

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



“La activación del receptor a histamina H₃ modula las discinesias inducidas por la administración de L-Dopa a ratas parkinsonianas: posible interacción funcional con el receptor a dopamina D₁”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

PRESENTA

M en C. Lauro Alberto Avila Luna

CO-DIRECTORES DE TESIS

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Dr. Antonio Bueno Nava

Asesor: Dr. Sergio Montes López

Ciudad de México, diciembre 2019

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM (Unidades Iztapalapa y Xochimilco) aprobó la tesis que presentó:

M. en C. Lauro Alberto Avila Luna.

El día 3 de diciembre del 2019.

Jurado:

Presidente: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Secretario: Dr. Antonio Bueno Nava

Vocal: Dr. Sergio Montes López

Vocal: Dr. Paul Carrillo Mora

Vocal: Dr. José Antonio Arias Montaña

Agradecimientos.

¡¡¡¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!!

Al Dr. Antonio Bueno por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por la ayuda que siempre me ha brindado, por su enseñanza, por sus consejos y su gran visión científica, pero sobre todo por la gran amistad invaluable desde hace ya más de dos décadas. Gracias amigo!!!

Al Dr. Camilo Ríos por ser un gran ejemplo a seguir, por su confianza brindada, por abrirme las puertas de su laboratorio y por el constante apoyo, consejos y sugerencias, precisas como siempre. Mi respeto y admiración Dr. Camilo.

Al Dr. Sergio Montes por todo el apoyo incondicional siempre brindado independientemente de esta tesis. Por compartir tu conocimiento, por los consejos, disposición, amabilidad y amistad. Sergio, gracias por enseñarme que la sencillez, naturalidad y las causas nobles no están peleadas con el grado académico.

Al Dr. Paul Carrillo por su compromiso académico, científico y profesional, por sus consejos y asesorías y sobre todo “por ser como es”. Mi admiración hacia usted Dr. Paul.

Al Dr. José Antonio Arias Montaña por el compromiso, su atención, enseñanza y la exquisitez en el compartir de su conocimiento. Dr. Arias, usted es sinónimo de excelencia.

A la M. en C. Carmen Parra por mantener mi estado emocional lo más equilibrado posible, con tu ánimo y compañerismo.

Al Dr. Arturo Gálvez por su compañerismo, apoyo y por las tantas horas de trabajo.

A mis padres

A MEME †

Y por último a ti América, a ti Carlos y a ti Daniela porque cuando el pilar se tambalea.... llegan ustedes como refuerzo y lo sostienen hasta hacerlo más fuerte!!...y se levanta de nuevo.

ÍNDICE

| | Pág. |
|--|------|
| Resumen | 7 |
| Abstract | 9 |
| Abreviaturas..... | 11 |
| 1. Introducción | 13 |
| 2. Antecedentes | 16 |
| 2.1. Ganglios basales (GB) y su organización funcional | 16 |
| 2.2. Núcleos de entrada y de salida de los GB..... | 18 |
| 2.3. Receptores dopaminérgicos en los GB y su participación en la modulación de las neuronas espinosas medianas | 20 |
| 2.4. Enfermedad de Parkinson y el efecto secundario al tratamiento farmacológico con L-Dopa | 23 |
| 2.5. Alteración de los GB en la enfermedad de Parkinson..... | 28 |
| 2.6. Alteración de los GB en las discinesias inducidas por L-Dopa (LIDs) | 28 |
| 2.7. Propiedades farmacológicas de la L-Dopa | 31 |
| 2.8. Participación de los receptores a dopamina D ₁ (RD _{1s}) en las LIDs..... | 34 |
| 2.9. Sistema histaminérgico | 40 |
| 2.10. Participación del receptor a histamina H ₃ (RH ₃) en la modulación estriatal | 45 |
| 2.11. Interacción entre los RH ₃ s y los RD ₁ s | 46 |
| 3. Pregunta de investigación | 48 |
| 4. Hipótesis | 49 |
| 5. Objetivo general | 49 |
| 5.1. Objetivos específicos | 49 |
| 6. Material y Métodos | 50 |
| 6.1. Animales | 50 |

| | |
|---|-----|
| 6.2. Procedimiento quirúrgico e inyección de la 6-OHDA para establecer el modelo de ratas parkinsonianas | 50 |
| 6.2.1. Descripción de la neurotoxina 6 -OHDA..... | 50 |
| 6.2.2. Descripción del procedimiento para inyectar la 6 -OHDA..... | 52 |
| 6.3. Protocolo experimental para inducir las LIDs en ratas parkinsonianas y la administración del fármaco histaminérgico..... | 53 |
| 6.4. Batería para el registro y evaluación de las LIDs | 57 |
| 6.5. Determinación de GABA y glutamato estriatales..... | 58 |
| 6.5.1. Cirugía estereotáxica para la implantación de la guía cánula | 59 |
| 6.5.2. Muestreo bioquímico <i>in vivo</i> y determinación de GABA y glutamato ... | 60 |
| 6.6. Análisis histológico | 61 |
| 6.7. Descripción del estudio y análisis estadístico | 62 |
| 7. Resultados | 64 |
| 7.1. Obtención de ratas parkinsonianas | 64 |
| 7.2. Experimento 1. Expresión de los subtipos de LIDs en los diferentes tratamientos farmacológicos | 65 |
| 7.3. Efecto de la administración de immpip en las LIDs | 66 |
| 7.4. Experimento 2. Efecto de la suspensión de la administración crónica de immpip en las LIDs..... | 77 |
| 7.5. Experimento 3. Efecto de immpip sobre la liberación de GABA y glutamato estriatales | 79 |
| 8. Discusión | 81 |
| 9. Conclusiones | 91 |
| 10. Perspectivas | 92 |
| 11. Referencias | 94 |
| 12. Anexos | 107 |

Resumen

La administración de la L-3,4-Dihidroxifenilalanina (L-Dopa) sigue siendo el tratamiento farmacológico más eficaz para la enfermedad de Parkinson (EP). Sin embargo, el uso prolongado de la L-Dopa produce como efecto secundario movimientos involuntarios anormales conocidos como discinesias inducidas por la L-Dopa (LIDs), que están asociados a la hipersensibilización de los receptores a dopamina D₁ (RD₁s) expresados a nivel del neostriado.

Los receptores a histamina H₃ (RH₃s) co-existen con los RD₁s en las neuronas espinosas medianas (NEMs) estriatales y modulan funcionalmente la respuesta mediada por los RD₁s. En el presente estudio, examinamos si la administración crónica de immapip un agonista de los RH₃s modula las LIDs en ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y en un estudio *in vivo* evaluamos el efecto de la co-activación de los RD₁s y los RH₃s en la liberación de GABA y glutamato en el neostriado de las ratas. Los resultados obtenidos, muestran que la administración crónica de immapip y L-Dopa durante 14 días disminuyó significativamente las puntuaciones y el número total de las LIDs axiales, orolinguales y de las extremidades, en comparación con las ratas que recibieron solo L-Dopa, y en un experimento adicional cuando la administración del immapip fue suspendida, las LIDs reaparecen. La administración de immapip durante cinco días antes de la administración de L-Dopa produce un retraso en la aparición de las LIDs. La administración sistémica de L-Dopa durante 14 días en ratas parkinsonianas

aumentó significativamente las LIDs axiales, orolinguales y de las extremidades, en comparación con las ratas parkinsonianas inyectadas con solución vehículo. Por otro lado, el grupo con la administración crónica de immepip disminuyó la liberación de GABA y de glutamato en el neostriado, en comparación al grupo de ratas parkinsonianas con solución vehículo, mientras que la administración de L-Dopa sola aumentó la liberación de GABA y glutamato. Los resultados indican que la co-estimulación crónica de los RD₁s y los RH₃s post-sinápticos reducen las LIDs y la liberación de GABA y glutamato en el neostriado de la rata y proporcionan evidencia *in vivo* de una interacción funcional entre los RD₁s y los RH₃s en los ganglios basales.

Palabras clave: Dopamina, Histamina, Receptor D₁, Receptor H₃, Discinesias, Neostriado, Enfermedad de Parkinson, L-Dopa, Immepip.

Abstract

The administration of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-Dopa) remains the most effective symptomatic treatment for Parkinson's disease, but the prolonged use of this drug induces in the majority of these patients involuntary movements known as dyskinesias induced by L-Dopa (LIDs), which are associated to hypersensitization of the dopamine D₁ receptors (RD_{1s}) expressed at the level of the striatum.

Histamine H₃ receptors (H₃Rs) and D₁Rs are co-expressed by the sub-population of striato-nigral GABAergic medium spiny neurons (MSNs), and H₃R activation by selective agonist functionally antagonize D₁R-mediated responses. We examined whether the chronic administration of the H₃R agonist immepip modifies LIDs, in rats lesioned with 6-hydroxydopamine in the substantia nigra *pars compacta* (SNc), and the effect of D₁R and H₃R co-activation on glutamate and GABA content in dialysates from the dorsal striatum of naïve rats.

The systemic administration (i.p.) of L-Dopa for 14 days significantly increased axial, limb, and orolingual abnormal involuntary movements (AIMs) compared with the vehicle group. The chronic administration of the H₃R agonist immepip alongside L-Dopa significantly decreased axial, limb, and orolingual AIMs compared with L-Dopa alone, but AIMs returned to previous values on immepip withdrawal. Chronic immepip was ineffective when administered prior to L-Dopa. The chronic administration of immepip significantly decreased GABA and glutamate content in striatal dialysates, whereas the administration of L-Dopa alone increased GABA and glutamate content. In conclusion, our results indicate that chronic H₃R activation

reduces LIDs, and the effects on striatal GABA and glutamate release provide evidence for a functional interaction between D₁Rs and H₃Rs.

Keywords: Dopamine, Histamine, D₁ receptor, H₃ receptor, Dyskinesia, Striatum, Parkinson's disease, L-Dopa, immepip.

Abreviaturas:

| | |
|------------------|---|
| 6-OHDA | 6- Hidroxidopamina |
| AC | Adenilil ciclase |
| AIMs | Movimientos involuntarios anormales |
| AMPc | 3'-5'-Monofosfato cíclico de adenosina |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| COMT | Catecol – O-metiltransferasa |
| DA | Dopamina |
| DARPP-32 | Proteína regulada por dopamina y por AMPc de 32 KDa |
| DDC | DOPA descarboxilasa |
| EP | Enfermedad de Parkinson |
| ERK | Cinasa regulada por señal extracelular |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GB | Ganglios basales |
| GPe | Globo pálido externo |
| GPi | Globo pálido interno |
| L-Dopa | L-3,4-dihidroxifenilalanina |
| LIDs | Discinesias inducidas por la administración de L-Dopa |
| LNAAs | Sistema de aminoácidos neutros |
| LTP | Potenciación a largo plazo |
| LTD | Depresión a largo plazo |
| MAO _A | Monoamina oxidasa A |
| MAO _B | Monoamina oxidasa B |
| MAPKs | Cinasas de proteína activadas por mitógenos |
| MTPT | 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina |

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| NEMs | Neuronas espinosas medianas |
| PKA | Cinasa A de proteínas |
| PKC | Cinasa C de proteínas |
| RD ₁ | Receptor a dopamina D ₁ |
| RH ₃ | Receptor a histamina H ₃ |
| SNc | Sustancia negra parte compacta |
| SNr | Sustancia negra parte reticulada |
| STN | Núcleo subtalámico |
| TH | Hidroxilasa de tirosina |
| Thr34 | Treonina 34 |
| Thr75 | Treonina 75 |

1 Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en todo el mundo (Connolly y Lang, 2014), se origina por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas ubicadas en la sustancia negra parte compacta (SNc) (Surmeier y cols., 2017), que es una de las estructuras que conforman los ganglios basales (GB). Los GB son estructuras neuronales subcorticales críticamente involucradas en el aprendizaje y la ejecución de programas motores (Bolam y cols., 2000). Aunque ninguna terapia disponible modifica el proceso neurodegenerativo subyacente, el tratamiento sintomático mejora la calidad de vida del paciente parkinsoniano (Connolly y Lang, 2014). A pesar de las nuevas estrategias terapéuticas, la administración de la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) sigue siendo el tratamiento sintomático más eficaz para la EP. Sin embargo, el uso prolongado de la L-Dopa produce como efecto secundario en la mayoría de los pacientes los movimientos involuntarios anormales (AIMs) conocidos como discinesias (Huot y cols., 2013).

Las discinesias inducidas por la administración crónica de L-Dopa (LIDs) están relacionadas con un aumento de los niveles de la dopamina (DA) estriatal, las alteraciones en la distribución celular de los receptores a DA D₁ (RD_{1s}), la sensibilización de su señalización intracelular y la expresión génica anormal de dichos receptores por la subpoblación de neuronas espinosas medianas (NEMs) estriado-nigrales, dan lugar a cambios en la transmisión dopaminérgica de los GB

a niveles pre- y post-sinápticos (Bastide y cols., 2015; Carta y Bezard, 2011; De la Fuente-Fernández y cols., 2004; Porrás y cols., 2014; Spigolon y Fisone, 2018).

Por otro lado, los GB están inervados por fibras histaminérgicas provenientes del núcleo tuberomamilar hipotalámico (Rapanelli, 2017), y son el neostriado, el globo pálido y la sustancia negra parte reticulada (SNr), las estructuras de los GB que expresan una alta densidad de receptores a histamina H₃ (RH₃s) (Pillot y cols., 2002). Los RD₁s y los RH₃s son co-expresados por la subpoblación de NEMs estriado-nigrales que dirigen sus eferencias a los núcleos de salida de los GB, conocida como “vía directa” (González-Sepúlveda, 2013), y varios estudios han demostrado una interacción funcional entre los RD₁s y los RH₃s en las NEMs (Arias-Montaño y cols., 2001; García y cols., 1997; Moreno y cols., 2011; Ryu y cols., 1994a). A nivel pre-sináptico, la activación de los RH₃s con el agonista immpip reduce la liberación de [³H]-GABA inducida con la estimulación de los RD₁s tanto en el neostriado como en la SNr (Arias-Montaño y cols., 2001; García y cols., 1997). A nivel post-sináptico, la activación de los RH₃s inhibe la acumulación del 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) inducida por los RD₁s (Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004). Como dato adicional, la interacción funcional entre los RD₁s y los RH₃s juega un papel importante para la modulación de cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs) (Moreno y cols., 2011).

En un estudio previo se reportó que una sola inyección sistémica de immpip (1, 5 y 10 mg/kg, s.c.), no reduce las discinesias axiales, orolinguales y de las extremidades inducidas por la administración crónica de L-Dopa en ratas lesionadas con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el haz prosencefálico medial

(Papathanou y cols., 2014). Adicionalmente, los autores mencionaron que la administración de immapip en los monos lesionados con la 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina (MPTP) reduce la discapacidad motora y las LIDs de baja intensidad. Sin embargo, las dosis altas de 5 o 10 mg/ kg, s.c producen náuseas y vómito en los animales, siendo estos efectos secundarios que alteraron el comportamiento motor y dificultaron el estudio. Por lo anterior se concluye que la administración aguda del fármaco agonista para los RH₃s no produce efectos significativos en las LIDs y que las dosis altas > 5 mg/ kg pueden producir efectos secundarios. Sin embargo, se desconoce si la administración crónica del agonista del RH₃ immapip, tiene un efecto sobre las LIDs, por lo tanto, en el presente estudio el objetivo fue determinar si la administración crónica del agonista H₃ immapip (1 mg/ kg, i.p.) podría tener efectos benéficos sobre las LIDs en ratas parkinsonianas lesionadas con 6-OHDA.

2 Antecedentes

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después del Alzheimer, con una prevalencia del 1% en la población mayor a 65 años y se caracteriza por una lenta y progresiva degeneración de neuronas dopaminérgicas de la SNc con la subsecuente disminución de DA liberada en el neocórtex. La pérdida neuronal dopaminérgica es la principal causa de los signos cardinales de bradicinesia, de la rigidez de las extremidades, de la lentitud de los movimientos e inestabilidad postural de los pacientes parkinsonianos (Moore y cols., 2005). Estos signos motores son indicadores de la alteración funcional de los GB, y éstos son un conjunto de núcleos neuronales importantes en el control motor.

2.1. Ganglios basales (GB) y su organización funcional

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales conformados por el neocórtex (caudado y putamen), el núcleo subtalámico (STN), la sustancia negra (SNc y SNr), el globo pálido tanto su segmento interno (GPi) como el externo (GPe) (Bolam y cols., 2000). Los GB están organizados funcionalmente en cuatro circuitos: el asociativo, el óculo-motor, el límbico y el motor (Alexander y Crutcher, 1990). En el circuito motor, los GB están interconectados con la corteza cerebral y el tálamo por aferentes (Bolam y cols., 2000; Wichmann y Dostrovsky, 2011), por ejemplo, la vía cortico-estriatal estimula a las NEMs GABAérgicas localizadas a nivel estriatal. Las

NEMs conforman el 95% del total de las neuronas estriatales y son divididas en dos subpoblaciones con eferencias a los núcleos de salida de los GB, una subpoblación de NEMs proyecta sus axones directamente a la SNr y conforma la vía directa (vía estriado-nigral), estas neuronas expresan los RD_{1s}, dinorfinas y sustancia P (Gerfen, 1992). La segunda subpoblación conforma la vía indirecta y son NEMs que proyectan sus axones al GPe y éste envía sus eferencias al STN, que a su vez proyecta sus eferencias glutamatérgicas al GPi y a la SNr. Las neuronas estriado-palidales de la vía indirecta expresan receptores a DA D₂ (RD_{2s}) y encefalinas (Gerfen y cols., 1990).

La estimulación cortico-estriatal a las NEMs estriado-nigrales incrementa la liberación de ácido γ -aminobutírico (GABA) tanto en la SNr como a nivel del neostriado por sus axones colaterales. Asimismo, la estimulación cortico-estriatal a las NEMs estriado palidales incrementa la liberación de GABA tanto a nivel estriatal como a nivel palidal. Ambas vías, directa e indirecta son moduladas por la DA liberada de axones nigro-estriatales. La DA liberada a nivel estriatal estimula a los RD_{1s} y a los RD_{2s} localizados en la membrana de las NEMs, facilitando la liberación de GABA e inhibiéndola, respectivamente. Así, la vía directa facilita la ejecución de programas motores asociados con la facilitación de los movimientos deseados, mientras que la vía indirecta está asociada con la inhibición de los movimientos no deseados (Alexander y Crutcher, 1990) (Figura 1).

2.2. Núcleos de entrada y de salida de los GB

El neostriado es el núcleo de entrada de los GB y recibe múltiples aferencias incluidas las dopaminérgicas provenientes de la SNc (Haber, 2016), las serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal y medial (Lavoie y Parent, 1990), las noradrenérgicas provenientes del locus coeruleus (Delfs y cols., 1998), las acetilcolinérgicas del núcleo pedunculopontino y las aferencias glutamatérgicas corticales, talámicas y subtalámicas (Castle y cols., 2005; Groenewegen y cols., 1999). Una de las características de las aferencias glutamatérgicas de la corteza frontal es su organización topográfica (Kunzle, 1975; McGeorge y Faull, 1989). Tanto en el humano como en los primates, las NEMs putaminales proyectan sus axones al GPi y la SNr (Somogyi y Smith, 1979), ambos son los núcleos de salida de los GB. Las neuronas de estos dos núcleos de salida de los GB envían eferencias GABAérgicas a los núcleos talámicos anterior ventral y lateral, además del locus coeruleus (DeLong, 1990). A su vez, los núcleos talámicos proyectan sus axones glutamatérgicos a las áreas corticales conformando el circuito cortico-ganglios basales-tálamo-cortical (Herkenham, 1979) (Figura 1).

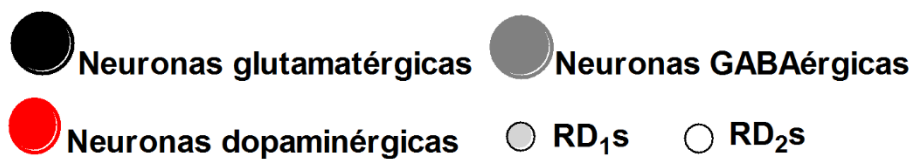
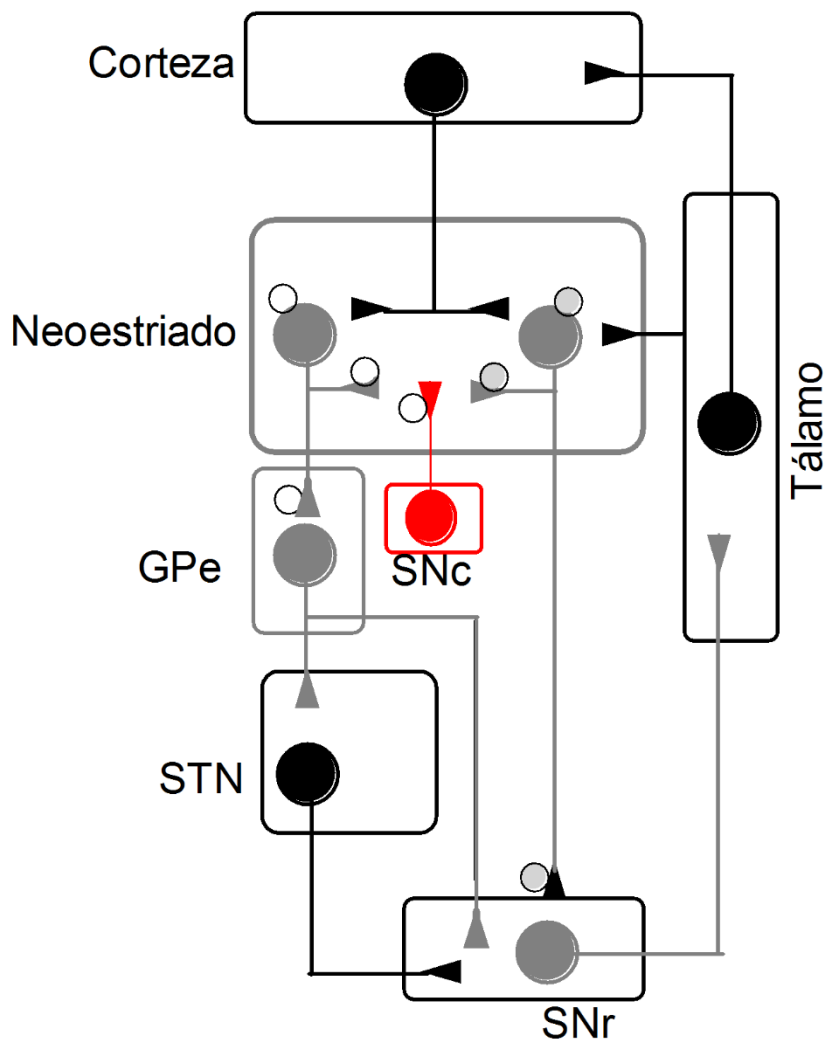


Figura 1: Los ganglios basales y su organización funcional representativa al circuito motor, se aprecia la interacción con la corteza y el tálamo, las vías estriado-nigral (vía directa) y estriado-palidal (vía indirecta) así como la naturaleza de las distintas neuronas y receptores que conforman el circuito. Globo pálido externo (GPe), núcleo subtalámico (STN), sustancia negra parte compacta (SNc) y parte reticulada (SNr), receptores a dopamina D₁ (RD₁s) y receptores a dopamina D₂ (RD₂s).

2.3. Receptores dopaminérgicos de los GB y su participación en la modulación de las neuronas espinosas medianas

La DA se une a 5 subtipos de receptores dopaminérgicos (RD_{1s}, RD_{2s}, RD_{3s}, RD_{4s} y RD_{5s}) acoplados a proteínas G (Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Los receptores dopaminérgicos activan la señalización mediada por la cinasa A de proteínas (PKA) a través de las proteínas G (Beaulieu y cols., 2007). La familia de los RD_{1s} (subtipos RD_{1s} y RD_{5s}) se acoplan a las proteínas G α_s y su activación aumenta la producción de AMPc y la actividad catalítica de la PKA (Civelli y cols., 1993). En contraste, la familia de los RD_{2s} (subtipos RD_{2s}, RD_{3s} y RD_{4s}) se acoplan a las proteínas G $\alpha_{i/o}$, y su activación inhibe a la adenilil ciclasa (AC), la formación de AMPc y la activación de fosfatasas que desfosforilan a canales de calcio, disminuyendo así la excitabilidad de las neuronas estriado-palidales (Missale y cols., 1998).

Las NEMs estriatales expresan altos niveles de RD_{1s} y RD_{2s} (Groenewegen, 2003; Kreitzer y Malenka, 2008) y la activación de dichos receptores modula la excitabilidad de las NEMs (Surmeier y cols., 2007). Los RD_{1s} están localizados en la membrana de la región somatodendrítica y en las terminales sinápticas de las NEMs de proyección estriado-nigral (vía directa), y su activación con agonistas dopaminérgicos se ha relacionado con efectos tanto excitatorios como inhibitorios (Surmeier y cols., 2007). Mientras que, la activación de los RD_{2s} localizados en NEMs de proyección estriado-palidal (vía indirecta) está asociada con efectos inhibitorios. Además, los RD_{2s}, pero no los RD_{1s}, se localizan en las terminales dopaminérgicas nigro-estriatales (Arias-Montaña y cols., 2001; García y cols., 1997). La activación de los RD_{1s}, acoplados a las proteínas G α_{olf} aumenta la función

catalítica de la AC y subsecuentemente la concentración AMPc, a partir del trifosfato de adenosina (ATP). El AMPc induce la disociación de las subunidades reguladoras de las catalíticas de la PKA y posteriormente la PKA fosforila el canal de Ca^{2+} tipo L, aumentando la frecuencia de disparo (Surmeier y cols., 2007). Se ha demostrado que la estimulación de los $\text{RD}_{1\text{s}}$ con el fármaco agonista SKF-38393 facilita la liberación de GABA en el neocórtex y la SNr (Arias-Montaña y cols., 2001; García y cols., 1997). Los efectos producidos en las NEMs después de la activación de los $\text{RD}_{1\text{s}}$ son el aumento en la tasa de disparo de potenciales de acción y la liberación de GABA, efectos mediados por la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L y P/Q respectivamente (Flores-Hernández y cols., 2000) (Figura 2). Por el contrario, la estimulación de los $\text{RD}_{2\text{s}}$ con fármacos agonistas está asociada con la reducción de la excitabilidad de las NEMs mostrando una reducción en la tasa de disparo de potenciales de acción y la reducción de la liberación de GABA.

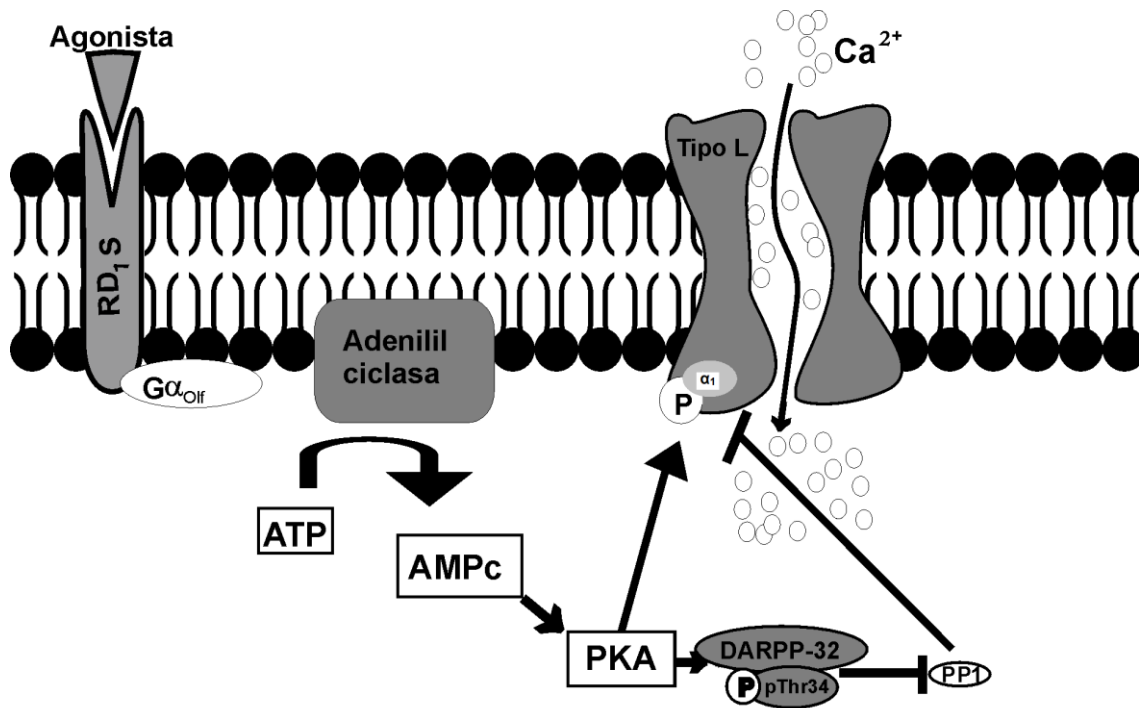


Figura 2: Efecto producido después de la activación del RD₁ post-sináptico en la membrana de una neurona espinosa mediana (NEM). La activación del RD₁ acoplado a proteína G α_{Olf} aumenta la función catalítica de la adenilil ciclasa y subsecuentemente, la concentración citosólica del AMPc, a partir del trifosfato de adenosina (ATP). El AMPc induce la disociación de las subunidades reguladoras de las catalíticas de la cinasa A de proteína (PKA), y posteriormente la PKA fosforila el canal de calcio tipo L. Esquema modificado de Bueno Nava y cols., (2011).

2.4. Enfermedad de Parkinson y el efecto secundario al tratamiento farmacológico con L-Dopa

En la EP, los estudios post-mortem han demostrado la presencia de cuerpos de inclusión intraneuronales conocidos como cuerpos de Lewy, que son inclusiones eosinofílicas citoplasmáticas compuestas por un núcleo de material granular y filamentoso, rodeado por filamentos radiales y con un diámetro de 10-15 nm formados principalmente de agregados de α -sinucleína además de la proteína sinfilina-1 y proteínas del proteosoma del citoesqueleto (Schapira y Jenner, 2011).

Aunque la fisiopatología de la EP no ha sido del todo esclarecida, las evidencias recientes han indicado alteraciones en la función mitocondrial, el estrés oxidativo y nitrosativo, la acumulación de proteínas aberrantes o con alteraciones en su plegamiento, así como la función anómala del sistema ubiquitina-proteosoma. Dichas alteraciones pueden representar los principales eventos responsables a nivel molecular de las formas idiopáticas de la EP (Moore y cols., 2005).

Por otro lado, la lenta y progresiva degeneración de neuronas dopaminérgicas de la SNc y la subsecuente disminución de DA liberada en el neostriado, son la principal causa de los signos cardinales manifestados por el paciente como la rigidez, la lentitud de movimientos e inestabilidad postural, que son también utilizados para el diagnóstico clínico de la EP (Moore y cols., 2005).

Para contrarrestar los trastornos hipocinéticos de la EP, desde la década de 1960 se ha utilizado como tratamiento farmacológico la administración de L-Dopa, que es el precursor de la DA (Carlsson y cols., 1957; Friedhoff y cols., 1963). Sin embargo, después del uso prolongado de la L-Dopa, los efectos favorables iniciales del tratamiento son comprometidos por la manifestación de LIDs, que son movimientos hipercinéticos involuntarios manifestados cuando va incrementándose el pico en la concentración de L-Dopa en plasma (Duvoisin, 1974; Fahn, 1974; Marsden y Parkes, 1976; Mueller y cols., 2007). Las LIDs son una complicación motora severa que es comúnmente expresada como una mezcla de corea (flujo irregular de movimientos en fases rápidas y lentas) y distonía (trastorno hipercinético del movimiento que causa contracciones musculares sostenidas o intermitentes que producen movimientos repetitivos, posturas anormales o ambos) (Fahn, 2000). La distonía puede afectar diferentes partes del cuerpo: los ojos (blefarospasmo), la parte inferior de la cara (distonía oromandibular), el cuello (anterocolis, laterocolis o retrocolis), el torso (distonía truncal, camptocormia, pleurotonus) y brazos (por calambres). Dentro de las LIDs, la distonía es un signo predominante después de la administración de la L-Dopa (Kuyper y cols., 2011).

