neuronas de este circuito responden durante la anticipación y ejecución de los movimientos de tal modo que su efecto sobre las motoneuronas superiores es necesario para el desarrollo normal de los movimientos voluntarios.



Prácticamente todas las regiones del neocórtex proyectan al estriado de manera topográfica constituyendo la vía corticostriatal, de carácter excitador y consistente en numerosas vías paralelas con funciones independientes. Además, las MSN de los componentes motores del estriado reciben aferentes de las interneuronas estriatales, del tálamo y dopaminérgicas de la SNc siendo esta última la que modula principalmente la señalización cortical.

Por otro lado, las MSN proyectan principalmente, a través de las vías directa e indirecta (ver pág. 4), a la SNr y al GP cuyas eferentes GABAérgicas (por tanto inhibitorias) originan las vías principales que comunican los ganglios basales con las motoneuronas superiores. La vía cortical se origina en el GPi o la SNr y alcanza el córtex motor a través de los núcleos ventral anterior y ventral lateral del tálamo. Sin embargo, algunos axones de la SNr proyectan a las motoneuronas superiores situadas en el colículo superior que controlan los movimientos de los ojos sin intervención del tálamo.

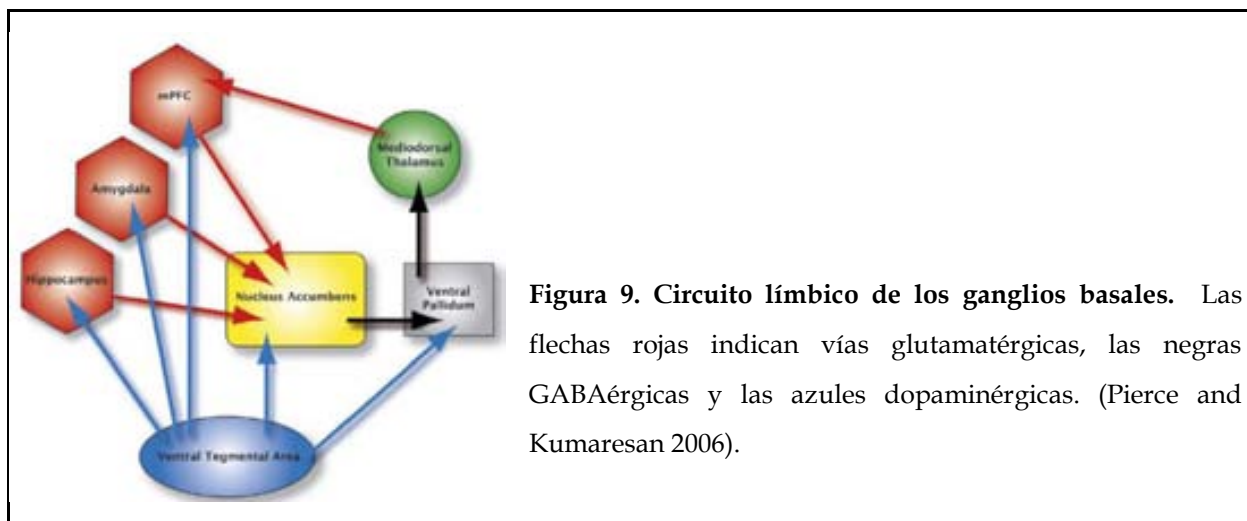
A diferencia de las MSN, las neuronas del GPi y la SNr muestran elevados niveles de actividad espontánea por lo que inhiben tónicamente sus dianas evitando así movimientos involuntarios. Por ello la activación de las MSN (también GABAérgicas e inhibitorias) por parte del córtex (glutamatérgico excitador) conlleva la inhibición de la señal tónica inhibitoria que las neuronas de la SNr y el GP ejercen sobre el córtex. Esta desinhibición es la que permite a las motoneuronas superiores enviar señales a las neuronas del circuito local y a las motoneuronas inferiores para iniciar el movimiento.

1.4. Circuito límbico de los ganglios basales

El circuito límbico de los ganglios basales es responsable de la influencia de la información motivacional, emocional, contextual y afectiva sobre el comportamiento (Pierce and Kumaresan 2006).

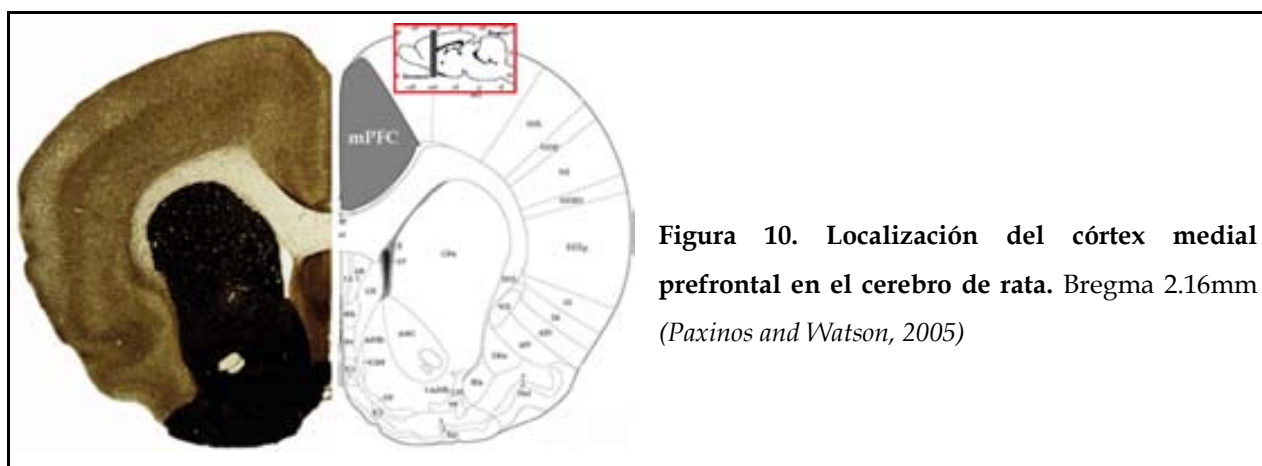
Núcleos límbicos externos a los ganglios basales, incluyendo la amígdala, el hipocampo y el córtex medial prefrontal (mPFC) envían proyecciones glutamatérgicas al Acb (**Fig. 9**). El Acb a su vez tiene dos proyecciones principales, de carácter GABAérgico, hacia el *ventral pallidum* y la VTA/SN (no especificada en la imagen). Ambas regiones envían a su vez aferentes GABAérgicas hacia el tálamo dorsal medial el cual completa el circuito por medio de una proyección glutamatérgica hacia el mPFC.

Además, las neuronas dopaminérgicas de la VTA inervan el Acb, la amígdala, el hipocampo, el mPFC y el pálido ventral de tal modo que cambios en la neurotransmisión dopaminérgica juegan un papel importante en el flujo de información a través del circuito límbico compuesto por estos núcleos interconectados.



1.4.1 Estructura y tipos neuronales del córtex medial prefrontal (mPFC)

El mPFC (Fig. 10) es una región heterogénea constituida por diversas áreas corticales organizadas en dos grandes divisiones: ventral (córtex infralímbico) y dorsal (córtex prelímbico y córtex cingulado).



Tanto la región dorsal como la ventral presentan una fuerte relación con el tálamo mediodorsal, el hipotálamo, el área tegmental ventral y el complejo amigdalóide (a

través del cual, junto con el núcleo accumbens, se implica el mPFC en los circuitos del miedo y la recompensa) (Morgane et al 2006). A pesar de lo cual sus patrones de aferentes y eferentes son claramente diferenciados y se encuentran organizados topográficamente (Heidbreder and Groenewegen 2003).

Las células del córtex cerebral pueden diferenciarse en dos grupos principales: las neuronas glutamatérgicas excitadoras y las interneuronas GABAérgicas inhibitorias.

1.4.1.1. Neuronas glutamatérgicas excitadoras

En su mayoría son neuronas piramidales aunque no exclusivamente. Las neuronas piramidales son las células más abundantes del córtex (75%) y se organizan en capas de diferente densidad celular. Su soma es triangular con una única dendrita apical dirigida a la superficie cortical y numerosas dendritas basales, todas ellas con numerosas espinas. Sus axones proyectan a la sustancia blanca y proporcionan *inputs* excitadores a otras regiones corticales o estructuras subcorticales. Estas neuronas piramidales pueden diferenciarse en dos grupos en función del transportador vesicular de glutamato que expresen: (1) las de proyección, que usan VGLUT1 para almacenar el glutamato en las vesículas sinápticas y (2) las neuronas de los circuitos locales corticales usan el VGLUT2 y que tienen una distribución más restringida preferentemente en la capa IV (Fremeau et al 2004)

1.4.1.2. Interneuronas GABAérgicas inhibitorias

Constituyen el 25% de las neuronas del córtex. Su soma, de unas 10-30 μ m de diámetro, tiene dendritas con pocas espinas que reciben *inputs* del tálamo y proyecciones axonales con las que inervan regiones corticales superficiales controlando y sincronizando el *output* de las neuronas piramidales. Existen diversos tipos de interneuronas corticales en función de diferentes características neuroquímicas, anatómicas y electrofisiológicas (PING 2008) (**Fig. 11**).

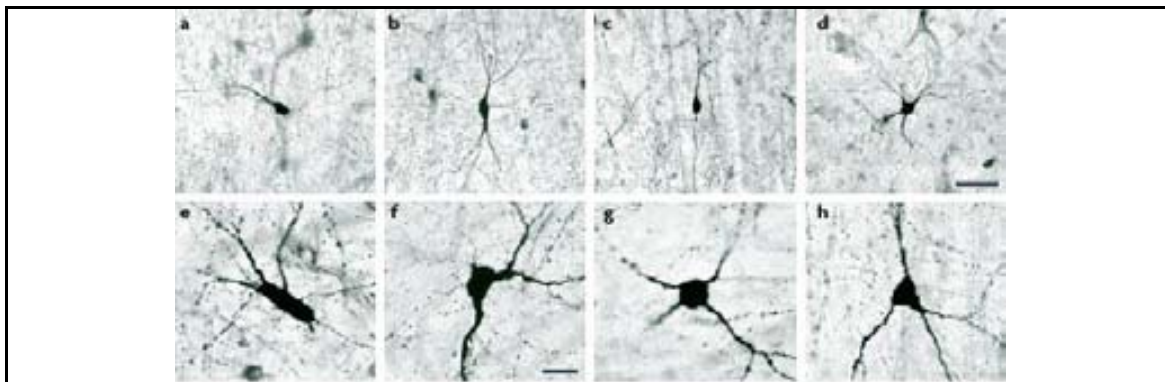


Figura 11. Diferentes estructuras somáticas de las interneuronas GABAérgicas del córtex. (modificado de PING 2008). El soma puede ser fusiforme (a-c), poligonal (d), redondo (g), triangular (h) o no tener una forma definida (e, f).

1.4.2. Estructura y tipos neuronales del área tegmental ventral (VTA)

La VTA contribuye tanto al refuerzo positivo como a la selección, aprendizaje, iniciación y fortalecimiento de las conductas apetitivas. Es una región que carece de límites citoarquitectónicos bien definidos, ya que es medial y dorsalmente continua a la SNc (Fig. 12).

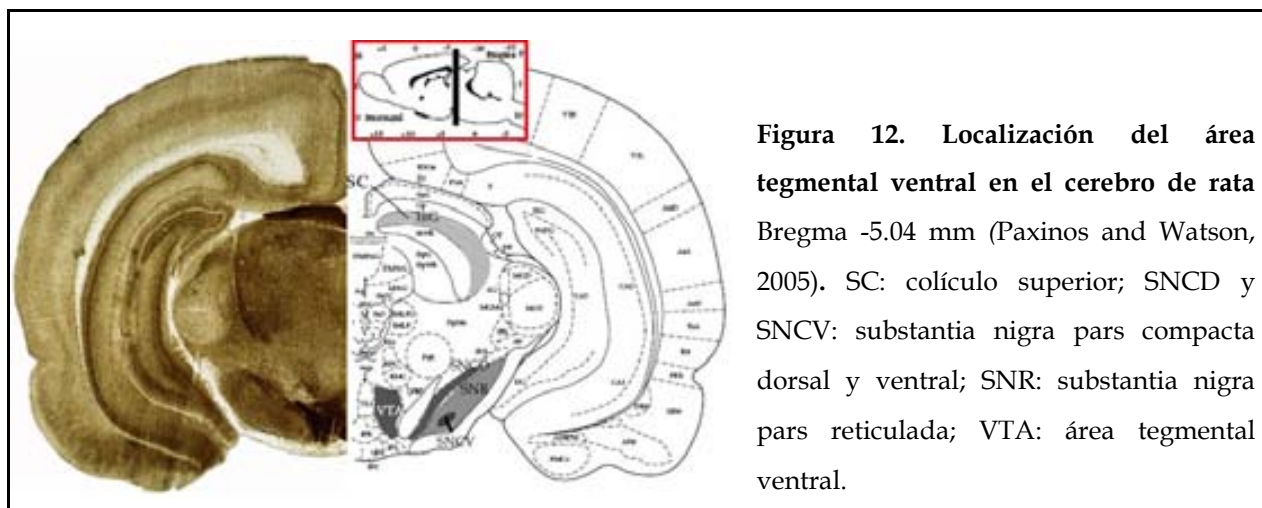
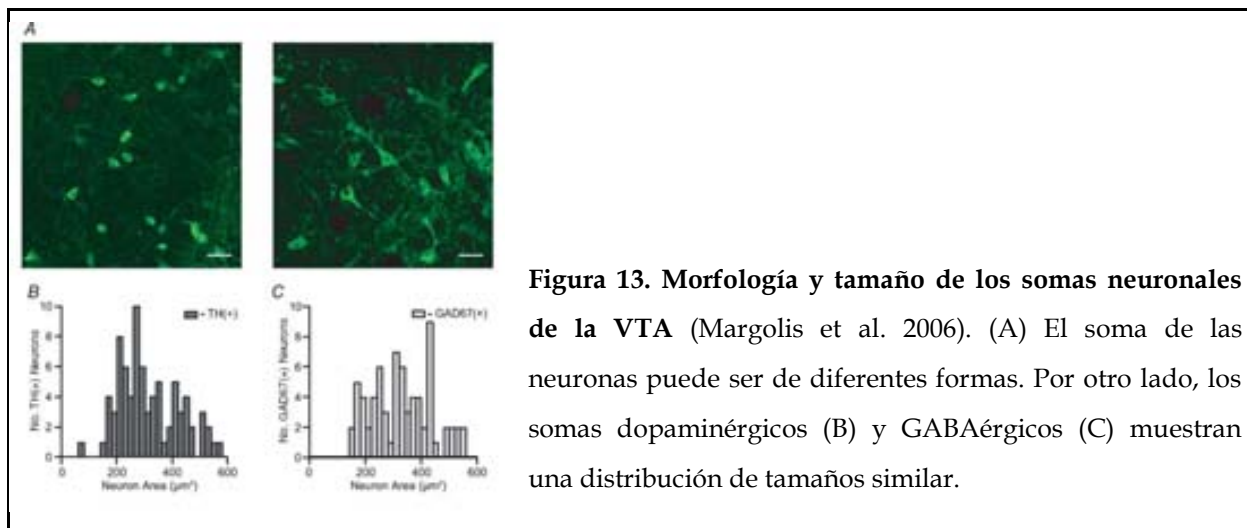


Figura 12. Localización del área tegmental ventral en el cerebro de rata Bregma -5.04 mm (Paxinos and Watson, 2005). SC: colículo superior; SNCD y SNCV: substantia nigra pars compacta dorsal y ventral; SNR: substantia nigra pars reticulada; VTA: área tegmental ventral.

Aunque habitualmente se considera una región dopaminérgica, la VTA está constituida por un $55\pm 2\%$ de neuronas dopaminérgicas (la población A10) heterogéneamente distribuidas junto con neuronas de carácter GABAérgico. Los dos tipos neuronales no pueden distinguirse en base al tamaño o la forma del soma pues en ambos casos éstos pueden ser fusiformes, redondos, elípticos o multipolares (Fig. 13)



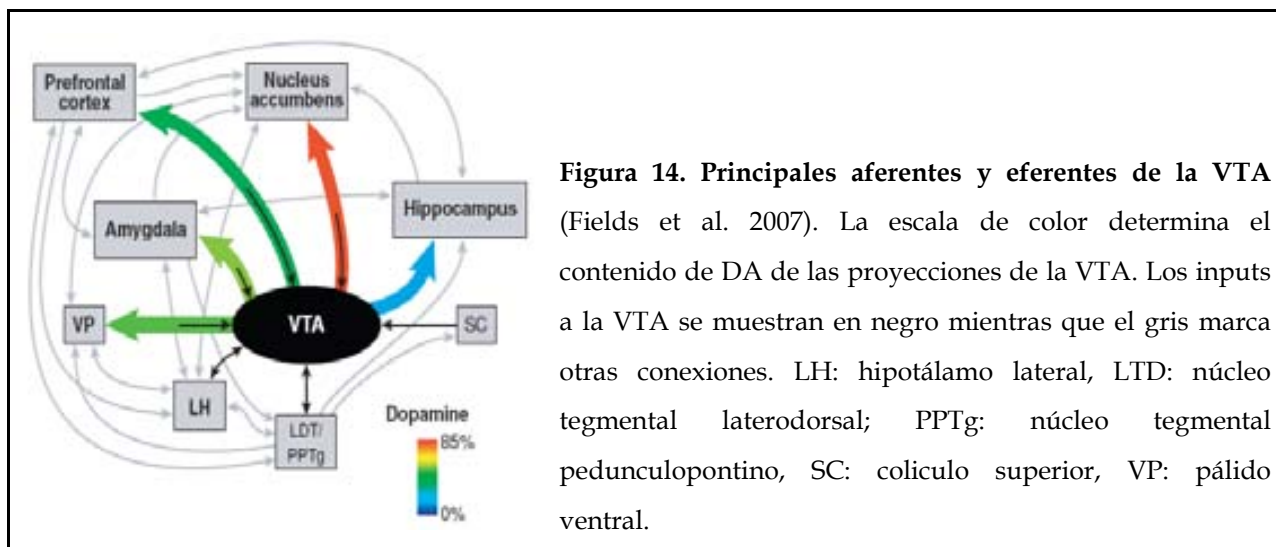
Del mismo modo, no pueden distinguirse en base a la duración del potencial de acción ni por la presencia/ausencia de I_h (corriente de cationes activada por hiperpolarización) ya que a pesar de que todas las neuronas dopaminérgicas lo presentan, algunas neuronas GABAérgicas pueden expresarlo también (Margolis et al. 2006). Actualmente no hay criterios farmacológicos o fisiológicos que permitan identificar todas las neuronas dopaminérgicas, las cuales pueden ser detectadas únicamente mediante técnicas citoquímicas que empleen marcadores moleculares como la tirosina hidroxilasa.

1.4.2.1. Neuronas GABAérgicas de la VTA

Su carácter GABAérgico viene determinado por la inmunoreactividad de la isoforma GAD67. Están situadas dorsalmente a las neuronas dopaminérgicas y son neuronas de proyección, pues envían aferentes al PFC y al Acb. A su vez envían colaterales axónicas locales a otras neuronas de la VTA por lo que también actúan como interneuronas.

La VTA recibe *inputs* (Fig. 14) de numerosas áreas cerebrales entre los que destacan: (1) glutamatérgicos del córtex prefrontal y el hipotálamo lateral (2) GABAérgicos del pálido ventral y del Acb, (3) noradrenérgicos del *locus coeruleus* y (4) serotoninérgicos del rafe dorsal. La VTA proyecta densamente al estriado ventral, principalmente al Acb (siendo ésta la proyección más rica en dopamina), aunque

también otras áreas límbicas son invadidas como es el caso del córtex prefrontal, el hipotálamo lateral, el hipocampo, el córtex entorrinal y el área septal lateral constituyendo así el sistema mesocorticolímbico (Fields et al 2007).



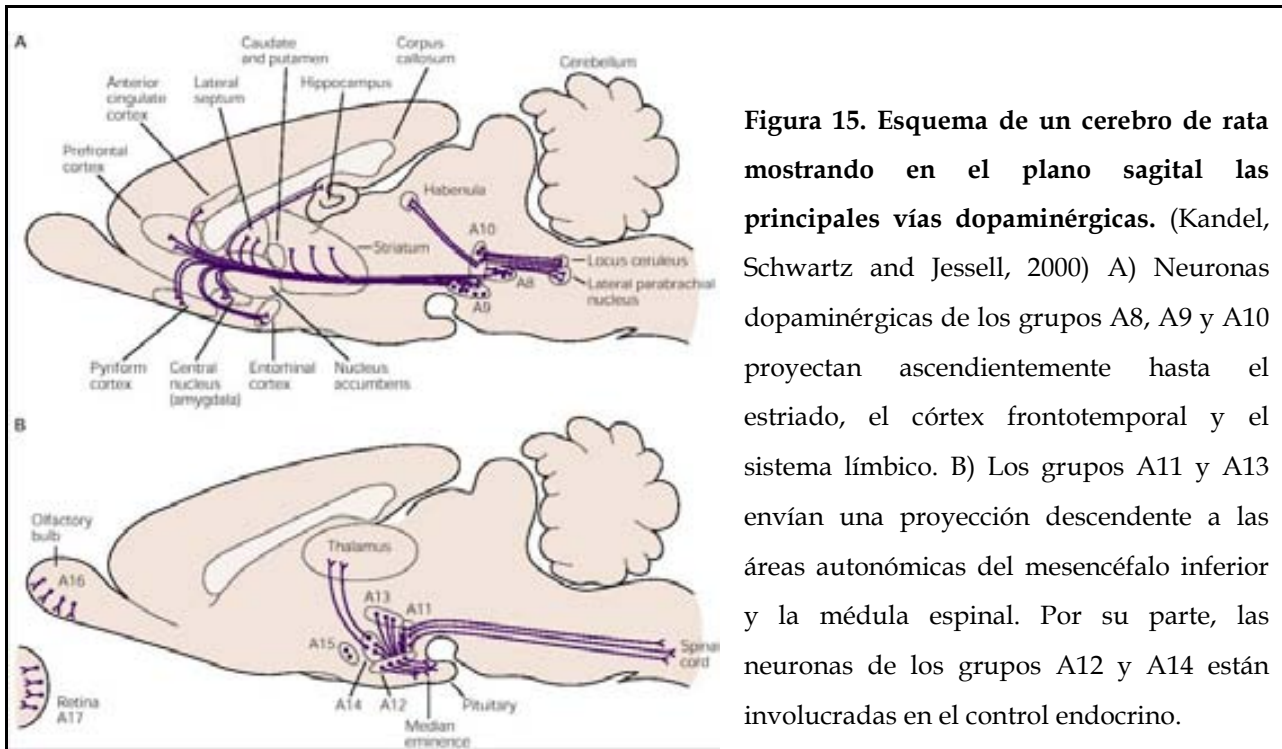
2. Sistemas neuronales dopaminérgicos

2.1. Vías de proyección dopaminérgicas

Las poblaciones neuronales dopaminérgicas fueron originariamente numeradas como si se tratasen de una continuación rostral de las poblaciones noradrenérgicas, de las cuales no se podían diferenciar con claridad mediante la técnica histofluorescente empleada. Por este motivo, la clasificación comienza con el grupo A8, población situada en el campo retrorubral y que proyecta al estriado. Estas neuronas constituyen una extensión caudal de las de la población A9 (en la SNc). La población A9 y la población A10 (en la VTA) dan lugar a dos vías de proyección implicadas en la emoción, aprendizaje y memoria (**Fig. 15A**):

- La **vía Nigroestriatal** se origina en la SNc (población A9) y proyecta principalmente al estriado dorsal y está asociada a función motora.
- La **vía mesocorticolímbica** se origina, principalmente, en la VTA (población A10) y está implicada en el control de las emociones y la recompensa. Se denomina así por el elevado solapamiento entre las neuronas de las vías mesolímbica y mesocortical:

- Vía mesolímbica: proyecta al Acb, al tubérculo olfatorio, al septum, a la amígdala y al hipocampo.
- Vía mesocortical: proyecta al mPFC y a los córtex cingulado y perirrinal desde la zona medial de la VTA.



Además, las poblaciones A11 y A13 (**Fig. 15B**), en el hipotálamo dorsal proyectan principalmente a la médula espinal regulando las neuronas simpáticas pregangliónicas. Por su parte, los grupos A12 y A14, situados a lo largo de la pared del tercer ventrículo, son componentes del sistema neuroendocrino hipotalámico tuberoinfundibular. Finalmente podemos encontrar neuronas dopaminérgicas en el sistema olfatorio (población A15 en el tubérculo olfatorio y población A16 en el bulbo olfatorio) y en la retina (población A17).

2.2. Metabolismo de la dopamina

La dopamina es una catecolamina sintetizada en dos reacciones a partir de su precursor L- Tirosina: (1) una hidroxilación catalizada por el enzima tirosina hidroxilasa (TH), en la que se genera L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y (2) la descarboxilación de

la L-DOPA por la DOPA descarboxilasa (DC, EC 4.1.1.28) obteniéndose así, finalmente, la dopamina (**Fig. 16**). Una vez sintetizada, la dopamina se acumula principalmente en las terminales axónicas donde es internalizada en las vesículas sinápticas mediante el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2). Posteriormente es liberada al espacio sináptico donde puede interactuar con sus receptores, ser recaptada por su transportador específico (DAT) o ser degradada por la acción de los enzimas monoaminoxidasa (MAO, EC 1.4.3.4) y catecol-O-metiltransferasa (COMT, EC 2.1.1.6) generando sus metabolitos principales: ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC), 3-metoxitiramina (3-MT) y ácido homovanílico (HVA).

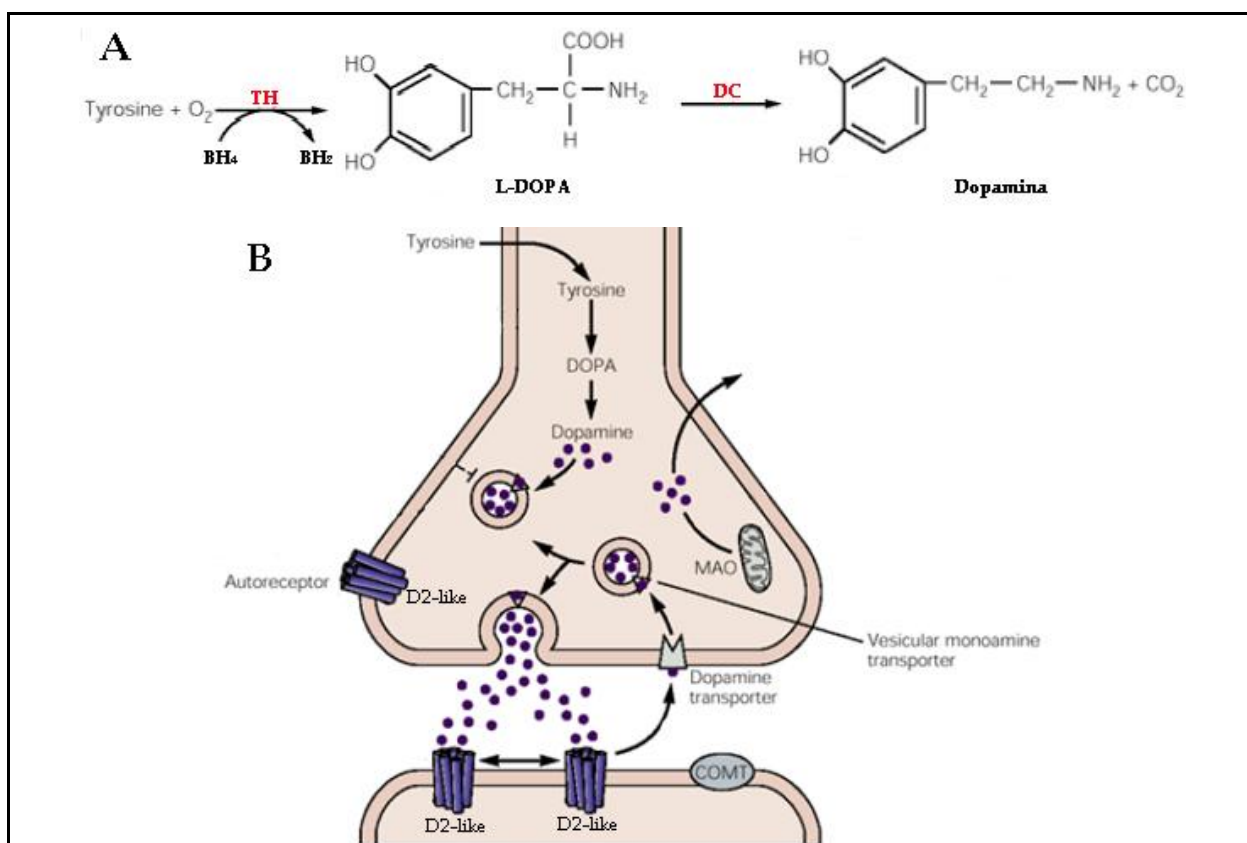


Figura 16. Metabolismo de la dopamina (modificado de Kandel, Schwartz and Jessell, 2000). A) La tirosina hidroxilasa emplea oxígeno molecular, tirosina y tetrahidrobiopterina (cofactor) para sintetizar L-DOPA, la cual será descarboxilada por la DOPA descarboxilasa dando lugar a dopamina y CO₂. B) Una vez sintetizada, la dopamina es almacenada en vesículas sinápticas hasta su posterior liberación al espacio sináptico. En él, puede interactuar con sus receptores específicos, ser recaptada y degradada. BH₂: dihidrobiopterina, BH₄: tetrahidrobiopterina, COMT: catecol-O-metiltransferasa, DC: DOPA descarboxilasa, MAO: monoaminoxidasa, TH: tirosina hidroxilasa.

2.2.1. La tirosina hidroxilasa: características y regulación.

El enzima tirosina hidroxilasa o tirosín 3-monooxigenasa (EC 1.14.16.2) se encuentra en el citosol de todas las neuronas que producen catecolaminas y la reacción que cataliza es el paso limitante de su producción. Pertenece a una familia de hidroxilasas de aminoácidos que incluye también a la fenilalanina hidroxilasa y la triptófano hidroxilasa y que se caracteriza por contener hierro y usar biopterinas como cofactor. La TH usa tirosina, oxígeno molecular y tetrahidrobiopterina (BH₄, cofactor) para producir dihidrobiopterina, L-DOPA y agua. El oxígeno molecular es la fuente del átomo de oxígeno incorporado en la L-DOPA mientras que el BH₄ funciona como donante de dos electrones para reducir el átomo de oxígeno restante a agua. Para la catálisis el hierro debe estar en forma ferrosa (Fe⁺²) pero la presencia de oxígeno lo oxida rápidamente a la forma férrica (Fe⁺³) por lo que es gracias a la biopterina que es reducido nuevamente a la forma ferrosa activa.

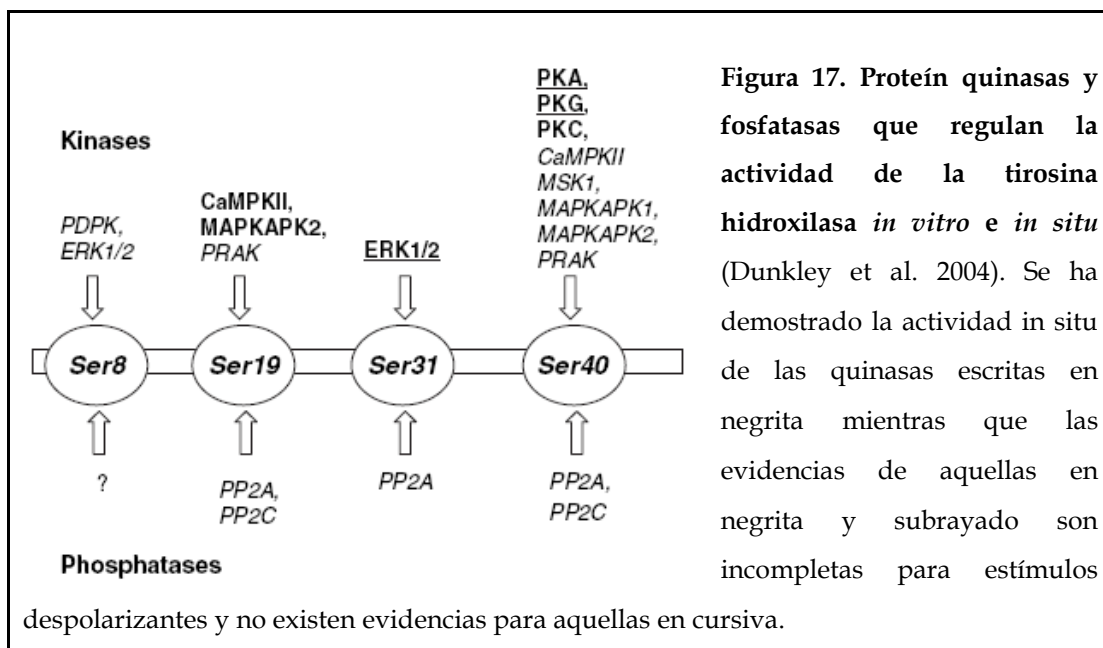
En humanos existen cuatro isoformas del enzima (nombradas hTH del 1 al 4), las cuales se diferencian en la longitud del dominio regulador. Todas ellas se expresan en el cerebro humano a diferente nivel (la hTH1 y la hTH2 son las predominantes) y pueden ser encontradas en la misma célula (Lewis et al. 1993). En la rata, existe una única tirosina hidroxilasa (similar a la isoforma 1 humana) que se dispone como un homotetrámero donde cada una de sus subunidades (de 498 aminoácidos y 55kDa) consta de un dominio catalítico central, un dominio asociativo C-terminal y un dominio regulador N-terminal (Kumer and Vrana 1996).

Este enzima está sujeto a una fuerte regulación debido a las consecuencias adversas que el déficit o exceso de dopamina produce en el organismo. Existen numerosos mecanismos de regulación paralelos que permiten a las diferentes poblaciones de neuronas catecolaminérgicas controlar la síntesis de catecolamina en respuesta a sus necesidades concretas. A medio-largo plazo se regula la expresión génica de la TH mediante el control de su transcripción, traducción o por *splicing* diferencial (del enzima humano). Sin embargo, cambios en los niveles de mRNA de la

TH no implican necesariamente cambios en los niveles de proteína o actividad de la misma. La regulación a corto plazo se basa en el control de su actividad enzimática por regulación alostérica, fosforilación o retroinhibición (revisado por Kumer and Vrana 1996).

2.2.1.1. Regulación de la TH por fosforilación

Los cambios en el estado de fosforilación de la TH están altamente implicados en la regulación de la síntesis de dopamina. La TH es fosforilada tanto *in vitro* como *in situ* en varios residuos clave del dominio N-terminal: las serinas (Ser) 8 (es Thr8 en humana), 19, 31 y 40 por diversas proteín quinasas. A su vez, es desfosforilada por las fosfatasas PP2A y PP2C (Dunkley et al. 2004) (**Fig. 17**).



La fosforilación de la TH en las Ser 19 o 31 incrementa la actividad del enzima en menor medida que la Ser40 por lo que es posible que su principal efecto sea debido a la fosforilación jerárquica de la TH. La fosforilación en la Ser19 en respuesta a despolarización triplica la tasa de fosforilación de la Ser40 mientras que la fosforilación de la Ser40 no afecta a la de la Ser19 (Bevilaqua et al. 2001). Esto es posible dada la proximidad de los tres sitios

de fosforilación principales: Ser 19, 31, 40. Del mismo modo, la fosforilación en la Ser31 incrementa la fosforilación de la Ser40 *in vitro* cuando la TH no está unida a dopamina (Lehmann et al. 2006). De este modo, las Ser19 y 31 regulan la fosforilación en la Ser40 durante diferentes etapas del ciclo de activación y en respuesta a distintos activadores.

La fosforilación de la TH en la Ser40 da lugar a un incremento de la actividad enzimática y síntesis de dopamina el cual puede ser cuantificado como un incremento en la V_{max} y un incremento de la afinidad por el cofactor, BH_4 (disminuye su K_m) (revisado por Dunkley et al. 2004). A su vez, la fosforilación en la Ser40 disminuye la afinidad de las catecolaminas por el enzima (Sura et al 2004) Sin embargo, la mayor parte de estos estudios se ha realizado *in vitro*, por lo que se desconocen las posibles implicaciones *in situ* o *in vivo* donde existen otros mecanismos implicados como es la retroinhibición.

2.2.1.2. Regulación de la TH por retroinhibición

La tirosina hidroxilasa puede ser inhibida por las catecolaminas. Estudios de *binding* de dopamina a TH recombinante han demostrado la existencia de al menos dos sitios de unión con distinta afinidad para la dopamina. (Gordon et al 2008).

a) Sitio de alta afinidad ($K_D 4 \pm 1 nM$)

En este sitio de unión, la dopamina compite por la unión al enzima con el BH_4 , cuya concentración fisiológica se sugiere en torno a los 1-100 μM (Nagatsu 1983). Al interactuar con el dominio catalítico del enzima, la dopamina disminuye la V_{max} y la afinidad por el BH_4 (incrementa su K_m) (Ribeiro et al. 1992) y sólo se puede disociar por medio de la fosforilación del enzima en la Ser40 (Sura et al. 2004). Se ha estimado que la concentración citosólica de dopamina en células PC12 es de $\approx 100 nM$ (Mosharov et al. 2006) por lo que, en condiciones basales

(en las que sólo una pequeña proporción de la TH está fosforilada), el sitio de alta afinidad está siempre saturado por la dopamina.

b) Sitio de baja afinidad ($K_D 90 \pm 34 \text{nM}$)

Este sitio de unión permite al enzima ser inhibido por la concentración citosólica de dopamina en una regulación independiente de su estado de fosforilación (**Fig. 18**) (Gordon et al 2008).

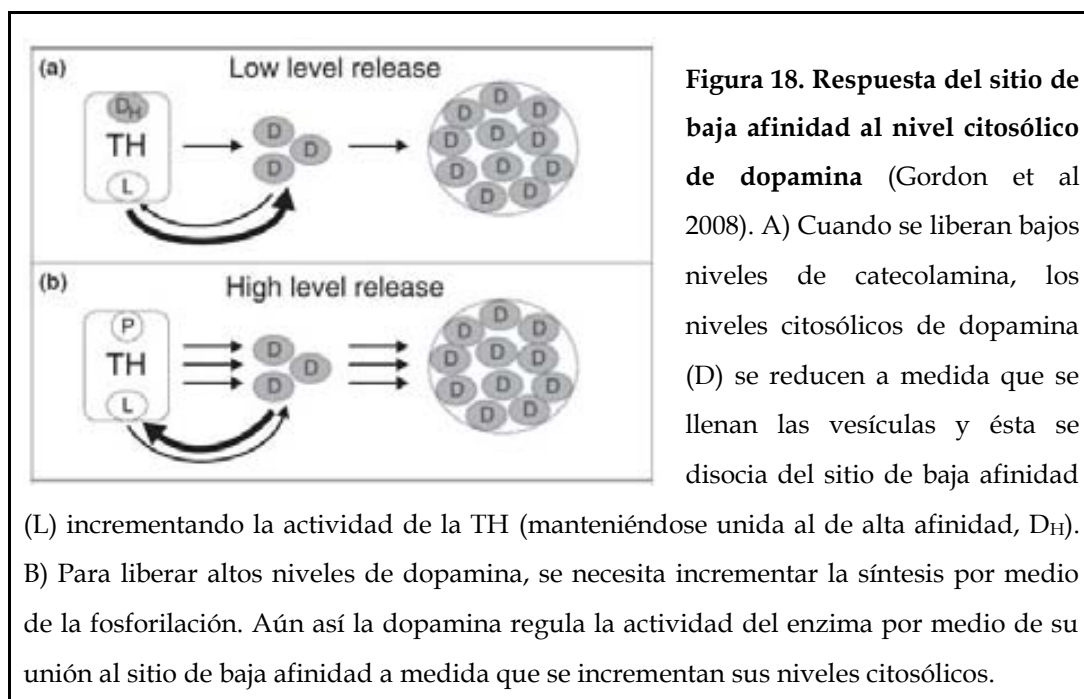


Figura 18. Respuesta del sitio de baja afinidad al nivel citosólico de dopamina (Gordon et al 2008). A) Cuando se liberan bajos niveles de catecolamina, los niveles citosólicos de dopamina (D) se reducen a medida que se llenan las vesículas y ésta se disocia del sitio de baja afinidad

(L) incrementando la actividad de la TH (manteniéndose unida al de alta afinidad, D_H). B) Para liberar altos niveles de dopamina, se necesita incrementar la síntesis por medio de la fosforilación. Aún así la dopamina regula la actividad del enzima por medio de su unión al sitio de baja afinidad a medida que se incrementan sus niveles citosólicos.

2.3. Receptores de dopamina

Una vez que la dopamina es liberada al espacio sináptico puede interaccionar con sus receptores específicos presentes en la membrana presináptica o postsináptica. Se han descrito cinco subtipos de receptores de dopamina: D₁, D₂, D₃, D₄ y D₅, todos ellos constituidos por siete dominios transmembrana y acoplados a proteínas G. Se organizan en dos grandes familias farmacológicas, según su influencia sobre la actividad adenil ciclasa (AC) (**Fig. 19**):

2.3.1. Familia D₁ de receptores dopaminérgicos

Constituida por los receptores D₁ y D₅, los cuales presentan una elevada similitud en los dominios transmembrana (80% de identidad) y se acoplan a una G α_s o G α_{olf} , por lo que activan la AC. Los genes que los codifican no contienen intrones por lo que no generan isoformas por corte y empalme diferencial. Parecen ser exclusivamente postsinápticos y están presentes en neuronas que reciben inervación dopaminérgica como las MSN del estriado.

En el cerebro, el receptor D₁ presenta un alto nivel de expresión en los núcleos inervados por las vías nigrostriatal y mesocorticolímbica mientras que el receptor D₅ se expresa a bajo nivel en numerosas áreas como el córtex, la SN, el hipotálamo, el hipocampo y el giro dentado (Beaulieu and Gainetdinov 2011).

2.3.2. Familia D₂ de receptores dopaminérgicos

Constituida por los receptores D₂, D₃ y D₄ cuya homología en los dominios transmembrana respecto al receptor D₂ es menor (75% para el D₃ y 53% para el D₄). Se acoplan a una G $\alpha_{i/o}$ por lo que inhiben la AC. Pueden expresarse tanto en neuronas pre- como postsinápticas. Sus genes contienen numerosos intrones: seis en el D₂, cinco en el D₃ y tres en el D₄ por lo que generan numerosas isoformas por corte y empalme diferencial. Entre ellas destacan las formas activas D_{2S} (*short*) y D_{2L} (*long*) que poseen diferentes propiedades anatómicas, fisiológicas y farmacológicas (Lindgren et al. 2003).

En el cerebro, el receptor D₂ se encuentra en el estriado (dorsal y ventral), el tubérculo olfatorio, la SN, la VTA, hipotálamo, córtex, septum, amígdala e hipocampo. Por su parte, el receptor D₃ se observa principalmente en áreas límbicas como la *shell* del Acb, el tubérculo olfatorio y los islotes de Calleja. El receptor D₄ muestra niveles de expresión más bajos en cerebro pudiéndose encontrar en córtex frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo, globus pallidus, SNr y tálamo (Beaulieu and Gainetdinov 2011).

Receptor Subtype	D ₁ -like Receptors		D ₂ -like Receptors		
	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
G protein	G _s	G _s	G _{i/o}	G _{i/o}	G _{i/o}
Transduction Mechanism	↑ AC, ↑ PLC, ↑ L-type Ca ²⁺ channels	↑ AC	↓ AC, ↑ [Ca ²⁺] _i , K ⁺ conductance, ↓ Ca ²⁺ conductance	↓ AC, activation of MAP kinase	↓ AC, ↓ Ca ²⁺ conductance
Localisation	Caudate, putamen, nucleus accumbens, olfactory tubercle	Hippocampus, hypothalamus	Caudate, putamen, nucleus accumbens, olfactory tubercle	Nucleus accumbens, olfactory tubercle, islands of Calleja	Frontal cortex, midbrain, amygdala, cardiovascular system
Likely Physiological Roles	Locomotion, reward, reinforcement, learning and memory, renin secretion	Learning and memory	Locomotion, reward, reinforcement, learning and memory	Locomotion, possible role in cognition and emotion	Mostly unknown - possible role in cognition and emotion, hypertension

Figura 19. Clasificación, localización y caracterización de los receptores de dopamina
(modificado de www.tocris.com).

2.5. Funciones de la dopamina

La dopamina, a través de sus receptores, está implicada en un alto número de procesos fisiológicos tanto fuera como dentro del sistema nervioso central. A nivel periférico, a través de los receptores D₁, D₂ y D₄, participa en el olfato, la visión (Witkovsky 2004), la regulación hormonal (controlando la secreción de prolactina, renina y aldosterona a través de los receptores D₁ y D₂) y la regulación de la función renal (Aperia 2000), la movilidad gastrointestinal (Li et al 2006) y la presión sanguínea. A nivel central la dopamina participa críticamente en el control de la actividad locomotora (receptores D₁, D₂ y D₃), de la ingesta, del sueño, aprendizaje y memoria (receptores D₁, D₂), sueño y de los mecanismos de la recompensa (receptores D₁, D₂ y, en menor medida D₃) (Beaulieu and Gainetdinov 2011).

2.5.1. Papel de la dopamina en la locomoción

La correcta iniciación y ejecución de los movimientos voluntarios necesita la integridad de las proyecciones dopaminérgicas de la SNc al estriado motor. Esta inervación está sujeta a variaciones dependientes de estímulos externos de tal modo que eventos que conducen a una mayor tasa de disparo de las neuronas de la SNc originan una mayor liberación de dopamina en el estriado, permitiendo así

la activación de los receptores D₁. La activación de estos receptores altera la respuesta de las MSN a los *inputs* glutamatérgicos facilitando la transición del *down-state* al *up-state* (ver pág. 6) y el posterior alcance del umbral de disparo (Surmeier et al. 2007), por lo que las MSN inhibirán las neuronas de la SNr y el GP produciendo la desinhibición de las neuronas corticales. Por otra parte, en ausencia de estímulos externos significativos, los bajos niveles de dopamina no permiten la activación de los receptores D₁ pero sí la de los receptores D₂, los cuales reducen la excitabilidad de las MSN que los expresan (Surmeier et al. 2007) contribuyendo así a que la transición entre estados no se produzca.

2.5.1.1. Patología asociada: Parkinson

El Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después del Alzheimer. Fue descrita por James Parkinson en 1817 y se caracteriza por una disfunción motora: temblores incontrolados, lentitud de movimientos (bradiquinesia), mínimas expresiones faciales, falta de movimientos asociados (como el movimiento de los brazos al andar) y rigidez de las extremidades y cuello... Además, en algunos casos esta pérdida de la función motora viene acompañada de demencia.

Es el resultado de un proceso complejo caracterizado por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigrostriatal, junto con reacciones gliales importantes para el desarrollo de la enfermedad. Muchos de los síntomas motores pueden ser atribuidos a la falta de dopamina en el estriado, como sugiere el hecho de que las intervenciones dirigidas a antagonizar los efectos de la dopamina en esa región reproducen los síntomas de hipoquinesia y rigidez propios del Parkinson (revisado por Fuentes et al. 2010). En condiciones normales la liberación de dopamina en el estriado activa las MSN de la vía directa e inhibe las de la indirecta. Cuando la SNc es destruida, no se produce una liberación suficiente de dopamina en el estriado por lo que no se dan estos efectos, lo que resulta en un incremento anormal del flujo inhibitorio tónico del GPi y la SNr que evita la activación talámica de las motoneuronas superiores del córtex (**Fig. 20**).

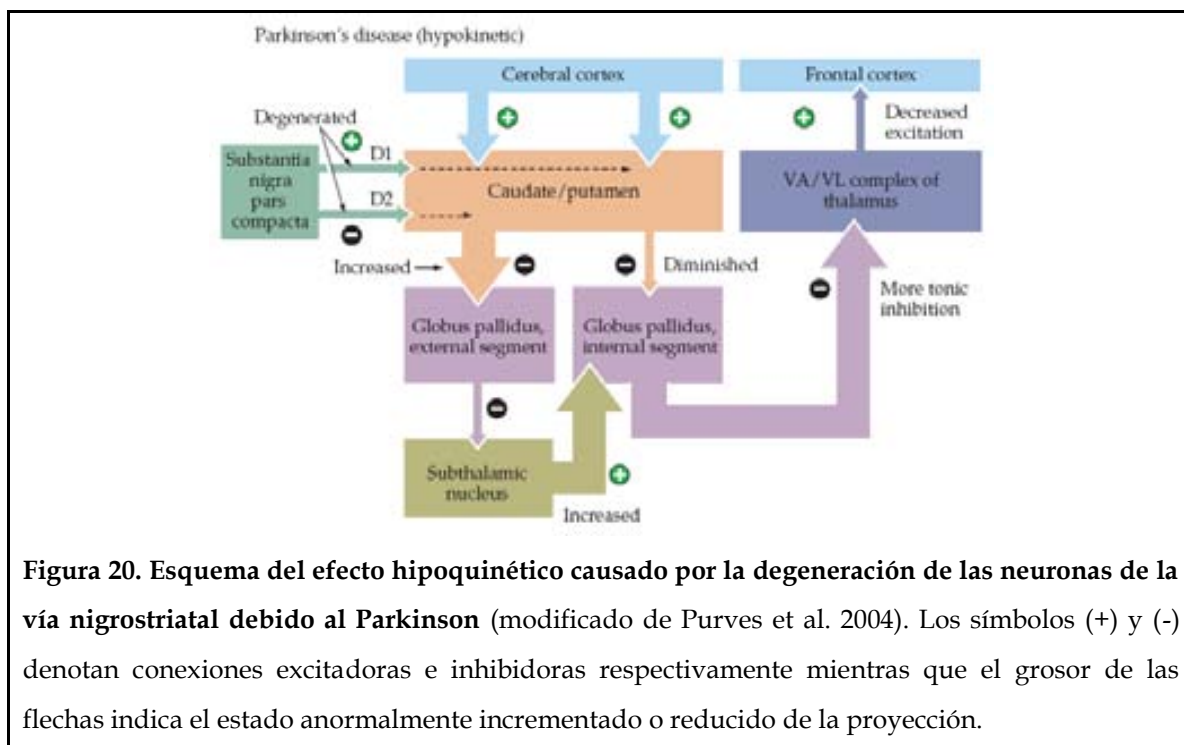


Figura 20. Esquema del efecto hipoquinético causado por la degeneración de las neuronas de la vía nigrostriatal debido al Parkinson (modificado de Purves et al. 2004). Los símbolos (+) y (-) denotan conexiones excitadoras e inhibitorias respectivamente mientras que el grosor de las flechas indica el estado anormalmente incrementado o reducido de la proyección.

2.5.2. Papel de la dopamina en el mecanismo de la recompensa

Las neuronas dopaminérgicas tienen un papel crucial en la guía del comportamiento, pensamiento y, en particular, en los mecanismos de la recompensa. La actividad de las espinas de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y la VTA muestra cambios fásicos que correlacionan con las recompensas recibidas (Schultz et al. 1993). La hipótesis del *reward prediction error* (Montague et al. 2004) ha sido desarrollada a partir de modelos de refuerzo-aprendizaje, los cuales asumen que la actividad de un animal está encaminada a obtener la máxima recompensa posible. Para ello, cada vez que se obtiene una recompensa, el cerebro almacena en la memoria la intensidad de dicho estímulo y las acciones que condujeron a él. De ese modo, puede usar los datos guardados para predecir, para cada acción posible, las futuras recompensas. Finalmente, la recompensa obtenida con una acción es comparada con la predicción y el resultado constituye el *reward prediction error* con el que se refinarán las predicciones futuras (Fig. 21).

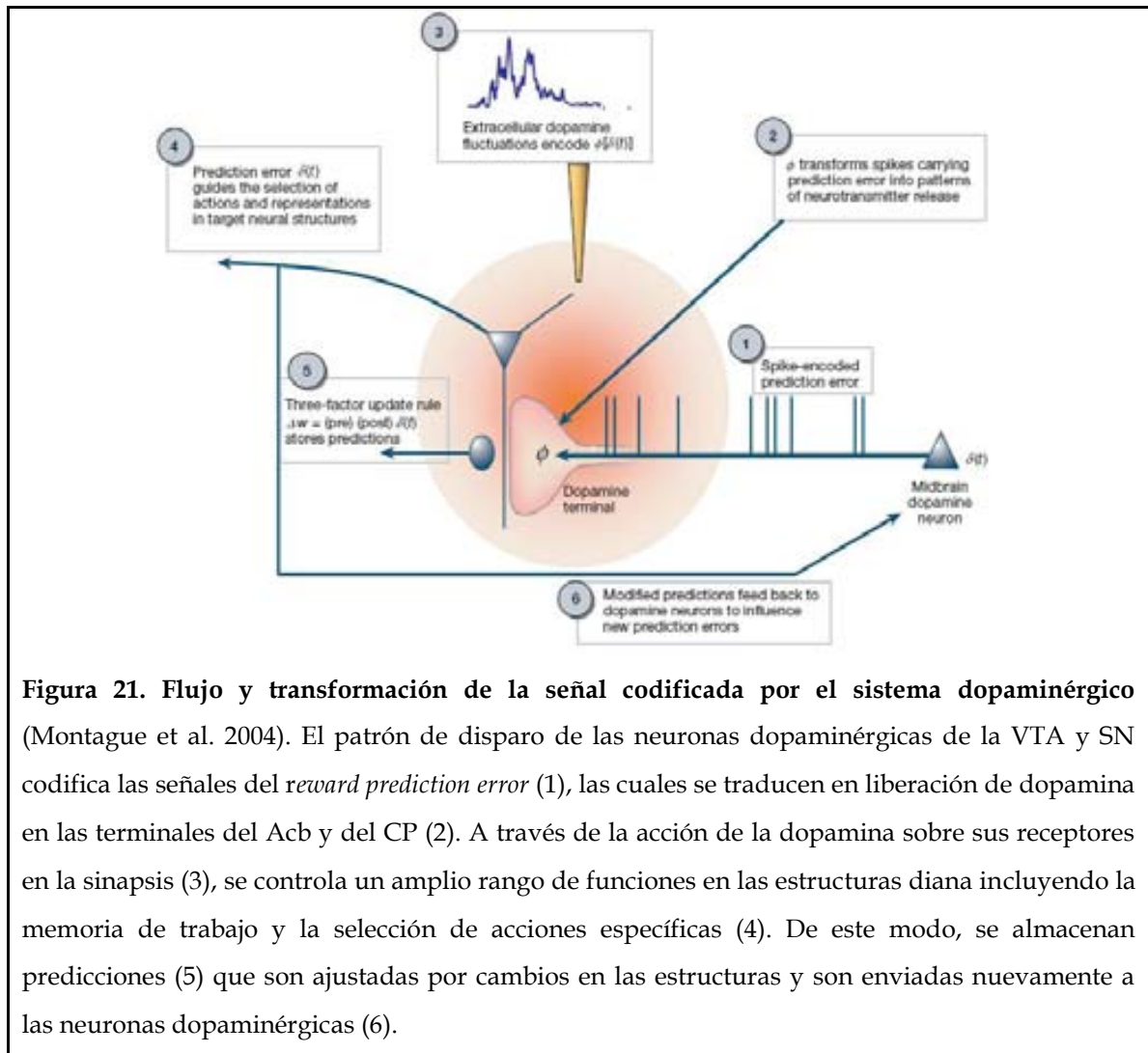
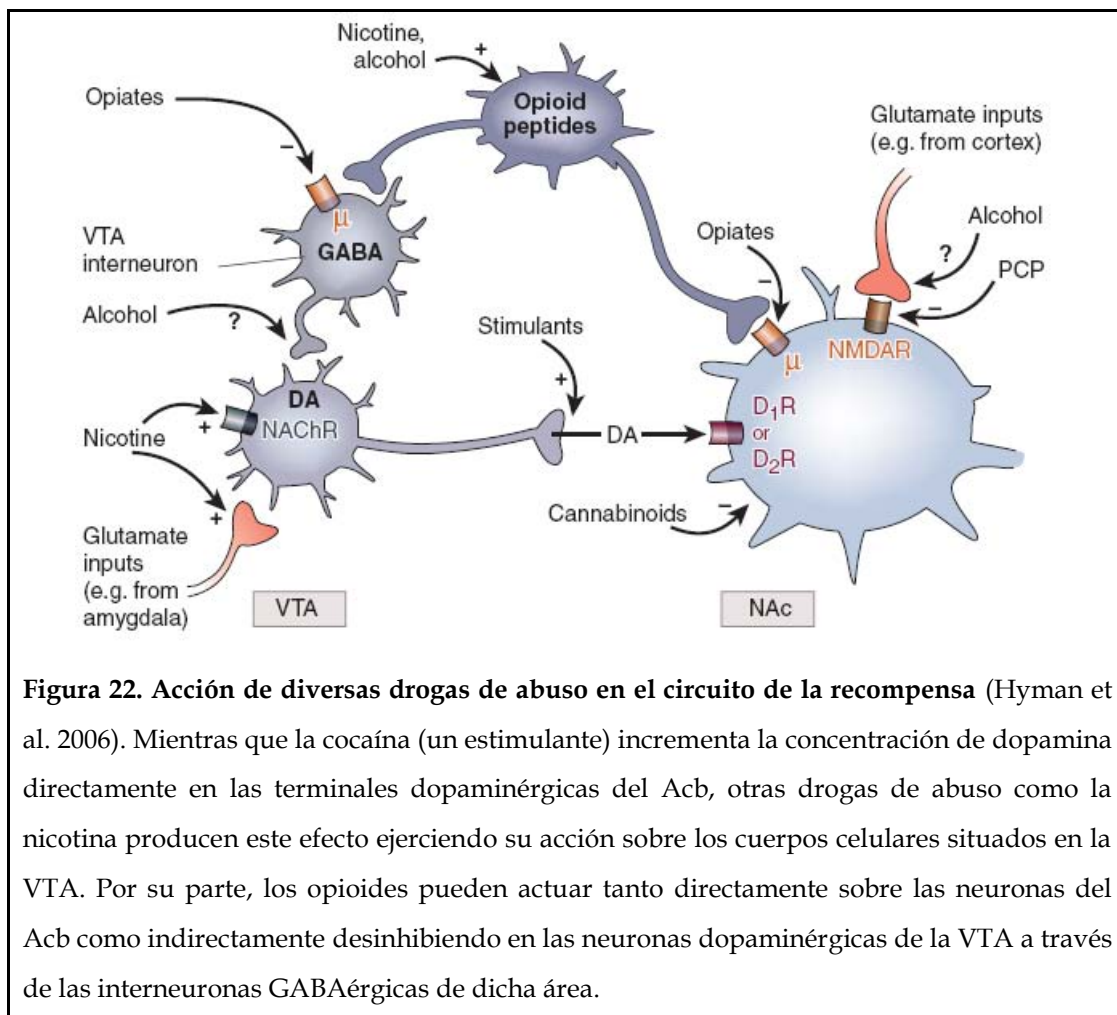


Figura 21. Flujo y transformación de la señal codificada por el sistema dopaminérgico (Montague et al. 2004). El patrón de disparo de las neuronas dopaminérgicas de la VTA y SN codifica las señales del *reward prediction error* (1), las cuales se traducen en liberación de dopamina en las terminales del Acb y del CP (2). A través de la acción de la dopamina sobre sus receptores en la sinapsis (3), se controla un amplio rango de funciones en las estructuras diana incluyendo la memoria de trabajo y la selección de acciones específicas (4). De este modo, se almacenan predicciones (5) que son ajustadas por cambios en las estructuras y son enviadas nuevamente a las neuronas dopaminérgicas (6).