En la clínica las LIDs pueden clasificarse en discinesias de beneficio, en distonías “off” y discinesias bifásicas (Fahn, 1974; Kuyper y cols., 2011). Las discinesias de beneficio se presentan durante la elevación máxima de la concentración plasmática de la L-Dopa (LIDs “on” o de “pico de dosis”), cuando el paciente goza de buena movilidad y la expresión clínica más frecuente son los movimientos estereotipados faciales o bucolinguales, movimientos coreiformes, distonía de las extremidades o

posturas corporales anormales (Hinson, 2010). Este tipo de LIDs es la más típica y aunque el término “pico de dosis” pareciera sugerirnos que solo se presentan en los momentos del pico plasmático más elevado, en realidad en la práctica los pacientes suelen cursar con las LIDs en toda la duración del periodo “on”, es decir, ocurre paradójicamente en el momento en el que cursa con los beneficios clínicos de la L-Dopa sobre la rigidez y la bradicinesia (Fabbrini y cols., 2007). Las LIDs ocurren en aproximadamente el 90% de los pacientes con EP tratados con L-Dopa (Ahlskog y Muentner, 2001) y su manifestación se observa de 4 a 6 años de haber iniciado el tratamiento con la L-Dopa (Ahlskog y Muentner, 2001) y una vez establecidas, son provocadas en cada administración de la L-Dopa (Rascol, 2000). Además, las LIDs aumentan en severidad con más dosis administradas de la L-Dopa (Fahn y cols., 2004) y son también discapacitantes, causando un impacto negativo en la calidad de vida (Chapuis y cols., 2005). Se ha descrito, que la aparición de las discinesias guarda una relación directamente proporcional con el tiempo y la dosis utilizada de L-Dopa, ya que un inicio de la EP menor a los 50 años y la dosis mayor a 600 mg/día se asocia con un mayor riesgo de la aparición de las LIDs (Grandas y cols., 1999). En lo que se refiere a las distonías en “off”, la aparición se da durante los periodos en los que el paciente no se encuentra bajo los efectos de la medicación, pero entre el 20 y el 30% de los pacientes con EP desarrollan este tipo de discinesia a los 3 años. La semiología de la distonía “off” es más homogénea, caracterizada por la aparición de posturas distónicas que con frecuencia afectan a un pie. Suele aparecer en los periodos “off”, siendo característica la presentación matutina previa a la toma de medicación de la mañana (distonía “off” matutina). Las discinesias bifásicas se definen como aquellas que aparecen durante los periodos en los que la

L-Dopa empieza a hacer efecto o está dejando de hacer efecto. Además, suponen una situación intermedia, en la que el paciente tiene una mala movilidad en determinados segmentos corporales y buena movilidad en otros. Semiológicamente se presentan con afectación característica de las extremidades inferiores y habitualmente consisten en movimientos repetitivos de abducción-aducción en las extremidades, que resultan especialmente invalidantes para la marcha. Pueden aparecer en un mismo paciente tras la ingesta de L-Dopa tanto en su inicio de acción como al final de la misma o exclusivamente en uno de los periodos (Fabbrini y cols., 2007; Grandas y cols., 1999; Rascol y cols., 1998).

Tabla 1.- Fármacos empleados comúnmente en el manejo de la enfermedad de Parkinson.

| Fármaco | Dosis inicial (mg) | Posología | Dosis de mantenimiento (mg/día) | Mecanismo de acción |
|---|--------------------|-----------|---------------------------------|--|
| USADOS EN MANIFESTACIONES MOTORAS | | | | |
| Rasagilina | 1 | Cada 24 h | 1 | Inhibidor de la MAO-B |
| Levodopa/ carbidopa | 50/12.5 | Cada 8 h | 300/75-1000/10 | Promueve síntesis de dopamina/ inhibidor de la dopa descarboxilasa |
| Rotigotina | 2 | Cada 24 h | 6 - 8 | Agonista de los RD _{1s} |
| Ropinirol | 0.25 | Cada 24 h | 1.5-3 / 8-24 | Agonista de los RD _{2s} |
| Apomorfina | 1-10 | Según | 3-30 | Agonista de los RD _{1s} y RD _{2s} |
| Entacapona | 200 | Cada 8 h | 600-2000 | Inhibidor de la COMT |
| Tolcapona | 100 | Cada 8 h | 300-600 | Inhibidor de la COMT |
| USADOS EN DISCINESIAS/ FLUCTUACIONES MOTORAS | | | | |
| Amantadina | 100 | Cada 24 h | 200 (2 tomas) | Antagonista del receptor NMDA |
| Safinamida | 50 | Cada 24 h | 50-100 | Inhibidor de la MAO-B |

2.5. Alteración de los GB en la enfermedad de Parkinson

El modelo clásico del circuito de los GB se ha utilizado para describir la fisiopatología de la EP. A partir de este modelo, se explica que los síntomas motores de la enfermedad se producen como resultado del desequilibrio entre las vías directa e indirecta causadas por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales. Mientras que las neuronas estriado-nigrales de la vía directa reducen su actividad, las neuronas estriado-palidales de la vía indirecta aumentan su actividad y conducen a la inhibición del GPe y la posterior desinhibición de las neuronas glutamatérgicas del STN (Albin y cols., 1989). Por lo tanto, con la reducción de la concentración de DA y la alteración de la vía directa e indirecta, se conduce a la inhibición de los núcleos talámicos motores. El efecto resultante es la reducción en la activación de las áreas corticales motoras en la corteza motora sensorial primaria (Rascol y cols., 1992) y el área motora suplementaria (Bezard y cols., 2001) (Figura 3B).

2.6. Alteración de los GB en las discinesias inducidas por L-Dopa (LIDs)

La fisiopatología de las LIDs describe el estado funcional opuesto al de la EP, en donde el papel de la vía directa sugiere una sobre estimulación de los núcleos de salida de los GB causada presumiblemente por la sobre activación de los RD₁s de las NEMs estriado-nigrales (Boraud y cols., 2001; Lozano y cols., 2000; Papa y cols.,

1999). La sobre estimulación de la vía directa en las LIDs se ha demostrado a nivel celular a partir del: (1) incremento en la expresión del ARNm de pre-proencefalina-B (PPE-B) y prodinorfinas estriatales (Aubert y cols., 2007; Cenci y cols., 1998) y (2) hipersensibilización de los RD₁s estriatales (Aubert y cols., 2005). Por otro lado, la activación de los RD₂s de la vía indirecta conlleva a la hipoactividad de las NEMs estriado-palidales, provocando la desinhibición del GPe y la posterior inhibición del STN. A su vez, la desinhibición de los núcleos talámicos, resultando con el incremento de la liberación de glutamato a las áreas corticales motoras, que se traduce en el trastorno hipercinético en los pacientes parkinsonianos que manifiestan las LIDs (Brooks y cols., 2000; Rascol y cols., 1998) (Figura 3C).

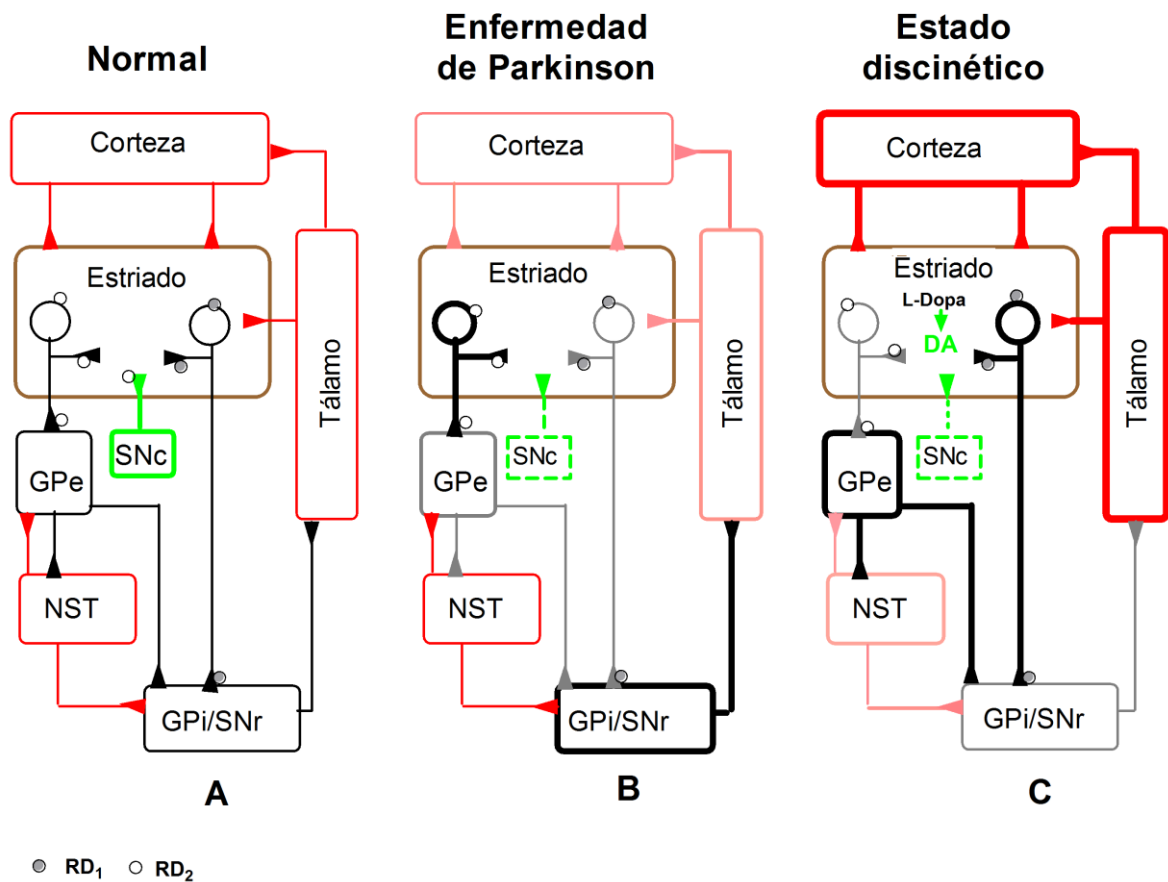


Figura 3: Circuito de los ganglios basales (GB) que ilustra la funcionalidad en tres distintos estados: normal (A), parkinsoniano (B) y discinético (C). La dopamina (DA) liberada a nivel del neostriado modula los efectos funcionales opuestos en las dos principales vías de proyección del neostriado (directa e indirecta). A) Estado normal del circuito motor; B) Estado del circuito motor en la enfermedad de Parkinson, en donde se aprecia, que la pérdida de DA endógena causa una actividad neuronal anormal que conduce a una reducción en la excitación y en la retroalimentación a la corteza; C) Estado discinético. La administración repetida de la L-Dopa en la enfermedad de Parkinson, induce un incremento en la vía tálamo-cortical. El grueso de las líneas en los diferentes colores corresponde a la actividad “alta o baja” en cada una de las proyecciones neuronales.

2.7. Propiedades farmacológicas de la L-Dopa

La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima responsable de catalizar la conversión del aminoácido L-tirosina a L-Dopa. La TH requiere oxígeno y los cofactores tetrahidrobiopterina y hierro para metabolizar la L-tirosina en L-Dopa (Nagatsu, 1995). La L-Dopa se cataboliza a DA por la enzima Dopa descarboxilasa (DDC), que requiere fosfato de piridoxal como cofactor (Opackajuffry y Brooks, 1995) (Figura 4). La DDC también se encuentra en el sistema sanguíneo periférico, por lo que la L-Dopa se administra con un inhibidor de DDC para evitar el catabolismo periférico y aumentar la concentración de L-Dopa a nivel cerebral. La inhibición de DDC permite reducir las dosis de L-Dopa requeridas hasta en un 60-80% (Hauser, 2009). Al menos 50-75 mg del inhibidor de DDC es necesario como dosis paralela a la L-Dopa diaria (LeWitt, 2008).

A nivel intestinal, la L-Dopa se absorbe en el duodeno y el yeyuno proximal mediante transporte activo a través del sistema de aminoácidos neutros (LNAA). La L-Dopa también se transporta activamente al cerebro a través del sistema LNAA (Lewitt, 1993) presente en las células endoteliales y de astrocitos (Inyushin y cols., 2012). Una vez en el cerebro, la L-Dopa se cataboliza a DA por la acción de la enzima DDC como se mencionó anteriormente. La DDC se encuentra en las neuronas catecolaminérgicas en el cerebro, principalmente en las neuronas dopaminérgicas y sus proyecciones, así como en otros sistemas como el serotoninérgico, incluidas las aferencias serotoninérgicas que recibe el neostriado. También interneuronas estriatales albergan a la enzima DDC (Arai y cols., 1996). Por lo anterior, son varios

los sitios donde la L-Dopa se metaboliza en DA en cerebro, incluyendo al neoestriado. Sin embargo, es el sistema dopaminérgico el que cuenta con la maquinaria necesaria para el control de la liberación de la DA (Pagano y cols., 2017).

Después de la liberación sináptica, la DA activa a los receptores dopaminérgicos, a los que se une con afinidad de moderada a alta (Missale y cols., 1998). La DA extracelular es transportada a la terminal dopaminérgica por el transportador de la DA (DAT) (Torres y cols., 2003). En la terminal dopaminérgica, la DA es almacenada en las vesículas por el transportador monoaminérgico vesicular tipo 2 (VMAT 2) (Zheng y cols., 2006) y si no es almacenada, es degradada por enzimas citosólicas. Cuando la DA no es recapturada, o no es almacenada a nivel citosólico, la DA es metabolizada por la enzima monoamino oxidasa B (MAO_B) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT), ambas son enzimas importantes para modular la duración de DA tanto en el espacio extracelular como a nivel citosólico (Fenelon y cols., 2003). La monoamino oxidasa A (MAO_A), la aldehído deshidrogenasa y la aldehído reductasa también están implicadas en la degradación de la DA. La MAO_A metaboliza a la DA a nivel citosólico de la terminal dopaminérgica, mientras que la MAO_B metaboliza la DA tanto en neuronas dopaminérgicas como en células gliales. Las MAOs y las COMTs catabolizan la DA en ácido 4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y en ácido homovanílico (HVA) (Youdim y cols., 2006). Los datos clínicos estiman una vida media de la L-Dopa de aproximadamente 1.5-2 h (Hauser y cols., 2011), después de su administración oral, los niveles plasmáticos máximos (T_{max}) se alcanzan 1 h después de la ingesta (Olanow y cols., 1991). El T_{max} y la

concentración de los niveles plasmáticos máximos (Cmax) son variables y dependen de la dosis administrada, así como del tiempo transcurrido desde la última comida o el tiempo de vaciamiento gástrico. Después de la administración de L-Dopa y el inhibidor de la DDC a dosis de 100/ 25 mg respectivamente, los niveles plasmáticos de la L-Dopa alcanzan una concentración plasmática máxima de 6-10 nmol/ ml. El umbral para el efecto clínico mínimo se estima en alrededor de los 7 nmol/ ml (Dethy y cols., 1997). Los niveles plasmáticos de L-Dopa son de 10-15 veces más altos que los niveles de DOPA en el líquido cefalorraquídeo ventricular (Woodward y cols., 1993).

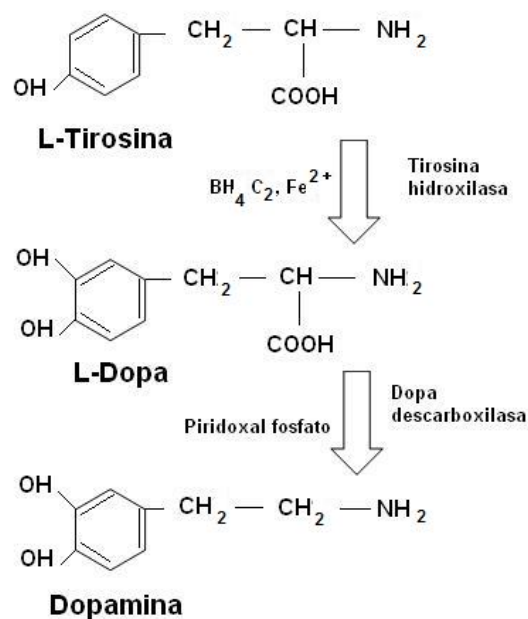


Figura 4: Síntesis de la dopamina.

2.8. Participación de los receptores a dopamina (RD₁s) en las LIDs

El mecanismo de la génesis de las discinesias aún no está completamente esclarecido y como se mencionó anteriormente, una de las hipótesis está asociada con el proceso de sensibilización de los RD₁s estriatales (Pavon y cols., 2006; Valastro y cols., 2007). Estos cambios en la membrana de las NEMs conducen a una mayor actividad o excitabilidad que culminan con la sobre expresión de proteínas y enzimas que indican la sobre actividad de la vía directa, tales como: la enzima adenil ciclasa (AC), PKA, DARPP-32 y Cdk5 (Aubert y cols., 2005; Santini y cols., 2007). Como se mencionó previamente, la estimulación prolongada de los RD₁s induce una reorganización anormal de los RD₁s en la membrana plasmática de las NEMs, así como la sobre expresión de los RD₁s (Berthet y cols., 2009). La disminución de la inervación dopaminérgica nigro-estriatal induce cambios moleculares de transducción de señales en las neuronas de los GB la que es asociada a una respuesta compensatoria, los cambios celulares y funcionales particularmente en la vía directa se conoce como “supersensibilidad a la denervación de axones dopaminérgicos” (Bordet y cols., 2000). La hipersensibilidad se ha demostrado en los niveles de expresión de ARNm para sustancia P y dinorfinas, ambos marcadores de las NEMs que conforman la vía directa (Cenci y cols., 1998), así como en la regulación de más de 30 genes, de los que están incluidos los zif 268, c-fos, c-jun y MAPK-1, la mayoría de estos son relacionados con la actividad neuronal y varios de estos genes y proteínas modificadas se involucran en la expresión del RD₁ y en sus vías de transducción de señales (Napolitano y cols., 2002).

Esto sugiere que la DA sintetizada con L-Dopa activa a los RD₁s, aumentando la expresión de genes y estimulando la vía directa (Bordet y cols., 2000).

Se ha demostrado la reorganización en el acoplamiento de los RD₁s en las proteínas G α_{olf} de ratas parkinsonianas, sin embargo, el nivel de la expresión de la proteína de G α_{olf} se mantuvo sin cambios (Cai y cols., 2002).

Por otro lado, los estudios post-mortem en pacientes parkinsonianos mostraron incremento en la expresión de las proteínas G α_{olf} (Corvol y cols., 2004). Estudios recientes en animales parkinsonianos han corroborado el aumento persistente en la expresión de las proteínas G α_{olf} en ratones discinéticos (Alcacer y cols., 2012). La activación de los RD₁s induce la actividad de la AC (isoforma V) por acoplamiento de la proteína G α_{olf} , que a su vez induce el aumento de AMPc y la activación de PKA. La activación de los RD₁s hipersensibilizados y acoplados a las proteínas G α_{olf} produce en las NEMs el aumento de la tasa de disparo y de la liberación de GABA tanto en el neostriado como en la SNr (Arias-Montaña y cols., 2007; Napolitano y cols., 2002).

Asimismo, se ha descrito que el agotamiento de DA estriatal hipersensibiliza la vía directa a través de los RD₁s (Feyder y cols., 2011), y el aumento constante de la actividad y de la expresión de la AC V/VI que se produce en NEMs de animales discinéticos (Rangel-Barajas y cols., 2011).

Los cambios en la AC V/VI se correlacionan con el aumento en la liberación de GABA en la SNr de ratas discinéticas con grado severo y no sucede en aquellas con discinesias leves. La evidencia sugiere que esta hipersensibilización subyace

en las LIDs, y que la intensidad de los síntomas discinéticos se correlaciona con la expresión de genes inmediatos como los FosB en los roedores (Pavon y cols., 2006). La administración de agonistas selectivos para los RD₁s también induce las discinesias y aumenta la expresión del gen FosB en el neostriado lesionado, lo que indica que las LIDs pueden ser desencadenadas por la estimulación de los RD₁s.

Otra relación importante entre los RD₁s y las LIDs se produce mediante la vía de señalización y la activación de la fosfoproteína DARPP-32, que desempeña un papel importante en la regulación de la eficacia en la neurotransmisión dopaminérgica. En condiciones basales la fosforilación de DARPP-32 en Thr34 es baja y alta en Thr75, Ser97, y residuos Ser130 (Santini y cols., 2007). En un estudio en animales con reducción dopaminérgica exhibieron hipersensibilización de los RD₁s después de la administración de L-Dopa, reflejándose en el incremento de la fosforilación de DARPP-32 en Thr34, dando lugar a cambios en la cascada de señalización y la activación de la transcripción de genes como los Arc, c-Fos, FosB y ZIF-268 en las NEMs de la vía directa (Santini y cols., 2007). También se ha indicado el aumento de la fosforilación de DARPP-32 en Thr34 en la denervación dopaminérgica y este cambio no se ha asociado con una mayor liberación de GABA (Fienberg y cols., 1998; Nishi y cols., 2011).

La potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) son dos tipos de plasticidad sináptica que modifican la eficacia de la neurotransmisión en las NEMs (Calabresi y cols., 2008). La LTP se pierde en animales parkinsonianos (Centonze y cols., 1999), y con el tratamiento de L-Dopa la restaura, pero no en aquellos que presentan las LIDs (Picconi y cols., 2003). La activación de la vía de

los RD₁s/ DARPP-32 es importante en la inducción de la LTP y LTD ya que ambas se pierden en ratones nocaout que carecen de la fosfoproteína DARPP-32 (Calabresi y cols., 2000).

Por otra parte, la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) es una importante proteína intracelular involucrada en la LTP (Sweatt, 2001) y se cree que también está asociada con el proceso de cebado de las LIDs (Santini y cols., 2010). La señalización de ERK es parte de las vías intracelulares de los RD₁s y su desfosforilación está regulada por la proteína fosfatasa 1 (Valjent y cols., 2005). La activación de los RD₁s induce la fosforilación de ERK en el cerebro normal y en ratas con depleción de DA estriatal (Gerfen y cols., 2002), y existe una correlación entre ERK fosforilado y las LIDs (Westin y cols., 2007), asimismo, el aumento en la fosforilación de ERK producido por la L-Dopa en ratones lesionados con 6-OHDA se reduce en ratones nocaout para la DARPP-32 (Santini y cols., 2007). Además, farmacológicamente las LIDs se reducen con la inhibición de la señalización intracelular de ERK (Lindgren y cols., 2009). Así mismo, la familia de factores de transcripción fos/jun ha sido ampliamente estudiada. Los agentes dopamino-miméticos inducen la expresión de los genes c-jun, c-fos, Δ FosB y FosB en neuronas estriatales tanto en animales normales (Graybiel y cols., 1990) como en animales parkinsonianos. En monos lesionados con la MPTP, la administración del agonista para los RD₁s SKF-82958, aumenta la expresión del gen Δ FosB, que permanece elevado durante varios meses después de la lesión, y dicho gen está asociado con el desarrollo de LIDs, lo que indica una participación de los RD₁s en el proceso de cebado que conduce a su expresión (Doucet y cols., 1996). Además,

existe una correlación positiva entre el número de células inmunorreactivas a FosB/ Δ FosB y la gravedad de las LIDs en ratas lesionadas con 6-OHDA (Levandis y cols., 2008). La sobre-expresión del gen Δ FosB en ratas normales produce movimientos involuntarios similares a las LIDs observadas en ratas lesionadas con 6-OHDA (Cao y cols., 2010). La sobre-expresión del gen JunD, un inhibidor negativo dominante de Δ FosB, reduce las LIDs en primates lesionados con MPTP. Por otra parte, el antagonista de los RD₁s SCH-23390, está asociado con la disminución de la expresión de FosB/FosB en animales discinéticos (Westin y cols., 2007). El aumento a largo plazo en Δ FosB y posiblemente la activación de la ruta ERK, puede contribuir a las LIDs (Figura 5).

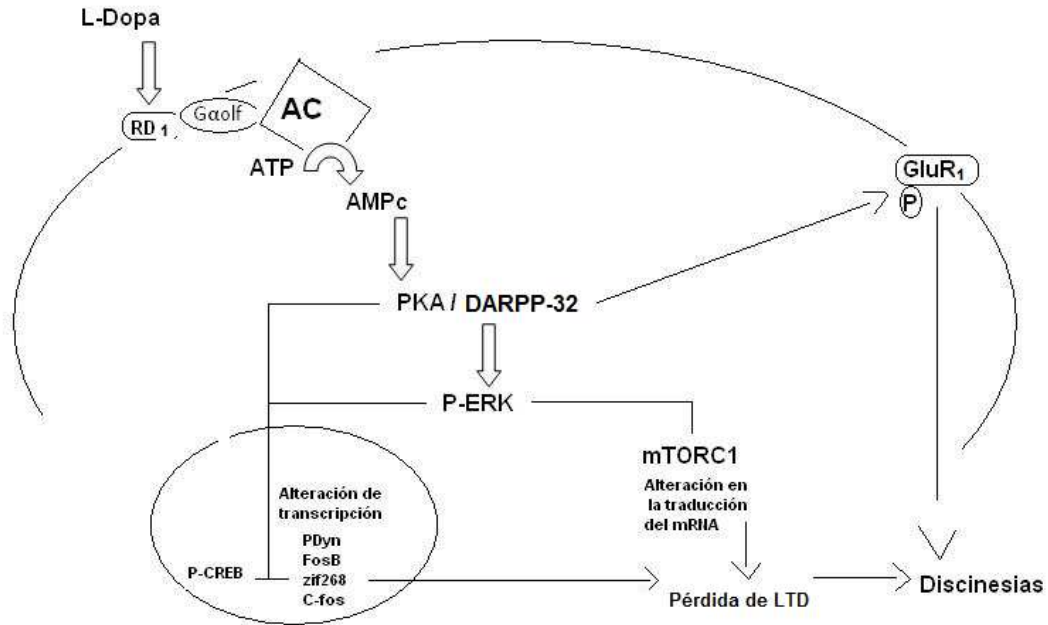


Figura 5: Participación de las vías AMPc/ DARPP-32 y ERK en las discinesias inducidas por la L-Dopa. En la enfermedad de Parkinson (EP), el agotamiento de la DA resulta en una mayor capacidad de respuesta de los RD₁s, que se expresan en gran proporción en las NEMs. La administración de L-Dopa conduce a la activación de PKA inducida por los RD₁s, que fosforila la subunidad GluR₁ de los receptores AMPA en Ser845 y DARPP-32 en Thr34. La fosforilación de GluR₁ inducida por PKA promueve la transmisión glutamatérgica y se intensifica por la fosforilación de DARPP-32 en Thr34, la cual inhibe a la PP-1. Además, el aumento de la señalización de PKA/DARPP-32 conduce a la activación de MEK, que se ve facilitada por la inhibición de PP-1. La translocación de fosfo-ERK al núcleo da como resultado fosforilación/ activación de MSK-1 e histona H₃. Esto, a su vez, conduce a reordenamientos de cromatina y transcripción de genes, como el c-fos. La activación anormal persistente de estas vías por la L-Dopa parece estar involucrada en los cambios a largo plazo responsables de las discinesias.

2.9. Sistema histaminérgico

La histamina es un importante neuromodulador del SNC y es sintetizada por el núcleo tuberomamilar hipotalámico posterior, núcleo neuronal que proyecta eferencias a casi todo el cerebro, incluidos los GB (Wada y cols., 1991). La heterogeneidad en la inervación por los axones histaminérgicos en el cerebro nos muestra la variedad de efectos que la histamina puede producir y participar en funciones fisiológicas y conductuales como el sueño-vigilia, la termorregulación, la ingestión de agua y alimento, la memoria, el aprendizaje y la conducta motora (Passani y cols., 2014). La histamina pertenece a la familia de las monoaminas que incluye a la DA, la noradrenalina y la serotonina (Masini y cols., 1998). Estructuralmente, la histamina tiene un anillo imidazol y un grupo etilamino como cadena lateral y es el producto de la descarboxilación del aminoácido L-histidina, una reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC) expresada y limitada a las neuronas histaminérgicas y que requiere fosfato de piridoxal como cofactor. La biosíntesis de histamina involucra dos pasos: el transporte de la L-histidina al interior de la célula y la subsecuente descarboxilación por la HDC, dependiendo por lo tanto de la actividad de la enzima y de la disponibilidad de su sustrato (Schwartz y cols., 1991) (Figura 6). La histamina es almacenada en vesículas en las terminales nerviosas de las neuronas histaminérgicas y su liberación es por exocitosis e inducida por despolarización, inhibiéndose en ausencia de Ca^{2+} o por concentraciones elevadas de Mg^{2+} , lo que indica la participación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Vanderwerf y cols., 1987).

El catabolismo de la histamina ocurre básicamente por metilación u oxidación. La metilación es catalizada por la enzima N-metil-transferasa de histamina, la cual utiliza S-adenosil-metionina como donador del grupo metilo. El producto de esta reacción es la 3-(*tele*)-metil-histamina, la cual es metabolizada por la monoamino oxidasa tipo B (MAOB), produciendo el ácido 3-(*tele*)-metil-imidazol-acético (Ogasawara y cols., 2006).

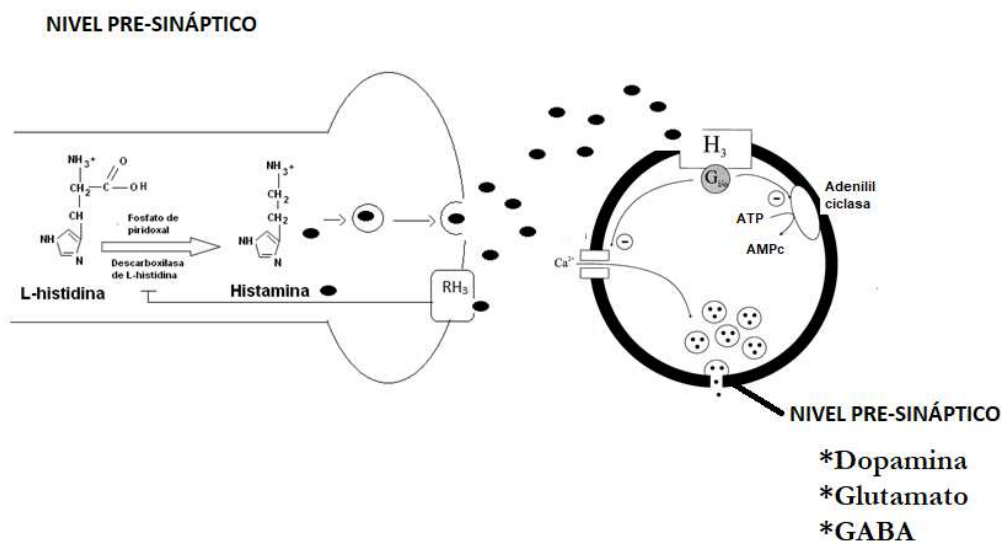


Figura 6: La histamina es el producto de la descarboxilación del aminoácido L-histidina, reacción catalizada por la enzima descarboxilasa de histidina. Asimismo, la figura representa la transmisión histaminérgica en el sistema nervioso central (SNC). Una vez sintetizada, la histamina es almacenada en vesículas sinápticas de las terminales histaminérgicas y liberada por exocitosis. La activación de RH_3 s presinápticos inhibe la síntesis y la liberación de histamina y disminuye la liberación de otros neurotransmisores como noradrenalina, serotonina, dopamina, glutamato y GABA.

Como fue mencionado anteriormente, las neuronas histaminérgicas proyectan sus axones ampliamente a múltiples regiones del cerebro como la corteza, los GB, el tálamo e hipocampo (Panula y Nuutinen, 2013). En estas áreas cerebrales, la histamina ejerce sus efectos a través de la activación de los receptores a histamina H₁, H₂ y H₃ acoplados a proteínas G. Los receptores a histamina difieren no sólo en su homología y localización sino también en su señalización. El receptor a histamina H₁ (RH₁) está acoplado a las proteínas G_q y su activación induce la hidrólisis del 4,5-bisfosfato de fosfatidil-inositol (PIP₂) por acción de la fosfolipasa C (PLC), generando 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros. El IP₃ se une a receptores presentes en el retículo endoplásmico promoviendo la liberación de Ca²⁺ intracelular. El receptor a histamina H₂ (RH₂) está acoplado a proteínas G_s, su activación conduce al aumento del AMPc y una respuesta en cascada tras la activación de la PKA por el AMPc (Haas y cols., 2008). El receptor a histamina H₃ (RH₃) se acopla a las proteínas G $\alpha_{i/o}$ y su activación conduce a varias vías de señalización intracelular como: a) la inhibición de la AC por las subunidades G $\alpha_{i/o}$; b) la modulación de canales de Ca²⁺ activados por voltaje a través de las subunidades $\beta\gamma$ disociadas tras la activación de proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Silver y cols., 2002); c) la inhibición del intercambiador Na⁺/H⁺ neuronal, cuya función es crítica para prevenir la acidificación del medio intracelular, mediante subunidades G $\alpha_{i/o}$ (Silver y cols., 2001); d) la modulación de canales de K⁺ de rectificación de entrada (*G protein-gated inwardly rectifying channels* [GIRK]), los cuales son activados también por las subunidades $\beta\gamma$ tras la activación de las proteínas G $\alpha_{i/o}$; e) la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), conduciendo a la formación y liberación de ácido

araquidónico, ácido docosahexaenoico y fosfolípidos (Rouleau y cols., 2002); f) la activación de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases* [MAPK]) con efectos sobre el crecimiento, la diferenciación y supervivencia celular, así como en la plasticidad neuronal (Drutel y cols., 2001); g) la activación de la vía 3 cinasa de fosfatidil inositol (PI3K)/ cinasa B de proteínas (AKT-PKB) (Bongers y cols., 2007) (Figura 7).

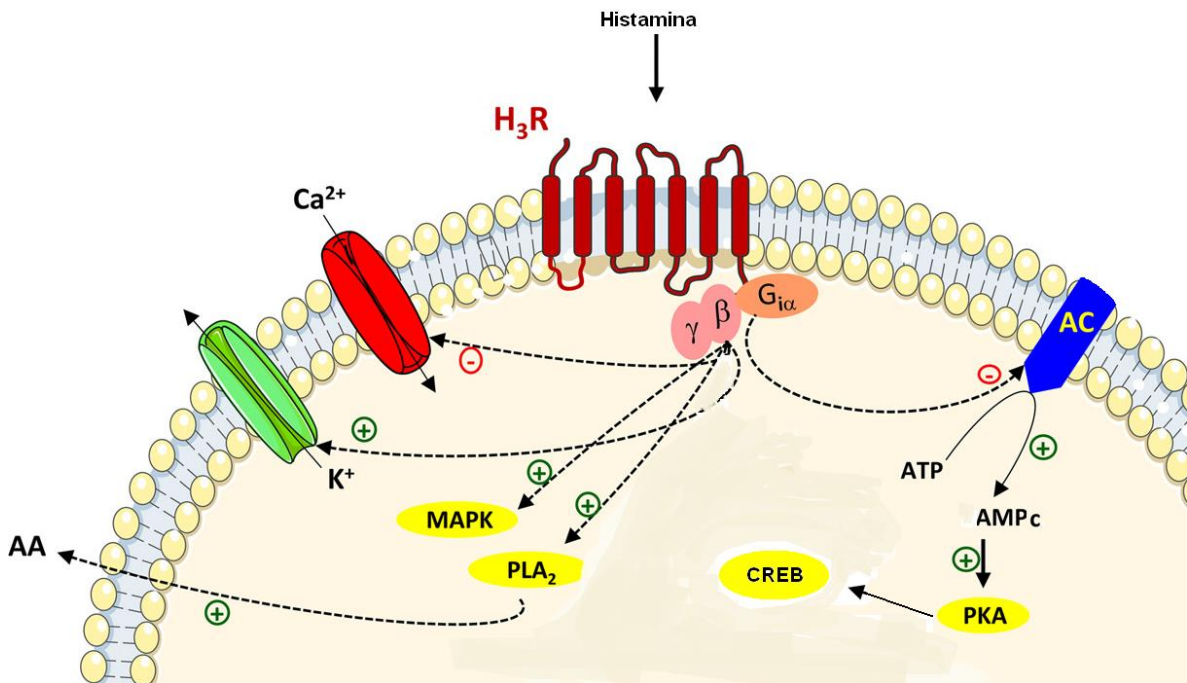


Figura 7. Representación de las diferentes vías de señalización inducidas por la activación del receptor a histamina H₃ (H₃R). Modificado de Sadek y cols., (2016).

Relacionado a la liberación de neurotransmisores, la activación de los RH_{3s} produce inhibición de la actividad de las neuronas histaminérgicas (Takeshita y cols., 1998) e inhibe de manera pre-sináptica la liberación de DA, acetilcolina, noradrenalina, serotonina, GABA y glutamato (Arias-Montaña y cols., 2001; Brown y cols., 2001; García y cols., 1997; Schlicker y cols., 1993). Además, la activación de los RH_{3s} inhibe la síntesis de DA (Molina-Hernández y cols., 2000) (Figura 5).

El neostriado presenta una alta densidad de los RH_{3s}, y se ha reportado que en cerebros de pacientes de la enfermedad de Parkinson la densidad de los RH_{3s} no se reduce y los niveles de histamina se incrementan en el putamen, la SNr y el GPi (Rinne y cols., 2002). Estos cambios han sido corroborados en ratas parkinsonianas con lesión unilateral inducida con 6-OHDA. También, se ha demostrado una mayor densidad de fibras histaminérgicas alrededor de los sitios de degeneración de la SNc (Anichtchik y cols., 2000a; Anichtchik y cols., 2000b). Esto puede involucrar a los RH_{3s} situados a nivel pre-sináptico o post-sináptico modulando la actividad de las neuronas GABAérgicas de las vías directa e indirecta implicadas en la pérdida de movimiento voluntario en la EP y en la génesis de las LIDs.

2.10. Participación del receptor a histamina H₃ (RH₃) en la modulación estriatal

A nivel del neostriado, los estudios electrofisiológicos y los bioquímicos describen que la histamina modula la liberación de glutamato cortical a través de la estimulación de los RH₃s (Molina-Hernández y cols., 2001), también se ha demostrado que la estimulación de los RH₃s localizados en terminales glutamatérgicas producen la reducción en la transmisión sináptica y en la frecuencia de disparo de las NEMs (Doreulee y cols., 2001). Los mismos autores describieron que la liberación de glutamato talámico se reduce a través de la activación de los RH₃s. La DA es otro neurotransmisor clave en el neostriado, relacionado con la actividad motora. Los estudios pioneros sobre los RH₃s como hetero-receptores en las terminales dopaminérgicas demostraron que su activación reduce la liberación (Schlicker y cols., 1993) y la síntesis de DA en las terminales dopaminérgicas del neostriado (Molina-Hernández y cols., 2000). En nuestro laboratorio, mediante un estudio *in vivo* demostramos que la activación del RH₃ pre-sináptico con immepip inhibe el efecto inducido por la activación de los RD₁s sobre los niveles de DA estriatal (Alfaro-Rodríguez y cols., 2013), estos datos sugieren una interacción *in vivo* entre los RD₁s y los RH₃s pre-sinápticos que modulan la liberación de DA estriatal. Por otro lado, la mayoría del GABA estriatal proviene de interneuronas locales que expresan parvalbumina. Con registros electrofisiológicos se ha mostrado que la histamina no afecta el disparo de las NEMs (Ellender y cols., 2011). No obstante, la activación del RH₃ puede inhibir la liberación de GABA inducida por

la activación del RD₁ en colaterales GABAérgicas de las NEMs (Arias-Montaña y cols., 2001). Las eferencias histaminérgicas también son reguladas por RH_{3s} localizados en las terminales sinápticas y su activación reduce la liberación y la síntesis de histamina (Arrang y cols., 1983).

2.11. Interacción entre los RH_{3s} y los RD_{1s}

Los estudios de inmuno-histoquímica han demostrado con imagen confocal, que los RH_{3s} y los RD_{1s} están co-localizados en las NEMs estriatales, tanto en la región somatodendrítica, como en las terminales sinápticas (Moreno y cols., 2011) y funcionalmente se ha demostrado una interacción en la liberación de GABA tanto a nivel del neostriado como en la SNr (Arias-Montaña y cols., 2001; García y cols., 1997). Estos autores, demostraron que la facilitación de la liberación de GABA inducida por el fármaco agonista para los RD_{1s} SKF-38393, es inhibida con el fármaco agonista para los RH_{3s} imepip, efecto que es revertido con el fármaco antagonista tioperamida. La activación de los RH_{3s}, que están acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$, está asociada con la inhibición de la AC vía la subunidad α , mientras que las subunidades $\beta\gamma$ inhiben canales de Ca²⁺ activados por voltaje y aumentan la conductancia de canales K⁺ (Brown y cols., 2001; Milligan y Kostenis, 2006; Sahlholm y cols., 2007). Otros estudios han mostrado que la formación de AMPc inducida por la activación de los RD_{1s} es inhibida por el agonista de los RH_{3s}, y que la formación de AMPc por las NEMs es regulada en direcciones opuestas por las subunidades G α_s y G α_i , como resultado de la estimulación de los RD_{1s} y los RH_{3s}

respectivamente (Sánchez-Lemus y Arias-Montaña, 2004). El AMPc por la vía de la PKA conduce al aumento de la excitabilidad de las NEMs y está asociada a la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Figura 8).

En modelos animales de la EP se ha descrito un aumento en la densidad de los RH_{3s} en el neostriado, la SNr y la SNc, así como un incremento en el ARNm del RH₃ estriatal (Ryu y cols., 1994b). El aumento en la expresión de los RH_{3s} puede ser revertido por la administración sistémica de un agonista de los RD_{1s} (Ryu y cols., 1994a). Estos datos sugieren que la inervación dopaminérgica en los GB controla la expresión de los RH_{3s} mediante la activación de los RD_{1s} y que en circunstancias de déficit de DA dicho control se pierde con el aumento de la expresión de los RH_{3s} (Anichtchik y cols., 2000a). Bajo este contexto, el estudio de la interacción funcional entre RD_{1s}/ RH_{3s} podría contribuir a la comprensión del papel de los RD_{1s} y los RH_{3s} en la disfunción de los GB que ocurren en las enfermedades neurodegenerativas que involucran trastornos del sistema dopaminérgico.

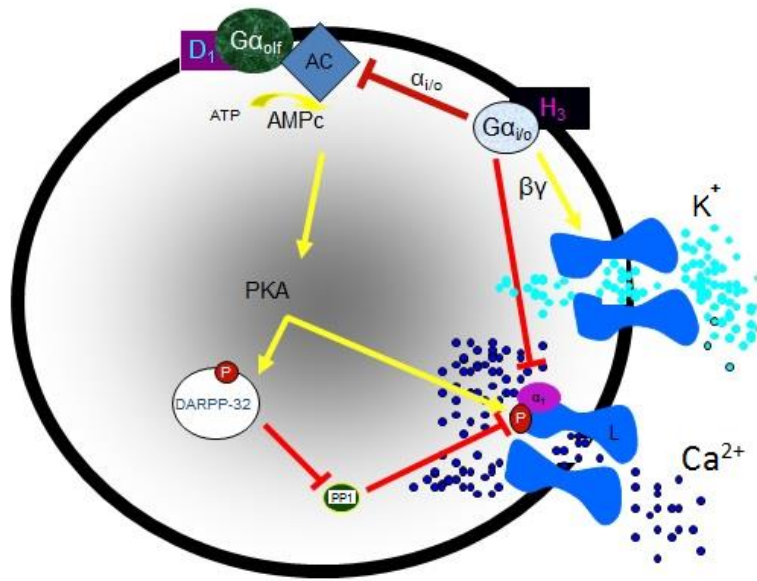


Figura 8: Posible interacción funcional entre los RD₁s y el RH₃s en una neurona GABAérgica estriatal de una NEM colateral (Bueno-Nava, 2013).

3 Pregunta de investigación

¿La activación del RH₃ modula las discinesias inducidas por la administración crónica de L-Dopa en ratas parkinsonianas?

4 Hipótesis

La activación del RH₃ modula las discinesias inducidas por la administración crónica de L-Dopa en ratas parkinsonianas a través de la interacción funcional con el RD₁.

5 Objetivo general

Determinar si la activación del RH₃ previene o reduce las discinesias inducidas por la administración crónica de L-Dopa en ratas parkinsonianas y estudiar su posible interacción funcional con el RD₁.

5.1. Objetivos específicos

- A). Establecer el modelo de parkinsonismo en la rata con la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en la SNc.
- B). Inducir discinesias en las ratas parkinsonianas con la administración crónica de L-Dopa.
- C). Determinar en ratas parkinsonianas si la administración aguda, subcrónica y crónica del agonista del RH₃ previene o reduce las discinesias inducidas por L-Dopa.
- D). Determinar *in vivo* si la activación simultánea de los RD₁s y RH₃s, modula la liberación de GABA y glutamato estriatales y establecer la posible interacción funcional entre el RD₁ y el RH₃.

6 Material y Métodos

6.1. Animales

Se utilizaron 68 ratas machos de la cepa Wistar con un peso corporal de 280 a 310 g. Estos animales fueron proporcionados por el UPEAL-Bioterio de la UAM-Xochimilco, y fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio y mantenidos a un ciclo de luz de 12 h/ 12 h de oscuridad. Se utilizó el mínimo número posible de animales necesarios según los criterios bioéticos y estadísticos de Festing (1994). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la Guía para el uso y cuidado de animales experimentales (Olfert y cols., 1993) y las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio como lo describe la NOM-062-ZOO(1999). Asimismo, los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

6.2. Procedimiento quirúrgico e inyección de la 6-OHDA para establecer el modelo de ratas parkinsonianas

6.2.1. Descripción de la neurotoxina 6-OHDA

La 6-OHDA es la neurotoxina más utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de parkinsonismo en roedores. La inyección intracerebral de esta neurotoxina produce una degeneración selectiva de neuronas catecolaminérgicas.

Esta especificidad es debida a su alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas. Varios estudios reportan que la 6-OHDA posee una potente acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial (Glinka y Youdim, 1995), sin embargo, la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por 6-OHDA está ligada a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales libres tipo hidroxilo($\bullet OH$) y quinonas que se producen en su proceso metabólico (Saito y cols., 2007). Se ha descrito que las sustancias antioxidantes como vitamina E (Perumal y cols., 1992) o el N-acetil-cisteína, y otras sustancias como inhibidores de la MAO y quelantes de hierro como desferroxamina protegen a las neuronas dopaminérgicas de la acción neurotóxica de la 6-OHDA (Youdim y cols., 1997).

Desde el punto de vista histológico, la lesión a nivel de la SNc inducida con la 6-OHDA es más aceptable para ser utilizada como modelo de parkinsonismo, ya que de esta manera se evita la afectación y pérdida de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral correspondiente al grupo neuronal A10 como sucede cuando se inyecta en el haz prosencefálico medial (Perese y cols., 1989).

Referente a lo conductual, los animales con lesión unilateral de la SNc, inducida por inyección directa en el haz prosencefálico medial o en la SNc, presentan inmediatamente después de la cirugía y de forma espontánea una conducta rotatoria ipsilateral a la lesión que se mantiene durante las 24 h siguientes.

6.2.2. Descripción del procedimiento quirúrgico para inyectar la 6-OHDA

Para cumplir el objetivo específico 5.1A, todas las ratas asignadas a cirugía estereotáxica permanecieron de dos a tres h de ayuno previo a la cirugía, se anestesiaron con ketamina-xilacina (80 mg/ kg-10 mg/ kg) por la vía intraperitoneal (i.p.) en el cuadrante inferior izquierdo del abdomen. Transcurridos 5 minutos de la inyección de los fármacos se comprobó gradualmente el grado de sensibilidad al comprimir el último tercio de la cola de la rata o puncionando los cojines plantares de las extremidades hasta alcanzar el periodo de anestesia quirúrgica. Después de rasurar y lavar el área de incisión (hueso frontal al hueso occipital), las ratas fueron montadas al equipo estereotáxico (Stoelting Co., Wood Dale, IL) y la temperatura corporal, se monitoreo y reguló con el equipo para ratas CMA/150 (CMA/Microdialysis, Kista, Sweden). Posteriormente se aplicó una solución antiséptica de yodo en el área de incisión y ésta se realizó con una hoja de bisturí del No. 15, para obtener de un solo corte cráneo caudal, una incisión en la piel de ~1.0 cm de longitud a nivel del hueso frontal al hueso occipital y una vez expuesto el cráneo, se marcó un punto sobre el cráneo de acuerdo a coordenadas preestablecidas (posterior a bregma, AP = -5.0) y lateral, L = -2 respecto a la línea media; de acuerdo a Paxinos y Watson (1998). Después de marcar sobre el cráneo las coordenadas, se realizó un trépano de ~1 mm de diámetro con una pieza de mano eléctrica. Después del trepano, a cada animal se le inyectó a nivel de la SNc hemisferio derecho 16 µg de la 6-OHDA contenida en 2 µl de solución salina al 0.9% y ácido ascórbico al 0.01%. Se utilizó la coordenada dorso ventral (DV) de 7.3 mm

a partir de la duramadre. La neurotoxina se inyectó a un flujo de 0.4 μ l/ min durante 5 minutos, la aguja permaneció en el sitio de inyección durante 5 minutos adicionales a los minutos de inyección, para posteriormente retirarla. Cada rata fue suturada con hilo no absorbible de nylon monofilamento de calibre 2/ 0 con aguja cuerpo estriado longitudinal (SC-26) de 26 mm de 3/ 8 de círculo punta reverso cortante. Finalmente se aplicó furazolidona con atomizador. Una vez recuperadas de la cirugía, las ratas fueron regresadas a su lugar proveyéndoles de las condiciones del bioterio. Catorce días después de la cirugía y la inyección de la neurotoxina, cada rata fue sometida a la prueba de giro con apomorfina (0.5 mg/ kg vía subcutánea). La apomorfina es un agonista no selectivo de los receptores dopaminérgicos (García-Ramírez y cols., 2004) y los animales que presentaron más de 6 giros por minuto durante una hora en la dirección contralateral de la lesión fueron incluidos al estudio. Este criterio ya está establecido por estudios que describen que aquellos animales que presentan más de 6 giros contralaterales a la lesión, muestran una reducción del ~95% de las neuronas dopaminérgicas (Kirik y cols., 1998).

6.3. Protocolo experimental para inducir las discinesias en ratas parkinsonianas y la administración del fármaco histaminérgico

Una vez obtenidas las ratas parkinsonianas y para cubrir los objetivos particulares 5.1B y 5.1C las ratas fueron asignadas aleatoriamente a 6 tratamientos (n=10/ grupo; ver figura 9) y que se describen a continuación:

- Grupo 1 = recibió durante 14 días solución vehículo.
- Grupo 2= recibió durante 14 días carbidopa (15 mg/ kg) + L-Dopa (6.25mg/ kg).
- Grupo 3 = recibió durante 14 días carbidopa (15 mg/ kg) + L-Dopa (6.25mg/ kg) + el agonista para los RH₃s, immepip (1 mg/ kg).
- Grupo 4 = recibió durante 14 días carbidopa (15 mg/ kg) + L-Dopa (6.25 mg/ kg), pero al día 7 después de haber iniciado dicho tratamiento se co-administró immepip (1 mg/ kg) durante los 7 días restantes.
- Grupo 5 = recibió durante 14 días carbidopa (15 mg/ kg) + L-Dopa (6.25mg/ kg), pero al día 12 después de haber iniciado el tratamiento se co-administró immepip (1 mg/ kg) durante los 3 días restantes.
- Grupo 6 = recibió durante 19 días immepip (1 mg/ kg), pero al día 5 de haber iniciado dicho tratamiento se co-administró carbidopa (15 mg/ kg) + L-Dopa (6.25 mg/ kg) durante los 14 días restantes.

Cabe señalar, que la carbidopa fue administrada 20 minutos antes de la administración de la L-Dopa. Así mismo, diferentes estudios describen que la L-Dopa a dosis de 6.25 mg/ kg produce discinesias en ratas parkinsonianas (Cenci y cols., 1998; Papathanou y cols., 2014). La dosis de immepip de 1 mg/ kg fue utilizada de acuerdo a los estudios previos que describen que dicha dosis los animales no presentan efectos secundarios que podrían interferir con el registro conductual (Gómez-Ramírez y cols., 2006; Papathanou y cols., 2014).

La administración de L-Dopa durante 14 días, fue en apego a la literatura que describe que las discinesias se manifiestan a partir del día 3 post tratamiento, aumentando gradualmente hasta alcanzar su pico a partir del día 9 y manteniéndose en días posteriores (Rangel-Barajas y cols., 2011).

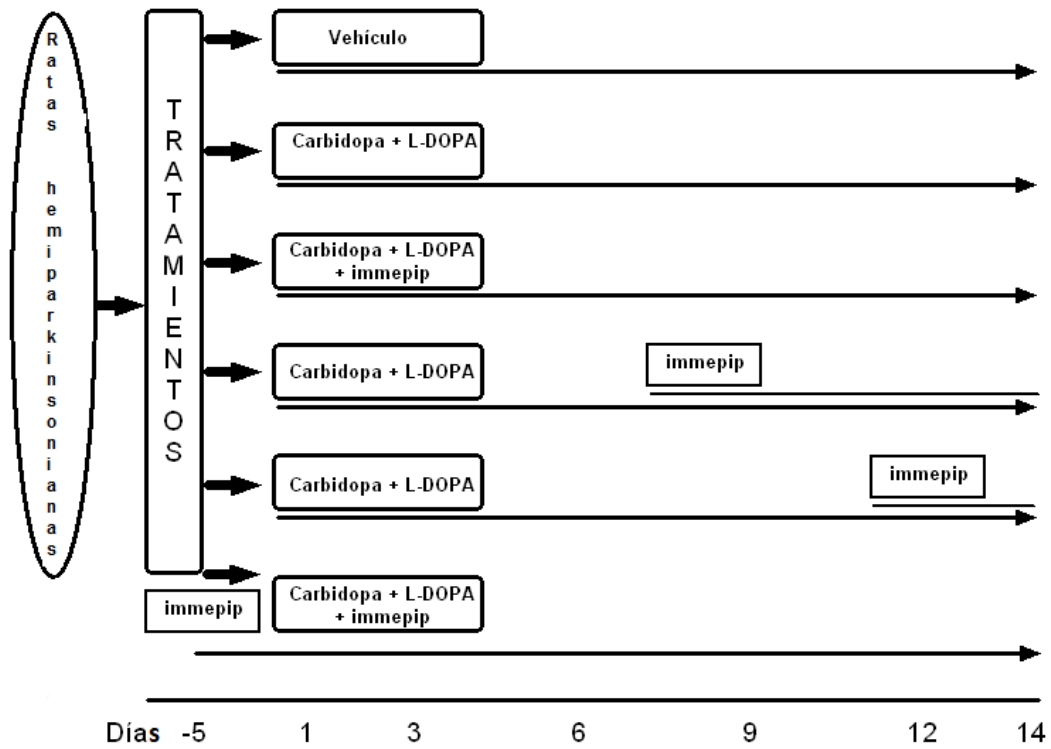


Figura 9. Se muestra el protocolo del experimento 1 para inducir las discinesias en ratas parkinsonianas. La carbidopa (15 mg/ kg), L-Dopa (6.25 mg/ kg) y la administración del fármaco immpip de 1 mg/ kg.

Se utilizaron ocho ratas para confirmar los efectos de la administración crónica de immpip (1 mg/ kg) + L-Dopa (6.25 mg/ kg) durante 14 días, pero al día 15 se retiró el immpip para continuar con una dosis diaria únicamente de L-Dopa durante 7 días consecutivos (Figura 10).

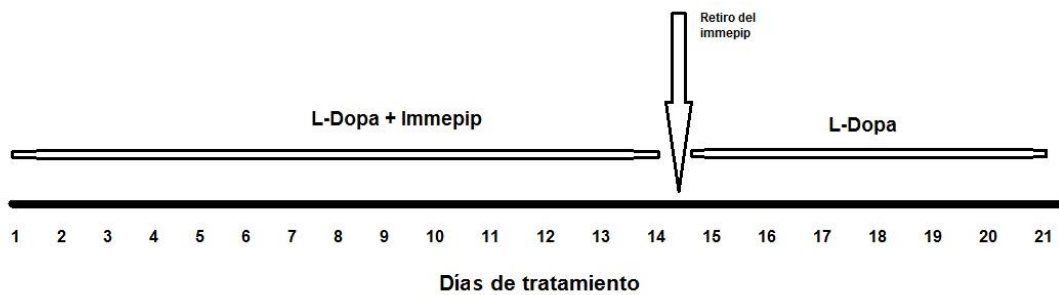


Figura 10. Se describe el procedimiento del experimento 2. Un grupo de ratas (n=8) que recibieron el tratamiento farmacológico durante 21 días, nótese que durante los primeros catorce días las ratas recibieron L-Dopa + immpip, posteriormente a partir del día 15 y hasta el día 21 únicamente recibieron L-Dopa, ya que el immpip fue retirado desde el día 15.

Para el análisis de la liberación de GABA y de glutamato en los dializados estriatales se utilizaron 20 ratas parkinsonianas, que fueron sometidas a los tratamientos descritos previamente, y al día 14 se dividieron en 5 subgrupos (n = 4): 1) Vehículo; 2) L-Dopa; 3) L-Dopa + immpip agudo; 4) L-Dopa + immpip subcrónico; 5) L-Dopa+ immpip crónico. Se incluyó un grupo sham para examinar el efecto de la dosis única de la L-Dopa al día 15.

6.4. Batería para el registro y evaluación de las LIDs

Las LIDs fueron evaluadas de acuerdo a los procedimientos descritos por Lundblad y cols. (2002), en ratas parkinsonianas a los 3, 6, 9,12 y 14 días después de la administración de L-Dopa. Inmediatamente después de la administración de L-Dopa, las ratas se colocaron en cajas separadas y se observó el comportamiento discinético durante un minuto (periodo de seguimiento) y así cada 20 minutos durante 120 minutos (6 observaciones), de esta manera las discinesias se clasificaron en cuatro subtipos:

- a) Las “discinesias locomotoras”, son manifestadas con giros contralaterales al sitio de inyección de la 6-OHDA.
- b) Las “discinesias axiales”, los animales presentan una torsión contralateral del cuello y de la parte superior del cuerpo en dirección contralateral a la lesión.
- c) Las “discinesias de las extremidades”, son manifestadas como movimientos bruscos de la extremidad contralateral a la lesión.
- d) Las “discinesias orolinguales”, son expresadas con los movimientos mandibulares y se presentan protrusiones linguales.

Cada subtipo, fue calificado usando una escala de 0 a 4 (0 = Ausencia de LIDs; 1= LIDs presentes en menos de la mitad del minuto de registro; 2 = LIDs frecuentes con presencia de más de la mitad del minuto de registro; 3 = LIDs continuas durante

todo el minuto de registro; 4 = LIDs continuas durante todo el minuto de registro y sin interrupción por algún estímulo externo).

Es importante señalar, que en cada sesión las puntuaciones de las escalas obtenidas en las 6 observaciones se sumaron obteniendo una puntuación máxima de 24. Las LIDs fueron expresadas por subtipo y así se obtuvo la puntuación en cada subtipo. Asimismo, para el total de las LIDs, cada subtipo (axiales, orolinguales, locomotoras y de las extremidades) se contaron y se sumaron (6 observaciones por sesión). Las LIDs fueron registradas, calificadas y contabilizadas por un solo evaluador (cegado a cada grupo experimental), que se apoyó de la video grabación de cada registro para su revisión. Cada registro tuvo una duración de 120 minutos.

6.5. Determinación de GABA y glutamato estriatales

Para cumplir el objetivo específico 5.1D, mediante microdiálisis cerebral y acoplado a un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), se determinaron los niveles extracelulares de GABA y glutamato, para esto, se utilizaron 5 ratas de cada uno de los tratamientos descritos en el apartado 6.3, que se sometieron por segunda ocasión a una cirugía estereotáxica al día 15 para implantar una cánula guía y 24 h después se realizó microdiálisis para la obtención y determinación de GABA y glutamato en cada uno de los animales con sus respectivos tratamientos a nivel del neostriado ipsilateral al sitio de la lesión (Figura 11).



Figura 11: Descripción de los diferentes procedimientos experimentales. Los animales que recibieron su respectivo tratamiento farmacológico se evaluaron y registraron los diferentes subtipos de LIDs durante 14 días. Al día 15 se sometieron a la cirugía estereotáxica para implantar una cánula guía a nivel del neoestriado ipsilateral a la SNc lesionada con 6-OHDA. Veinticuatro horas después cada animal se montó a un sistema de microdiálisis para la obtención de dializados estriatales, mismos que se inyectaron a un sistema de HPLC para la determinación de la concentración de GABA y glutamato.

6.5.1. Cirugía estereotáxica para la implantación de la cánula guía

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina/ xilazina (80/ 10 mg/ kg), se montaron en un aparato estereotáxico (Stoelting Corp., Wood Dale, IL) y se sometieron a cirugía para colocar la cánula guía para la membrana de microdiálisis (Bioanalytical System, Inc. USA), dirigiéndola al neoestriado utilizando las coordenadas AP= +0.24, L= +2.8 y DV= 3.5 a partir de bregma de acuerdo a Paxinos y Watson (1998). La cánula guía se fijó al cráneo con acrílico dental anclado a un par de tornillos de fijación.

6.5.2. Muestreo bioquímico in vivo y la determinación de GABA y glutamato

El muestreo bioquímico se realizó utilizando el sistema de microdiálisis acoplado a un sistema de libertad de movimiento. Los dializados fueron obtenidos en intervalos de 30 min en un colector de fracciones CMA 470 (CMA/Microdialysis, Kista, Sweden) a 4°C y fueron inyectadas al sistema de HPLC para la determinación de GABA y glutamato. Para obtener el dializado extracelular se insertó a la guía una membrana de microdiálisis con una punta de membrana de 4 mm de longitud. Las sondas fueron perfundidas con solución de Ringer (mM: 146 NaCl, 4 de KCl y 2.3 CaCl₂, a pH 7.4 con 2 mM con buffer de fosfatos), utilizando una bomba de perfusión CMA 400 (CMA/Microdialysis, Kista, Sweden), ajustada a un flujo de trabajo de 1.2 uL/ min.

Los animales fueron colocados en el sistema de microdiálisis para insertar la membrana de dializado, y se obtuvieron 9 fracciones de dializados, las primeras 3 fracciones se desecharon considerando que los animales son expuestos al estrés por la manipulación al insertar la cánula; las siguientes 3 fracciones de dializados fueron consideradas como basales y las últimas 3 fracciones de dializados fueron obtenidas bajo los efectos de la administración sistémica de los tratamientos descritos en el apartado 6.3. Las 6 fracciones de dializados fueron inyectadas al sistema de HPLC para determinar GABA y glutamato estriatales (Figura 12).

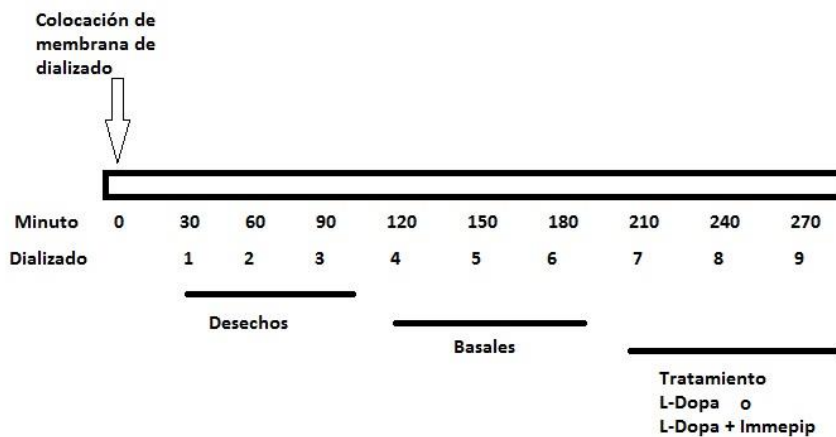


Figura 12: Se representa el diseño experimental para la obtención de los dializados. Una vez montado el animal al sistema de microdiálisis se colocó la membrana de dializado a nivel del neostriado.

6.6. Análisis histológico

Después de concluir los experimentos *in vivo*, las ratas fueron decapitadas y los cerebros extraídos para seccionarlos en una matriz cerebral de acero inoxidable para cortes coronales del cerebro de la rata (51384, Stoelting Corp., Wood Dale. IL) y se obtuvieron rebanadas de 1 mm de la sección anterior del cerebro con el propósito de determinar la correcta ubicación macroscópica de la posición de la membrana de microdiálisis a nivel del neostriado dorsal, que fue corroborada en un microscopio óptico (modelo SZ-CTV, Olympus, Japan). Fueron incluidas al

estudio todas las ratas en las que se observó la correcta posición de la membrana a nivel del neoestriado.

6.7. Descripción del estudio y análisis estadístico

El estudio fue de tipo experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo debido a que se comprobaron los efectos de una intervención farmacológica específica en el modelo animal de LIDs, y el desarrollo experimental comprendió la evaluación de las discinesias a través del tiempo, donde las variables del estudio fueron cualitativas y cuantitativas, en las puntuaciones y conteo del número total de los diferentes subtipos de discinesias respectivamente, mientras que, la variable de estudio en los resultados de la liberación de GABA y glutamato, medida a través de HPLC fue cuantitativa.

Las puntuaciones de la escala de las LIDs corresponden a una medición ordinal y el número total de las LIDs obtenidas corresponden a una escala de razón. Asimismo, en la determinación de GABA y glutamato corresponden a la escala de razón.