2.5.2.1. Patología asociada: Adicción

Probablemente la patología en la que un exceso de función dopaminérgica ha sido más estudiada es la adicción a las drogas de abuso. Ya sea de modo directo o indirecto, las drogas de abuso como los estimulantes (Jones et al. 1998), la nicotina (Tapper et al. 2004) y la heroína (Waldhoer et al. 2004,) incrementan los niveles sinápticos de dopamina en el Acb (**Fig. 22**) en mayor medida que cualquier refuerzo natural. Por lo que, al estar ésta implicada en los procesos de aprendizaje estímulo-respuesta y estímulo-acción, modificarán las predicciones primando aquellas acciones que conducen a la obtención de droga.



En ratas, la *shell* del Acb es requerida para la adquisición inicial de la conducta de autoadministración de cocaína mientras que es el *core* el que se encarga de la adquisición de la conducta de búsqueda condicionada a estímulos asociados a dicha droga (Ito et al. 2004). Del mismo modo, una vez que la habilidad de los estímulos asociados a cocaína para mantener la conducta está consolidada, es el estriado dorsal el que juega un papel central (Everitt and Robbins , 2005). Es decir, se hipotetiza que se pasa progresivamente de una búsqueda motivada de una recompensa (conducta dependiente del Acb) a hábitos estímulo-respuesta que dependen del estriado dorsal.

2.5.2.2. Patología asociada: Esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad cerebral crónica estructural y funcionalmente vinculada a los circuitos que participan en la conducta emocional, cognitiva y motivacional. Afecta al 1% de la población mundial y sus síntomas aparecen normalmente en la adolescencia tardía o al principio de la etapa adulta. Éstos se pueden organizar en tres grandes grupos: (1) los síntomas positivos (psicóticos) como delirios y alucinaciones, (2) los síntomas negativos (pobreza lingüística, motivación reducida, comportamiento asocial...) y (3) la disfunción cognitiva (déficits de atención, memoria y función ejecutiva).

Es una enfermedad compleja, en la que participan tanto factores genéticos como ambientales. En su desarrollo están implicados numerosos genes con pequeños efectos, entre los que destacan algunos vinculados a las vías dopaminérgicas. Por su parte, los factores ambientales son de diversa índole: (1) vinculados a la adversidad social (migración, desempleo, abuso infantil...), (2) complicaciones durante el embarazo o neonatales (estrés...) y (3) el consumo de drogas de abuso (principalmente estimulantes, cannabis o drogas psicoactivas) y conllevan un incremento de la función dopaminérgica presináptica estriatal (revisado en Howes and Kapur, 2009).

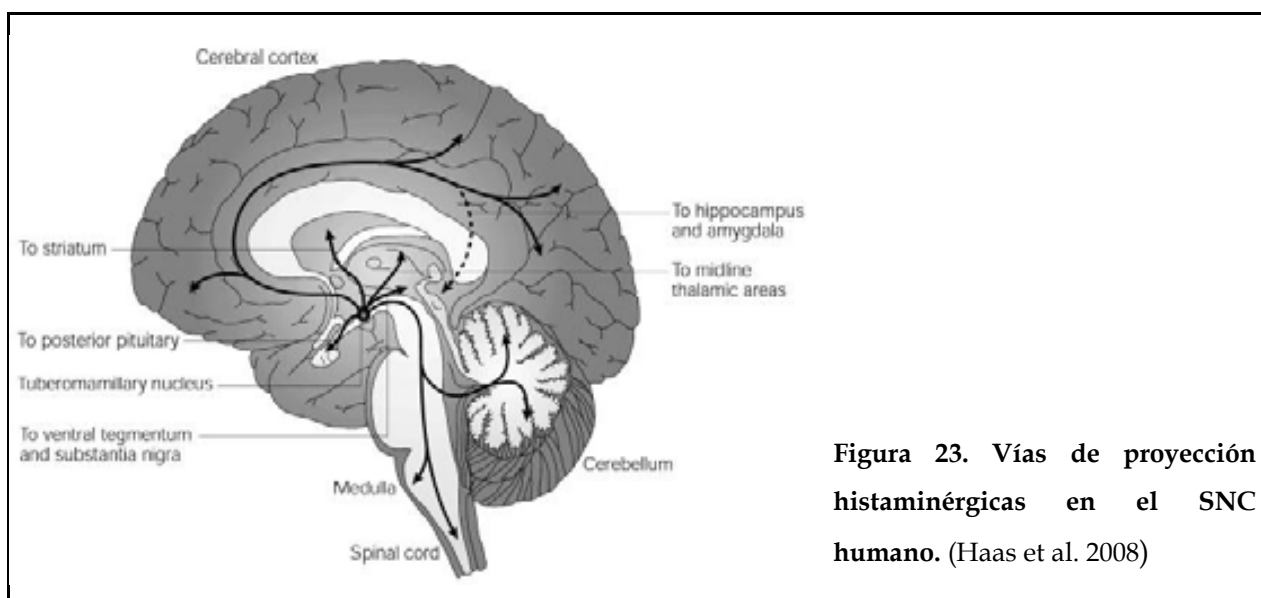
Los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia se explican mejor por una disfunción glutamatérgica (Javitt 2010), mientras que diversas evidencias vinculan la hiperfunción dopaminérgica a la psicosis propia de la esquizofrenia y de otras patologías. Numerosos estudios muestran una elevada síntesis y liberación presináptica de dopamina en el estriado de pacientes psicóticos así como un incremento de la densidad y ocupación basal de los receptores $D_{2/3}$, siendo los receptores D_2 cruciales para la acción de los fármacos antipsicóticos (revisado en Howes and Kapur, 2009).

3. Sistema neuronal histaminérgico.

3.1. Vías de proyección.

Las neuronas histaminérgicas se encuentran en los núcleos tuberomamilares (TM) en la región hipotalámica posterior. Tienen un soma grande (20-30 μ m de diámetro) del que surgen dos o tres largas dendritas, de una de las cuales (más gruesa) parte el axón. Sus proyecciones se extienden, sin una organización topográfica aparente, por casi todas las áreas del cerebro a través de dos vías ascendentes y una descendente (**Fig. 23**):

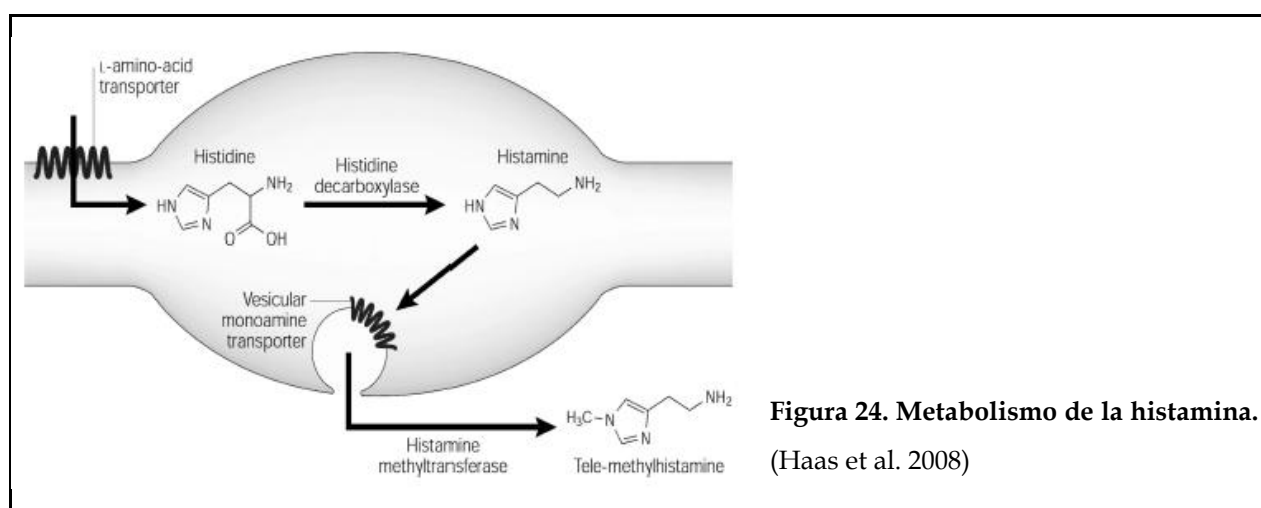
- Vía ascendente que viaja al hipotálamo, banda diagonal, septum, bulbo olfatorio, hipocampo y córtex.
- La segunda vía ascendente va a través del tercer ventrículo hasta los ganglios basales, tálamo, hipocampo, amígdala y córtex.
- La vía descendente va al cerebelo y médula espinal.



La mayor densidad de fibras con histamina puede observarse en el hipotálamo seguido de la banda diagonal, la SN y la VTA mientras que el estriado dorsal y el núcleo accumbens muestran una densidad media. A su vez, parte de los núcleos inervados por las neuronas histaminérgicas envían aferentes a los núcleos TM, como es el caso del córtex prefrontal, del área preóptica medial del hipotálamo, del tegmento dorsal y del septum (Haas et al 2008).

3.2. Metabolismo de la histamina

La histamina pertenece al grupo de las aminas biógenas y es sintetizada a partir de su precursor L-Histidina mediante una descarboxilación catalizada por el enzima histidina descarboxilasa (HDC, EC 4.1.1.22), el cual usa piridoxal 5'-fosfato (PLP) como cofactor. Una vez sintetizada, la histamina se acumula en el soma y en las varicosidades axónicas donde es internalizada en las vesículas sinápticas mediante el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) para su posterior liberación al espacio sináptico donde puede interactuar con sus receptores específicos o ser degradada a tele-metilhistamina por el enzima histamina N-metiltransferasa (EC 2.1.1.8) (**Fig. 24**).



La síntesis de histamina se ve regulada por la disponibilidad de su precursor, el cual ha de ser captado por los transportadores de aminoácidos de la barrera hematoencefálica. Además, la síntesis de histamina es controlada por un mecanismo de feedback a través de los autoreceptores H_3 de histamina (H_3R) localizados en el soma y las varicosidades axónicas de las neuronas histaminérgicas.

3.3. Receptores de histamina.

Una vez liberada al medio extracelular y antes de ser degradada por la histamina N-metil-transferasa, la histamina puede interactuar con sus receptores en la neurona presináptica (autoreceptor) y/o en la postsináptica (heteroreceptor). Los receptores de

histamina se clasifican en cuatro subtipos, denominados H₁, H₂, H₃ y H₄, siendo todos ellos receptores heptahélicos transmembrana acoplados a proteínas G (Fig. 25).

Properties	H1R	H2R	H3R	H4R
G protein isoforms	G _{q/11}	G _{α_s}	G _{V_o}	G _{V_o}
Constitutive activity	+	+	++*	?
Signal transduction	PLC IP ₃ , DAG Ca ²⁺ , PKC AMPK, NF-κB	AC cAMP, PKA CREB	AC ↓ cAMP ↓ MAPK Akt/GSK3	AC ↓ cAMP ↓ MAPK
Effector pathways	TRPC I _{K_{leak}} ↓	I _h (HCN2) I _{AHP} ↓	I _{Ca} ↓	Cytoskeleton

Figura 25. Señalización de los receptores de histamina (modificado de Haas et al. 2008).

Cada uno de ellos presenta una expresión tisular específica, destacando la baja presencia del receptor H₄ en cerebro, pues es característico de células de linaje hematopoyético (Hofstra et al. 2003). En cerebro, los receptores H₁, H₂ y H₄ se pueden encontrar como heteroreceptores mientras que el H₃ puede actuar como auto o heteroreceptor.

3.3.1. Receptor H₁ de histamina

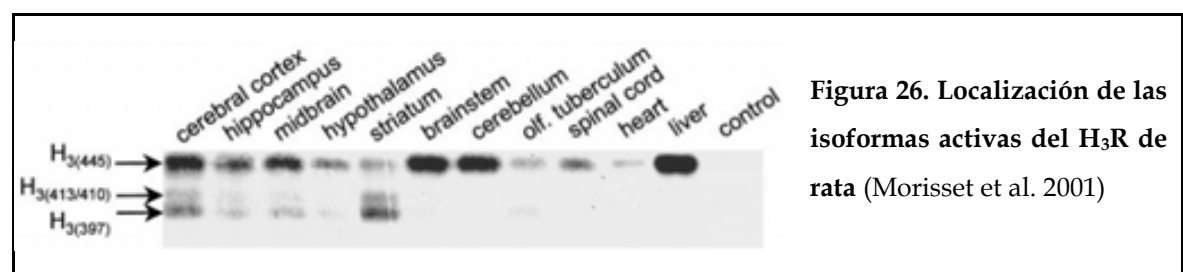
El gen del receptor H₁ se encuentra en el cromosoma 3 y codifica para una glicoproteína de 56kDa y 486 (rata) - 487 (humano) - 488 (ratón) aminoácidos que presenta una elevada homología entre especies (75-85%). Los receptores H₁ de histamina se encuentran tanto en corazón, médula adrenal, células endoteliales, linfocitos y musculatura lisa como en el sistema nervioso central (neocortex, hipocampo, tálamo, núcleo accumbens, hipotálamo posterior, cerebelo y ganglios basales) (Hill et al. 1997). Esta amplia distribución favorece su participación en diversos procesos fisiológicos como las reacciones alérgicas, la inflamación de tejidos periféricos, memoria (Roegge et al 2007) y el control de la ingesta (Masaki and Yoshimatsu, 2006).

3.3.2. Receptor H₂ de histamina

Su gen, situado en el cromosoma 5, codifica para una glicoproteína de 40kDa y 358 (rata y ratón) – 359 (humano) aminoácidos que también presenta una fuerte homología entre especies (83-95%). Al igual que el receptor H₁, el receptor H₂ puede encontrarse fuera del sistema nervioso central (células gástricas, tejido cardíaco, musculatura lisa y sistema inmunitario) o en su interior (ganglios basales, hipocampo, amígdala y córtex donde muestra una distribución laminar) (Haas et al 2008). Lo que le permite participar en funciones tan dispares como la secreción gástrica o la plasticidad sináptica (Brown et al., 2001; Lindstrom et al., 2001).

3.3.3. Receptor H₃ de histamina (H₃R)

El receptor H₃ es una glicoproteína de 70kDa y 445 que muestra poca homología en su secuencia peptídica con los receptores H₁ y H₂ (alrededor de un 20%) pero una alta similitud con el receptor muscarínico M₂ de acetilcolina (Lovenberg et al. 1999). Su gen se encuentra en el cromosoma 3 de rata y consta de tres exones y dos intrones los cuales, a través del mecanismo de corte y empalme diferencial, dan lugar a seis isoformas del mRNA del receptor en rata, cuatro activas: H₃(445), H₃(413), H₃(410), H₃(397) y dos inactivas: H₃(nf1), H₃(nf2). Todas ellas se coexpresan en cerebro y, aunque su nivel relativo de expresión varía dependiendo de la región cerebral (Morisset et al. 2001; Drutel et al. 2001) (**Fig. 26**), su expresión es más marcada en cortex, tálamo y estriado (Lovenberg et al. 1999).



Estudios de unión de radioligandos como el ¹²⁵I-iodoproxyfan indican una presencia más abundante de la proteína en los núcleos olfatorios, cortex, estriado

(incluyendo caudado-putamen y Acb), SNr, amígdala, tálamo e hipotálamo (sobretudo en los núcleos TM) (Pillot et al. 2002a).

Inicialmente caracterizado como un autoreceptor que regulaba la liberación de histamina en el sistema nervioso central (Arrang et al. 1983), se observó que además el receptor H₃ regulaba la síntesis de histamina (Arrang et al. 1987) y que se expresaba en otros tipos neuronales, siendo capaz de modular la liberación de otros neurotransmisores como la serotonina (Threlfell et al. 2004), la noradrenalina (Schicker et al. 1989), la dopamina (Molina-Hernandez et al. 2000), el glutamato (Molina-Hernandez et al. 2001) y el GABA (Arias-Montaña et al. 2001).

3.3.4. Receptor H₄ de histamina

El gen del receptor H₄ se encuentra en el cromosoma 18 y contiene tres exones y dos intrones dispuestos con una organización similar a la del receptor H₃ y que, al igual que en el caso de éste, originan dos isoformas por corte y empalme diferencial (van Rijn et al. 2008). La secuencia aminoacídica (de 390 aminoácidos en humano) presenta una baja analogía con los restantes receptores de histamina, siendo el H₃R el más similar con un 35%. Al igual que este se expresa en el sistema nervioso central, principalmente en neuronas del córtex, tálamo e hipocampo (Connelly et al 2009). Sin embargo, el receptor H₄ es expresado principalmente por las células de linaje hematopoyético tales como células T, monocitos, mastocitos, neutrófilos y eosinófilos (Liu et al., 2001) donde participa en los procesos de alergia (Dunford et al. 2006) e inflamación (Zampeli and Tiligada 2009).

3.4. Funciones de la histamina.

La histamina, a través de sus receptores, participa en multitud de procesos fisiológicos (**Fig. 27**) tanto periféricos como en el sistema nervioso central. A nivel periférico la histamina participa en la señalización de la inflamación y del daño tisular y es un mediador específico del picor. A nivel central está implicada, junto con otros sistemas de neurotransmisores, en funciones complejas tales como la regulación del ciclo sueño/vigilia, aprendizaje y memoria, la locomoción, la respuesta al dolor y estrés (revisado por Haas et al 2008) y su disfunción juega un papel importante en algunos

trastornos. Sin embargo, hemos escogido profundizar en las siguientes patologías (Parkinson, adicción y esquizofrenia) para establecer un paralelismo con el sistema dopaminérgico.

Properties	H1R	H2R	H3R	H4R
Cellular function	Postsynaptic excitability and plasticity†	Postsynaptic excitability and plasticity	Presynaptic transmitter release‡ and plasticity	?
Systemic function	Behavioral state and reinforcement (novelty, arousal)	Learning and memory (consolidation)	Numerous CNS functions,‡ cognition, emotion, learning, and memory Blood-brain barrier control	Chemotaxis
Pathophysiology	Working memory Feeding rhythms Energy metabolism Endocrine control Disorders of sleep, mood, memory, eating, and addiction	Schizophrenia	Disorders of sleep, mood, memory, eating, and addiction pain and neuroinflammation	?
	Pain and neuroinflammation	Pain and neuroinflammation		

Figura 27. Funciones de los receptores de histamina (modificado de Haas et al. 2008).

3.4.1. La histamina en el Parkinson

En la enfermedad de Parkinson las neuronas hipotalámicas no son afectadas (Nakamura et al., 1996) pero se observa un incremento en los niveles de histamina en el putamen, la substantia nigra y el globus pallidus (Rinne et al. 2002). Además, en la SN de pacientes de PD se observan diversas alteraciones como: (1) un *binding* del receptor H₃ anormalmente elevado (Anichtchik et al. 2001) que también se observa tras la depleción de dopamina nigrostriatal en rata con 6-hidroxidopamina (Ryu et al. 1994) y (2) la aparición de terminales histaminérgicas rodeando las neuronas nigrales en degeneración (Anichtchik et al. 2000). Sin embargo, en esta región no se encuentran alteraciones en los niveles de telemetilhistamina (Rinne et al. 2002), el metabolito principal de la histamina, hecho que podría sugerir que la liberación de histamina podría no estar afectada en estos pacientes. Finalmente, la activación de los H₃R altera el flujo de GABA y serotonina en las vías directa e indirecta de los ganglios basales por lo que estos receptores representan una buena diana para fármacos para la terapia de enfermedades neurodegenerativas de los ganglios basales.

3.4.2. La histamina en la adicción

La adicción y la compulsión son debidas a una disfunción de los sistemas que controlan el aprendizaje y memoria y su refuerzo a través del placer o la represión. No se conoce el mecanismo concreto por el que el sistema histaminérgico puede participar en la adicción, aunque parece basarse en el efecto que la histamina tiene sobre ciertas regiones diana: hipotálamo, hipocampo Acb y VTA, donde puede interactuar con otros sistemas de neurotransmisores como: GABA, glutamato, diversas aminas y dopamina. Tanto la liberación (Schlicker et al. 1993) como la síntesis (Molina-Hernández et al. 2000) de dopamina se ven reducidas por efecto de la histamina a través de sus heteroreceptores H₃, lo que podría reducir la motivación por obtener la recompensa (Pierce and Kumaresan 2006).

Muchas de las drogas de abuso (alcohol, cocaína, morfina, cannabinoides) interfieren con la actividad de las neuronas histaminérgicas de los núcleos tuberomamilares (Nath and Gupta 2001). La histamina reduce la hiperactividad producida por cocaína (Ito et al. 1997a) o por metanfetamina (Ito et al. 1997b) e inhibe (Cohn et al. 1973) la autoestimulación eléctrica intracraneal en ratas, la cual se ve incrementada por lesiones en los núcleos TM (Wagner et al. 1993). Esto indica que las neuronas histaminérgicas de los TM están implicadas en el control inhibitorio de la recompensa.

Por otra parte, el Acb tiene una alta densidad de receptores histaminérgicos H₁ y H₂ y es muy rico en receptores H₃ (Pillot et al. 2002a), siendo una región ampliamente conocida por su papel en el refuerzo de drogas de abuso (Pierce and Kumaresan 2006). Además, los receptores H₃ están presentes en otros componentes del sistema límbico pues actúan como heteroreceptores en neuronas glutamatérgicas mediando la inhibición de la transmisión corticoestriatal (Doreulee et al. 2001) y están presentes en neuronas estriatales GABAérgicas de proyección (Pillot et al. 2002b). Por sí mismos, los antagonistas/agonistas inversos H₃ no parecen producir autoadministración; sin embargo, potencian el refuerzo producido por la metanfetamina. Este efecto podría ser mediado por el incremento que los antagonistas/agonistas inversos H₃ generan en la liberación de

dopamina debida a la metanfetamina en la *shell* del Acb (Munzar et al. 2004). Por otra parte, se ha visto que antagonistas H₃ modulan la autoadministración de etanol en ratas seleccionadas por su preferencia por esta droga (ratas Alko-alcohol) (Lintunen et al. 2001). Del mismo modo el imetit, un agonista H₃, retrasa el comienzo de la autoadministración de cocaína y disminuye la síntesis de dopamina en el estriado (Rosell et al., en preparación).

Todo ello sugiere que la histamina reduce el refuerzo producido por las drogas de abuso y que contrarresta los efectos del sistema dopaminérgico sobre la obtención de la recompensa, particularmente a través del H₃R.

3.4.3. La histamina en la esquizofrenia

Pacientes de esquizofrenia, especialmente aquellos que presentan predominantemente síntomas negativos, poseen niveles elevados de tetra-metilhistamina, lo que concuerda con el elevado recambio de la histamina hallado en diversos modelos animales de esquizofrenia (revisado por Haas et al 2008). Esto, junto al bajo *binding* del receptor H₁ observado en el córtex frontal y cíngulo de pacientes con esta enfermedad (Nakai et al. 1991) es indicativo de una elevada tasa de liberación y recambio de histamina en la esquizofrenia. Por otra parte, en pacientes que muestran síntomas psicóticos, se ha observado un incremento del *binding* del H₃R en el córtex frontal (Jin et al. 2009) sugiriendo la implicación del H₃R en la patología de los síntomas positivos.

Hoy en día para el tratamiento de la esquizofrenia se usan antipsicóticos convencionales o atípicos. Todos ellos actúan, al menos parcialmente, por medio del antagonismo de los receptores de dopamina D₂-like (con lo que se tratan adecuadamente los síntomas positivos), pero afectan también a otros sistemas. Los antipsicóticos sedativos se unen al receptor H₁ mientras que los neurolepticos atípicos bloquean receptores de serotonina (5-HT_{2R}) en neuronas histaminérgicas incrementando el recambio de histamina en córtex, hipotálamo y estriado en la misma proporción que el agonista inverso H₃ ciproxifan (Morisset et al. 1999). Por otra parte, los antagonistas/agonistas inversos del receptor H₃ han sido testados en diferentes modelos de esquizofrenia con resultados prometedores (revisado

por Tiligada et al. 2009) pero por sí mismos no parece que pudiesen servir como única terapia antipsicótica. Sin embargo, podrían constituir una eficiente medicación adicional para controlar los déficits cognitivos en pacientes esquizofrénicos y reducir los efectos secundarios (somnolencia, apetito) de los antipsicóticos mediados por H₁. Por tanto, la combinación de antagonistas/agonistas inversos D_{2-like}, 5-HT_{2R} y H_{3R} puede ser considerada como una buena propuesta para el tratamiento de diferentes tipos de psicosis (Tiligada et al. 2009).

OBJETIVOS GENERALES

1. Objetivos generales

En esta tesis se pretende aportar datos experimentales que ayuden a comprender las interacciones entre el sistema neuronal histaminérgico y otros sistemas de neurotransmisores presentes en los ganglios basales, particularmente el dopaminérgico. Dicho conocimiento podría ayudar a paliar patologías tales como la adicción a drogas de abuso, la esquizofrenia o la enfermedad de Parkinson. Al intentar estudiar efectos de ligandos de receptores sobre la síntesis de dopamina nos encontramos ante un posible efecto de retroinhibición en nuestras preparaciones estriatales *ex vivo*, que decidimos estudiar en profundidad antes de plantear futuros estudios farmacológicos.

El sistema histaminérgico, a través del receptor H₃ de histamina, modula la síntesis y liberación de otros neurotransmisores como la dopamina (Molina-Hernandez et al. 2000), la serotonina (Schickler et al. 1988), la noradrenalina (Schickler et al. 1989), el glutamato (Molina-Hernandez et al. 2001) y el GABA (Arias-Montaña et al. 2001). Sin embargo, aunque es conocida la amplia distribución de los receptores H₃ (Pillot et al. 2002a) y existen pruebas indirectas de su variada localización celular (Arias-Montano et al. 2001, Molina-Hernandez 2001, Bacciottini et al. 2002), su presencia en los distintos tipos celulares de los ganglios basales no ha sido directamente estudiada. Para interpretar efectos de ligandos H₃ sobre los ganglios basales, en el trabajo de esta tesis nos preguntamos **¿en qué poblaciones celulares se encuentra el receptor H₃?**

Al modular la actividad de otros sistemas de neurotransmisores y en especial de la dopamina, el H₃R puede participar en diversas patologías como el Parkinson, la esquizofrenia o la adicción a las drogas de abuso, todas ellas acompañadas por una disfunción del sistema dopaminérgico de los ganglios basales. Por ello, y debido a que el imetit (agonista H₃R) retrasa el reinicio de la autoadministración de cocaína (Rosell et al. en preparación) nos planteamos **estudiar si la presencia del H₃R en neuronas dopaminérgicas se ve alterada en un modelo de patología adictiva: la autoadministración de cocaína.**

Sin embargo, las técnicas histoquímicas no permiten el estudio en profundidad del mecanismo de acción de los receptores histaminérgicos sobre la neurotransmisión dopaminérgica. Por este motivo, pasamos a estudiar la síntesis de dopamina *ex vivo*, al ser ésta exclusiva de neuronas catecolaminérgicas. Resultados de otro miembro del

grupo confirmaron la inhibición por parte del agonista H₃ imetit de la velocidad de síntesis de dopamina. A la hora de testar otros fármacos nos encontramos inesperadamente con una disminución de la síntesis claramente dependiente del tiempo de incubación que atribuimos a la retroinhibición de la dopamina sobre la TH. Sabiendo que los estudios más detallados sobre este tema han sido llevados a cabo *in vitro* con enzima recombinante, nos preguntamos **¿Podemos estudiar cómo retroinhibe la dopamina a la tirosina hidroxilasa en cerebro incubado *ex vivo*?**

Para responder a estas preguntas nos propusimos:

- 1. Describir la distribución del receptor H₃ de histamina (tanto la proteína como el mRNA) en los diversos tipos neuronales y glía de los ganglios basales: astrocitos y neuronas dopaminérgicas, glutamatérgicas, colinérgicas y GABAérgicas.**

Para la consecución de este objetivo se han empleado los procedimientos experimentales de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica fluorescentes sobre secciones de cerebro de rata.

- 2. Evaluar si la autoadministración crónica de cocaína altera la expresión de los mRNA del receptor H₃ y la tirosina hidroxilasa.**

Al igual que en para el objetivo anterior, se han empleado técnicas histoquímicas sobre secciones de cerebro. Sin embargo, en este caso, los cerebros provienen de animales que han sido sometidos al procedimiento de autoadministración operante de cocaína.

- 3. Interpretar la regulación de la síntesis de dopamina en tejido cerebral, como base para la posterior selección de fármacos que puedan modificar la conducta de autoadministración.**

Se ha estudiado la retroinhibición de la tirosina hidroxilasa en miniprismas de núcleo estriado mediante la incubación de los mismos y la posterior purificación por HPLC de la dopamina sintetizada. Con el mismo fin, se ha analizado la síntesis de L-DOPA en homogenado de estriado de rata.

METODOLOGÍA

1. Animales.

Se han utilizado ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de una edad aproximada de 8 semanas y entre 250-300g que han sido criadas en el Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona en condiciones de temperatura, humedad y luz constantes y con libre acceso a comida y bebida.

Los procedimientos realizados en este estudio cumplen la directiva de la Comunidad Económica Europea en la regulación y uso de animales de laboratorio (86/609/CEE, 24 de Noviembre de 1986) y el decreto de la Generalitat de Cataluña (DOGC 2450 7/8/1977) en el que se regula la utilización de animales para la experimentación y otras finalidades científicas. Así mismo, el procedimiento experimental fue aprobado por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la Universidad Autónoma de Barcelona (número 3336).

2. Histoquímica.

2.1. Reactivos y materiales.

Se usó el criostato motorizado *Leica JungCM 3000* y portas *starfrost plus* suministrados por Deltalab para la recogida de los cortes de 10µm. Para el marcado de las sondas se usaron productos de Roche y el *Nescofilm* para la hibridación *in situ* fue suministrado por Karlan. Los reactivos necesarios para las diferentes etapas del procedimiento fueron adquiridos de la máxima pureza posible.

2.2. Sondas de cRNA:

El cDNA de las secuencias de interés fue obtenido por PCR y subclonado en plásmidos pGEM-4Z (Promega) para su amplificación. Tras la digestión del plásmido con enzimas de restricción específicos y la recuperación de las secuencias de cDNA, las sondas de mRNA *antisense* y *sense* (control) fueron marcadas en los UTP con digoxigenina (la sonda del H₃R) o biotina (las demás) por transcripción *in vitro*. Los plásmidos con el cDNA de H₃, SP y PE insertados fueron facilitados por el Dr. Jorge

Díaz de la Universidad Paris Descartes, donde se llevó a cabo parte del trabajo experimental.

Las sondas empleadas son las siguientes:

1) Sonda del receptor H₃ de histamina

Corresponde a los nucleótidos 636-1243 de la secuencia del cDNA del receptor de rata (NCBI Reference Sequence: NM_053506.1) (**Fig. 28**). Se ha empleado esta parte de la secuencia debido a que previamente se había demostrado que la sonda *antisense* hibridaba con el mRNA de varias isoformas del H₃R en cerebro y tejidos periféricos (Morisset et al. 2001), concretamente las isoformas H₃(445), H₃(413/410) y H₃(397). Además esta misma sonda ha sido empleada en el estudio de distribución del H₃R llevado a cabo por (Pillot et al. 2002a).

```

601                                     ggacc ttgggcccggg gcctctgcaa
661 gctgtggctg gtggtagact acctactgtg tgcctcctcg gtcttcaaca tcgtactcat
721 cagctatgac cgattcctgt cagtcactcg agctgtctcc tacagggccc agcaggggga
781 cacgagacgg gccgttcgga agatggcaact ggtgtgggtg ctggccttcc tgctgatgg
841 gcctgccatc ctgagttggg agtacctgtc tgggtggcagt tccatccccg agggccactg
901 ctatgctgag ttcttttaca actggtactt tctcatcagc gcctccacc ctaggttctt
961 caegcccttc ctcagegtta ccttcttcaa cctcagcacc tacctgaaca tccagaggcg
1021 caccgcctt cggcttgatg ggggcccgtga ggctggccca gaacccccac cagatgccc
1081 gccctgcgca cctccagctc ccccagctg ctggggctgc tggccaaaag ggcattggcg
1141 ggccatgccg ttgcacaggt atgggggtgg tgaggcaggc cctgggtgtt aggctgggga
1201 ggctgccctc ggggggtggca gtgggtggagg tgc
    
```

Figura 28. Secuencia de cDNA del H₃R complementaria a la de la sonda utilizada.

2) Sonda de la proencefalina

Corresponde a los nucleótidos 335-641 de la secuencia del cDNA de rata (GenBank AH002996) (**Fig. 29**).

```

301                                     acacg ggctggcgta gggcctgcgt
361 cagctgcagc ccgatggcga ttggcgcgcg cgcctcttcg gtttggggct aattataggg
421 tggctgtgcg gccgccagag aggcaggcgc acagagcccc gcagcccagc gacgctgccg
481 ggcgctcgt agagctcccc gacggggcca cctcacactt gccttcttta tttctcttgc
541 agagtggcat ctgcatccg ctctccagc tacttgccc atctgaacaa cggcagcgtg
601 agtgactttg cccaagtgc cgtagccttg cggaccgtct c
    
```

Figura 29. Secuencia de cDNA de la PE complementaria a la de la sonda utilizada.

3) Sonda de la sustancia P

Corresponde a los nucleótidos 80-227 de la secuencia del cDNA de rata (GenBank AH002233) (Fig. 30).

```

61          t tcccacccct tctgccttca ggggtgtgcct gggaagaagc
121 tgtaggggaa caaaagatgc cttagaatgg ctgatgggta agttctacat gagaaaggag
181 gtttaaattc ctctttcccc taaatgtaaa acaaacctgc cttcacc

```

Figura 30. Secuencia de cDNA de la SP complementaria a la de la sonda utilizada.

4) Sonda de la tirosina hidroxilasa

La sonda de la TH, de aproximadamente 1.7kb de longitud es complementaria a la secuencia del mRNA de TH de rata (NCBI Reference Sequence: NM_012740.3) desde el nucleótido 25 hasta su final (Fig. 31).

```

1          gcgccc cctcgccaca gcccaagggc ttcagaaggg
61 ccgtctcaga gcaggatgcc aagcaggccg aggctgtcac gtccccaagg ttcacatggac
121 ggcgacagag tctcatcgag gatgcccgcg aggagcggga ggcggcggca gctgcagcag
          ...
1681 gcactccagg gtggctcctgc attcctcctg ccctccatgc tctatactac cctgattatt
1741 ctctcaataa aggaaggaaa gaatctaacc

```

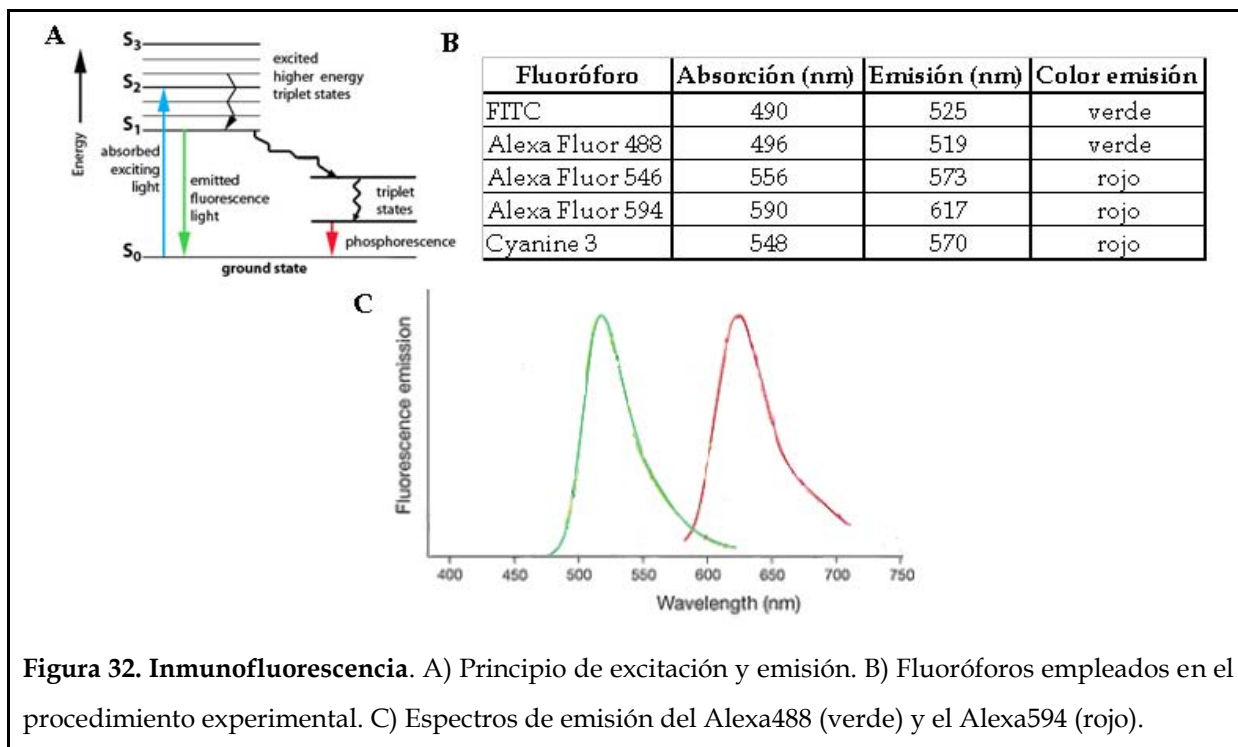
Figura 31. Secuencia de cDNA de la TH complementaria a la de la sonda utilizada.

2.3. Inmunofluorescencia

Para el desarrollo experimental se ha elegido la detección fluorescente dado que los anticuerpos así conjugados permiten la detección simultánea de diversos componentes celulares (proteínas, RNA...) de modo seguro para el experimentador y el ambiente.

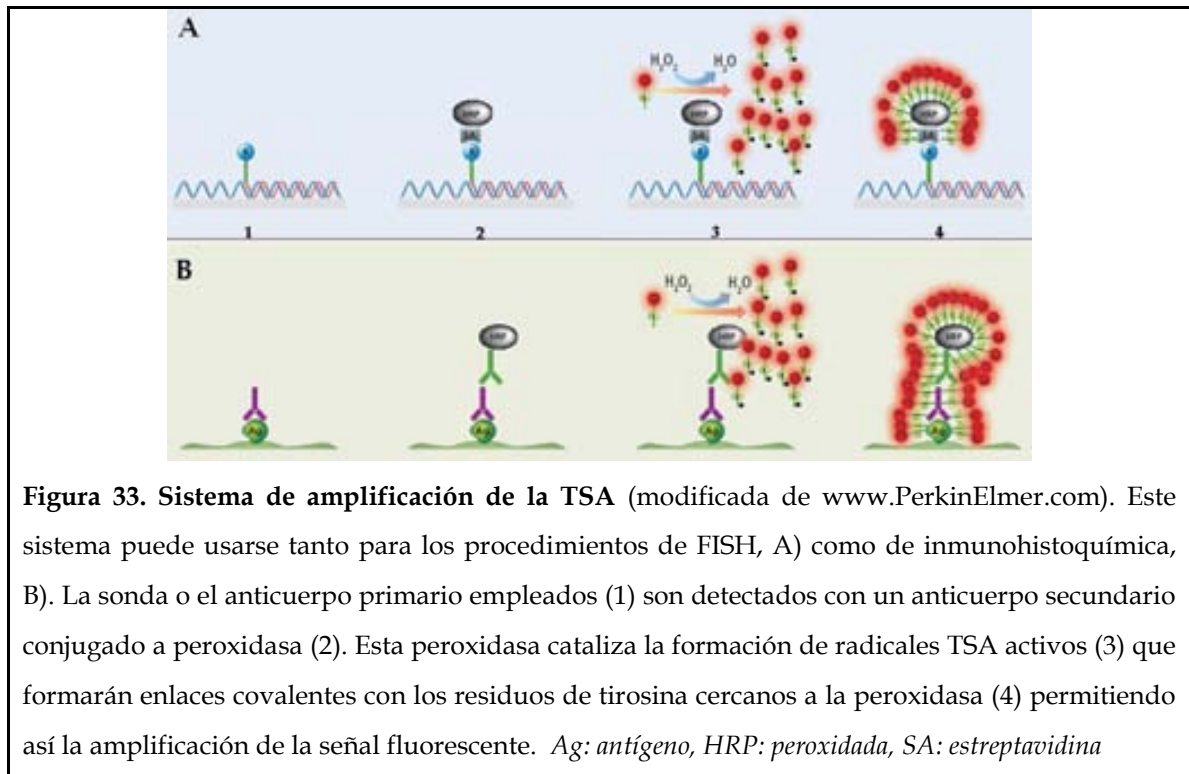
Los distintos fluoróforos absorben fotones de luz a una longitud de onda determinada de tal modo que parte de sus electrones suben a un estado excitado inestable de alta energía. Cuando estos electrones retornan a su estado basal de baja energía emiten una menor cantidad de energía que la absorbida (es decir, de mayor longitud de onda) en forma de luz (si no es absorbida por otra molécula) (Fig. 32A). La cantidad de energía emitida y su longitud de onda depende tanto del ambiente químico como de la estructura del fluoróforo, por lo que se suele emplear compuestos con anillos aromáticos y dobles enlaces.

En el presente trabajo se han empleado anticuerpos conjugados a distintos fluoróforos (**Fig. 32B**) pero en todos los casos se han combinado uno rojo y uno verde, aprovechando la separación existente entre sus espectros de emisión (**Fig. 32C**).



2.3.1. Sistema de amplificación de la TSA (tyramide signal amplification)

Este sistema de amplificación de la señal puede usarse tanto en el procedimiento de hibridación *in situ* como en el de inmunohistoquímica (**Fig. 33**). El sistema se basa en la deposición, sobre y junto la sonda o el anticuerpo primario empleados, de moléculas de tiramida conjugadas con un fluoróforo, una vez la tiramida ha sido activada por la peroxidasa. Los radicales de tiramida no depositados en la muestra, forman dímeros que serán eliminados con los lavados.



2.4. Congelado, corte y recuperación de secciones de cerebro de 10µm de espesor.

Tras la decapitación mediante el empleo de la guillotina, se extrajo el cerebro del animal, se congeló sumergiéndolo en isopentano (enfriado a -40°C con nieve carbónica) durante 2min y se guardó a -20°C hasta su posterior procesado. Empleando *Tissue-Tek O.C.T*, una formulación de resinas y glicoles solubles en agua, el cerebro congelado se adhirió a un soporte que permitió situarlo y orientarlo perfectamente en el brazo móvil (Fig. 34) del criostato para su posterior segmentado.

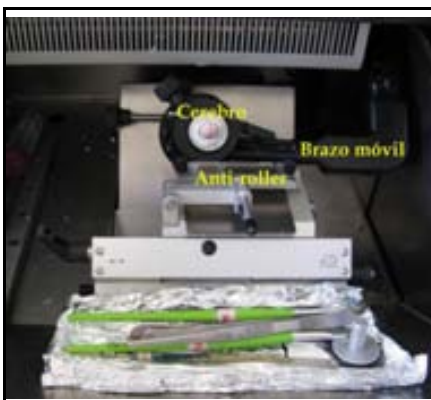
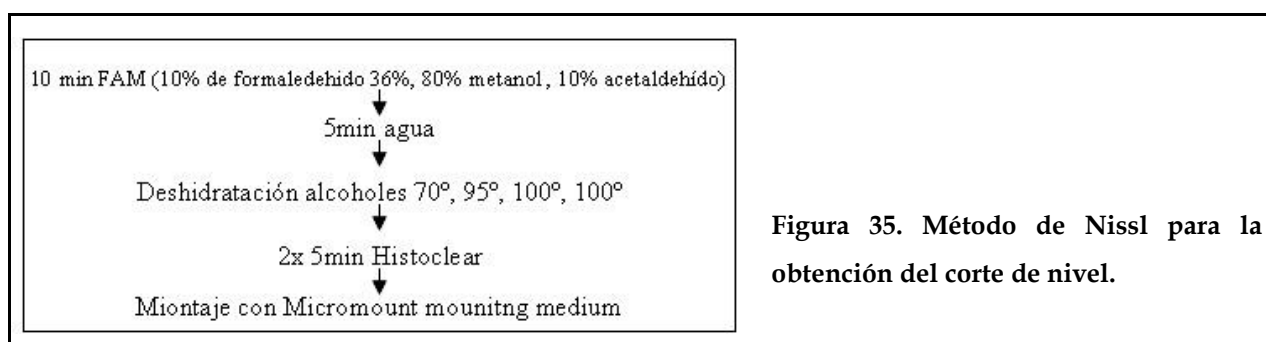


Figura 34. Corte del cerebro de rata en el interior del criostato. La temperatura de la cámara es de -19°C y la del área alrededor del cerebro es de -11°C .

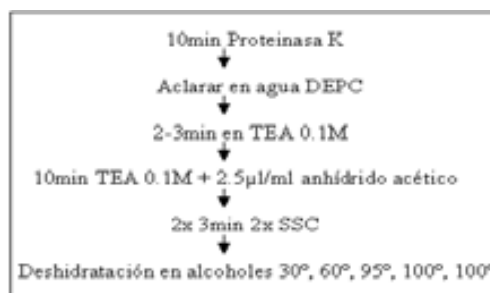
Tras localizar la zona correcta con ayuda del atlas “The Rat Brain” (Paxinos and Watson 2005), se hicieron secciones de 10µm de espesor que se recogieron directamente en porta de forma continua (no seriada) empleando un *anti-roller* para mantenerlas estiradas. Al terminar, las secciones se fijaron con paraformaldehído 4% durante 40min, se desecaron con alcoholes de concentración creciente y, tras permanecer 30min en aire frío, se guardaron en el congelador a -20°C. Cada 5 portas se guardó un corte en un porta aparte, los cuales se tiñeron de azul con violeta de cresilo 0,5% según el método de Nissl (Fig. 35) para así conseguir un corte de nivel.



2.5. Doble hibridación in situ fluorescente (FISH):

2.5.1. Prehibridación

Sin dejar atemperar los portas (que estaban a -20°C y contienen las secciones de 10µm) comenzaron los diferentes lavados: 10min Proteinasa K 1µg/ml en tampón (TrisCl 100mM pH 8.0, EDTA 50mM pH 8) a 37°C, aclarado en agua DEPC, 2-3min en 0,1M trietanolamina pH 8,0,



10min 2,5µl/ml anhídrido acético en 0,1M trietanolamina, 2x 3min 2xSSC y, por último, una deshidratación en etanol de concentración creciente 30°, 60° (15s), 95°, 100°, 100° (30s). Al terminar los lavados, los portas se dejaron secar 30min en aire frío antes de la hibridación.

La fijación de las secciones con paraformaldehído favorece que éstas soporten, permaneciendo morfológicamente intactas, la acción de la proteínasa K la cual facilita el

acceso de la sonda al ácido nucleico diana. A su vez, la acetilación del DNA con anhídrido acético colabora junto con el SSC en la disminución de la señal inespecífica.

2.5.2. Hibridación de las sondas de cRNA

Se preparó la cantidad necesaria de solución de hibridación:

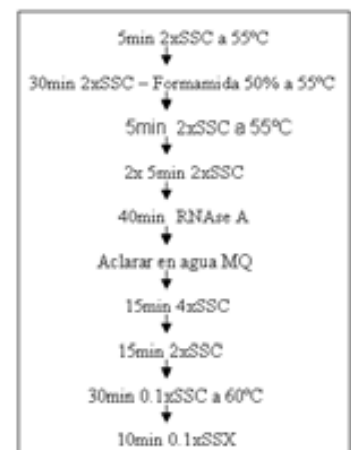
- 50% formamida, que disminuye la Tm aproximadamente un grado por cada 1%.
 - 2x SSC, junto con la Tm controla la astringencia de la hibridación.
 - 10% dextrán sulfato, da consistencia y capta agua aumentando la concentración efectiva del resto de componentes de la mezcla de hibridación.
 - 1% Denhart's solution.
 - 0.1% Pirofosfato sódico
 - 1mM EDTA pH 8.0
- } dificultan la unión inespecífica.
- 50mM Tris-HCl pH 7.4 que estabiliza el pH.
 - 0.1mg/ml esperma de salmón y 0.1mg/ml de RNA de levadura calentados a 95°C durante 15min para desnaturalizarlos y conservados en hielo, compiten con la sonda por las uniones inespecíficas.
 - Agua DEPC para completar el volumen.

A continuación se diluyeron las dos sondas en la solución de hibridación a la concentración deseada (normalmente entre 10 y 20ng de sonda por porta). Se calentó 5min a 70°C y posteriormente se dejó en hielo 5min tras lo que se añadieron 50µl por porta. Se cubrieron con *Nescofilm* (film resistente a la temperatura) y se incubaron durante la noche a 55°C en una cámara húmeda de formamida 50%.

2.5.3. Posthibridación

La concentración decreciente de SSC aumenta progresivamente la astringencia de la hibridación dificultando la misma de modo que sólo permanecen las uniones específicas. A su vez, la RNAsa degrada la sonda no hibridada minimizando así la señal inespecífica.

Se realizaron sucesivos lavados con agitación: 5min 2xSSC (para separar el Nescofilm), 30min 2xSSC-50%

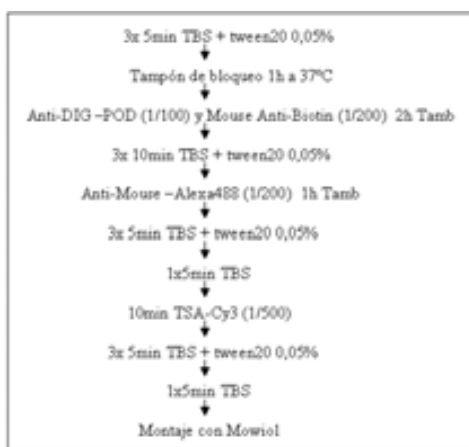


formamida, 5min 2xSSC (todos ellos a 55°C), dos veces 5min 2xSSC a Tamb, 40min a 37°C RNase A 20µg/ml en tampón RNase (500mM NaCl, TrisCl 10mM pH8, EDTA 1mM pH8), siendo a partir de aquí a temperatura ambiente: aclarado en agua MilliQ, 15min 4xSSC, 15min 2xSSC, 30min a 60°C 0,1xSSC, 10min 0,1xSSC a Tamb.

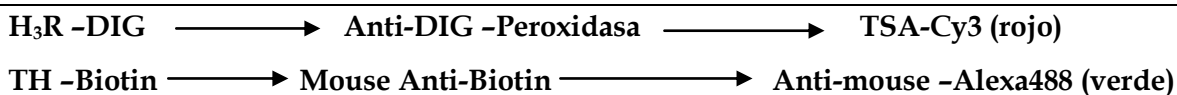
2.5.4. Detección de la FISH.

Ambas sondas se revelaron simultáneamente, pues no se observaron interferencias entre sus reactivos. Todos los lavados se llevaron a cabo en agitación suave y, a partir de la incubación con el anticuerpo Anti-mouse –Alexa488, protegidos de la luz para que los fluoróforos no se degradasen; del mismo modo, todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. La presencia de detergente facilitanla permeabilización del tejido permitiendo el paso de los diferentes productos empleados. A diferencia de otros detergentes, como el *Triton X-100*, al eliminar el Tween20 el tejido se recupera permitiendo una correcta visualización del mismo.

Se hicieron tres lavados de 5min con tampón TBS (TrisCl 50mM, pH 7.8 y 0.9%



NaCl) con tween20 0.05% antes de bloquear las posibles uniones inespecíficas durante 1h a 37°C con 100µl de tampón de bloqueo (1% Blocking reagent de Roche, en TBS). A continuación, se incubó 2h a Tamb con 250µl de la mezcla de los anticuerpos Anti-DIG –POD (1/100) y Mouse Anti-Biotin (1/200) diluidos en: TBS, BSAc 0.1%, suero normal de cordero 1%, tween20 0.1%.



Las siguientes incubaciones estuvieron separadas entre sí por tres lavados de 10min con TBS-tween20 0.05% y un último lavado de 5min en TBS para eliminar el tween20. La primera consistió en 1h a Tamb con 100µl del anticuerpo Anti-mouse –Alexa488 (fluorescencia verde) diluido 1/200 en TBS-tween20 0.1%. y la segunda en

10min con 100µl de TSA-Cy3 (fluorescencia roja) diluida 1/500 en su tampón específico (proporcionado por el *kit*). Tras los lavados finales, se realizó el montaje de los cubreobjetos con el medio de montaje Mowiol.

2.6. Hibridación in situ radioactiva (³³P)

2.6.1. Prehibridación

Es exactamente igual a la prehibridación no radioactiva con la salvedad de que se elimina el lavado de 3min con 0,1M TEA pH 8,0.

2.6.2. Hibridación de las sondas de cRNA

Es similar a la de la FISH con la diferencia de que la solución de hibridación lleva formamida al 70%, que la temperatura de hibridación fue de 58°C y que la sonda están marcadas con ³³P, por lo que su concentración se mide en cpm/µl. Normalmente se utilizan unos 2 millones de cpm por portaobjetos.

2.6.3. Posthibridación

Es tras la incubación con la RNAse donde empiezan las diferencias con el protocolo fluorescente. Se realizaron los siguientes lavados: 2 veces 15min con 4xSSC, 30min con 0,5xSSC a 55°C, 30min con 0,1xSSC a 60°C y 20min con 0,1xSSC. A continuación los portas se deshidrataron con una concentración creciente de alcoholes (30°, 60°, 95°, 100°, 100°) durante 15sec cada uno y se dejaron secar con aire frío 30min.

2.6.4. Exposición

Los portas se pusieron en un *cassette* y, a oscuras, se les puso encima un film Kodak Biomax MR-1. El tiempo de exposición depende, entre otros factores, del nivel de expresión del mRNA a detectar pues cuanto menos se exprese más larga será la exposición del film. En este caso el tiempo de exposición ha sido de una semana para el H₃ en la región del estriado.

2.6.5. Revelado

Se llevó a cabo un revelado fotográfico del *film*. Tras atemperar durante 30min el revelador y el *film*, este se sumergió en el revelador (D19) durante 4min para a continuación lavarlo en agua y sumergirlo 10min en fijador (GBX). Por último se hizo un último lavado de 20 min en agua, para eliminar los posibles restos de fijador, antes de dejarlo secar a temperatura ambiente.

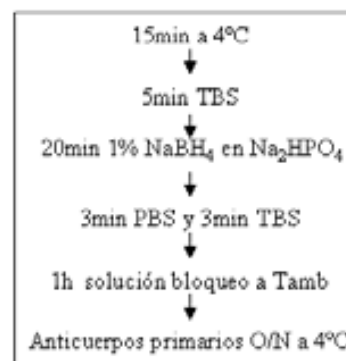
2.6.6. Cuantificación

El nivel de expresión del mRNA para el receptor H₃ ha sido cuantificado mediante el programa Scion image.

2.7. Doble inmunohistoquímica fluorescente.

2.7.1. Bloqueo e incubación con los anticuerpos primarios

En primer lugar los portas con las secciones de 10µm previamente congeladas se dejaron unos 15min en la nevera para que se atemperasen lentamente y a continuación se lavaron 5min con TBS a Tamb antes de lavarlos con NaBH₄ 1% en Na₂HPO₄ 0.1M pH 8.5 durante 20min para permeabilizar el tejido y desenmascarar los antígenos. Tras 3min de PBS 50mM y 3min de TBS se incubó durante 1h a



37°C con tampón de bloqueo (1% Blocking reagent en TBS). Una vez terminado el bloqueo, los portas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en TBS con Tween20 0.1%, suero normal de burro 10% y BSA acetilada 0.1% durante toda la noche a 4°C. Al igual que en la doble FISH, ambos anticuerpos se han incubado y detectado simultáneamente al no hallarse interferencias en el protocolo. Del mismo modo, los lavados se han llevado a cabo en agitación suave y las incubaciones en cámara húmeda.

En el caso del anticuerpo anti-H₃Ral se ha llevado a cabo el control negativo con el péptido bloqueante (Alfa Diagnostics, H3R31-P). Para ello, previamente a la incubación con el anticuerpo, éste se dejó reaccionar con el péptido bloqueante durante 2h a Tamb para su inactivación.

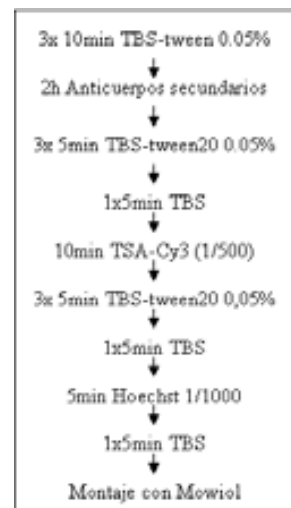
Antígeno	Abrev.	Dil.	Referencia	Especie
Histamine H ₃ receptor	anti-H ₃ Rab	1/300	Abcam (ab-13014)	Rabbit (P)
Histamine H ₃ receptor	anti-H ₃ Rc	1/200	Chemicon (ab5660)	Rabbit (P)
Histamine H ₃ receptor	anti-H ₃ Ral	1/200	Alfa Diagnostics (H3R31-A)	Rabbit (P)
Tyrosine Hydroxylase	anti-TH	1/500	Millipore (AB1542)	Sheep (P)
Dopamine D1 receptor	anti-D1	1/300	Frontier Institute (D1rgpap501)	G. Pig (P)
Choline Acetyl Transferase	anti-ChAT	1/100	Chemicon (ab144P)	Goat (P)
Vesicular Glutamate Transporter 1	anti-VGLUT1	1/300	Synaptic Systems (135 511)	Mouse (M)
Glial fibrillary Acidic Protein	anti-GFAP	1/500	Sigma Aldrich (G3893)	Mouse (M)

P, polyclonal; M, monoclonal

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios del procedimiento de inmunohistoquímica.

2.7.2. Detección de la doble inmunohistoquímica fluorescente

Los portas se lavaron 3 veces 10min con TBS con Tween20 0.05%, y después se incubaron durante 2h con la mezcla de los anticuerpos secundarios diluidos en TBS con Tween20 0.1%, BSAc 0.1%, suero de burro 10%. A continuación, protegidos de la luz, se repitieron los lavados pero esta vez seguidos de 5min en TBS antes de incubar 10min con 100µl TSA-Cy3 (fluorescencia roja) diluida 1/100 en su tampón específico proporcionado por el kit en aquellos casos en los que es necesaria. Tras dos lavados más con TBS, todos los portas se dejaron incubar durante 5min con Hoechst para la tinción de los núcleos en fluorescencia azul. Finalmente se realizó una última serie de lavados previos al montaje con Mowiol.