Todos los valores fueron expresados con la media \pm error estándar (SEM). El análisis estadístico de las puntuaciones de las LIDs se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida por la prueba U de Mann-Whitney para comparar el rango promedio de los grupos de tratamiento. Para el análisis del conteo del número total de LIDs se realizó con ANOVA de medidas repetidas

seguido de la prueba post hoc de Bonferroni para comparar las medias de los grupos de tratamiento farmacológico. El análisis de las puntuaciones de las LIDs correspondiente a la suspensión del imnepip se realizó con la prueba de Wilcoxon para medidas repetidas para comparar los rangos de medias entre los tratamientos farmacológicos, y el análisis de las LIDs totales se realizó con la prueba de t de Student. Para la determinación de los niveles de GABA y glutamato se utilizó un ANOVA de un factor y para la comparación múltiple de las medias fue a través de la prueba de Dunnett para la comparación de los tratamientos con respecto al grupo control. Para la comparación entre los tratamientos se utilizó una prueba de Tukey. Las diferencias observadas en las condiciones experimentales se consideraron estadísticamente significativas a $P < 0.05$.

7 Resultados

7.1. Obtención de ratas parkinsonianas

Dos semanas después de inyectar la 6-OHDA a nivel de la SNc (Figura 13), como se describió anteriormente en el apartado 6.2, los animales recibieron una dosis de 0.5 mg/ kg de apomorfina para inducir los giros contralaterales a la lesión.

En este estudio, se observó que las 68 ratas presentaron de 5 a 9 giros contralaterales por minuto (Figura 14).

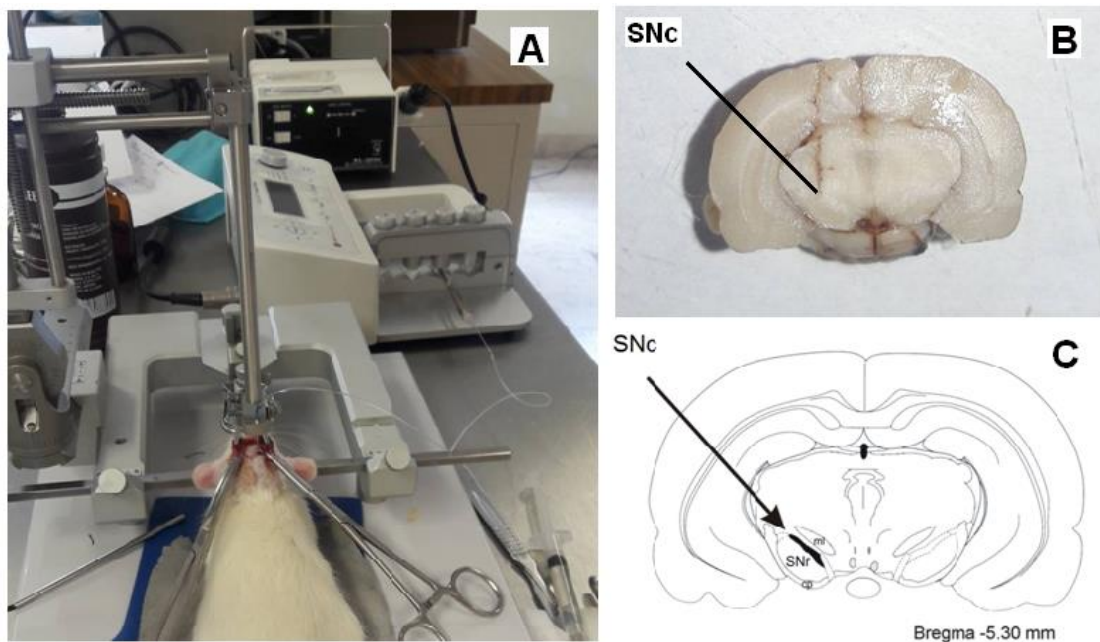


Figura 13: En la imagen (A) se observa la intervención quirúrgica de una ratas montada al equipo de cirugía estereotáxica para la inyección de la neurotoxina 6-OHDA. En la imagen (B) se aprecia un corte coronal del cerebro de una ratas representativa y la lesión mecánica inducida por la aguja y el punto final donde es depositada la 6-OHDA a nivel de la SNc. (C) Representa un corte coronal del cerebro de la ratas con el cual podemos apreciar donde se encuentra la SNc.

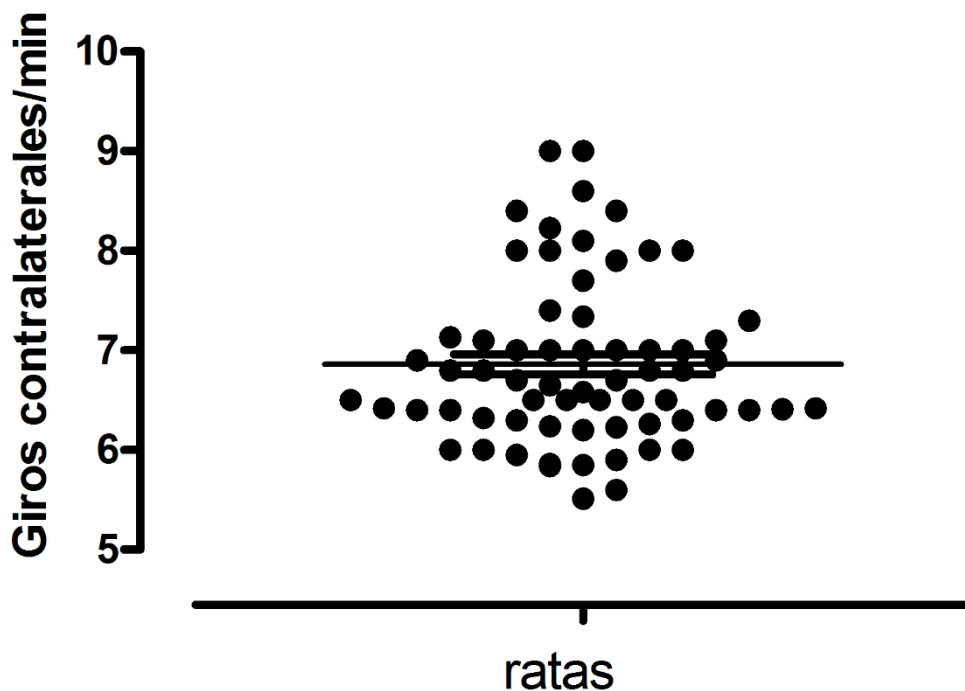


Figura 14. Se muestra el número de giros contralaterales a la lesión, cada círculo representa a un animal registrado después de la administración de 0.5 mg/ kg de apomorfina después de dos semanas de la inyección de 6-OHDA a nivel de la SNC. Nótese que se presentan de 5 a 9 giros contralaterales a la lesión.

7.2. EXPERIMENTO 1. Expresión de los diferentes subtipos de LIDs en los diferentes tratamientos farmacológicos

En el grupo que recibió únicamente la administración de L-Dopa durante 14 días, se observaron los diferentes subtipos de LIDs en todas las ratas, con puntuaciones de la escala de 1-3.

En el grupo que recibió los fármacos de L-Dopa + ImmePIP (crónico) durante 14 días, se observaron las LIDs en el 35% de las ratas expuestas a este tratamiento, con puntuaciones de la escala de 0-1.

En los grupos de ImmePIP subcrónico y agudo, se observó la presencia de las LIDs en el 100% de las ratas, con puntuaciones de la escala de 1-2.

En el grupo de tratamiento previo con ImmePIP, estos efectos discinéticos se observaron en todos los animales, con puntuaciones de la escala de 1-2.

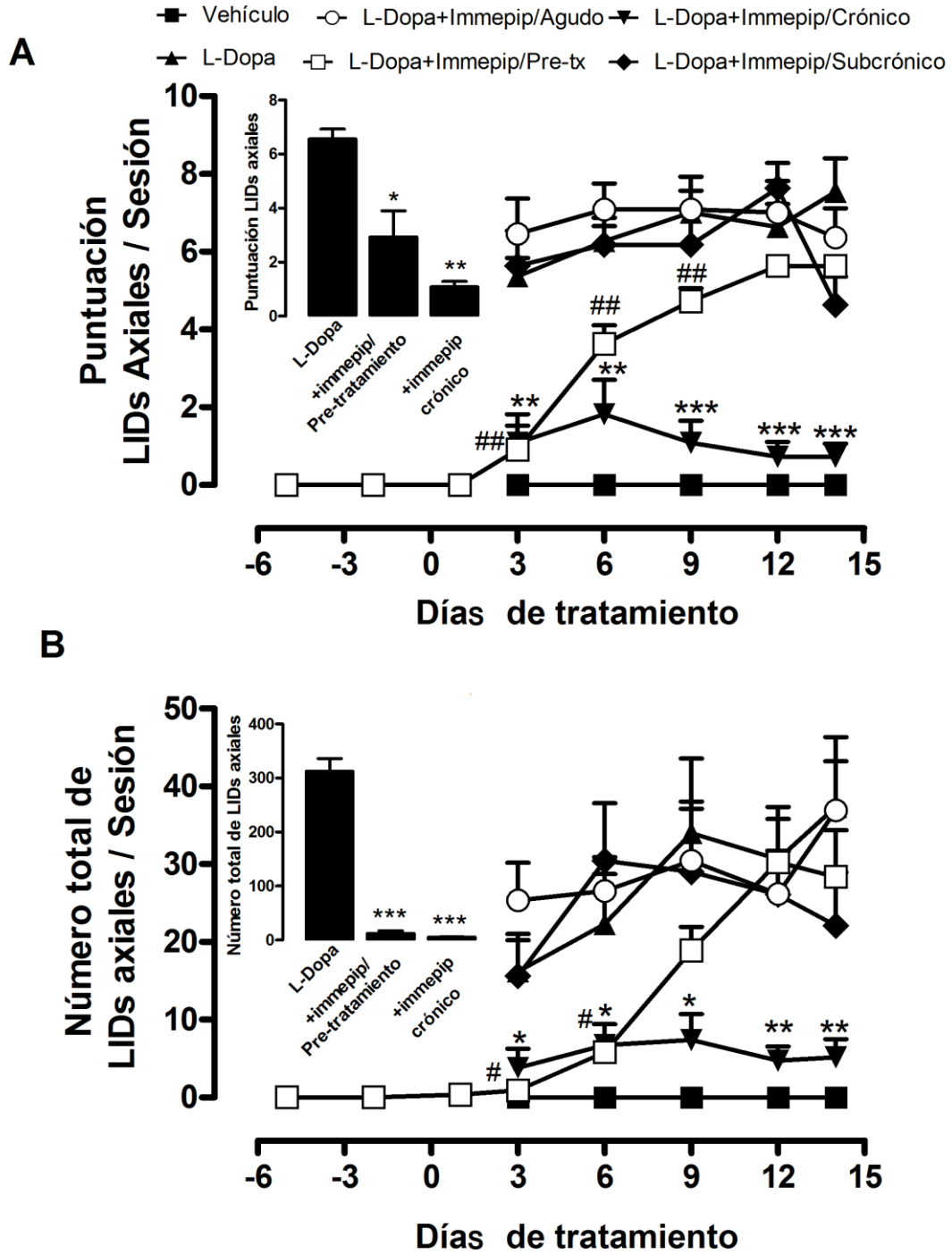
El grupo del vehículo, no se observaron las LIDs en ningún animal.

7.3. Efecto de la administración de ImmePIP en las LIDs

Las figuras 15-18 muestran que la administración sistémica diaria de L-Dopa sola durante 14 días aumentó significativamente ($P < 0.05$) las puntuaciones y el número total de las LIDs para los 4 subtipos analizados (axiales, orolinguales, locomotoras y de las extremidades) en los días 3, 6, 9, 12 y 14 de tratamiento, en comparación con el grupo vehículo respectivo (inyección diaria de solución vehículo durante 14 días). Estos datos indican que la dosis de 6.25 mg/ kg de L-Dopa analizada en este estudio resultó en LIDs en ratas lesionadas con 6-OHDA con una alta reproducibilidad.

La figura 15A muestra que la administración crónica de ImmePIP (una dosis diaria de L-Dopa + ImmePIP durante 14 días) disminuyó significativamente las puntuaciones de las LIDs axiales (-79, -71, -84, -89 y -90% a 3, 6, 9, 12 y 14 días

post tratamiento, respectivamente; $P < 0.01$ para todos los valores) en comparación con el grupo que recibió solo L-Dopa. La administración subcrónica y aguda de immpip no afectó las puntuaciones de las LIDs axiales en comparación con el grupo de solo L-Dopa correspondiente. En contraste, el pretratamiento con immpip disminuyó significativamente las puntuaciones de las LIDs axiales (-83, -42 y -32% a los 3, 6 y 9 días, respectivamente; $P < 0.01$ para todos los valores; Figura 15A) en comparación con el grupo de L-Dopa sola, lo que indica que el efecto anti-discinético estaba presente solo en los primeros días. La administración de Immpip solo en los días -5 y -2 no produjo un efecto significativo en las puntuaciones y en el total de las LIDs axiales (Figuras 15A-B respectivamente). La Figura 15B muestra que la administración crónica de immpip (L-Dopa + immpip durante 14 días) disminuyó significativamente el número total de las LIDs axiales (-76, -70, -78, -80 y -86% a 3, 6, 9, 12 y 14 días post-tratamiento, respectivamente; $P < 0.05$ para todos los valores) en comparación con el grupo de solo L-Dopa. En contraste, la administración crónica de immpip + L-Dopa no produjo un efecto significativo en el número total de las LIDs axiales en 3, 6, 9, 12 y 14 días en comparación con el grupo vehículo (Figura 15B). La administración subcrónica y aguda de immpip no tuvo un efecto significativo en el número total de las LIDs axiales en comparación con el grupo de solo L-Dopa (Figura 15B). Se observó un efecto anti-discinético para el tratamiento previo con immpip, que disminuyó significativamente el número total de las LIDs axiales (-94 y -74% a los 3 y 6 días, respectivamente; $P < 0.05$ para ambos valores) en comparación con el grupo de solo L-Dopa (Figura 15B).



La figura 16A muestra que la administración crónica de immePIP disminuyó significativamente las puntuaciones de las LIDs de las extremidades (-69, -70, -83, -82 y -83% a los 3, 6, 9, 12 y 14 días post-tratamiento, respectivamente; $P < 0.01$ para todos los valores) en comparación con el grupo de solo L-Dopa. La administración subcrónica y aguda de immePIP no afectó las puntuaciones de las LIDs de las extremidades en comparación con el grupo de solo L-Dopa. La administración del pre-tratamiento con immePIP en los días -5 y -2 previos al tratamiento con L-Dopa, no produjo un efecto significativo en las puntuaciones y el número total de las LIDs de las extremidades (Figura 16A y 16B respectivamente), pero se observó un efecto anti-discinético significativo de las LIDs de las extremidades en los días 3 y 6 (-85 y -43%, respectivamente; $P < 0.01$ para ambos valores) en comparación con el grupo de solo L-Dopa (Figura 16A). Con respecto al número total de las LIDs de las extremidades, el grupo de immePIP crónico mostró una disminución significativa (-76, -74, -80, -84 y -82% a los 3, 6, 9, 12 y 14 días post tratamiento, respectivamente; $P < 0.0001$ para todos los valores; Figura 16B) en comparación con el grupo de solo L-Dopa, pero sin diferencias con el grupo vehículo. La administración subcrónica y aguda de immePIP no produjo una diferencia significativa en el número total de las LIDs de las extremidades en comparación con el grupo de solo L-Dopa (Figura 16B). Sin embargo, el pre-tratamiento con immePIP disminuyó significativamente el número total de las LIDs de las extremidades (-95 y -63% a los 3 y 6 días, respectivamente; $P < 0.0001$ para ambos valores; Figura 16B) en comparación con el grupo de solo L-Dopa, lo que indica que el efecto anti-discinético se produjo temporalmente durante los primeros días.

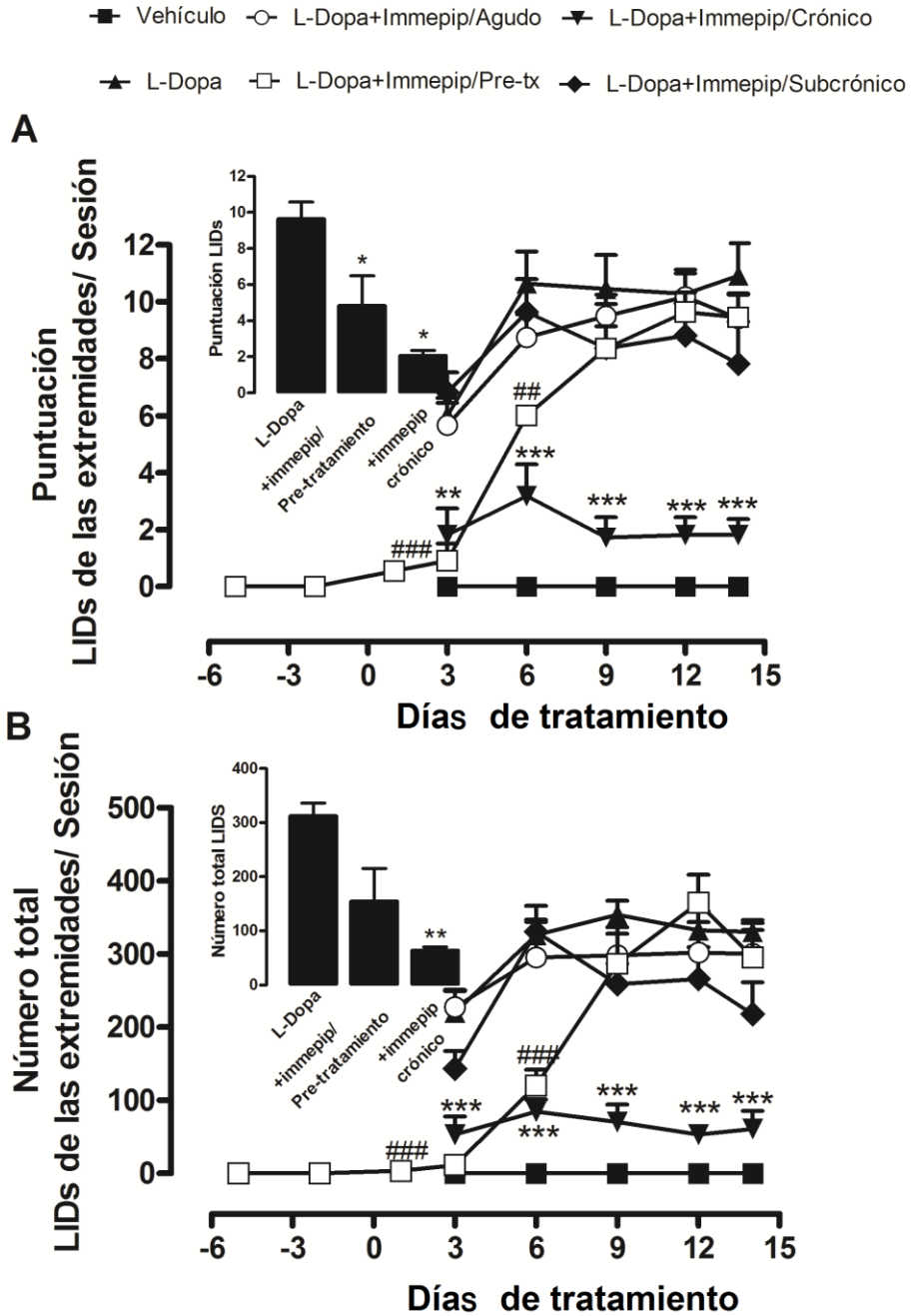


Figura 16: Efecto de la administración sistémica del agonista del RH_3 immepip (1 mg/ kg) sobre las puntuaciones (A) y el número total de las LIDs de las extremidades (B). Todos los valores se expresan como la media \pm error estándar. En cada sesión por día, se sumaron las puntuaciones de las escalas correspondientes a las 6 observaciones (A), mientras que, para el número total de las LIDs de las extremidades, se contaron y luego se sumaron por sesión (B). El inserto de las barras muestra la comparación entre los grupos representativos de L-Dopa, pre-immepip y L-Dopa +immepip crónico. *, $P < 0.05$; **, ##, $P < 0.01$; ***, ###, $P < 0.0001$; cuando se compara con el grupo de L-Dopa.

Como se muestra en la figura 17A, la administración crónica de immepip disminuyó significativamente las puntuaciones de las LIDs orolinguales (-75, -69, -68, -89 y -82% a los 3, 6, 9, 12 y 14 días post tratamiento, respectivamente; $P < 0.01$ para todos los valores) en comparación con el grupo de solo L-Dopa. La administración del pre-tratamiento con immepip solo en los días -5 y -2 no produjo un efecto significativo en las puntuaciones y en el número total de las LIDs orolinguales, pero en los días 3 y 6 se observó un efecto anti-discinético con una disminución significativa de las LIDs orolinguales (-86 y -51%, respectivamente; $P < 0.05$ para ambos valores; Figura 17A y B) en comparación con el grupo de solo L-Dopa.

La Figura 17B muestra que en el grupo de immepip crónico presentó una disminución significativa en el número total de las LIDs orolinguales (-87, -83, -82, -86 y -77% a los 3, 6, 9, 12 y 14 días post-tratamiento, respectivamente; $P < 0.01$ para todos los valores) en comparación con el grupo de solo L-Dopa, pero ninguna diferencia significativa en comparación con el grupo vehículo. La administración subcrónica y aguda de immepip no afectó el número total de las LIDs orolinguales en comparación con los grupos de solo L-Dopa. Sin embargo, el pre-tratamiento con immepip disminuyó significativamente el número total de las LIDs orolinguales (-96 y -73% a los 3 y 6 días, respectivamente; $P < 0.001$ para ambos valores; Figura 17B) en comparación con el grupo de solo L-Dopa.

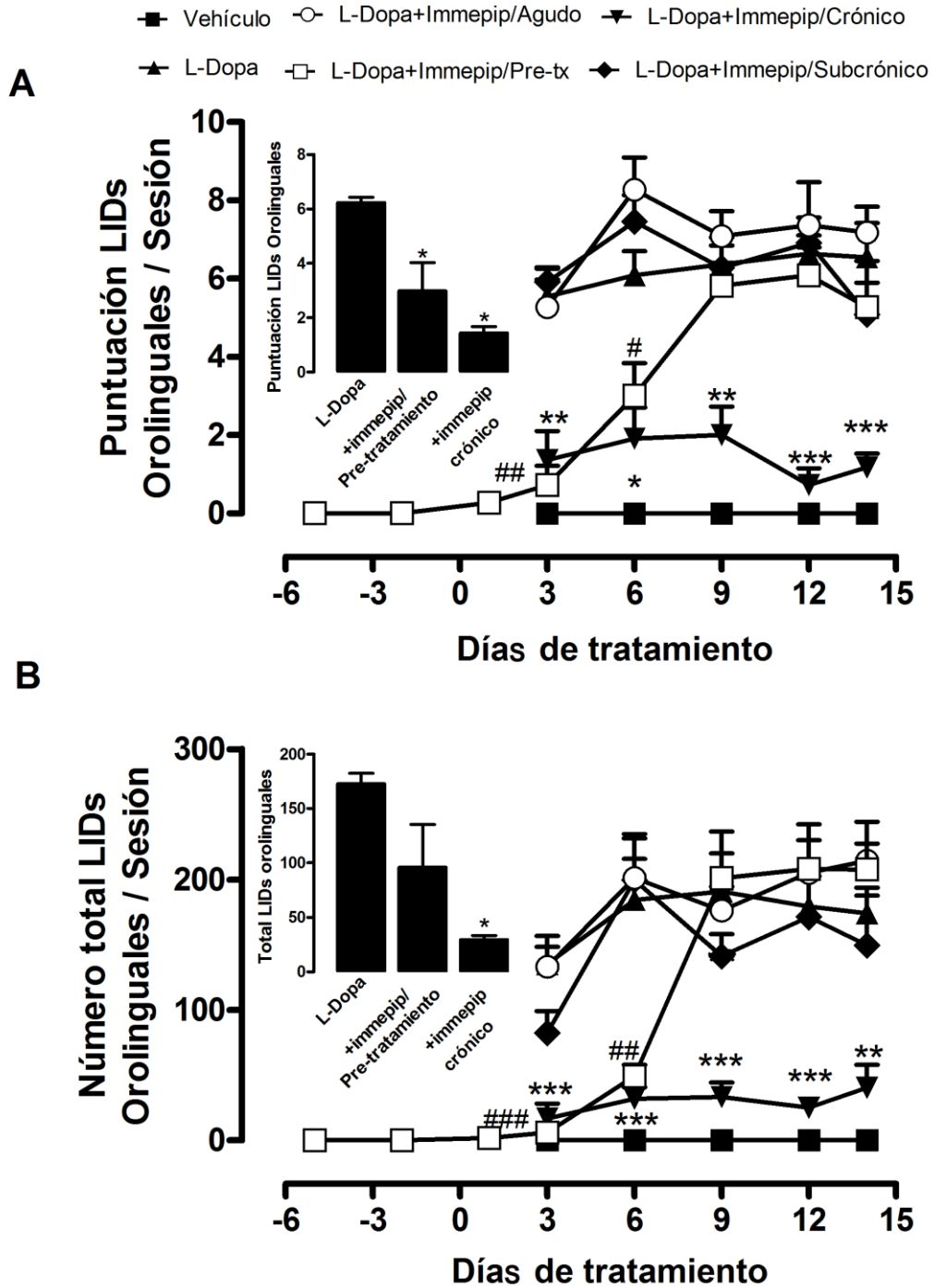


Figura 17: Efecto de la administración sistémica del agonista del RH₃ immepip (1 mg/kg) sobre las puntuaciones (A) y el número total de las LIDs orolinguales (B). Todos los valores fueron expresados como la media \pm error estándar. El inserto de las barras muestra la comparación entre los grupos representativos de L-Dopa, pre-immepip y L-Dopa + immepip crónico. *, #, $P < 0.05$; **, ##, $P < 0.01$; ***, ###, $P < 0.0001$; cuando se compara con el grupo de L-Dopa.

La figura 18A y B muestran que la administración crónica de immePIP + L-Dopa no afectó la puntuación y el número total de las LIDs locomotoras en comparación con los respectivos grupos de solo L-Dopa. La administración aguda de immePIP aumentó significativamente las puntuaciones de las LIDs locomotoras (69, 83, 87 y 68% a los 3, 6, 12 y 14 días, respectivamente; $P < 0.05$ para todos los valores; Figura 18A), mientras que, la administración subcrónica de immePIP no tuvo un efecto significativo en comparación con el grupo L-Dopa. Además, la administración del pre-tratamiento con immePIP en los días -5 y -2 no presentó un efecto significativo en las puntuaciones y en el número total de las LIDs locomotoras, y la administración concomitante con L-Dopa a los 3, 6, 9, 12 y 14 días no afectó las puntuaciones y el número total de las LIDs locomotoras (Figura 18A, B) en comparación con el grupo vehículo. La administración crónica de immePIP + L-Dopa no produjo un efecto significativo en el número total de las LIDs locomotoras a los 3, 6, 9, 12 y 14 días en comparación con el grupo vehículo (Figura. 18B). La administración subcrónica y aguda de immePIP no produjo una diferencia significativa en el número total de las LIDs locomotoras en comparación con el grupo de solo L-Dopa (Figura 18B).

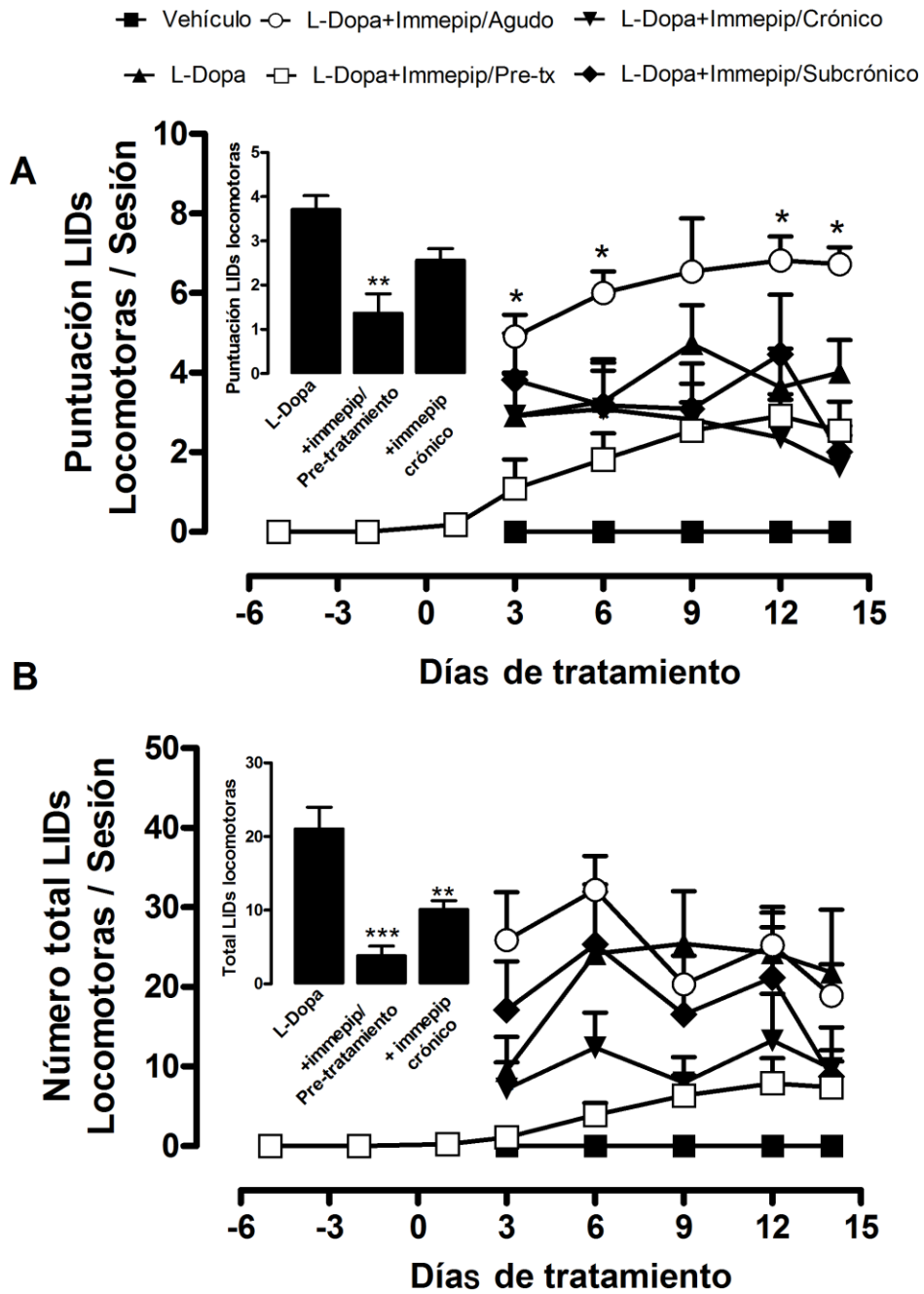


Figura 18: Efecto de la administración sistémica del immeip (1 mg/kg) sobre las puntuaciones de (A) y el número total de las LIDs locomotoras (B). Todos los valores se expresan como la media \pm error estándar. En cada sesión por día, las puntuaciones corresponden a la suma de cada calificación de las 6 observaciones (A), mientras que para el número total de las LIDs locomotoras corresponden a la suma total de las 6 observaciones. El inserto de las barras muestra la comparación entre los grupos representativos de L-Dopa, pre-immepip y L-Dopa + immeip crónico. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$; cuando se compara con el grupo de L-Dopa.

Como se muestra en la figura 19A, la administración crónica de immapip disminuyó significativamente la suma de las puntuaciones de las LIDs axiales, de las extremidades y orolinguales (ALO) (-75, -70, -80, -86 y -84% a los 3, 6, 9, 12 y 14 días post-tratamiento, respectivamente; $P < 0.01$ para todos los valores) en comparación con el grupo de solo L-Dopa. La administración del pre-tratamiento con immapip solo en los días -5 y -2 no produjo un efecto significativo en las puntuaciones y el número total de ALO, pero en los días 3 y 6 mostró un efecto anti-discinético con una disminución significativa en las puntuaciones de ALO (-85 y -45%, respectivamente; $P < 0.05$ para ambos valores; Figura 19A) en comparación con el grupo de L-Dopa sola. La figura 19B muestra que el grupo de immapip crónico presentó una disminución significativa en el número total de ALO (-79, -77, -81, -85 y -80% a los 3, 6, 9, 12 y 14 días post-tratamiento, respectivamente; $P < 0.001$ para todos los valores) en comparación con el grupo de solo L-Dopa, pero no hay diferencia significativa con el grupo vehículo.

La administración subcrónica y aguda de immapip no afectó las puntuaciones de ALO en comparación con los grupos de solo L-Dopa correspondientes. Sin embargo, el pre-tratamiento con immapip disminuyó significativamente el número total de ALO (-95 y -70% a los 3 y 6 días, respectivamente; $P < 0.001$ para ambos valores; Figura 19B) en comparación con el grupo de solo L-Dopa, lo que indica que el efecto anti-discinético se produjo en los primeros días de iniciado el tratamiento.

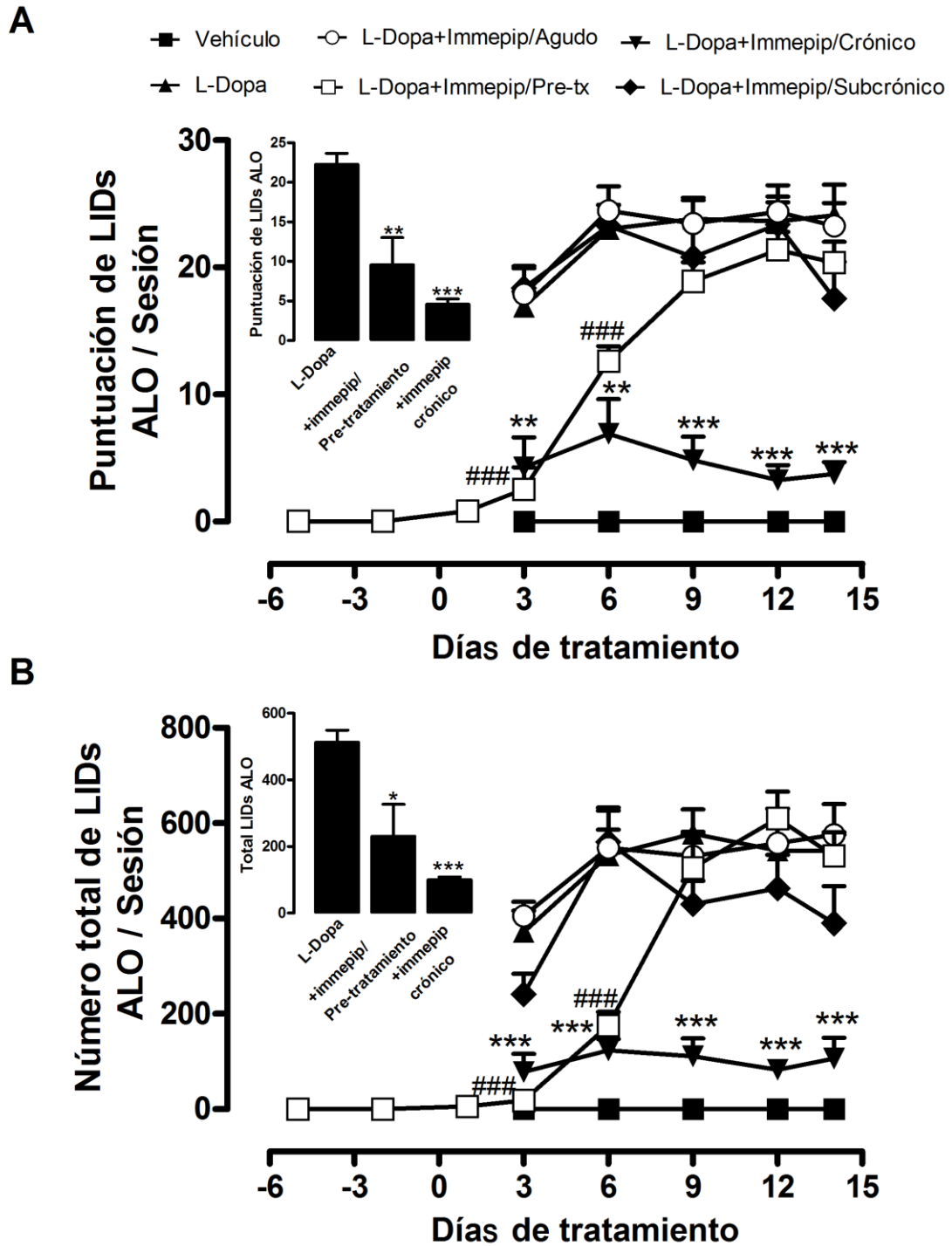
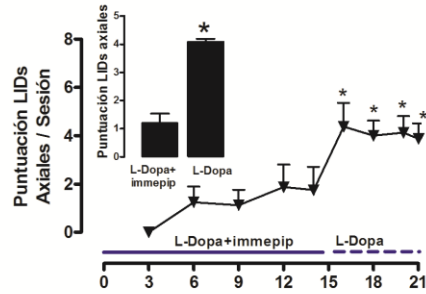
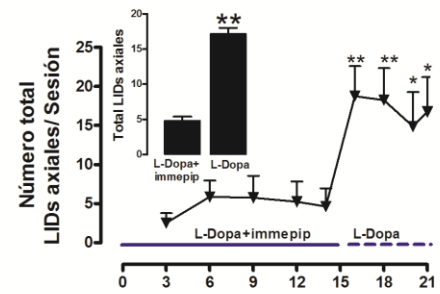
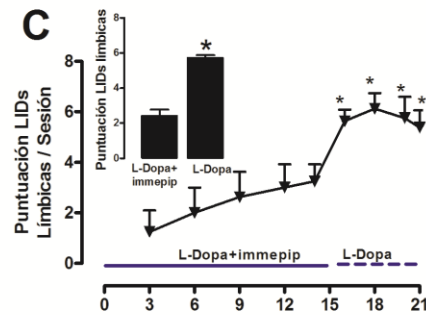
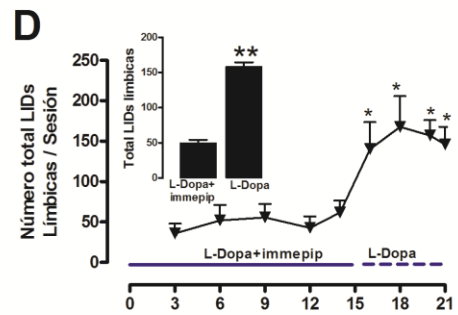
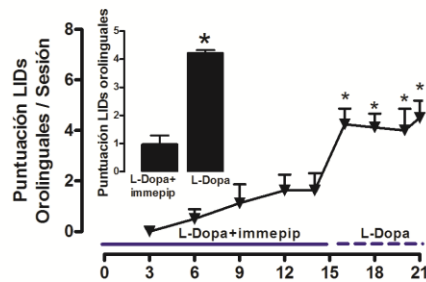
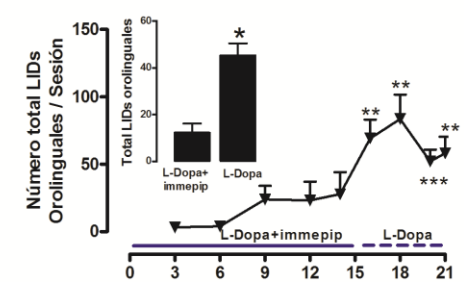
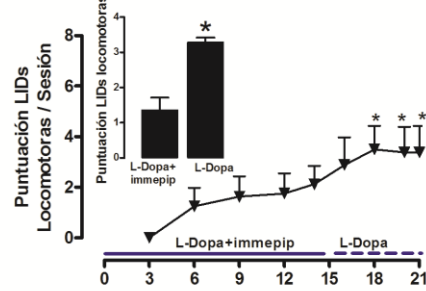
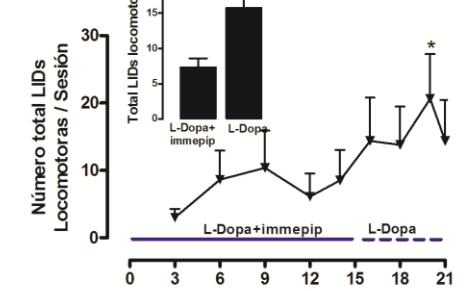


Figura 19: Efecto de la administración sistémica del immeip sobre las puntuaciones de las ALO (A) y el número total de las LIDs ALO (B). Todos los valores se expresan con la media \pm error estándar. El inserto muestra la comparación entre los grupos representativos L-Dopa, pre-immeip y L-Dopa +immeip crónico. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, ###, $P < 0.0001$; cuando se compara con el grupo de L-Dopa.

7.4. EXPERIMENTO 2. Efecto de la suspensión de la administración crónica de immepip crónico en las LIDs

La figura 20 muestra que la exclusión de immepip del tratamiento en el grupo de L-Dopa+immepip crónico aumentó significativamente las puntuaciones de las LIDs axiales (265, 233, 244 y 223% en los días 16, 18, 20 y 21 post-exclusión de immepip, respectivamente; $P < 0.02$ para todos los valores; Figura 20A), de las extremidades (135, 155, 140 y 124% en los días 16, 18, 20 y 21 post-exclusión de immepip, respectivamente; $P < 0.02$ para todos los valores; Figura 20C), y orolinguales (325, 313, 300 y 350% en los días 16, 18, 20 y 21 post-exclusión de immepip, respectivamente; $P < 0.02$ para todos los valores; Figura 20E) y las LIDs locomotoras (180, 170 y 170% en los días 18, 20 y 21 post-exclusión, respectivamente; $P < 0.05$ para todos los valores; Figura 20G) comparados con los días 3, 6, 9, 12 y 14 previos a la suspensión del immepip.

Para el número total de las LIDs, la exclusión de immepip aumentó significativamente las LIDs axiales (265, 256, 190 y 226% en los días 16, 18, 20 y 21 post-exclusión de immepip respectivamente; $P < 0.02$ para todos los valores; Figura 20B), las LIDs de las extremidades (85, 121, 107 y 92% en los días 16, 18, 20 y 21 post-exclusión de immepip, respectivamente; $P < 0.05$ para todos los valores; Figura 20D), las LIDs orolinguales (482, 709, 468 y 501% a los 16, 18, 20 y 21 días, respectivamente; $P < 0.001$ para todos los valores; Figura 20F) y las LIDs locomotoras (179% a 20 días; $P < 0.05$; Figura 20H) en comparación con los valores de L-Dopa + immepip de 3, 6, 9, 12 y 14 días.

A**B****C****D****E****F****G****H**

Días de tratamiento

Días de tratamiento

Figura 20: Efecto de la administración sistémica durante 14 días consecutivos de L-Dopa+immepip (6.25 mg/ kg; 1 mg/ kg) después se retiró el fármaco immepip evaluándose los efectos de L-Dopa sola durante 7 días (del día 16 al 21), en las puntuaciones de las LIDs axiales (A), límbicas (C), orolinguales (E) y locomotoras (G) y sus respectivas LIDs evaluando el número total (B, D, F, H). El grupo de immepip crónico recibió una dosis diaria de L-Dopa + immepip durante 14 días (L-Dopa + immepip / crónico). Todos los valores se expresan con la media \pm error estándar. En cada sesión por día, las puntuaciones de las LIDs recibidas en las 6 observaciones fueron sumadas por subtipo, mientras que, para el número total de las LIDs por subtipo, cada LIDs se contó y luego se sumó por sesión. El inserto de barras muestra la comparación de las LIDs totales entre los grupos L-Dopa + immepip y L-Dopa. Las barras corresponden a los promedios \pm error estándar de las puntuaciones y los totales de los días 3, 6, 9, 12 y 14 para L-Dopa + immepip, y los días 16, 18, 20 y 21 después de la suspensión de immepip (solo L-Dopa). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $p < 0.0001$; en comparación con los valores de L-Dopa + immepip.

7.5. EXPERIMENTO 3. Efecto de immepip crónico sobre la liberación de GABA y glutamato estriatales

En el grupo que recibió únicamente L-Dopa (6.25 mg/ kg), la administración sistémica al día 15 post-tratamiento aumentó significativamente la liberación de glutamato estriatal en un 150, 134 y 127% a los 120, 150 y 180 min comparado con los valores para las ratas parkinsonianas que recibieron dosis única de L-Dopa respectivamente ($P < 0.05$ para todos los valores; Figura 21A). Se observó un efecto similar para los niveles de GABA para el grupo de solo L-Dopa con un aumento de 195, 185 y 176% de los valores para las ratas parkinsonianas a 120, 150 y 180 min, respectivamente; $P < 0.05$ para todos los valores (Figura 21B). En contraste, en el grupo de L-Dopa+immepip crónico, la administración de L-Dopa disminuyó significativamente los niveles de glutamato estriatales en comparación con las ratas parkinsonianas (-40, -41 y -35% a 120, 150 y 180 min, respectivamente; $P < 0.05$ para todos los valores; Figura 21A), mientras que los niveles de GABA estriatales no se vieron afectados al compararlos con el mismo grupo de ratas parkinsonianas (Figura 21B).

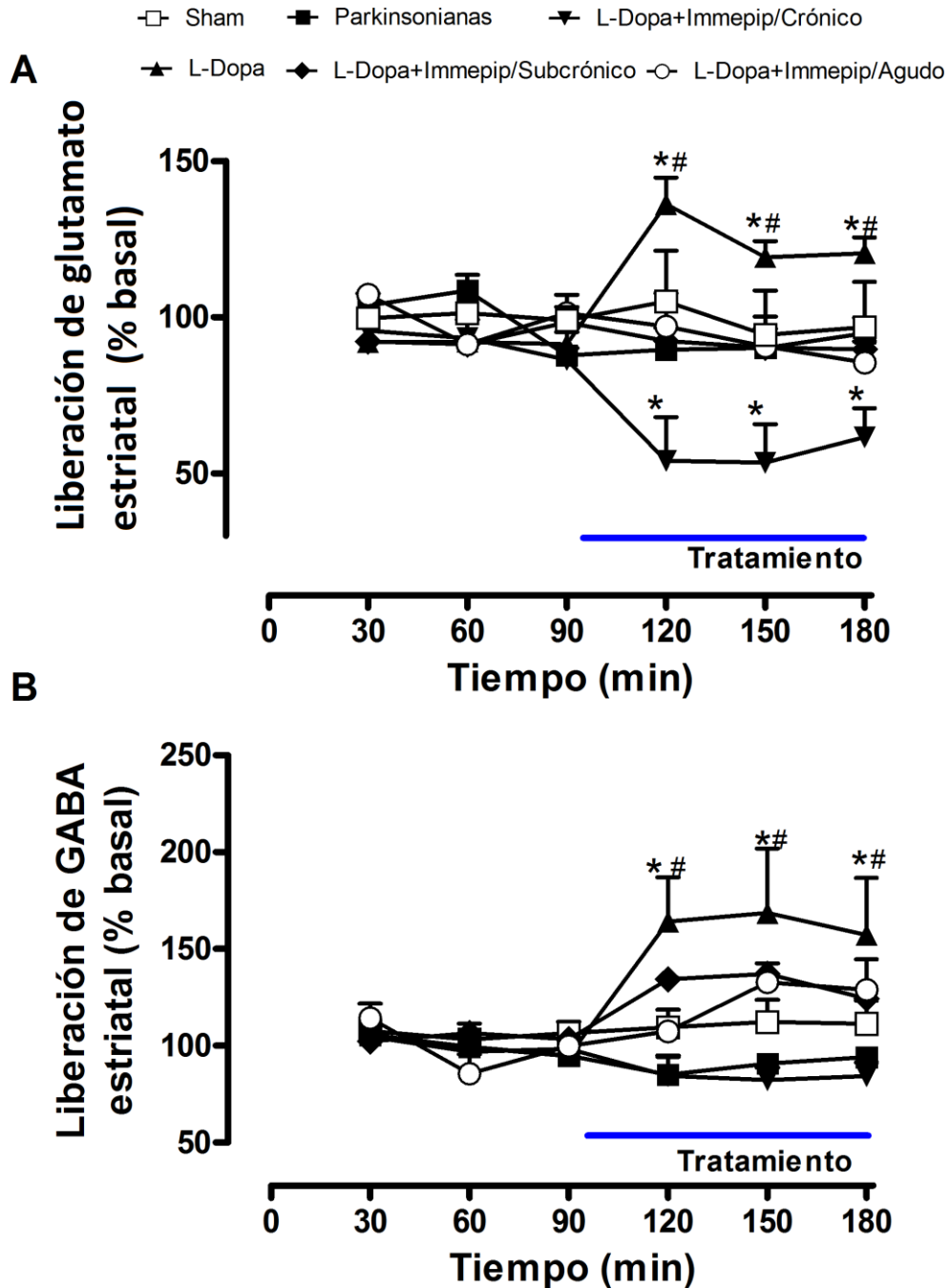


Figura 21: Efecto de la administración sistémica del immepip (1 mg/ kg) en la liberación de glutamato (A) y GABA (B) en el neostriado ipsilateral a la lesión. Los valores están representados con la media \pm error estándar. Los grupos sham, parkinsonianos y L-Dopa recibieron la administración de L-Dopa durante el experimento de la microdiálisis. Todos los valores se expresan con media \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney para comparar los grupos de tratamiento. *, $P < 0.05$; En comparación con los valores del grupo de ratas parkinsonianas. #, $P < 0.05$; Cuando se compara con valores del grupo de immepip crónico.

8 Discusión

El principal hallazgo de este estudio fue que la administración crónica del fármaco agonista para los RH_{3s} immpip reduce las discinesias inducidas por la L-Dopa en ratas parkinsonianas lesionadas con la neurotoxina 6-OHDA.

En este estudio, corroboramos que la administración crónica de la L-Dopa conduce a la generación de las discinesias. Se ha descrito, que el mecanismo de la génesis de las discinesias está asociado con el proceso de sensibilización de los RD_{1s} localizados en las NEMs estriatales (Pavon y cols., 2006; Valastro y cols., 2007), y la estimulación prolongada de los RD_{1s} con la administración crónica de L-Dopa induce una reorganización anormal, así como la sobre expresión de los RD_{1s} (Berthet y cols., 2009). Los cambios celulares y funcionales particularmente en la vía directa se conocen como “hipersensibilidad a la denervación de axones dopaminérgicos” (Bordet y cols., 2000). La hipersensibilidad se ha demostrado con el aumento de ARNm para sustancia P y dinorfinas, ambos marcadores de las NEMs que conforman la vía directa (Cenci y cols., 1998). Los cambios en las propiedades de membrana de las NEMs conducen a una mayor actividad excitatoria, incluida la sobre expresión de proteínas y enzimas en la vía directa, tales como: la enzima AC, la PKA, la DARPP-32 y CdK5 (Aubert y cols., 2005; Santini y cols., 2007), así como en la regulación de algunos genes y proteínas, de los que están incluidos los zif 268, c-fos, c-jun y MAPK-1. La mayoría de estos genes y proteínas están relacionados con la actividad neuronal, en la expresión de los RD_{1s} y de moléculas asociadas a su vía de transducción de señal (Napolitano y cols., 2002).

En animales no lesionados, se ha demostrado que la activación de los RD₁s facilita la excitabilidad de las NEMs cuando su potencial de membrana está cercano al umbral de disparo (-54 mV) y el efecto facilitador inducido por la estimulación del RD₁ puede ser inhibido tras la activación de los RH₃s, tanto a nivel del estriado y de la SNr (Arias-Montaño y cols., 2007; García y cols., 1997; Napolitano y cols., 2002). Se ha demostrado en ratas parkinsonianas una reorganización de proteínas en la membrana de las NEMs, cambios que afectan el acoplamiento de los RD₁s en las proteínas G α_{olf} de las ratas, así como en el contenido de dicha proteína (Cai y cols., 2002; Rangel-Barajas y cols., 20011). En ratones discinéticos se ha reportado el aumento en la expresión de las proteínas G α_{olf} (Alcacer y cols., 2012), así como el aumento de la expresión de la AC V/VI y la acumulación de AMPc (Rangel-Barajas y cols., 2011). Los cambios en el contenido de la AC V/VI y la acumulación de AMPc se correlacionan con el aumento en la liberación de GABA en la SNr de ratas discinéticas (Rangel-Barajas y cols., 2011).

Con los estudios previamente mencionados podemos proponer que la administración crónica de L-Dopa induce la sensibilización de los RD₁s en las NEMs de la vía directa, lo que conlleva a una señalización excesiva tras la activación de los RD₁s, que conduce a la activación de la PKA y la DARPP-32 promoviendo un efecto en cascada de la señalización intracelular que da como resultado la expresión génica anormal (Spigolon y Fisone, 2018). En un estudio en animales discinéticos se demostró que la administración de L-Dopa incrementa la fosforilación de DARPP-32 en Thr34, ERK, MSK1 e histona 3, y la activación de la transcripción de genes como los Arc, c-Fos, FosB y ZIF-268 en las NEMs de la vía directa (Santini y cols.,

2007). También se ha indicado que la fosforilación de DARPP-32 en Thr34 conduce a la fosforilación de ERK (Taniguchi y cols., 2009) y que posiblemente es como consecuencia a la alteración funcional de la calmodulina Ca^{2+} /calmodulina-dependiente CaMKII que desfosforila DARPP-32. En otros estudios se ha demostrado que ERK está asociado con las LIDs (Pavón y cols., 2006) y que el uso de inhibidores las reduce (Cheen y cols., 2017;). En este estudio, es posible que la génesis de las discinesias inducida por las dosis repetidas de la L-Dopa estén asociadas a procesos de neuroplasticidad, ya que se ha demostrado en animales discinéticos un aumento en la potenciación a largo plazo (LTP) y una disminución en la depresión a largo plazo (LTD) (Galabresi y cols., 2008).

Asimismo, la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) es una importante proteína intracelular involucrada en la LTP (Sweatt, 2001) y se cree que también está asociada con el proceso de cebado de las LIDs (Santini y cols., 2010). La señalización de ERK es parte de las vías intracelulares de los $\text{RD}_{1\text{s}}$ y su desfosforilación está regulada por la proteína fosfatasa 1 (Valjent y cols., 2005). La activación de los $\text{RD}_{1\text{s}}$ induce la fosforilación de ERK en el cerebro normal y en ratas con depleción de DA estriatal (Gerfen y cols., 2002), y existe una correlación entre ERK fosforilado y las LIDs (Westin y cols., 2007), asimismo, el aumento en la fosforilación de ERK producido por la L-Dopa en ratones lesionados con 6-OHDA se reduce en ratones nocaout para la DARPP-32 (Santini y cols., 2007). Además, farmacológicamente las LIDs se reducen con la inhibición de la señalización intracelular de ERK (Lindgren y cols., 2009). Asimismo, la familia de factores de transcripción fos/jun ha sido ampliamente estudiada. Los agentes dopamino-

miméticos inducen la expresión de los genes c-jun, c-fos, Δ FosB y FosB en neuronas del neostriado en animales normales (Graybiel y cols., 1990) y animales parkinsonianos. Además, existe una correlación positiva entre el número de células inmunorreactivas a FosB/ Δ FosB y la gravedad de las LIDs en ratas lesionadas con 6-OHDA (Levandis y cols., 2008). Esto sugiere que la DA sintetizada con L-Dopa activa a los RD₁s, aumentando la expresión de genes y estimulando la vía directa (Bordet y cols., 2000).

En este estudio, los grupos de imnepip subcrónico y agudo administrados los días 8 y 12, respectivamente no disminuyeron las discinesias, es decir, en ambos grupos el imnepip fue administrado cuando las discinesias estaban establecidas, tal y como lo describió Papathanou y cols., (2014). Estos autores demostraron en ratas lesionadas con la 6-OHDA que la dosis única de imnepip a 1, 5 y 10 mg/ kg no produjo ningún efecto sobre las discinesias, pero la dosis alta de 10 mg/ kg de agonistas de los RH₃s como imnepip o imetit si disminuyó significativamente los movimientos coreicos inducidos por la L-Dopa, en cambio, no tuvo ningún efecto sobre la discapacidad motora y las discinesias en los monos títes lesionados con 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Gómez-Ramírez y cols., 2006). A pesar de la falta del efecto sobre las discinesias con dosis altas y bajas, la administración sistémica de 5 mg/ kg de imetit disminuyó la liberación de DA inducida por la L-Dopa en el neostriado de ratas lesionadas con la 6-OHDA y redujo la conducta estereotipada inducida por la L-Dopa (Nowak y cols., 2008), esto sugiere que la activación aguda del RH₃ reduce la transmisión dopaminérgica inducida por la L-Dopa, pero no las discinesias, presumiblemente debido a la presencia de

alteraciones crónicas en la transmisión dopaminérgica inducida por L-Dopa y la sensibilización de los RD₁s en NEMs de la vía directa, lo que conlleva a una señalización excesiva de los RD₁s que a través de la PKA y la DARPP-32 promueve un efecto en cascada de la señalización intracelular que da como resultado la expresión génica anormal (Spigolon y Fisone, 2018). La ineficacia de la administración aguda y subcrónica de immapip para modificar las discinesias podría, por lo tanto, depender de la generación previa de cambios pre- y post-sinápticos inducidos por la administración crónica de L-Dopa (Papathanou y cols., 2014).

En contraste, nuestro estudio demostró que la administración del agonista para los RH₃s immapip durante 14 días disminuyó las discinesias axiales, orolinguales y de las extremidades en el grupo de L-Dopa + immapip crónico desde el día 3 del tratamiento. Nuestros resultados sugieren que el agonista para los RH₃s immapip es efectivo al iniciar el tratamiento de la L-Dopa, pero es ineficaz si las discinesias están establecidas. Esta hipótesis fue demostrada en el grupo de immapip crónico retirado después del día 14 (Figura 20).

Los RD₁s y RH₃s son expresados por las NEMs de la vía directa (González-Sepúlveda y cols., 2013), tanto a nivel somatodendrítico como en las terminales sinápticas. Previamente, fue demostrada una interacción funcional entre estos receptores en varios estudios (Arias-Montaña y cols., 2001; García y cols., 1997; Moreno et al., 2011; Rapanelli, 2017; Ryu et al., 1994b). A nivel pre-sináptico, los estudios en rebanadas estriatales y de la SNr, la activación de los RH₃s con immapip inhibió la liberación de [³H]-GABA inducida por la estimulación de los RD₁s (Arias-

Montaño y cols., 2001; García y cols., 1997), y la administración sistémica del agonista del RH₃ immepip (5 mg/kg) disminuye la liberación de DA inducida por la L-Dopa en el neostriado de ratas lesionadas con 6-OHDA (Nowak y cols., 2008), presumiblemente activando a los RH₃s ubicados en terminales dopaminérgicas estriatales (Schlicker y cols., 1993).

A nivel post-sináptico, la activación de los RH₃s reduce la formación de AMPc inducida por la activación de los RD₁s (Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004). La activación de los RH₃s acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ inhiben a la AC vía la subunidad $\alpha_{i/o}$, mientras que las subunidades $\beta\gamma$ inhiben canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y aumentan la conductancia de los canales de K⁺ (Brown y cols., 2001; Milligan y Kostenis, 2006; Sahlholm y cols., 2007).

Asimismo, los RH₃s pueden formar heterodímeros con los RD₁s y heterómeros con los RD₁s y los receptores a glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA). Mientras que en el dímero entre los RD₁s/ RH₃s, la activación del RH₃ reduce la afinidad del RD₁ por agonistas selectivos y disocia el acoplamiento de los RD₁s de proteínas G α_s a proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Ferrada y cols., 2009; Moreno y cols., 2011). En el complejo de los RD₁/ RH₃/ NMDA, la activación del RH₃ previene la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la estimulación de los RD₁s (Rodríguez-Ruiz y cols., 2017).

Nuestros resultados mostraron también que la administración de immepip solo (1 mg/ kg) en el grupo de pre-tratamiento, durante 5 días consecutivos antes de la administración de L-Dopa no redujo las puntuaciones y el número total de las LIDs axiales, orolinguales, locomotoras y de las extremidades (Figuras 15 a 20). Una

posible explicación para dicho resultado es que la activación continua de los RH₃s en ausencia de la estimulación de los RD₁s puede conducir a la desensibilización de los RH₃s post-sinápticos (García-Gálvez y cols., 2018; Osorio-Espinoza y cols., 2014).

En los resultados de liberación por el método de microdiálisis, la inyección sistémica de L-Dopa (6.25 mg/ kg) en el grupo de L-Dopa aumentó significativamente la liberación de GABA y glutamato en el neostriado en comparación con las ratas parkinsonianas.

El aumento en la liberación de GABA en nuestro estudio fue consistente con resultados previos donde se demostró aumentada la liberación [³H]-GABA en rebanadas de la SNr de ratas discinéticas (Rangel-Barajas y cols., 2011), y dicho aumento se correlaciona con las discinesias registradas en nuestro estudio y podría explicarse por la sensibilización de los RD₁s (Figura 22C).

Por otra parte, la administración crónica de immpip previno el efecto de la L-Dopa, disminuyendo la liberación de GABA y puede asociarse con la interacción funcional entre los RH₃s y los RD₁s analizados anteriormente (Arias-Montaña y cols., 2001; García y cols., 1997; Moreno y cols., 2011; Rapanelli, 2017). Presumiblemente la interacción entre los RH₃s y los RD₁s, podría asociarse a la activación de receptores localizados a nivel pre- y post-sinápticos, disminuyendo tanto la liberación de GABA como la frecuencia de disparo de potenciales de acción en las NEMs, respectivamente. Los resultados obtenidos en el tratamiento crónico de immpip con la reducción de las LIDs podrían explicarse utilizando el modelo clásico del

circuito y función de los GB (Albin y cols., 1989; Figura 22D) que sugiere que la reducción de GABA estriatal y posiblemente a nivel de SNr, contribuiría desde la modulación de los núcleos de salida de los GB a la reducción de la actividad de la vía cortico-estriatal, comparado con el grupo de L-Dopa sola que mostró un efecto opuesto (Figura 22 C).

En este estudio, el aumento en la liberación de glutamato en ratas discinéticas coincide con lo reportado previamente donde se describió el incremento de glutamato extracelular (Huot y cols., 2013). El glutamato es un neurotransmisor excitador que actúa a través de los receptores a glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), y los estudios experimentales han demostrado que la hiperfosforilación de las subunidades NR1, NR2A y NR2B se asocia con el aumento de la neurotransmisión glutamatérgica y el desarrollo de las discinesias (Pagano y cols., 2017) (Figura 22C). Utilizando nuevamente el modelo clásico del circuito y función de los GB (Albin y cols., 1989) sugiere que la hiperactividad de las proyecciones glutamatérgicas de la vía cortico-estriatal es la ruta crítica para producir la hiperactividad de las NEMs estriado-nigrales que forman la vía directa en los GB (Figura 22C).

Si bien la administración aguda y subcrónica de immpip solo previno el efecto de la L-Dopa en la liberación de GABA y glutamato, la administración crónica de immpip redujo los niveles de glutamato a valores inferiores al basal. Una explicación para este último efecto podría ser la inhibición de la vía cortico-estriatal (Figura 22D), que es altamente dominante en la modulación de la actividad de las neuronas del neostriado en comparación con la vía tálamo-cortical (Ding y cols.,

2008). En cambio, los tratamientos agudo y subcrónico con immePIP no mostraron aumentados los niveles de GABA y glutamato estriatales, y también no mostraron diferencias significativas con el grupo de ratas parkinsonianas, una explicación presumiblemente sería la participación de los RH₃s estimulados en la terminal cortico-estriatal (Molina-Hernández y cols., 2001) y en las NEMs (Arias-Montaño y cols., 2001), que reducen la liberación. Además, se ha demostrado que la activación del RH₃ cortico-estriatal reduce la transmisión sináptica y la frecuencia de disparo de las NEMs (Doreulee y cols., 2001).

El principal resultado de nuestro estudio fue que la administración crónica del immePIP reduce significativamente las discinesias inducidas por la administración de L-Dopa a ratas parkinsonianas. Aunque los resultados son promisorios, faltan más estudio para corroborar si el efecto benéfico del immePIP crónico es prolongado o transitorio. Por otro lado, sabemos que una de las limitaciones terapéuticas de los fármacos histaminérgicos radica en su estructura química particularmente del anillo imidazol que inhibe la actividad de los citocromos P-450 a nivel hepático y por lo que la administración crónica puede comprometer la función hepática (Schwartz y cols., 1991). Dicha limitante no resta la importancia a los resultados encontrados en nuestro estudio, ya que el desarrollo de nuevos fármacos que no inhiban la actividad de los citocromos permitiría su uso terapéutico.