Sistema de detección	Dilución	Referencia	Especie
Anti Digoxigenin -POD	1/100	Roche (11207733910)	Sheep
Anti-rabbit-HRP	1/200	Cell signalling (7074)	Goat
TSA-Cy3 (amplification system)	1/100-500	Perkin Elmer (NEL 744)	-
Anti biotine	1/200	Jackson Immun. (200-002-211)	Mouse
Anti mouse -Alexa 488	1/200	Invitrogen (A11029)	Goat
Anti sheep -FITC	1/40	Sigma Aldrich (F7634)	Donkey
Anti goat -Alexa 488	1/200	Invitrogen (A11055)	Donkey
Anti guinea pig -Alexa 488	1/200	Invitrogen (A11073)	Goat
Anti rabbit -Alexa594	1/200	Invitrogen (A21442)	Chicken

Tabla 2. Sistemas de detección del procedimiento de inmunohistoquímica.

2.8. Fotografiado

Las fotografías fueron tomadas empleando un microscopio Nikon Eclipse 90i equipado con los siguientes filtros de fluorescencia: (1) DAPI (340-380nm excitación, 435-485nm emisión), (2) FITC (465-495nm excitación, 515-555nm emisión) y (3) G2-A (510-560nm excitación, 590 emisión). Las imágenes fluorescentes fueron tomadas con una cámara de alta resolución (1280x1024 pixels) Nikon digital DXM1200F controlada por el *software* ACT-1 de Nikon. Sus niveles de intensidad de la señal fueron ajustados mediante el programa informático Adobe PhotoShop para una mejor visualización, a pesar de lo cual los originales han sido guardados. Las imágenes de microscopía confocal son un Z-stack de 5 fotografías (tomadas cada 1 μ m) hechas con el microscopio Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) equipado con un objetivo UPLSAPO 60x NA: 1.35. Se usaron los siguientes lasers: (1) 488nm (488nm excitación, 520nm emisión) y (2) 559nm (559nm excitación, 618nm emisión).

Dado que la intensidad del marcaje para los anticuerpos empleados es debida a numerosas variables que no pueden ser individualmente cuantificadas, este estudio no intenta cuantificar las cantidades relativas de antígenos marcados. En su lugar, se han medido la colocación con el software FV10-ASW 1.7 (Olympus) expresada como overlap \pm desviación estándar de 7 diferentes regiones de interés. Cuando el valor de overlap es superior a 0.5 se considerará que ambos antígenos colocan.

3. Autoadministración de cocaína en rata

3.1. Reactivos y materiales

La cocaína para el procedimiento de autoadministración fue cedida por el Ministerio de Sanidad. Los *pellets* de sacarosa provienen de Bio-Serv. Las jaulas de Skinner LE1005 así como el programa informático *Pakwin*, para controlarlas y recoger los datos, de Pablab.

3.2. Animales

Los 23 animales del grupo experimental de autoadministración han estado estabulados individualmente en condiciones constantes de temperatura y humedad con libre disposición de agua y comida. La excepción tuvo lugar durante el entrenamiento de autoadministración operante de sacarosa, durante el que tenían el alimento restringido.

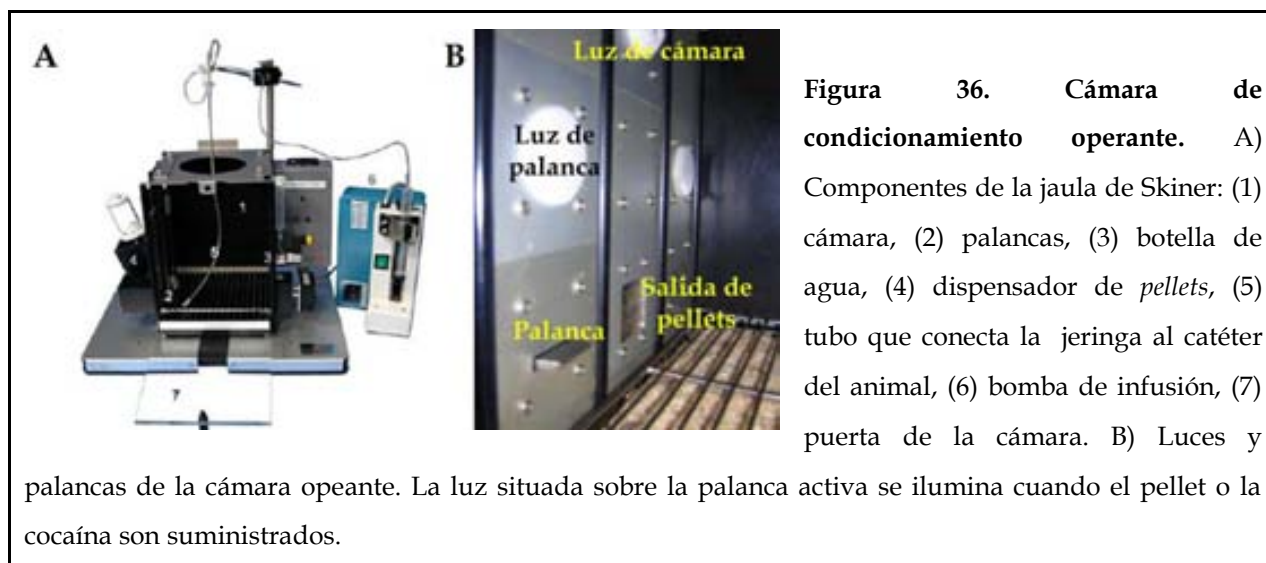
Todos los animales (tanto los control como los que se autoadministraron cocaína) comenzaron el protocolo experimental a las 8 semanas de edad, fueron sometidos al entrenamiento con sacarosa y operados para la implantación de un catéter (el cual, en el caso de los animales control, no era funcional). Se comprobó el estado de salud de todos los animales 5 días a la semana, momento en que se les pesaba y manipulaba para que el contacto con el experimentador no les causase estrés.

3.3. Cámaras e autoadministración operante

Para el protocolo de autoadministración se han empleado 4 jaulas modulares de condicionamiento operante, también llamadas jaulas de Skinner (25cm x 25cm x 25cm) colocadas en cajas de insonorización ventiladas y controladas por el programa *Pakwin*, con el que también se recogieron los datos. El interior de la jaula de Skinner (**Fig. 36A**) contiene dos palancas: activa e inactiva (como control para descartar una posible tendencia de los animales hacia uno de los extremos de la jaula, dos tienen la palanca activa a la derecha y dos a la izquierda del comedero), un recipiente para *pellets* y diferentes elementos para establecer estímulos condicionados: diferentes luces, sonido e incluso una rejilla electrizable.

En nuestro caso se empleó, como estímulo discriminatorio, un disco de 4cm de diámetro que se iluminaba con una bombilla de luz blanca (2.4W, 24V) durante 5s sobre la palanca activa para señalar la presentación inmediata del refuerzo. Además, tras ese tiempo, la luz general de la cámara, otro disco de iguales características situado en la parte superior del lateral derecho, normalmente encendida se apagaba durante 10s (**Fig. 36B**). Estos 15s constituían un período denominado *time out* en el que las

respuestas en las palancas no tenían efecto a pesar de que eran registradas para su posterior análisis.



Las infusiones de cocaína se realizaron mediante un tubo de plástico conectado al catéter y a una jeringa de 20ml controlada por una bomba de infusión situada sobre la cámara insonorizada. Este tubo va en el interior de otro metálico (aunque flexible) para su seguridad y que se enrosca a la parte externa del catéter del animal.

3.4. Entrenamiento de refuerzo por sacarosa

Con el objetivo de que los animales se familiarizaran con el funcionamiento de la jaula de conducta, se realizó un entrenamiento de respuesta a la palanca utilizando *pellets* de sacarosa de 45mg como refuerzo. Aproximadamente 7 días antes de este entrenamiento, se restringió la ingesta de los animales hasta reducir su peso al 85-80%, el cual se mantuvo hasta completar el entrenamiento. Se realizaron sesiones diarias donde los animales tenían que apretar la palanca activa para conseguir los *pellets* de sacarosa y que terminaban automáticamente con el fin del tiempo o si la rata obtenía 100 refuerzos. Cuando el animal superaba con éxito tres sesiones de 100 refuerzos cada una (la primera nocturna de 14h y las dos siguientes diurnas de 2h en días consecutivos) se consideraba que había aprendido el procedimiento. Si el animal no las superaba, era eliminado del experimento.

3.4. Implantación quirúrgica del catéter

Después del entrenamiento de refuerzo, los animales fueron implantados con un catéter endovenoso en la yugular (**Fig. 37**) por personal de nuestro grupo. El buen estado del animal y del catéter se revisó todos los días antes y después de la autoadministración.

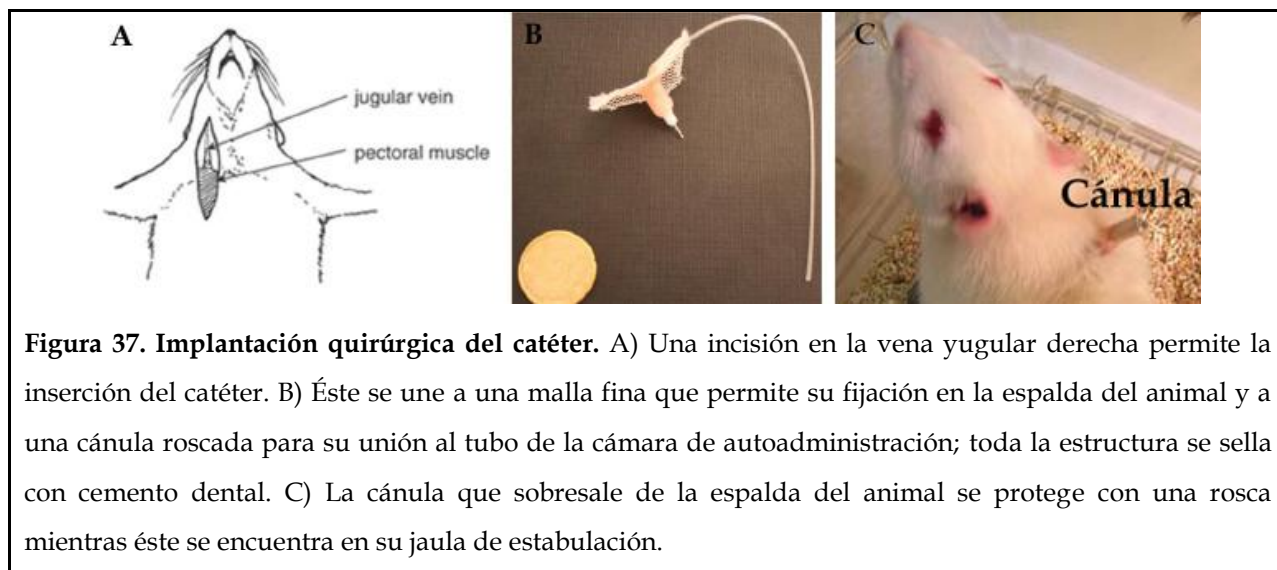
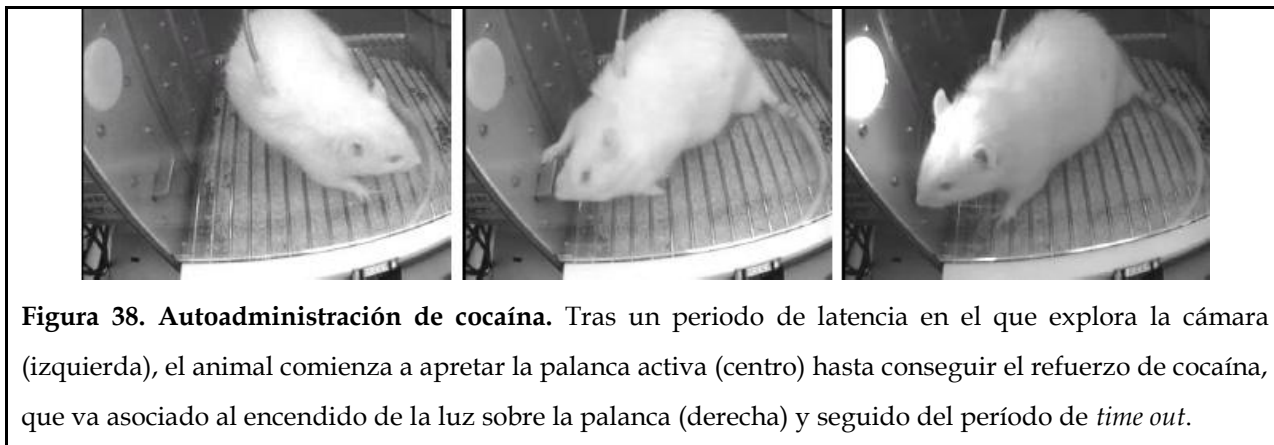


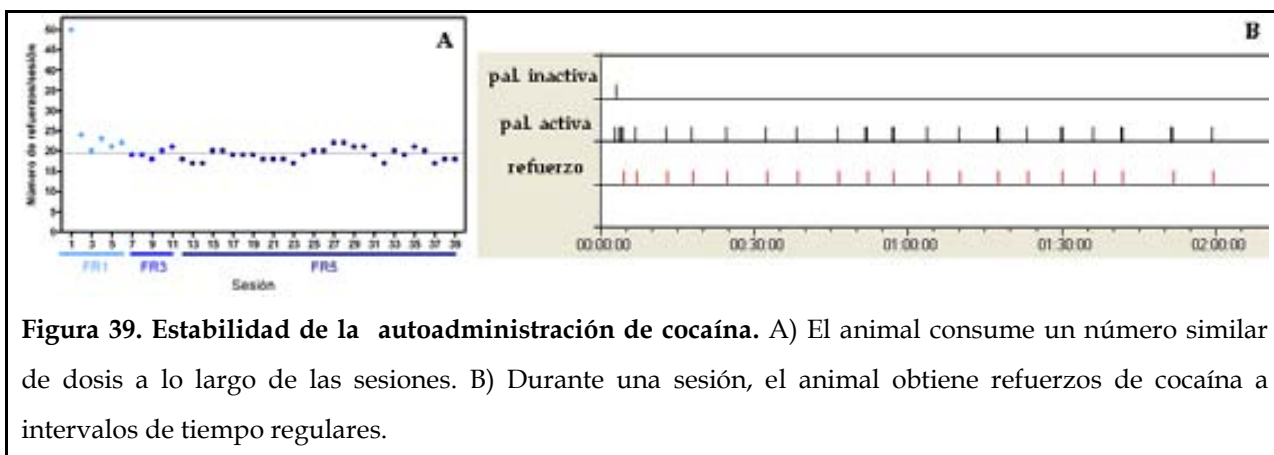
Figura 37. Implantación quirúrgica del catéter. A) Una incisión en la vena yugular derecha permite la inserción del catéter. B) Éste se une a una malla fina que permite su fijación en la espalda del animal y a una cánula roscada para su unión al tubo de la cámara de autoadministración; toda la estructura se sella con cemento dental. C) La cánula que sobresale de la espalda del animal se protege con una rosca mientras éste se encuentra en su jaula de estabulación.

3.5. Procedimiento de autoadministración de cocaína

Las sesiones de autoadministración se llevaron a cabo durante 5 días a la semana con una duración de 2h aunque era detenida con anterioridad si el animal se administraba 50 refuerzos, para evitar la sobredosificación. La cocaína en forma de clorhidrato se disolvió en suero fisiológico 0.9% a una concentración de 5mg/ml la cual se corrigió posteriormente por el peso del animal. Los refuerzos consistían en una infusión endovenosa de 0.5mg/kg en un volumen de 0.1ml a lo largo de 5s a través del catéter, al apretar la palanca activa (**Fig. 38**).



Si el animal se autoadministraba 10 o más refuerzos durante un mínimo de 5 sesiones consecutivas, la razón fija (FR) del procedimiento se aumentaba de FR1 a FR3. Es decir, el animal a partir de ese momento debía apretar 3 veces la palanca activa para conseguir un refuerzo, el cual antes lograba con cada palancada. Si en FR3 mantenían la estabilidad (consumo similar día tras día con un patrón regular de autoadministración; **Fig. 39**) durante 3 sesiones se volvía a aumentar la razón fija a FR5 (donde era necesario apretar 5 veces la palanca activa para obtener el refuerzo) en la que permanecieron hasta el final del procedimiento.



3.5.1. Grupo experimental del procedimiento de autoadministración

Con el procedimiento de autoadministración de cocaína se obtuvo un grupo de 23 animales (13 autoadministración y 10 control) de los que se seleccionó un grupo bastante homogéneo en lo referente al consumo de cocaína ($19,1 \pm 2,3$ refuerzos en FR5) (**Fig. 40**) para los experimentos de hibridación *in situ* e

inmunohistoquímica. Los cerebros del resto de animales se conservan para su posterior procesado.

Nº Rata	Semanas autoad.	Semanas FR5	Refuerzos FR5
20	13	11	18
22	13	9	16
23	13	10	23
25	11	5	20
27	8	4	19

Figura 40. Grupo experimental del procedimiento de autoadministración. De los trece animales de autoadministración se han seleccionado estos 5 (junto con 5 animales control) para los estudios de histoquímica.

4. Determinación de la síntesis de [³H]-dopamina en miniprismas de estriado.

4.1. Reactivos y materiales

La L-[3,5-³H]-tirosina, los viales, el líquido de centelleo Optiphase "HIsafe" 2 y el contador de centelleo Tri-carb 2810TR fueron comprados a Perkin Elmer. La columna de C18 (Tracer Extrasil ODS2, 5µm de tamaño de partícula) se obtuvo de Teknokroma. El espectrofotómetro lector de placas Power Wave XS se compró en Bio-Tek y el incubador Thermomixer comfort a Eppendorf al igual que los tubos empleados.

4.1.1. Tampones y fases móviles.

- **Tampón Krebs-Ringer (TKR)**
120mM NaCl, 0.8mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 0.67mM MgSO₄, 1.2mM KH₂PO₄, 27.5mM, NaHCO₃ y 10mM Glucosa. Además, al TKR se le aplica gas carbónico (95% O₂:5% CO₂) mediante burbujeo durante unos 15-30sg.
- **Fase móvil para la purificación de la L-[3,5-³H]-tirosina comercial.**
0.1M NaH₂PO₄, 0.75mM ácido octanosulfónico, 1mM EDTA y 1% metanol a pH 3.4
- **Fase móvil para la purificación de la [³H]-dopamina**
0.1M NaH₂PO₄, 0.75mM SOS, 1mM EDTA y 12% metanol a pH 5.0
- **Fase móvil para la limpieza de la columna de purificación**
Mezcla 7:3 de 100% metanol y 0.75mM ácido octanosulfónico en agua

4.2. Purificación de la L-[3,5-³H]-tirosina comercial.

La actividad específica de la L-[3,5-³H]-tirosina comercial (1mCi) es de 37MBeq/mmol pero, al padecer ésta cierto grado de radiolisis, es conveniente purificarla antes de su uso. Para ello se empleó un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con una columna Tracer Extrasil C18 por la que pasaba la fase móvil apropiada y un espectrofotómetro UV que mide la absorbancia a 285nm. En primer lugar, se realizó una recta patrón de 2.5, 5, 10 y 20nmol de L-Tirosina no radioactiva para así determinar la concentración real de la tirosina tritiada comercial. Una vez corroborado el correcto funcionamiento del sistema, se inyectó 400µl de L-[3,5-³H]-tirosina y se recogió en un tubo eppendorf el volumen correspondiente al pico detectado tras comprobar que el tiempo de elución era el mismo que el de los patrones no radioactivos. A continuación se cuantificó la radioactividad presente en 1µl de la elución recogida para calcular la actividad específica de la L-[3,5-³H]-tirosina, aplicando el volumen total recogido y la cantidad de tirosina (obtenida tras interpolar el área del pico en la recta patrón). Finalmente, se calculó el volumen de [³H]-tirosina purificada necesario para añadir a los miniprismas una concentración final de 0.12µM (unas 500.000 dpm).

4.3. Obtención de los miniprismas de estriado de rata.

Tras el sacrificio de los animales por decapitación, el cerebro fue extraído y preservado en TKR frío hasta su posterior procesado. En la cámara fría (a 4°C) se diseccionaron los núcleos estriados (eliminando el núcleo accumbens para una mayor reproducibilidad de los resultados) de ambos hemisferios cerebrales. Los estriados fueron procesados en un McIlwain tissue chopper para obtener, mediante cortes coronales y sagitales, miniprismas de 300x300µm de grosor (**Fig. 41**) los cuales se resuspendieron en nuevo TKR frío.



Figura 41. Obtención de miniprismas de estriado de rata. Una vez extraído el cerebro (A), se diseccionó el núcleo estriado de ambos hemisferios cerebrales (B) y se cortaron coronal y sagitalmente para obtener los miniprismas (C).

Por último, los miniprismas fueron lavados tres veces por centrifugación 1min a 1000rpm y resuspensión en nuevo TKR frío quedando finalmente en unos 780 μ l de tampón.

4.4. Incubación de las muestras para la síntesis de [³H]-DA.

Las muestras de estriado fueron incubadas en tubos de 2ml de fondo casi plano (para su correcta agitación) situados un incubador Thermomixer con el que se puede controlar las condiciones de temperatura, agitación (37° C y 450rpm respectivamente) y de gasificación, pues un pequeño agujero en la tapa del incubador permite introducir carbógeno en la atmósfera de los tubos.

Tanto en los 24 tubos del incubador como en los 3 colocados en hielo (los blancos, donde la actividad metabólica está parada) se añadieron 225 μ l de TKR y 25 μ l de muestra (unos 0.3-0.7mg de proteína). Para la mayoría de experimentos, las muestras se pre-incubaron durante 25min (tiempo durante el que se adicionan los fármacos para facilitar su difusión en el tejido) antes de añadir la L-[3,5-³H]-tirosina e incubarlas 10min adicionales (**Fig. 42A**). Sin embargo, para los experimentos de acumulación de [³H]-DA, se eliminó el tiempo de pre-incubación al añadir la tirosina radioactiva a los 0min (**Fig. 42B**) dejando entonces distintos tiempos de incubación. A pesar de que el método también permitiría la cuantificación de la liberación de dopamina, en esta tesis sólo hemos llevado a cabo experimentos de síntesis de dopamina.

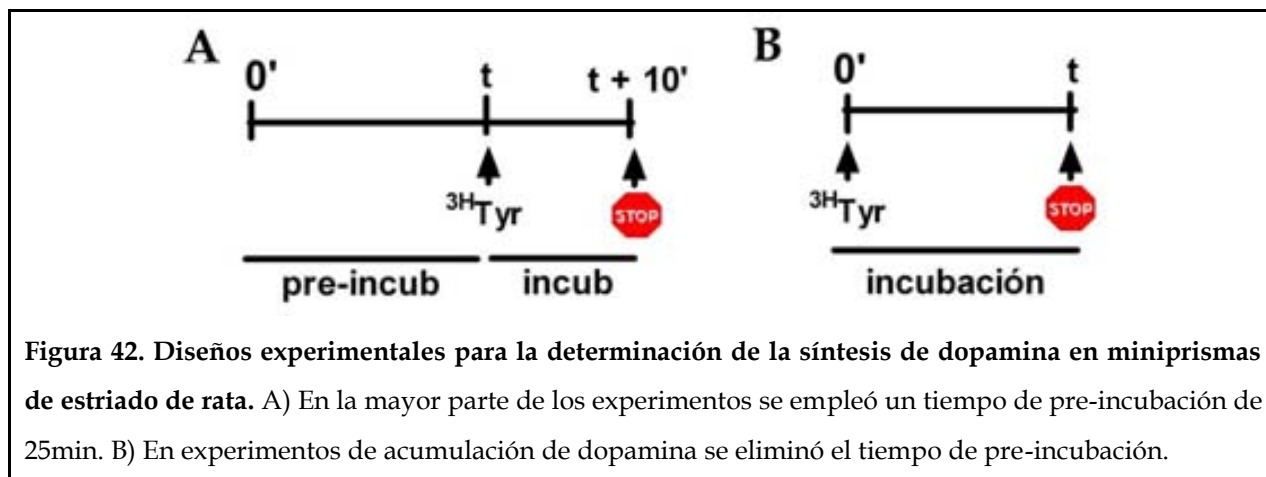


Figura 42. Diseños experimentales para la determinación de la síntesis de dopamina en miniprismas de estriado de rata. A) En la mayor parte de los experimentos se empleó un tiempo de pre-incubación de 25min. B) En experimentos de acumulación de dopamina se eliminó el tiempo de pre-incubación.

4.5. Desproteínización y preparación de las muestras.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, las muestras se pusieron en hielo y se añadió 35µl de la mezcla de patrón interno (25nmol DA, 32.2nmol ácido ascórbico y 0.5% p/v ácido tricloroacético, TCA, en agua) logrando así detener la actividad enzimática por desnaturalización de las proteínas (al disminuir drásticamente el pH con el TCA). La DA añadida actúa de patrón interno al permitir cuantificar la eficiencia de la extracción de [³H]-DA sintetizada durante la incubación de las muestras. Además, facilita la correcta colección del pico de dopamina en el HPLC al incrementar la señal detectada por el espectrofotómetro.

Las muestras desproteínizadas fueron, a continuación, sonicadas (~15sg) para homogenizar el tejido y permitir la solubilización de la [³H]-DA sintetizada durante la incubación. Se separó una alícuota (10µl) para la determinación de la cantidad de proteína (paso 6). Por último se centrifugaron las muestras 5min a 14000rpm para eliminar la proteína sedimentada y recuperar el sobrenadante, que fue transferido a nuevos tubos para la purificación por HPLC.

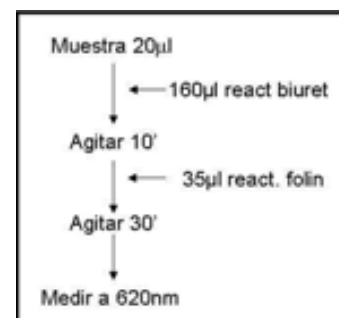
De este modo, en este punto del proceso nos encontramos con dos tipos de muestras a inyectar en el HPLC:

1. Blancos de incubación: muestras que permanecieron a 4°, no incubadas
2. Muestras problema: muestras incubadas en las diferentes condiciones.

4.6. Determinación de la cantidad de proteína

Para la determinación de la cantidad de proteína de las muestras se utilizó el método de Lowry adaptado a microplacas, lo que permite la utilización de un menor volumen de reactivos (200µl) y de muestra (20µl). Este método está basado en la aplicación de la reacción de Biuret y en la posterior amplificación de la sensibilidad mediante la reacción con el reactivo Folin, el cual vira su color de amarillo a azul permitiendo la cuantificación en un espectrofotómetro lector de placas a 620nm.

De este modo, a los 20µl de muestra o patrón en cada pocillo (se hicieron triplicados para cada muestra y cuadruplicados para los patrones) se añadieron 160µl de reactivo Biuret (200µl CuSO₄ 1%, 200µl tartrato 2%, 19.6ml NaOH 0,1N/2% Na₂CO₃). Tras 10min de agitación se añadió 35µl de reactivo Folin diluido ¼ en agua y se dejó agitar otros 30min antes de la lectura a 620nm. Como patrón se utilizaron distintas concentraciones de albúmina de suero bovino, observándose linealidad de la respuesta entre 0 y 0.25mg/ml.



4.7. Purificación de la [³H]-DA por HPLC

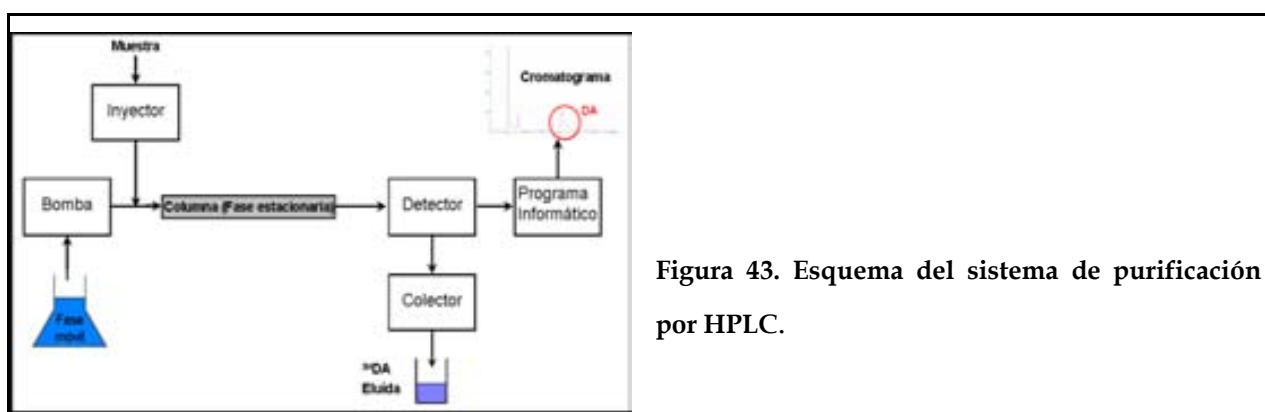


Figura 43. Esquema del sistema de purificación por HPLC.

El sistema de purificación por HPLC está formado por: fase móvil, bomba, inyector, fase estacionaria, detector, colector y un programa informático de registro (Fig. 43). La separación de las distintas moléculas de la muestra disueltas en la fase móvil se basa en la diferente interacción de éstas con la fase estacionaria. En nuestro caso, la fase

estacionaria empleada fue una columna Tracer Extrasil C18 que contiene cadenas hidrofóbicas de 18 carbonos de longitud. Sin embargo, gracias a la fase móvil la convertimos en una columna de intercambio catiónico. Esto se debe a que la fase móvil presenta una elevada concentración de ácido octanosulfónico, una molécula anfipática con una cadena hidrocarbonada que se une a la columna y un extremo cargado negativamente. De este modo, la dopamina presente en las muestras inyectadas se ve retenida gracias a la carga positiva de su estructura al pH de la fase móvil (**Fig. 44**).

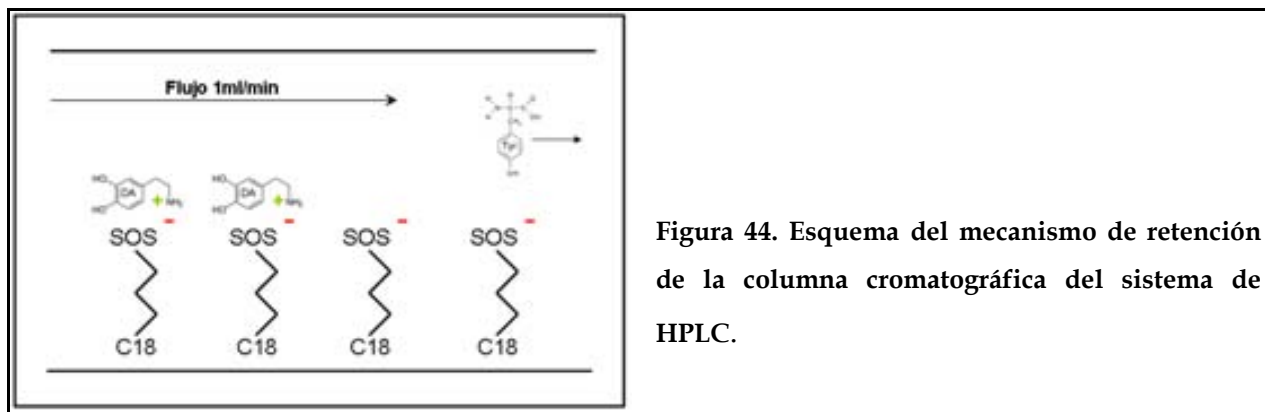


Figura 44. Esquema del mecanismo de retención de la columna cromatográfica del sistema de HPLC.

Al ser eluída (sobre los 8-10min), la dopamina fue detectada por un espectrofotómetro UV a 285nm y recogida en viales de centelleo por el colector automático, para la posterior determinación de la radioactividad presente. Los datos de absorbancia fueron registrados por el programa informático *Borwin 1.5* para obtener así un cromatograma (**Fig. 45**) en el que se observó claramente el pico de la dopamina.

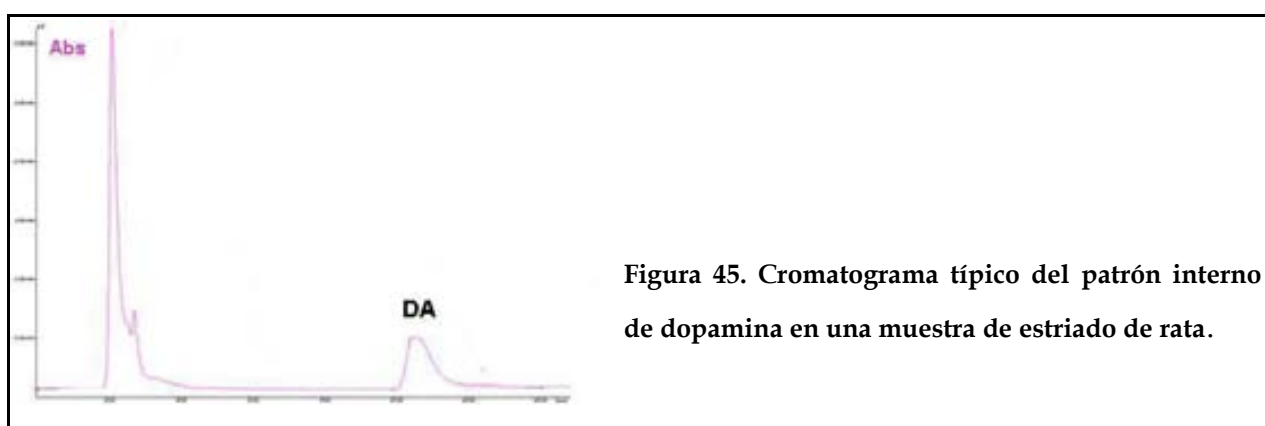


Figura 45. Cromatograma típico del patrón interno de dopamina en una muestra de estriado de rata.

Este pico detectado corresponde a la suma de la dopamina endógena, la [³H]-DA y la dopamina exógena del patrón interno. Es esta dopamina añadida la que permitió la correcta visualización del pico, dado que tanto la dopamina endógena como la

radioactiva son indetectables por el espectrofotómetro dada su baja concentración. Comparando el área del pico de dopamina de la muestra con el obtenido al inyectar un patrón externo no radiactivo (la misma concentración de dopamina añadida con el patrón interno, 25nmol) se calculó la eficiencia del proceso de recuperación de la [³H]-DA del tejido. Además, el cuantificar la radioactividad presente en el eluido del patrón externo nos permitió conocer la actividad residual del sistema, debida a la gran cantidad de dpm inyectadas con cada muestra (alrededor de 5×10^5 dpm).

4.8. Determinación de las dpm [³H]-DA

Las muestras tenían un exceso de [³H]-Tyr en relación a la [³H]-DA sintetizada y que no apareció en el cromatograma, al carecer las muestras del patrón interno correspondiente. Sin embargo, la tirosina eluye con la suficiente antelación para que ambos picos de radioactividad no se solapen, tal y como muestra la (Fig. 46).

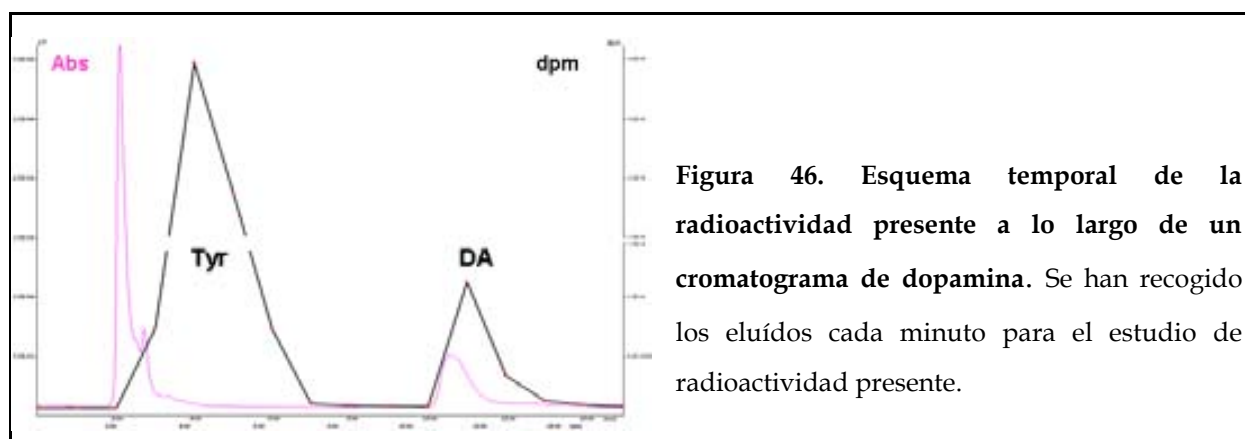


Figura 46. Esquema temporal de la radioactividad presente a lo largo de un cromatograma de dopamina. Se han recogido los eluidos cada minuto para el estudio de radioactividad presente.

De este modo, las fracciones recogidas por el colector automático contienen únicamente la [³H]-DA presente en las diferentes muestras. Para determinar dicha radioactividad, se añadieron a los 2ml de fracción 6ml de líquido de centelleo, el cual es capaz de convertir la energía cinética de las emisiones nucleares en luz que, a su vez, es captada por el contador de centelleo.

4.8.1. Cálculo del porcentaje de [³H]-DA sintetizada

Para calcular el porcentaje de [³H]-DA sintetizada (Fig. 47) se han tenido en cuenta los siguientes datos:

- La radioactividad del patrón externo es de carácter residual y debida a la sucesiva inyección de muestras en el sistema, por lo que ha de ser restada de los valores de dpm obtenidos.
- La recuperación de DA del tejido, que tiene una eficiencia determinada para cada muestra calculada a partir de la diferencia de áreas de la muestra y del patrón externo.
- La cantidad de proteína presente en cada muestra.
- Según el tipo de experimento el tiempo de incubación puede variar entre las diferentes muestras, expresándose siempre éste en horas.

En primer lugar se han restado a las dpm de las muestras y blancos de incubación la radioactividad presente en el patrón externo. A continuación hemos corregido la eficiencia de recuperación de la dopamina desde el tejido, por medio de la comparación de las áreas del blanco o muestra con la del patrón externo. Restando la radioactividad presente en los blancos de incubación, calculamos la radioactividad generada durante la misma. Se aplicó el tiempo de incubación y los mg de proteína de cada muestra para así expresar la radioactividad presente como dpm [³H]-DA/mg*h. Finalmente, los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje respecto al grupo control al cual se le atribuyó un valor del 100%.

Síntesis de [³ H]-DA											
Área media del patrón		dpm medias del patrón		media dpm blancos							
PROMEDIO(C6,C6)		PROMEDIO(D6,D6)		PROMEDIO(F7,F7)							
Muestra	Área pico	dpm	resta de las dpm del patrón externo	Corrección de la eficiencia de recuperación	resta de las dpm corregidas del blanco	mg de proteína	dpm/mg*h	media	desviación	% respecto al control	media
Patrón externo	XX	XX									
	XX	XX									
	XX	XX									
blanco de incubación	XX	XX	D9-\$G\$3	(\$E\$3*\$E9)/C9							
	XX	XX	D10-\$G\$3	(\$E\$3*\$E10)/C10							
	XX	XX	D11-\$G\$3	(\$E\$3*\$E11)/C11							
control	XX	XX	D12-\$G\$3	(\$E\$3*\$E12)/C12	F12-\$I\$3	XX	G12/(H12*1060)	PROMEDIO (I12,I14)	DESVEST (I12,I14)	J12*100/\$K\$12	100.00
	XX	XX	D13-\$G\$3	(\$E\$3*\$E13)/C13	F13-\$I\$3	XX	G13/(H13*1060)			J13*100/\$K\$12	
	XX	XX	D14-\$G\$3	(\$E\$3*\$E14)/C14	F14-\$I\$3	XX	G14/(H14*1060)			J14*100/\$K\$12	
tratamiento	XX	XX	D15-\$G\$3	(\$E\$3*\$E15)/C15	F15-\$I\$3	XX	G15/(H15*1060)	PROMEDIO (I15,I17)	DESVEST (I15,I17)	J15*100/\$K\$12	PROMEDIO (I,15-I,17)
	XX	XX	D16-\$G\$3	(\$E\$3*\$E16)/C16	F16-\$I\$3	XX	G16/(H16*1060)			J16*100/\$K\$12	
	XX	XX	D17-\$G\$3	(\$E\$3*\$E17)/C17	F17-\$I\$3	XX	G17/(H17*1060)			J17*100/\$K\$12	

Figura 47. Cálculo del porcentaje de [³H]-DA sintetizada en miniprismas de estriado de rata. Ejemplo típico de los cálculos realizados para hallar la síntesis de [³H]-DA con un tiempo de incubación de 10min.

5. Determinación de la síntesis de [³H]-L-DOPA en homogenado de estriado.

Este protocolo es una modificación de la determinación de la síntesis de [³H]-dopamina en miniprismas de estriado para la determinación de [³H]-L-DOPA en el homogenado de los miniprismas de estriado. Por este motivo, a continuación solo se expondrán aquellos apartados que se han modificado.

5.1. Reactivos y materiales

Los potters para la homogenización provienen de *Afora* mientras que la L-DOPA y el 5-hidroxibenzilhidracina (NSD1015) han sido adquiridos en *Sigma-Aldrich*.

5.1.1. Tampones y fases móviles.

- Tampón de lisis

Tampón fosfato sódico 10mM pH 4.7

- Fase móvil para la purificación de la ³H-L-DOPA

0.1M NaH₂PO₄, 0.75mM ácido octanosulfónico, 1mM EDTA y 12% metanol a pH 3.5

5.2. Incubación y homogenización de las muestras.

Los miniprismas de estriado (25µl) fueron sometidos a una primera incubación en el thermomixer con 225µl de TKR durante 10min. Al principio de esta incubación se añadió el producto que se deseó testar y 100µM NSD1015 para evitar la síntesis de dopamina mediante la inhibición de la DOPA descarboxilasa (**Fig. 48B**). Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron para poder eliminar el TKR y se resuspendieron en 500µl de tampón de lisis antes de ser transferidas al *potter*; siendo homogenizadas juntas (en el mismo *potter*) aquellas pertenecientes al mismo grupo experimental. El resultado de la homogenización (200µl cada muestra) se incubó una

segunda vez en presencia de 100μM NSD1015, 20μM tirosina, 0.25μM [³H]-tyrosina y distintas concentraciones del cofactor BH₄ (0, 2.5, 25, 250μM) durante 30min (**Fig. 48A**).

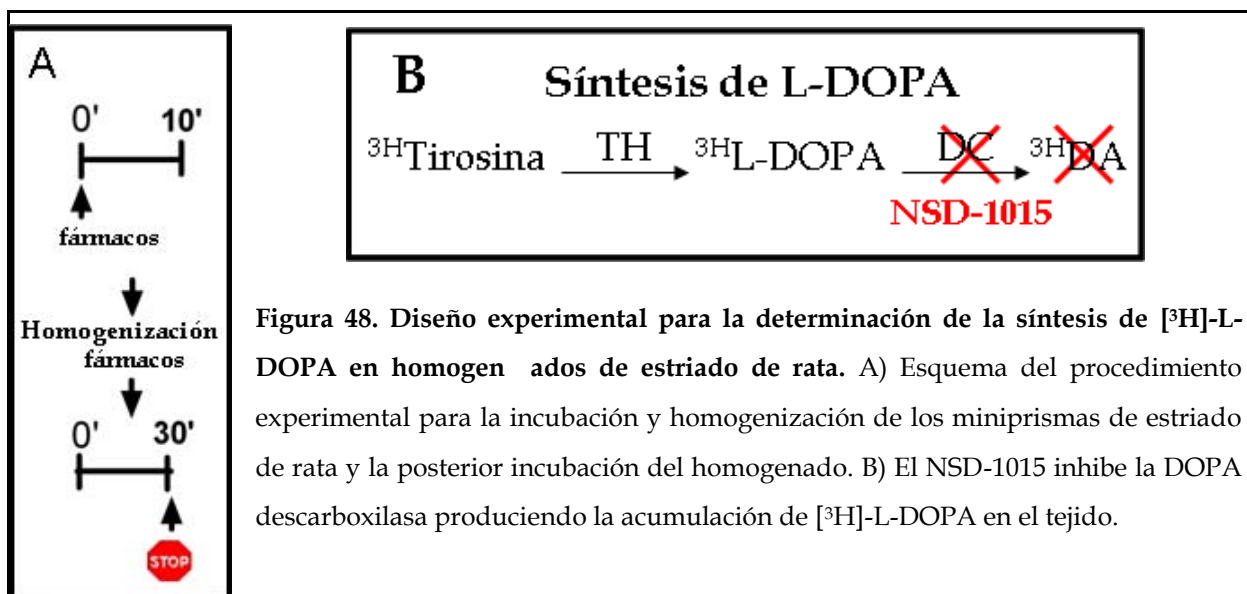


Figura 48. Diseño experimental para la determinación de la síntesis de [³H]-L-DOPA en homogenizados de estriado de rata. A) Esquema del procedimiento experimental para la incubación y homogenización de los miniprismas de estriado de rata y la posterior incubación del homogenado. B) El NSD-1015 inhibe la DOPA descarboxilasa produciendo la acumulación de [³H]-L-DOPA en el tejido.

5.3. Desproteinización y preparación de las muestras.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, las muestras se pusieron en hielo y se añadió 35μl de la mezcla de patrón interno (25nmol L-DOPA y 0.5% p/v TCA, en agua). Por último, se separó una alícuota (10μl) para la determinación de la cantidad de proteína y se centrifugaron las muestras 5min a 14000rpm. De este modo, en este punto del proceso nos encontramos con dos tipos de muestras que inyectar en el HPLC:

1. Blancos de incubación: muestras que permanecieron a 4°, no incubadas
2. Muestras problema: muestras incubadas en las diferentes condiciones.

RESULTADOS

Capítulo 1: Distribución del receptor H₃ de histamina en los ganglios basales.

1.1. Objetivos

Diversos estudios en la bibliografía muestran la interacción del receptor H₃ de histamina con los distintos sistemas de neurotransmisores, así como su amplia distribución (tanto de la proteína como del mRNA) en el cerebro de rata. Sin embargo, estos estudios de distribución no indican las poblaciones neuronales concretas que expresan receptor, objetivo en el que nos centraremos en el presente capítulo.

Con el fin de asegurar la especificidad de la unión de los anticuerpos y la sonda a sus dianas y, por tanto, de la señal obtenida con las técnicas histoquímicas empleadas, nos propusimos:

- **Validar las técnicas de doble FISH y doble inmunohistoquímica en secciones de 10µm de espesor.** Para lo cual hemos llevado a cabo: 1) los controles negativos de los anticuerpos secundarios, 2) la comparación de las sondas *sense* y *antisense* para el mRNA del H₃R, así como 3) la comparación de diversos anticuerpos contra el receptor. Además la señal obtenida con el anticuerpo H₃R ha sido bloqueada con su péptido inhibidor.

La *substantia nigra* es posiblemente el área más estudiada de los ganglios basales pues, junto con el área tegmental ventral, constituye el principal punto de partida de la innervación dopaminérgica hacia el cuerpo estriado. Estudios previos (Pillot et al. 2002a) no aclaraban la distribución de los receptores H₃ en las diferentes poblaciones neuronales y, más concretamente, ponían en duda su expresión en las neuronas dopaminérgicas de la VTA. Por este motivo nos centramos en primer lugar en:

- **Investigar la expresión del mRNA y la proteína del receptor H₃ de histamina en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.** Hemos empleado la tirosina hidroxilasa como marcador de neuronas dopaminérgicas.

La mayor parte de las neuronas del cuerpo estriado son neuronas de proyección GABAérgicas, las cuales constituyen *output* principal de la estructura. Dada su importancia para la función límbica y motora de los ganglios basales, decidimos:

- **Analizar la distribución del mRNA del receptor H₃ de histamina en neuronas GABAérgicas de proyección estriatonigrales y estriopalidales.** Para diferenciar las dos poblaciones principales de MSN empleamos los marcadores: sustancia P (para las estriatonigrales) y pro-encefalina (para las estriopalidales) en lugar de los receptores dopaminérgicos, dado que existe menor solapamiento en su expresión.

Estudios paralelos de nuestro grupo han mostrado indicios de la existencia de heterodímeros de receptores D₁ y H₃ (ver apéndice). Por tanto nos planteamos:

- **Examinar la expresión de la proteína del H₃R en neuronas y terminales inmunoreactivas para el receptor D₁ de dopamina.** Dado que su colocalización posibilitaría la existencia del dímero D₁-H₃.

Las MSN estriatales reciben numerosos inputs de diversa índole que modulan su actividad, entre los que podemos encontrar proyecciones glutamatérgicas procedentes del cortex y colinérgicas de las interneuronas estriatales. Por ello, nos propusimos:

- **Evaluar la presencia de la proteína del receptor H₃ de histamina en interneuronas colinérgicas y neuronas y terminales glutamatérgicas de mPFC y núcleo estriado.** Hemos empleado la colina acetiltransferasa (ChAT) como marcador de las interneuronas colinérgicas y el VGLUT1 para detectar las proyecciones corticoestriatales.

Sin embargo, son los astrocitos y no las neuronas las células más abundantes del sistema nervioso central. Estas células expresan diversos receptores para responder a la

actividad neuronal, entre los que se ha descubierto que se encuentra el H₁R. Dado que no había datos acerca del H₃R, decidimos:

- **Determinar si existe proteína del receptor H₃ de histamina en astrocitos de mPFC y núcleo estriado.**

1.2. Resultados

La mayor parte de los resultados de este capítulo forman parte del artículo que constituye el apartado 1.2.2 de esta sección. Los experimentos de funcionalidad del receptor (Fig. 4 y 9 del artículo 1) han sido llevados a cabo por otros miembros del grupo de investigación.

1.2.1. Controles negativos del procedimiento de inmunohistoquímica.

Para validar la especificidad del método de inmunohistoquímica fluorescente, se han llevado a cabo controles negativos en ausencia de anticuerpo primario o secundario (no mostrados) para todos los antígenos estudiados, así como el control del *kit* TSA-Cy3 (Fig. 49). En ninguno de los casos se ha detectado señal inespecífica significativa.

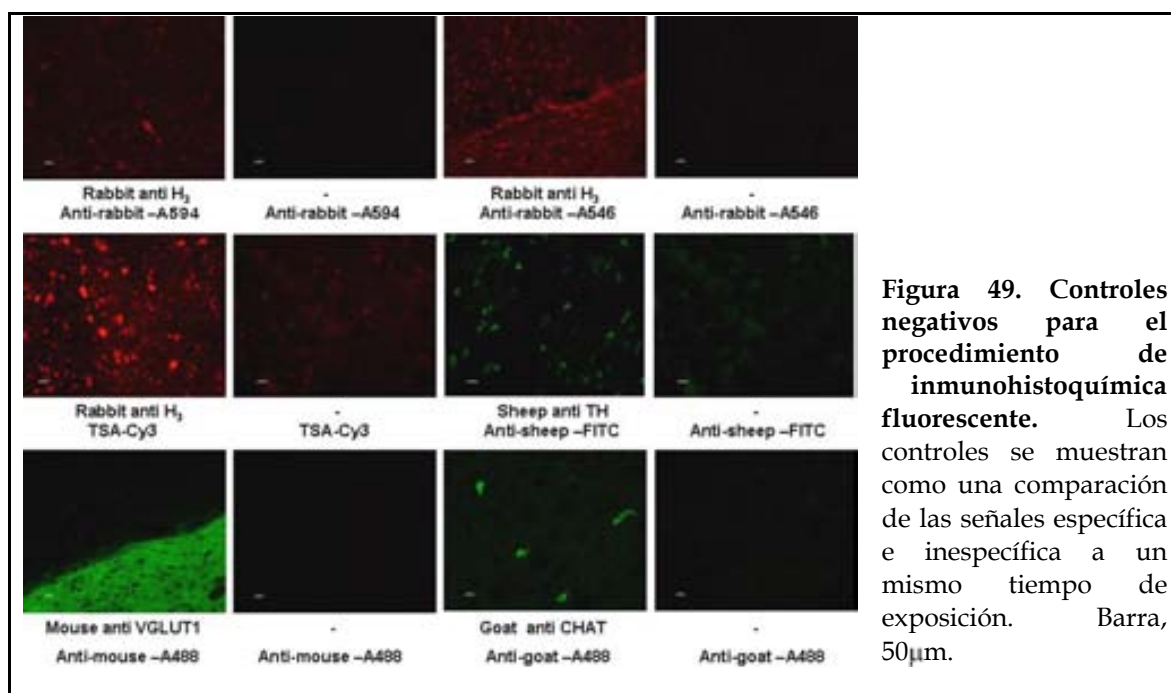


Figura 49. Controles negativos para el procedimiento de inmunohistoquímica fluorescente. Los controles se muestran como una comparación de las señales específica e inespecífica a un mismo tiempo de exposición. Barra, 50µm.

1.2.2. **ARTÍCULO 1: Cellular distribution of the Histamine H₃ receptor in the basal ganglia: functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission.** (Enviado a Brain Structure and Function)

Marta González-Sepúlveda, Santi Rosell, Hanne Hoffmann, M^a del Mar Castillo-Ruiz, Virginie Mignon, David Moreno-Delgado, Michel Vignes, Jorge Díaz, Josefa Sabriá, Jordi Ortiz

Abstract:

Histamine H₃ receptors (H₃R) are widely expressed in rat brain where they participate in sleep-wake cycle and cognitive functions among others. Despite their high expression in some regions of the basal ganglia, their functional role in this forebrain neural network remains unclear. The present findings provide in situ hybridization and immunohistochemical evidence for H₃R expression in several basal ganglia neuronal populations but not in astrocytes (glial fibrillary acidic protein immunoreactive cells). We demonstrate the presence of H₃R mRNA and protein in dopaminergic neurons (tyrosine hydroxylase positive) of the ventral tegmental area and substantia nigra. In addition we found H₃R in cholinergic neurons (choline acetyltransferase immunoreactive) and GABAergic neurons (substance P, proenkephalin or dopamine D₁ receptor positive) as well as in corticostriatal terminals (VGLUT1-immunoreactive) of the dorsal and ventral (nucleus accumbens) striatal complex. Double-labelling experiments in the medial prefrontal cortex shown that H₃R is expressed in D₁R-positive interneurons and VGLUT1-positive corticostriatal output neurons. Functional experiments confirmed that H₃R ligands modulated dopamine synthesis and the probability of glutamate release in the striatum. The presence of H₃R in such different neuronal populations and its functional involvement in the control of striatal dopaminergic and glutamatergic transmission credits a complex role to H₃R in the functional basal ganglia neural network.

Abbreviations

Acb: nucleus Accumbens; D1R: dopamine receptor 1; H3R: histamine receptor 3 ; mPFC: medial prefrontal cortex; PE: proenkephalin ; SNc: substance nigra pars compacta; SNr: substance nigra pars reticulata; SP: substance P; SSC: sodium saline citrate; TBS: 50mM tris buffer saline pH 7.6); TSA: tyramide signal amplification; VGLUT1: vesicular glutamate transporter 1 ; VTA: ventral tegmental area

Introduction

Histamine is involved in a variety of brain functions such as the sleep-wake cycle, attention, learning, memory and locomotion control (Yanai and Tachiro, 2007) through its interaction with four G-protein coupled receptors. Three of them (H₁ to H₃) are widely distributed in the central nervous system while the H₄ receptor is expressed mostly in bone marrow and leukocytes, displaying very low levels in brain (Oda et al., 2000; Connelly et al., 2009).

The histamine H₃ receptor (H₃R) was initially characterized as an autoreceptor controlling histamine release and synthesis in histaminergic terminals of the central nervous system (Arrang et al. 1983, 1987). Later, its heteroreceptor role was demonstrated as it modulated release of other cerebral neurotransmitters including serotonin (Schlicker et al. 1988), norepinephrine (Schlicker et al. 1989), dopamine (Molina-Hernandez et al. 2000), glutamate (Molina-Hernandez et al. 2001) and GABA (Arias-Montaño et al. 2001) in brain samples. Six H₃ mRNA isoforms have been described in the rat, four of which are functionally active: H₃₍₄₄₅₎, H₃₍₄₁₃₎, H₃₍₄₁₀₎, H₃₍₃₉₇₎ and two inactive: H_{3(nf1)} H_{3(nf2)}. Isoforms are generated by differential splicing of the three exons and two introns of the gene. All of them have a variable expression level in cerebral structures (Morisset et al. 2001) being more expressed in cortex, thalamus and caudate-putamen of humans (Lovenberg et al. 1999). This regional localisation matches the relative distribution of histaminergic projections arising from the tuberomammillary nucleus. In addition, radioligand binding studies in rodents show high H₃ receptor levels in olfactory nucleus, cortex, substantia nigra pars reticulata (SNr), amygdala, thalamus and hypothalamus (specially in tuberomammillary nucleus) with the highest density in dorsal striatum and nucleus accumbens (Acb) (Pillot et al. 2002a).

The rat striatum is the main input structure of the basal ganglia involved in sensory-motor behavioural aspects. It can be divided in two big regions: 1) the dorsal striatum (caudate-putamen) that has been implicated in the initiation and development of a voluntary motor behaviour and 2) the ventral striatum (nucleus accumbens) which plays a central role in motivated and goal directed behaviours because it integrates the motor and limbic systems (Morgane et al. 2005). In spite of the different afferences and efferences of the dorsal and ventral striatum, both present the same neuronal phenotypes. Thus 95% of striatal neurons are GABAergic spiny projection neurons, which can be divided in two populations: striato-nigral pathway neurons which show dynorphin, substance P (SP) and D₁-like dopamine receptors and striato-pallidal pathway neurons that coexpress enkephalin and the D₂-like dopamine receptor (Le Moine et al. 1995, Sonomura et al. 2007). Nevertheless, discrimination between these two populations is not absolutely clear because all of these neurons can express low levels of characteristic receptors of the other neuronal type (Aizman et al. 2000; see also Valjent et al. 2009). The remaining 5% of striatal neurons is composed by interneurons of two subtypes: cholinergic and GABAergic (Kawaguchi et al. 1997).

Striatal neurons are a major target of mesencephalic dopaminergic neurons, which are implicated in complex neurological and psychiatric disorders such as Parkinson, Huntington, schizophrenia and addiction. The role of H₃R in normal striatal functions such as locomotion is not clearly elucidated (Chiavegatto et al. 1998, Toyota et al. 2002), and even less in pathological conditions. However, it has been proposed that antagonism of H₃R has therapeutic potential in sleep-wake disorders, dementia, epilepsy and schizophrenia (Sander et al. 2008). Conversely, stimulation of H₃R decreases L-dopa-induced chorea and turning behaviour in animal models of Parkinson's disease (Huotari et al., 2000; Gomez-Ramirez et al. 2006). In the present work functional histamine H₃R expression in basal ganglia neuronal populations is studied to evaluate the possibility that H₃ receptors constitute new targets for treatments of these disorders.

Experimental procedures

Tissue preparation for histochemistry

Experiments performed in the present study conformed to the Ethics Committee for Human and Animal Research (Universidad Autónoma de Barcelona) in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Brains were obtained from male Sprague-Dawley rats weighing 200-250 g (Animal Service, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain). Animals were sacrificed by decapitation, their brain was removed rapidly, immediately frozen (-40 °C) by immersion in isopentane and stored at -20 °C. Brain sections (10µm) were prepared on a cryostat and thaw-mounted onto Superfrost slides. Slices were fixed for 40min at 4 °C in freshly prepared 4% formaldehyde made up in 0.1M phosphate buffer pH 7.4, rinsed three times (5min each) in 0.1M phosphate buffered saline, pH 7.4, dehydrated through graded ethanol and dried. All the sections were stored at -20°C until use.

Fluorescent in situ hybridization histochemistry

Brain sections were incubated at 37°C for 10 min with proteinase K (5µg/ml), acetylated for 10min (in 0.1M triethanolamine, pH 8 and 0.25% acetic anhydride) at room temperature and dehydrated in graded ethanol up to 100%. Hybridization was performed overnight at 55°C in the presence of 10-20 ng of biotin/digoxigenine labelled antisense or sense probes in hybridization buffer (50% formamide, 10% dextran sulfate, standard saline citrate 2x (SSC), 1% Denhart's solution, 50mM Tris-HCl buffer, 0.1% NaPPi, 0.2mg/ml tRNA, 1mM EDTA). Subsequently, sections were rinsed with: 50% formamide in SSC2x (30min at 55°C), SSC2x (5min at 55°C, 2 times 10min at room temperature) and incubated for 40min at 37°C with ribonuclease. Then, sections were washed in graded SSC (4x and 2x, 15min each, 0.1x 30min at 60°C and 0.1x 10min room temperature), Tris buffered saline 50mM pH 7.6 (TBS) -Tween20 0.05% three times (5min each) and blocked with 1% blocking reagent (Roche Applied Science) in TBS for 1h at 37°C. They were then incubated for 2h at room temperature in a humid chamber with the primary antibodies sheep anti-digoxigenine-peroxidase (Roche Applied Science, 1/100) and mouse anti-Biotin (Jackson Immunoresearch, 1/200) diluted in buffer (TBS, 0.1% acetylated bovine serum albumin, 1% goat serum, 0.1% Tween20).

After three rinses with TBS-Tween20 0.05% (5min each) sections were incubated with the green secondary antibody anti-mouse-Alexa488 (Invitrogen, 1/200) diluted in TBS-Tween20 0.1% for 2h at room temperature. Two more washes followed by one in TBS without Tween20 (5min) were performed before the incubation with the red fluorophore, which is conjugated to tyramide signal amplification (TSA)-Cy3 activated by peroxidase (Perkin Elmer, 1/500). Finally, sections were washed and mounted with Mowiol.

The H₃R probe corresponded to nucleotides 636-1243 of the rat H₃R sequence. It was previously shown to hybridize to the various H₃R mRNA isoforms expressed in the brain or peripheral tissues (Morisset et al., 2001; Pillot et al., 2002). The tyrosine hydroxylase probe used to detect dopaminergic neurons was complementary to rat tyrosine hydroxylase mRNA sequence from nucleotide 25 till the end. cDNAs for proenkephalin (PE) and SP were obtained by polymerase chain reaction and corresponded to nucleotides 335-641 (GenBank accession n° AH002996) and nucleotides 80 - 227 (AH002233), respectively. They were subcloned into pGEM-4Z (Promega) plasmids. Antisense and sense cRNA riboprobes were prepared by *in vitro* transcription.

Fluorescent immunohistochemistry

Brain sections were thawed at 4°C, washed in TBS for 5min, then in sodium borohydrate 1% (diluted in disodium hydrogenphosphate 0.1M pH 7.8) for 20min and rinsed in phosphate buffer saline 50mM pH 7.4 and TBS (3min each). Blocking was made with 7% donkey serum in TBS for 1h at 37°C. Primary antibodies (listed in **Table 1**) were diluted in buffer (TBS, acetylated bovine serum albumin 1%, Tween20 0.1%, 7% donkey serum) and incubated overnight at 4°C. Histamine H₃ receptor expression in dopaminergic and cholinergic neurons was detected using the Abcam 13014 antibody while the Alfa Diagnostics H3R31A antibody was employed for the other experiments. After three washes in TBS-Tween20 0.05%, sections were incubated with the secondary antibodies diluted in the same buffer as the primary. Three more washes with TBS-Tween20 0.05% and TBS were done prior the incubation of 5min with Hoechst33258

diluted 1/1000 in TBS. Final washes in TBS were made before the mounting with Mowiol.

A				
Antigen	Abbreviation	Dilution	Reference	Host
Histamine H ₃ receptor	anti-H ₃ Rab	1/300	Abcam (ab-13014)	Rabbit (P)
Histamine H ₃ receptor	anti-H ₃ Rc	1/200	Chemicon (ab5660)	Rabbit (P)
Histamine H ₃ receptor	anti-H ₃ Ral	1/200	Alfa Diagnostics (H3R31-A)	Rabbit (P)
Tyrosine Hydroxylase	anti-TH	1/500	Millipore (AB1542)	Sheep (P)
Dopamine D1 receptor	anti-D1	1/300	Frontier Institute (D1rgpaf501)	G. Pig (P)
Choline Acetyl Transferase	anti-ChAT	1/100	Chemicon (ab144P)	Goat (P)
Vesicular Glutamate Transporter 1	anti-VGLUT1	1/300	Synaptic Systems (135511)	Mouse (M)
Glial fibrillary Acidic Protein	anti-GFAP	1/500	Sigma Aldrich (G3893)	Mouse (M)

P, polyclonal; M, monoclonal

B			
Detection system	Dilution	Source	Host
Anti Digoxigenin -peroxidase	1/100	Roche (11207733910)	Sheep
Anti-rabbit-peroxidase	1/200	Cell signalling (7074)	Goat
TSA-Cy3 (amplification system)	1/100-500	Perkin Elmer (NEL 744)	-
Anti biotine	1/200	Jackson Immun. (200-002-211)	Mouse
Anti mouse -Alexa 488	1/200	Invitrogen (A11029)	Goat
Anti sheep -FITC	1/40	Sigma Aldrich (F7634)	Donkey
Anti goat -Alexa 488	1/200	Invitrogen (A11055)	Donkey
Anti guinea pig -Alexa 488	1/200	Invitrogen (A11073)	Goat
Anti rabbit -Alexa594	1/200	Invitrogen (A21442)	Chicken

Table 1. List of antibodies (A) and fluorescent detection systems (B) used for immunofluorescence and fluorescent in situ hybridization studies. Histamine H₃ receptor protein was detected using the Abcam 13014 antibody in dopaminergic and cholinergic neurons and the Alfa Diagnostics H3R31A antibody in the rest of experiments.

Sections were analyzed with a Nikon Eclipse 90i microscope equipped with conventional fluorescence: (1) DAPI filters (340-380nm excitation, 435-485nm emission), (2) FITC filters (465-495nm excitation, 515-555nm emission) and (3) G2-A filters (510-

560nm excitation, 590 emission). Fluorescent images were captured with a high resolution (1280x1024 pixels) Nikon digital DXM1200F camera interfaced with the ACT-1 Nikon software. Image signal levels were adjusted using Adobe Photoshop software for a better visualization. Original images have been kept. Confocal images are a Z-stack of 5 photos (1µm/slice) made with an Olympus FluoView FV1000 (Olympus) microscope equipped with a UPLSAPO 60x NA: 1.35 objective. The following lasers were used: a 488nm laser (488nm excitation, 520nm emission) and a 559nm laser (559nm excitation, 618nm emission). Since the intensity of immunolabelling for the antibodies used could be due to many variables that cannot be individually quantified, this study does not attempt to quantify the relative amounts of labelled antigens. Colocalization of both antigens were measured with the FV10-ASW 1.7 software (Olympus) and shown as average overlap \pm standard deviation of seven different regions of interest for each image. When the overlap value is above 0.5 we consider both antigens colocalized.

Electrophysiology

The protocol used was adapted from Lante et al. (2006) and was as follows: Brains from male Sprague-Dawley rats were rapidly extracted and placed in ice-cold Krebs buffer containing 124 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 10 mM glucose, 10 mM Hepes (pH=7.4) and oxygen saturated O₂/CO₂ (95%/5%). Sagittal cortico-striatal slices (350 µm) were prepared from tissue blocks of the brain with a Vibratome (Leica, VT1000S) and maintained at least 2 h at room temperature in the Krebs buffer, containing 2 mM CaCl₂. This medium was used for further recordings. A single slice was transferred to a recording chamber of an upright microscope (DMLFS, Leica). The slice was positioned under a nylon mesh and continuously superfused with oxygen saturated Krebs solution (flow rate 2 ml/min) maintained at 30-32 °C. Extracellular recordings were made using a glass micropipette (flame polished borosilicate capillary, inside diameter 0.58 mm, outside diameter 1 mm, Warner instruments; resistance 4-7 MΩ) with a wire (silver, 250 µm, A-M Systems) filled with perfusion medium and placed in the striatum. Afferent fibers were stimulated by delivering monophasic voltage pulses at a frequency of 0.05 Hz to a bipolar electrode (nickel chrome wire, bare diameter 50 µm, A-M Systems)

connected to a multi-channel external stimulator (STG4, Multi channels systems) controlled by the software MC Stim (Multi channels systems). The stimulating electrode was placed in the corpus callosum, or in the striatum close to the border of the corpus callosum. Stimulation intensity ranged from 100-800 μ A and 80-600 ms. The recording electrode was connected to a patch-clamp amplifier (Axopatch 200 B, Axon Instruments). Signals were digitized (Digidata 1200 Interface, Axon Instruments) and filtered at 2 kHz. Paired-pulse ratio was obtained by applying two stimuli with a 50 ms interval and calculated by dividing the second field potential with the first field potential (P2/P1). Data were collected by Win LTP (Kind gift by Dr. W. Anderson, University of Bristol, UK). The amplitude of the field potential was used as a measure of synaptic transmission. After obtaining a stable baseline of at least 15 min, drugs were diluted in the Krebs solution and bath-applied at the indicated concentrations. Field potential amplitudes were normalized to baseline amplitude. Each data point used for statistics was the mean of 8 consecutive field potentials. Results were pooled in Sigmaplot (Sigmaplot version 9) and represented as means (\pm SEM) of n= 5 animals.

Dopamine synthesis

Fresh rat brains were chilled immediately in modified Krebs-Ringer-bicarbonate medium with the following composition: 120 mM NaCl, 0.8 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 0.67 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 27.5 mM NaHCO₃, and 10 mM glucose, pH 7.4, saturated with 95% O₂/5% CO₂. In a 4°C room, striata (including nucleus accumbens) were dissected and sliced using a McIlwain tissue chopper to obtain miniprisms of 0.3-0.3 mm/side. Miniprisms were suspended in the same medium and washed by centrifugation and resuspension to remove cell debris. Miniprisms were distributed into 2-ml polypropylene tubes and preincubated for 15 min at 37 °C in an Eppendorf Thermomixer under 95% O₂/5% CO₂ atmosphere. Imetit (H₃R agonist) or vehicle was added and preincubation continued for 10 min. Then ring-labeled [3,5-³H]-L-tyrosine (40-60 Ci/mmol) was added to all samples (final concentration of 0.12 μ M) and incubation continued for 10 min to synthesize [³H]-dopamine. Synthesis was stopped by the addition of a deproteinizing solution containing trichloroacetic acid and 100 nmol internal standard dopamine per tube. Blank tubes contained deproteinizing

solution prior to [³H]-tyrosine and were kept ice-cold throughout. All samples were homogenized in a Dynatech/Sonic Dismembrator (Dynatech Labs). An aliquot was taken for protein quantification by the Lowry method to take into account the variability of tissue amounts in each tube. Tissue homogenates were then centrifuged (12,000 g, 10 min, 4 °C), and supernatants were recovered for [³H]-dopamine purification by HPLC-UV.

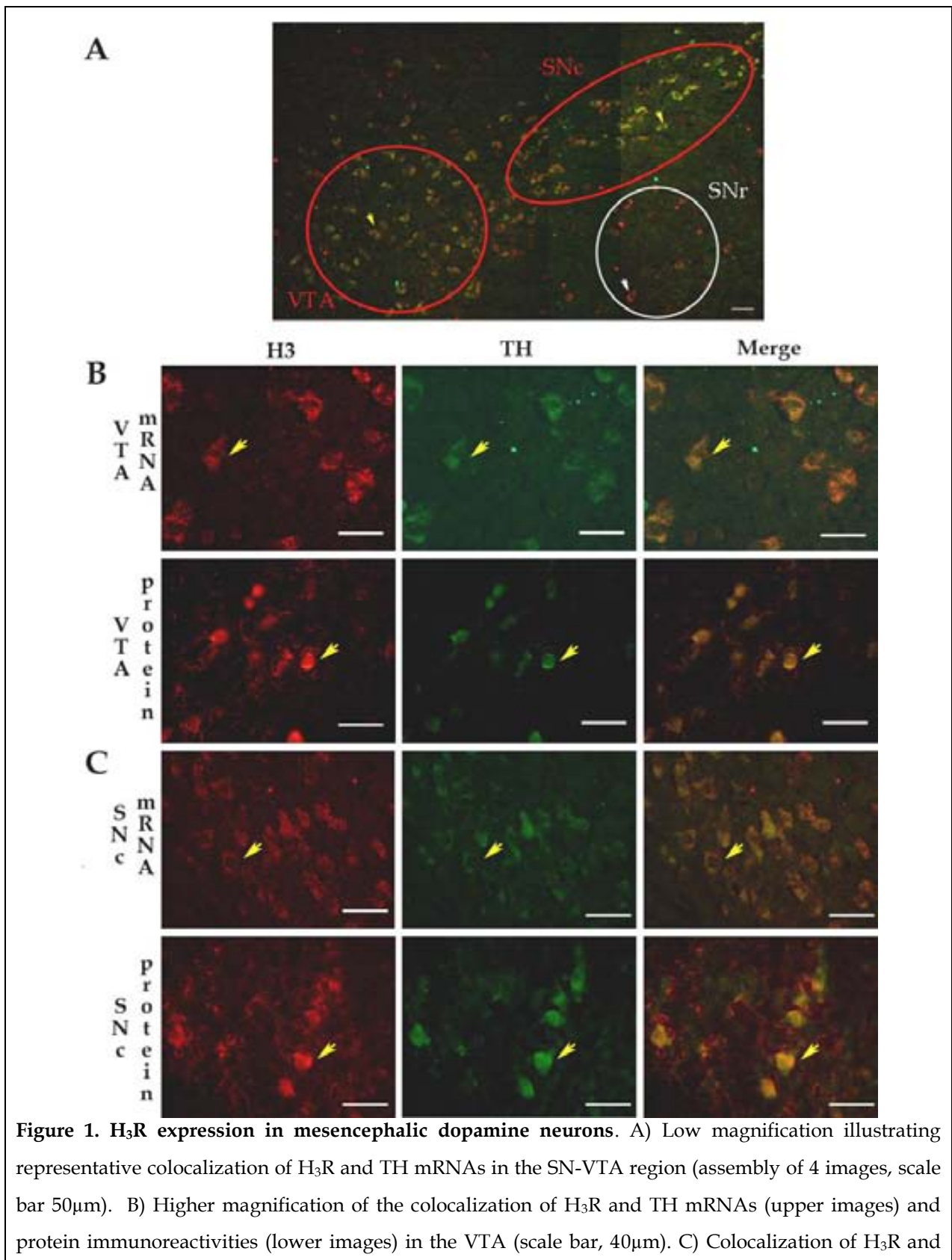
The chromatography system consisted of a reverse-phase C18 column (Tracer Extrasil ODS2, 5-mm particle size, 25 × 0.46 cm; Teknokroma) and an ion-pair mobile phase, made up of 100mM sodium phosphate buffer, 1mM EDTA, 0,75mM octanesulfonic acid plus 12% (v/v) methanol (pH 5). Flow rate was 1 ml/min. Internal standards were detected by UV 285 nm. Radiolabelled and endogenous tyrosine and dopamine were undetectable by UV absorbance. Recovery of the internal standard was quantified in each sample (internal/external standard peak area). Dopamine fractions were collected in scintillation vials, mixed with Optiphase HiSafe III cocktail (Wallac), and [³H]-dopamine was quantified in a liquid scintillation counter. Dpm obtained were corrected by dopamine internal standard recovery, dpm in blank samples, and protein content in each incubated tube. Results were expressed as percentage versus control samples in the same experiment.

Results

H₃R mRNA and protein expression in mesencephalic dopaminergic neurons. Effects on dopamine synthesis

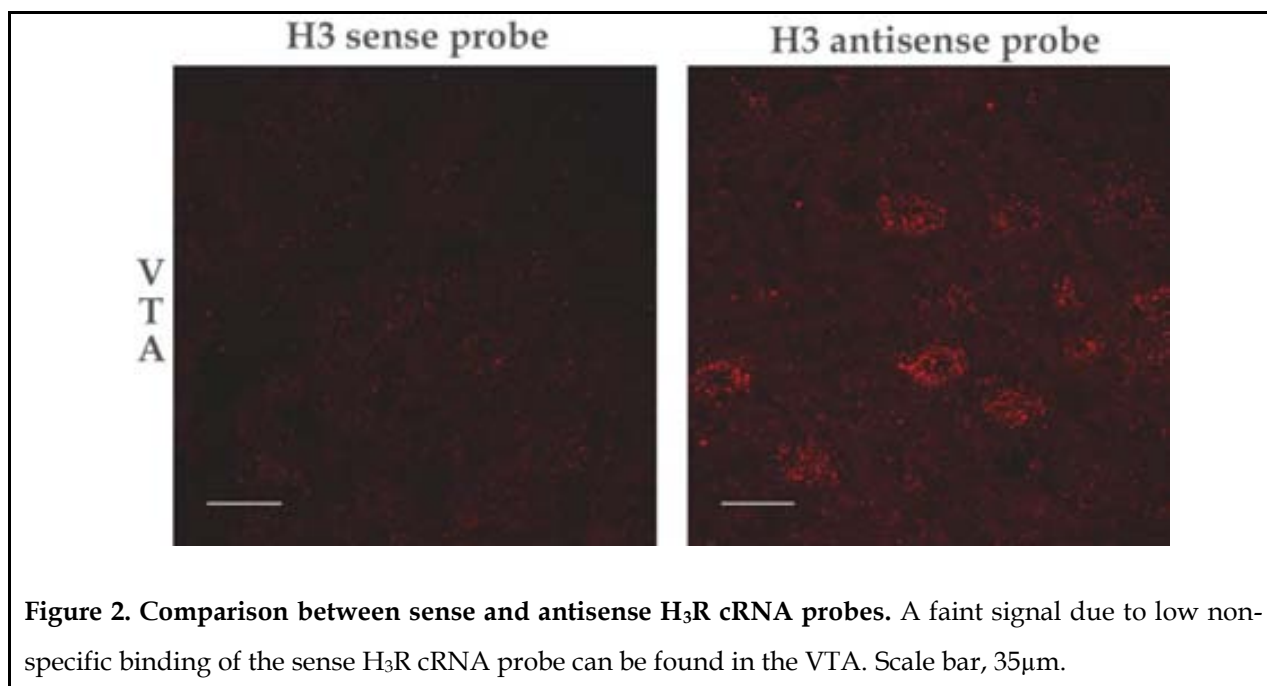
In a previous study of H₃R mRNA distribution in several brain regions (Pillot et al. 2002a), no expression was apparent in the ventral tegmental area (VTA). In contrast in the present work we describe H₃R expression in the VTA using the same H₃R cRNA probe for in situ hybridization as Pillot et al. 2002a. TSA amplification permitted to visualize H₃R expression particularly in dopaminergic neurons of the VTA identified by tyrosine hydroxylase mRNA and protein (**Fig. 1A and B**). In agreement with Pillot et al (2002a) we confirm H₃R mRNA and protein presence in substantia nigra pars compacta (SNc, **Fig. 1C**), particularly in dopaminergic neurons, as well as in other neuronal populations of SNr (**Fig. 1A**). The Pillot et al (2002a) study also shown a lower but

significant binding of the H₃R ligand [¹²⁵I]-iodoproxyfan in the VTA as compared to the SNc.



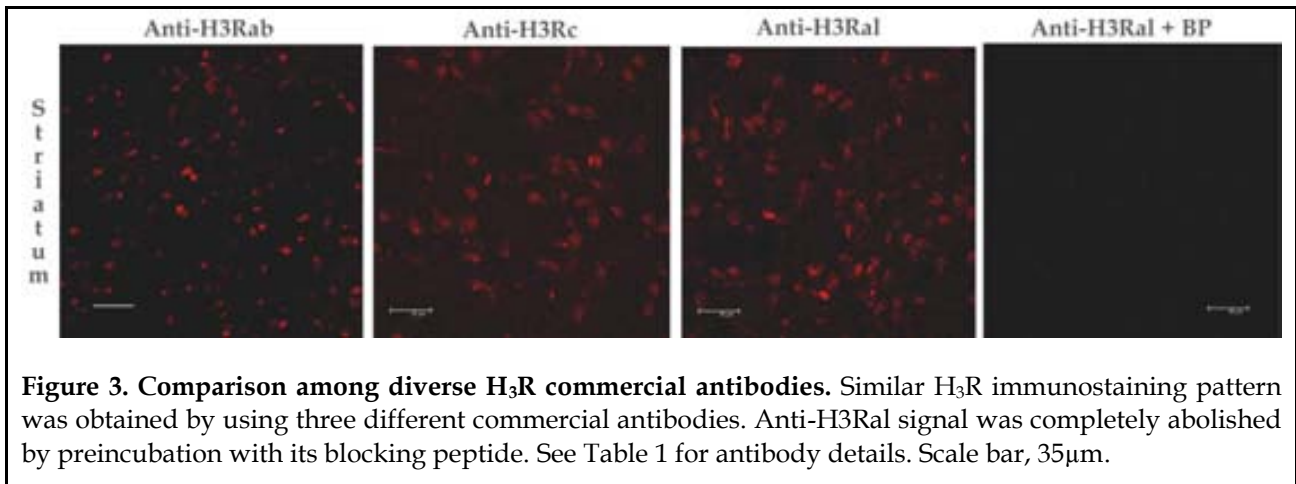
TH mRNAs (upper images) and protein immunoreactivities (lower images) in the SNc (scale bar, 40µm). H₃R protein immunoreactivity is detected with a rabbit anti-H₃R antibody and an anti-rabbit secondary coupled to DIG. H₃R mRNA is detected with a H₃R-specific cRNA-DIG probe. In both protocols, an anti-DIG-peroxidase antibody is used followed by TSA-Cy3 signal amplification, which gives a red labelling to H₃R expressing cells. TH protein is detected with a sheep anti-TH antibody and an anti-sheep FITC-coupled secondary antibody. TH mRNA is detected with a cRNA-biotin probe, followed by a mouse anti-biotin antibody and an anti-mouse Alexa 488-coupled antibody. In both cases a green label shows TH-expressing cells. Yellow arrows show neurons with positive colocalization. A white arrow shows a neuron with H₃R mRNA but no TH mRNA.

Our results would then agree with those of Pillot et al (2002a) after improvement of signal detection with TSA. Nevertheless, we controlled the specificity of the H₃ antisense probe used for *in situ* hybridization with the sense probe. In both our study and Pillot et al (2002a) a very low non-specific signal was detected in the VTA with the sense probe (**Fig. 2**), but it was almost undetectable when compared with the specific signal of the antisense probe in the same conditions.

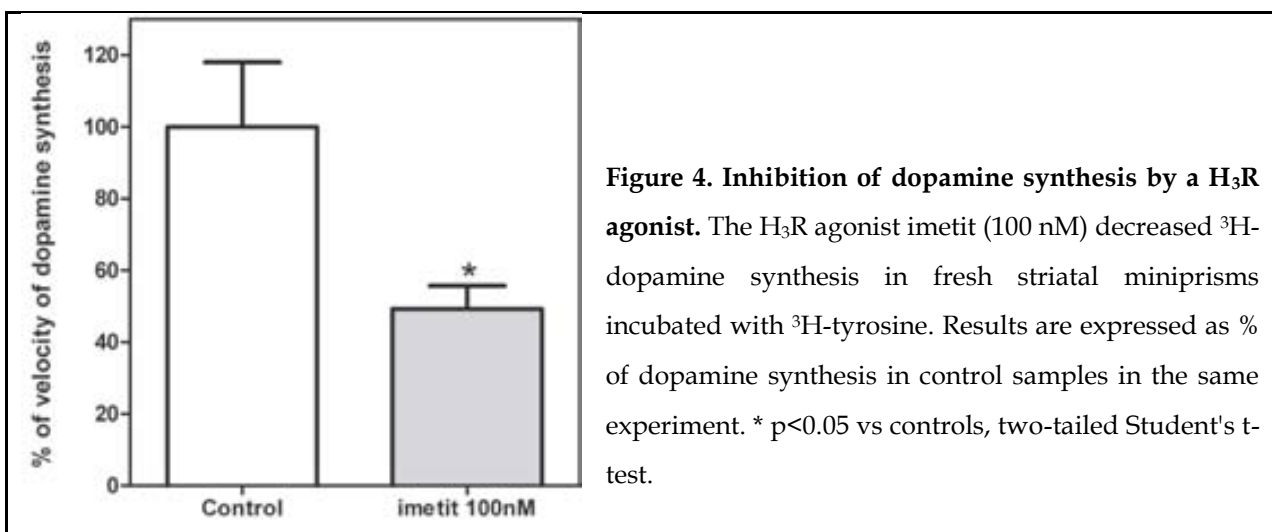


We also controlled the specificity of the H₃R antibodies used. Three different commercial antibodies (listed in **Table 1**) gave the same signal pattern. Moreover, the

signal of the H3R31A antibody was completely abolished by preincubating it with its blocking peptide (**Fig. 3**). All these antibodies lacked non-specific signal in negative controls made in the absence of primary antibodies or probe (data not shown) validating the results obtained.



Striatal dopamine synthesis takes place in dopaminergic terminals arising from VTA and SNc. To search for H₃R function in dopaminergic neurons we chose to determine dopamine synthesis in miniprism preparations of freshly dissected striatum. In the presence of the H₃R agonist imetit (100 nM), ³H-dopamine synthesis from ³H-tyrosine was decreased by 50 % vs. controls ($p < 0.05$ Student's t-test; **Fig. 4**). This result confirms a previous report with a different H₃R agonist (Molina-Hernandez et al., 2000) suggesting that H₃R are functional inhibitory heteroreceptors in dopaminergic neurons.



H₃R protein and mRNA expression in striatal neurons

We studied the presence of H₃R mRNA (Fig. 5) and protein (Fig. 6) in striatal GABAergic projection neurons expressing either SP or PE. As seen in Fig. 5, approximately half of H₃R mRNA-positive neurons correspond to each population of GABAergic projection neurons. Almost all SP or PE mRNA positive neurons express H₃R mRNA.

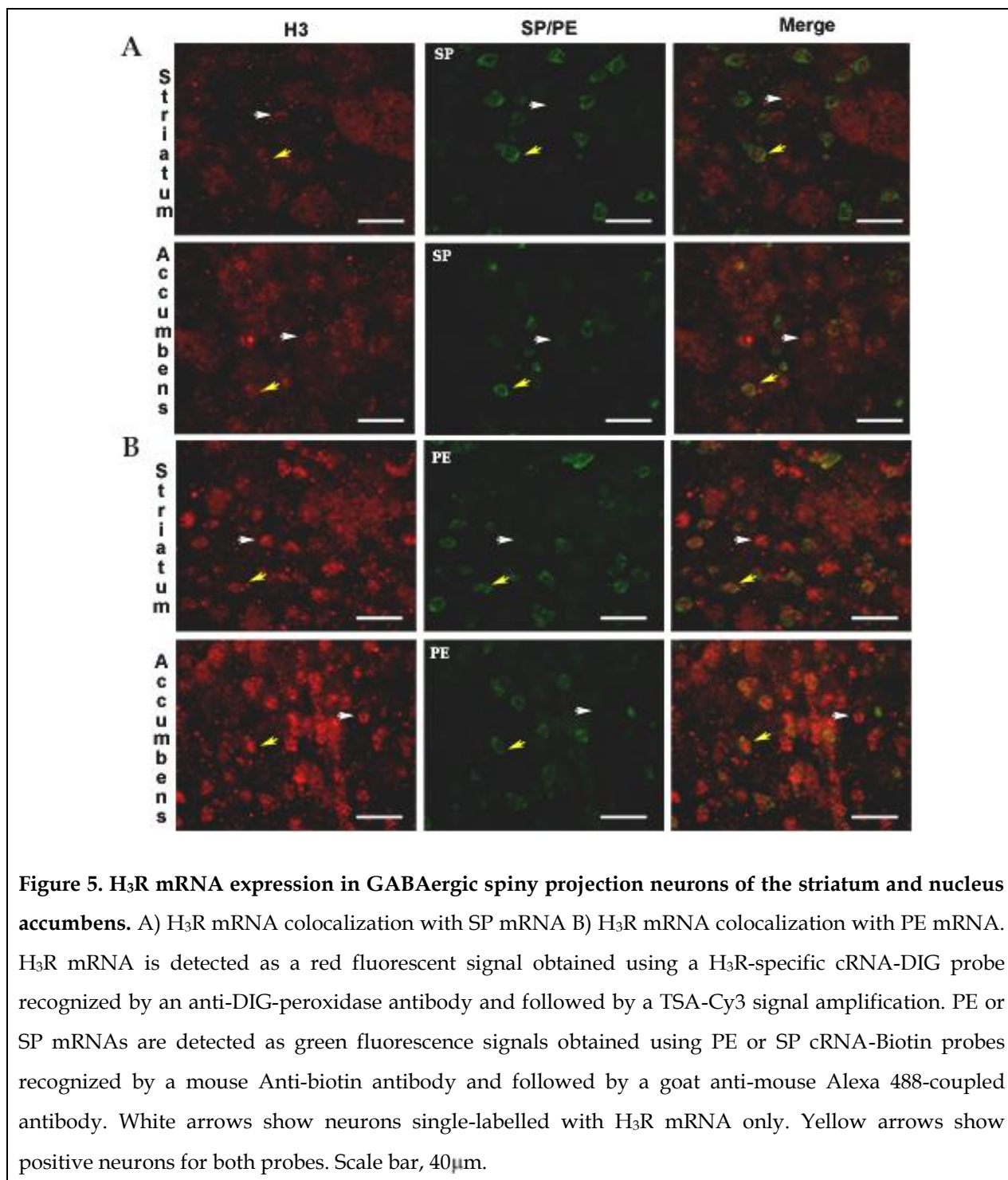
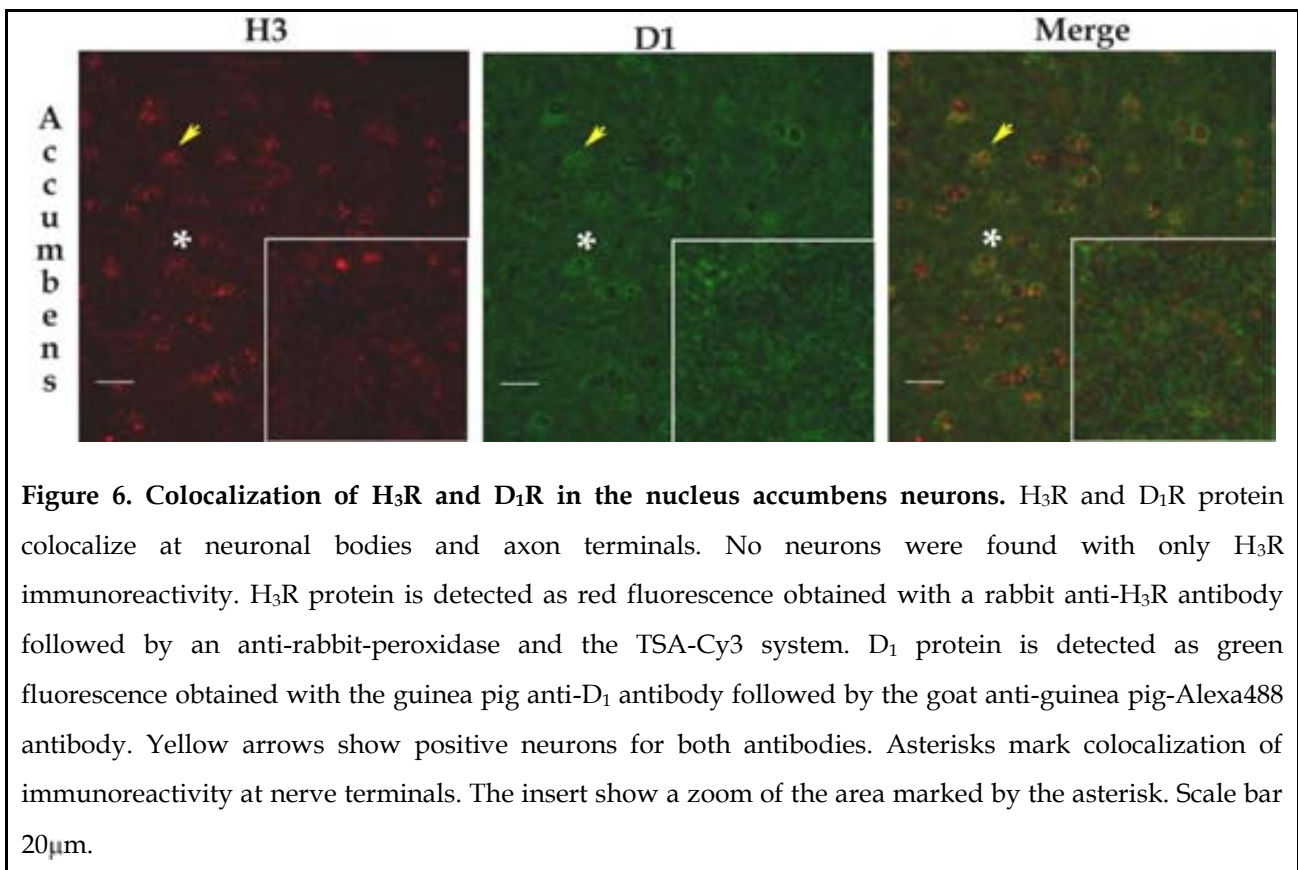
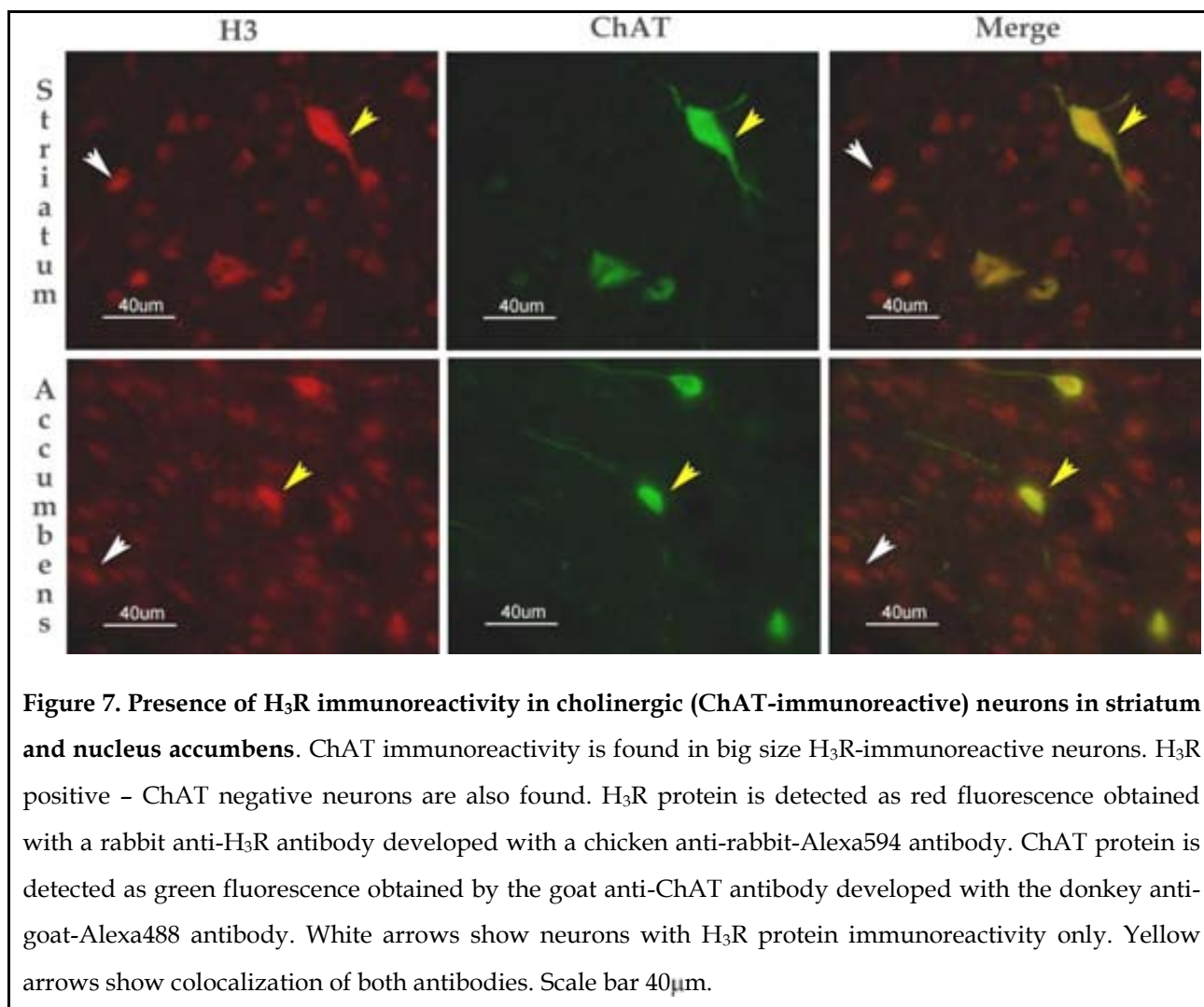


Figure 5. H₃R mRNA expression in GABAergic spiny projection neurons of the striatum and nucleus accumbens. A) H₃R mRNA colocalization with SP mRNA B) H₃R mRNA colocalization with PE mRNA. H₃R mRNA is detected as a red fluorescent signal obtained using a H₃R-specific cRNA-DIG probe recognized by an anti-DIG-peroxidase antibody and followed by a TSA-Cy3 signal amplification. PE or SP mRNAs are detected as green fluorescence signals obtained using PE or SP cRNA-Biotin probes recognized by a mouse Anti-biotin antibody and followed by a goat anti-mouse Alexa 488-coupled antibody. White arrows show neurons single-labelled with H₃R mRNA only. Yellow arrows show positive neurons for both probes. Scale bar, 40µm.

Dopamine D₁ receptor immunoreactivity shown a general pattern of expression suggesting terminal labelling, although the signal was more intense in neuronal somas. We found H₃R-D₁R colocalization (**Fig. 6**) in the H₃R positive neurons of the mPFC, dorsal striatum and nucleus accumbens (overlap values 0.71 ± 0.01 , 0.67 ± 0.05 and 0.71 ± 0.03 respectively) and also in H₃R positive terminals of these areas (overlap values 0.70 ± 0.02 , 0.70 ± 0.03 and 0.74 ± 0.04 respectively).



Although H₃R activation modulates acetylcholine release (Clapham and Kilpatrick 1992; Arrang et al. 1995; Prast et al., 1999), the presence of H₃R on cholinergic neuron terminals had not yet been clearly established. We found H₃R immunoreactivity in virtually all the striatal cholinergic interneurons, as shown in **Fig. 7**.



H₃R protein expression in glutamatergic endings. Effects on glutamate release.

The striatum receives a modulatory histaminergic input arising from the tuberomammillary nucleus of the hypothalamus (Panula et al. 1989) and three major synaptic inputs: the dopaminergic nigrostriatal pathway and the glutamatergic corticostriatal and thalamostriatal pathways (Smith et al. 2004). These two glutamatergic inputs to striatal neurons can be easily distinguished on the basis of the vesicular transporter used for glutamate storage. Thalamic neurons express the vesicular glutamate transporter 2 while cortical neurons innervating the striatum are believed to use the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) (Kaneko and Fujiyama 2002). As **Fig. 8** shows, corticostriatal glutamatergic (VGLUT1 immunoreactive) endings are highly expressed in mPFC, striatum and nucleus accumbens, where they surround H₃R positive neurons (overlap values 0.68 ± 0.08 , 0.75 ± 0.08 and 0.72 ± 0.04 respectively).

Although colocalization of VGLUT1 and H₃R is found at the neuronal body in these areas it is limited to the external border of some H₃R positive neurons (overlap values 0.54 ± 0.03 , 0.60 ± 0.03 and 0.62 ± 0.05 respectively), while central area of the neurons only shows H₃R immunoreactivity.

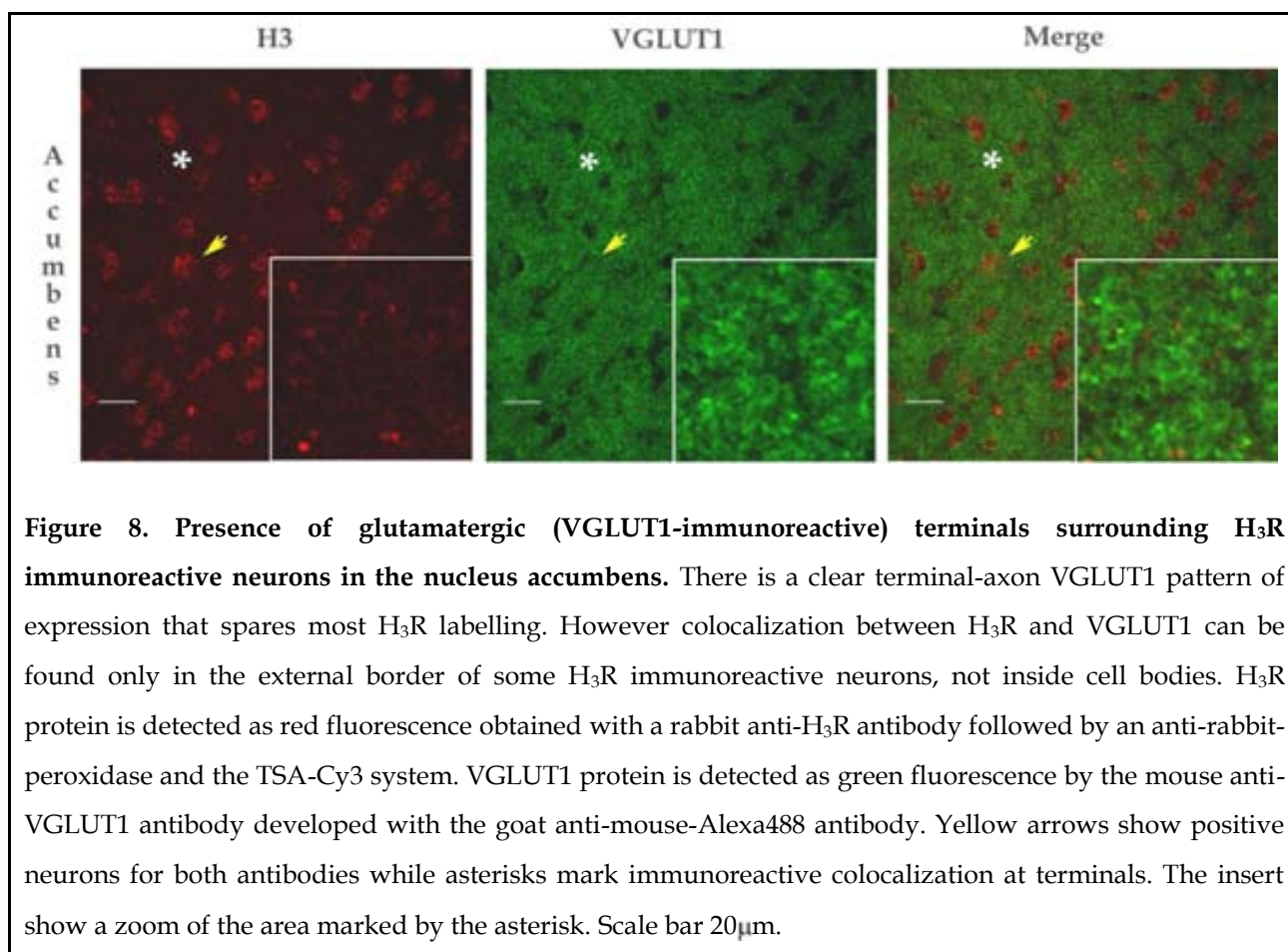


Figure 8. Presence of glutamatergic (VGLUT1-immunoreactive) terminals surrounding H₃R immunoreactive neurons in the nucleus accumbens. There is a clear terminal-axon VGLUT1 pattern of expression that spares most H₃R labelling. However colocalization between H₃R and VGLUT1 can be found only in the external border of some H₃R immunoreactive neurons, not inside cell bodies. H₃R protein is detected as red fluorescence obtained with a rabbit anti-H₃R antibody followed by an anti-rabbit-peroxidase and the TSA-Cy3 system. VGLUT1 protein is detected as green fluorescence by the mouse anti-VGLUT1 antibody developed with the goat anti-mouse-Alexa488 antibody. Yellow arrows show positive neurons for both antibodies while asterisks mark immunoreactive colocalization at terminals. The insert show a zoom of the area marked by the asterisk. Scale bar 20 μ m.

H₃ receptors found in glutamatergic corticostriatal endings are functional as long as the application of H₃R inverse agonist thioperamide (100 nM) to fresh brain slices decreased the paired-pulse ratio of field potentials elicited by cortico-striatal stimulation (**Fig. 9**). This effect persisted during thioperamide application (30 min) and after washout ($p < 0.05$ two-way ANOVA). A change in paired-pulse ratio is generally interpreted as a changed probability of neurotransmitter release reflecting a presynaptic action of the studied molecule.

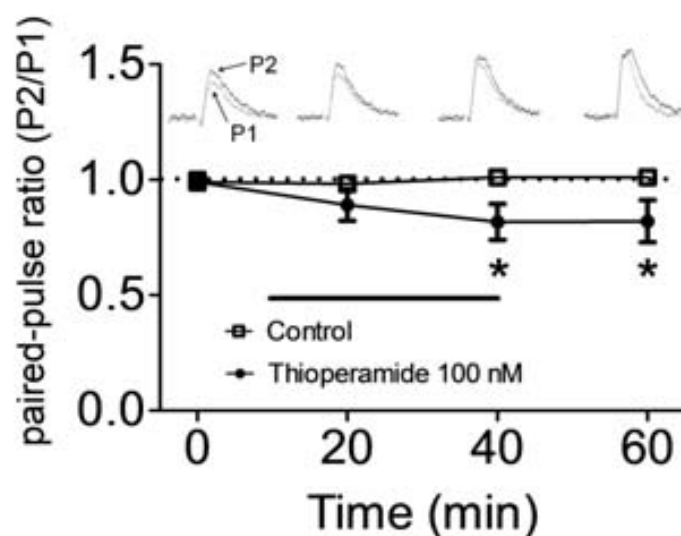


Figure 9. Paired-pulse depression elicited by a H₃R inverse agonist in fresh corticostriatal slices. Bath application of the H₃R inverse agonist thioperamide (100 nM, horizontal line) decreased paired-pulse ratio of field potentials elicited by stimulation of the corpus callosum, which suggests that presynaptic H₃R alter the probability of neurotransmitter release. Results are expressed as mean paired-pulse ratio (P2/P1) \pm SEM obtained from N=5 animals, where each data point is the mean of 8 consecutive field potentials normalized to baseline. Representative electrophysiological traces are shown above each time point. * $p < 0.05$ versus controls, two-way ANOVA.

H₃R protein is not expressed in GFAP-immunoreactive astrocytes.

Astrocytes detected with an antibody against its specific marker the glial fibrillary acidic protein (GFAP) are present in diverse brain areas including the neostriatum, the substantia nigra and the cortex (Savchenko et al. 2000). We analyzed the possible presence of H₃R in astrocytes and found no colocalization between H₃R and GFAP proteins in mPFC, striatum or nucleus accumbens (**Fig. 10**; overlap values 0.29 ± 0.03 , 0.26 ± 0.07 and 0.27 ± 0.07 respectively).

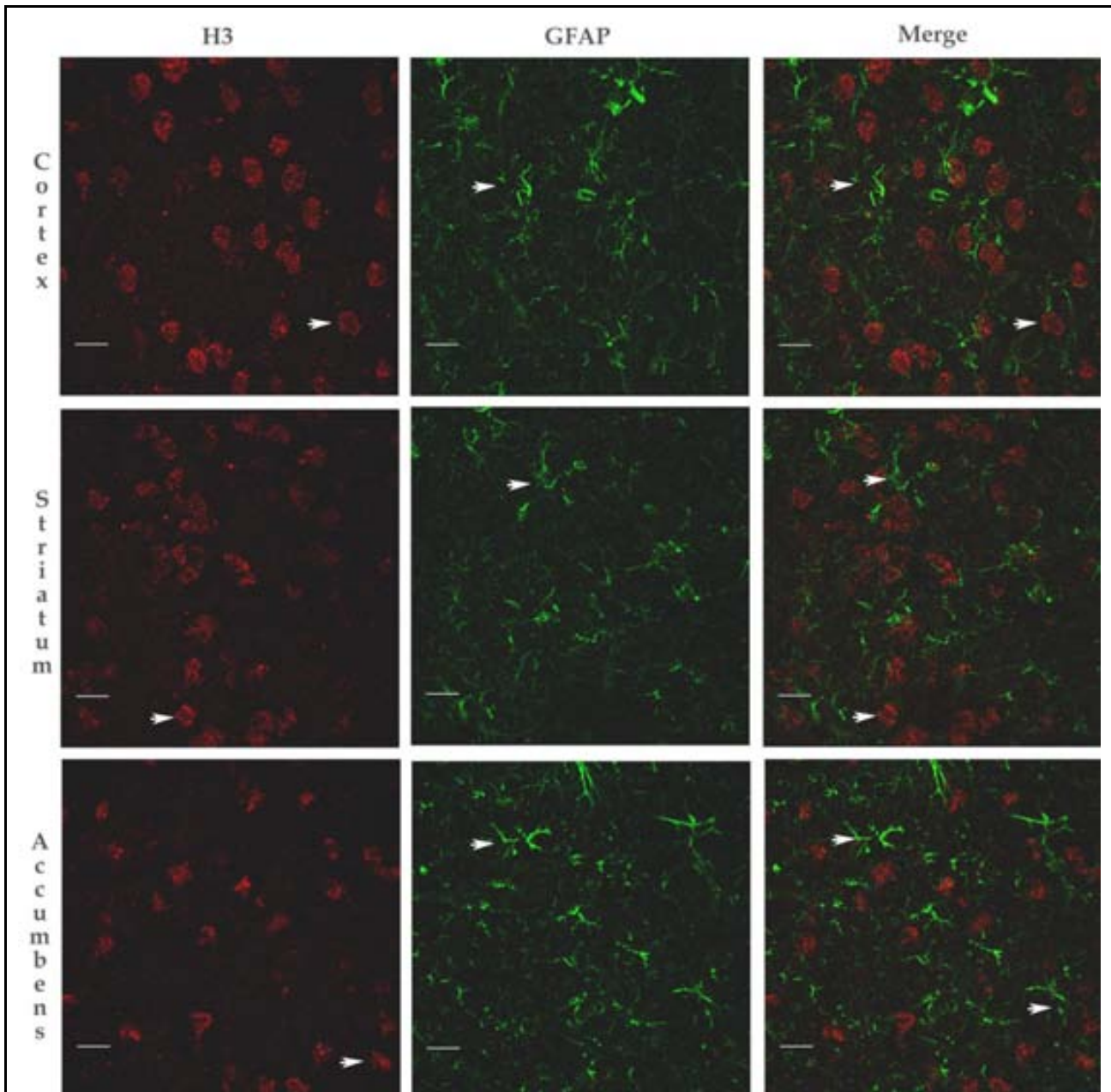


Figure 10. Absence of H₃R protein in astrocytes (GFAP-immunoreactive cells) in the rat forebrain. GFAP-positive astrocytes surround H₃R immunolabelled neurons in the mPFC, striatum and nucleus accumbens. H₃R protein is detected as red fluorescence obtained with a rabbit anti-H₃R antibody followed by an anti-rabbit-peroxidase and the TSA-Cy3 system. GFAP protein is detected as green fluorescence obtained with the mouse anti-GFAP antibody developed with the goat anti-mouse-Alexa488 antibody. White arrows show immunostained cells for only one of the antigens. Scale bar 20 μ m.

Discussion

In the present work we describe the presence of histamine H₃ receptor expression in several neuronal types of rat brain: (1) dopaminergic neurons of the VTA and SNc; (2) striatonigral and striatopallidal GABAergic neurons; (3) striatal cholinergic interneurons and (4) glutamatergic terminals. In addition, we show that H₃ receptors seem to be functional in these cells.

H₃R mRNA distribution in several brain regions was previously shown (Pillot et al. 2002a). However in the Pillot et al. study H₃R mRNA was not detected in the VTA. The reason for this discrepancy could be due to methodological procedures of different sensitivity. In the Pillot work a ³³P radioactive probe was used for a one-week exposition time, a relatively short and probably insufficient period for low levels of mRNA expression. In our case we used the same probe as Pillot et al. but we labelled it with digoxigenin. Detection with the potent TSA amplification system revealed H₃R mRNA expression in the VTA. Pillot et al. 2002a also studied the brain distribution of H₃R protein by means of binding studies with the H₃R antagonist ¹²⁵I-iodoproxyfan, and found a minimum binding in the VTA, much lower than in the dorsal striatum, Acb and substantia nigra (noteworthy weaker in SNc than in SNr, suggesting high H₃R expression in striatonigral neurons). Using fluorescence we have confirmed H₃R receptor presence in those areas (cortex, dorsal striatum, Acb, SNc and also VTA), but a comparison between regions was not attempted due to the difficulties of fluorescence quantification. Although H₃R expression can be lower in the VTA and SNc than in other regions, it is clearly present in dopaminergic neurons characterized both by tyrosine hydroxylase immunoreactivity and mRNA expression. Furthermore, H₃R stimulation decreased dopamine synthesis in striatal tissue (Figure 4 and Molina-Hernandez et al., 2000), as expected according to the typically inhibitory role of H₃R in other cells (Arrang et al., 1983, 1987). Dopamine release is also modulated by H₃R, although this effect has been more clearly observed in the prefrontal cortex than in the striatum (Ligneau et al., 2007; Schlicker et al 1993). In the Acb shell H₃R ligands modulate methamphetamine-stimulated dopamine release, but fail to modulate release when not stimulated (Munzar

et al., 2004). Thus despite low expression levels, functional inhibitory H₃R are present in dopaminergic neurons projecting to the prefrontal cortex, dorsal striatum and Acb.

Colocalization of PE or SP mRNA with H₃R mRNA in the striatum and nucleus accumbens confirms H₃R expression in all GABAergic medium spiny projection neurons (Ryu et al., 1994; Moreno et al., 2011). The presence of functional H₃R in striatonigral neurons agrees with: 1) the fact that H₃R stimulation reduces dopamine D₁ receptor dependent GABA release (Arias-Montano et al. 2001); 2) H₃R-mediated inhibition of the D₁ dopamine receptor-stimulated cAMP accumulation (Sanchez-Lemus 2004), and 3) D₁R - H₃R receptor heteromers stimulating MAP kinase specifically in these cells (Moreno et al., 2011). On the other hand, H₃R presence in striatopallidal neurons agrees with 1) a previous report of H₃R mRNA presence in PE positive neurons (Pillot et al 2002b) and 2) D₂ - H₃ colocalization (Moreno et al., 2011). D₂ and H₃ receptors can interact forming heteromers in living cells *in vitro*, and locomotor tests suggest they could also interact *in vivo* (Pillot et al 2002b; Ferrada et al. 2008), but it is still uncertain whether this interaction actually occurs in striatal neurons (Humbert-Claude et al., 2007).

The strict separation of dopamine D₁-like and D₂-like receptors between populations of striatonigral and striatopallidal projection neurons has been challenged by evidence showing that: (1) in the ventral striatum dopamine D₃ receptors can be co-expressed with D₁ or D₂ receptors (Le Moine and Bloch 1996); (2) D₄ and D₅ receptors can be colocalized in other striatal efferent neurons (Smith and Kieval 2000) and (3) neurons expressing D₁ receptors contain low levels of D₂ receptors and vice versa (Aizman et al., 2000). Currently, the existence of a population of medium spiny neurons which express both D₁ and D₂ receptors is accepted (Valjent et al. 2009, Perreault et al. 2010). Furthermore, two additional populations of D₁-expressing projection neurons can be found in striatum: one projects principally to SNc and co-express SP and PE (Wang 2007), and a second one projects to the substantia innominata and produces neurokinin B instead of SP or PE (Sonomura 2007). This implies that a low percentage of neurons can express both SP and PE or none, preventing a complete separation of the neuronal

populations. In this paper we found that H₃R-mRNA positive neurons express SP or PE mRNA, and all H₃R-protein immunoreactive neurons show D₁ protein immunoreactivity in the areas studied. This would imply H₃R expression in neurons where D₁ and D₂ receptors are colocalized and in neurokinin B neurons. However as these populations represent only a small part of the medium spiny neurons, the specificity of the antibodies should be discussed. The specificity of the antibody against the dopamine D₁ receptor we used was described for first time by Narushima et al. (2006). In Narushima's paper, D₁ receptor immunoreactivity shown a partial colocalization with the D₂ receptor immunoreactivity, although this fact was not discussed by the authors. The specificity of the H₃R antibody used here has been tested (Fig. 3) but we can not discard the possibility that it could also recognize low levels of histamine H₄ receptors present in the striatum (Connelly et al. 2009).

GABAergic and cholinergic interneurons of the caudate/putamen express dopamine D₁R (David 2005). Thus the terminal pattern of colocalization of D₁R and H₃R immunoreactivity that we found should be due to H₃R presence in interneuron arborizations, as glutamatergic inputs express only dopamine D₂-like receptors (David 2005). Similarly, the D₁R - H₃R protein colocalization found in the mPFC could be due to the H₃R presence in the D₁R-expressing GABAergic interneurons of the cortex.

We found H₃R immunoreactivity in corticostriatal glutamatergic inputs to the striatum. It is well known that excitatory corticostriatal afferents to the striatum innervate both populations of medium-sized spiny GABAergic projection neurons (Lei et al. 2004). The colocalization of H₃R and VGLUT1 agrees with functional studies showing that 1) the H₃ ligand thioperamide elicits paired-pulse depression in corticostriatal synapses (Fig. 9), an index of altered probability of presynaptic neurotransmitter release (Thomson, 2000); 2) H₃R mediate histamine-induced synaptic depression in corticostriatal inputs (Doreulee 2001), and 3) H₃R activation in striatal synaptosomes inhibits glutamate release (Molina-Hernandez 2001).

Our results show that striatal cholinergic neurons present histamine H₃ receptor immunoreactivity. Due to the low number of striatal cholinergic interneurons, we were unable to show direct effects of H₃R ligands specifically in these cells, but there are numerous studies where H₃R modulation of acetylcholine release has been observed in diverse brain regions: (1) in the amygdala H₃R agonists increased acetylcholine release (Cangioli et al. 2002); (2) in the cortex H₃R agonists decreased acetylcholine release (Clapham & Kilpatrick, 1992; Arrang et al., 1995); (3) in the hippocampus H₃R antagonists increased acetylcholine release (Bacciottini et al. 2002); (4) in the ventral striatum of freely moving rats acetylcholine release was stimulated by both H₃R agonists and inverse agonists by acting at H₃ receptors putatively located in different populations of neurons, although no evidence was obtained of direct effects of H₃ ligands on cholinergic neurons (Prast et al. 1999). Thus, the possibility that H₃ receptors in striatal cholinergic interneurons are functional is still uncertain.