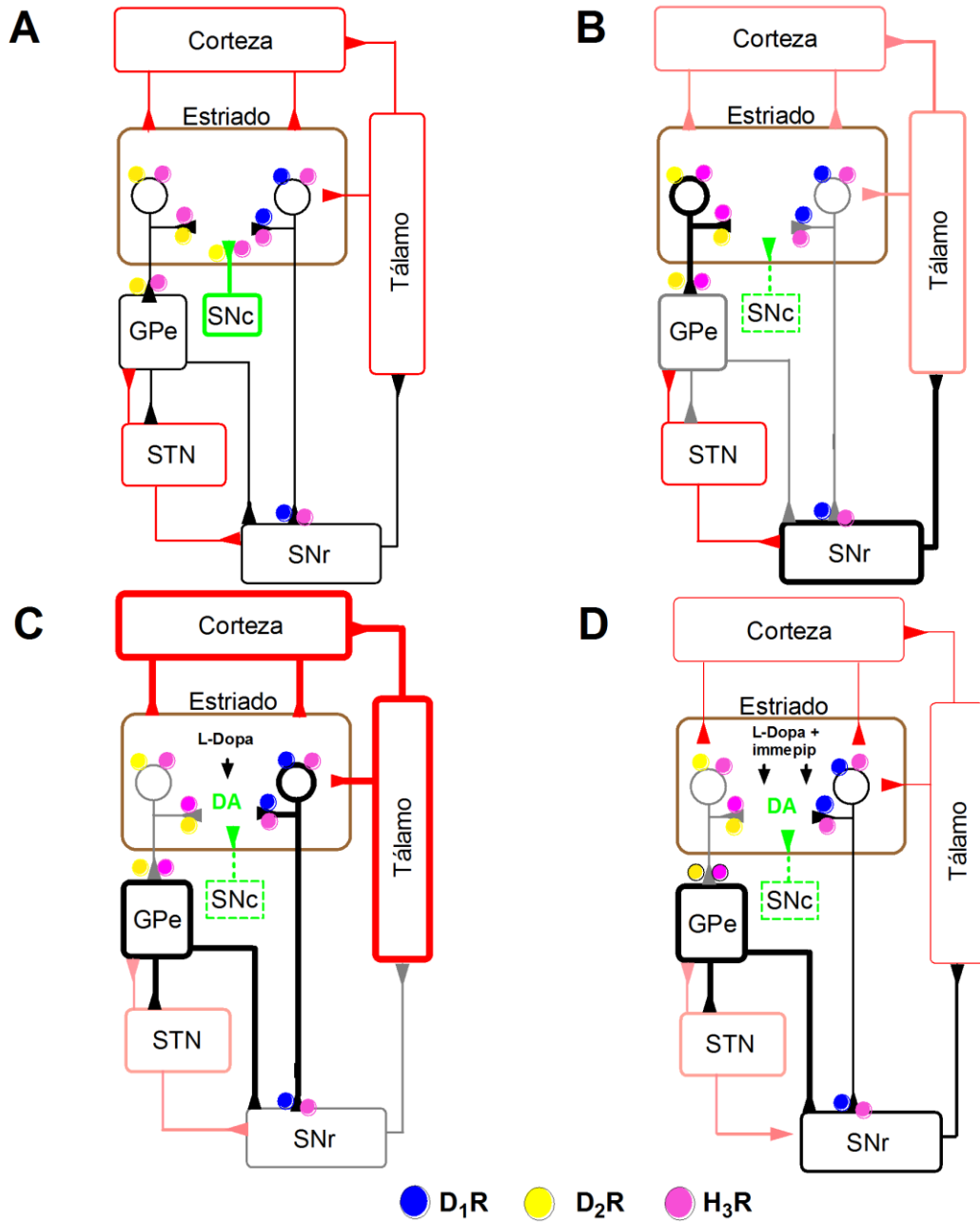


Figura 22: Representación del circuito de los ganglios basales en los estados fisiológicos normal (A), parkinsonismo (B), discinético (C) y en la acción propuesta de la administración crónica del agonista RH₃ imipip (D). Las líneas rojas indican proyecciones excitatorias y las líneas negras proyecciones inhibitorias. Las líneas de puntos indican el agotamiento dopaminérgico en la sustancia negra compacta (SNc). El neostriado se comunica con las neuronas en la sustancia negra reticulada (SNr) a través de la vía directa, y al globo pálido externo (GPe), que a su vez proyecta al núcleo subtalámico (STN) que se proyecta a la SNr, formando la vía indirecta.

9 Conclusiones

- La administración crónica del agonista para los RH₃s immepip disminuye las discinesias en ratas parkinsonianas lesionadas con 6-OHDA.
- La administración aguda y subcrónica no disminuyeron las discinesias, por lo que nuestros resultados sugieren que el immepip es efectivo siempre y cuando se administre cuando inicia el tratamiento de L-Dopa y, por lo tanto, es ineficaz una vez que ya las discinesias están manifestadas.
- La administración crónica de immepip redujo los niveles de GABA y glutamato en el neostriado y estos niveles se correlacionan con la disminución de las discinesias, por lo que el efecto del immepip parece depender de la inhibición mediada por el RH₃ de las acciones estimulantes del RD₁ sobre la liberación de GABA en el neostriado.
- Estos hallazgos pueden contribuir a la comprensión del papel de los RD₁s y los RH₃s en la disfunción de los ganglios basales que ocurren en enfermedades neurodegenerativas que involucran alteraciones del sistema dopaminérgico.

10 Perspectivas

Los resultados obtenidos y discutidos en el presente estudio, plantean algunas perspectivas para realizar experimentos futuros que se pueden encaminar con 3 abordajes:

El primer objetivo estaría dirigido a determinar si la administración crónica de immepip induce una reorganización de los RD₁s y de los RH₃s en la membrana plasmática de las NEMs estudio que se puede realizar utilizando la técnica de unión de radioligando.

El segundo objetivo sería para determinar si la administración crónica del immepip produce efectos post-sinápticos y evaluaríamos la actividad de la adenil ciclasa con la acumulación de AMPc estriatal, utilizando un ensayo de competencia con [³H]-AMPc por la subunidad reguladora de la PKA bovina.

El tercer objetivo propuesto estaría dirigido a determinar la expresión de RNAm para los RD₁s y los RH₃s estriatales después de la administración crónica de immepip, dicho objetivo se puede alcanzar utilizando el método de PCR-TR.

En un cuarto objetivo determinaríamos si el efecto antidiscinético del tratamiento crónico del immepip es prologando o temporal. En este experimento el tratamiento crónico del immepip se llevaría por arriba de los 14 días que analizamos en el presente estudio y se determinará si el efecto antidiscinético se mantiene o es reversible con el paso del tiempo. Para alcanzar este objetivo necesitamos las evaluaciones conductuales de las LIDs.

Un quinto objetivo consistiría en reincorporar el immepip al tratamiento después del día 21, para determinar si el efecto antidiscinético reaparece, que de acuerdo a nuestros resultados el efecto del agonista para los RH₃s en el grupo la administración crónica, fue agudo, ya que el efecto antidiscinético se pierde después del retiro del immepip (Figura 20).

Un sexto objetivo se realizaría con el propósito de entender el posible mecanismo por el cual la estimulación anticipada del RH₃ retarda el efecto discinético inducido por la administración de L-Dopa en el grupo del pre-tratamiento con immepip. Para determinar los cambios en la densidad de los RH₃s localizados en membrana, se puede utilizar el método de unión de radioligando, mientras que para conocer si estos son funcionales, se puede utilizar el método de la microdiálisis cerebral para cuantificar liberación de GABA a nivel presináptico.

11 Referencias

Ahlskog, JE, and Muentner, MD (2001): Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 16, 448-58.

Albin, RL, Young, AB, and Penney, JB (1989): The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences* 12, 366-75.

Alcacer, C, Santini, E, Valjent, E, Gaven, F, Girault, J-A, and Herve, D (2012): $G\alpha_{\text{off}}$ Mutation Allows Parsing the Role of cAMP-Dependent and Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Signaling in L-3,4-Dihydroxyphenylalanine-Induced Dyskinesia. *Journal of Neuroscience* 32, 5900-5910.

Alexander, GE, and Crutcher, MD (1990): Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences* 13, 266-71.

Alfaro-Rodríguez, A, Alonso-Spilsbury, M, Arch-Tirado, E, González-Piña, R, Arias-Montaño, J-A, and Bueno-Nava, A (2013): Histamine H_3 receptor activation prevents dopamine D_1 receptor-mediated inhibition of dopamine release in the rat striatum: A microdialysis study. *Neuroscience Letters* 552, 5-9.

Anichtchik, OV, Huotari, M, Peitsaro, N, Haycock, JW, Mannisto, PT, and Panula, P (2000a): Modulation of histamine H_3 receptors in the brain of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *The European Journal of Neuroscience* 12, 3823-32.

Anichtchik, OV, Rinne, JO, Kalimo, H, and Panula, P (2000b): An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 163, 20-30.

Arai, R, Karasawa, N, and Nagatsu, I (1996): Aromatic L-amino acid decarboxylase is present in serotonergic fibers of the striatum of the rat. A double-labeling immunofluorescence study. *Brain Research* 706, 177-179.

Arias-Montaño, JA, Floran, B, Floran, L, Aceves, J, and Young, JM (2007): Dopamine D_1 receptor facilitation of depolarization-induced release of gamma-amino-butyric acid in rat striatum is mediated by the cAMP/PKA pathway and involves P/Q-type calcium channels. *Synapse* 61, 310-319.

Arias-Montaño, JA, Floran, B, García, M, Aceves, J, and Young, JM (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. *British Journal of Pharmacology* 133, 165-71.

Arrang, JM, Garbarg, M, and Schwartz, JC (1983): Auto-inhibition of brain histamine-release mediated by a novel class H_3 of histamine-receptor. *Nature* 302, 832-837.

Aubert, I, Guigoni, C, Hakansson, K, Li, Q, Dovero, S, Barthe, N, Bioulac, BH, Gross, CE, Fisone, G, Bloch, B, and Bezard, E (2005): Increased D_1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Annals of Neurology* 57, 17-26.

Aubert, I, Guigoni, C, Li, Q, Dovero, S, Bioulac, BH, Gross, CE, Crossman, AR, Bloch, B, and Bezard, E (2007): Enhanced preproenkephalin-B-derived opioid transmission in striatum and subthalamic nucleus converges upon globus pallidus internalis in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biological Psychiatry* 61, 836-844.

Bastide, MF, Meissner, WG, Picconi, B, Fasano, S, Fernagut, PO, Feyder, M, Francardo, V, Alcacer, C, Ding, YM, Brambilla, R, Fisone, G, Stoessl, AJ, Bourdenx, M, Engeln, M, Navailles, S, De Deurwaerdere, P, Ko, WKD, Simola, N, Morelli, M, Groc, L, Rodríguez, MC, Gurevich, EV, Quik, M, Morari, M, Mellone, M, Gardoni, F, Tronci, E, Guehl, D, Tison, F, Crossman, AR, Kang, UJ, Steece-Collier, K, Fox, S, Carta, M, Cenci, MA, and Bezard, E (2015): Pathophysiology of L-Dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 132, 96-168.

Beaulieu, JM, and Gainetdinov, RR (2011): The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews* 63, 182-217.

Beaulieu, JM, Gainetdinov, RR, and Caron, MG (2007): The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends in Pharmacological Sciences* 28, 166-172.

Berthet, A, Porras, G, Doudnikoff, E, Stark, H, Cador, M, Bezard, E, and Bloch, B (2009): Pharmacological Analysis Demonstrates Dramatic Alteration of D₁ Dopamine Receptor Neuronal Distribution in the Rat Analog of L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Journal of Neuroscience* 29, 4829-4835.

Bezard, E, Crossman, AR, Gross, CE, and Brotchie, JM (2001): Structures outside the basal ganglia may compensate for dopamine loss in the presymptomatic stages of Parkinson's disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 1092-4.

Bolam, JP, Hanley, JJ, Booth, PA, and Bevan, MD (2000): Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy* 196 (Pt 4), 527-42.

Bongers, G, Sallmenj, T, Passani, MB, Mariottini, C, Wendelin, D, Lozada, A, van Marle, A, Navis, M, Blandina, P, Bakker, RA, Panula, P, and Leurs, R (2007): The Akt/GSK-3 beta axis as a new signaling pathway of the histamine H₃ receptor. *Journal of Neurochemistry* 103, 248-258.

Boraud, T, Bezard, E, Bioulac, B, and Gross, CE (2001): Dopamine agonist-induced dyskinesias are correlated to both firing pattern and frequency alterations of pallidal neurones in the MPTP-treated monkey. *Brain: a Journal of Neurology* 124, 546-57.

Bordet, R, Ridray, S, Schwartz, JC, and Sokoloff, P (2000): Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *The European Journal of Neuroscience* 12, 2117-23.

Brooks, DJ, Piccini, P, Turjanski, N, and Samuel, M (2000): Neuroimaging of dyskinesia. *Annals of Neurology* 47, S154-8.

Brown, RE, Stevens, DR, and Haas, HL (2001): The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology* 63, 637-72.

- Cai, G, Wang, H-Y, and Friedman, E (2002): Increased dopamine receptor signaling and dopamine receptor-G protein coupling in denervated striatum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302, 1105-12.
- Calabresi, P, Di Filippo, M, Ghiglieri, V, and Picconi, B (2008): Molecular mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia. *Movement Disorders* 23, S570-S579.
- Calabresi, P, Gubellini, P, Centonze, D, Picconi, B, Bernardi, G, Chergui, K, Svenningsson, P, Fienberg, AA, and Greengard, P (2000): Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience* 20, 8443-8451.
- Cao, XB, Yasuda, T, Uthayathas, S, Watts, RL, Mouradian, MM, Mochizuki, H, and Papa, SM (2010): Striatal Overexpression of Delta FosB Reproduces Chronic Levodopa-Induced Involuntary Movements. *Journal of Neuroscience* 30, 7335-7343.
- Carlsson, A, Lindqvist, M, and Magnusson, T (1957): 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180, 1200-1200.
- Carta, M, and Bezard, E (2011): Contribution of pre-synaptic mechanisms to L-Dopa-induced dyskinesia. *Neuroscience* 198, 245-251.
- Castle, M, Aymerich, MS, Sánchez-Escobar, C, Gonzalo, N, Obeso, JA, and Lanciego, JL (2005): Thalamic innervation of the direct and indirect basal ganglia pathways in the rat: Ipsi- and contralateral projections. *Journal of Comparative Neurology* 483, 143-153.
- Cenci, MA, Lee, CS, and Bjorklund, A (1998): L-Dopa-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *The European Journal of Neuroscience* 10, 2694-706.
- Centonze, D, Gubellini, P, Picconi, B, Calabresi, P, Giacomini, P, and Bernardi, G (1999): Unilateral dopamine denervation blocks corticostriatal LTP. *Journal of Neurophysiology* 82, 3575-3579.
- Chapuis, S, Ouchchane, L, Metz, O, Gerbaud, L, and Durif, F (2005): Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life. *Movement Disorders* 20, 224-230.
- Civelli, O, Bunzow, JR, and Grandy, DK (1993): Molecular diversity of the dopamine-receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 33, 281-307.
- Connolly, BS, and Lang, AE (2014): Pharmacological treatment of Parkinson disease a review. *Jama-Journal of the American Medical Association* 311, 1670-1683.
- Corvol, J-C, Muriel, M-P, Valjent, E, Feger, J, Hanoun, N, Girault, J-A, Hirsch, EC, and Herve, D (2004): Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D₁ receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 7007-14.
- de la Fuente-Fernández, R, Sossi, V, Huang, ZG, Furtado, S, Lu, JQ, Calne, DB, Ruth, TJ, and Stoessl, AJ (2004): Levodopa-induced changes in synaptic dopamine levels increase with progression of Parkinson's disease: implications for dyskinesias. *Brain* 127, 2747-2754.

- Delfs, JM, Zhu, Y, Druhan, JP, and Aston-Jones, GS (1998): Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Research* 806, 127-40.
- DeLong, MR (1990): Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences* 13, 281-5.
- Dethy, S, Laute, MA, VanBlercom, N, Damhaut, P, Goldman, S, and Hildebrand, J (1997): Microdialysis-HPLC for plasma levodopa and metabolites monitoring in parkinsonian patients. *Clinical Chemistry* 43, 740-744.
- Ding, J, Peterson, JD, and Surmeier, DJ (2008): Corticostriatal and thalamostriatal synapses have distinctive properties. *Journal of Neuroscience* 28, 6483-6492.
- Doreulee, N, Yanovsky, Y, Flaggmeyer, I, Stevens, DR, Haas, HL, and Brown, RE (2001): Histamine H₃ receptors depress synaptic transmission in the corticostriatal pathway. *Neuropharmacology* 40, 106-113.
- Doucet, JP, Nakabeppu, Y, Bedard, PJ, Hope, BT, Nestler, EJ, Jasmin, BJ, Chen, JS, Iadarola, MJ, StJean, M, Wigle, N, Blanchet, P, Grondin, R, and Robertson, GS (1996): Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of Delta FosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum. *European Journal of Neuroscience* 8, 365-381.
- Drutel, G, Peitsaro, N, Karlstedt, K, Wieland, K, Smit, MJ, Timmerman, H, Panula, P, and Leurs, R (2001): Identification of rat H₃ receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Molecular Pharmacology* 59, 1-8.
- Duvoisin, RC (1974): Variations in the "on-off" phenomenon. *Advances in neurology* 5, 339-40.
- Ellender, TJ, Huerta-Ocampo, I, Deisseroth, K, Capogna, M, and Bolam, JP (2011): Differential modulation of excitatory and inhibitory striatal synaptic transmission by histamine. *Journal of Neuroscience* 31, 15340-15351.
- Fabbrini, G, Brotchie, JM, Grandas, F, Nomoto, M, and Goetz, CG (2007): Levodopa-induced dyskinesias. *Movement Disorders* 22, 1379-1389.
- Fahn, S (1974): "On-off" phenomenon with levodopa therapy in Parkinsonism. Clinical and pharmacologic correlations and the effect of intramuscular pyridoxine. *Neurology* 24, 431-41.
- Fahn, S (2000): The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. *Annals of neurology* 47, S2-9; discussion S9-11.
- Fahn, S, Oakes, D, Shoulson, I, Kieburtz, K, Rudolph, A, Lang, A, Olanow, CW, Tanner, C, Marek, K, and Parkinson Study, G (2004): Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine* 351, 2498-508.
- Fenelon, G, Gimenez-Roldan, S, Montastruc, JL, Bermejo, F, Durif, F, Bourdeix, I, Pere, JJ, Galiano, L, Schadrack, J, and Group, INTS (2003): Efficacy and tolerability of entacapone in patients with Parkinson's disease treated with levodopa plus a dopamine agonist and experiencing wearing-off motor fluctuations. A randomized, double-blind, multicentre study. *Journal of Neural Transmission* 110, 239-251.

Ferrada, C, Moreno, E, Casado, V, Bongers, G, Cortes, A, Mallol, J, Canela, EI, Leurs, R, Ferre, S, Lluís, C, and Franco, R (2009): Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D₁ and histamine H₃ receptors. *British Journal of Pharmacology* 157, 64-75.

Festing, MF (1994): Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Laboratory animals* 28, 212-21.

Feyder, M, Bonito-Oliva, A, and Fisone, G (2011): L-Dopa-induced dyskinesia and abnormal signaling in striatal medium spiny neurons: focus on dopamine D₁ receptor-mediated transmission. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5.

Fienberg, AA, Hiroi, N, Mermelstein, PG, Song, W, Snyder, GL, Nishi, A, Cheramy, A, O'Callaghan, JP, Miller, DB, Cole, DG, Corbett, R, Haile, CN, Cooper, DC, Onn, SP, Grace, AA, Ouimet, CC, White, FJ, Hyman, SE, Surmeier, DJ, Girault, J, Nestler, EJ, and Greengard, P (1998): DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science (New York, N.Y.)* 281, 838-42.

Flores-Hernández, J, Hernández, S, Snyder, GL, Yan, Z, Fienberg, AA, Moss, SJ, Greengard, P, and Surmeier, DJ (2000): D₁ dopamine receptor activation reduces GABA_A receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *Journal of neurophysiology* 83, 2996-3004.

Friedhoff, AJ, Hekimian, L, Alpert, M, and Tobach, E (1963): Dihydroxyphenylalanine in extrapyramidal disease. *Jama* 184, 285-6.

García, M, Floran, B, Arias-Montaña, JA, Young, JM, and Aceves, J (1997): Histamine H₃ receptor activation selectively inhibits dopamine D₁ receptor-dependent [³H] GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 80, 241-9.

García-Gálvez, AM, Escamilla-Sánchez, J, Flores-Maldonado, C, Contreras, RG, Arias, JM, and Arias-Montaña, JA (2018): Differential homologous desensitization of the human histamine H₃ receptors of 445 and 365 amino acids expressed in CHO-K1 cells. *Neurochemistry International* 112, 114-123.

García-Ramírez, M, Aceves, J, and Arias-Montaña, JA (2004): Intranigral injection of the H₃ agonist immapip and systemic apomorphine elicit ipsilateral turning behaviour in naive rats, but reduce contralateral turning in hemiparkinsonian rats. *Behavioural Brain Research* 154, 409-415.

Gerfen, CR (1992): The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annual review of neuroscience* 15, 285-320.

Gerfen, CR, Engber, TM, Mahan, LC, Susel, Z, Chase, TN, Monsma, FJ, Jr., and Sibley, DR (1990): D₁ and D₂ dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science (New York, N.Y.)* 250, 1429-32.

Gerfen, CR, Miyachi, S, Paletzki, R, and Brown, P (2002): D₁ dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *Journal of Neuroscience* 22, 5042-5054.

Glinka, YY, and Youdim, MBH (1995): Inhibition of mitochondrial complex-i and complex-iv by 6-hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology-Environmental Toxicology and Pharmacology Section* 292, 329-332.

Gómez-Ramírez, J, Johnston, TH, Visanji, NP, Fox, SH, and Brotchie, JM (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* 21, 839-846.

González-Sepúlveda, MR, Santi. Hoffmann, Hanne. Castillo-Ruiz, Ma del Mar. Mignon, Virginie. Moreno-Delgado, David. Vignes, Michel. Díaz, Jorge. Sabriá, Josefa. Ortiz, Jordi. (2013): Cellular distribution of the histamine H₃ receptor in the basal ganglia: Functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia* 3, 109-121.

Gottowik, J, Malherbe, P, Lang, G, Daprada, M, and Cesura, AM (1995): Structure-function-relationships of mitochondrial monoamine-oxidase-a and monoamine-oxidase-b chimeric forms. *European Journal of Biochemistry* 230, 934-942.

Grandas, F, Galiano, ML, and Tabernero, C (1999): Risk factors for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 246, 1127-1133.

Graybiel, AM, Moratalla, R, and Robertson, HA (1990): Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 6912-6916.

Groenewegen, HJ (2003): The basal ganglia and motor control. *Neural plasticity* 10, 107-20.

Groenewegen, HJ, Galis-de Graaf, Y, and Smeets, WJ (1999): Integration and segregation of limbic cortico-striatal loops at the thalamic level: an experimental tracing study in rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 16, 167-85.

Haas, HL, Sergeeva, OA, and Selbach, O (2008): Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews* 88, 1183-1241.

Haber, S (2016): Perspective on basal ganglia connections as described by Nauta and Mehler in 1966: Where we were and how this paper effected where we are now. *Brain Research* 1645, 4-7.

Hauser, RA (2009): Levodopa: Past, Present, and Future. *European Neurology* 62, 1-8.

Hauser, RA, Ellenbogen, AL, Metman, LV, Hsu, A, O'Connell, MJ, Modi, NB, Yao, HM, Kell, SH, and Gupta, SK (2011): Crossover Comparison of IPX066 and a Standard Levodopa Formulation in Advanced Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 26, 2246-2252.

Herkenham, M (1979): The afferent and efferent connections of the ventromedial thalamic nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 183, 487-517.

Huot, P, Johnston, TH, Koprach, JB, Fox, SH, and Brotchie, JM (2013): The Pharmacology of L-Dopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease. *Pharmacological Reviews* 65, 171-222.

Inyushin, MY, Huertas, A, Kucheryavykh, YV, Kucheryavykh, LY, Tsydzik, V, Sanabria, P, Eaton, MJ, Skatchkov, SN, Rojas, LV, and Wessinger, WD (2012): L-Dopa Uptake in Astrocytic Endfeet Enwrapping Blood Vessels in Rat Brain. *Parkinsons Disease*.

Kirik, D, Rosenblad, C, and Bjorklund, A (1998): Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Experimental Neurology* 152, 259-277.

Kreitzer, AC, and Malenka, RC (2008): Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron* 60, 543-554.

Kunzle, H (1975): Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain research* 88, 195-209.

Kuyper, DJ, Parra, V, Aerts, S, Okun, MS, and Kluger, BM (2011): Nonmotor Manifestations of Dystonia: A Systematic Review. *Movement Disorders* 26, 1206-1217.

Lavoie, B, and Parent, A (1990): Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *The Journal of Comparative Neurology* 299, 1-16.

Leurs, R, Bakker, RA, Timmerman, H, and de Esch, IJP (2005): The histamine H₃ receptor: From gene cloning to H₃ receptor drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 107-U18.

Levandis, G, Bazzini, E, Armentero, MT, Nappi, G, and Blandini, F (2008): Systemic administration of an mGluR5 antagonist, but not unilateral subthalamic lesion, counteracts L-Dopa-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 29, 161-168.

Lewitt, PA (1993): Levodopa therapeutics - new treatment strategies. *Neurology* 43, 31-37.

LeWitt, PA (2008): Levodopa for the Treatment of Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine* 359, 2468-2476.

Lindgren, HS, Ohlin, KE, and Cenci, MA (2009): Differential Involvement of D₁ and D₂ Dopamine Receptors in L-Dopa-Induced Angiogenic Activity in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neuropsychopharmacology* 34, 2477-2488.

Lozano, AM, Lang, AE, Levy, R, Hutchison, W, and Dostrovsky, J (2000): Neuronal recordings in Parkinson's disease patients with dyskinesias induced by apomorphine. *Annals of neurology* 47, S141-6.

Lundblad, M, Andersson, M, Winkler, C, Kirik, D, Wierup, N, and Cenci, MA (2002): Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* 15, 120-132.

- Marsden, CD, and Parkes, JD (1976): "On-off" effects in patients with Parkinson's disease on chronic levodopa therapy. *Lancet* (London, England) 1, 292-6.
- Masini, E, Di Bello, MG, Raspanti, S, Ndisang, JF, Baronti, R, Cappugi, P, and Mannaioni, PF (1998): The role of histamine in platelet aggregation by physiological and immunological stimuli. *Inflammation Research* 47, 211-220.
- McGeorge, AJ, and Faull, RL (1989): The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29, 503-37.
- Milligan, G, and Kostenis, E (2006): Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology* 147, S46-S55.
- Missale, C, Nash, SR, Robinson, SW, Jaber, M, and Caron, MG (1998): Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews* 78, 189-225.
- Molina-Hernández, A, Nunez, A, and Arias-Montaño, JA (2000): Histamine H₃-receptor activation inhibits dopamine synthesis in rat striatum. *Neuroreport* 11, 163-166.
- Molina-Hernández, A, Nunez, A, and Arias-Montaño, JA (2001): Histamine H₃ receptor activation modulates glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Histamine Research in the New Millennium* 1224, 455-456.
- Moore, DJ, West, AB, Dawson, VL, and Dawson, TM (2005): Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience* 28, 57-87.
- Moreno, E, Hoffmann, H, Gonzalez-Sepulveda, M, Navarro, G, Casado, V, Cortes, A, Mallol, J, Vignes, M, McCormick, PJ, Canela, EI, Lluís, C, Moratalla, R, Ferre, S, Ortiz, J, and Franco, R (2011): Dopamine D₁-histamine H₃ Receptor Heteromers Provide a Selective Link to MAPK Signaling in GABAergic Neurons of the Direct Striatal Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 286, 5846-5854.
- Mueller, T, Woitalla, D, Russ, H, Hock, K, and Haeger, DA (2007): Prevalence and treatment strategies of dyskinesia in patients with Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 114, 1023-1026.
- Nagatsu, T (1995): Tyrosine hydroxylase: Human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays in Biochemistry*, Vol 30, 1995 30, 15-35.
- Napolitano, M, Centonze, D, Calce, A, Picconi, B, Spiezia, S, Gulino, A, Bernardi, G, and Calabresi, P (2002): Experimental parkinsonism modulates multiple genes involved in the transduction of dopaminergic signals in the striatum. *Neurobiology of Disease* 10, 387-95.
- Nava-Asbell, C, Paz-Bermudez, F, Erij, D, Aceves, J, and Floran, B (2007): GABA_B receptor activation inhibits dopamine D₁ receptor-mediated facilitation of H₃ GABA release in substantia nigra pars reticulata. *Neuropharmacology* 53, 631-637.
- Nishi, A, Kuroiwa, M, and Shuto, T (2011): Mechanisms for the modulation of dopamine D₁ receptor signaling in striatal neurons. *Frontiers in Neuroanatomy* 5.
- Nowak, P, Bortel, A, Dabrowska, J, Biedka, I, Slomian, G, Roczniak, W, Kostrzewa, RM, and Brus, R (2008): Histamine H₃ receptor ligands modulate L-Dopa-evoked behavioral responses and L-Dopa-derived extracellular dopamine in dopamine-denervated rat striatum. *Neurotoxicity Research* 13, 231-240.

- Ogasawara, M, Yamauchi, K, Satoh, Y, Yarnaji, R, Inui, K, Jonker, JW, Schinkel, AH, and Maeyama, K (2006): Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: Organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *Journal of Pharmacological Sciences* 101, 24-30.
- Olanow, CW, Gauger, LL, and Cedarbaum, JM (1991): temporal relationships between plasma and cerebrospinal-fluid pharmacokinetics of levodopa and clinical effect in parkinsons-disease. *Annals of Neurology* 29, 556-559.
- Opackajuffry, J, and Brooks, DJ (1995): l-dihydroxyphenylalanine and its decarboxylase - new ideas on their neuroregulatory roles. *Movement Disorders* 10, 241-249.
- Osorio-Espinoza, A, Escamilla-Sánchez, J, Aquino-Jarquín, G, and Arias-Montaña, JA (2014): Homologous desensitization of human histamine H₃ receptors expressed in CHO-K1 cells. *Neuropharmacology* 77, 387-397.
- Pagano, G, Yousaf, T, and Politis, M (2017): PET Molecular Imaging Research of Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 17.
- Panula, P, and Nuutinen, S (2013): The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience* 14, 472-487.
- Papa, SM, Desimone, R, Fiorani, M, and Oldfield, EH (1999): Internal globus pallidus discharge is nearly suppressed during levodopa-induced dyskinesias. *Annals of neurology* 46, 732-8.
- Papathanou, M, Jenner, P, Iravani, M, Jackson, M, Stockwell, K, Strang, I, Zeng, BY, McCreary, AC, and Rose, S (2014): The H₃ receptor agonist immpip does not affect L-dopa-induced abnormal involuntary movements in 6-OHDA-lesioned rats. *European Journal of Pharmacology* 741, 304-310.
- Passani, MB, Panula, P, and Lin, J-S (2014): Histamine in the brain. *Frontiers in systems neuroscience* 8, 64-64.
- Pavon, N, Martin, AB, Mendiola, A, and Moratalla, R (2006): ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biological Psychiatry* 59, 64-74.
- Paxinos, and Watson (1998): *The rat brain in stereotaxic coordinates*, San Diego.
- Perese, DA, Ulman, J, Viola, J, Ewing, SE, and Bankiewicz, KS (1989): A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Research* 494, 285-293.
- Perumal, AS, Gopal, VB, Tordzro, WK, Cooper, TB, and Cadet, JL (1992): vitamin-e attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free-radical scavenging systems in rat-brain. *Brain Research Bulletin* 29, 699-701.
- Picconi, B, Centonze, D, Hakansson, K, Bernardi, G, Greengard, P, Fisone, G, Cenci, MA, and Calabresi, P (2003): Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-Dopa-induced dyskinesia. *Nature Neuroscience* 6, 501-506.

Pillot, C, Heron, A, Cochois, V, Tardivel-Lacombe, J, Ligneau, X, Schwartz, JC, and Arrang, JM (2002): A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* 114, 173-193.

Porras, G, De Deurwaerdere, P, Li, Q, Marti, M, Morgenstern, R, Sohr, R, Bezard, E, Morari, M, and Meissner, WG (2014): L-dopa-induced dyskinesia: beyond an excessive dopamine tone in the striatum. *Scientific Reports* 4.

Rangel-Barajas, C, Silva, I, Maria López-Santiago, L, Aceves, J, Erlij, D, and Floran, B (2011): L-Dopa-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type V/VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata. *Neurobiology of Disease* 41, 51-61.

Rapanelli, M (2017): The magnificent two: histamine and the H₃ receptor as key modulators of striatal circuitry. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 73, 36-40.

Rascol, O (2000): Medical treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Annals of neurology* 47, S179-88.

Rascol, O, Sabatini, U, Brefel, C, Fabre, N, Rai, S, Senard, JM, Celsis, P, Viillard, G, Montastruc, JL, and Chollet, F (1998): Cortical motor overactivation in parkinsonian patients with L-dopa-induced peak-dose dyskinesia. *Brain: a Journal of Neurology* 121 (Pt 3), 527-33.

Rascol, O, Sabatini, U, Chollet, F, Celsis, P, Montastruc, JL, Marc-Vergnes, JP, and Rascol, A (1992): Supplementary and primary sensory motor area activity in Parkinson's disease. Regional cerebral blood flow changes during finger movements and effects of apomorphine. *Archives of neurology* 49, 144-8.