Although we did not find H₃R presence in GFAP-immunoreactive astrocytes in the mPFC, striatum or nucleus accumbens, this colocalization was recently shown at the caudal spinal trigeminal nucleus of non-human primates (Sekizawa 2010). Thus H₃R presence in astrocytes could be limited to some areas. In cultured astrocytes histamine seems to act through H₁ receptors to induce inositol phosphate accumulation (Kondou 1991) and calcium entry (Jung 2000) but we have found no literature evidence of H₃ receptor-mediated effects in astrocytes.

Due to the presence of functional H₃R in such different cellular types, what role should these receptors have in striatal function? Regarding locomotion, it has been shown that histamine action on H₃R elicits a fast hypokinetic effect, and afterwards histamine would activate H₁ receptors to elicit hyperactivity (Chiavegatto et al., 1998). The hypokinetic effect could be explained by a transient decrease of dopamine neurotransmission provoked by H₃R stimulation. However H₃R KO mice exhibit lower locomotion than wild-type mice (Toyota et al., 2002), a finding that is hard to reconcile with the H₃-mediated hypokinetic effect. An interpretation given by these authors is that the absence of H₃ inhibitory autoreceptors in histamine neurons of KO mice could

favor histamine release, which could decrease neuronal histamine levels, which in turn could decrease activation of H₁ receptors (Toyota et al., 2002). Expression of H₃R as auto- and heteroreceptors in such many different cellular types difficults to interpret the results obtained, most notably those of KO mice, wich experiment developmental adaptations.

Several H₃R agonists decrease L-dopa and apomorphine-induced turning behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rats (Huotari et al., 2000; Liu et al., 2008) as well as L-dopa-induced chorea in MPTP-lesioned monkeys (Gomez-Ramirez et al. 2006). These effects could be due to H₃R-mediated decrease of GABA release in the SNr (García-Ramirez et al., 2004, but see Yanovsky et al., 2011). In reserpinized mice, H₃ receptor stimulation decreases locomotion induced by dopaminergic agonists (Ferrada et al., 2008). These effects should be independent of H₃R expression in dopaminergic neurons. In brains from Parkinson disease patients a strong H₃R binding was found in the SNr (Anichtchik et al., 2001). Thus, it is likely that H₃R in the GABAergic direct pathway could account for the majority of effects of H₃R agonists in models of Parkinson's disease. H₃R and D₁R in these neurons have opposite effects (Arias-Montaña et al, 2001; Moreno et al., 2011) and dopaminergic lesions may sensitize them (Anichtchik et al., 2001; Sanchez-Lemus and Arias-Montaña, 2004).

The effects of H₃R antagonists / inverse agonists can be more difficult to interpret. H₃R inverse agonists would (1) stimulate histamine release, which may lead to H₁-mediated effects such as hyperlocomotion (Chiavegatto et al., 1998; Zhou et al., 2006), (2) facilitate glutamate release from corticostriatal terminals (Fig. 9), and (3) stimulate cortical dopamine release (Ligneau et al., 2007). In reserpinized mice, the H₃R antagonists / inverse agonist thioperamide potentiates locomotion elicited by dopaminergic agonists (Ferrada et al., 2008). However, antagonism of H₃R in striatonigral neurons could also block D₁-H₃ receptor heteromers (Moreno et al., 2011), whose involvement in locomotion is uncertain, but that could hypothetically contribute to dopamine-mediated effects. D₁-H₃ receptor heteromers work as processors integrating dopaminergic and histaminergic signals that can be blocked by antagonists

of either receptor partner (Moreno et al., 2011). According to H₃R expression in several neuronal types of the basal ganglia, further studies would help to determine whether H₃R ligands could be useful as therapeutic agents in Parkinson's disease or related movement disorders.

In conclusion, functional H₃ receptors are present in many different neuronal populations where they control striatal dopaminergic and glutamatergic transmission. These results could help to understand the role of H₃R in basal ganglia neural network.

Acknowledgements

Supported by Spanish government grants SAF2006-08240, SAF2009-12510 and Red de Trastornos Adictivos RD06/0001/0015. M.G.S. was recipient of a spanish government FPI fellowship.

References

- Aizman, O., Brismar, H., Uhlen, P., Zettergren, E., Levey, A. I., Forsberg, H., et al. (2000). Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nature Neuroscience*, 3(3), 226-230. doi: 10.1038/72929
- Anichtchik, O. V., Peitsaro, N., Rinne, J. O., Kalimo, H., & Panula, P. (2001). Distribution and modulation of histamine H(3) receptors in basal ganglia and frontal cortex of healthy controls and patients with parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 8(4), 707-716. doi:10.1006/nbdi.2001.0413
- Arias-Montano, J. A., Floran, B., Garcia, M., Aceves, J., & Young, J. M. (2001). Histamine H(3) receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D(1) receptor-dependent release of [(3)H]-gamma-aminobutyric acid from rat striatal slices. *Br J Pharmacol*, 133(1), 165-71. doi: 10.1038/sj.bjp.0704053
- Arrang, J. M., Drutel, G., & Schwartz, J. C. (1995). Characterization of histamine H3 receptors regulating acetylcholine release in rat entorhinal cortex. *British Journal of Pharmacology*, 114(7), 1518-1522.

- Arrang, J. M., Garbarg, M., & Schwartz, J. C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature*, 302(5911), 832-7.
- Arrang, J. M., Garbarg, M., & Schwartz, J. C. (1987). Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H₃-receptors. *Neuroscience*, 23(1), 149-57.
- Bacciottini, L., Passani, M. B., Giovannelli, L., Cangioli, I., Mannaioni, P. F., Schunack, W., et al. (2002). Endogenous histamine in the medial septum-diagonal band complex increases the release of acetylcholine from the hippocampus: A dual-probe microdialysis study in the freely moving rat. *The European Journal of Neuroscience*, 15(10), 1669-1680. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02005.x
- Cangioli, I., Baldi, E., Mannaioni, P. F., Bucherelli, C., Blandina, P., & Passani, M. B. (2002). Activation of histaminergic H₃ receptors in the rat basolateral amygdala improves expression of fear memory and enhances acetylcholine release. *The European Journal of Neuroscience*, 16(3), 521-528. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02092.x
- Chiavegatto, S., Nasello, A. G., & Bernardi, M. M. (1998). Histamine and spontaneous motor activity: Biphasic changes, receptors involved and participation of the striatal dopamine system. *Life Sciences*, 62(20), 1875-1888. doi:10.1016/S0024-3205(98)00154-4
- Clapham, J., & Kilpatrick, G. J. (1992). Histamine H₃ receptors modulate the release of [3H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: Evidence for the possible existence of H₃ receptor subtypes. *British Journal of Pharmacology*, 107(4), 919-923.
- Connelly, W. M., Shenton, F. C., Lethbridge, N., Leurs, R., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., et al. (2009). The histamine H₄ receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *British Journal of Pharmacology*, 157(1), 55-63. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00227.x
- David, H. N., Anseau, M., & Abbraini, J. H. (2005). Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 50(2), 336-360. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.09.002

- Doreulee, N., Yanovsky, Y., Flaggmeyer, I., Stevens, D. R., Haas, H. L., & Brown, R. E. (2001). Histamine H(3) receptors depress synaptic transmission in the corticostriatal pathway. *Neuropharmacology*, 40(1), 106-13. doi:10.1016/S0028-3908(00)00101-5
- Ferrada, C., Ferre, S., Casado, V., Cortes, A., Justinova, Z., Barnes, C., et al. (2008). Interactions between histamine H(3) and dopamine D(2) receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology*, 55(2), 190-197. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.05.008
- Garcia-Ramirez, M., Aceves, J., & Arias-Montano, J. A. (2004). Intranigral injection of the H3 agonist immpip and systemic apomorphine elicit ipsilateral turning behaviour in naive rats, but reduce contralateral turning in hemiparkinsonian rats. *Behavioural Brain Research*, 154(2), 409-415. doi:10.1016/j.bbr.2004.03.007
- Gomez-Ramirez, J., Johnston, T. H., Visanji, N. P., Fox, S. H., & Brotchie, J. M. (2006). Histamine H3 receptor agonists reduce L-dopa-induced chorea, but not dystonia, in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of parkinson's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 21(6), 839-846. doi: 10.1002/mds.20828
- Humbert-Claude, M., Morisset, S., Gbahou, F., & Arrang, J. M. (2007). Histamine H3 and dopamine D2 receptor-mediated [35S]GTPgamma[S] binding in rat striatum: Evidence for additive effects but lack of interactions. *Biochem Pharmacol*, 73(8), 1172-81. doi:10.1016/j.bcp.2007.01.006
- Huotari, M., Kukkonen, K., Liikka, N., Potasev, T., Raasmaja, A., & Mannisto, P. T. (2000). Effects of histamine H(3)-ligands on the levodopa-induced turning behavior of hemiparkinsonian rats. *Parkinsonism & Related Disorders*, 6(3), 159-164. doi:10.1016/S1353-8020(00)00007-9
- Jung, S., Pfeiffer, F., & Deitmer, J. W. (2000). Histamine-induced calcium entry in rat cerebellar astrocytes: Evidence for capacitative and non-capacitative mechanisms. *The Journal of Physiology*, 527 Pt 3, 549-561. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00549.x
- Kaneko, T., & Fujiyama, F. (2002). Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neuroscience Research*, 42(4), 243-250. doi:10.1016/S0168-0102(02)00009-3

- Kawaguchi, Y. (1997). Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neuroscience Research*, 27(1), 1-8. doi: 10.1016/S0168-0102(96)01134-0
- Kondou, H., Inagaki, N., Fukui, H., Koyama, Y., Kanamura, A., & Wada, H. (1991). Histamine-induced inositol phosphate accumulation in type-2 astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177(2), 734-738. doi:10.1016/0006-291X(91)91849-8
- Lante, F., de Jesus Ferreira, M. C., Guiramand, J., Recasens, M., & Vignes, M. (2006). Low-frequency stimulation induces a new form of LTP, metabotropic glutamate (mGlu5) receptor- and PKA-dependent, in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus*, 16(4), 345-360. doi: 10.1002/hipo.20146
- Le Moine, C., & Bloch, B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: Sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol*, 355(3), 418-26.
- Le Moine, C., & Bloch, B. (1996). Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: Comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience*, 73(1), 131-143. doi:10.1016/0306-4522(96)00029-2
- Lei, W., Jiao, Y., Del Mar, N., & Reiner, A. (2004). Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *The Journal of Neuroscience*, 24(38), 8289-8299. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1990-04.2004
- Ligneau, X., Perrin, D., Landais, L., Camelin, J. C., Calmels, T. P., Berrebi-Bertrand, I., et al. (2007). BF2.649 [1-{3-[3-(4-chlorophenyl)propoxy]propyl}piperidine, hydrochloride], a nonimidazole inverse agonist/antagonist at the human histamine H₃ receptor: Preclinical pharmacology. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(1), 365-375. doi: 10.1124/jpet.106.111039
- Liu, C. Q., Hu, D. N., Liu, F. X., Chen, Z., & Luo, J. H. (2008). Apomorphine-induced turning behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rats is increased by histidine and decreased by histidine decarboxylase, histamine H₁ and H₂ receptor antagonists, and an H₃ receptor agonist. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 90(3), 325-330. doi:10.1016/j.pbb.2008.03.010

- Lovenberg, T. W., Roland, B. L., Wilson, S. J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., et al. (1999). Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol Pharmacol*, 55(6), 1101-7.
- Molina-Hernandez, A., Nunez, A., & Arias-Montano, J. A. (2000). Histamine H₃-receptor activation inhibits dopamine synthesis in rat striatum. *Neuroreport*, 11(1), 163-6.
- Molina-Hernandez, A., Nunez, A., Sierra, J. J., & Arias-Montano, J. A. (2001). Histamine H₃ receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology*, 41(8), 928-34. doi:10.1016/S0028-3908(01)00144-7
- Moreno, E., Hoffmann, H., Gonzalez-Sepulveda, M., Navarro, G., Casado, V., Cortes, A., et al. (2011). Dopamine D1-histamine H₃ receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5846-5854. doi: 10.1074/jbc.M110.161489
- Morgane, P. J., Galler, J. R., & Mokler, D. J. (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in Neurobiology*, 75(2), 143-160. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.01.001
- Morisset, S., Sasse, A., Gbahou, F., Heron, A., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., et al. (2001). The rat H₃ receptor: Gene organization and multiple isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(1), 75-80. doi:10.1006/bbrc.2000.4073
- Munzar, P., Tanda, G., Justinova, Z., & Goldberg, S. R. (2004). Histamine H₃ receptor antagonists potentiate methamphetamine self-administration and methamphetamine-induced accumbal dopamine release. *Neuropsychopharmacology*, 29(4), 705-17. doi:10.1038/sj.npp.1300380
- Narushima, M., Uchigashima, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., & Kano, M. (2006). Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *The European Journal of Neuroscience*, 24(8), 2246-2252. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05119.x

- Oda, T., Morikawa, N., Saito, Y., Masuho, Y., & Matsumoto, S. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36781-36786. doi: 10.1074/jbc.M006480200
- Panula, P., Flugge, G., Fuchs, E., Pirvola, U., Auvinen, S., & Airaksinen, M. S. (1989). Histamine-immunoreactive nerve fibers in the mammalian spinal cord. *Brain Res*, 484(1-2), 234-9.
- Perreault, M. L., Hasbi, A., Alijaniam, M., Fan, T., Varghese, G., Fletcher, P. J., et al. (2010). The dopamine D1-D2 receptor heteromer localizes in dynorphin/enkephalin neurons: Increased high affinity state following amphetamine and in schizophrenia. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36625-36634. doi: 10.1074/jbc.M110.159954
- Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J. C., et al. (2002). A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*, 114(1), 173-93. doi:10.1016/S0306-4522(02)00135-5
- Pillot, C., Ortiz, J., Heron, A., Ridray, S., Schwartz, J. C., & Arrang, J. M. (2002). Ciproxifan, a histamine H₃-receptor antagonist/inverse agonist, potentiates neurochemical and behavioral effects of haloperidol in the rat. *J Neurosci*, 22(16), 7272-80.
- Prast, H., Tran, M. H., Fischer, H., Kraus, M., Lamberti, C., Grass, K., et al. (1999). Histaminergic neurons modulate acetylcholine release in the ventral striatum: Role of H₃ histamine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 360(5), 558-64. doi: 10.1007/s002109900097
- Ryu, J. H., Yanai, K., Iwata, R., Ido, T., & Watanabe, T. (1994). Heterogeneous distributions of histamine H₃, dopamine D₁ and D₂ receptors in rat brain. *Neuroreport*, 5(5), 621-624.
- Sanchez-Lemus, E., & Arias-Montano, J. A. (2004). Histamine H₃ receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-induced cAMP accumulation in rat striatal slices. *Neurosci Lett*, 364(3), 179-84. doi:10.1016/j.neulet.2004.04.045

- Sander, K., Kottke, T., & Stark, H. (2008). Histamine H₃ receptor antagonists go to clinics. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(12), 2163-2181. doi:10.1248/bpb.31.2163
- Savchenko, V. L., McKanna, J. A., Nikonenko, I. R., & Skibo, G. G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: Comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience*, 96(1), 195-203. doi:10.1016/S0306-4522(99)00538-2
- Schlicker, E., Betz, R., & Gothert, M. (1988). Histamine H₃ receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 337(5), 588-90.
- Schlicker, E., Fink, K., Detzner, M., & Gothert, M. (1993). Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H₃ receptors. *J Neural Transm Gen Sect*, 93(1), 1-10.
- Schlicker, E., Fink, K., Hinterthaler, M., & Gothert, M. (1989). Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H₃ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 340(6), 633-8.
- Sekizawa, S., Bechtold, A. G., Tham, R. C., Kott, K. S., Hyde, D. M., Joad, J. P., et al. (2010). House-dust mite allergen and ozone exposure decreases histamine H₃ receptors in the brainstem respiratory nuclei. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247(3), 204-210. doi:10.1016/j.taap.2010.06.014
- Smith, Y., & Kieval, J. Z. (2000). Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, 23(10 Suppl), S28-33.
- Smith, Y., Raju, D. V., Pare, J. F., & Sidibe, M. (2004). The thalamostriatal system: A highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends in Neurosciences*, 27(9), 520-527. doi:10.1016/j.tins.2004.07.004
- Sonomura, T., Nakamura, K., Furuta, T., Hioki, H., Nishi, A., Yamanaka, A., et al. (2007). Expression of D1 but not D2 dopamine receptors in striatal neurons producing neurokinin B in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 26(11), 3093-3103. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05923.x

- Thomson, A. M. (2000). Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends in Neurosciences*, 23(7), 305-312. doi:10.1016/S0166-2236(00)01580-0
- Toyota, H., Dugovic, C., Koehl, M., Laposky, A. D., Weber, C., Ngo, K., et al. (2002). Behavioral characterization of mice lacking histamine H(3) receptors. *Molecular Pharmacology*, 62(2), 389-397. doi: 10.1124/mol.62.2.389
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Herve, D., Fisone, G., & Girault, J. A. (2009). Looking BAC at striatal signaling: Cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends in Neurosciences*, 32(10), 538-547. doi:10.1016/j.tins.2009.06.005
- Wang, H. B., Deng, Y. P., & Reiner, A. (2007). In situ hybridization histochemical and immunohistochemical evidence that striatal projection neurons co-containing substance P and enkephalin are overrepresented in the striosomal compartment of striatum in rats. *Neurosci Lett*, 425(3), 195-9. doi:10.1016/j.neulet.2007.08.033
- Yanai, K., & Tashiro, M. (2007). The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: An insight from human positron emission tomography studies. *Pharmacol Ther*, 113(1), 1-15. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.06.008
- Yanovsky Y, Li S, Klyuch BP, Yao Q, Blandina P, Passani MB, Lin JS, Haas H, Sergeeva OA. (2011) L-Dopa activates histaminergic neurons. *J Physiol*. 2011 Jan 17. [Epub ahead of print]. doi: 10.1113/jphysiol.2010.203257
- Zhou, F. W., Xu, J. J., Zhao, Y., LeDoux, M. S., & Zhou, F. M. (2006). Opposite functions of histamine H1 and H2 receptors and H3 receptor in substantia nigra pars reticulata. *Journal of Neurophysiology*, 96(3), 1581-1591. doi: 10.1152/jn.00148.2006

1.3. Conclusiones del capítulo 1

- 1.3.1. Las técnicas histoquímicas usadas permiten el desarrollo experimental al carecer de señales inespecíficas significativas que dificulten la interpretación de los resultados (**Fig. 49** y **Fig. 2 y 3** del artículo 1).
- 1.3.2. Tanto la proteína como el mRNA del receptor H₃ de histamina se expresan en las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra compacta y del área tegmental ventral (**Fig. 1** del artículo 1).
- 1.3.3. Las neuronas GABAérgicas de proyección estriatonigrales y estriopalidales presentan mRNA del H₃R (**Fig. 5** del artículo 1).
- 1.3.4. La proteína del H₃R colocaliza con la del D₁R tanto a nivel de cuerpo celular como de terminales axónicas, por lo que está presente en neuronas estriatonigrales así como en otras poblaciones neuronales que expresan este receptor de dopamina (**Fig. 6** del artículo 1).
- 1.3.5. La proteína del receptor H₃ es expresada en neuronas colinérgicas y glutamatérgicas (tanto a nivel del cuerpo celular como de las terminales) del núcleo estriado y mPFC (**Fig. 7 y 8** del artículo 1).
- 1.3.6. Los astrocitos marcados mediante GFAP en el mPFC y núcleo estriado no muestran inmunoreactividad para la proteína del H₃R (**Fig. 10** del artículo 1).

Capítulo 2: Efectos de la autoadministración crónica de cocaína en rata sobre la expresión de los mRNA del H₃R y la TH.

2.1. Objetivos

La presencia del receptor H₃ en las distintas poblaciones neuronales de los ganglios basales le permite regular su actividad modulando así la síntesis y liberación de distintos neurotransmisores. La dopamina, en particular, es de vital importancia pues su desregulación conlleva graves enfermedades vinculadas tanto al circuito locomotor como al límbico.

En nuestro grupo de investigación hemos decidido centrarnos en el estudio de la adicción a la cocaína y en la búsqueda de tratamientos para su consumo. Para ello empleamos el modelo animal de autoadministración de cocaína debido a la importancia del carácter voluntario del consumo y el valor que presenta como modelo de adicción (Deroche-Gamonet et al., 2004). Hemos mencionado que el imetit (agonista H₃) incrementa la latencia de autoadministración, lo cual podría deberse a la expresión del H₃R en neuronas dopaminérgicas de la SN y VTA descritas en el artículo 1.

Por otra parte, ya sea directa o indirectamente, las diversas drogas de abuso incrementan la liberación de dopamina en el núcleo accumbens, región donde también hemos descrito la presencia del H₃R. Sin embargo, en la literatura existen datos conflictivos respecto al efecto de la cocaína sobre la expresión de mRNA de TH. Por este motivo decidimos:

- **Evaluar si la autoadministración de cocaína produce diferencias respecto a los animales control, a nivel del número de neuronas TH positivas y del porcentaje de colocación de mRNAs TH-H₃ en la región del mesencéfalo.**

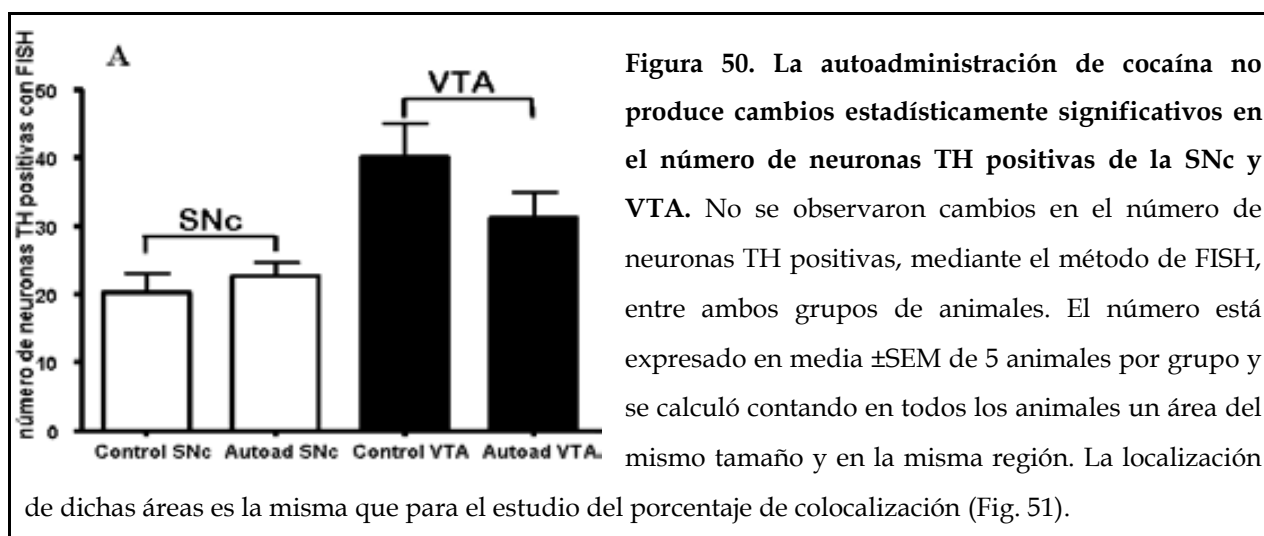
- Estudiar si la autoadministración de cocaína produce diferencias respecto a los animales control, a nivel de la cuantificación del mRNA del H₃R en córtex y cuerpo estriado.

2.2. Resultados

2.2.1. Efecto sobre el número de neuronas TH positivas.

Para cuantificar el número de neuronas marcadas para el mRNA de la TH se han tenido en cuenta todas las células marcadas en la región examinada, independientemente de la intensidad de su marcaje. Los datos se han expresado en media \pm SEM y la significación de los resultados se ha estudiado empleando una ANOVA de un factor y el post-test de Bonferroni.

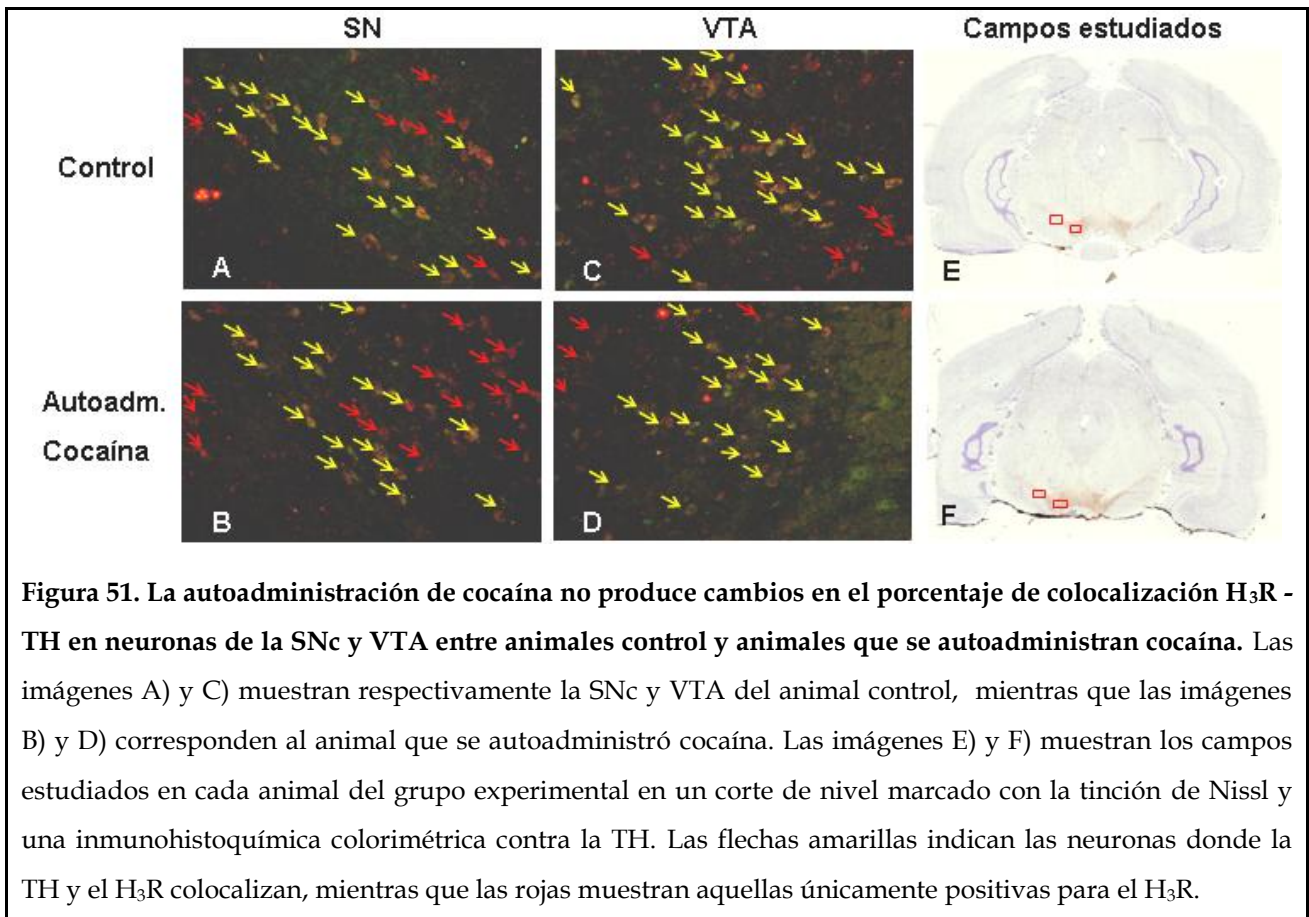
A pesar de observar un pequeño descenso, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas (**Fig. 50**) entre los animales control y aquellos que se autoadministraron cocaína tanto en la SNc como en la VTA.



2.2.2. Efecto sobre el porcentaje de colocalización de los mRNA de TH y H₃ en la región del mesencéfalo.

Se ha reproducido la colocalización previamente observada en ratas *naive* (ver Capítulo 1) entre los mRNA del receptor H₃ y de TH en mesencéfalo y se ha estudiado el porcentaje de colocalización tanto en los animales control como en aquellos que se

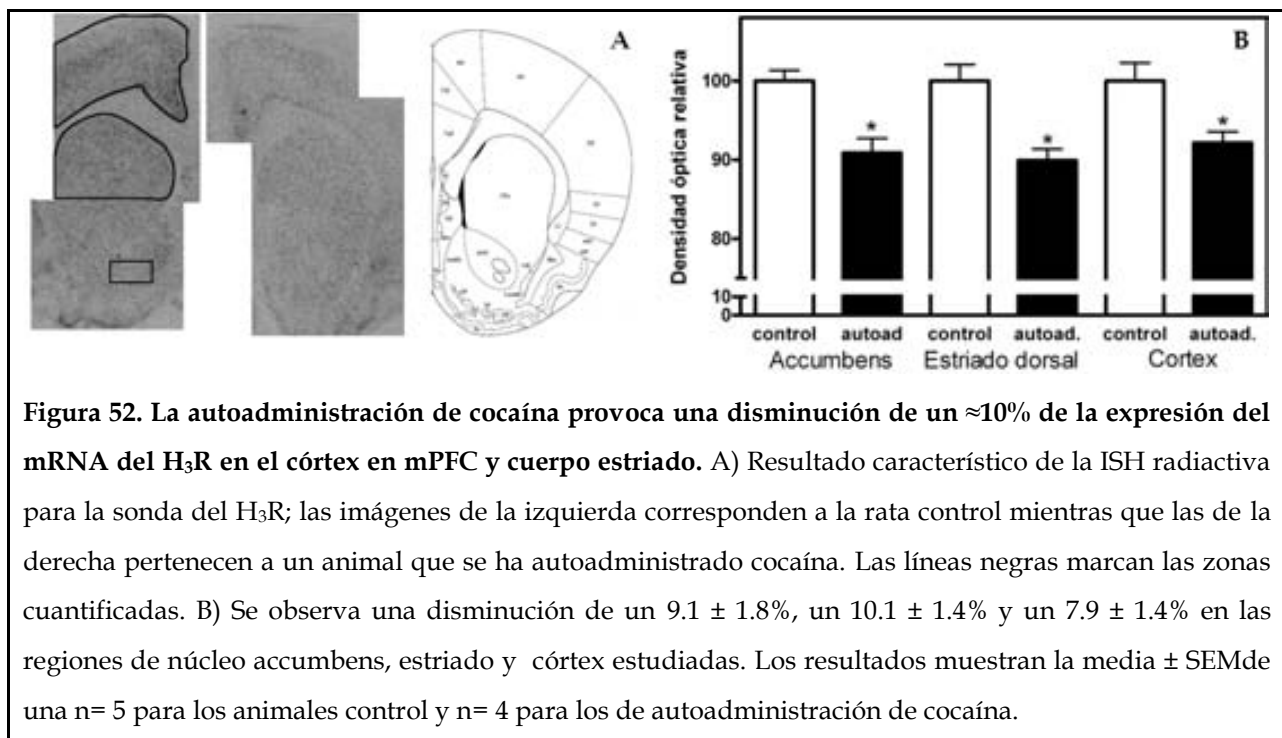
autoadministraron cocaína. Por porcentaje de colocalización nos referimos al porcentaje de neuronas marcadas positivamente para ambas sondas, independientemente de la intensidad del marcaje. En ambos tipos de animales hemos hallado que prácticamente el 100% de las neuronas TH positivas colocalizan con el mRNA de H₃R (flechas amarillas) (Fig. 51). Aunque sí se aprecian neuronas reactivas para el H₃ que carecen de marcaje para la TH (flechas rojas), no se encuentran neuronas reactivas para la TH y negativas para el receptor H₃. Esta observación se repite para todos los animales control, cocaína y *naive* (aquellos no pertenecientes al procedimiento de autoadministración) estudiados, por lo que no se ha realizado un análisis estadístico.



2.2.3. Efecto sobre la cuantificación del mRNA del H₃R en córtex y cuerpo estriado.

Dada la falta de efecto de la cocaína sobre el número de neuronas TH positivas o sobre el porcentaje de éstas que expresan el mRNA del receptor H₃, nos planteamos

estudiar si la expresión de éste podría estar alterada en regiones inervadas por estas neuronas. Tal y como muestra la **Fig. 52** en las áreas estudiadas del núcleo accumbens, estriado y córtex la autoadministración de cocaína produce una disminución significativa de los niveles de mRNA de H₃R aunque de muy pequeña magnitud ($9.1 \pm 1.8\%$, un $10.1 \pm 1.4\%$ y un $7.9 \pm 1.4\%$ de disminución respectivamente).



2.3. Discusión

En esta parte del presente trabajo nos planteamos evaluar las posibles diferencias que la autoadministración de cocaína podría producir en la expresión de los mRNA de la TH y el H₃R. Estudiando 10 animales (5 controles y 5 autoadministración) hemos visto que en la SNc y la VTA no existen diferencias significativas tanto en el número de neuronas TH positivas como en el porcentaje de colocalización TH-H₃R en neuronas TH positivas. Sin embargo, se ha visto por Western blot, que el nivel de proteína TH se encuentra aumentado en la VTA 24h después de la autoadministración crónica de cocaína (Lu et al. 2003). Dicho incremento podría deberse a un aumento del nivel de la proteína en las neuronas o a un mayor número de neuronas que expresen el mRNA y traduzcan la proteína. En este trabajo hemos descartado esta última opción pues en

nuestros animales (en los que cabe esperar ese incremento de niveles de proteína TH dado que han sido sacrificados un día después de su última autoadministración) no se observan diferencias en el número de neuronas positivas para el mRNA de la TH. Así pues, no sabemos si los resultados de Lu et al. y otros autores se deben a un incremento de la expresión del mRNA por neurona, de la traducción de la proteína o a una disminución de su degradación. Además, el aumento de TH en la VTA desaparece pocos días después de la autoadministración por lo que su relevancia de cara al fenómeno de la adicción, que perdura largo tiempo después del consumo de drogas, es discutible, pudiendo estar relacionada con el inicio de la misma (Lu et al., 2003).

Del mismo modo, no hemos observado diferencias en el porcentaje de colocación TH-H₃R en la región de la SNc/VTA pues tanto en los animales que se autoadministraron como en los animales control dicho porcentaje es de prácticamente el 100% de las neuronas TH positivas. Esto nos permite descartar que, debido al consumo de cocaína, en esas regiones haya un distinto número de neuronas dopaminérgicas que expresen el mRNA del H₃R. Continuando en esta línea de trabajo, hemos llevado a cabo una semicuantificación del mRNA del H₃R empleando la sonda marcada radiactivamente, lo que permite detectar la señal con mejor linealidad que el sistema Anti-DIG-POD/TSA. De forma preliminar hemos obtenido una disminución significativa de los niveles de mRNA del H₃R de aproximadamente un 10% en las regiones estudiadas (estriado, Acb y córtex) de animales que se habían autoadministrado. Este resultado es consistente con un pequeño descenso del *binding* del H₃R hallado en el córtex prefrontal por nuestros colaboradores (M. Humbert-Claude et al, no publicado), mediante autorradiografía. Sin embargo, en un estudio (llevado a cabo por otros colaboradores) de *binding* con R-alfa-metilhistamina (agonista H₃R) no se hallaron variaciones debidas a la autoadministración de cocaína en las constantes de afinidad ni en la unión máxima del receptor H₃. Es posible que la técnica de *binding*, al requerir mayor cantidad de tejido, haya diluido el pequeño efecto que hemos observado en regiones relativamente pequeñas. También sería posible que exista una compensación por parte de los mecanismos de traducción del mRNA y/o de degradación de la proteína. Finalmente no hay que olvidar el carácter preliminar de los diferentes estudios realizados y la pequeña magnitud (10%) de los resultados. Sea como

fuere, estas regiones son importantes para el mecanismo de la recompensa, especialmente el núcleo accumbens. Por ello, la disminución de la expresión del receptor en estas áreas podría estar relacionada con la alteración de la función dopaminérgica debida a la cocaína. Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos llevan a pensar en el H₃R como una buena diana para la búsqueda de fármacos contra la autoadministración de cocaína teniendo en cuenta que, tal y como se ha explicado, el agonista H₃ imetit retrasa el inicio de la autoadministración e inhibe la síntesis de dopamina.

2.4. Conclusiones del capítulo 2

- 2.4.1. La autoadministración de cocaína no altera significativamente el número de neuronas TH positivas en la SNc y la VTA (**Fig. 50**).
- 2.4.2. Del mismo modo, el porcentaje de neuronas TH positivas que expresan el mRNA del receptor H₃ de histamina no se ve modificado (**Fig 51**).
- 2.4.3. Se observa una pequeña disminución estadísticamente significativa de la expresión del mRNA del H₃R después de la autoadministración crónica de cocaína (**Fig 52**).

Capítulo 3: Regulación de la tirosina hidroxilasa por retroinhibición de la dopamina en miniprismas de núcleo estriado.

3.1. Objetivos

Las técnicas histológicas, como la inmunohistoquímica fluorescente o la FISH, permiten conocer la distribución de las moléculas estudiadas y sentar así una base para su posible interacción. Sin embargo, la propia naturaleza de estas técnicas no permite el estudio de su interacción a nivel bioquímico o molecular (por ej. que dos receptores colocalicen en la misma neurona no implica que formen un heterómero), así como el estudio de la función de las moléculas analizadas. Por su parte, la determinación de la síntesis de dopamina aporta datos funcionales careciendo así de estas limitaciones. Presenta, además, la ventaja de ser una técnica sencilla en comparación con el procedimiento de autoadministración de cocaína, mucho más complejo aunque de gran valor como modelo de adicción.

El estudio del efecto de nuevos fármacos sobre la síntesis de dopamina podría permitir desarrollar tratamientos farmacológicos que modifiquen conductas adictivas. Sin embargo, durante la búsqueda de fármacos que afectasen ambos procesos, nos hallamos frente a un efecto inesperado de disminución de la síntesis de dopamina dependiente del tiempo de incubación. Dicha disminución semejaba un potente efecto retroinhibidor de la dopamina recién sintetizada sobre la tirosina hidroxilasa. Estudios anteriores en este tema habían sido llevados a cabo mayoritariamente con proteína recombinante pero apenas había buenas descripciones de retroinhibición por dopamina en tejido cerebral. Por ello, nos planteamos:

- **Comprobar si existe el efecto de retroinhibición de la dopamina sobre la TH *ex vivo* en miniprismas de estriado.** Para lo cual nos propusimos descartar la degradación y la defosforilación como causantes de la disminución observada en la velocidad de síntesis de dopamina a lo largo del tiempo.

- **Analizar si la adición de dopamina exógena o la acumulación de dopamina endógena permite observar el efecto de retroinhibición.** La acumulación de la dopamina endógena se ha estudiado gracias a la inhibición del transportador vesicular de monoaminas.

Una vez confirmado que el efecto retroinhibidor de la dopamina estaba actuando en nuestras muestras y en base a teorías *in vitro* que proponen la fosforilación como el único modo de revertir el efecto de retroinhibición, nos planteamos:

- **Determinar si la fosforilación de la tirosina hidroxilasa en la Ser40 modula el efecto causado por la dopamina.**
- **Analizar el efecto de la dopamina o de la fosforilación sobre la afinidad del cofactor BH₄ por el enzima.**

3.2. Resultados

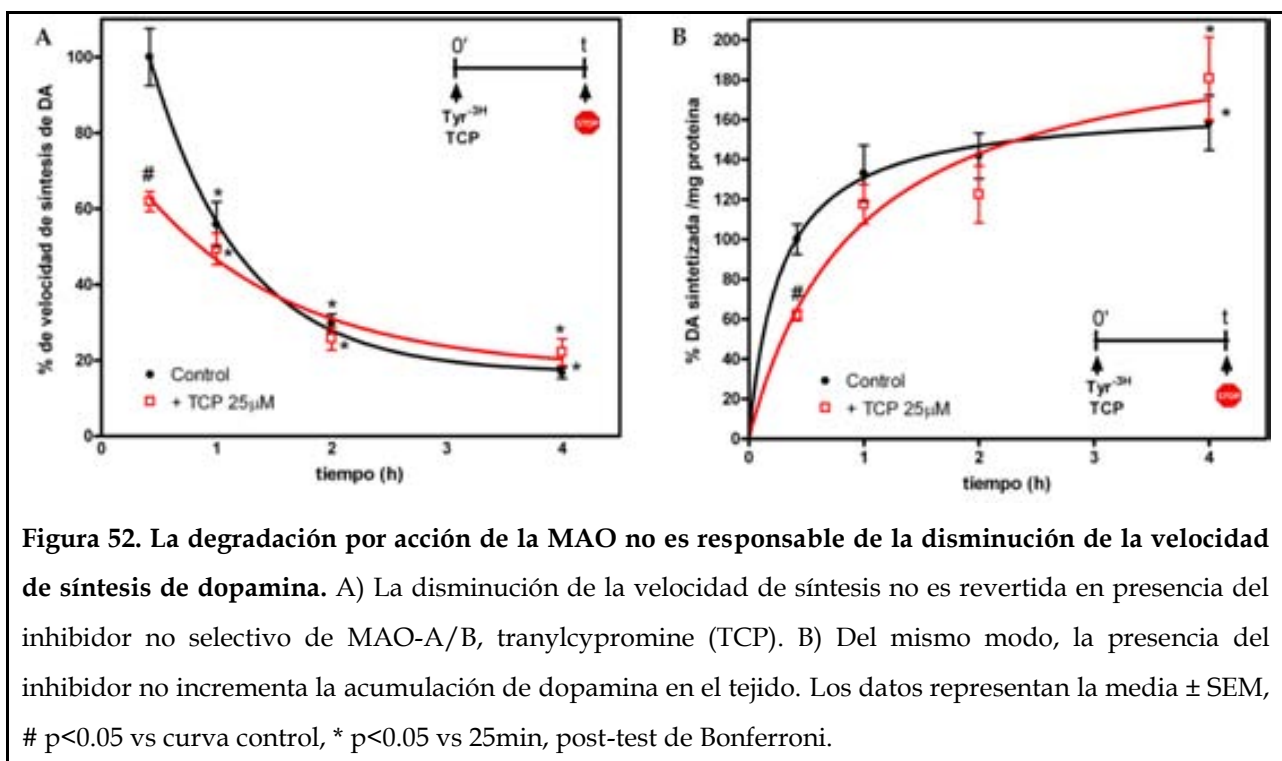
La mayor parte de los resultados de este capítulo forman parte del artículo que constituye el apartado 3.2.1 de esta sección. Los experimentos de western-blot y algunos experimentos de síntesis de L-DOPA en miniprismas han sido llevados a cabo por otros miembros del grupo de investigación.

3.2.1. La degradación por acción de la MAO no es responsable de la disminución de la velocidad de síntesis de dopamina durante el tiempo de incubación.

Como ya se ha comentado, el agonista H₃ imetit disminuyó la síntesis de dopamina y aumentó la latencia en el reinicio de la autoadministración. Esta coincidencia nos impulsó a testar nuevos fármacos primero sobre la síntesis de dopamina (como se ha explicado, la dopamina juega un papel importante en el mecanismo de la recompensa) para luego aplicarlos durante el procedimiento de autoadministración.

Durante la experimental nos dimos cuenta de que, sorprendentemente, la velocidad de síntesis de dopamina disminuía significativamente a lo largo de tiempo de incubación (**Fig. 52A, línea negra**) y de que su acumulación se estabilizaba (**Fig. 52B, línea negra**). En un primer momento nos planteamos que estos efectos fuesen debidos a la degradación de la dopamina por la acción de la MAO. Para descartar esta posibilidad los miniprismas se incubaron en presencia de 25 μ M de tranilcipromina (TCP, inhibidor no selectivo de la MAO A y B). Tal y como muestra la (**Fig. 52, línea roja**), dicho inhibidor no revierte la disminución observada en la velocidad de síntesis de dopamina ni incrementa la acumulación de la misma a lo largo del tiempo.

Es más, si algún resultado se pudiese atribuir a la tranilcipromina, sería una pequeña disminución de la síntesis inicial de dopamina. La interpretación más sencilla de estos resultados podría ser que la acumulación de dopamina retroinhibe su propia síntesis, tal y como ha sido estudiado *in vitro* (Ribeiro et al., 1992; Ramsey et al., 1998; Gordon et al., 2008)



3.2.2. ARTÍCULO 2: Dual regulation of brain striatal dopamine synthesis by enzymatic end-product feedback inhibition. (enviado a Journal of Neuroscience)

Marta González-Sepúlveda, Santi Rosell-Vilar, Carlos Ruiz-Arenas, Josefa Sabriá, Jordi Ortiz * and David Moreno-Delgado

Abstract

Dopaminergic neurons play an important role in Parkinson's disease, psychosis, and addiction. Dopamine biosynthesis is rate-limited by tyrosine hydroxylase activity, which can be modified by phosphorylation and/or by dopamine in a process called end-product feedback inhibition. *In vitro* studies have shown that tyrosine hydroxylase has two binding sites for dopamine inhibitory effects: a high affinity site (regulated by phosphorylation) and a low affinity site. When studying dopamine biosynthesis in rat brain striatal miniprisms we observed a decay of the velocity in control tissue suggestive of end-product feedback inhibition by newly formed dopamine. Here we report that: a) tyrosine hydroxylase is strongly inhibited by newly formed dopamine during incubation of striatal miniprisms *ex vivo*, b) increasing extracellular or intracellular dopamine (by inhibition of the vesicular transporter) inhibits tyrosine hydroxylase activity in a clear dose-dependent manner to an almost complete stop, c) tyrosine hydroxylase activation by phosphorylation is only reduced by the highest dopamine concentrations, suggesting a dual action of dopamine at high- and low affinity sites, and d) as expected the high affinity site appears to be regulated by physiological dopamine and by phosphorylation through changes in the affinity for the tetrahydrobiopterin cofactor. Activation by phosphorylation would lead to cofactor binding to the high-affinity site unless high dopamine concentrations have been reached. Physiological, probably lower dopamine concentrations could still inhibit tyrosine hydroxylase independently of its phosphorylation state.

Introduction

Tyrosine hydroxylase (TH; tyrosine 3-monooxygenase; E.C. 1.14.16.2) is the first and rate-limiting enzyme in dopamine biosynthesis. Regulation of its activity is thought to be crucial to maintain dopamine levels, so permanent changes may turn in physiopathological phenotypes. It has been characterized that mutations or deletions in the TH gene can cause dopa-responsive dystonia or early-onset and adult parkinsonism (Furukawa et al., 2001; Hertz et al., 2006; Bademci et al., 2010). Pharmacological regulation of TH activity has also been described: notably, exposure to drugs of abuse changes phosphorylation and enzyme levels (Jedynak et al., 2002). Abused drugs increase dopamine release in several brain areas (Di Chiara and Imperato 1988), which activates D₂-like autoreceptors inhibiting dopamine synthesis and firing rate. In addition, it has been recently reported that D₁/D₅ receptors mediate reversal of dopamine inhibition of firing rate (Nimitvilai and Brodie 2010). Thus, the study of dopaminergic regulatory mechanisms in tissue still has open questions that need to be considered to design novel therapies to treat dopamine associated pathologies.

TH activity is modulated by a long-term regulation of gene expression as well as by short-term regulation of enzyme activity such as end-product feedback inhibition or phosphorylation (Kumer and Vrana 1996). Changes in TH phosphorylation state are usually considered as critically involved in the regulation of dopamine synthesis (Haycock JW and Haycock DA 1991). TH can be phosphorylated at several serine residues by diverse protein kinases such as PKA, ERK or CaMKII, and it can be dephosphorylated by PP2A and PP2C protein phosphatases. In particular, an increase in the phosphorylation of Ser40 induces TH activity, thereby stimulating synthesis of neurotransmitter (Harada et al., 1996; Lindgren et al., 2000; Jedynak et al., 2002). In contrast Ser19 does not directly potentiate TH activity, but it increases the rate of phosphorylation of Ser40 (Dunkley et al., 2004; Bevilaqua et al., 2001). Modulation of TH activity by phosphorylation has been extensively investigated *in vitro*. However it is less clear what regulatory mechanisms could be more important *in vivo*, where other factors including end-product feedback inhibition should be present.

Previous works with recombinant TH have suggested the existence of at least two dopamine binding sites in TH (Gordon et al., 2008): a high affinity site (K_d 4nM), from which dopamine could only be dissociated from the enzyme by Ser40 phosphorylation (Daubner et al. 1992, Nakashima et al., 2009), and a low affinity binding site (K_d 90nM) from which dopamine is readily dissociable. Dissociation of dopamine from the low-affinity binding site increases TH activity in both the non-phosphorylated and pSer40 forms of the enzyme. Moreover, the main alteration in TH upon Ser40 phosphorylation is a change in K_d value for catecholamines, leading to a lower affinity for dopamine (Daubner et al., 2011). Thus, end-product feedback inhibition might be a key regulatory mechanism unifying signaling inputs leading to phosphorylation, and a dopamine level sensor under any conditions. However, feedback inhibition in brain tissue has not been well characterized. After some initial classic studies (Javoy et al., 1972; Costa and Meek, 1974; reviewed by Kumer and Vrana 1996), only some computational analysis pointed out the potential importance of this feedback inhibition mechanism as the first principle to control cytosolic dopamine levels in basal and depolarized neurons (Wallace LJ 2007; Wallace and Hughes 2008). The study of end-product feedback inhibition in tissue is complex because of the unavoidable presence of endogenous dopamine bound to the enzyme at unknown amounts, which difficults to characterize the conditions of inhibition. Moreover, common methods to estimate tyrosine hydroxylase activity in brain tissue typically prevent dopamine formation by inhibiting L-DOPA-decarboxylase to measure L-DOPA accumulation, impairing to estimate actual feedback by dopamine.

During the course of a study of [3 H]-dopamine synthesis in rat brain striatal miniprisms we observed a consistent and spontaneous decay of the velocity in control tissue. We suspected end-product feedback inhibition by newly formed dopamine as causative of this effect. To test this hypothesis we improved radioisotopic methodology for [3 H]-dopamine synthesis determination and compared it to the prototypical estimation based on decarboxylase inhibition and L-DOPA accumulation. The effects of phosphorylating conditions, presence of dopamine and cofactor availability were also tested.

Material and Methods

Chemicals

Opti-Phase HiSafe-3 liquid scintillation cocktail was supplied by PerkinElmer Wallac (Turku, Finland). [3,5-³H]L-tyrosine (50 Ci/mmol), from the same supplier, was purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) before use as described (Purification of [³H]-Tyrosine standards). db-cAMP was obtained from Biolog Life Science Institute (Bremen, Germany). Okadaic acid was purchased from Merck Biosciences (Darmstadt, Germany). NSD-1015, EDTA, HPLC standards, and other reagents were purchased from Sigma/RBI (Steinheim, Germany).

Purification of [³H]-Tyrosine Standards

Ring-labeled [3,5-³H]-L-tyrosine (40–60 Ci/mmol) shows a decomposition rate of at least 1–3% per month, which generates unwanted by-products that must be separated before its incubation with tissue. The main goal of this purification is to maintain a high degree of purity and control specific activity of [³H]-tyrosine. The system used for HPLC purification consisted of a reverse-phase C18 column (Tracer Extrasil ODS2, 5- μ m particle size, 25 x 0.46 cm; Teknokroma, Spain) and a mobile phase with the following composition 100 mM sodium phosphate buffer, 1mM EDTA, 0.75 mM octanosulfonic acid and 1% (v/v) methanol (pH 3.4). The flow rate was 1 ml/min. Under these conditions, tyrosine eluted at 9–10 min. In each purification, 0.4mCi of [3,5-³H]L-tyrosine were injected into the HPLC and the whole tyrosine fraction (0.5–1 ml) was collected. The amount of [³H]-tyrosine was quantified against an external standard calibration curve of nonradiolabeled tyrosine detected by UV absorbance at 285 nm. An aliquot of the purified fraction was subjected to liquid scintillation counting to obtain specific activity of the purified product, as total dpm in the purified fraction divided by the amount of tyrosine UV detected.

Preparation and preincubation of striatal miniprisms

Protocols for animal handling were previously approved by the Ethics Committee for Human and Animal Research (Universitat Autònoma de Barcelona) in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Male Sprague-Dawley rats weighing 200-250 g (Animal Service, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain) were sacrificed by decapitation. Brains were chilled immediately in modified Krebs-Ringer-bicarbonate medium with the following composition: 120 mM NaCl, 0.8 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 0.67 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 27.5 mM NaHCO₃, and 10 mM glucose, pH 7.4. In a 4°C room, dorsal striata from both hemispheres were dissected and sliced using a McIlwain tissue chopper obtaining miniprisms of 0.3 x 0.3 mm/side. The miniprisms were suspended in ice-cold Krebs Ringer bicarbonate medium and washed by centrifugation and resuspension in order to remove debris of damaged cells. Striatal tissue from a single rat allowed obtaining up to 28 aliquots (25 µl each) of the settled slice suspension corresponding to 24 incubations and 4 blank samples. Blank tubes were kept on ice and the rest were distributed into 2-ml polypropylene tubes and incubated at 37 °C in an Eppendorf Thermomixer (5 Prime, Inc., Boulder, CO) under 95% O₂/5% CO₂ atmosphere. Samples were preincubated from 0 to 4 hours depending on the experiment. Preincubation is intended to reactivate metabolism of the different samples.

[³H]-Dopamine synthesis

Purified [³H]-tyrosine was added to all samples at the end of preincubation time to a final concentration of 0.12 µM and afterwards they were incubated for 10 min to synthesize [³H]-dopamine. In experiments where drugs were needed, they were added during preincubation period. [³H]-dopamine synthesis was stopped by the addition of a deproteinizing mixture containing trichloroacetic acid (1%) and 25nmol dopamine and 1mM ascorbic acid as internal standard. Samples were homogenized in a Dynatech/Sonic Dismembrator (Dynatech Labs, Chantilly, VA). An aliquot was taken for protein quantification by the Lowry method to take into account the variability of tissue amounts inside each tube. Tissue homogenates were then centrifuged (12,000 g, 10 min, 4 °C), and all supernatants were processed for [³H]-dopamine purification by HPLC-UV (as described below).

[³H]-Dopamine Purification by HPLC-UV

[³H]-Dopamine formed during the incubation reaction was separated from [³H]-tyrosine and purified by HPLC. The chromatography system consisted of a reverse-phase C18 column (Tracer Extrasil ODS2, 5-mm particle size, 25 x 0.46 cm; Teknokroma, Spain) and an ion-pair mobile phase, made up of 100mM sodium phosphate buffer, 1mM EDTA, 0,75 mM octanesulfonic acid plus 12% (v/v) methanol (pH 5). The flow rate was 1 ml/min. This HPLC system separates completely standards of tyrosine and dopamine detected by UV 285 nm (ring absorbance). Samples contain extremely low levels of radiolabeled tyrosine and dopamine that were undetectable by UV absorbance. Similarly, endogenous tyrosine and dopamine were negligible as compared to the amounts of internal standard dopamine used. The recovery of the internal standard in each sample (internal/external standard peak area) was quantified from dopamine HPLC-UV peak areas. Dopamine fractions were recovered in scintillation vials, mixed with Optiphase HiSafe III cocktail, and [³H]-dopamine was quantified in a liquid scintillation counter. Dpm obtained were corrected by dopamine internal standard recovery, dpm in blank samples, and protein content in each incubate. Results were expressed as percentage with respect to control samples in each experiment.

Tyrosine Hydroxylase kinetic curves in homogenates

Miniprism samples were treated as described above in *Preparation and preincubation of striatal miniprisms*. Tubes were placed on ice, centrifuged at 1000 g in order to settle miniprisms and Krebs-Ringer buffer was removed. Cold phosphate buffer 10mM pH 7.4 was added and samples were homogenized using a glass Potter homogenizer. 200µl of homogenates were distributed in incubation tubes and 100µM NSD-1015, 0.25µM [³H]-tyrosine, 20µM tyrosine and tetrahydrobiopterin (BH₄, at concentrations from 0 to 250µM) were added. After 30 min of incubation at 37°C samples were placed in an ice block and deproteinizing mixture (containing trichloroacetic acid and 25nmol L-DOPA as internal standard) was added. L-DOPA was purified by HPLC-UV, recovered in a scintillation vial and mixed with Optiphase HiSafe III cocktail (Wallac). Coeluted [³H]-L-DOPA was quantified using a scintillation counter. Dpm obtained were corrected by

L-DOPA internal standard recovery, dpm in blank samples, and protein content in each incubate. Results were expressed as percentage with respect to control samples in each experiment.

Estimation of tyrosine hydroxylase activity *in situ* by L-DOPA accumulation

Tyrosine hydroxylase activity in miniprisms of rat striatum was estimated using the method described by Lindgren et al, 2000 with slight modifications. Miniprisms were treated as *Preparation and preincubation of striatal miniprisms* and then treated with NSD-1015 (100 μ M) to inhibit L-aminoacid aromatic decarboxylase. After 30 min of incubation the accumulation of L-DOPA was quantified by HPLC. The stationary phase consisted of a reverse-phase C18 column (2.5 μ m particle Fortis C18, 100 x 4.6, Sugelabor, Spain) and an ion-pair mobile phase, made up of 100mM sodium phosphate buffer, 1mM EDTA, 5 mM octanesulfonic acid plus 1% (v/v) methanol (pH 2.5). The flow rate was 1 ml/min. This HPLC system completely separated standards of tyrosine, L-DOPA and dopamine that were detected by a coulometric detector (Coulchem II; ESA) with a detection limit of 0,2nmol for L-DOPA. Standards of L-DOPA at different concentrations (4-40nmol) were injected in every experiment to quantify L-DOPA in miniprisms by the external standard method. Fmols of L-DOPA in samples were corrected by fmols present in blank samples and protein content in each incubate. Results were expressed as percentage versus control samples in each experiment.

Western blot

Each sample was added 100 μ L of ice-cold lysis buffer made of 1 mM orthovanadate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaCl, 1% Triton X100, 50 mM sodium fluoride, 5 μ M zinc chloride, 2 mM DTT, phosphatase inhibitor cocktail 1 (Sigma) and protease inhibitor cocktail 1 (Sigma). Samples were sonicated on ice for 15 s and centrifuged (13000 g, 20 min, 4 °C). Supernatant protein concentration was determined by a modified Lowry's method where 30 μ L of 4% SDS was added 5 min prior to folin reagent to avoid interference with Triton X100 (Wang and Smith, 1975). Proteins were dissolved in denaturing loading buffer and boiled at 99 °C for 5 min. Equal amounts of protein (10 μ g) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-

polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Millipore), washed in phosphate buffered saline-0.05% Tween 20 (PBS-T) or Trizma buffered saline-0.05% Tween 20 (TBS-T), followed by blocking in 3% BSA dissolved in TBS-T. Primary antibodies were prepared in 1% BSA dissolved in TBS-T and incubated over night at 4 °C with gentle agitation. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were incubated at room temperature for 1 h. Antibody binding was detected by enhanced chemiluminescence (Millipore).

Immunoblotting was carried out using primary antibodies against: tyrosine hydroxylase (1:5000, AB1542, Chemicon) and tyrosine hydroxylase phosphoSer40 (1:4000, AB5935, Chemicon). Horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies used were goat anti-rabbit (1:1000, #7074 Cell Signaling) and donkey anti-sheep (1:3000, AP147P, Chemicon). A CCD camera (Gene Gnome Syngene Bio Imaging) was used to reveal chemiluminescence. Semi-quantitative analysis was performed by ImageJ (NIH image). Results were expressed in arbitrary units of optical density.

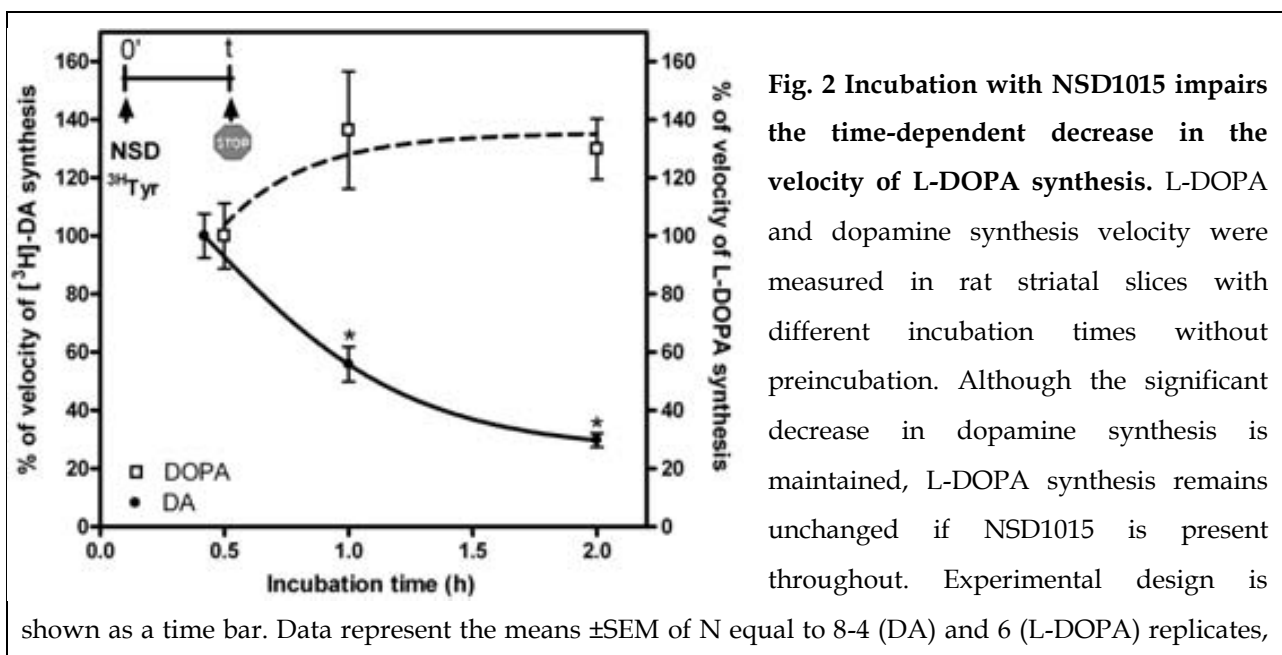
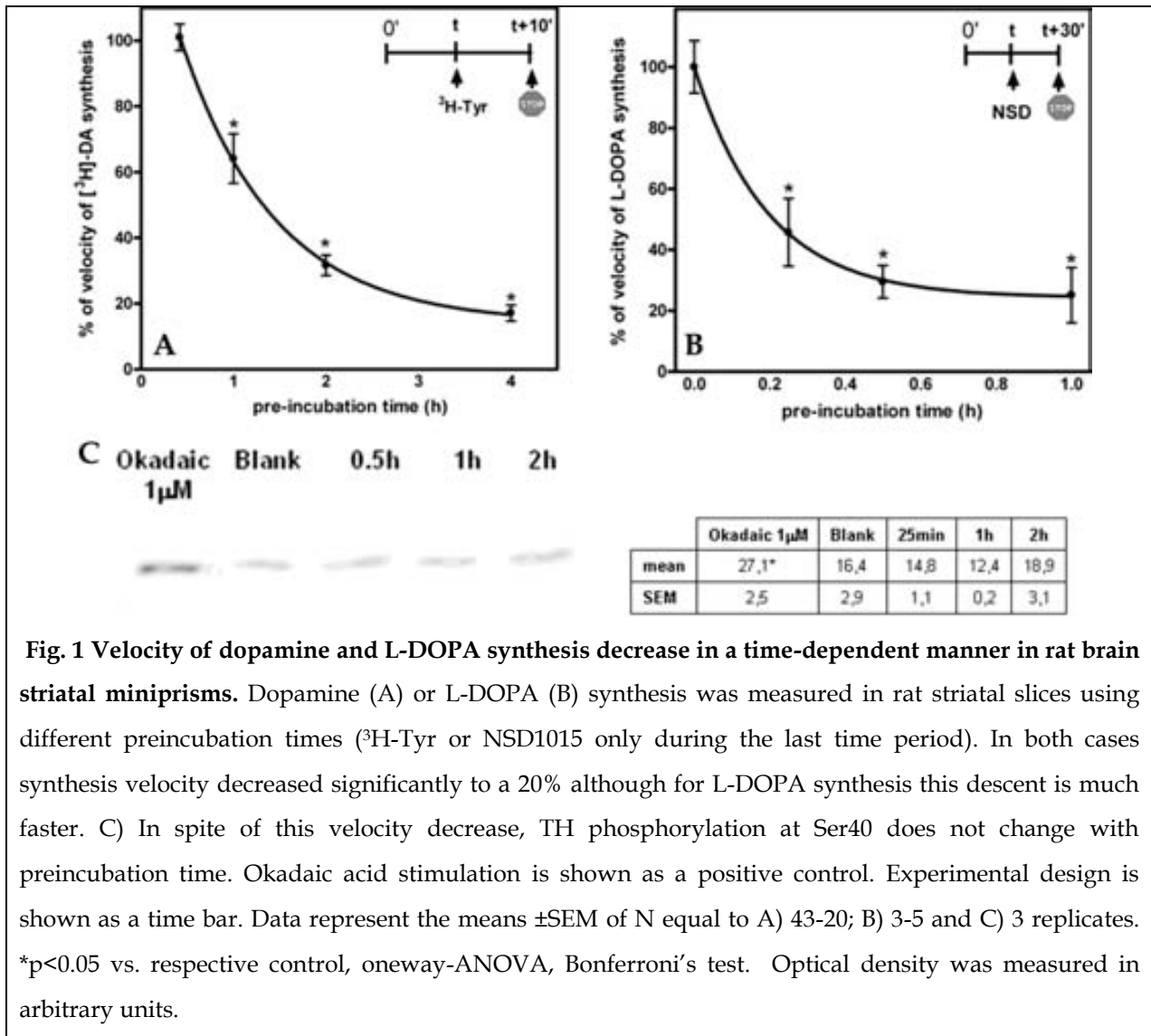
Statistical analysis

Statistical significance of differences between groups was assessed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc tests. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Effect of preincubation or incubation time in L-DOPA and dopamine syntheses.

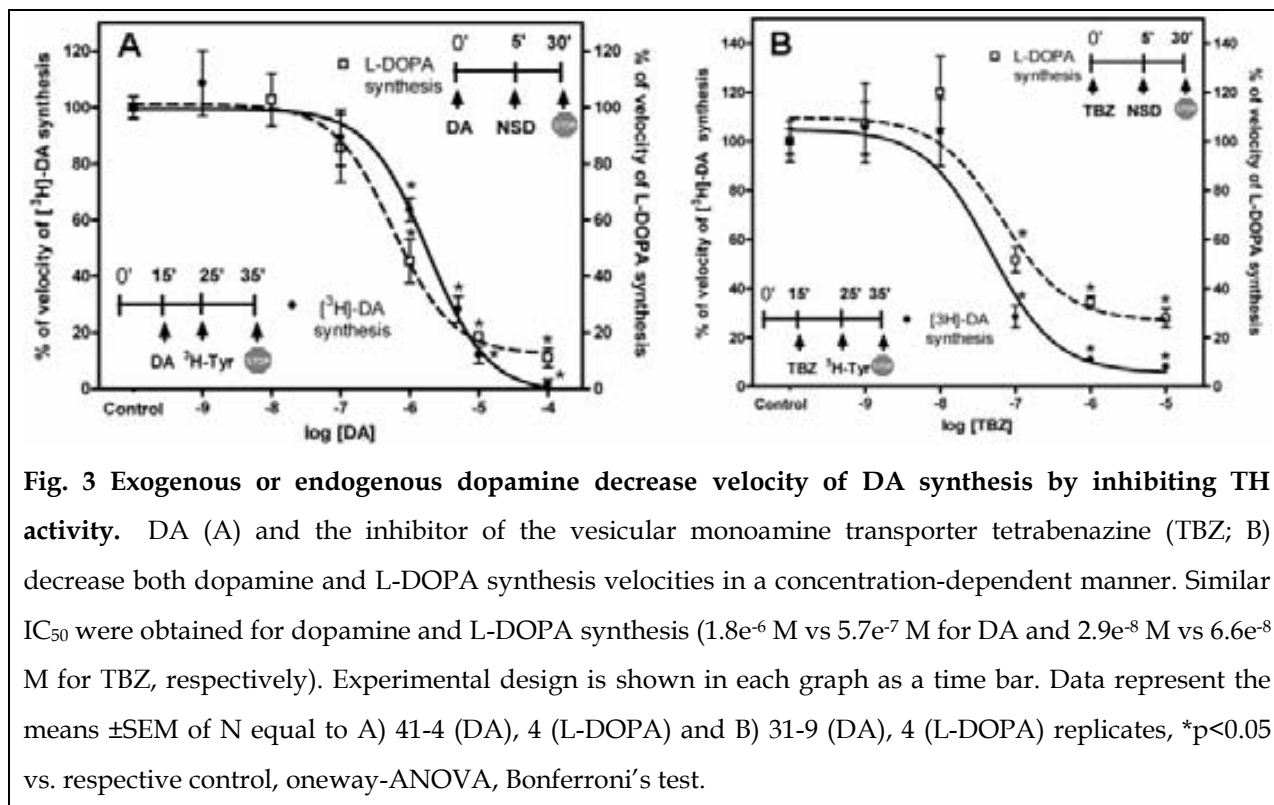
Tissue preincubation is frequently used to recover and to stabilize metabolism after sample processing in ice-cold buffer. We expected TH activity to increase during preincubation. However using preincubation times above 25 min we observed a significant reduction of [³H]-dopamine synthesis velocity (**Fig 1A**). This reduction of dopamine synthesis was consistently observed across experiments. To reaffirm this result we measured TH activity by L-DOPA accumulation after decarboxylase inhibition with NSD-1015, obtaining a parallel decrease with the same characteristics (**Fig 1B**). The latter result also discarded the possibility that degradation of newly formed [³H]-dopamine was the cause of the observed decrease. Nevertheless, we confirmed that monoamino oxidase inhibition did not suppress the observed decrease of the velocity of [³H]-dopamine synthesis (data not shown). Moreover, no modification of TH phosphorylation at Ser40 was detected (**Fig 1C**). Furthermore, the presence of D₂-like autoreceptor blockers such as haloperidol or sulpiride did not impair this decrease (data not shown). According to previous *in vitro* reports (Ramsey and Fitzpatrick 1998; Gordon et al., 2008) we suspected that TH activity might be decreasing due to the accumulation of newly formed dopamine which would exert end-product feedback inhibition on the TH enzyme. Reports of such effect have been hardly obtained in brain tissue (Javoy et al., 1972; Costa and Meek, 1974), although it is well characterized in recombinant TH and other cells (Kumer and Vrana 1996; Daubner et al., 2011). In order to observe if feedback inhibition could be responsible of such decrease, we incubated samples with [³H]-Tyr or NSD-1015 for different times without preincubation. In the presence of NSD-1015 no new dopamine should be formed. The velocity of [³H]-dopamine synthesis decayed exactly in the same way as did in previous preincubation experiments (**Fig 2**, continuous line). However the velocity of L-DOPA synthesis remained constant versus incubation time (**Fig 2**, discontinuous line). These results strongly suggest that *de novo* dopamine synthesis, impaired when NSD-1015 was present from the beginning, is responsible of end-product inhibition of TH.



* $p < 0.05$ vs. respective control, Oneway-ANOVA, Bonferroni's test.

Cytosolic dopamine inhibits [^3H]-dopamine and L-DOPA synthesis.

Next, we increased the concentrations of dopamine. The addition of dopamine during incubation of striatal miniprisms decreased [^3H]-dopamine synthesis in a clear concentration dependent manner (Fig 3A, continuous line). This effect was caused by an impairment of TH activity, as confirmed by measuring L-DOPA accumulation. Similarly, the inhibitor of the vesicular monoamine transporter tetrabenazine (TBZ) also inhibited both [^3H]-dopamine synthesis (Fig 3B, continuous line) and TH activity. Since TBZ impairs dopamine storage in vesicles, the effect of TBZ should be due to dopamine accumulation in the cytoplasm.



Modulation of end-product inhibition by stimulation of TH phosphorylation

It is well known that PKA activators as well as inhibitors of protein phosphatases induce TH activity by phosphorylation in Ser40 (Haycock 1991). Phosphorylation also increases TH affinity for BH_4 and decreases dopamine occupation of the high affinity

dopamine binding site. Thus, we wondered if the previously observed decay on dopamine synthesis would be affected by TH phosphorylation. We observed that the time-dependent decay of dopamine synthesis attributed to end-product feedback inhibition during preincubation was similar in all conditions assayed (control, db-cAMP, and okadaic acid) (**Fig 4**). As expected, PKA activation and okadaic acid (an inhibitor of Ser/Thr protein phosphatases) increased initial TH activity. However the time-dependent decay observed had the same extent than control samples, despite the higher initial level of dopamine synthesis in phosphorylating conditions.

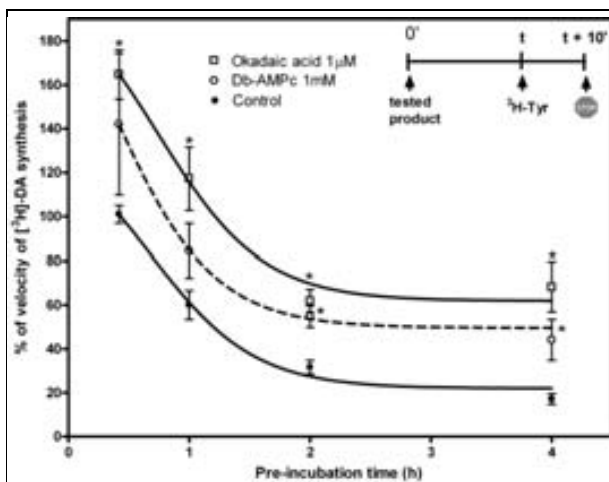


Fig. 4 Time-dependent decrease of dopamine síntesis does not depend on TH phosphorylation.

The PKA activator db-AMPC, and the phosphatase inhibitor okadaic acid increase DA synthesis velocity, but the pattern of time-dependent inhibition is maintained. Experimental design is shown as a time bar. Data represent the means \pm SEM of N equal to 43-20 (control), 23-4 (okadaic) and 19-3 (db-AMPC) replicates. Every data group

was statistically significant vs. its 25 minute value; * $p < 0.05$ vs. control curve, oneway-ANOVA, Bonferroni's test.

Okadaic acid effects were also assayed in presence of increasing concentrations of dopamine. Although, as expected, okadaic acid initially enhanced $[^3\text{H}]$ -dopamine synthesis in control samples, this effect was progressively lost when increasing concentrations of exogenous dopamine were added (**Fig 5**). Similar results were obtained using TBZ to increase cytoplasmatic dopamine concentrations (data not shown).

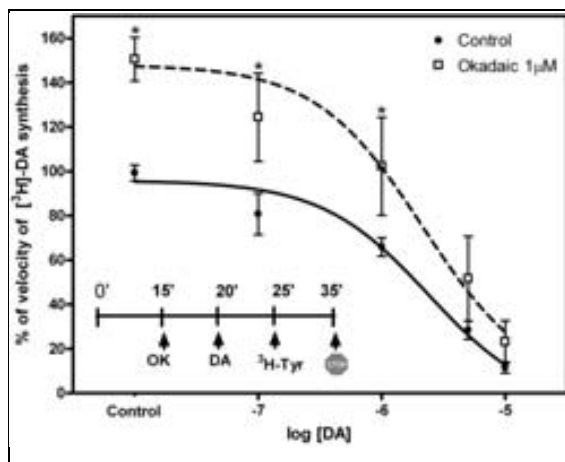
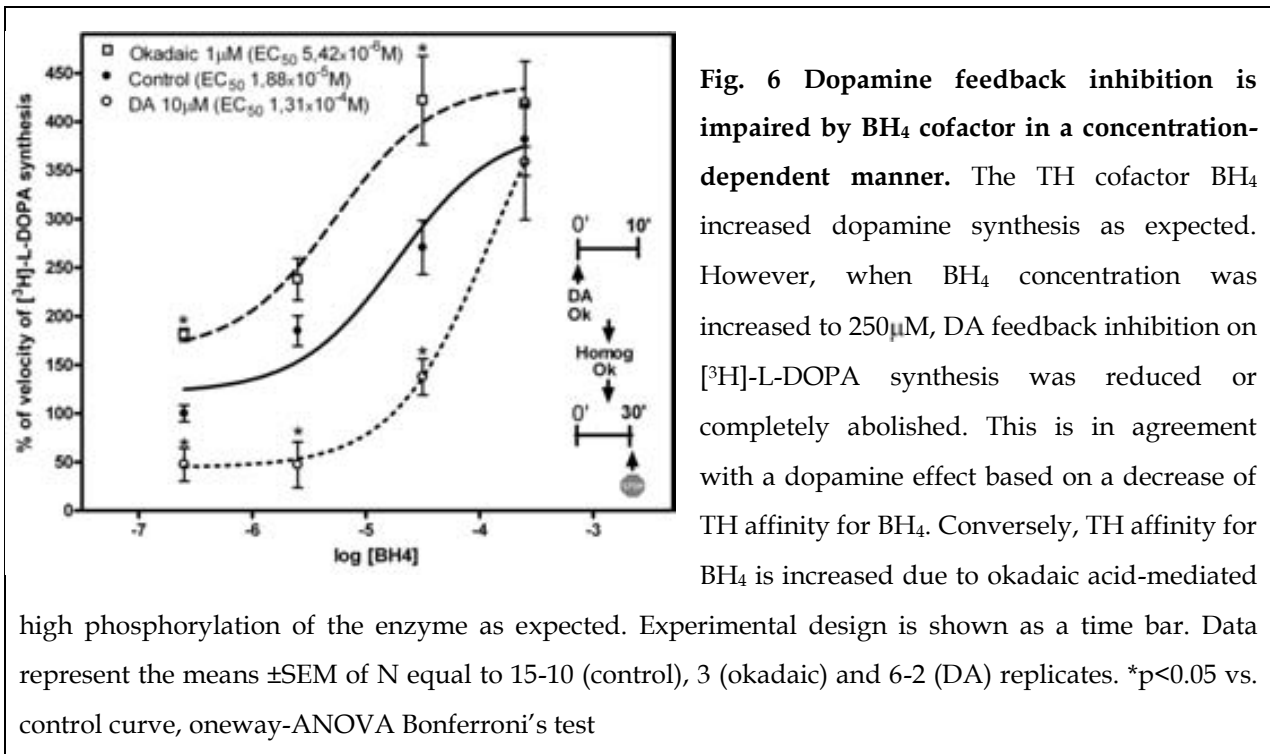


Fig. 5 Dopamine feedback inhibition reduces okadaic acid effect on dopamine synthesis. Although okadaic acid enhances velocity of DA synthesis in control conditions, this effect is lost as DA concentration increases. Experimental design is shown as a time bar. Data represent the means \pm SEM of N equal to 40-16 (control) and 38-6 (okadaic) replicates. * $p < 0.05$ vs. control curve, oneway-ANOVA, Bonferroni's test.

TH kinetics vs. BH₄ is affected by dopamine and okadaic acid

To assess whether our previous results could be due to a change in the kinetics of TH related to BH₄, after incubation of tissue miniprisms in the presence of dopamine or okadaic acid we homogenized them and reincubated the homogenates with increased BH₄ concentrations (see *Tyrosine Hydroxylase kinetic curves in homogenates*). We performed this assay by measuring [³H]-L-DOPA accumulation in the presence of NSD-1015 to specifically determine TH activity in homogenates. As expected, with no BH₄ added, TH activity in homogenates was increased by previous addition of okadaic acid, and decreased by previous addition of dopamine to tissue miniprisms. In all cases, addition of BH₄ resulted in increased TH activity in homogenates. Notably, when dopamine had been added, a higher K_m of TH for BH₄ was observed (control EC₅₀ 1.88x10⁻⁵ M vs. DA EC₅₀ 1.31x10⁻⁴ M). Conversely, when TH was phosphorylated due to previous addition of okadaic acid, K_m for BH₄ decreased (control EC₅₀ 1.88x10⁻⁵ vs. okadaic acid EC₅₀ 5.42x10⁻⁶). In the presence of 250 μM BH₄ no statistically significant differences were observed between control, dopamine and okadaic acid treatment groups (Fig 6). These results would agree with dopamine- and phosphorylation effects being mediated by changes in affinity for the BH₄ cofactor.



Discussion

The unexpected observation of a time-dependent decay of the velocity of dopamine synthesis facilitated to characterize end-product feedback inhibition in brain striatal tissue. Although this could be the main mechanism regulating cytosolic dopamine levels, literature descriptions in brain samples were limited to few classic papers and indirect proofs (Javoy et al., 1972; Costa and Meek, 1974). We show that end-product feedback inhibition plays a central role on the regulation of tyrosine hydroxylase activity by phosphorylation and by physiological dopamine concentrations.

We have exploited the methodological advantage of our highly sensitive radioisotopic technique which determines [3H]-dopamine synthesized during a relatively short period of time. Nevertheless, equivalent results have been obtained with the classical L-DOPA accumulation assay performed in parallel as described by Lindgren et al., 2000 in striatal slices. Using both techniques we observed a decrease of the velocity of synthesis when preincubation times increased. However no such decrease was observed when we inhibited L-DOPA decarboxylation from the start to

completely block dopamine formation, pointing out to the inhibitory effect of newly synthesized dopamine. Furthermore, TH phosphorylation in Ser 40 remained constant versus time, suggesting that a phosphorylation-independent inhibition was present in tissue. In fact, blockade of either D₂-like autoreceptors or monoamino oxidase did not impair the decrease of the velocity of synthesis, ruling out other possibilities.

End-product feedback inhibition has been well described *in vitro* using recombinant TH (Ribeiro et al., 1992; Ramsey et al., 1998; Gordon et al., 2008). Its importance in brain has been hypothesized, but proofs of its relevance are limited to classic papers (Javoy et al., 1972) or results obtained in other tissues and cell types easier to work with (Costa and Meek, 1974; Kumer and Vrana 1996). Our results show that TH is strongly regulated by end-product feedback inhibition in striatal tissue under conditions as close as possible to physiological, with tissue manipulation restricted to chopping and washing in Krebs buffer.

Computational analyses predict that cytosolic dopamine concentration in dopaminergic terminals is extremely regulated by dopamine inhibitory control on TH as well as by the velocity of transport into vesicles (Wallace 2007). Once dopamine is stored into vesicles, it can be released to the synaptic cleft and subsequently reuptaken by the dopamine transporter into cytosol, participating again in TH regulation by end-product feedback inhibition. This mechanism might potentially limit secondary waves of synthesis and release independently of D₂-like autoreceptors. In agreement, inhibition of the vesicular transporter elicits similar curves of end-product feedback inhibition than extracellularly added dopamine. Feedback inhibition could be the key regulator of dopamine synthesis, facilitating crosstalk with release mechanisms and phosphorylation regulated by D₂-like autoreceptors.

TH phosphorylation by PKA in Ser40 or inhibition of protein phosphatases increases enzymatic velocity (Haycock et al., 1991). In agreement we show that PKA stimulation by dbcAMP or phosphatase inhibition by okadaic acid increases TH activity. Although end-product feedback inhibition still occurs, when striatal miniprisms were treated with dbcAMP or okadaic acid the steady-state dopamine level

reached must be higher than basal conditions. *In vitro* studies have demonstrated that tyrosine hydroxylase activity is regulated by two different dopamine binding sites, a high affinity (K_d 4nM) and a second low affinity site (K_d 90nM). Moreover, TH phosphorylation in Ser40 alters dopamine binding to the high affinity site only (Ribeiro et al., 1992; Ramsey et al, 1998). Dopamine is still able to inhibit TH activity by binding to the low affinity site, which has been proposed as the physiological dopamine sensor of TH (Gordon et al., 2008; Gordon et al., 2009). Our results in striatal tissue completely agree with these *in vitro* data as long as we observe independent effects of phosphorylation (probably at the high-affinity site) and newly formed dopamine (at the low-affinity site; Fig. 4). This agrees with the view that phosphorylation in Ser40 increases TH activity through relief from already bound dopamine inhibiting TH at the high-affinity site. Binding reports suggest that this relief occurs by increasing the K_d of TH for dopamine binding to a site that overlaps the BH4 cofactor binding site (Fujisawa and Okuno 2005).

In incubations of brain tissue it is difficult to know which dopamine binding sites are occupied in each assayed condition because of the presence of endogenous dopamine. However, taking into account physiological levels of dopamine lower than 100nM (Mosharov et al., 2006), Gordon et al. (2008), suggested that the high affinity binding site might be completely occupied by dopamine, while the low affinity binding site would be able to respond to an increase of cytosolic dopamine concentrations (Fig. 7, step 1). Our results are in agreement with this suggestion. First, dopamine synthesis quickly decreases after a cytosolic dopamine increase (Fig. 7, step 4), and inhibition is maintained as long as cytosolic dopamine remains increased. Physiological dopamine levels must be similar to those obtained during our preincubation, as no new tyrosine was added (except for 0.12 μ M [3 H]-tyrosine in some experiments). Maximum inhibition appears at 2 hours, and then dopamine synthesis is stabilized (Fig. 1). Second, TH phosphorylation by PKA activators or induced by okadaic acid initially increase dopamine synthesis but they do not change the time-dependent pattern of end-product feedback inhibition. This suggests that the observed pattern is caused by binding of dopamine to the low affinity binding site of TH, while phosphorylation reliefs dopamine binding from its high affinity site (Fig. 7, step 2).

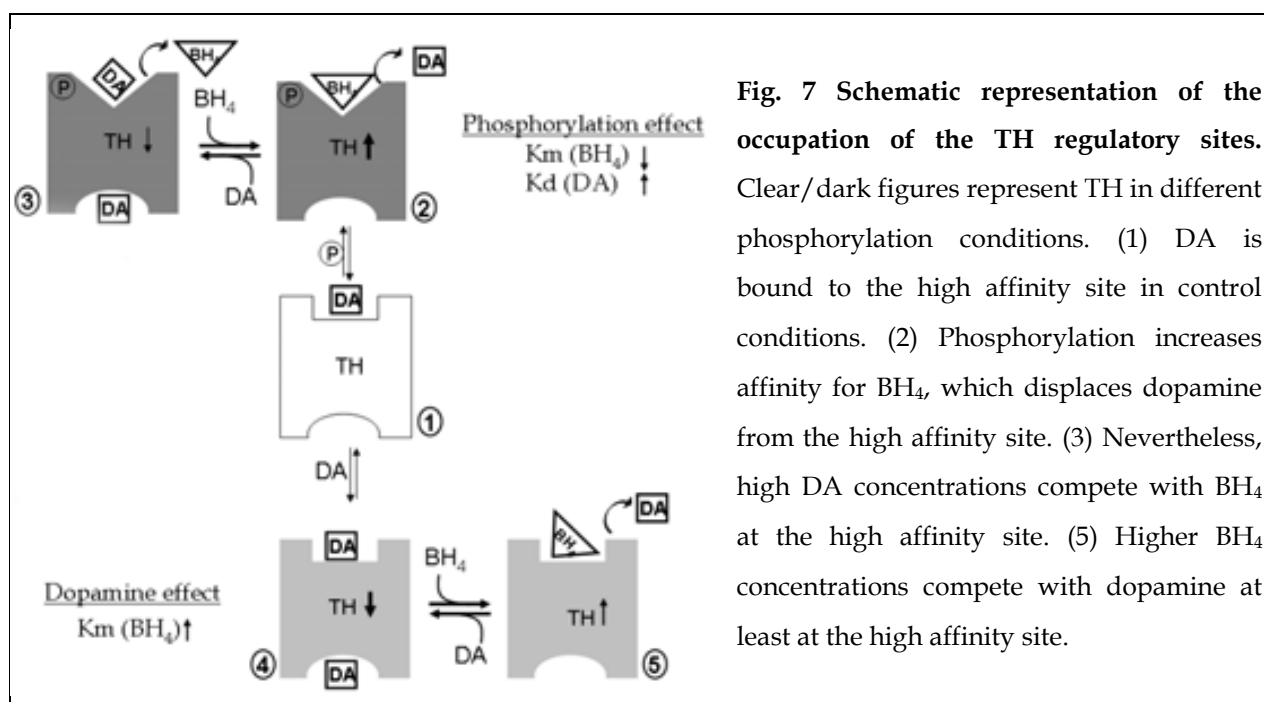


Fig. 7 Schematic representation of the occupation of the TH regulatory sites. Clear/dark figures represent TH in different phosphorylation conditions. (1) DA is bound to the high affinity site in control conditions. (2) Phosphorylation increases affinity for BH₄, which displaces dopamine from the high affinity site. (3) Nevertheless, high DA concentrations compete with BH₄ at the high affinity site. (5) Higher BH₄ concentrations compete with dopamine at least at the high affinity site.

It is thought that the effect of phosphorylation on TH activity can only be reversed by dephosphorylation by protein phosphatases. However, we show that the increase of dopamine synthesis elicited by okadaic acid can be reversed by end-product feedback inhibition. In Fig 5, the okadaic acid effect on [³H]-dopamine synthesis decreases at high dopamine concentrations (5-10 μM), which suggests that BH₄ can be displaced from its binding site due to the high amount of dopamine applied (Fig. 7, step 3). Conversely, dopamine could be displaced out of the high-affinity site by increasing concentrations of BH₄ (Fig. 6 and Fig. 7, step 5). Even though such high levels of cytosolic dopamine might not be physiologically reached, this result agrees with previous suggestions that the main change in phosphorylated TH is the decrease of the affinity for dopamine to a site overlapping with the BH₄ site (Daubner et al., 2011).

Dopamine binding to the high affinity site should inhibit TH by increasing the apparent Km for BH₄ and decreasing Vmax, whereas dopamine binding to the low affinity binding site should only increase Km for BH₄. In agreement, TH phosphorylation stimulated by okadaic acid decreased Km for BH₄ while the opposite was observed by adding dopamine (Fig. 6). No changes in Vmax were sought as tyrosine concentrations were not changed. In fact phosphorylation can expel dopamine

from the high affinity binding site but not dopamine strongly bound to the ferric iron at the catalytic site which could be responsible for the decrease in V_{max} (Okuno and Fujisawa 1985; Ribeiro et al., 1992).

In physiological conditions the high affinity binding site is probably occupied by dopamine and TH activity should be low. In this situation, cytosolic dopamine (exogenous, synthesised or reuptaken) should exert its inhibitory effect through the low-affinity binding site. Disregulation of inhibitory mechanisms on TH might lead to an increase of cytosolic dopamine levels, storage in vesicles, and higher dopamine release. It is known that different behavioral profiles such as impulsivity, novelty-seeking or emotional reactivity are associated (by cause or consequence) to differences in dopamine levels in particular brain areas (Moreno-Delgado et al., 2011; Colzato et al., 2010; Nemoda et al. 2011). Perhaps, understanding inhibition of dopamine synthesis could lead to new treatment strategies to modulate behavior.

In conclusion, end-product feedback inhibition by dopamine is a central mechanism integrating signals from different modulatory inputs on TH such as dopamine receptors, phosphorylation/dephosphorylation, dopamine storage into vesicles, and dopamine release. A highly regulated tyrosine hydroxylase activity guarantees normal function of dopamine neurotransmission.

Acknowledgements

Supported by Spanish government grants SAF2006-08240, SAF2009-12510 and Red de Trastornos Adictivos RD06/0001/0015. M.G.S. has received a spanish government FPI fellowship.

Bibliography

Bademci G, Edwards TL, Torres AL, Scott WK, Züchner S, Martin ER, Vance JM, Wang L. A rare novel deletion of the tyrosine hydroxylase gene in Parkinson disease. *Hum Mutat.* 2010 Oct;31(10):E1767-71.

- Bevilaqua L. R., Graham M. E., Dunkley P. R., von Nagy-Felsobuki E. I. and Dickson P. W. (2001) Phosphorylation of Ser(19) alters the conformation of tyrosine hydroxylase to increase the rate of phosphorylation of Ser(40). *J. Biol. Chem.* 276, 40411–40416.
- Colzato, L. S., van den Wildenberg, W. P., Van der Does, A. J., & Hommel, B. (2010). Genetic markers of striatal dopamine predict individual differences in dysfunctional, but not functional impulsivity. *Neuroscience*, 170(3), 782-788.
- Costa E, Meek JL. (1974) Regulation of biosynthesis of catecholamines and serotonin in CNS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 14: 491-511
- Daubner SC, Lauriano C, Haycock JW, Fitzpatrick PF. Site-directed mutagenesis of serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. Effects of dopamine and cAMP-dependent phosphorylation on enzyme activity. *J Biol Chem.* 1992 Jun 25;267(18):12639-46.
- Daubner SC, Le T, Wang S. (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2011 Apr 1;508(1):1-12.
- Di Chiara G, Imperato A Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic dopamine system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 85:5274–5278.
- Dunkley P. R., Bobrovskaya L., Graham M. E., von Nagy-Felsobuki E. I. and Dickson P. W. (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J. Neurochem.* 91, 1025–1043.
- Fujisawa H, Okuno S. Regulatory mechanism of tyrosine hydroxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 9;338(1):271-6. Epub 2005 Aug 10.
- Furukawa Y, Graf WD, Wong H, Shimadzu M, Kish SJ. Dopa-responsive dystonia simulating spastic paraplegia due to tyrosine hydroxylase (TH) gene mutations. *Neurology.* 2001 Jan 23;56(2):260-3.
- Gordon SL, Quinsey NS, Dunkley PR, Dickson PW. Tyrosine hydroxylase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. *J Neurochem.* 2008 Aug;106(4):1614-23. Epub 2008 May 31.

- Gordon SL, Webb JK, Shehadeh J, Dunkley PR, Dickson PW. The low affinity dopamine binding site on tyrosine hydroxylase: the role of the N-terminus and in situ regulation of enzyme activity. *Neurochem Res.* 2009 Oct;34(10):1830-7. Epub 2009 May 16.
- Harada, Wu J, Haycock JW, Goldstein M Regulation of L-DOPA biosynthesis by site-specific phosphorylation of tyrosine hydroxylase in AtT-20 cells expressing wild-type and serine 40-substituted enzyme.. *J Neurochem.* 1996 Aug;67(2):629-35.
- Haycock JW, Haycock DA. Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. *J Biol Chem.* 1991 Mar 25;266(9):5650-7.
- Hertz JM, Ostergaard K, Juncker I, Pedersen S, Romstad A, Møller LB, Güttler F, Dupont E. Low frequency of Parkin, Tyrosine Hydroxylase, and GTP Cyclohydrolase I gene mutations in a Danish population of early-onset Parkinson's Disease. *Eur J Neurol.* 2006 Apr;13(4):385-90.
- Javoy F, Agid Y, Bouvet D, Glowinski. Feedback control of dopamine synthesis in dopaminergic terminals of the rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther.* 1972 Sep;182(3):454-63.
- Jedynak JP, Ali SF, Haycock JW, Hope BT. Acute administration of cocaine regulates the phosphorylation of serine-19, -31 and -40 in tyrosine hydroxylase. *J Neurochem.* 2002 Jul;82(2):382-8.
- Kumer SC, Vrana KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem.* 1996 Aug;67(2):443-62.
- Lindgren N, Xu ZQ, Lindskog M, Herrera-Marschitz M, Goiny M, Haycock J, Goldstein M, Hökfelt T, Fisone G. Regulation of tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation at Ser(19) and Ser(40) via activation of glutamate NMDA receptors in rat striatum. *J Neurochem.* 2000 Jun;74(6):2470-7.
- Moreno-Delgado D, Rosell-Villar S, Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A and Ortiz J. P.2.026 Dopamine synthesis and release in Roman high and low avoidance inbred

rats. *European Neuropsychopharmacology* Volume 21, Supplement 1, March 2011, Page S55.

Mosharov, E. V., Staal, R. G., Bove, J., Prou, D., Hananiya, A., Markov, D., et al. (2006). Alpha-synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(36), 9304-9311.

Nakashima A, Hayashi N, Kaneko YS, Mori K, Sabban EL, Nagatsu T, Ota A. Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines. *J Neural Transm*. 2009 Nov;116(11):1355-62. Epub 2009 Apr 25.

Nemoda, Z., Szekely, A., & Sasvari-Szekely, M. (2011). Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*,

Okuno S, Fujisawa H. A new mechanism for regulation of tyrosine 3-monooxygenase by end product and cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1985 Mar 10;260(5):2633-5.

Ribeiro P, Wang Y, Citron BA, Kaufman S. Regulation of recombinant rat tyrosine hydroxylase by dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 15;89(20):9593-7.

Wallace LJ, Hughes RM. Computational analysis of stimulated dopaminergic synapses suggests release largely occurs from a single pool of vesicles. *Synapse*. 2008 Dec;62(12):909-19.

Wallace LJ. A small dopamine permeability of storage vesicle membranes and end product inhibition of tyrosine hydroxylase are sufficient to explain changes occurring in dopamine synthesis and storage after inhibition of neuron firing. *Synapse*. 2007 Sep;61(9):715-23

3.3. Conclusiones del capítulo 3

- 3.3.1. En miniprismas de núcleo estriado la dopamina sintetizada a lo largo del tiempo reduce drásticamente su velocidad de síntesis, en un mecanismo de inhibición por producto final (**Fig. 52** y **Fig. 1, 2** del artículo 2).
- 3.3.2. El estado de fosforilación de la tirosina hidroxilasa en Ser40 no altera el patrón temporal de retroinhibición a pesar de que produce un incremento general de la velocidad de síntesis de dopamina (**Fig. 3** del artículo 2).
- 3.3.3. El efecto de retroinhibición debido al incremento de dopamina (ya sea endógena o exógena) es dependiente de concentración y afecta tanto a la síntesis de dopamina como a la de L-DOPA con IC_{50} similares (**Fig. 4** del artículo 2).
- 3.3.4. La retroinhibición debida a concentraciones crecientes de dopamina no es contrarrestada mediante la fosforilación de la TH pero sí por concentraciones crecientes del cofactor del enzima, BH_4 (**Fig. 5 y 6** del artículo 2).
- 3.3.5. En condiciones basales, aunque el sitio de alta afinidad de unión de dopamina está ocupado, el enzima puede seguir respondiendo a cambios en la concentración de dopamina extracelular mediante el sitio de unión de baja afinidad (**Fig. 3 y 7** del artículo 2).
- 3.3.6. La dopamina establece una competición con el cofactor por el sitio de alta afinidad, el cual es afectado por la fosforilación. Esta facilita la unión del cofactor (incrementando su afinidad por el enzima) y dificulta la unión de la DA (**Fig. 7** del artículo 2).

DISCUSIÓN GENERAL

El sistema dopaminérgico juega un papel central en el control de las funciones límbica y motora, de tal modo que su disfunción participa en graves enfermedades como el Parkinson, la esquizofrenia o la adicción a las drogas de abuso. Sin embargo, en el desarrollo de estas patologías intervienen también otros sistemas de neurotransmisores que modulan la neurotransmisión de los ganglios basales. Los resultados previos en la literatura así como nuestra experiencia con el receptor H₃ (ver apéndice) nos han llevado a seleccionar el sistema histaminérgico como posible sistema inhibidor de funciones mediadas por dopamina. Estudios anteriores han demostrado la modulación por parte del receptor H₃ de histamina de la liberación de dopamina (Molina-Hernandez et al. 2000), glutamato (Molina-Hernández et al. 2001), acetilcolina (Prast et al. 1999a) y GABA (Arias-Montaño et al. 2001) así como la amplia distribución del receptor (Pillot et al. 2002a) pero no se había estudiado su expresión en los anteriores tipos neuronales.

En el presente trabajo hemos demostrado la presencia del mRNA del receptor H₃ en las MSN estriatales. Estas neuronas, de naturaleza GABAérgica, tradicionalmente se han dividido en dos grandes poblaciones en base a sus vías de proyección, a los neuropéptidos que contienen así como a la familia de receptores de dopamina que expresan. Aunque existe una pequeña población que contiene tanto SP como PE (Wang 2007) y otra que carece de ambas (Sonomura 2007), aproximadamente la mitad de las MSN contiene el mRNA de uno u otro neuropéptido y ambos tipos presentan el mRNA del H₃R (Resultados: Capítulo 1: Fig. 5 del artículo 1). Su segregación en base a los receptores de dopamina ha despertado mucha controversia y recientemente se ha aceptado la existencia de una tercera población que posee simultáneamente ambos receptores (Aizman et al. 2000, Wise et al. 2002). En córtex, estriado y *nucleus accumbens* hemos demostrado la colocalización entre las proteínas de los receptores D₁ y H₃ (Resultados: Capítulo 1: Fig. 6 del artículo 1) lo que constituye una prueba adicional de la presencia de este receptor en las MSN y posibilita la existencia del dímero D₁-H₃ (Moreno et al., 2011; Apéndice). La actividad de las MSN es fundamental para la función de los ganglios basales y se ve regulada por otros sistemas de neurotransmisores, en los que hemos demostrado la presencia de la proteína y/o el mRNA del H₃R: (1) la proyección glutamatérgica corticostriatal excitadora (Resultados: Capítulo 1: Fig. 8 del

artículo 1) procedente del mPFC; (2) las interneuronas colinérgicas estriatales (Resultados: Capítulo 1: Fig. 7 del artículo 1) que modulan la actividad de las neuronas GABAérgicas de proyección y (3) las proyecciones dopaminérgicas procedentes de la SNc y VTA (Resultados: Capítulo 1: Fig. 1 del artículo 1) que pueden activar o inhibir las MSN en función del receptor de dopamina implicado (Purves et al., 2004). La presencia del H₃R en las diversas poblaciones neuronales le permite participar en la regulación de la transición entre el *down-* y *up-state* de las MSN, esencial para la actividad de estas neuronas, de dos modos distintos: (1) directo, debido a su presencia en las propias MSN y (2) indirecto, a través del control de la síntesis y liberación de los diferentes neurotransmisores que regulan la actividad de estas neuronas. Por ello y dado el papel central de las MSN en la función de los ganglios basales, podemos postular que el H₃R juega un papel importante en la regulación de dicha función. Además, consolida nuestra consideración del receptor H₃ de histamina como un buena diana para el tratamiento de diversas patologías como la esquizofrenia, la adicción o el Parkinson.

En el caso del Parkinson, junto con la degeneración de las neuronas nigrostriatales también se conoce una afectación glial, especialmente de los astrocitos protoplasmáticos (revisado por Halliday et al., 2011). Hemos descartado la presencia del H₃R en astrocitos inmunoreactivos para GFAP en córtex, estriado y *nucleus accumbens* (Resultados: Capítulo 1: Fig. 10 del artículo 1). Por ello, podemos postular que el posible papel del H₃R en esta enfermedad no implicaría la modulación de la actividad neuronal a través de estas células.

Así pues, el receptor H₃ de histamina puede jugar un papel importante en la regulación de la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisores de los ganglios basales, entre los que se encuentran el dopaminérgico. La disfunción de la actividad dopaminérgica es característica de la adicción a las drogas de abuso, o por lo menos se interpreta que en los sujetos adictos existe una actividad dopaminérgica inapropiadamente elevada al reconocer estímulos asociados con las drogas (Schultz et al., 1993). Por esta razón, hemos estudiado posibles cambios en la expresión de la TH y/o el H₃R en la SNc y la VTA debidos a la autoadministración crónica de cocaína. A

pesar de que el nivel de proteína TH se encuentra incrementado en la VTA 24h después de la autoadministración de cocaína (Lu et al. 2003) no hemos encontrado un mayor número de neuronas positivas para el mRNA del enzima (Resultados: Capítulo 2: Fig. 50) por lo que el aumento de la proteína TH debe ser debido a cambios intracelulares del nivel de expresión. Del mismo modo, la presencia del mRNA H₃R en neuronas dopaminérgicas apenas se ve alterada por la autoadministración de cocaína (Resultados: Capítulo 2: Fig. 51) aunque preliminarmente hemos detectado un ligero descenso de los niveles de mRNA del H₃R en estas neuronas (Resultados: Capítulo 2: Fig. 52). Resultados de otros miembros del grupo muestran que el imetit (agonista del H₃R) retrasa el reinicio de la autoadministración, lo que podría deberse a efectos directos del agonista sobre neuronas dopaminérgicas tal y como indica el hecho de que el imetit inhibe la velocidad de síntesis de dopamina en miniprismas de estriado. La relación existente entre ambos resultados convierte a la determinación de la velocidad de síntesis de dopamina en una herramienta ideal para la búsqueda de nuevos fármacos con posibles efectos sobre la conducta de autoadministración de cocaína. Estos fármacos serían buenos candidatos a convertirse en tratamientos contra la adicción a esta droga, para la cual no existe un tratamiento farmacológico adecuado en la actualidad.

Independientemente de la participación de otros sistemas de neurotransmisores, la síntesis de dopamina y más concretamente la síntesis de L-DOPA catalizada por la tirosina hidroxilasa (paso limitante de la síntesis de dopamina), es un proceso altamente regulado por diversos mecanismos a largo o corto plazo, entre los que destaca la retroinhibición por la dopamina. Hasta el momento, la existencia de este mecanismo así como algunas de sus características ha sido descrita mediante algunos estudios preliminares en cerebro de rata (Javoy et al., 1972) y, sobre todo, estudios *in vitro* con células PC12 (Haycock JW and Haycock DA 1991) o enzima recombinante (Gordon et al., 2008). En un principio se consideraba que la dopamina ejercía su efecto (sólo removible por fosforilación) por interacción con el sitio activo del enzima, de alta afinidad por la dopamina ($K_d \approx 4\text{nM}$). Sin embargo, en 2008 Gordon y colaboradores describieron un segundo sitio de unión de la dopamina fuera del centro activo. Este segundo sitio, de baja afinidad por la dopamina ($K_d \approx 90\text{nM}$), permite una regulación

sensible a la concentración citosólica de dopamina incluso cuando el enzima está fosforilado.

Durante el desarrollo experimental de esta tesis hemos encontrado, en miniprismas de estriado de rata, un descenso dependiente del tiempo de incubación de la velocidad de síntesis de dopamina, acompañado de una estabilización de la acumulación de la misma (Resultados: Capítulo 3: Fig. 52). Sospechando que podía tratarse del mecanismo de retroinhibición debido a la dopamina sintetizada, decidimos descartar otros posibles causantes como: la desfosforilación del enzima o la degradación por acción de la MAO. Mediante western-blot descartamos el posible efecto de la desfosforilación del enzima en la Ser40 (residuo principal de fosforilación para la actividad del enzima) (Resultados: Capítulo 3: Fig. 2 del artículo 2) dado que esta se mantiene constante a lo largo del tiempo. En segundo lugar, por medio de la tranilcipromina, inhibimos la degradación de la dopamina debido a la acción de la MAO (Resultados: Capítulo 3: Fig. 52) a pesar de lo cual, los perfiles de velocidad de síntesis y de acumulación de dopamina permanecían inalterados. Sin embargo, observamos una disminución significativa de la velocidad de síntesis inicial posiblemente debida a una potenciación del efecto retroinhibidor de la dopamina al bloquear su degradación. A diferencia de los estudios con proteína recombinante, nuestras muestras *ex vivo* contienen la concentración fisiológica de dopamina (100nM, Mosharov et al. 2006), teóricamente suficiente para bloquear el sitio de alta afinidad y causar el efecto de retroinhibición. Por ello, para demostrar la existencia del mecanismo de regulación en miniprismas de estriado de rata, comparamos la velocidad enzimática en presencia o ausencia (gracias al inhibidor de la dopa descarboxilasa, NSD-1015) de dopamina en el tejido (Resultados: Capítulo 3: Fig. 1 y 2 del artículo 2).

Dada la afinidad de la dopamina y el cofactor BH₄ por el sitio de unión al enzima en el centro activo (K_d 4nM para la dopamina y 10μM para el cofactor, Gordon et al., 2008) y sus concentraciones basales estimadas (respectivamente 100nM y 1-100, μM Bowling et al., 2008), el sitio de alta afinidad debe estar permanentemente inhibido por la dopamina. De este modo, el perfil de retroinhibición observado (en el tiempo o debido al incremento de dopamina exógena o endógena; Resultados: Capítulo 3: Fig. 3 y 4 del artículo 2) debe ser causado por la actuación de la dopamina sobre el sitio de baja

afinidad. Esto concuerda con el hecho de que el perfil de retroinhibición no se ve alterado por la fosforilación del enzima más allá de un aumento general de la velocidad de síntesis (Resultados: Capítulo 3: Fig. 3 del artículo 2). Es decir, al incrementar la afinidad por el cofactor (y disminuir la de la dopamina), la fosforilación permite el desplazamiento de la dopamina fuera del sitio de alta afinidad, lo que conduce al incremento de actividad del enzima (Resultados: Capítulo 3: Fig. 7.2 del artículo 2). Sin embargo, la dopamina puede seguir actuando sobre el sitio de baja afinidad y por ello se conserva el perfil temporal de retroinhibición.

Por otra parte, el incremento de la velocidad de síntesis debido a la fosforilación se pierde a elevada concentración de dopamina (Resultados: Capítulo 3: Fig. 5 del artículo 2). Es decir, una alta concentración de dopamina (5-10 μ M) logra desplazar nuevamente al cofactor BH₄ del sitio de unión de alta afinidad a pesar de los cambios en las afinidades debidos a la fosforilación (Resultados: Capítulo 3: Fig. 7.3 del artículo 2). Del mismo modo, con el enzima no fosforilado, concentraciones crecientes de cofactor logran desplazar a la dopamina revirtiendo su efecto inhibitor (Resultados: Capítulo 3: Fig. 6 y 7.5 del artículo 2). Esto implica que la competición por el sitio de alta afinidad entre el cofactor y la dopamina puede tener lugar, teóricamente, tanto en la forma defosforilada como fosforilada de la TH. Sin embargo en condiciones fisiológicas, donde la concentración de cofactor permanece relativamente estable y la de dopamina está altamente regulada por distintos mecanismos (entre los que se encuentra la retroinhibición), difícilmente podría tener lugar el desplazamiento de de la dopamina unida al sitio de alta afinidad o del cofactor BH₄ del enzima fosforilado. En condiciones no fisiológicas en las que se incrementa en gran medida la concentración de dopamina citosólica (como el caso de pacientes de Parkinson tratados con L-DOPA) el cofactor sí podría ser desplazado del enzima fosforilado por acción de la dopamina.

En base a lo anterior, podemos postular que, *in vivo*, en condiciones basales el sitio de alta afinidad estará mayoritariamente ocupado por la dopamina mientras que cuando el enzima está fosforilado será el BH₄ el que ocupe habitualmente dicha posición. Además, en ambas situaciones, la dopamina seguirá ejerciendo parte de su efecto retroinhibidor a través de su unión al sitio de baja afinidad.

Nuestros resultados de localización del receptor H₃ describen con detalle su presencia en diversas poblaciones de los ganglios basales, aportando así una base histológica para posteriores estudios. Tal es el caso de la posible existencia de heterómeros del H₃R con otros receptores así como de la implicación del receptor en la regulación de otros sistemas de neurotransmisores importantes para la función de los ganglios basales. Aún así, sería interesante estudiar la presencia del receptor en otras regiones de los ganglios basales como el globus pallidus, cuyas neuronas GABAérgicas difieren de las estriatales por tener unos elevados niveles de actividad espontánea. De este modo, se podrían analizar estas neuronas (así como las restantes poblaciones GABAérgicas de los ganglios basales) en busca de diferencias de expresión del H₃R relacionadas con las características propias de cada población.

Entre los sistemas de neurotransmisores que expresan el H₃R en los ganglios basales, es clara la importancia del sistema dopaminérgico para el correcto desarrollo de las funciones límbica y motora del organismo. En este sentido, nuestros datos sobre los efectos de la autoadministración de cocaína, junto con los de otros miembros del grupo, establecen el receptor H₃ de histamina como una diana de fármacos para el tratamiento de la adicción a las drogas de abuso. La confirmación del ligero efecto sobre la expresión del mRNA del H₃R que hemos encontrado con el resto de animales del grupo experimental implicaría al receptor con el consumo de cocaína, ya sea como una consecuencia o una causa del mismo. En este caso, sería interesante estudiar las diferencias que los animales *knock-out* para el receptor (condicionales para evitar los efectos de compensación) podrían mostrar en la autoadministración de cocaína. Si la disminución en la expresión del receptor H₃ fuese una causa del consumo de cocaína, estos animales deberían mostrar una tasa de consumo incrementada. Si, por el contrario, la disminución en la expresión del receptor fuese una consecuencia del consumo, éste no se tendría que ver alterado en los animales *knock-out*.

Dada su función inhibitoria de la síntesis de dopamina, un tratamiento para la adicción podría basarse en la potenciación de la actividad del H₃R mediante el empleo de agonistas. Esto conduciría a una disminución de la síntesis y liberación de dopamina en el núcleo accumbens, disminuyendo así el deseo de autoadministración o la predicción de obtención de recompensa. Sin embargo, la presencia del receptor en otros

sistemas de neurotransmisores y las propiedades particulares de cada heterómero (de afinidad e incluso cascada de señalización) hace patente la necesidad de una alta especificidad del fármaco empleado.

Otra línea de actuación de un posible tratamiento contra la adicción podría consistir en el diseño de fármacos destinados a incrementar el efecto retroinhibidor de la dopamina sobre la tirosina hidroxilasa. En este caso se podría pensar en, por ej., un análogo de la dopamina que no activase sus receptores pero sí retroinhibiese la TH. De este modo, al establecer una actividad enzimática disminuida al tiempo que se mantienen activos los procesos de degradación, se podría obtener un bajo umbral de síntesis, no rebasable. Dada la vinculación de los mecanismos de síntesis y liberación, esta síntesis limitada podría implicar una menor liberación de dopamina en respuesta a estímulos. De este modo, los estímulos condicionados asociados a la droga darían lugar a señales dopaminérgicas menores a lo esperado por lo que, en base a la teoría del *reward prediction error*, la conducta de consumo se iría perdiendo con el tiempo.

Al desarrollar, en el presente trabajo de tesis, una técnica sencilla con la que poder describir el mecanismo de regulación de la tirosina hidroxilasa en tejido cerebral, creemos que hemos facilitado futuros estudios sobre la regulación del enzima *in vivo* que pueden conducir a la selección de las dianas de dichos fármacos.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Los estudios histológicos realizados nos permiten afirmar la presencia de la proteína y/o mRNA del H₃R en: 1) neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, 2) neuronas de proyección GABAérgicas estriatonigrales y estriopalidales, 3) interneuronas colinérgicas estriatales, 4) neuronas y terminales glutamatérgicas del mPFC y cuerpo estriado. Asimismo, la proteína del H₃R no está presente en astrocitos inmunoreactivos para GFAP en el cuerpo estriado ni en el mPFC y colocaliza con la proteína del receptor D₁ de dopamina en dichas regiones.
2. La autoadministración de cocaína no produce diferencias en cuanto al número de neuronas TH positivas (presumiblemente dopaminérgicas) ni al porcentaje de éstas que expresan receptor H₃ de histamina en SNc y VTA de rata. Sin embargo, sí disminuye ligeramente la expresión del mRNA del H₃R en el córtex y cuerpo estriado. La localización del receptor H₃ de histamina en neuronas dopaminérgicas contribuye a considerar este receptor como una posible diana farmacológica para el tratamiento de la adicción.
3. En miniprismas de núcleo estriado la dopamina ejerce un control muy estricto sobre la TH por retroinhibición mediante un mecanismo basado en la competición con el cofactor por la unión al sitio de alta afinidad. Es un mecanismo de regulación adaptable a las diferentes necesidades de la célula, dado que es modulable por fosforilación (la cual incrementa la afinidad del enzima por el cofactor potenciando su unión frente a la de la dopamina) y por la concentración citosólica del cofactor enzimático.

BIBLIOGRAFÍA

- Anichtchik, O. V., Peitsaro, N., Rinne, J. O., Kalimo, H., & Panula, P. (2001). Distribution and modulation of histamine H₃ receptors in basal ganglia and frontal cortex of healthy controls and patients with parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 8(4), 707-716.
- Anichtchik, O. V., Rinne, J. O., Kalimo, H., & Panula, P. (2000). An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 163(1), 20-30.
- Aperia, A. C. (2000). Intrarenal dopamine: A key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. *Annual Review of Physiology*, 62, 621-647.
- Arias-Montano, J. A., Floran, B., Garcia, M., Aceves, J., & Young, J. M. (2001). Histamine H₃ receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D₁ receptor-dependent release of [(3)H]-gamma-aminobutyric acid from rat striatal slices. *Br J Pharmacol*, 133(1), 165-71.
- Arrang, J. M., Garbarg, M., & Schwartz, J. C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature*, 302(5911), 832-7.
- Arrang, J. M., Garbarg, M., & Schwartz, J. C. (1987). Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H₃-receptors. *Neuroscience*, 23(1), 149-57.
- Bademci G, Edwards TL, Torres AL, Scott WK, Züchner S, Martin ER, Vance JM, Wang L. A rare novel deletion of the tyrosine hydroxylase gene in Parkinson disease. *Hum Mutat*. 2010 Oct;31(10):E1767-71.
- Beaulieu, J. M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*,
- Bevilaqua, L. R., Graham, M. E., Dunkley, P. R., von Nagy-Felsobuki, E. I., & Dickson, P. W. (2001). Phosphorylation of ser(19) alters the conformation of tyrosine

- hydroxylase to increase the rate of phosphorylation of ser(40). *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 40411-40416.
- Bowling, K. M., Huang, Z., Xu, D., Ferdousy, F., Funderburk, C. D., Karnik, N., et al. (2008). Direct binding of GTP cyclohydrolase and tyrosine hydroxylase: Regulatory interactions between key enzymes in dopamine biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31449-31459.
- Brown, R. E., Stevens, D. R., & Haas, H. L. (2001). The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology*, 63(6), 637-672.
- Centonze, D., Gubellini, P., Bernardi, G., & Calabresi, P. (1999). Permissive role of interneurons in corticostriatal synaptic plasticity. *Brain Research Reviews*, 31(1), 1-5.
- Cohn, C. K., Ball, G. G., & Hirsch, J. (1973). Histamine: Effect on self-stimulation. *Science (New York, N.Y.)*, 180(87), 757-758.
- Connelly, W. M., Shenton, F. C., Lethbridge, N., Leurs, R., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., et al. (2009). The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *British Journal of Pharmacology*, 157(1), 55-63.
- Daubner SC, Lauriano C, Haycock JW, Fitzpatrick PF. Site-directed mutagenesis of serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. Effects of dopamine and cAMP-dependent phosphorylation on enzyme activity. *J Biol Chem*. 1992 Jun 25;267(18):12639-46.
- Daubner SC, Le T, Wang S. (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Apr 1;508(1):1-12.
- David, H. N., Anseau, M., & Abraini, J. H. (2005). Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 50(2), 336-360.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*. 305:1014-7

- Di Chiara G, Imperato A Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic dopamine system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 85:5274-5278.
- Doreulee, N., Yanovsky, Y., Flaggmeyer, I., Stevens, D. R., Haas, H. L., & Brown, R. E. (2001). Histamine H(3) receptors depress synaptic transmission in the corticostriatal pathway. *Neuropharmacology*, 40(1), 106-13.
- Drutel, G., Peitsaro, N., Karlstedt, K., Wieland, K., Smit, M. J., Timmerman, H., et al. (2001). Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol*, 59(1), 1-8.
- Dunford, P. J., O'Donnell, N., Riley, J. P., Williams, K. N., Karlsson, L., & Thurmond, R. L. (2006). The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(11), 7062-7070.
- Dunkley, P. R., Bobrovskaya, L., Graham, M. E., von Nagy-Felsobuki, E. I., & Dickson, P. W. (2004). Tyrosine hydroxylase phosphorylation: Regulation and consequences. *Journal of Neurochemistry*, 91(5), 1025-1043.
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1481-1489.
- Fields, H. L., Hjelmstad, G. O., Margolis, E. B., & Nicola, S. M. (2007). Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 289-316.
- Freneau, R. T., Jr, Voglmaier, S., Seal, R. P., & Edwards, R. H. (2004). VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends in Neurosciences*, 27(2), 98-103.