Rinne, JO, Anichtchik, OV, Eriksson, KS, Kaslin, J, Tuomisto, L, Kalimo, H, Roytta, M, and Panula, P (2002): Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *Journal of neurochemistry* 81, 954-60.

Rodríguez-Ruiz, M, Moreno, E, Moreno-Delgado, D, Navarro, G, Mallol, J, Cortes, A, Lluís, C, Canela, EI, Casado, V, McCormick, PJ, and Franco, R (2017): Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D₁, Histamine H₃, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology* 54, 4537-4550.

Rouleau, A, Ligneau, X, Tardivel-Lacombe, J, Morisset, S, Gbahou, F, Schwartz, JC, and Arrang, JM (2002): Histamine H₃-receptor-mediated S-35 GTP gamma S binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H₃ receptors. *British Journal of Pharmacology* 135, 383-392.

Ryu, JH, Yanai, K, Iwata, R, Ido, T, and Watanabe, T (1994a): heterogeneous distributions of histamine H₃, dopamine D₁ and D₂ receptors in rat-brain. *Neuroreport* 5, 621-624.

Ryu, JH, Yanai, K, and Watanabe, T (1994b): 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, 19-22.

- Sadek, B, Saad, A, Sadeq, A, Jalal, F, and Stark, H (2016): Histamine H₃ receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. *Behavioural Brain Research* 312, 415-430.
- Sahlholm, K, Nilsson, J, Marcellino, D, Fuxe, K, and Arhem, P (2007): The human histamine H₃ receptor couples to GIRK channels in *Xenopus* oocytes. *European Journal of Pharmacology* 567, 206-210.
- Saito, Y, Nishio, K, Ogawa, Y, Kinumi, T, Yoshida, Y, Masuo, Y, and Niki, E (2007): Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: Involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action. *Free Radical Biology and Medicine* 42, 675-685.
- Sánchez-Lemus, E, and Arias-Montaña, J-A (2004): Histamine H₃ receptor activation inhibits dopamine D₁ receptor-induced cAMP accumulation in rat striatal slices. *Neuroscience Letters* 364, 179-84.
- Santini, E, Sgambato-Faure, V, Li, Q, Savasta, M, Dovero, S, Fisone, G, and Bezard, E (2010): Distinct Changes in cAMP and Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Signalling in L-Dopa-Induced Dyskinesia. *Plos One* 5, (8) 12322.
- Santini, E, Valjent, E, Usiello, A, Carta, M, Borgkvist, A, Girault, J-A, Herve, D, Greengard, P, and Fisone, G (2007): Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-Dopa-induced dyskinesia. *Journal of Neuroscience* 27, 6995-7005.
- Schapira, AH, and Jenner, P (2011): Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 26, 1049-1055.
- Schlicker, E, Fink, K, Detzner, M, and Gothert, M (1993): Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H₃ receptors. *Journal of neural transmission. General section* 93, 1-10.
- Schwartz, JC, Arrang, JM, Garbarg, M, Pollard, H, and Ruat, M (1991): histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiological Reviews* 71, 1-51.
- Silver, RB, Mackins, CJ, Smith, NCE, Koritchneva, IL, Lefkowitz, K, Lovenberg, TW, and Levi, R (2001): Coupling of histamine H₃ receptors to neuronal Na⁺/H⁺ exchange: A novel protective mechanism in myocardial ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2855-2859.
- Silver, RB, Poonwasi, KS, Seyedi, N, Wilson, SJ, Lovenberg, TW, and Levi, R (2002): Decreased intracellular calcium mediates the histamine H₃-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 501-506.
- Somogyi, P, and Smith, AD (1979): Projection of neostriatal spiny neurons to the substantia nigra. Application of a combined Golgi-staining and horseradish peroxidase transport procedure at both light and electron microscopic levels. *Brain Research* 178, 3-15.
- Spigolon, G, and Fisone, G (2018): Signal transduction in L-Dopa-induced dyskinesia: from receptor sensitization to abnormal gene expression. *Journal of Neural Transmission* 125, 1171-1186.

Surmeier, DJ, Ding, J, Day, M, Wang, Z, and Shen, W (2007): D₁ and D₂ dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences* 30, 228-235.

Surmeier, DJ, Obeso, JA, and Halliday, GM (2017): Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience* 18, 101-113.

Sweatt, JD (2001): The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry* 76, 1-10.

Takekoshi, Y, Watanabe, T, Sakata, T, Munakata, M, Ishibashi, H, and Akaike, N (1998): Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. *Neuroscience* 87, 797-805.

Torres, GE, Gainetdinov, RR, and Caron, MG (2003): Plasma membrane monoamine transporters: Structure, regulation and function. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 13-25.

Valastro, B, Andersson, M, Lindgren, HS, and Cenci, MA (2007): Expression pattern of JunD after acute or chronic L-DOPA treatment: Comparison with Delta FosB. *Neuroscience* 144, 198-207.

Valjent, E, Pascoli, V, Svenningsson, P, Paul, S, Enslen, H, Corvol, JC, Stipanovich, A, Caboche, J, Lombroso, PJ, Nairn, AC, Greengard, P, Herve, D, and Girault, JA (2005): Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 491-496.

Vanderwerf, JF, Bast, A, Bijloo, GJ, Vandervliet, A, and Timmerman, H (1987): Ha autoreceptor assay with superfused slices of rat-brain cortex and electrical-stimulation. *European Journal of Pharmacology* 138, 199-206.

Wada, H, Inagaki, N, Itow, N, and Yamatodani, A (1991): histaminergic neuron system in the brain - distribution and possible functions. *Brain Research Bulletin* 27, 367-370.

Westin, JE, Vercaemmen, L, Strome, EM, Konradi, C, and Cenci, MA (2007): Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-Dopa-induced dyskinesia and the role of dopamine D₁ receptors. *Biological Psychiatry* 62, 800-810.

Wichmann, T, and Dostrovsky, JO (2011): Pathological basal ganglia activity in movement disorders. *Neuroscience* 198, 232-244.

Woodward, WR, Olanow, CW, Beckner, RM, Hauser, RA, Gauger, LL, Cedarbaum, JM, and Nutt, JG (1993): The effect of L-Dopa infusions with and without phenylalanine challenges in parkinsonian-patients - plasma and ventricular csf L-Dopa levels and clinical-responses. *Neurology* 43, 1704-1708.

Youdim, MBH, Ben-Shachar, D, and Eshel, G (1997): Neuroprotection by desferrioxamine and lipoic acid against 6-hydroxydopamine induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience Letters*, S54-S54.

Youdim, MBH, Edmondson, D, and Tipton, KF (2006): The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 295-309.

Zheng, G, Dwoskin, LP, and Crooks, PA (2006): Vesicular monoamine transporter 2: Role as a novel target for drug development. *AAPS Journal* 8, E682-E692.

12 Anexos



Chronic administration of the histamine H₃ receptor agonist imnepip decreases L-Dopa-induced dyskinesias in 6-hydroxydopamine-lesioned rats

Alberto Avila-Luna^{1,2} · Camilo Rios^{3,4} · Arturo Gálvez-Rosas¹ · Sergio Montes³ · José-Antonio Arias-Montaña⁵ · Antonio Bueno-Nava¹

Received: 24 September 2018 / Accepted: 28 January 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Rationale Histamine H₃ receptors (H₃Rs) are co-expressed with dopamine D₁ receptors (D₁Rs) by striato-nigral medium spiny GABAergic neurons, where they functionally antagonize D₁R-mediated responses.

Objectives and methods We examined whether the chronic administration of the H₃R agonist imnepip modifies dyskinesias induced by L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-Dopa (LIDs), in rats lesioned with 6-hydroxydopamine in the substantia nigra pars compacta, and the effect of D₁R and H₃R co-activation on glutamate and GABA content in dialysates from the dorsal striatum of naïve rats.

Results The systemic administration (i.p.) of L-Dopa for 14 days significantly increased axial, limb, and orolingual abnormal involuntary movements (AIMs) compared with the vehicle group. The chronic administration of the H₃R agonist imnepip alongside L-Dopa significantly decreased axial, limb, and orolingual AIMs compared with L-Dopa alone, but AIMs returned to previous values on imnepip withdrawal. Chronic imnepip was ineffective when administered prior to L-Dopa. The chronic administration of imnepip significantly decreased GABA and glutamate content in striatal dialysates, whereas the administration of L-Dopa alone increased GABA and glutamate content.

Conclusions These results indicate that chronic H₃R activation reduces LIDs, and the effects on striatal GABA and glutamate release provide evidence for a functional interaction between D₁Rs and H₃Rs.

Keywords Dopamine · Histamine · D₁ receptor · H₃ receptor · Dyskinesia · Striatum · Parkinson's disease · L-Dopa · Imnepip

Introduction

Parkinson's disease, the second most common neurodegenerative disease worldwide (Connolly and Lang 2014), is originated by the progressive loss of dopaminergic neurons located

in the substantia nigra pars compacta, SNc (Surmeier et al. 2017), one of the neuronal nuclei that form the basal ganglia, a group of sub-cortical structures critically involved in the learning and execution of motor programs (Bolam et al. 2000). Although no available therapies modify the underlying

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00213-019-5182-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Antonio Bueno-Nava
abueno@inr.gob.mx

¹ Lab. Neurofisiología Química de la Discapacidad, División de Neurociencias, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, SSA, Calz. México-Xochimilco 289, 14389 Mexico City, Mexico

² Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 Mexico City, Mexico

³ Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, SSA, Insurgentes Sur 3877, 14269 Mexico City, Mexico

⁴ Lab. Neurofarmacología Molecular, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 Mexico City, Mexico

⁵ Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, 07360 Mexico City, Mexico

neurodegenerative process, symptomatic treatment improves the patient quality of life (Connolly and Lang 2014). In spite of new therapeutic strategies, the administration of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa) remains the most effective symptomatic treatment of Parkinson's disease. However, the majority of patients eventually develop dyskinesia, abnormal involuntary movements (AIMs) related to long-term L-Dopa administration (Ahlskog and Muentz 2001; Bastide et al. 2015; Hely et al. 2005; Huot et al. 2013).

L-Dopa-induced dyskinesias (LIDs) are related to increased striatal dopamine levels, alterations in the cellular distribution of dopamine D₁ receptors (D₁Rs), sensitization of their intracellular signaling and abnormal gene expression in D₁R-expressing neurons, leading to changes in basal ganglia dopaminergic transmission at the pre- and post-synaptic levels (Bastide et al. 2015; Carta and Bezard 2011; Fuente-Fernandez et al. 2004; Porras et al. 2014; Spigolon and Fisone 2018).

The basal ganglia are innervated by histaminergic fibers (Panula et al. 1989), and the striatum, globus pallidus, and substantia nigra *pars reticulata* (SNr) express a high density of histamine H₃ receptors, H₃Rs (Pillot et al. 2002). D₁Rs and H₃Rs are co-expressed by the sub-population of striatal GABAergic medium spiny neurons (MSNs) that originates the direct pathway of the basal ganglia (González-Sepúlveda et al. 2013), and several studies have shown a D₁R/H₃R functional interaction in these neurons (Arias-Montaño et al. 2001; Garcia et al. 1997; Moreno et al. 2011; Ryu et al. 1994). At the pre-synaptic level, in rat striatum and SNr slices, H₃R activation by the agonist immapip selectively inhibited the component of depolarization-evoked [³H]-GABA release that depends on concomitant D₁R stimulation (Arias-Montaño et al. 2001; Garcia et al. 1997). At the post-synaptic level, H₃R activation inhibits D₁R-induced cAMP accumulation (Sanchez-Lemus and Arias-Montano 2004), and D₁Rs play a permissive role in H₃R-mediated activation of mitogen-activated protein kinases, MAPKs (Moreno et al. 2011).

A previous study reported that the systemic administration of a single dose of immapip (1, 5, and 10 mg/kg, s.c.) did not reduce L-Dopa-induced axial, lingual, or oral AIMs in rats lesioned with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in the SNc (Papathanou et al. 2014). However, these authors mention that in common marmosets lesioned with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and primed with L-Dopa, immapip produced a marked decrease in motor disability and the onset of moderate dyskinesia, although the study generated limited behavioral data because immapip and other H₃R agonist, imetit (1, 5 or 10 mg/kg, s.c.), produced retching and vomiting that disrupted motor behavior. Because this study only explored the effect of single doses of H₃R agonists, both in rats and marmosets, we have studied whether the chronic administration (14 days) of a low dose of immapip (1 mg/kg, i.p.) could have beneficial effect on LIDs in rats unilaterally lesioned with 6-OHDA in the SNc.

Materials and methods

Subjects

Adult male Wistar rats (280–310 g), provided by the UPEAL-Bioterio of UAM-Xochimilco, were acclimatized to laboratory conditions and maintained on a 12-h/12-h light/dark cycle. All experimental procedures were conducted in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Offert et al. 1993). We used the minimum possible number of animals needed according to the bioethical and statistical criteria established by Festing (1994), and all procedures were approved by the Animal Care Committee of Instituto Nacional de Rehabilitación.

6-OHDA lesion

Rats were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine (80–10 mg/kg; i.p.) and positioned in a stereotaxic frame (Stoelting Corp., Wood Dale, IL). The skull was exposed, and a trephine hole (~1 mm diameter) was drilled according to the following coordinates (mm): anteroposterior (AP), –5 mm from bregma; lateral (L), –2 mm from the midline; and vertical (V), 7.2 mm below the duramadre (Paxinos and Watson 2007). For the SNc lesion, 6-OHDA (8 µg/µl of saline solution containing 0.1% ascorbic acid) was injected unilaterally at a flow rate of 0.4 µl/min for 5 min using an injection pump (CMA400, CMA/Microdialysis, Kista, Sweden), and the needle (30 gauge) was left in place for 5 min before being withdrawn. Two weeks after the lesion, animals were tested for contralateral rotation in response to the systemic administration of apomorphine hydrochloride (0.5 mg/kg, s.c.). Only rats with six or more contralateral turns per min, were included in the study.

Experimental design

Experiment 1 Sixty hemi-parkinsonian rats were divided into the following six groups (10 animals per group): (a) the vehicle group received a daily intraperitoneal (i.p.) injection of saline solution for 14 days (vehicle); (b) the L-Dopa alone group received a daily dose of carbidopa (15 mg/kg) followed by L-Dopa (6.25 mg/kg) 20 min later, for 14 days; (c) the acute immapip group received a daily dose of L-Dopa for 14 days and a daily injection of the H₃R agonist immapip (1 mg/kg; i.p.) on days 12, 13, and 14 (L-Dopa + immapip/acute); (d) the subchronic immapip group received a daily dose of L-Dopa for 14 days and a daily injection of immapip on day 8 and thereafter for 7 consecutive days (L-Dopa + immapip/subchronic); (e) the chronic immapip group received a daily dose of L-Dopa + immapip for 14 days (L-Dopa + immapip/chronic); (g) the pre-treatment

immepip group received a daily dose of L-Dopa for 14 days and a daily injection of immepip 5 days before the first L-Dopa dose, and thereafter for 19 days (L-Dopa + immepip/pre-treatment).

Experiment 2 Eight rats were used to confirm the effects of the chronic administration of immepip + L-Dopa for 14 days, but on day 15, immepip was withdrawn. Thereafter, rats received a daily dose of L-Dopa alone for 7 consecutive days.

Experiment 3 For the quantification of GABA and glutamate contents in striatal dialysates, 20 hemi-parkinsonian rats underwent the treatments described in 'Experiment 1', and at day 14 were divided into the following five groups (4 animals per group): (1) parkinsonian; (2) L-Dopa alone; (3) acute immepip group; (4) subchronic immepip; (5) chronic immepip. A sham group (non-lesioned rats) was included to examine the effect of a single dose of L-Dopa at day 15.

Behavioral analysis

AIMs were evaluated with a previously validated scale (Andersson et al. 1999; Cenci et al. 1998; Johansson et al. 2001; Lundblad et al. 2002; Papathanou et al. 2014), according to which AIMs are classified into four subtypes: axial, limb, orolingual, and locomotive. Each AIM subtype was scored on a scale from 0 to 4, based on the following criteria: 0 = not present; 1 = present during less than half of the observation time; 2 = present during more than half of observation time; 3 = present all the time, but suppressible by threatening stimuli; 4 = present all the time and not suppressible. AIMs were scored daily and counted for 1 min every 20 min from 20 to 120 min after drug or vehicle administration. In each session, the AIM scores obtained in the six observation recordings were summed (maximum score 24) and expressed per subtype (axial, limb, or orolingual) or the sum of the three subtypes (ALO, maximum score 72). Locomotive dyskinesia was excluded from the analysis because its interpretation is still controversial (Cenci et al. 1998). For total AIMs per subtype, each AIM (axial, limb, orolingual, or locomotive) was counted and then summed per session. For total AIMs per subtypes, ALO were summed, excluding locomotive dyskinesia. All rats were videotaped during the test, and an investigator blind to the treatment reviewed the videotapes (see [Supplementary videos](#)).

Microdialysis and HPLC analysis

Striatal microdialysis was performed as previously reported (Alfaro-Rodriguez et al. 2013). After completion of the treatments described above (day 14), a guide cannula was implanted into the striatum according to the following coordinates (mm): AP + 0.24 mm from bregma, L + 2.8 mm from

the midline, DV 6.8 mm below the duramadre (Paxinos and Watson 2007). After the surgery, animals were housed individually and allowed to recover for 20–24 h. For the microdialysis experiments, the probe was continuously perfused (30 min) with Ringer's solution (in mM: 146 NaCl, 4 KCl, 1.2 CaCl₂, 2 NaH₂PO₄, pH 7.4 with NaOH) at a flow rate of 1.25 µl/min using an injection pump (CMA/400, CMA/Microdialysis, Kista, Sweden) coupled to a system for freely moving animals (CMA/120, CMA/Microdialysis AB, Kista, Sweden). The probe had an outer diameter of 0.5 mm and contained a polycarbonate membrane (molecular weight cut-off 20 kDa). The length of the exposed part of the probe was 4 mm. The dialysis probe was carefully inserted, and the rat was then placed in the system for freely moving animals. After 90–120 min of stabilization, dialysate samples were collected in a refrigerated fraction collector (CMA/470, CMA/Microdialysis AB, Kista, Sweden) every 30 min for 180 min. After collection, samples were injected into a high-performance liquid chromatograph (HPLC).

GABA and glutamate contents were determined as reported in detail elsewhere (Montes et al. 2003), using an HPLC system (Alltech, binary HPLC pump, model 626, Grace Discovery Science, Deerfield, IL) coupled to a fluorescence detector (Linear Fluor LC-305, ESA, Chelmsford, MA) with an Adsorbosphere OPA column (Alltech, Adsorbosphere OPA HS, 100 × 4.6 mm, 5-µm particle size). The mobile phase consisted of sodium acetate buffer (50 mM, pH 3.2) containing 1.5% tetrahydrofuran, and HPLC-grade methanol. Separation was achieved with a linear gradient of 20 min from 10 to 65% methanol. Pre-column derivatization was performed by mixing 37.5 µl of sample and 37.5 µl of orthophthalaldehyde reagent (5 mg ortho-phthalaldehyde dissolved in a mixture of 625 µl methanol, 5.6 ml borate buffer, pH 9.5, and 25 µl mercaptoethanol). The concentrations of GABA and glutamate were calculated by interpolation of the sample chromatograms to the chromatograms from five standards of known concentrations of GABA or glutamate.

Drugs

The following drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO): immepip dihydrobromide, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-Dopa), S-(+)-carbidopa, 6-hydroxydopamine hydrobromide, and apomorphine hydrochloride.

Statistical analysis

All values are expressed as means ± standard error (SEM). The statistical analysis of AIM scores was performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney *U* test to compare the mean rank of the treatment groups. The analysis of total AIMs was performed with repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's post

hoc test to compare the means of the drug treatment groups. The analysis of AIM scores from the chronic immpip/withdrawal group was performed with the Wilcoxon test for repeated measures to compare the ranks of means between drug treatments, and the analysis of total AIMs was performed with Student's *t* test. Differences were regarded statistically significant at $P < 0.05$.

Results

AIM expression

In the L-Dopa alone group, dyskinetic effects were observed in all rats, with scores within the range 1–3. In the chronic immpip group, dyskinesias were observed in 35% of rats, with scores in the range 0–1. In the subchronic and acute immpip groups, dyskinetic effects were observed in 100% of rats, with scores 1–2. In the pre-treatment immpip group, these effects were observed in all animals, with scores 0–2. In the vehicle group, dyskinetic effects were not observed in any animal.

Effect of the chronic administration of immpip on LIDs

Figures 1, 2, 3, and 4 show that the daily systemic administration of L-Dopa alone for 14 days significantly increased

($P < 0.05$) the AIM scores and total AIMs for the four subtypes analyzed (axial, limb, orolingual, and locomotive) at days 3, 6, 9, 12, and 14 in comparison with the respective vehicle group (daily injection of saline solution for 14 days). These data indicate that the dose of L-Dopa tested in this study (6.25 mg/kg) resulted in LIDs in 6-OHDA-lesioned rats with high reproducibility.

Figure 1a shows that the chronic administration of immpip (a daily dose of L-Dopa + immpip for 14 days) significantly decreased axial AIM scores (–79, –71, –84, –89, and –90% at 3, 6, 9, 12, and 14 days, respectively; $P < 0.01$ for all values) compared with the L-Dopa alone group. The subchronic and acute administration of immpip did not affect axial AIM scores compared with the corresponding L-Dopa alone group. In contrast, pre-treatment with immpip significantly decreased axial AIMs (–83, –42, and –32% at 3, 6, and 9 days, respectively; $P < 0.01$ for all values; Fig. 1a) compared with the L-Dopa alone group, indicating that the anti-dyskinetic affect was present only at the initial time points. The administration of immpip alone on days –5 and –2 did not produce a significant effect on axial AIM scores and total AIMs (Fig. 1a, b).

Figure 1b shows that the chronic administration of immpip (L-Dopa + immpip for 14 days) significantly decreased total axial AIMs (–76, –70, –78, –80, and –86% at 3, 6, 9, 12, and 14 days, respectively; $P < 0.05$ for all values) compared with the L-Dopa alone group. In contrast,

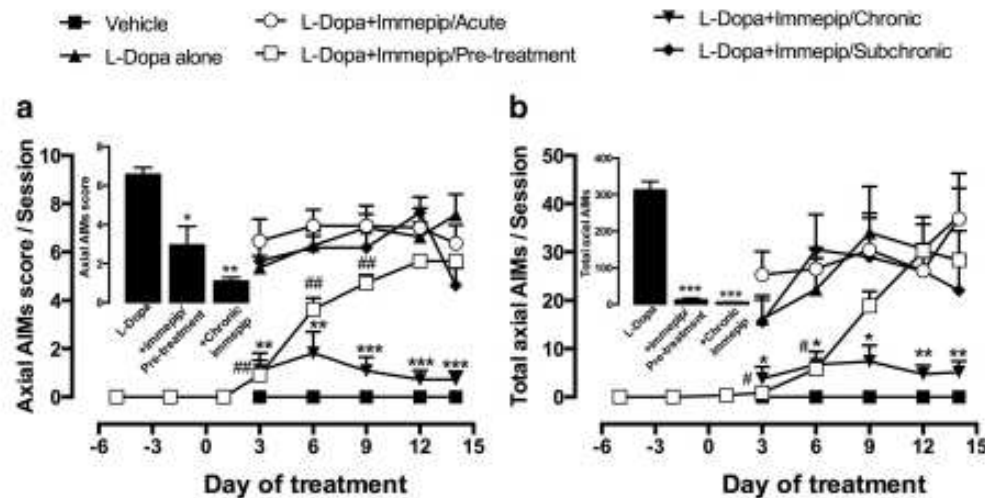


Fig. 1 Effect of the systemic administration of the H₃R agonist immpip (1 mg/kg) on axial AIM scores (A) and total axial AIMs (B) induced by L-Dopa (6.25 mg/kg; carbidopa 15 mg/kg). The acute immpip group received a daily dose of immpip for 3 consecutive days from day 12. The sub-chronic immpip group received a daily dose of immpip 7 consecutive days from day 8. The chronic immpip group received a daily dose of immpip for 14 consecutive days (days 1–14). All values are expressed as means \pm SEM. In each session per day, the axial AIM scores received in the six observation points were summed (A), whereas for total axial

AIMs, each axial AIM was counted and then summed per session (B). The statistical analysis of AIM scores was performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney *U* test to compare the mean rank of the drug treatment groups. The analysis of total AIMs was performed with repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test to compare the means of the drug treatment groups. The insert shows the comparison of the L-Dopa, L-Dopa + immpip and L-Dopa + chronic immpip groups. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$; when compared with L-Dopa

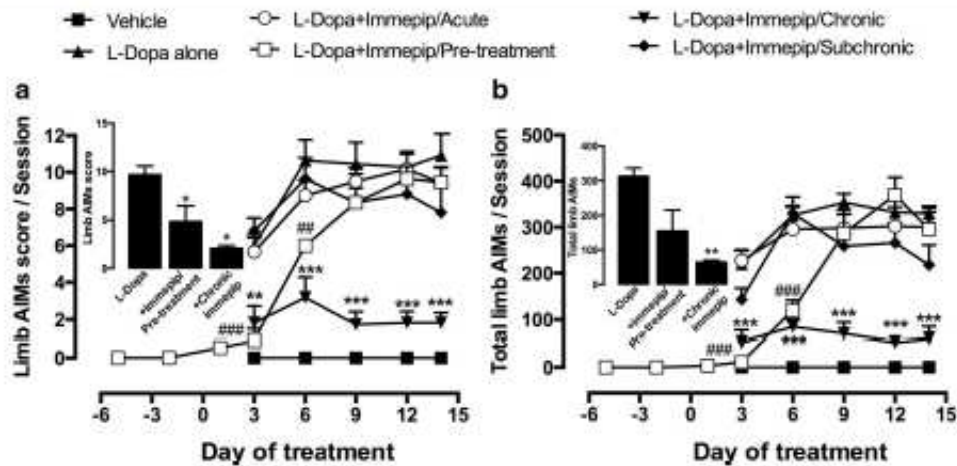


Fig. 2 Effect of the systemic administration of the H₃R agonist imnepip (1 mg/kg) on limb AIM scores (A) and total limb ADMs (B) induced by L-Dopa (6.25 mg/kg; carbidopa 15 mg/kg). Drug administration was as described for Fig. 1. All values are expressed as the mean \pm SEM. In each session per day, the limb AIM scores received in the six observation points were summed (A), whereas for total limb ADMs, each limb AIM

was counted and then summed per session (B). The statistical analysis was performed as described for Fig. 1. The insert shows the comparison of the L-Dopa, L-Dopa + imnepip, and L-Dopa + chronic imnepip groups. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.0001; when compared with L-Dopa

the chronic administration of imnepip + L-Dopa did not produce a significant effect on total axial ADMs at 3, 6, 9, 12, and 14 days compared with the vehicle group. The sub-chronic and acute administration of imnepip had no significant effect on total axial ADMs compared with the L-Dopa alone group. An anti-dyskinetic effect was observed for the

pre-treatment with imnepip, which significantly decreased total axial ADMs (-94 and -74% at 3 and 6 days, respectively; *P* < 0.05 for both values) compared with the L-Dopa alone group (Fig. 1b).

Figure 2a shows that the chronic administration of imnepip significantly decreased limb AIM scores (-69,

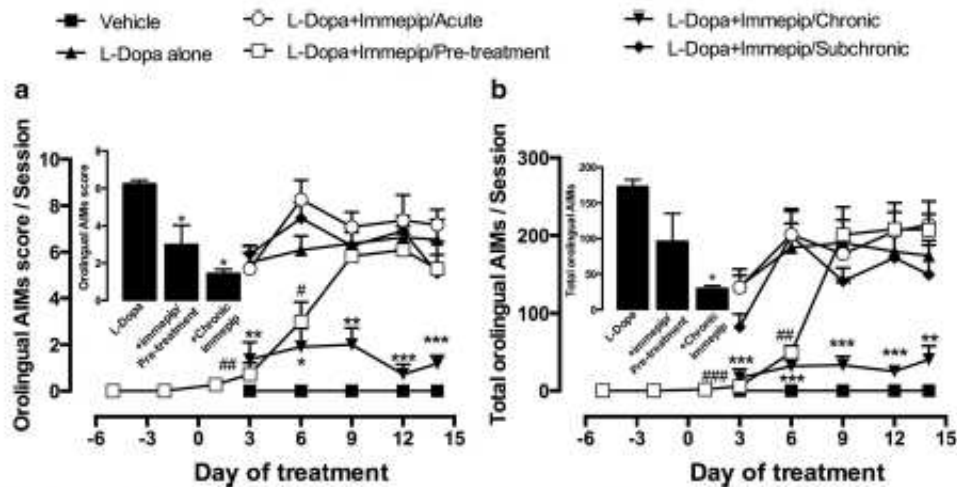


Fig. 3 Effect of the systemic administration of the H₃R agonist imnepip (1 mg/kg) on orolingual AIM scores (A) and total orolingual ADMs (B) induced by L-Dopa (6.25 mg/kg; carbidopa 15 mg/kg). Drug administration was as described for Fig. 1. All values are expressed as means \pm SEM. In each session per day, the orolingual AIM scores received in the six observation points were summed (A), whereas for total orolingual

ADMs, each orolingual AIM was counted and then summed per session (B). The statistical analysis was performed as described for Fig. 1. The insert shows the comparison of the L-Dopa, L-Dopa + imnepip, and L-Dopa + chronic imnepip groups. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.0001; when compared with L-Dopa

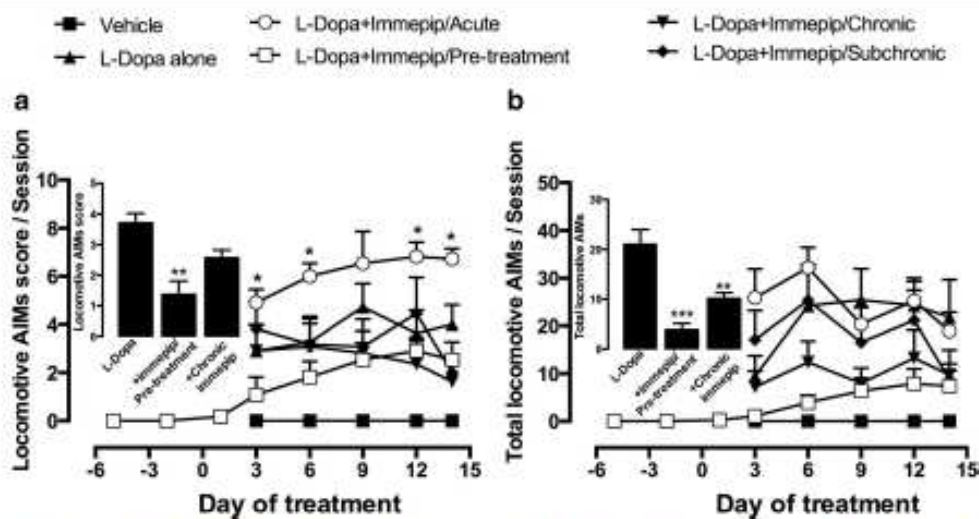


Fig. 4 Effect of the systemic administration of the H_2R agonist immapip (1 mg/kg) on locomotive AIM scores (A) and total locomotive AIMs (B) induced by L-Dopa (6.25 mg/kg, carbidopa 15 mg/kg). Drug administration was as described for Fig. 1. All values are expressed as means \pm SEM. In each session per day, the locomotive AIM scores received in the six observation points were summed (A), whereas for total locomotive

AIMs, each locomotive AIM was counted and then summed per session (B). The statistical analysis was performed as described for Fig. 1. The insert shows the comparison of the L-Dopa, L-Dopa + immapip, and L-Dopa + chronic immapip groups. $**P < 0.01$; $***P < 0.0001$; when compared with L-Dopa.

– 70, – 83, – 82, and – 83% at 3, 6, 9, 12, and 14 days, respectively; $P < 0.01$ for all values) compared with the L-Dopa alone group. The subchronic and acute administration of immapip did not affect limb AIM scores compared with the L-Dopa alone group. The administration of immapip alone on days – 5 and – 2 did not produce a significant effect on limb AIM scores and total AIMs (Fig. 2a, b), but an anti-dyskinetic effect was observed at days 3 and 6 with a significant decrease in AIMs (– 85 and – 43%, respectively; $P < 0.01$ for both values) compared with the L-Dopa alone group (Fig. 1a).

With respect to total limb AIMs, the chronic immapip group showed a significant decrease in limb AIMs (– 76, – 74, – 80, – 84 and – 82% at 3, 6, 9, 12, and 14 days, respectively; $P < 0.0001$ for all values; Fig. 2b) compared with the L-Dopa alone group, but no difference with the vehicle group. The subchronic and acute administration of immapip did not produce a significant difference in total limb AIMs compared with the L-Dopa alone group (Fig. 2b). However, pre-treatment with immapip significantly decreased total limb AIMs (– 95 and – 63% at 3 and 6 days, respectively; $P < 0.0001$ for both values; Fig. 2b) compared with the L-Dopa alone group, indicating that the anti-dyskinetic effect was produced only at the initial time points.