- Fuentes, R., Petersson, P., & Nicolelis, M. A. (2010). Restoration of locomotive function in parkinson's disease by spinal cord stimulation: Mechanistic approach. *The European Journal of Neuroscience*, 32(7), 1100-1108.
- Fujisawa H, Okuno S. Regulatory mechanism of tyrosine hydroxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 9;338(1):271-6. Epub 2005 Aug 10.
- Furukawa Y, Graf WD, Wong H, Shimadzu M, Kish SJ. Dopa-responsive dystonia simulating spastic paraplegia due to tyrosine hydroxylase (TH) gene mutations. *Neurology*. 2001 Jan 23;56(2):260-3.
- Gordon, S. L., Quinsey, N. S., Dunkley, P. R., & Dickson, P. W. (2008). Tyrosine hydroxylase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1614-1623.
- Gordon SL, Webb JK, Shehadeh J, Dunkley PR, Dickson PW. The low affinity dopamine binding site on tyrosine hydroxylase: the role of the N-terminus and in situ regulation of enzyme activity. *Neurochem Res*. 2009 Oct;34(10):1830-7. Epub 2009 May 16.
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews*, 88(3), 1183-1241.
- Haber, S. N., Fudge, J. L., & McFarland, N. R. (2000). Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(6), 2369-2382.
- Halliday, G. M., & Stevens, C. H. (2011). Glia: Initiators and progressors of pathology in parkinson's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 26(1), 6-17.
- Harada, Wu J, Haycock JW, Goldstein M Regulation of L-DOPA biosynthesis by site-specific phosphorylation of tyrosine hydroxylase in AtT-20 cells expressing wild-type and serine 40-substituted enzyme.. *J Neurochem*. 1996 Aug;67(2):629-35.

- Haycock JW, Haycock DA. Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. *J Biol Chem.* 1991 Mar 25;266(9):5650-7.
- Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555-579.
- Hertz JM, Ostergaard K, Juncker I, Pedersen S, Romstad A, Møller LB, Güttler F, Dupont E. Low frequency of Parkin, Tyrosine Hydroxylase, and GTP Cyclohydrolase I gene mutations in a Danish population of early-onset Parkinson's Disease. *Eur J Neurol.* 2006 Apr;13(4):385-90.
- Hill, S. J., Ganellin, C. R., Timmerman, H., Schwartz, J. C., Shankley, N. P., Young, J. M., et al. (1997). International union of pharmacology. XIII. classification of histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 49(3), 253-278.
- Hofstra, C. L., Desai, P. J., Thurmond, R. L., & Fung-Leung, W. P. (2003). Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 305(3), 1212-21.
- Howes, O. D., & Kapur, S. (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III--the final common pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 549-562.
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 565-598.
- Ito, C., Onodera, K., Sakurai, E., Sato, M., & Watanabe, T. (1997). Effect of cocaine on the histaminergic neuron system in the rat brain. *J Neurochem*, 69(2), 875-8.
- Ito, C., Onodera, K., Watanabe, T., & Sato, M. (1997). Effects of histamine agents on methamphetamine-induced stereotyped behavior and behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology*, 130(4), 362-367.

- Ito, R., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2004). Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nature Neuroscience*, 7(4), 389-397.
- Javitt, D. C. (2010). Glutamatergic theories of schizophrenia. *The Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences*, 47(1), 4-16.
- Javoy, F., Agid, Y., Bouvet, D., & Glowinski, J. (1972). Feedback control of dopamine synthesis in dopaminergic terminals of the rat striatum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 182(3), 454-463.
- Jedynak JP, Ali SF, Haycock JW, Hope BT. Acute administration of cocaine regulates the phosphorylation of serine-19, -31 and -40 in tyrosine hydroxylase. *J Neurochem*. 2002 Jul;82(2):382-8.
- Jin, C. Y., Anichtchik, O., & Panula, P. (2009). Altered histamine H3 receptor radioligand binding in post-mortem brain samples from subjects with psychiatric diseases. *British Journal of Pharmacology*, 157(1), 118-129.
- Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Wightman, R. M., & Caron, M. G. (1998). Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J Neurosci*, 18(6), 1979-86.
- Kandel E., Schwartz J. and Jessell T. (Ed.). (2000). (4^o ed.)
- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(11), 4908-4923.
- Kawaguchi, Y. (1997). Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neuroscience Research*, 27(1), 1-8.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., & Emson, P. C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(10), 3421-3438.

- Kirchhoff, F., Dringen, R., & Giaume, C. (2001). Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 251(4), 159-169.
- Kumer, S. C., & Vrana, K. E. (1996). Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *Journal of Neurochemistry*, 67(2), 443-462.
- Lehmann, I. T., Bobrovskaya, L., Gordon, S. L., Dunkley, P. R., & Dickson, P. W. (2006). Differential regulation of the human tyrosine hydroxylase isoforms via hierarchical phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 17644-17651.
- Lewis, D. A., Melchitzky, D. S., & Haycock, J. W. (1993). Four isoforms of tyrosine hydroxylase are expressed in human brain. *Neuroscience*, 54(2), 477-492.
- Li, Z. S., Schmauss, C., Cuenca, A., Ratcliffe, E., & Gershon, M. D. (2006). Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: Analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(10), 2798-2807.
- Lin, B., Levy, S., Raval, A. P., Perez-Pinzon, M. A., & Defazio, R. A. (2010). Forebrain ischemia triggers GABAergic system degeneration in substantia nigra at chronic stages in rats. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2010, 506952.
- Lindgren N, Xu ZQ, Lindskog M, Herrera-Marschitz M, Goiny M, Haycock J, Goldstein M, Hökfelt T, Fisone G. Regulation of tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation at Ser(19) and Ser(40) via activation of glutamate NMDA receptors in rat striatum. *J Neurochem*. 2000 Jun;74(6):2470-7.
- Lindgren, N., Usiello, A., Goiny, M., Haycock, J., Erbs, E., Greengard, P., et al. (2003). Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4305-4309.

- Lindstrom, E., Chen, D., Norlen, P., Andersson, K., & Hakanson, R. (2001). Control of gastric acid secretion: The gastrin-ECL cell-parietal cell axis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 128(3), 505-514.
- Lintunen, M., Hyytia, P., Sallmen, T., Karlstedt, K., Tuomisto, L., Leurs, R., et al. (2001). Increased brain histamine in an alcohol-preferring rat line and modulation of ethanol consumption by H(3) receptor mechanisms. *FASEB J*, 15(6), 1074-6.
- Liu, C., Ma, X., Jiang, X., Wilson, S. J., Hofstra, C. L., Blevitt, J., et al. (2001). Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. *Molecular Pharmacology*, 59(3), 420-426.
- Lovenberg, T. W., Roland, B. L., Wilson, S. J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., et al. (1999). Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Molecular Pharmacology*, 55(6), 1101-7.
- Lu, L., Grimm, J. W., Shaham, Y., & Hope, B. T. (2003). Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration in rats. *J Neurochem*, 85(6), 1604-13.
- Margolis, E. B., Lock, H., Hjelmstad, G. O., & Fields, H. L. (2006). The ventral tegmental area revisited: Is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *The Journal of Physiology*, 577(Pt 3), 907-924.
- Masaki, T., & Yoshimatsu, H. (2006). The hypothalamic H1 receptor: A novel therapeutic target for disrupting diurnal feeding rhythm and obesity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(5), 279-284.
- Molina-Hernandez, A., Nunez, A., & Arias-Montano, J. A. (2000). Histamine H3-receptor activation inhibits dopamine synthesis in rat striatum. *Neuroreport*, 11(1), 163-6.

- Molina-Hernandez, A., Nunez, A., Sierra, J. J., & Arias-Montano, J. A. (2001). Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology*, 41(8), 928-34.
- Montague, P. R., Hyman, S. E., & Cohen, J. D. (2004). Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature*, 431(7010), 760-767.
- Moreno-Delgado D, Rosell-Villar S, Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A and Ortiz J. P.2.026 Dopamine synthesis and release in Roman high and low avoidance inbred rats. *European Neuropsychopharmacology Volume 21, Supplement 1, March 2011, Page S55.*
- Moreno, E., Hoffmann, H., Gonzalez-Sepulveda, M., Navarro, G., Casado, V., Cortes, A., et al. (2011). Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5846-5854.
- Morgane, P. J., & Mokler, D. J. (2006). The limbic brain: Continuing resolution. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(2), 119-125.
- Morisset, S., Sahn, U. G., Traiffort, E., Tardivel-Lacombe, J., Arrang, J. M., & Schwartz, J. C. (1999). Atypical neuroleptics enhance histamine turnover in brain via 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptor blockade. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288(2), 590-596.
- Morisset, S., Sasse, A., Gbahou, F., Heron, A., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., et al. (2001). The rat H3 receptor: Gene organization and multiple isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(1), 75-80.
- Mosharov, E. V., Staal, R. G., Bove, J., Prou, D., Hananiya, A., Markov, D., et al. (2006). Alpha-synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(36), 9304-9311.

- Munzar, P., Tanda, G., Justinova, Z., & Goldberg, S. R. (2004). Histamine h3 receptor antagonists potentiate methamphetamine self-administration and methamphetamine-induced accumbal dopamine release. *Neuropsychopharmacology*, 29(4), 705-17.
- Nagatsu, T. (1983). Biopterin cofactor and monoamine-synthesizing monooxygenases. *Neurochemistry International*, 5(1), 27-38.
- Nakai, T., Kitamura, N., Hashimoto, T., Kajimoto, Y., Nishino, N., Mita, T., et al. (1991). Decreased histamine H1 receptors in the frontal cortex of brains from patients with chronic schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 30(4), 349-356.
- Nakashima A, Hayashi N, Kaneko YS, Mori K, Sabban EL, Nagatsu T, Ota A. Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines. *J Neural Transm*. 2009 Nov;116(11):1355-62. Epub 2009 Apr 25.
- Nakamura, S., Ohnishi, K., Nishimura, M., Suenaga, T., Akiguchi, I., Kimura, J., et al. (1996). Large neurons in the tuberomammillary nucleus in patients with parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurology*, 46(6), 1693-1696.
- Nath, C., & Gupta, M. B. (2001). Role of central histaminergic system in lorazepam withdrawal syndrome in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 68(4), 777-782.
- Nieoullon, A. (2002). Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in Neurobiology*, 67(1), 53-83.
- Okuno S, Fujisawa H. A new mechanism for regulation of tyrosine 3-monooxygenase by end product and cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1985 Mar 10;260(5):2633-5.
- Panickar, K. S., & Norenberg, M. D. (2005). Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. *Glia*, 50(4), 287-298.

- Paxinos, G. (Ed.). (2004). *The rat nervous system* (3rd ed.)
- Paxinos, G. and Watson, C. (Ed.). (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (5 ed.)
- Perreault, M. L., Hasbi, A., Alijaniam, M., Fan, T., Varghese, G., Fletcher, P. J., et al. (2010). The dopamine D1-D2 receptor heteromer localizes in dynorphin/enkephalin neurons: Increased high affinity state following amphetamine and in schizophrenia. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36625-36634.
- Pierce, R. C., & Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev*, 30(2), 215-38.
- Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J. C., et al. (2002). A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*, 114(1), 173-93.
- Pillot, C., Ortiz, J., Heron, A., Ridray, S., Schwartz, J. C., & Arrang, J. M. (2002). Ciproxifan, a histamine H3-receptor antagonist/inverse agonist, potentiates neurochemical and behavioral effects of haloperidol in the rat. *J Neurosci*, 22(16), 7272-80.
- Purves, D. e. a. (Ed.). *Neuroscience* (3rd ed.)
- Ribeiro, P., Wang, Y., Citron, B. A., & Kaufman, S. (1992). Regulation of recombinant rat tyrosine hydroxylase by dopamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), 9593-9597.
- Rinne, J. O., Anichtchik, O. V., Eriksson, K. S., Kaslin, J., Tuomisto, L., Kalimo, H., et al. (2002). Increased brain histamine levels in parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *Journal of Neurochemistry*, 81(5), 954-960.

- Roegge, C. S., Perraut, C., Hao, X., & Levin, E. D. (2007). Histamine H1 receptor involvement in prepulse inhibition and memory function: Relevance for the antipsychotic actions of clozapine. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 86(4), 686-692.
- Ryu, J. H., Yanai, K., & Watanabe, T. (1994). Marked increase in histamine H3 receptors in the striatum and substantia nigra after 6-hydroxydopamine-induced denervation of dopaminergic neurons: An autoradiographic study. *Neuroscience Letters*, 178(1), 19-22.
- Savchenko, V. L., McKanna, J. A., Nikonenko, I. R., & Skibo, G. G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: Comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience*, 96(1), 195-203.
- Schlicker, E., Fink, K., Detzner, M., & Gothert, M. (1993). Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H3 receptors. *J Neural Transm Gen Sect*, 93(1), 1-10.
- Schlicker, E., Fink, K., Hinterthaler, M., & Gothert, M. (1989). Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H3 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 340(6), 633-8.
- Schultz, W., Apicella, P., & Ljungberg, T. (1993). Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(3), 900-913.
- Shelton, M. K., & McCarthy, K. D. (1999). Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia*, 26(1), 1-11.
- Shelton, M. K., & McCarthy, K. D. (2000). Hippocampal astrocytes exhibit Ca²⁺-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 555-563.

- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7-35.
- Sonomura, T., Nakamura, K., Furuta, T., Hioki, H., Nishi, A., et al. (2007). Expression of D1 but not D2 dopamine receptors in striatal neurons producing neurokinin B in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 26(11), 3093-3103.
- Sura, G. R., Daubner, S. C., & Fitzpatrick, P. F. (2004). Effects of phosphorylation by protein kinase A on binding of catecholamines to the human tyrosine hydroxylase isoforms. *Journal of Neurochemistry*, 90(4), 970-978.
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., & Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 228-235.
- Tapper, A. R., McKinney, S. L., Nashmi, R., Schwarz, J., Deshpande, P., Labarca, C., et al. (2004). Nicotine activation of alpha4* receptors: Sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5698), 1029-1032.
- The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING). (2008). Petilla terminology: Nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), 557-568.
- Threlfell, S., Cragg, S. J., Kallo, I., Turi, G. F., Coen, C. W., & Greenfield, S. A. (2004). Histamine H3 receptors inhibit serotonin release in substantia nigra pars reticulata. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(40), 8704-8710.
- Tiligada, E., Zampeli, E., Sander, K., & Stark, H. (2009). Histamine H3 and H4 receptors as novel drug targets. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(10), 1519-1531.
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Herve, D., Fisone, G., & Girault, J. A. (2009). Looking BAC at striatal signaling: Cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends in Neurosciences*, 32(10), 538-547.

- van Rijn, R. M., van Marle, A., Chazot, P. L., Langemeijer, E., Qin, Y., Shenton, F. C., et al. (2008). Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H4 receptor. *The Biochemical Journal*, 414(1), 121-131.
- Wagner, U., Weiler, H. T., & Huston, J. P. (1993). Amplification of rewarding hypothalamic stimulation following a unilateral lesion in the region of the tuberomammillary nucleus. *Neuroscience*, 52(4), 927-932.
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 953-990.
- Wallace LJ, Hughes RM. Computational analysis of stimulated dopaminergic synapses suggests release largely occurs from a single pool of vesicles. *Synapse*. 2008 Dec;62(12):909-19.
- Wallace LJ. A small dopamine permeability of storage vesicle membranes and end product inhibition of tyrosine hydroxylase are sufficient to explain changes occurring in dopamine synthesis and storage after inhibition of neuron firing. *Synapse*. 2007 Sep;61(9):715-23
- Wang, H. B., Deng, Y. P., & Reiner, A. (2007). In situ hybridization histochemical and immunohistochemical evidence that striatal projection neurons co-containing substance P and enkephalin are overrepresented in the striosomal compartment of striatum in rats. *Neurosci Lett*, 425(3), 195-9.
- Witkovsky, P. (2004). Dopamine and retinal function. *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology*, 108(1), 17-40.
- Yamaguchi, S., & Kobayashi, S. (1998). Contributions of the dopaminergic system to voluntary and automatic orienting of visuospatial attention. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(5), 1869-1878.
- Zampeli, E., & Tiligada, E. (2009). The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *British Journal of Pharmacology*, 157(1), 24-33.

APÉNDICE

DIFFERENT ROLE OF cAMP DEPENDENT PROTEIN KINASE AND CaMKII IN H₃ RECEPTOR REGULATION OF HISTAMINE SYNTHESIS AND RELEASE

D. MORENO-DELGADO,* J. GÓMEZ-RAMÍREZ,
A. TORRENT-MORENO, M. GONZÁLEZ-SEPÚLVEDA,
I. BLANCO AND J. ORTIZ

Universitat Autònoma de Barcelona, Neuroscience Institute and Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, 08193 Bellaterra, Spain

Abstract—Histamine H₃ autoreceptors induce a negative feedback on histamine synthesis and release. While it is known that cAMP/cAMP dependent protein kinase (PKA) and Ca²⁺/CaMKII transduction pathways mediate H₃ effects on histamine synthesis, the pathways regulating neuronal histamine release are poorly known. Given the potential use of H₃ ligands in cognitive diseases, we have developed a technique for the determination of H₃ effects on histamine synthesis and release in brain cortical miniprisms. Potassium-induced depolarization effects were impaired by blockade of calcium entry through N and P/Q channels, as well as of CaMKII, but release was not affected by activators or inhibitors of the cAMP/PKA pathway (1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX), N6,2'-O-dibutyryladenine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (db-cAMP) or myristoyl PKA inhibitor peptide 14-22 (PKI₁₄₋₂₂). In contrast, forskolin stimulated histamine release, although independently of PKA. Stimulation of histamine H₃ receptors with the agonist imetit markedly reduced the depolarization increase of histamine release, apparently through P/Q calcium channel inhibition. The H₃ antagonist/inverse agonist thioperamide modestly stimulated histamine release. Thioperamide effect on release was not modified by the PKA inhibitor PKI₁₄₋₂₂, but it was blocked by the CaMKII inhibitor KN-62. These results indicate that H₃ autoreceptors regulate neuronal histamine release (1) independently of the cAMP/PKA cascade, and (2) through modulation of calcium entry and CaMKII activation during depolarization. © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: HPLC, histidine decarboxylase, calcium, cAMP, H₃ receptor, slices.

Histaminergic neurons regulate important brain functions like learning, arousal, and feeding (Haas and Panula, 2003). Modern drugs are needed in order to treat diseases affecting these brain functions, so a better understanding of histaminergic physiology can be helpful for drug discovery. Three major types of histaminergic receptors are

*Corresponding author. Tel: +34-93-581-4827; fax: +34-93-581-1573. E-mail address: david.moreno@uab.cat (D. Moreno-Delgado).
Abbreviations: AIP, myristoyl autocomide-2-related inhibitory peptide; db-cAMP, N6,2'-O-dibutyryladenine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt; HA, histamine; HPLC, high performance liquid chromatography; IBMX, 1-methyl-3-isobutylxanthine; PKA, cAMP dependent protein kinase; PKI₁₄₋₂₂, myristoyl PKA inhibitor peptide 14-22; UV, ultraviolet.

highly expressed in the brain (H₁, H₂ and H₃). At present, histamine H₃ ligands are being clinically studied as treatments for cognitive diseases and obesity (Leurs et al., 2005). Brain H₃ receptors are coupled to Gi/o proteins modulating protein kinases such as cAMP dependent protein kinase (PKA), ERK2 (Giovannini et al., 2003) and GSK3 (Bongers et al., 2007). Among histaminergic receptors, only the H₃ subtype is expressed in histaminergic neurons where they regulate histamine synthesis and release. In histaminergic neurons, it has been described that H₃ receptors inhibit histamine synthesis activation through cAMP/PKA and Ca²⁺/CaMKII pathways (Gomez-Ramirez et al., 2002; Torrent et al., 2005) but the regulatory mechanisms of the H₃ receptor on histamine release has not been studied. We have recently described that constitutive activity of H₃ receptors inhibits cAMP/PKA-dependent activation of histamine synthesis (Moreno-Delgado et al., 2006). H₃ constitutive activity also inhibits histamine release *in vivo* (Arrang et al., 2007). Thus, our aim was to search for PKA involvement in histamine release and constitutive H₃ receptor effects.

Histaminergic cell bodies are strictly located in the hypothalamic tuberomammillary nucleus and project their nerve endings widely to several brain regions. Histamine release can be indirectly estimated by measuring changes in brain tele-methylhistamine concentrations (Ligneau et al., 2007; Morisset et al., 2000). A more direct measurement of histamine release can be approached by microdialysis *in vivo* in stimulated conditions (Washington et al., 2000). However, discrepancies between the basal values obtained in different studies reflect technical difficulties (Cumming et al., 1991; Chikai et al., 1993) which include handling stress-induced activation of histaminergic neurons (Westerink et al., 2002). Classical release methods based in previous radiolabelled neurotransmitter uptake are not possible in histaminergic nerve endings because the existence of a high capacity and affinity histamine uptake has not been demonstrated (Barnes and Hough, 2002; but see Sakurai et al., 2006). However, the radiolabelled precursor [³H]-histidine has been used to show histamine release regulation by H₃ (Arrang et al., 1983), and other receptors (Gulat-Marnay et al., 1989a,b). When using a radiolabeled precursor, [³H]-histamine synthesis precedes its release, and changes in [³H]-histamine synthesis should be taken into account for [³H]-histamine release measurements. In this paper we use an improvement of our method for the determination of histamine synthesis (Ortiz et al., 2000; Gomez-Ramirez et al., 2002) to simultaneously estimate histamine release in the same

samples. We express release as the percent of extracellular [^3H]-histamine versus total [^3H]-histamine synthesized within each individual sample (% released). This ratio has scarcely been used in previous literature, probably due to awkward classical [^3H]-histamine purifications in ion-exchange columns that we substituted with automated HPLC. Once we confirmed the validity of this expression of release, we sought to answer the question of whether PKA or CaMKII are involved in regulating histamine release.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals

Ring-labelled (2,5- ^3H)-L-histidine (50 Ci mmol/l) obtained from Amersham Biosciences, UK, Ltd (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) was purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) before use as described by Ortiz et al. (2000). Myristoyl PKA inhibitor peptide 14-22 (PKI₁₄₋₂₂), 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX), N₆,2'-O-dibutyryl-adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (db-cAMP), KN-62, and myristoyl autocalmitide-2-related inhibitory peptide (AIP) were obtained from Merck Biosciences (Darmstadt, Germany). Omega-conotoxins were purchased from Tocris Cookson Inc. (Bristol, UK). Forskolin was supplied from Alomone-laboratories (Jerusalem, Israel). Thioperamide, imetit, SFK-91488, EGTA, HPLC standards, and other reagents were purchased from Sigma/RBI (Steinheim, Germany). Optiphase HiSafe-3 liquid scintillation cocktail was supplied by PerkinElmer Wallac (Turku, Finland).

Preparation and incubation of brain slices

Most of the procedure used has been previously described (Moreno-Delgado et al., 2006). Protocols for animal handling were previously approved by the Ethics Committee for Human and Animal Research (Universitat Autònoma de Barcelona) in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). The number of animals used and their suffering was minimized. Male Sprague–Dawley rats weighing 200–250 g (Animal Service, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain) were sacrificed by decapitation between 10 and 11 AM. Brains were chilled immediately in modified Krebs–Ringer–bicarbonate medium with the following composition: 120 mM NaCl, 0.8 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 0.67 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 27.5 mM NaHCO₃, and 10 mM glucose, pH 7.4. In a 4 °C chamber, cortical lobes were dissected and sliced in a McIlwain tissue chopper to obtain miniprisms of 0.3–0.3 mm/side. The miniprisms were suspended in ice cold Krebs–Ringer bicarbonate medium and washed by centrifugation and resuspension in order to remove debris of damaged cells. A single rat cortex allowed to obtain up to 28 aliquots (100 μl each) of the settled miniprisms suspension corresponding to 24 incubations and four blank samples. Blank tubes were kept on ice and the rest were distributed into 2 ml polypropylene tubes and incubated at 37 °C in an Eppendorf Thermomixer (5 Prime, Inc., Boulder, CO, USA) under 95% O₂/5% CO₂ atmosphere. Samples were preincubated to equalize metabolism of the different samples and afterward they were incubated to synthesize and release [^3H]-histamine. In experiments where drugs were needed, they were added during preincubation period. Previously purified [^3H]-histidine (Ortiz et al., 2000) was added to all samples to a final concentration of 0.25 μM and samples were incubated during 30 min. Depolarization was achieved by adding buffer with concentrated KCl to a total volume of 250 μl at the beginning of the incubation period. To stop incubations, the tubes were quickly cooled, and immediately centrifuged (1 min, 4000 g) to separate buffer and tissue. Supernatants (buffer and released compounds) were extracted and placed in new tubes containing deproteinizing mixture. The same depro-

teinizing mixture (containing trichloroacetic acid and 100 nmol histamine per tube as internal standard) was also added to the tissue fractions. Supernatant volume extracted was replaced by ice cold Krebs–Ringer–bicarbonate buffer. Afterward, tissue samples were homogenized in a Dynatech/Sonic Dismembrator (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA). An aliquot was taken for protein quantification by the Lowry method to take into account the variability of tissue amounts inside each tube. Tissue homogenates were then centrifuged (12,000 g, 10 min, 4 °C), and all supernatants were processed for [^3H]-histamine purification by HPLC.

[^3H]-histamine purification by HPLC

The procedure used was reported in Ortiz et al. (2000). Briefly, deproteinized supernatants were mixed with ion-exchange resin (Amberlite IRA 900 mesh 16–50; Supelco, Bellefonte, PA, USA) and vortexed for 10 min to allow for binding of most [^3H]-histidine. The tubes were centrifuged, and the supernatants recovered. The supernatants were injected into a Merck–Hitachi HPLC system equipped with an L-7200 autosampler (VWR International, Barcelona, Spain) and a reverse-phase C18 column (25 \times 0.46 cm Tracer Extrasil ODS-2, 5 μm particle size; Teknokroma, Barcelona, Spain) with 2 \times 20 mm guard column (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA). The mobile phase was made of 21% v/v methanol, 10 mM octanesulfonic acid ion pair, and 0.3 M sodium phosphate buffer, adjusted to pH 3. Histamine eluted isocratically at 10–11 min using a 1 ml/min flow rate. The histamine internal standard was the main peak apparent in all samples by ultraviolet (UV) detection at 225 nm, while endogenous histamine and [^3H]-histamine formed were not UV detected. Histamine UV peak detection automatically started a fraction collector (Merck–Hitachi L-5200) recovering histamine internal standard and co-eluted [^3H]-histamine into a scintillation vial. Collected histamine fractions were mixed with Optiphase scintillation cocktail and dpm counted. To estimate recovery within each sample, internal- and external-standard histamine UV peak areas were quantified using a Hercules 2000 interface with Borwin software (JMBS, Grenoble, France).

Calculations and statistical analysis

In summary, one rat cerebral cortex gave 24 incubations, each with respective buffer and tissue samples from where [^3H]-histamine was purified. Dpm obtained from each of these samples were corrected by internal standard recovery, dpm in blank samples, and specific activity (dpm/fmol) of [^3H]-histidine used. Fmol of [^3H]-histamine obtained were expressed as function of protein content in each incubate and incubation time. Extracellular [^3H]-histamine was quantified from dpm obtained from the histamine purification of incubation buffer. Synthesized [^3H]-histamine in a single incubation was the sum of dpm present in the buffer plus tissue samples. Release was expressed as the % of extracellular versus total (synthesized) histamine (“% released”) in that incubation. Statistical significance of differences between groups was assessed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc tests. Statistical significance was set at $P < 0.05$ prior to the experiments.

RESULTS

In order to test the properties of the % released versus total [^3H]-histamine synthesized as a measure of *in vitro* [^3H]-histamine release, we reproduced several conditions described previously such as depolarization and calcium dependence. A stable basal release was obtained in non-depolarizing conditions (2 mM K⁺) and when samples were incubated with 30 mM K⁺ histamine release was

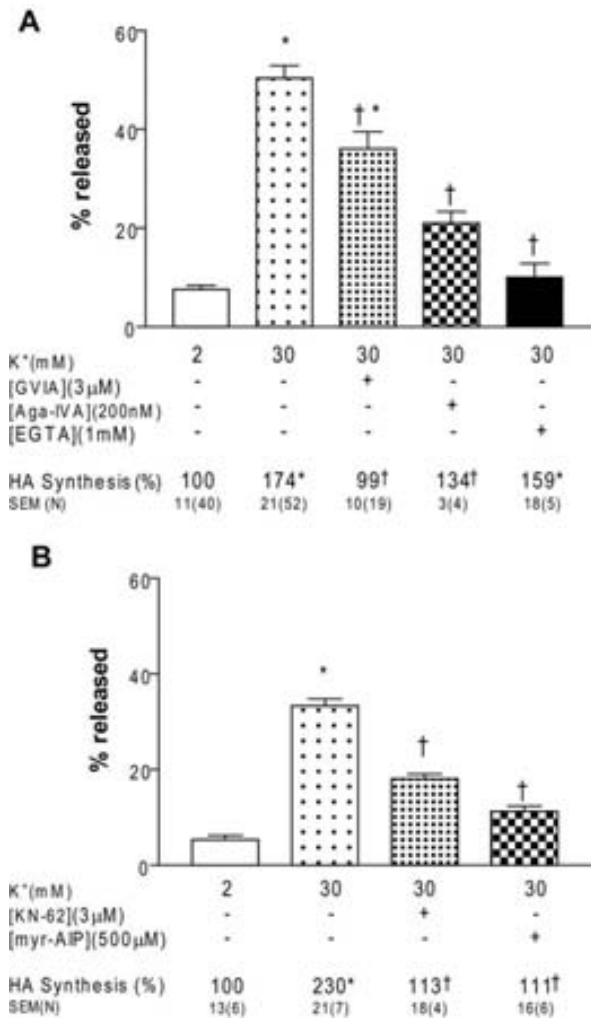


Fig. 1. (A) Full reversion of K⁺-elicited histamine release by the addition of EGTA, a slow divalent cations chelator, while a partial but significant reduction was observed with the calcium channels antagonists, GVIA (N channels) and Aga-IVA (P/Q channels). Note that GVIA effects are stronger on histamine synthesis (bottom line) than on release (graph). (B) The CaMKII inhibitors KN-62 and myr-AIP reduce histamine release and synthesis. Results are means ± SEM. Synthesis control in A, 12.5 ± 1.6 fmol/mg·h; B, 8.4 ± 1.0 fmol/mg·h. * $P < 0.001$ versus control 2 mM K⁺; † $P < 0.001$ versus 30 mM K⁺; one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

proportional to incubation time. As described previously in Arrang et al. (1983, 1987), potassium produced a concentration-dependent stimulation on histamine release, reaching the plateau between 45 and 60 mM K⁺ (not shown). A clear dependence of calcium ions was observed. The incubations with 1 mM EGTA, a slow calcium cation chelator, abolished histamine release elicited by 30 mM K⁺-depolarization (Fig. 1).

During depolarization calcium enters into the terminal through voltage-activated calcium channels. In previous work (Torrent et al., 2005) we reported that activation of N-type calcium channels increases histamine synthesis. Accordingly, omega-conotoxin GVIA 3 μM (an N-type calcium blocker) completely abolished the effect of K⁺ depolarization on histamine synthesis (Fig. 1A, bottom line).

Surprisingly this toxin only inhibited histamine release by 30% (Fig. 1A). In contrast, Agatoxin IVA (a P/Q calcium channel blocker) (Turner et al., 1992) suppressed to the same extent histamine release (−60%) and synthesis (−54%). These results suggest a different role of the N and P/Q-type calcium channels on histamine synthesis and release. In order to assess the intracellular role of calcium on histamine release, the CaMKII inhibitors KN-62 and myr-AIP were used (Fig. 1B). Both inhibitors reduced histamine release (−45–70%), suggesting that calcium entry through voltage-activated calcium channels activates CaMKII during depolarization and this kinase participates in histamine release. Neither calcium channel toxins nor CaMKII inhibitors produced any effect by themselves on histamine synthesis or release in basal conditions (2 mM K⁺) (data not shown).

Histamine synthesis is regulated by two different pathways activating CaMKII and PKA. PKA activation by rising up cAMP levels with IBMX (a non-selective phosphodiesterase inhibitor) or by db-cAMP (a non-hydrolysable cAMP analogue) increases histamine synthesis (Gomez-Ramirez et al., 2002). So, we wondered if the PKA pathway could also play a central role in histamine release. However, when histamine release was measured in the presence of IBMX or db-cAMP no difference was apparent in comparison with control samples (Fig. 2A). This result was confirmed by the fact that in the same experiment IBMX and db-cAMP increased histamine synthesis (Fig. 2A bottom line), and 30 mM K⁺ elicited the expected increase in both histamine release and synthesis. In the presence of depolarization, IBMX and db-cAMP also failed to stimulate histamine release, while having a significant effect on synthesis (Fig. 2B and Torrent et al., 2005). Furthermore, the specific inhibitor of PKA, PKI₁₄₋₂₂, did not affect histamine release induced by depolarization at any K⁺-concentration (Fig. 2C). These results led us to the conclusion that PKA is not involved in the basic mechanisms regulating histamine release.

Despite the described evidence, forskolin, a well-known direct stimulator of adenylyl cyclase, increased histamine release (Fig. 3). However, we found that this stimulation was mimicked by its inactive analog, dd-forskolin, which does not activate adenylyl cyclase. Moreover, the PKA inhibitor PKI₁₄₋₂₂ did not reduce forskolin effect on histamine release, indicating a non PKA-mediated effect. Furthermore, histamine release elicited by forskolin was totally associated with calcium entry, as omega-conotoxin GVIA completely reversed the forskolin effect. Non-specific effects of the drug at similar concentrations are well described (Hoshi et al., 1988; Laurenza et al., 1989). It decreases voltage-dependent K⁺ currents in nerve cells, perhaps acting directly in the K⁺ channel pore (Laurenza et al., 1989). In agreement with this hypothesis, we have observed that the K⁺-channel blocker aminopyridine also elicits histamine release (data not shown). In contrast, forskolin effects on histamine synthesis were partly mediated by PKA and partly by N-type calcium entry, as both mechanisms regulate histamine synthesis (Fig. 3, bottom line; Torrent et al., 2005).

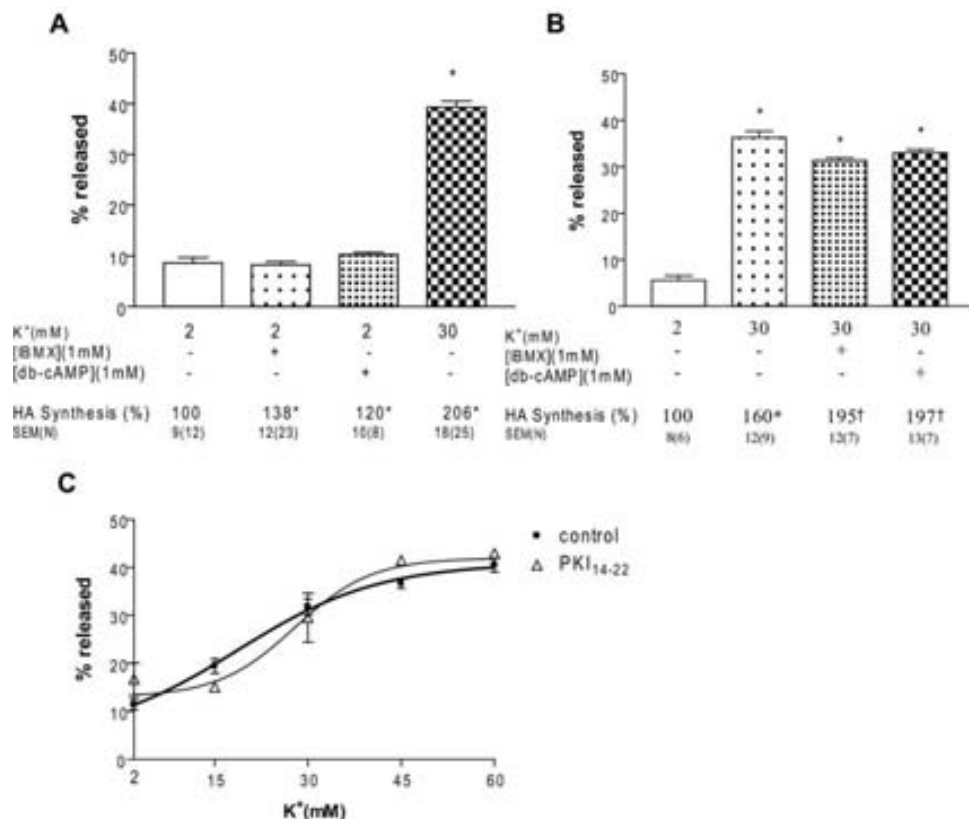


Fig. 2. (A, B) IBMX, a non-selective inhibitor of phosphodiesterases, and db-cAMP, an activator of PKA, do not increase histamine release in basal or depolarizing conditions. In contrast, they do increase histamine synthesis as reported (bottom line). (C) K⁺-depolarization increases histamine release independently of PKA inhibition with PKI₁₄₋₂₂ ($n=4-8$ incubations/group). Results are means \pm SEM. Synthesis control: 8.6 ± 1.0 fmol/mg h. * $P < 0.001$ versus 2 mM K⁺ control, † $P < 0.01$ versus 30 mM K⁺, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

It has been previously described that histamine H₃ autoreceptor agonists are able to inhibit histamine synthe-

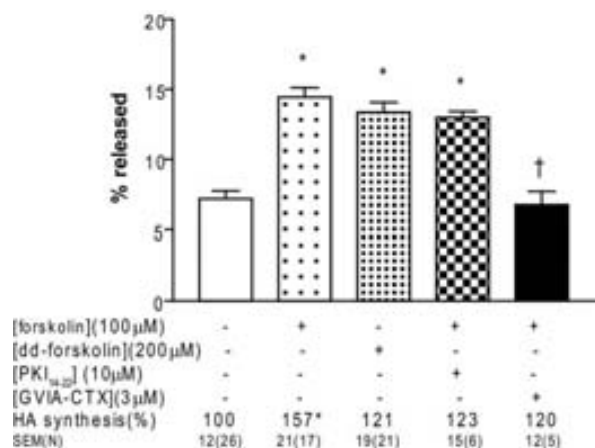


Fig. 3. Forskolin, an adenylate cyclase activator, increases histamine release independently of PKA: Forskolin effect is replicated by its inactive analogue (dd-forskolin) but it is not reduced by the PKA inhibitor, PKI₁₄₋₂₂, and is fully reverted by the addition of the N-type voltage-gated calcium channels antagonist, GVIA. In contrast, forskolin effects on histamine synthesis are only in part PKA-dependent. Results are means \pm SEM. Synthesis control: 12.2 ± 1.2 fmol/mg h. * $P < 0.001$ versus control; † $P < 0.01$ versus forskolin 100 μ M, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

sis and release (Arrang et al., 1983; Torrent et al., 2005). As expected, when the H₃ agonist imetit was added to depolarized miniprisms histamine release was markedly decreased (Fig. 4). The imetit effect was reversed by the H₃ antagonist/inverse agonist thioperamide used at the same concentration (100 nM) (not shown). As it has been postulated that H₃ receptors decrease calcium entry mainly through N and P/Q-type calcium channels (Takeshita et al., 1998) and in previous results we have confirmed the potential role of N and P/Q-type channels on histamine release (Fig. 1), we incubated depolarized miniprisms in the presence of omega-conotoxin GVIA or Agatoxin IVA in presence of imetit. GVIA further decreased imetit effect on histamine release, indicating that H₃ receptor stimulation did not close all N-type calcium channels. In contrast, Agatoxin IVA did not further reduce imetit effects, suggesting that P/Q channels had already been closed by the H₃ receptor agonist.

As the H₃ antagonist/inverse agonist thioperamide elicits histamine release *in vivo* (Arrang et al., 2007), we asked if this effect could be reproduced in our preparation. However, as we previously discussed in Moreno-Delgado et al. (2006), thioperamide effects required activation of calcium entry. Thioperamide inverse agonist effects on release were difficult to study in our system because depolarization itself also elicits histamine release and had stronger ef-

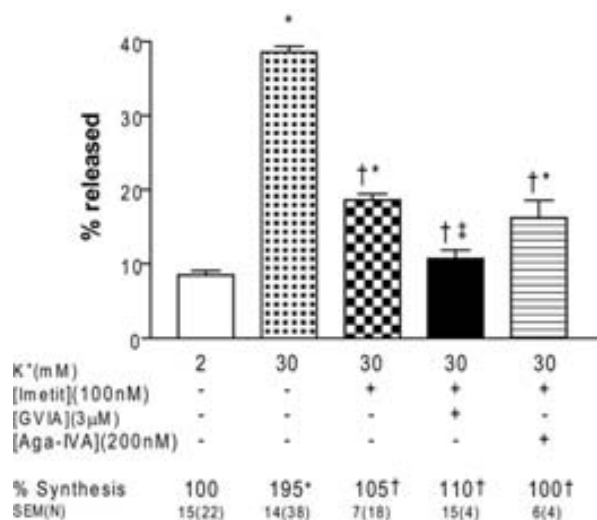


Fig. 4. The H₃ agonist imetit, reduces histamine release preferentially inactivating P/Q calcium channels: GVIA (N-type calcium channel blocker) further reduces release while Agatoxin IVA (P/Q calcium channel blocker) does not. Synthesis control: 18.5 ± 5.5 fmol/mg h. * $P < 0.001$ versus control; † $P < 0.001$ versus 30 mM K⁺; ‡ $P < 0.05$ versus 30 mM K⁺ plus Imetit, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

fects. Thus we had to optimize the experimental conditions allowing to measure thioperamide effects on release, using a mild depolarization (10 mM K⁺) and adding a histamine methyltransferase inhibitor (SKF-91488 100 μM) to prevent degradation of histamine after release. Using these conditions, the modest effects of thioperamide reached statistical significance ($P < 0.05$ vs. control) (Fig. 5). The CaMKII inhibitor KN-62 completely impaired thioperamide effects on histamine release (Fig. 5A) but it did not affect histamine synthesis (Fig. 5A, bottom line). On the other hand, the presence of PKA inhibitor PKI₁₄₋₂₂ did not prevent thioperamide effects on release (Fig. 5B), in contrast to its effects on histamine synthesis (Moreno-Delgado et al., 2006 and Fig. 5B, bottom line). These results suggest that, differently to histamine synthesis, thioperamide effect on histamine release is driven by CaMKII.

DISCUSSION

In this paper we show differences in the signalling pathways regulating neuronal histamine release and synthesis. Both processes could be compared through the use of an improved methodology. As mentioned in the Introduction, technical drawbacks hampered knowledge about the mechanisms regulating histamine release in histaminergic neurons. To purify [³H]-histamine from brain incubates we used an automated HPLC improving chemical selectivity and reproducibility from classical ion-exchange columns. [³H]-histamine recovery was optimally controlled within each sample using a non-radiolabelled histamine internal standard. A reliable ratio of % released [³H]-histamine versus total [³H]-histamine synthesized from the precursor [³H]-histidine was obtained within each individual incubation. The % of released [³H]-histamine was constant versus incubation time in non-depolarized samples, and po-

tassium-induced depolarization increased it proportionally to potassium concentration. As expected, several treatments impairing the effects of calcium entry such as EGTA, CaMKII inhibitors, calcium channel blockers (GVIA, AGA-IVA) and the H₃ agonist imetit clearly reduced the % released [³H]-histamine. EGTA increased histamine synthesis as described in Arrang et al. (1987). Although the mechanisms of this effect are not yet clear, we could hypothesize that histidine decarboxylase enzyme activity could be increased by ionic changes elicited by this chelator. Taken together, our data show that the % released [³H]-histamine adequately reproduces literature data on histamine release, and our method allows simultaneous histamine synthesis determinations.

CaMKII inhibitors KN-62 and myristoyl-AIP impaired depolarization effects on histamine synthesis and release (Fig. 1B). As phosphorylation of synapsin I by CaMKII allows vesicles to enter the active zone releasable pool

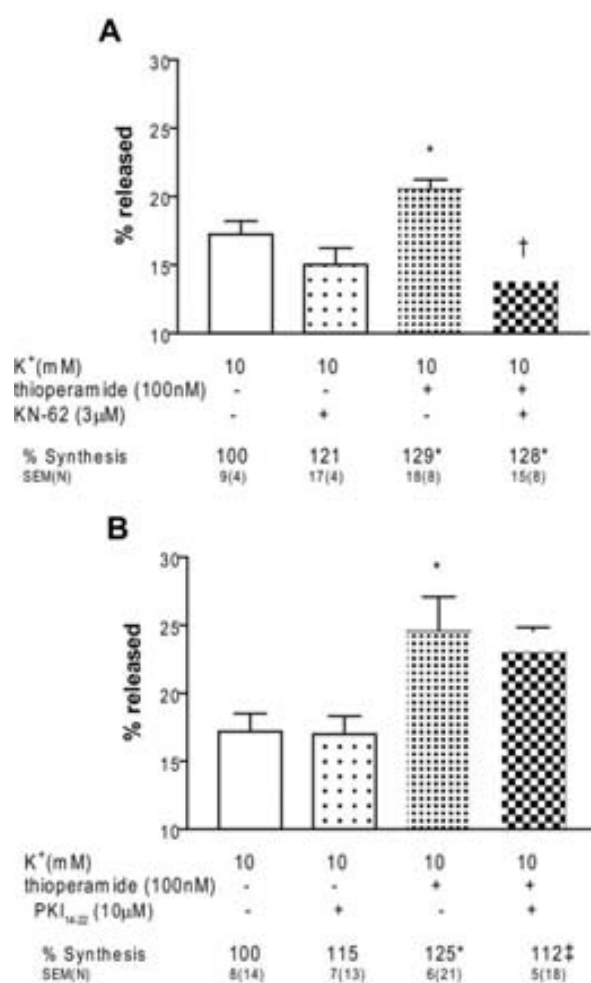


Fig. 5. (A) The CaMKII inhibitor KN-62 impairs thioperamide effect on release, but not on synthesis. (B) In contrast, the PKA inhibitor myr-PKI₁₄₋₂₂ does not alter thioperamide increase of release although as expected it decreased histamine synthesis. Synthesis control in A (10 mM K⁺): 21.4 ± 4.3 fmol/mg h; B, 25.1 ± 2.1 fmol/mg h * $P < 0.05$ versus control; † $P < 0.001$ versus 10 mM K⁺ plus thioperamide, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. ‡ $P < 0.05$ versus 10 mM K⁺ plus thioperamide, one-tailed student's *t*-test.

(Turner et al., 1999), an effect of CaMKII inhibitors on release was expected. However, CaMKII inhibitors only blocked 45–70% of histamine release stimulation while they completely abolished histamine synthesis stimulation (Fig. 1B, bottom line and Torrent et al., 2005). In addition, the N-type calcium channel inhibitor omega-conotoxin GVIA only partially decreased the effects of K^+ on release, while having a much stronger effect on histamine synthesis (Fig. 1A; Takemura et al., 1989; Torrent et al., 2005). In contrast P/Q-type calcium channel inhibition with agatoxin IVA seemed to exert a higher weight in the regulation of histamine release than synthesis (Fig. 1A). Therefore our results suggest that CaMKII, N and P/Q-type calcium channels could participate in depolarization-elicited histamine release and synthesis, but with a different contribution to each process. This different contribution could be due to the intracellular location of each, although we could also hypothesize the participation of additional calcium-mediated mechanisms in neuronal histamine release with respect to synthesis.

A role of the cAMP/PKA pathway in neurotransmitter release has been previously sought by other authors (Patrick and Barchas, 1976; West and Galloway, 1996). Literature data show that some vesicular release proteins are phosphorylated by PKA, but this kinase does not seem to play a central role in release, at least as compared to CaMKII (Turner et al., 1999). In neurons of the squid giant synapse, neurotransmitter release is not stimulated by direct injection of PKA catalytic subunits, although tonic activity of this kinase does facilitate release (Hilfiker et al., 2001). PKA may facilitate the timing of quantal release (Bukharaeva et al., 2002) and vesicular cycling in cultured neurons (Chavis et al., 1998), and it does facilitate the increase of synaptic efficacy underlying long-term potentiation (Weisskopf et al., 1994). Effects of cAMP on histamine release by non-neuronal cells have been found, but they do not appear to be mediated by PKA (Botana and MacGlashan, 1994; Pernas-Sueiras et al., 2006). Our results confirm the effects of the cAMP/PKA pathway on histamine synthesis (Gomez-Ramirez et al., 2002; Torrent et al., 2005; Moreno-Delgado et al., 2006) but do not support a central role of PKA or cAMP on the basic mechanisms of neuronal histamine release, as (1) rising cAMP levels with IBMX or the cAMP analog db-cAMP do not modify histamine release; (2) PKA inhibition does not significantly change K^+ -stimulated histamine release; (3) PKA inhibition does not change histamine release elicited by the histamine H_3 receptor antagonist/inverse agonist thioperamide (Fig. 5) and (4) forskolin effect on histamine release was PKA independent and completely dependent on calcium entry through N-type calcium channels (Fig. 3). It has been described that forskolin can decrease voltage-dependent K^+ currents in nerve cells, perhaps acting directly in the K^+ channel pore (Laurenza et al., 1989) increasing the excitability of nerve terminals (Hoshi et al., 1988). In conclusion, release from histaminergic terminals is triggered by standard calcium-dependent mechanisms, and the possibility that PKA stimulation could facilitate the

synaptic efficacy of histamine release is not observed in this preparation.

The H_3 autoreceptor was described to regulate histamine release initially (Arrang et al., 1983), and then also histamine synthesis later (Arrang et al., 1987). We characterized the mechanisms regulating histamine synthesis by H_3 receptors (Gómez-Ramírez et al., 2002; Torrent et al., 2005; Moreno-Delgado et al., 2006). However as stated previously the differences between histamine synthesis and release mechanisms deserved to be compared. The H_3 agonist imetit inhibited histamine release, although to a minor extent than histamine synthesis (Fig. 4). It is noteworthy that in experiments by both Arrang et al. (1985, 1987) and us, the H_3 receptor agonists decrease histamine release to a lower extent than synthesis, as if some mechanisms participating in histamine release escaped from control by H_3 autoreceptors. We could hypothesize that one such mechanism could be a subpopulation of N-type calcium channels. Takeshita et al. (1998) showed that activation of H_3 receptors decrease N and P/Q calcium currents. As shown in Fig. 4, the inhibition elicited by the H_3 agonist imetit on depolarization-stimulated histamine release was unaffected by the addition of the P/Q calcium channel blocker Agatoxin IVA, a toxin with strong effects itself (Fig. 1A). This could suggest that both the H_3 agonist imetit and Agatoxin-IVA could inhibit histamine release through the closing of P/Q-type calcium channels. In contrast the effect of imetit on histamine release was further reduced by the addition of the N-type calcium channel blocker omega-conotoxin GVIA (Fig. 4). Thus, a subpopulation of N-type calcium channels involved in release might not be controlled by H_3 receptors. In contrast, imetit effects on histamine synthesis are near to maximal and the closing of N-channels could mediate this effect (Figs. 1, 4; Torrent et al., 2005).

We previously reported that H_3 receptor constitutive activity inhibits histamine synthesis in rat brain cortical miniprisms (Moreno-Delgado et al., 2006). This constitutive activity can be abolished by the inverse agonist thioperamide. Morisset et al. (2000) previously found a very small stimulation of histamine release by thioperamide in similar miniprisms, so we were interested in reproducing and analyzing this effect on release. Thioperamide effects require at least a small depolarization (Moreno-Delgado et al., 2006), which suggests that the inverse agonist alone is not able to activate voltage-activated calcium channels from a closed state. During depolarization voltage-activated calcium channels are opened, and the inverse agonist would simply disengage the “brake” that active H_3 receptors may exert on them. As depolarization has very strong effects on release itself, thioperamide effects on release are hardly seen in this preparation. To overcome this limitation, we tried to optimize our experimental conditions using a light depolarization and simultaneously inhibiting histamine degradation (Moreno-Delgado et al., 2006). Statistically significant thioperamide effects on release were obtained, which were not blocked by the PKA inhibitor PKI₁₄₋₂₂ (Fig. 5). On the other hand, thioperamide effects on release were completely impaired by CaMKII

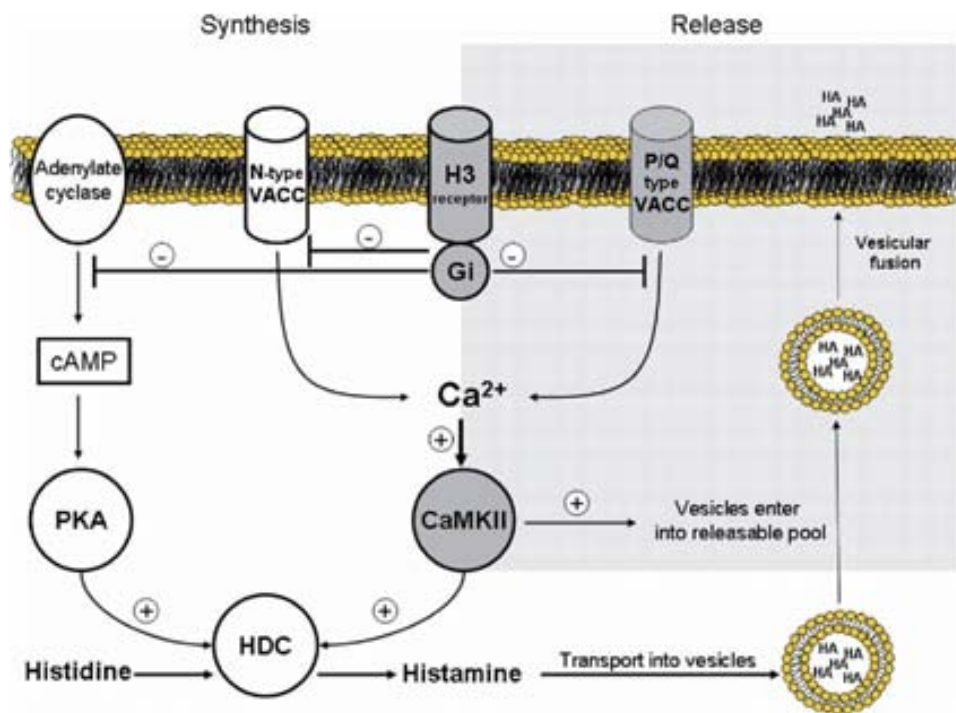


Fig. 6. Summary of the main pathways regulating histamine synthesis and release. VACC, voltage-activated calcium channels; HDC, histidine decarboxylase; HA, histamine; PKA, cAMP dependent protein kinase; CaMKII, calcium-calmodulin dependent protein kinase type II. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

inhibitor KN-62, again supporting the role of this kinase on neuronal histamine release. Despite the statistically significant effect of thioperamide on release, still the effects were small. For this reason we did not further attempt to discriminate whether thioperamide was acting as a classical antagonist of extracellular histamine or as an inverse agonist on H_3 receptors. The second possibility would imply that H_3 receptors would constitutively repress release in our preparation, independently of extracellular histamine concentrations. However in histamine release experiments the presence of extracellular histamine cannot be avoided. Therefore a pharmacological comparison to assess such possible constitutive activity would require the analysis of a very high number of samples, comparing the effects of several H_3 neutral antagonists and inverse agonists in different conditions, and clear-cut conclusions on whether the receptor is constitutively repressing release might not be drawn.

CONCLUSION

The simultaneous determination of histamine synthesis and the % of released histamine provide an improvement of the methodology to identify H_3 ligands that might be useful in treating cognitive diseases. This work has led to a better understanding of H_3 receptor regulation of pathways involved in histamine synthesis and release (Fig. 6). N and P/Q-type calcium channels and protein kinases CaMKII and PKA are differentially involved in both processes suggesting that even though histamine synthesis

and release are two intrinsically related functions, their regulation mechanisms are evidently different.

Acknowledgments—This work was supported by grants BFI 2002-01077 (IB), SAF 2005-06040 and SAF2006-08240 (JO), Spanish Ministry of Education and Science.

REFERENCES

- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H_3) of histamine receptor. *Nature* 302(5911):832–837.
- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1985) Autoregulation of histamine release in brain by presynaptic H_3 -receptors. *Neuroscience* 15(2):553–562.
- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1987) Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H_3 -receptors. *Neuroscience* 23(1):149–157.
- Arrang JM, Morisset S, Gbahou F (2007) Constitutive activity of the histamine H_3 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 28(7):350–357.
- Barnes WG, Hough LB (2002) Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine. *J Neurochem* 82(5):1262–1271.
- Bongers G, Sallmen T, Passani MB, Mariottini C, Wendelin D, Lozada A, Marle A, Navis M, Blandina P, Bakker RA, Panula P, Leurs R (2007) The Akt/GSK-3 β axis as a new signaling pathway of the histamine H_3 receptor. *J Neurochem* 103(1):248–258.
- Botana LM, MacGlashan DW (1994) Differential effects of cAMP-elevating drugs on stimulus-induced cytosolic calcium changes in human basophils. *J Leukoc Biol* 55(6):798–804.
- Bukharaeva EA, Samigullin D, Nikolsky E, Vyskocil F (2002) Protein kinase A cascade regulates quantal release dispersion at frog muscle endplate. *J Physiol* 538(Pt 3):837–848.