As shown in Fig. 3a, the chronic administration of immapip significantly decreased orolingual AIM scores (– 75, – 69, – 68, – 89, and – 82% at 3, 6, 9, 12, and 14 days, respectively; $P < 0.01$ for all values) compared with the L-Dopa alone group. The administration of immapip alone on days – 5 and – 2 did not produce a significant effect on orolingual AIM

scores and total AIMs, but on days 3 and 6, an anti-dyskinetic effect was observed with a significant decrease in orolingual AIMs (– 86 and – 51%, respectively; $P < 0.05$ for both values; Fig. 3a) compared with the L-Dopa alone group.

Figure 3b shows that in the chronic immapip group, there was a significant decrease in total orolingual AIMs (– 87, – 83, – 82, – 86, and – 77% at 3, 6, 9, 12, and 14 days, respectively; $P < 0.01$ for all values) compared with the L-Dopa alone group, but no significant difference when compared with the vehicle group. The subchronic and acute administration of immapip did not affect total orolingual AIMs compared with the corresponding L-Dopa alone groups. However, pre-treatment with immapip significantly decreased total orolingual AIMs (– 96 and – 73% at 3 and 6 days, respectively; $P < 0.001$ for both values; Fig. 3b) compared with the L-Dopa alone group.

Figure 4a and b show that the chronic administration of immapip + L-Dopa did not affect the locomotive AIM scores and total AIMs compared with the respective L-Dopa alone groups. The acute administration significantly increased the locomotive AIM scores (69, 83, 87, and 68% at 3, 6, 12, and 14 days, respectively; $P < 0.05$ for all values; Fig. 4a), whereas the subchronic administration had no significant effect compared with the L-Dopa group. Furthermore, the administration of immapip alone on days – 5 and – 2 had no significant effect on locomotive AIM scores and total AIMs, and the concomitant administration with L-Dopa at 3, 6, 9, 12, and 14 days failed to affect locomotive AIM scores and total AIMs (Fig. 4a, b) compared with the vehicle group. The

chronic administration of imnepip + L-Dopa did not produce a significant effect on total locomotive AIMS at 3, 6, 9, 12, and 14 days compared with the vehicle group (Fig. 4b). The subchronic and acute administration of imnepip did not produce a significant difference in total locomotive AIMS compared with the L-Dopa alone group (Fig. 4b).

As shown in Fig. 5a, the chronic administration of imnepip significantly decreased ALO AIM scores (-75, -70, -80, -86, and -84% at 3, 6, 9, 12, and 14 days, respectively; $P < 0.01$ for all values) compared with the L-Dopa alone group. The administration of imnepip alone on days -5 and -2 did not produce a significant effect on ALO AIM scores and total ALO AIMS, but on days 3 and 6 showed an anti-dyskinetic effect with a significant decrease in ALO AIM scores (-85 and -45%, respectively; $P < 0.05$ for both values; Fig. 5a) compared with the L-Dopa alone group. Figure 5b shows that the chronic imnepip group presented a significant decrease in total ALO AIMS (-79, -77, -81, -85, and -80% at 3, 6, 9, 12, and 14 days, respectively; $P < 0.001$ for all values) compared with the L-Dopa alone group, but no significant difference with the vehicle group.

The subchronic and acute administration of imnepip did not affect ALO AIM scores compared with the corresponding L-Dopa alone groups. However, pre-treatment with imnepip significantly decreased total ALO AIMS (-95 and -70% at 3 and 6 days, respectively; $P < 0.001$ for both values; Fig. 5b) compared with the L-Dopa alone group, indicating that the anti-dyskinetic effect was produced only at the initial time points.

Effect of the withdrawal of chronic imnepip administration on LIDs

Figure 6 shows that imnepip withdrawal significantly increased axial AIMS (265, 233, 244, and 223% at 16, 18, 20, and 21 days, respectively; $P < 0.02$ for all values; Fig. 6a), limb AIMS (135, 155, 140, and 124% at 16, 18, 20, and 21 days, respectively; $P < 0.02$ for all values; Fig. 6c), orolingual AIMS (325, 313, 300, and 350% at 16, 18, 20, and 21 days, respectively; $P < 0.02$ for all values; Fig. 6e) and locomotive AIMS (180, 170, and 170% at 18, 20, and 21 days, respectively; $P < 0.05$ for all values; Fig. 6g) scores compared with L-Dopa + imnepip for 3, 6, 9, 12, and 14 days.

For total AIMS, the systemic administration of L-Dopa alone after imnepip withdrawal significantly increased axial AIMS (265, 256, 190, and 226% at 16, 18, 20, and 21 days, respectively; $P < 0.02$ for all values; Fig. 6b), limb AIMS (85, 121, 107, and 92% at 16, 18, 20, and 21 days, respectively; $P < 0.05$ for all values; Fig. 6d), orolingual AIMS (482, 709, 468, and 501% at 16, 18, 20, and 21 days, respectively; $P < 0.001$ for all values; Fig. 6f), and locomotive AIMS (179% at 20 day; $P < 0.05$; Fig. 6h) compared with the L-Dopa + imnepip values from 3, 6, 9, 12, and 14 days.

Effect of imnepip on GABA and glutamate contents in striatal dialysates

In the L-Dopa alone group, the systemic administration of L-Dopa (6.25 mg/kg) on day 15 significantly increased

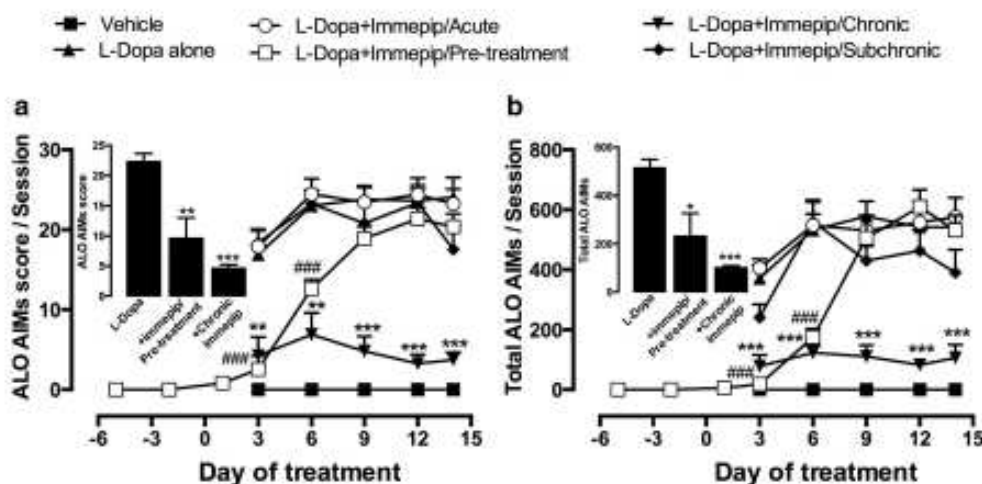
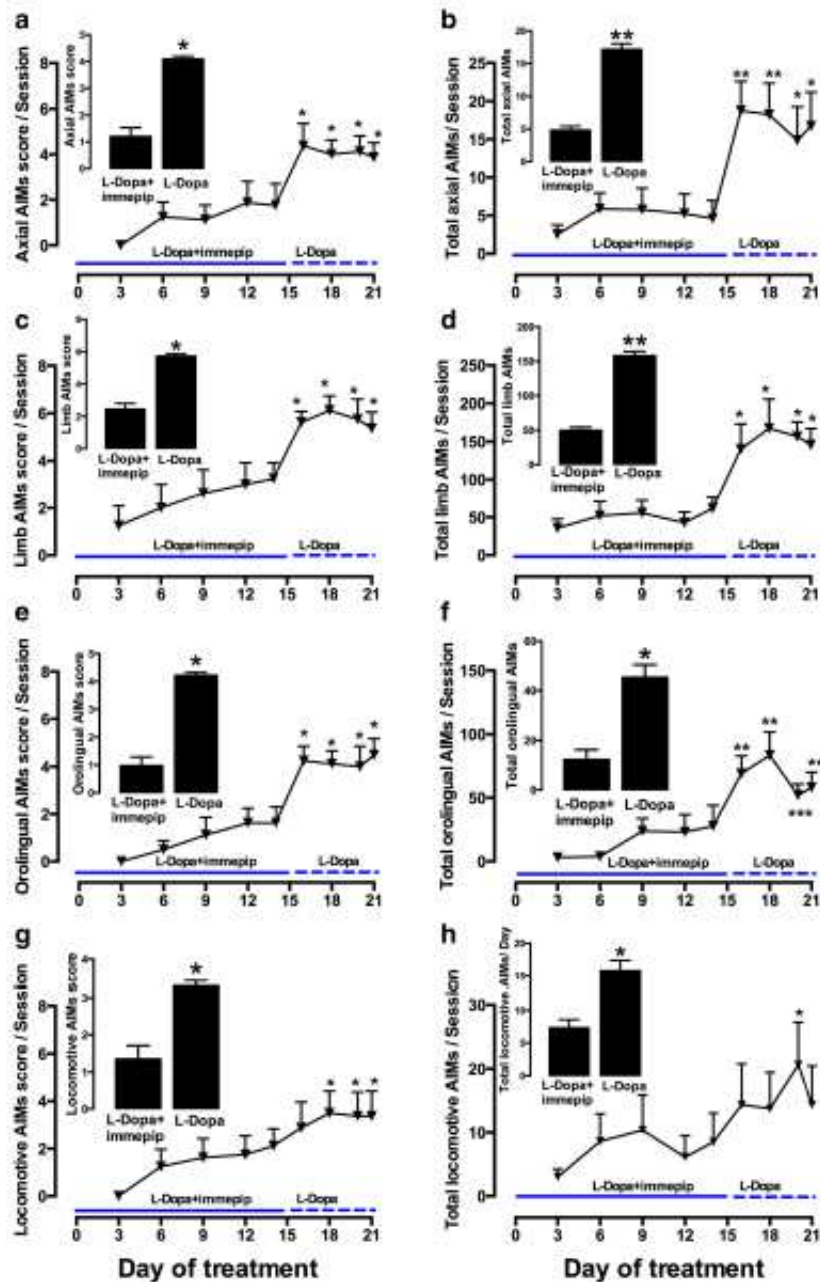


Fig. 5 Effect of the systemic administration of the H₂R agonist imnepip (1 mg/kg) on ALO AIMs scores (A) and total ALO AIMS (B) induced by L-Dopa (6.25 mg/kg; carbidopa 15 mg/kg). Drugs administration was as described for Fig. 1. All values are expressed as means \pm SEM. In each session per day, the ALO AIM scores received in the six observation points were summed (A), whereas for total ALO AIMS, each ALO

AIM was counted and then summed per session (B). The statistical analysis was performed as described for Fig. 1. The inset shows the comparison of the L-Dopa, L-Dopa + imnepip, and L-Dopa + chronic imnepip groups. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$; when compared with L-Dopa.



glutamate levels in striatal dialysates to 150, 134, and 127% of the values for the parkinsonian rats that received the same treatment, at 120, 150, and 180 min, respectively ($P < 0.05$ for all values; Fig. 7a). A similar effect was observed for GABA levels (195, 185, and 176% of the values for the parkinsonian rats, at 120, 150, and 180 min, respectively;

$P < 0.05$ for all values; Fig. 7b). In contrast, in the chronic imnepip + L-Dopa group, L-Dopa administration significantly decreased striatal glutamate levels compared with the parkinsonian rats (-40 , -41 , and -35% at 120, 150, and 180 min, respectively; $P < 0.05$ for all values; Fig. 7a), whereas striatal GABA levels were not affected (Fig. 7b).

Fig. 6 Effect of the systemic administration for 7 consecutive days of L-Dopa (6.25 mg/kg; carbidopa 15 mg/kg) after imnepip withdrawal on day 15, on axial (A), limb (C), orolingual (E), and locomotive (G) AIM scores and the respective total AIMs (B, D, F, H). The chronic imnepip group received a daily dose of L-Dopa + imnepip for 14 days (L-Dopa + imnepip/chronic). All values are expressed as means ± SEM. In each session per day, the AIM scores received in the five observation points were summed and represented per subtype, whereas for total AIMs per subtype, each AIM was counted and then summed per session. The statistical analysis of AIMs scores was performed with Wilcoxon test. The insert shows the comparison of total AIMs between the L-Dopa + imnepip and L-Dopa groups. The bars correspond to the means ± SEM of AIM scores and total AIMs from days 3, 6, 9, 12, and 14 for the withdrawal of chronic imnepip (L-Dopa + imnepip), and days 16, 18, 20, and 21 for the after-withdrawal of chronic imnepip (L-Dopa alone). The statistical analysis was performed with the Wilcoxon test (A, C, E, and G) or Student's *t* test (B, D, F, and H). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.0001; when compared with L-Dopa + imnepip values

Discussion

The main finding of this study is that the chronic administration of the H₃R agonist imnepip reduces LIDs in 6-OHDA-lesioned rats.

In agreement with the report of Papathanou et al. (2014), who showed that in 6-OHDA-lesioned rats, a single dose of imnepip had no effect on LIDs, in our study, the acute administration of imnepip failed to modify LIDs in 6-OHDA-lesioned rats. Likewise, a high dose of imnepip or imetit (10 mg/kg) significantly decreased L-Dopa-induced chorea, but had no effect on motor disability and dyskinesia in marmosets lesioned with MPTP (Gomez-Ramirez et al. 2006). In spite of the lack of effect on LIDs, the systemic administration of imetit (5 mg/kg) decreased L-Dopa-induced dopamine release in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats, and reduced stereotyped behaviors induced by L-Dopa (Nowak et al. 2008), indicating that acute H₃R activation opposes L-Dopa-

induced dopaminergic transmission but not LIDs, presumably due to the presence of chronic alterations in dopaminergic transmission induced by L-Dopa, as discussed below.

In contrast to the acute administration, imnepip decreased axial, orolingual, and limb AIMs when it was co-administered with L-Dopa from day 1 (chronic administration), although not when administered afterwards (subchronic and acute groups, administered at days 8 and 12, respectively), when LIDs were already established. These results suggest that imnepip acts to prevent the generation of LIDs and is thus ineffective once LIDs are established.

Related to the differences between dyskinetic and non-dyskinetic animals, patients with Parkinson's disease who developed LIDs showed increased striatal dopamine levels after the administration of L-Dopa in comparison to stable responders, and the observed difference correlated positively with the duration of symptoms for the caudate and putamen nuclei (De la Fuente-Fernandez et al. 2004). The increase in dopamine levels could therefore be associated to the reduction of the dopamine transporter (DAT) reported by Pagano et al. (2017), which leads to increased dopamine concentrations in the extracellular space.

Chronic L-Dopa administration induces D₁R sensitization in the striatal projection neurons of the direct pathway, leading to excessive D₁R signaling that through protein kinase A (PKA) and the cAMP-regulated protein of 32 kDa (DARPP-32) promotes the activation of additional intracellular signaling cascades resulting in abnormal gene expression (Spigolon and Fisone 2018). Accordingly, in severe-dyskinetic rats, but not in mild-dyskinetic animals, the chronic administration of L-Dopa increases D₁R-mediated cAMP formation and depolarization-evoked [³H]-GABA release in slices of the SNr ipsilateral to 6-OH-lesioned *pars compacta*. Furthermore, in animals with mild dyskinesia, L-Dopa

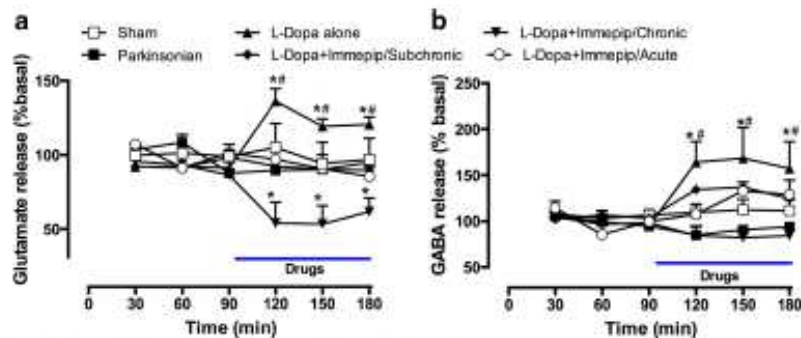


Fig. 7 Effect of the systemic administration of the H₃R agonist imnepip (1 mg/kg) on glutamate (A) and GABA (B) release in the striatum. Values are expressed as means ± SEM. The sham, parkinsonian, and L-Dopa groups received a single dose of L-Dopa (6.25 mg/kg; carbidopa 15 mg/kg). The acute, subchronic, and chronic imnepip groups received single doses of L-Dopa and imnepip (1 mg/kg). All drugs were

administered at min 87, except for carbidopa, administered at min 67. All values are expressed as means ± SEM. The statistical analysis was performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by Mann-Whitney *U* test to compare the mean rank of the drug treatment groups. **P* < 0.05; when compared with parkinsonian values. ***P* < 0.05; when compared with chronic imnepip values

restored the content of adenylyl cyclase (type V/VII) in the 6-OH-DA-lesioned SNr, but had no effect in rats with severe dyskinesia (Rangel-Barajas et al. 2011).

The ineffectiveness of the acute administration of immapip to modify LIDs (Papaathanou et al. 2014) could therefore rely on the previous generation of pre- and post-synaptic changes induced by chronic L-Dopa administration. However, if immapip is administered before the development of dyskinesias, as showed for the chronic immapip group, H₃R activation was effective. This hypothesis is supported by the appearance of LIDs after the withdrawal of immapip administration (Fig. 6).

D₁Rs and H₃Rs are expressed by the MSNs of the direct pathway (González-Sepúlveda et al. 2013), both in their bodies and the axon terminals, and a functional interaction between these receptors has been reported by several studies (Arias-Montaña et al. 2001; Garcia et al. 1997; Moreno et al. 2011; Rapanelli 2017; Ryu et al. 1994). Pre-synaptically, in slices from the rat striatum and SNr, H₃R activation with immapip selectively inhibited the component of depolarization-evoked [³H]-GABA release that depends on concomitant D₁R stimulation (Arias-Montaña et al. 2001; Garcia et al. 1997), and the systemic administration of the H₃R agonist imetit (5 mg/kg) decreases L-Dopa-induced dopamine release in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats (Nowak et al. 2008), presumably by activating H₃Rs located on striatal dopaminergic terminals (Schlicker et al. 1993).

Post-synaptically, H₃R activation reduces D₁R-induced cAMP formation (Sanchez-Lemus and Arias-Montano 2004). Furthermore, H₃Rs can form heterodimers with D₁Rs and heteroreceptor complexes with D₁Rs and glutamate N-

methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Whereas in the D₁R/H₃R dimer, H₃R activation reduces D₁R affinity for selective agonists and shifts the coupling of D₁Rs from G α_s to G $\alpha_{i/o}$ proteins (Ferrada et al. 2009; Moreno et al. 2011); in the D₁R/H₃R/NMDA receptor complex, H₃R activation prevents ERK-1/2 phosphorylation induced by D₁R stimulation (Rodríguez-Ruiz et al. 2017).

Unexpectedly, our results showed that the administration of immapip alone (1 mg/kg) for 5 consecutive days prior to L-Dopa did not reduce axial, limb, orolingual, and locomotive AIM scores or total AIMs (Figs. 1, 2, 3, 4, and 5). We do not have an explanation for this result, but one possibility is that the continuous activation of H₃Rs in the absence of D₁R stimulation leads to desensitization of post-synaptic H₃Rs, a phenomenon showed for transfected receptors by our group (García-Galvez et al. 2018; Osorio-Espinoza et al. 2014).

In the microdialysis experiments, the systemic injection of L-Dopa (6.25 mg/kg; carbidopa 15 mg/kg) to animals of the L-Dopa alone group significantly increased striatal GABA and glutamate release compared with parkinsonian rats.

The increase in GABA release is consistent with the enhanced depolarization-induced [³H]-GABA release from SNr slices of dyskinetic rats (Rangel-Barajas et al. 2011), correlates with the increased AIMs in our study, and can be explained by the sensitization of D₁R signaling (Fig. 8c). The chronic administration of immapip prevented the L-Dopa effect and can be associated with the functional interaction between H₃Rs and D₁Rs discussed before (Arias-Montaña et al. 2001; Garcia et al. 1997; Moreno et al. 2011; Rapanelli 2017).

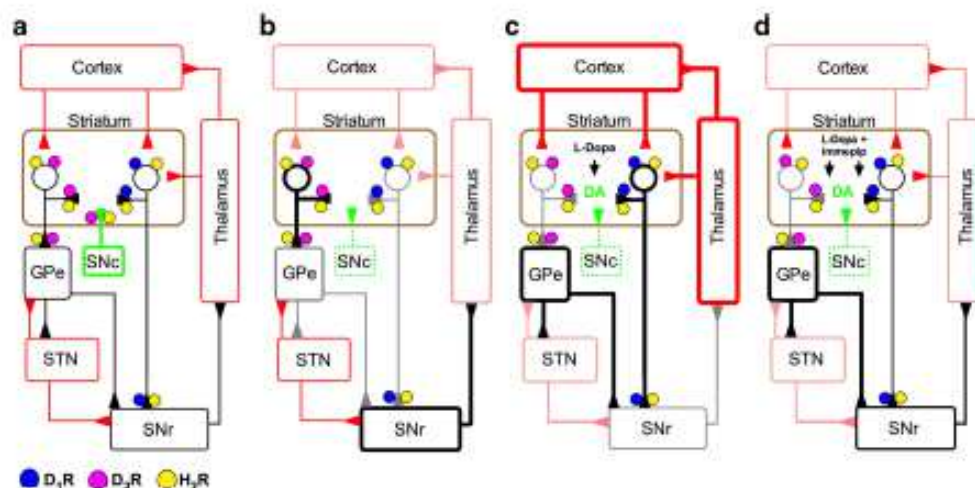


Fig. 8 Schematic representation of the basal ganglia synaptic circuitry in normal conditions (A), parkinsonism (B), the dyskinetic state (C), and the proposed action of the chronic administration of the H₃R agonist immapip (D). Red lines indicate excitatory projections and black lines inhibitory projections. Dotted lines indicate dopaminergic depletion in the

substantia nigra *pars compacta* (SNc). The striatum communicates with neurons in the substantia nigra *pars reticulata* (SNr) through a direct pathway, and to the external segment of the globus pallidus (GPe), which in turn projects to the subthalamic nucleus (STN) that projects to the SNr, forming the indirect pathway

The increase in glutamate release is in accord with the enhancement in glutamatergic transmission reported previously (Huot et al. 2013). Increased extracellular glutamate concentration and changes in the subcellular distribution of glutamate receptor subunits have also been associated with the development and expression of LIDs (Pagano et al. 2017) (Fig. 8c). The classic model of basal ganglia function (Albin et al. 1989) suggests that overactivity of glutamatergic corticostriatal projections is critical for the hyperactivity of striatonigral neurons that form the basal ganglia direct pathway (Fig. 8c). H₃R activation inhibits glutamate release from corticostriatal and thalamo-striatal nerve terminals (Doreulee et al. 2001; Ellender et al. 2011; Molina-Hernandez et al. 2001), and this effect could explain the effect of the immpip administration. Of note, whereas the acute and sub-chronic immpip administration only prevented the effect of L-Dopa, the chronic administration reduced glutamate levels to values below basal. One explanation for the latter effect could be the inhibition of the cortico-striatal pathway (Fig. 8d), which is highly dominant in the modulation of the activity of striatal neurons compared with the thalamo-cortical pathway (Ding et al. 2008; Silberberg and Bolam 2015; Smith et al. 2004).

Conclusion

Our results indicate that the chronic administration of the H₃R agonist immpip prevents LIDs in 6-OHDA-lesioned rats, and that this effect requires the continuous administration of the agonist. The effect of immpip appears to rely on the H₃R-mediated inhibition of D₁R stimulatory actions on GABA and glutamate release in the striatum. These findings can contribute to the understanding of the role of D₁Rs and H₃Rs in the dysfunction of the basal ganglia that occurs in neurodegenerative diseases involving disturbances of the dopaminergic system.

Acknowledgments We thank MVZ Hugo Lecona Batrón for the support with housing, care, maintenance, and monitoring of the health of the experimental animals at the Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. We thank MVZ Javier Pérez Gallaga for the technical support. The authors wish to thank Dr. Ivonne M. Houze de Kazza for her support with the experimental animals.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

Ahlskog JE, Muentner MD (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16:448–458

Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375

Alfaro-Rodríguez A, Alonso-Spillsbury M, Arch-Tirado E, González-Pina R, Arias-Montano J-A, Bueno-Nava A (2013) Histamine H₃ receptor activation prevents dopamine D₁ receptor-mediated inhibition of dopamine release in the rat striatum: a microdialysis study. *Neurosci Lett* 552:5–9

Anderson M, Hilbertson A, Cenci MA (1999) Striatal forB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 6: 461–474

Arias-Montano JA, Florán B, García M, Aceves J, Young JM (2001) Histamine H₃ receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D₁ receptor-dependent release of [³H]-gamma-aminobutyric acid from rat striatal slices. *Br J Pharmacol* 133: 165–171

Bastide MF, Meisner WG, Picconi B, Fasano S, Farnagut PO, Feyder M, Fenuardo V, Akacser C, Ding YM, Brambilla R, Fisone G, Stoessl AJ, Boudreau M, Engel M, Navailles S, De Dourwaerle P, Ko WKD, Simola N, Morelli M, Gme L, Rodriguez MC, Gurevich EV, Quik M, Morari M, Mellone M, Gardoni F, Tronci E, Guehl D, Tison F, Crossman AR, Kang UJ, Stecco-Collier K, Fox S, Carta M, Cenci MA, Bezard E (2015) Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 132:96–168

Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organization of the basal ganglia. *J Anat* 196(Pt 4):527–542

Carta M, Bezard E (2011) Contribution of pre-synaptic mechanisms to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuroscience* 198:245–251

Cenci MA, Lee CS, Bjorklund A (1998) L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci* 10:2694–2706

Connolly BS, Lang AE (2014) Pharmacological treatment of Parkinson disease a review. *JAMA J Am Med Assoc* 311:1670–1683

De la Fuente-Fernandez R, Sossi V, Huang ZG, Furtado S, Lu JQ, Calne DB, Ruth TJ, Stoessl AJ (2004) Levodopa-induced changes in synaptic dopamine levels increase with progression of Parkinson's disease: implications for dyskinesias. *Brain* 127:2747–2754

Ding J, Peterson JD, Surmeier DJ (2008) Corticostriatal and thalamostriatal synapses have distinctive properties. *J Neurosci* 28: 6483–6492

Doreulee N, Yanovsky Y, Flaggmeyer I, Stevens DR, Haas HL, Brown RE (2001) Histamine H₃ receptors depress synaptic transmission in the corticostriatal pathway. *Neuropharmacology* 40:106–113

Ellender TJ, Huerta-Ocampo I, Deisseroth K, Capogna M, Bolam JP (2011) Differential modulation of excitatory and inhibitory striatal synaptic transmission by histamine. *J Neurosci* 31:15340–15351

Fernández C, Moreno E, Casado V, Bongers G, Cortes A, Mallol J, Canela EI, Leurs R, Ferré S, Lluís C, Franco R (2009) Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D₁ and histamine H₃ receptors. *Br J Pharmacol* 157:64–75

Festing MF (1994) Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab Anim* 28:212–221

García M, Florán B, Arias-Montano JA, Young JM, Aceves J (1997) Histamine H₃ receptor activation selectively inhibits dopamine D₁ receptor-dependent [³H]GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 80:241–249

García-Galvez AM, Escamilla-Sánchez J, Flores-Maldonado C, Contreras RG, Arias JM, Arias-Montano JA (2018) Differential homologous desensitization of the human histamine H-3 receptors of 445 and 365 amino acids expressed in CHO-K1 cells. *Neurochem Int* 112:114–123

Gomez-Ramírez J, Johnston TH, Visanji NP, Fox SH, Brochie JM (2006) Histamine H₃ receptor agonists reduce L-dopa-induced

- chora, but not dystonia, in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 21:839–846
- González-Sepúlveda M, Rosell S, Hoffmann HM, Castillo-Ruiz MM, Mignon V, Moreno-Delgado D, Michel V, Díaz J, Sahriá J, Ortiz J (2013) Cellular distribution of the histamine H₃ receptor in the basal ganglia: functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia* 3:109–121
- Hely MA, Morris JGL, Reid WGJ, Traficante R (2005) Sydney multicenter study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord* 20:190–199
- Huot P, Johnston TH, Koprich JB, Fox SH, Brotchie JM (2013) The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol Rev* 65:171–222
- Johansson PA, Andersson M, Andersson KE, Cenci MA (2001) Alterations in cortical and basal ganglia levels of opioid receptor binding in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis* 8:220–239
- Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002) Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15:120–132
- Molina-Hernandez A, Nunez A, Sierra JJ, Arias-Montano JA (2001) Histamine H₃ receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 41:928–934
- Montes S, Alcaraz-Zabedra M, Muriel P, Rios C (2005) Role of manganese accumulation in increased brain glutamine of the cirrhotic rat. *Neurochem Res* 28:911–917
- Moreno E, Hoffmann H, González-Sepúlveda M, Navarro G, Casado V, Cortes A, Mallol J, Vignes M, McCormick PJ, Canela EI, Lluís C, Montaña R, Ferré S, Ortiz J, Franco R (2011) Dopamine D₁-histamine H₃ receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J Biol Chem* 286:5846–5854
- Nowak P, Bortel A, Dulbrowska J, Biedka I, Skonian G, Roczniak W, Kostzewska RM, Brus R (2008) Histamine H₃ receptor ligands modulate L-dopa-evoked behavioral responses and L-dopa-derived extracellular dopamine in dopamine-denervated rat striatum. *Neurotox Res* 13:231–240
- Olfert E, Cronin B, McWilliam A (1993) Guide for the care and use of experimental animals. *Can Council Anim Care* 1:211
- Ovorio-Espinoza A, Escamilla-Sanchez J, Aquino-Jarquin G, Arias-Montano JA (2014) Homologous desensitization of human histamine H₃ receptors expressed in CHO-K1 cells. *Neuropharmacology* 77:387–397
- Pagano G, Youssaf T, Politis M (2017) PET molecular imaging research of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Reports* 17:90
- Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Ainkainen MS (1989) Histamine-immunoreactive nerve-fibers in the rat-brain. *Neuroscience* 28:585–610
- Papathanou M, Jenner P, Inzani M, Jackson M, Stockwell K, Strang I, Zeng B-Y, McCreary AC, Rose S (2014) The H₃ receptor agonist imzepip does not affect L-dopa-induced abnormal involuntary movements in 6-OHDA-lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 741:304–310
- Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th edn. Academic Press, London
- Pillet C, Benin A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM (2002) A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* 114:173–193
- Porras G, De Deurwaerdere P, Li Q, Marti M, Morgenstern R, Sohr R, Bezzard E, Monni M, Meissner WG (2014) L-dopa-induced dyskinesia beyond an excessive dopamine tone in the striatum. *Sci Rep* 4:5730
- Rangel-Banjas C, Silva I, Lopez-Santiago LM, Aceves J, Erlij D, Floran B (2011) L-dopa-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type VVI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata. *Neurobiol Dis* 41:51–61
- Rapanello M (2017) The magnificent two: histamine and the H₃ receptor as key modulators of striatal circuitry. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 73:36–40
- Rodríguez-Ruiz M, Moreno E, Moreno-Delgado D, Navarro G, Mallol J, Cortes A, Lluís C, Canela EI, Casado V, McCormick PJ, Franco R (2017) Heteroreceptor complexes formed by dopamine D₁, histamine H₃, and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors as targets to prevent neuronal death in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 54:4537–4550
- Ryu JH, Yanai K, Iwata R, Ido T, Watanabe T (1994) Heterogeneous distributions of histamine H₃, dopamine D₁ and D₂ receptors in rat brain. *Neuroreport* 5:621–624
- Sanchez-Lemus E, Arias-Montano JA (2004) Histamine H₃ receptor activation inhibits dopamine D₁ receptor-induced cAMP accumulation in rat striatal slices. *Neurosci Lett* 364:179–184
- 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* 93:1–10
- Silberberg G, Bolam JP (2015) Local and afferent synaptic pathways in the striatal microcircuitry. *Curr Opin Neurobiol* 33:182–187
- Smith Y, Raju DV, Pare JF, Sidibe M (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci* 27:520–527
- Spigolon G, Fisone G (2018) Signal transduction in l-dopa-induced dyskinesia: from receptor sensitization to abnormal gene expression. *J Neural Transm* 125:1171–1186
- Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM (2017) Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci* 18:101–113