- Chavis P, Mollard P, Bockaert J, Manzoni O (1998) Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells. *Neuron* 20(4):773–781.
- Chikai T, Oishi R, Saeki K (1993) Microdialysis study of the effects of sedative drugs on extracellular histamine in the striatum of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 266(3):1277–1281.
- Cumming P, Damsma G, Fibiger HC, Vincent SR (1991) Characterization of extracellular histamine in the striatum and bed nucleus of the stria terminalis of the rat: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 56(5):1797–1803.
- Giovannini MG, Efooudebe M, Passani MB, Baldi E, Bucherelli C, Giachi F, Corradetti R, Blandina P (2003) Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *J Neurosci* 23(27):9016–9023.
- Gomez-Ramirez J, Ortiz J, Blanco I (2002) Presynaptic H3 autoreceptors modulate histamine synthesis through cAMP pathway. *Mol Pharmacol* 61(1):239–245.
- Gulat-Marnay C, Lafitte A, Arrang JM, Schwartz JC (1989a) Regulation of histamine release and synthesis in the brain by muscarinic receptors. *J Neurochem* 52(1):248–254.
- Gulat-Marnay C, Lafitte A, Arrang JM, Schwartz JC (1989b) Modulation of histamine release and synthesis in the brain mediated by alpha 2-adrenoceptors. *J Neurochem* 53(2):513–518.
- Haas H, Panula P (2003) The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4(2):121–130.
- Hilfiker S, Czernik AJ, Greengard P, Augustine GJ (2001) Tonically active protein kinase A regulates neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Physiol* 531(Pt 1):141–146.
- Hoshi T, Garber SS, Aldrich RW (1988) Effect of forskolin on voltage-gated K⁺ channels is independent of adenylate cyclase activation. *Science* 240(4859):1652–1655.
- Laurenza A, Sutkowski EM, Seamon KB (1989) Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends Pharmacol Sci* 10(11):442–447.
- Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJ (2005) The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4(2):107–120.
- Ligneau X, Landais L, Perrin D, Piriou J, Uguen M, Denis E, Robert P, Parmentier R, Anaclet C, Lin JS, Burbán A, Arrang JM, Schwartz JC (2007) Brain histamine and schizophrenia: potential therapeutic applications of H3-receptor inverse agonists studied with BF.649. *Biochem Pharmacol* 73(8):1215–1224.
- Moreno-Delgado D, Torrent A, Gómez-Ramírez J, de Esch I, Blanco I, Ortiz J (2006) Constitutive activity of H3 autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway. *Neuropharmacology* 51(3):517–523.
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM (2000) High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 408(6814):860–864.
- Ortiz J, Gómez J, Torrent A, Aldavert M, Blanco I (2000) Quantitative radioisotopic determination of histidine decarboxylase using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 280(1):111–117.
- Patrick RL, Barchas JD (1976) Dopamine synthesis in rat brain striatal synaptosomes. II. Dibutyl cyclic adenosine 3':5'-monophosphoric acid and 6-methyltetrahydropterine-induced synthesis increases without an increase in endogenous dopamine release. *J Pharmacol Exp Ther* 197(1):97–104.
- Pernas-Sueiras O, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM (2006) PKC and cAMP positively modulate alkaline-induced exocytosis in the human mast cell line HMC-1. *J Cell Biochem* 99(6):1651–1663.
- Sakurai E, Sakurai E, Orelan L, Nishiyama S, Kato M, Watanabe T, Yanai K (2006) Evidence for the presence of histamine uptake into the synaptosomes of rat brain. *Pharmacology* 78(2):72–80.
- Takemura M, Kishino J, Yamatodani A, Wada H (1989) Inhibition of histamine release from rat hypothalamic slices by omega-conotoxin GVIA, but not by nilvadipine, a dihydropyridine derivative. *Brain Res* 496(1–2):351–356.
- Takeshita Y, Watanabe T, Sakata T, Munakata M, Ishibashi H, Akaike N (1998) Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. *Neuroscience* 87(4):797–805.
- Torrent A, Moreno-Delgado D, Gómez-Ramírez J, Rodríguez-Agudo D, Rodríguez-Caso C, Sánchez-Jiménez F, Blanco I, Ortiz J (2005) H3 autoreceptors modulate histamine synthesis through calcium/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinase pathways. *Mol Pharmacol* 67(1):195–203.
- Turner TJ, Adams ME, Dunlap K (1992) Calcium channels coupled to glutamate release identified by omega-Aga-IVA. *Science* 258(5080):310–313.
- Turner KM, Burgoyne RD, Morgan A (1999) Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci* 22(10):459–464.
- Washington B, Shaw JB, Li J, Fisher B, Gwathmey J (2000) In vivo histamine release from brain cortex: the effects of modulating cellular and extracellular sodium and calcium channels. *Eur J Pharmacol* 407(1–2):117–122.
- Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, Nicoll RA (1994) Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science* 265(5180):1878–1882.
- West AR, Galloway MP (1996) Regulation of serotonin-facilitated dopamine release in vivo: the role of protein kinase A activating transduction mechanisms. *Synapse* 23(1):20–27.
- Westerink BH, Cremers TI, De Vries JB, Liefers H, Tran N, De Boer P (2002) Evidence for activation of histamine H3 autoreceptors during handling stress in the prefrontal cortex of the rat. *Synapse* 43(4):238–243.

Dopamine D₁-histamine H₃ Receptor Heteromers Provide a Selective Link to MAPK Signaling in GABAergic Neurons of the Direct Striatal Pathway^{*[5]}

Received for publication, July 7, 2010, and in revised form, December 16, 2010. Published, JBC Papers in Press, December 20, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.161489

Estefanía Moreno[‡], Hanne Hoffmann^{§¶}, Marta Gonzalez-Sepúlveda[§], Gemma Navarro[‡], Vicent Casadó[‡], Antoni Cortés[‡], Josefa Mallol[‡], Michel Vignes[¶], Peter J. McCormick^{¶1}, Enric I. Canela[‡], Carme Lluís[‡], Rosario Moratalla^{||}, Sergi Ferré^{**}, Jordi Ortiz^{§2}, and Rafael Franco^{‡¶2,3}

From the [‡]Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain, the [§]Neuroscience Institute and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain, [¶]UMR 5247 The Max Mousseron Biomolecules Institute, CNRS, University of Montpellier 1 and 2, University of Montpellier 2, 34095 Montpellier, France, ^{||}Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, the ^{**}National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland 21224, and the ^{¶¶}Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pio XII 55, 31008 Pamplona, Spain

Previously, using artificial cell systems, we identified receptor heteromers between the dopamine D₁ or D₂ receptors and the histamine H₃ receptor. In addition, we demonstrated two biochemical characteristics of the dopamine D₁ receptor-histamine H₃ receptor heteromer. We have now extended this work to show the dopamine D₁ receptor-histamine H₃ receptor heteromer exists in the brain and serves to provide a novel link between the MAPK pathway and the GABAergic neurons in the direct striatal efferent pathway. Using the biochemical characteristics identified previously, we found that the ability of H₃ receptor activation to stimulate p44 and p42 extracellular signal-regulated MAPK (ERK 1/2) phosphorylation was only observed in striatal slices of mice expressing D₁ receptors but not in D₁ receptor-deficient mice. On the other hand, the ability of both D₁ and H₃ receptor antagonists to block MAPK activation induced by either D₁ or H₃ receptor agonists was also found in striatal slices. Taken together, these data indicate the occurrence of D₁-H₃ receptor complexes in the striatum and, more importantly, that H₃ receptor agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation in striatal slices is mediated by D₁-H₃ receptor heteromers. Moreover, H₃ receptor-mediated phospho-ERK 1/2 labeling co-distributed with D₁ receptor-containing but not with D₂ receptor-containing striatal neurons. These results indicate that D₁-H₃ receptor heteromers work as processors integrating dopamine- and histamine-related signals

involved in controlling the function of striatal neurons of the direct striatal pathway.

The striatum is the main input structure of the basal ganglia, which are subcortical structures involved in the processing of information related to the performance and learning of complex motor acts. It is widely accepted that dopamine receptor subtypes, which are fundamental for motor control and are implicated in numerous neuropsychiatric disorders, are largely segregated in the two subtypes of medium spiny neurons (MSNs),⁴ the most populated neuronal type in the striatum. Dopamine D₂ receptors (D₂Rs) are mostly localized in the striatopallidal MSNs, which express the peptide enkephalin and which gives rise to the indirect striatal efferent pathway, whereas dopamine D₁ receptors (D₁Rs) are mostly expressed by the striatonigral MSNs, which express substance P and dynorphin and constitute the direct striatal efferent pathway (1, 2). Dopaminergic drugs activate the ERK transduction pathway, which is involved in basic physiological processes and in synaptic plasticity (3). In the dopamine-depleted striatum, ERK signaling is implicated in the development of L-DOPA-induced dyskinesia. Thus, in dopamine-denervated mice, L-DOPA activates ERK signaling specifically in D₁Rs containing striatonigral MSNs but not in D₂Rs containing striatopallidal MSNs (4). This regulation may result in ERK-dependent changes in striatal plasticity leading to dyskinesia.

Histamine is an important regulatory transmitter in the nervous system involved in the sleep/wake cycle, attention, memory, and other functions. Four histamine receptor types (H₁R–H₄R) have been cloned. H₃Rs are expressed in abundance in the brain and high densities are particularly found in the striatum (5–7). H₃Rs were first identified as autoreceptors (8), but they were later found to act as heteroreceptors (9).

* This study was supported by Grants SAF2008-00146, SAF2008-03229-E, SAF2009-07276, SAF2006-08240, and SAF2009-12510 from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, the Centre National de la Recherche Scientifique, the French Ministry of Research and Higher Education, Red de Trastornos Adictivos RD06/0001/0015, Grant 060110 from Fundación La Marató de TV3 and the Intramural Funds of the National Institute on Drug Abuse.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. 1.

¹ A Ramon y Cajal investigator.

² Both authors contributed equally to this article.

³ To whom correspondence should be addressed: Centro de Investigación Médica Aplicada, University of Navarra, Pio XII, 55, 31008 Pamplona, Italy. Tel.: 34-948194700; Fax: 34-948194715; E-mail: rfranco@unav.es.

⁴ The abbreviations used are: MSN, medium spiny neurons; D₂R, dopamine D₂ receptor; H₁R, histamine H₁ receptor; D₁R, dopamine D₁ receptor; RAMH, R(-)- α -methylhistamine dihydrochloride.

The major localization of striatal H₃Rs is postsynaptic (5, 10), and most probably in both subtypes of MSNs (6, 10). Histamine, by means of interactions with striatal H₃Rs, plays an important role in the modulation of dopamine neurotransmission (11–14). At the behavioral level, it was shown that stimulation of postsynaptic H₃R counteracts the motor activation induced by D₁R and D₂R agonists in reserpinized mice (14). These interactions may be related to the ability of H₃Rs to form heteromers with dopamine receptors. In fact, D₁R-H₃R and D₂R-H₃R heteromerization was demonstrated by biophysical techniques in mammalian cells (14, 15). However, their presence in the brain remained to be demonstrated. In addition, if H₃Rs form heteromers with both D₁R and D₂R, is there a functional difference between these two receptor heteromer pairs? One might expect that because the D₁R and D₂R receptors are found in two different neuronal pathways that the different heteromers might confer different properties. Here, we have explored this idea by taking advantage of unique properties of the D₁R-H₃R heteromers to provide evidence for their presence in rodent brain. Previously, using an *in vitro* cell system, we found an important feature of the D₁R-H₃R heteromer is that H₃R agonists only activate ERK 1/2 in a receptor heteromer context, but not in cells expressing H₃Rs without D₁R (15). Here, by taking advantage of this distinct ERK 1/2 signaling characteristic, we demonstrate the occurrence of D₁R-H₃R heteromers in rodent striatum. Despite H₃Rs being expressed in both D₁R and D₂R containing neurons, histamine-receptor-mediated phosphorylation of the ERK 1/2 kinase occurred only in neurons expressing D₁R and not in those with D₂R. Thus, D₁-H₃ receptor heteromers confer a direct link to MAPK activation within the GABAergic neurons of the direct striatal efferent pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals—Sprague-Dawley male rats, 7–9 weeks old and weighing 200–250 g, were provided by the Animal Service of the Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, Spain). Six-to-eight-month-old wild-type littermates and dopamine D₁ receptor knock-out C57BL6 male mice, weighing 25–30 g, were provided by Instituto Cajal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas; Madrid, Spain) and generated by homologous recombination as described previously (16). Rats (2 per cage) or mice (five per cage) were housed in a temperature (21 ± 1 °C) and humidity-controlled (55 ± 10%) room with a 12:12 h light/dark cycle (light between 08:00 and 20:00 h) with food and water *ad libitum*. Animal procedures were conducted according to standard ethical guidelines (European Communities Council Directive 86/609/EEC) and approved by the local (Universidad Autónoma de Barcelona or Consejo Superior de Investigaciones Científicas) ethical committee.

Cell Culture and Membrane Preparation—SK-N-MC/H₃ cells were grown in Eagle's minimal essential medium, supplemented with 10% FBS, 50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, nonessential amino acids, 2 mmol/liter L-glutamine, and 50 µg/ml sodium pyruvate at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ to 80% confluence. The SK-N-MC cells stably expressing the human H₃R (SK-N-MC/H₃) were provided by Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & De-

velopment, L.L.C. Cells were disrupted with a Polytron homogenizer (PTA 20 TS rotor, setting 3; Kinematica, Basel, Switzerland) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor mixture (1/1000; Sigma). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 × g for 5 min at 4 °C, and membranes were obtained by centrifugation at 105,000 × g for 1 h at 4 °C. Membranes were lysed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 45 mM β-glycerophosphate, 1% Triton X-100, 20 µM phenylarsine oxide, 0.4 mM NaVO₄, and protease inhibitor mixture to be processed by Western blot.

Brain Slice Preparation—Rats and mice were decapitated with a guillotine, and the brains were rapidly removed and placed in ice-cold oxygenated (O₂/CO₂: 95/5%) Krebs-HCO₃⁻ buffer (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM glucose, and 26 mM NaHCO₃, pH 7.4). The brains were sliced at 4 °C in a brain matrix (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA) into 0.5-mm coronal slices. Slices were kept at 4 °C in Krebs-HCO₃⁻ buffer during the dissection of the striatum. Each slice was transferred into an incubation tube containing 1 ml of ice-cold Krebs-HCO₃⁻ buffer. The temperature was raised to 23 °C and after 30 min, the medium was replaced by 2 ml Krebs-HCO₃⁻ buffer (23 °C). The slices were incubated under constant oxygenation (O₂/CO₂: 95/5%) at 30 °C for 4–5 h in an Eppendorf Thermomixer (5 Prime, Inc., Boulder, CO). The media was replaced by 200 µl of fresh Krebs-HCO₃⁻ buffer and incubated for 30 min before the addition of ligands.

ERK Phosphorylation Assays—Striatal slices were incubated in the presence of the indicated concentrations of histamine H₃ or dopamine D₁ receptor ligands, prepared in Krebs-HCO₃⁻ buffer. After the indicated incubation period, the solution was discarded, and slices were frozen on dry ice and stored at –80 °C. Slices were lysed by the addition of 500 µl of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 45 mM β-glycerophosphate, 1% Triton X-100, 20 µM phenylarsine oxide, 0.4 mM NaVO₄, and protease inhibitor mixture). Cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 × g for 5 min at 4 °C, and protein was quantified by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin dilutions as standard. To determine the level of ERK1/2 phosphorylation, equivalent amounts of protein (10 µg) were separated by electrophoresis on a denaturing 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF-FL membranes. Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska) was then added, and membranes were rocked for 90 min. Membranes were then probed with a mixture of a mouse antiphospho-ERK 1/2 antibody (1:2500, Sigma) and rabbit anti-ERK 1/2 antibody (1:40,000, Sigma) for 2–3 h. The 42 and 44 kDa bands corresponding to ERK 1 and ERK 2 were visualized by the addition of a mixture of IRDye 800 (anti-mouse) antibody (1:10,000, Sigma) and IRDye 680 (anti-rabbit) antibody (1:10,000, Sigma) for 1 h and scanned by the Odyssey infrared scanner (LI-COR Biosciences). Bands densities were quantified using the scanner software and exported to Microsoft Excel. The level of phosphorylated ERK 1 and phosphorylated ERK 2 was normalized for differences in loading using the total ERK 1/2 protein band intensities.

Dopamine D₁-histamine H₃ Receptor Heteromers in Striatum

Immunohistochemistry—Striatal slices were incubated with the indicated H₃R ligands in Krebs-HCO₃⁻ buffer for 10 min and fixed with 4% paraformaldehyde solution (Antigenfix, DiaPath) for 1 h at room temperature with gentle agitation. The slices were then washed in TBS (50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.8), treated 5 min with 1% Na₂BH₄ dissolved in TBS, followed by successive TBS washes until all Na₂BH₄ was eliminated. Finally, the slices were cryopreserved in a 30% sucrose solution overnight at 4 °C and stored at -20 °C until sectioning. 15- μ m-thick coronal sections were cut on a freezing cryostat (Leica Jung CM-3000) and mounted on slide glass (three control and three treated coronal sections in each slide; STAR FROST PLUS, DELTALAB). Coronal sections were thawed at 4 °C, washed in TBS, and rocked in 7% normal donkey serum (SND, Sigma) in TBS for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere. Coronal sections were then incubated overnight at 4 °C in a humidified atmosphere with the primary antibodies: rabbit antiphospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ ERK 1/2 antibody (1:300, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), guinea pig anti-D₁ antibody (1:100, Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan) or guinea pig anti-D₂ antibody (1:100, Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan) alone or in combination in a solution with 0.1% TBS-Tween, 0.1% BSA-acetylated (Aurion), 7% SND (250 μ l per slide). The specificity of these dopamine receptor antibodies has been previously shown by preabsorption tests with the antigen peptides and by mutually exclusive pattern and triple labeling in immunohistochemistry (17) and by Western blot (see "Results"). Coronal sections were washed in 0.05% TBS-T and left for 2 h at room temperature in a humidified atmosphere with the corresponding secondary antibodies: chicken anti-rabbit (1:200, Alexa Fluor 594, Invitrogen) and goat anti-guinea pig (1:200, Alexa Fluor 488, Invitrogen) in a solution with TBS-Tween 0.1%, BSA acetylated 0.1%, SND 7%, and then washed in TBS-T 0.05%, followed by a single wash in TBS before mounting in Mowiol medium (Calbiochem), covered with a glass, and left to dry at 4 °C for 24 h. Single and double immunostained slices were observed and imaged in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Images were opened and processed with ImageJ confocal microscopy program and a Adobe Photoshop program (version 5.5; Seattle, WA). Double-labeled cells (cells stained for phospho-ERK 1/2 and D₁ or D₂ receptors) were counted in a total of two to three nonoverlapping fields of 45 coronal sections from 4 to 5 slices treated with medium (control), 1 μ M RAMH, or 1 μ M imetit.

Coronal sections from nontreated slices (six control coronal sections in each slide) were used for double-immunohistochemistry using rabbit anti-H₃R antibody (1:200, Chemicon, Billerica, MA) and guinea pig anti-D₁R antibody or guinea pig anti-D₂R antibody as primary antibodies and goat anti-rabbit-peroxidase (1:200, Thermo Scientific, Fremont, CA) and goat anti-guinea pig (1:200, Alexa Fluor 488, Invitrogen) as secondary antibodies by the same procedure as described above. In this case, the amplification system for the red fluorophore, TSA-cyanine 3 (1:100, Tyramide Signal Amplification, PerkinElmer Life Science) was used as described in the TSA Plus fluorescence amplification kit, before mounting in

Mowiol medium. Double-labeled cells (cells stained for H₃ and D₁ or D₂ receptors) were counted in a total of two to three nonoverlapping fields of 15 coronal sections from four to five slices. In all cases, we did not observe staining in the absence of the primary antibodies.

Coimmunoprecipitation—The rat striatal tissue was disrupted with a Polytron homogenizer in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor mixture (1/1000, Sigma). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 \times g for 5 min at 4 °C, and membranes were obtained by centrifugation at 105,000 \times g for 1 h at 4 °C. Membranes were washed two more times at the same conditions and were solubilized by homogenization in ice-cold immunoprecipitation buffer (phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 1% (v/v) Nonidet P-40) and incubated for 30 min on ice before centrifugation at 105,000 \times g for 1 h at 4 °C. The supernatant (1 mg/ml of protein) was processed for immunoprecipitation as described in immunoprecipitation protocol using a Dynabeads[®] Protein G kit (Invitrogen). Protein was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce) using bovine serum albumin dilutions as standard. Immunoprecipitates were carried out with rat anti-D₁ receptor antibody (1:1000, Sigma) or rabbit anti-D₂ receptor antibody (1:1000, Millipore, Billerica, MA) As negative control anti-calnexin antibody was used (1:1000, BD Biosciences Pharmingen). Immunoprecipitates were separated on a denaturing 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membranes. Membranes were probed with the primary antibodies guinea pig anti-D₁ antibody (1:1000, Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan), guinea pig anti-D₂ antibody (1:1000, Frontier Institute) or goat anti-H₃R antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and the secondary antibodies goat anti-guinea pig-peroxidase (1:20,000, Sigma) and donkey anti-goat-peroxidase (1:20,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Bands were visualized with a LAS-3000 (Fujifilm). Analysis of detected bands was performed by Image Gauge software (version 4.0) and Multi Gauge software (version 3.0).

RESULTS

D₁R and H₃R Are Functionally Coupled to MAPK Signaling Pathway in Brain Striatal Slices—To establish whether D₁R and H₃R are functionally coupled to the MAPK pathway in rat striatum, slices were treated with a D₁R or an H₃R agonist, and ERK 1/2 phosphorylation was assayed as described under "Experimental Procedures." The time response curve obtained after treatment with 10 μ M SKF 38393 (D₁R agonist) or 0.1 μ M imetit (H₃R agonist) showed that phosphorylation peaked at 10 min (Fig. 1*a*). Therefore, all subsequent assays were analyzed at 10 min of drug treatment. Dose-response curves for different D₁R or H₃R agonists are displayed in Fig. 1*b*. Both SKF 81297 and SKF 38393 (full and partial D₁R agonists, respectively) were able to increase ERK 1/2 phosphorylation; SKF 81297 was more potent than SKF 38393. RAMH and imetit (H₃R agonists) also increased ERK 1/2 phosphorylation, with imetit being more potent than RAMH. The results show that striatal slices contain D₁R and H₃R functionally coupled to MAPK signaling.

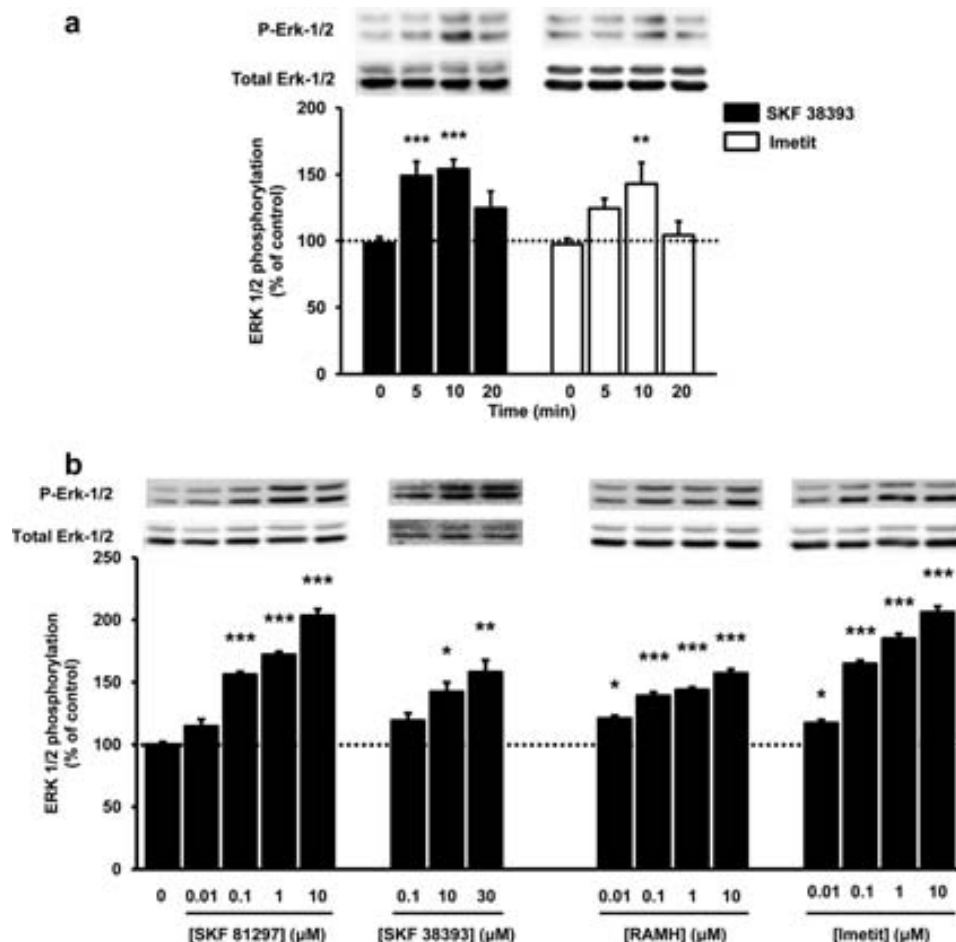


FIGURE 1. H₃R and D₁R agonists induced ERK 1/2 phosphorylation in rat striatal slices. *a*, slices were treated with 10 μM SKF 38393 (black) or 1 μM imetit (white). *b*, slices were treated for 10 min with different SKF 81297, SKF 38393, RAMH, or imetit concentrations. ERK 1/2 phosphorylation was determined as described under "Experimental Procedures." The immunoreactive bands from five to 27 (*a*) or 19 to 24 (*b*) slices obtained from three to 14 (*a*) or six to nine (*b*) animals were quantified, and values represent the mean ± S.E. of the percentage of phosphorylation relative to basal levels of untreated slices (100%). Significant differences were calculated by one-way analysis of variance with post hoc Bonferroni's multiple tests and *, **, and *** correspond to $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively, as compared with nontreated samples (control). A representative Western blot is shown in each panel (top).

H₃R Agonist-induced ERK 1/2 Phosphorylation in Striatal Slices Is Mediated by D₁R-H₃R Heteromers—A cross-antagonism between D₁Rs and H₃Rs has been demonstrated previously in heterologous cell systems. This cross-antagonism only occurs in D₁R-H₃R-heteromer-containing cells and consists of both the ability of D₁R antagonists to block the effect of H₃R agonists and, conversely, the ability of H₃R antagonists to block the effect of D₁R agonists (15). To test whether this phenomenon also occurs *in vivo*, rat striatal slices were incubated with D₁R or H₃R agonists (SKF 81297 or RAMH, respectively) in the presence of either D₁R or H₃R antagonists (SCH 23390 or thioperamide, respectively). The results reproduced the cross-antagonism found in the heterologous cell system (Fig. 2). ERK 1/2 phosphorylation induced by RAMH (0.1 μM) was not only blocked by thioperamide (10 μM) but also by SCH 23390 (10 μM) (Fig. 2*a*). Similarly, ERK 1/2 phosphorylation induced by SKF 81297 (0.1 μM) was blocked by both SCH23390 and thioperamide (10 μM in both cases) (Fig. 2*b*). As a control, activation of striatal serotonin receptors (with 0.2 μM of serotonin) significantly induced ERK 1/2 phosphorylation, but the effect was not modified by either

SCH23390 or thioperamide (10 μM in both cases) (Fig. 2, *c* and *d*). These results provide evidence for the expression D₁R-H₃R heteromers in the striatum. Another characteristic of the D₁R-H₃R heteromer is that it allows H₃R agonists to activate MAPK signaling (15). We decided to investigate whether this heteromer characteristic persisted *in vivo* using transgenic mice lacking D₁Rs. When H₃R-mediated MAPK signaling was investigated in striatal slices from transgenic mice lacking the D₁Rs and in wild-type littermate controls displaying the same genetic background, RAMH (0.1 μM) was unable to induce ERK 1/2 phosphorylation, whereas a strong signal was obtained in slices from wild-type littermate controls displaying the same genetic background (Fig. 3). In addition in wild-type animals, RAMH-induced ERK 1/2 phosphorylation was blocked by both thioperamide (10 μM) and SCH 23390 (10 μM) (Fig. 3). These results indicate that H₃R agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation in striatal slices is mediated by D₁R-H₃R heteromers.

To provide further insight on the function of striatal D₁R and H₃R receptors coexpressed in striatal neurons, ERK 1/2

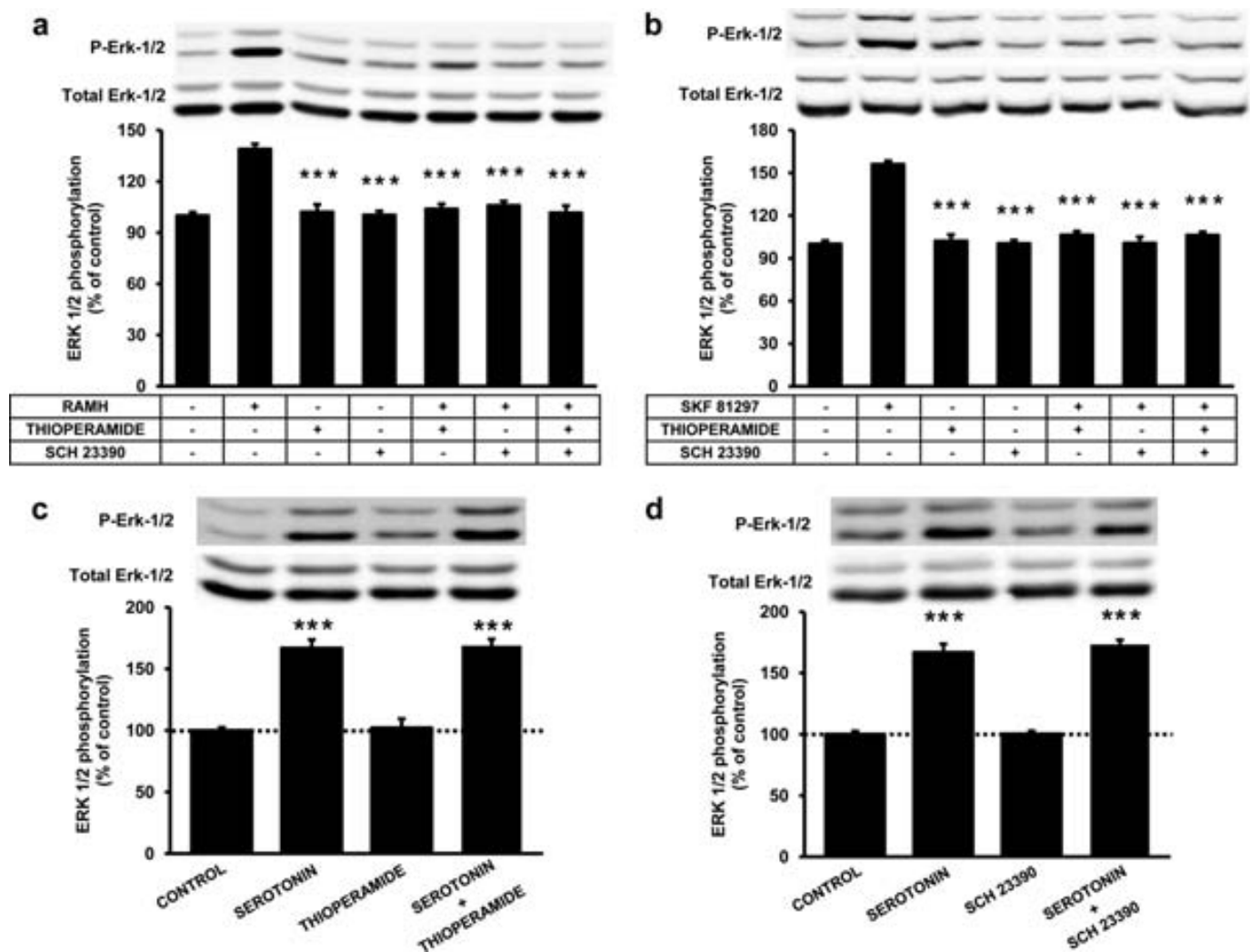


FIGURE 2. Effect of H₃R and D₁R antagonists on agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation in rat striatal slices. Slices were preincubated with medium or with 10 μ M thioperamide, 10 μ M SCH 23390, or both for 20 min prior to the addition of 0.1 μ M RAMH (a) or 0.1 μ M SKF 81297 (b) followed by a further incubation of 10 min. In c and d, slices were preincubated for 20 min with medium or with 10 μ M thioperamide (c) or 10 μ M SCH 23390 (d) prior to the addition of 0.2 μ M serotonin followed by a further incubation of 10 min. ERK1/2 phosphorylation was determined as described under "Experimental Procedures." The immunoreactive bands from 12 to 21 (a and b) or 10 to 14 (c and d) slices obtained from 8 to 10 (a and b) or 4 to 6 (c and d) animals were quantified, and values represent the mean \pm S.E. of the percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices (100%). Significant differences were calculated by one-way analysis of variance with post hoc Bonferroni's multiple tests (***, $p < 0.001$, as compared with the first treatment in a and b, or to the basal in c and d). A representative Western blot is shown in each panel (top).

activation was studied in rat striatal slices in the presence of agonists for the two receptors. This would mimic the situation when the two neurotransmitters histamine and dopamine are simultaneously impacting a given GABAergic neuron. Interestingly, the effect of the D₁R agonist SKF 81297 (10 μ M) was significantly counteracted by the H₃R agonist, RAMH (1 μ M). Furthermore, the combination of RAMH (10 μ M) and SKF 81297 (1 μ M) produced a significantly weaker effect than that of either drug alone (Fig. 4), indicating the existence in striatal neural circuits of an agonist-induced D₁R-H₃R reciprocal negative cross-talk.

Selective D₁R-H₃R Heteromer-mediated Effects only in Striatal Neurons of Direct Pathway—Dopamine receptors are segregated in the two main types of GABAergic striatal efferent neurons: dynorphinergic neurons of the direct pathway expressing D₁Rs and enkephalinergic neurons of the indirect pathway expressing dopamine D₂Rs. Evidence supporting the

presence of H₃R in both types of neurons had been obtained previously by autoradiography and lesion studies (5) and by *in situ* hybridization (10). Accordingly, by double immunohistochemistry using H₃R and either D₁R or D₂R antibodies, we found H₃R immunostaining in cells labeled with either D₁R or D₂R antibodies (Fig. 5). In fact, 95 \pm 12% of D₁R stained neurons or 89 \pm 15% of D₂R stained neurons showed H₃R staining (Fig. 6a). Thus, co-expression of D₁R and H₃R in GABAergic neurons of the direct pathway and co-expression of D₂R and H₃R in GABAergic neurons of the indirect pathway was found. We have described previously that both D₁R and D₂R may form heteromers with H₃R in living cells (14, 15). To test D₁R-H₃R and D₂R-H₃R heteromer expression in the rat striatum, co-immunoprecipitation experiments were carried out. The immunoprecipitates with the anti-D₁R antibody (Fig. 7a) or with the anti-D₂R antibody (Fig. 7b) were not stained in a Western blot using anti-D₂R or anti-D₁R anti-

bodies respectively, showing the specificity of the antibodies. Interestingly, specific H₃R staining was detected by Western blot in both immunoprecipitates using anti-D₁R or anti-D₂R antibodies but not with an irrelevant antibody (Fig. 7c). These

results corroborate the expression of D₁R-H₃R heteromers in the neurons of the direct pathway and suggest the expression of D₂R-H₃R heteromers in the neurons of the indirect pathway.

In striatal slices incubated with 1 μ M imetit and subjected to immunohistochemistry, we observed that imetit-induced ERK 1/2 phosphorylation occurs in a high number of neurons stained using the anti-D₁R antibody, but only in a small number of neurons stained using the anti-dopamine D₂R antibody (Fig. 8). In fact, 85 \pm 7% of phospho-ERK 1/2-positive neurons displayed specific D₁ receptor immunostaining, whereas only 23 \pm 5% of phospho-ERK 1/2-positive neurons were positive for D₂ receptor labeling (Fig. 6b). It should be noted that despite D₂R-H₃R heteromers may play a role in this signaling pathway, neurons containing both the D₁R and D₂R may exist in the striatum (18). Similar results were obtained in striatal slices incubated with 1 μ M RAMH (results not shown). Furthermore, the effect of H₃R agonists in striatal slices was independent of changes in presynaptic neurotransmitter release (e.g. dopamine or histamine), which could potentially contribute to trigger ERK 1/2 phosphorylation in D₁R-expressing cells. In fact, the presence of 1 μ M tetrodotoxin affected neither the D₁R agonist nor the H₃R agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation (supplemental Fig. 1). Collectively, these results demonstrate that histamine-induced MAPK pathway activation in striatal slices is specifically mediated by the D₁R and H₃R heteromers present in neurons of the direct pathway, but not by the H₃Rs localized in the indirect pathway or as autoreceptors or heteroreceptors in neighboring nerve terminals.

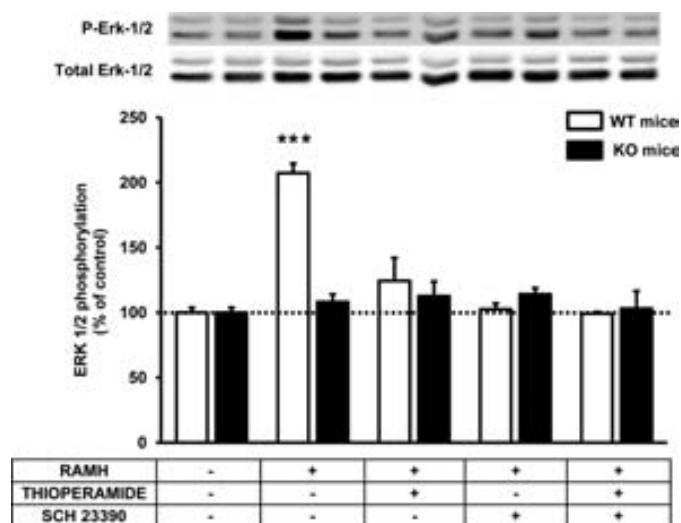


FIGURE 3. H₃R agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation in striatal slices from wild-type and dopamine D₁R knock-out mice. Wild-type (white) or D₁R knock-out mice (black) slices were treated for 10 min with 0.1 μ M RAMH or for 10 min with 10 μ M thioperamide and/or 10 μ M SCH 23390 prior to the addition of 0.1 μ M RAMH and incubation for further 10 min. ERK 1/2 phosphorylation was determined as described under "Experimental Procedures." For each treatment, the immunoreactive bands from four to six slices from a total six wild-type and nine knock-out animals were quantified, and values represent the mean \pm S.E. of the percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices (100%). No significant differences were obtained between the basal levels of the wild-type and the D₁R knock-out mice, and no significant differences were observed between basal and slices treated (20 min) with 10 μ M thioperamide or 10 μ M SCH 23390. Significant treatment and genotype effects were analyzed by a bifactorial analysis of variance followed by post hoc Bonferroni's tests. There were significant genotype, treatment, and interaction effects, explained by the ability of RAMH to strongly and selectively induce ERK 1/2 phosphorylation in wild-type mice (***, $p < 0.001$, as compared with knock-out mice). A representative Western blot is also displayed (top).

DISCUSSION

We have previously described that not only D₁R but also D₂R may form heteromers with H₃R in living cells (14, 15). Here, it is demonstrated that both D₁R and D₂R co-immunoprecipitate H₃R from rat striatum supporting the expression

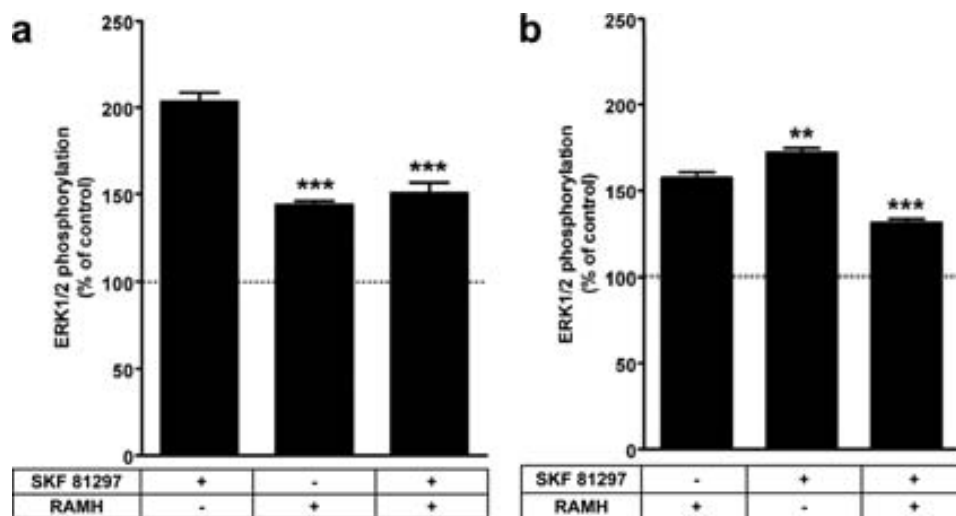


FIGURE 4. Negative cross-talk between D₁Rs and H₃R receptors on ERK 1/2 phosphorylation in rat striatal slices. Slices were treated for 10 min with 10 μ M SKF 81297 and/or 1 μ M RAMH (a) or 10 μ M RAMH and/or 1 μ M SKF 81297 (b). ERK 1/2 phosphorylation was determined as described under "Experimental Procedures." The immunoreactive bands from 10 to 24 (a) or eight to 23 (b) slices obtained from four to six animals were quantified, and values represent the mean \pm S.E. of the percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices (100%). Significant differences were calculated by one-way analysis of variance with post hoc Bonferroni's multiple tests. (** and ***, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, as compared with 10 μ M SKF 81297 in (a) or 10 μ M RAMH in (b)).

Dopamine D₁-histamine H₃ Receptor Heteromers in Striatum

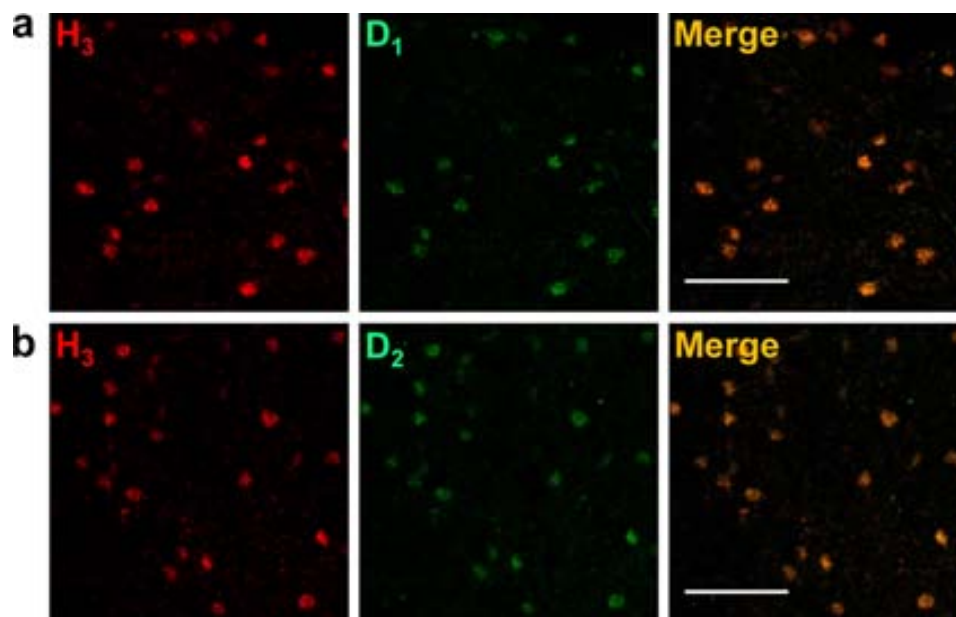


FIGURE 5. **Co-localization between H₃R and D₁R or D₂R in striatal MSNs.** Confocal microscope representative images of coronal sections from striatal slices are shown. Slices were labeled with anti-H₃R antibody (red). Labeling (green) using an anti-D₁R antibody (a) or an anti-D₂R antibody (b) is also shown. In a and b, colocalization is shown in yellow. Scale bars, 60 μ m.

of D₁R-H₃R and D₂R-H₃R heteromers in the neurons of the direct and indirect striatal efferent pathways, respectively. From our earlier work, it was unclear whether D₁R-H₃R and D₂R-H₃R heteromers were engaging similar signaling pathways in the two different neuronal populations or whether there was a functional difference that might help delineate the direct and indirect pathways of the striatum via the existence of these heteromers. The data presented in this paper indicate that D₁R-H₃R heteromers in the striatonigral GABAergic neurons of the direct pathway, but not the H₃R receptors in the indirect pathway, allow direct histaminergic activation of the MAPK pathway.

Biophysical techniques can provide strong support for the existence of receptor heteromers in artificial cell systems (19, 20), but, as these techniques are difficult to perform in intact tissues, obtaining evidence for naturally occurring heteromer expression remains a significant challenge. For many receptor heteromers, we depend on an indirect approach for their identification in native tissues, which relies on the discovery of a characteristic signature of the heteromer. This characteristic, which is usually identified in a heterologous cell system, may be then used as a “fingerprint” to demonstrate the presence of the heteromer in the native tissue (21–24). A specific characteristic of the D₁R-H₃R heteromer, previously identified in transfected cells is cross-antagonism (15), *i.e.* the ability of both D₁R and H₃R antagonists to block the effect of either D₁R or H₃R agonists. This phenomenon, in which an antagonist of one of the receptor units in the receptor heteromer blocks signaling originated by ligand binding to the other receptor unit in the heteromer, has also been observed with other receptor heteromers, such as the cannabinoid CB₁-orexin OX₁ receptor heteromer (25). Significantly, the same D₁R-H₃R cross-antagonism on MAPK signaling, which was described in transfected cells (15), was observed in rat striatal slices (Fig. 2), strongly supporting the occurrence of D₁R-H₃R

heteromers in the rodent striatum. Of note, a further characteristic of the D₁R-H₃R heteromer is its ability to allow the activation of the MAPK cascade by H₃R-selective agonists, which otherwise cannot drive this signaling pathway (15). In fact, H₃R agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation was demonstrated in striatal slices of wild-type but not of D₁R knockout mice, indicating the occurrence of D₁R-H₃R heteromers in the rodent striatum. As the H₃R agonist was unable to activate MAPK signaling in slices from D₁R-deficient mice (Fig. 3) it is likely that only neurons containing both H₃R and D₁R are able to link histaminergic neurotransmission to the MAPK cascade. Interestingly, although H₃R were found to be co-expressed with D₁R- and D₂R-containing neurons, the H₃R-mediated phospho-ERK labeling only co-distributed with D₁R- but not with D₂R-containing neurons (Figs. 5 and 8) and was not dependent on neurotransmitter release from neighboring cells.

The results obtained with co-administration of D₁R and H₃R agonists suggest that the D₁R-H₃R heteromer works as a processor that integrates dopamine and histamine-related signals, and its output consists of quantitatively different activation of the MAPK pathway. Strong MAPK signaling was obtained with either D₁R or H₃R activation, but a significantly weaker MAPK signaling was obtained upon co-activation of both receptors. Thus, at very low dopamine concentrations, histamine can foster MAPK signaling by activating H₃R in D₁R-H₃R-coexpressing neurons. In contrast, when the two neurotransmitters are present, the MAPK activation in the striatonigral MSN would be repressed. Because the MAPK pathway is considered critical to activity-dependent changes underlying synaptic strengthening (26), our results predict that not only dopamine but also histamine plays an important role in MAPK-dependent neuroplasticity in the striatonigral MSN.

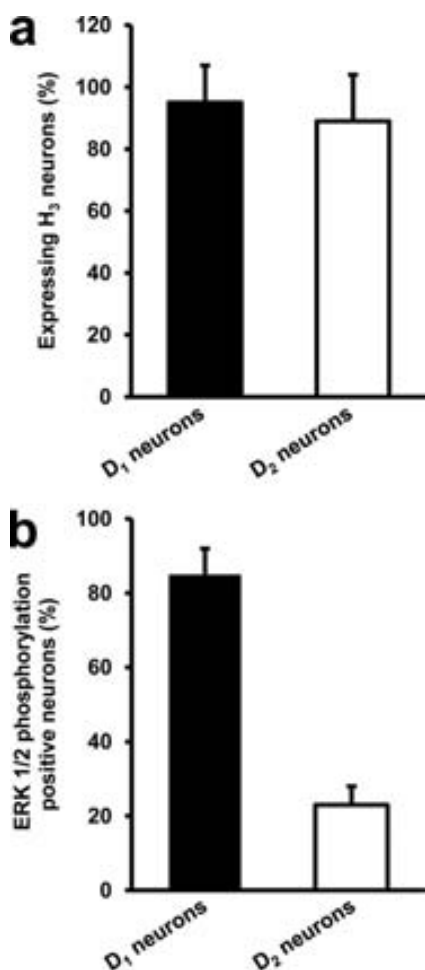


FIGURE 6. Quantification of colocalization in confocal microscope images. Quantification of H₃R expression (a) or 1 μ M imetit-induced ERK 1/2 phosphorylation (b) in neurons expressing D₁R (D₁ neurons) or D₂R (D₂ neurons). Values are mean \pm S.E. of the percentage of double-labeled cells (cells stained for H₃R and D₁R or D₂R in a or cells stained for imetit-induced phospho-ERK 1/2 and D₁R or D₂R in b) were counted in a total of two to three nonoverlapping fields of 15 (a) or 45 (b) coronal sections from four to five slices.

A negative cross-talk between striatal D₁R and H₃R has also been described for the adenylyl cyclase-induced signaling pathway, as histamine H₃R activation inhibits D₁R-mediated cAMP accumulation in striatal slices (27). Additional examples of H₃R-mediated responses able to inhibit D₁R-mediated effects are the ability of H₃R agonists to inhibit the effects of D₁R agonists on GABA release in striatal slices (12) and motor activation in reserpinized mice (14). Overall, these results are consistent with an antagonism at the level of adenylyl cyclase between H₃R and D₁R that would not require heteromer formation. In fact, it is known that H₃R and D₁R couple to G_i and G_s, respectively (9, 28–30). Although it is difficult to confirm these results in living animals, studies in transfected cells indicate that D₁R-H₃R heteromers couple to G_i, but not to G_s, to direct histaminergic input toward the MAPK pathway.

Taken together, it appears that histamine and dopamine antagonism mediated by D₁Rs and H₃Rs may rely on balancing ERK activation in GABAergic neurons where D₁R and H₃R are co-expressed and where D₁R-H₃R heteromerization is likely occurring. Heteromers not only allow neu-

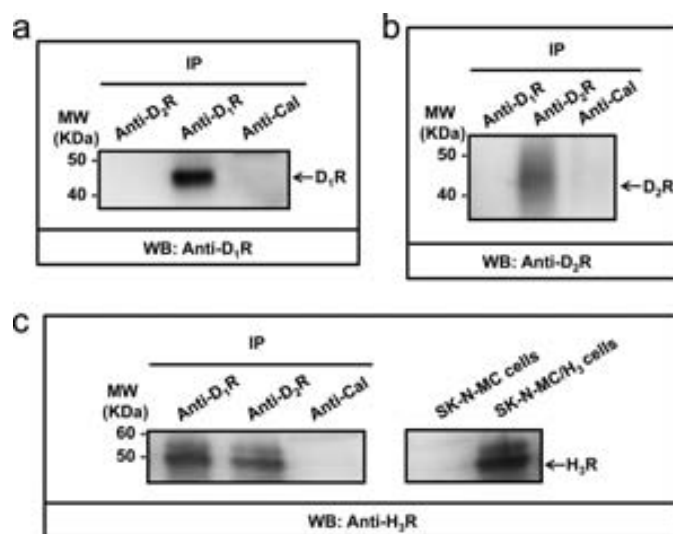


FIGURE 7. Co-immunoprecipitation of H₃R and D₁R or D₂R. Rat striatal membranes were solubilized and processed for immunoprecipitation as described under “Experimental Procedures” using rat anti-D₁R antibody, rabbit anti-D₂R antibody, or rabbit anti-calnexin antibody as negative control. As positive controls and to test the specificity of dopamine receptors antibodies, immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using guinea pig anti-D₁R antibody (a) or guinea pig anti-D₂R antibody (b). To test the co-immunoprecipitation, immunoprecipitates were blotted with goat anti-H₃R antibody (c). The right panel in c corresponds to solubilized membranes from SK-N-MC and SK-N-MC/H₃ cells analyzed by SDS-PAGE and blotted with anti-H₃R antibody to test the specificity of the antibody. IP, immunoprecipitation; MW, molecular mass.

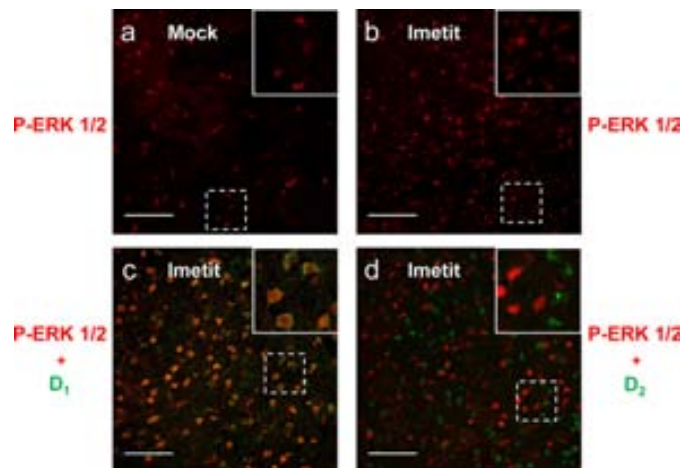


FIGURE 8. Imetit-induced ERK 1/2 phosphorylation in rat striatal GABAergic neurons. Confocal microscopy images of coronal sections from striatal slices were treated with medium (a) or treated with 1 μ M imetit (b–d). Slices were labeled with antiphospho-ERK 1/2 antibody (red). Labeling (green) using an anti-D₁ receptor antibody (c), or an anti-D₂ receptor antibody (d) is also shown. Insets in c and d are 2 \times magnification of the indicated parts of the figure. Scale bars, 100 μ m (a and b) or 80 μ m (c and d). Representative images of coronal sections are displayed.

rons to differentially “sense” a given neurotransmitter, but they serve to process the different signals impacting them at a given time frame (31, 32). Therefore D₁R-H₃R receptor heteromers would be actively involved in controlling the response of striatal neurons of the direct striatal efferent pathway. The qualitative and quantitative output on ERK 1/2 phosphorylation would largely depend on the concentrations of histamine and dopamine impacting neurons expressing D₁R-H₃R complexes.

Acknowledgments—We acknowledge the technical help obtained from Jasmina Jiménez (Molecular Neurobiology Laboratory, Barcelona University) and Mar Castillo (Neuroscience Institute, Universidad Autónoma de Barcelona).

REFERENCES

1. Albin, R. L., Young, A. B., and Penney, J. B. (1995) *Trends Neurosci.* **18**, 63–64
2. Gerfen, C. R. (2004) in *The Rat Nervous System* (Paxinos G., ed) pp. 445–508, Elsevier Academic Press, Amsterdam
3. Thomas, G. M., and Hagan, R. L. (2004) *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 173–183
4. Santini, E., Alcacer, C., Cacciatori, S., Heiman, M., Hervé, D., Greenberg, P., Girault, J. A., Valjent, E., and Fisone, G. (2009) *J. Neurochem.* **108**, 621–633
5. Ryu, J. H., Yanai, K., Iwata, R., Ido, T., and Watanabe, T. (1994) *Neuroreport* **5**, 621–624
6. Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J. C., and Arrang, J. M. (2002) *Neuroscience* **114**, 173–193
7. Hamill, T. G., Sato, N., Jitsuoka, M., Tokita, S., Sanabria, S., Eng, W., Ryan, C., Krause, S., Takenaga, N., Patel, S., Zeng, Z., Williams, D., Jr., Sur, C., Hargreaves, R., and Burns, H. D. (2009) *Synapse* **63**, 1122–1132
8. Arrang, J. M., Garbarg, M., and Schwartz, J. C. (1983) *Nature* **302**, 832–837
9. Leurs, R., Bakker, R. A., Timmerman, H., and de Esch, I. J. (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 107–120
10. Pillot, C., Ortiz, J., Héron, A., Ridray, S., Schwartz, J. C., and Arrang, J. M. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 7272–7280
11. García-Ramírez, M., Aceves, J., and Arias-Montaña, J. A. (2004) *Behav. Brain Res.* **154**, 409–415
12. Arias-Montaña, J. A., Floran, B., Garcia, M., Aceves, J., and Young, J. M. (2001) *Br. J. Pharmacol.* **133**, 165–171
13. Hussain, N., Flumerfelt, B. A., and Rajakumar, N. (2002) *Neuroscience* **112**, 427–438
14. Ferrada, C., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Justinova, Z., Barnes, C., Canela, E. I., Goldberg, S. R., Leurs, R., Lluís, C., and Franco, R. (2008) *Neuropharmacology* **55**, 190–197
15. Ferrada, C., Moreno, E., Casadó, V., Bongers, G., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E. I., Leurs, R., Ferré, S., Lluís, C., and Franco, R. (2009) *Br. J. Pharmacol.* **157**, 64–75
16. Xu, M., Moratalla, R., Gold, L. H., Hiroi, N., Koob, G. F., Graybiel, A. M., and Tonegawa, S. (1994) *Cell* **79**, 729–742
17. Narushima, M., Uchigashima, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., and Kano, M. (2006) *Eur. J. Neurosci.* **24**, 2246–2252
18. Hasbi, A., Fan, T., Aljaniaram, M., Nguyen, T., Perreault, M. L., O'Dowd, B. F., and George, S. R. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 21377–21382
19. Milligan, G., and Bouvier, M. (2005) *FEBS J.* **272**, 2914–2925
20. Pflieger, K. D., and Eidne, K. A. (2006) *Nat. Meth.* **3**, 165–174
21. Franco, R., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Ciruela, F., Ferré, S., Lluís, C., and Canela, E. I. (2008) *Br. J. Pharmacol.* **153**, S90–S98
22. Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A. S., Lluís, C., and Franco, R. (2007) *Trends Neurosci.* **30**, 440–446
23. Ferré, S., Baler, R., Bouvier, M., Caron, M. G., Devi, L. A., Durroux, T., Fuxe, K., George, S. R., Javitch, J. A., Lohse, M. J., Mackie, K., Milligan, G., Pflieger, K. D., Pin, J. P., Volkow, N. D., Waldhoer, M., Woods, A. S., and Franco, R. (2009) *Nat. Chem. Biol.* **5**, 131–134
24. Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Pérez-Capote, K., Ferré, S., Lluís, C., Franco, R., and Canela, E. I. (2009) *Pharmacol. Ther.* **124**, 248–257
25. Ellis, J., Pediani, J. D., Canals, M., Milasta, S., and Milligan, G. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 38812–38824
26. Sánchez-Lemus, E., and Arias-Montaña, J. A. (2004) *Neurosci. Lett.* **364**, 179–184
27. Torrent, A., Moreno-Delgado, D., Gómez-Ramírez, J., Rodríguez-Agudo, D., Rodríguez-Caso, C., Sánchez-Jiménez, F., Blanco, I., and Ortiz, J. (2005) *Mol. Pharmacol.* **67**, 195–203
28. Moreno-Delgado, D., Torrent, A., Gómez-Ramírez, J., de Esch, I., Blanco, I., and Ortiz, J. (2006) *Neuropharmacology* **51**, 517–523
29. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., and Caron, M. G. (1998) *Physiol. Rev.* **78**, 189–225
30. Rashid, A. J., So, C. H., Kong, M. M., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B. F., and George, S. R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 654–659
31. Franco, R. (2009) *Br. J. Pharmacol.* **158**, 23–31
32. Hasbi, A., O'Dowd, B. F., and George, S. R. (2010) *Curr. Op. Pharmacol.* **10**, 93–99