

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA / INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

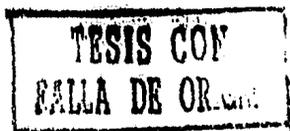
“CARACTERIZACION DE RECEPTORES PARA  
HISTAMINA DEL SUBTIPO H1 EN LA LINEA  
CELULAR GnRHERGICA GT<sub>1-1</sub>”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
PRESENTA

GINO FABRIZIO NORIS GARCIA

MEXICO D.F. FEBRERO DE 1996.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

	página.
1. <b>RESUMEN.</b>	3
2. <b>INTRODUCCION.</b>	5
2.1 Regulación neuroendócrina de la reproducción: El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.	5
2.2 Las células GT <sub>1-1</sub> como modelo para estudiar la biología de las neuronas GnRHégicas.	6
2.3 La histamina como transmisor neuroendócrino: Receptores para histamina.	9
3. <b>ANTECEDENTES.</b>	12
3.1 Evidencias anatómicas que apuntan hacia una posible participación de la histamina en la regulación de la secreción de la GnRH.	12
3.2 Mediciones de cambios en la secreción de la GnRH como respuesta a la manipulación de la concentración de histamina.	13
4. <b>HIPOTESIS.</b>	15
5. <b>OBJETIVO.</b>	15
6. <b>MATERIAL Y METODOS.</b>	16
6.1 Reactivos.	16
6.2 Cultivo celular.	16
6.3 Preparación de Membranas.	17
6.4 Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford.	18
6.5 Estudios de Unión con un Radioligando.	19
7. <b>RESULTADOS.</b>	21
7.1 Estadarización de la Técnica.	21
7.2 Unión de un Ligando Selectivo de Receptores para Histamina del Subtipo H1 a Membranas de Células GT1-1: Curva de Saturación y Análisis Tipo Scatchard.	23
7.3 Curvas de Competencia.	24
7.4 Comunicación de los resultados.	25
8. <b>DISCUSION.</b>	25
9. <b>CONCLUSION.</b>	29
10. <b>BIBLIOGRAFIA.</b>	30

## RESUMEN.

### LA HISTAMINA ESTIMULA DIRECTAMENTE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH) VIA RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS H1 ACOPLADOS A LA HIDROLISIS DE FOSFOINOSITIDOS EN LAS CELULAS GT<sub>1-1</sub>.

La reproducción es regulada por el sistema neuroendócrino. Dentro de éste el sistema nervioso central se encarga de recibir una enorme cantidad de información sobre factores ambientales e internos que influyen en la función reproductiva. Una vez recibida la información, el cerebro la procesa y la integra en el hipotálamo a través de una vía final común de integración que consiste en la modulación de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Esta hormona regula la función de la hipófisis y las hormonas secretadas por la hipófisis a su vez regulan la función de las gónadas.

Aunque las neuronas GnRHérgicas juegan un papel muy importante en la regulación de la reproducción, se conoce poco sobre su biología debido a que existe un número muy reducido de ellas en el cerebro y a que su distribución es difusa, ya que no se encuentran concentradas en un núcleo definido.

Recientemente parte de estos problemas se han podido resolver gracias a que el grupo de Pamela Mellon en el instituto Salk (La Jolla California) obtuvo una línea celular inmortalizada derivada de estas neuronas y que conservan un fenotipo de neuronas neurosecretoras de GnRH bien diferenciadas. Estas células se obtuvieron por la técnica de tumorigénesis genéticamente dirigida. Lo que se hizo fue un ratón transgénico con un gen híbrido consistente en el promotor del gen de la GnRH unido a la región codificadora del oncogen antígeno T del virus 40 del simio.

Existen muchos neuromediadores que parecen estar involucrados en el control de la secreción de GnRH, uno de los cuales es la histamina. Se ha demostrado que si la histamina se inyecta intracerebro-ventricularmente puede provocar la ovulación de conejas o la liberación de la hormona luteinizante (LH) en ratas. También se ha observado que el bloqueo de los receptores para histamina o bien el bloqueo de la síntesis de histamina en el cerebro provoca una inhibición de la secreción de LH. Finalmente se ha visto que la histamina provoca la liberación de la GnRH de explantes de hipotálamo. Sin embargo hasta la fecha ningún trabajo ha podido discernir si este efecto de la histamina se da directamente sobre las neuronas secretoras de la GnRH o si se da vía interneuronas. Es más, existen discrepancias entre los trabajos que han intentado dilucidar el subtipo de receptor para histamina involucrado en este fenómeno. Nuestro grupo de trabajo encontró que.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la histamina ejerce parte de su acción reguladora de la reproducción mediante una acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas. La predicción que se desprende de esta hipótesis es que las células GT<sub>1-1</sub>, que al parecer son un buen modelo de neuronas GnRHérgicas, expresan receptores para histamina.

El objetivo de este trabajo fue montar una metodología que nos permitiese examinar la expresión de receptores histaminérgicos del subtipo H1 en las células GT<sub>1</sub> de manera directa. Para ello realizamos estudios de unión de mepiramina tritlada a membranas de estas células. La mepiramina es un ligando selectivo de los receptores para histamina del subtipo H1.

Observamos un pegado específico y saturable de mepiramina tritlada a la preparación de membranas crudas. La transformación de la curva de saturación con un análisis tipo scatchard, mostró que la constante de disociación aparente es de 37.8 nM. y el número de sitios de unión aparente es de 279 fmol/mg de proteína.

Estos sitios de unión se caracterizaron en ensayos de competencia utilizando ligandos selectivos para receptores H1 o H2. Los ligandos específicos para receptores H1 (mepiramina y triprolidina) desplazaron al radioligando con una potencia tres órdenes de magnitud mayor que el ligando específico para los receptores H2 (ranitidina).

Estos resultados, junto con otros obtenidos por nuestro grupo de trabajo en los cuales se demuestra que la histamina facilita la secreción de la GnRH en células  $GT_{1-1}$  y la formación de fosfatos de inositol a través de receptores que farmacológicamente se comportan como receptores para histamina del subtipo H1, refuerzan la conclusión de que las células  $GT_{1-1}$  expresan en la membrana sitios de unión específicos para histamina del subtipo H1.

La existencia de receptores para histamina en las células  $GT_{1-1}$  sugiere que la histamina puede estimular al eje reproductivo, al menos en parte, directamente en la superficie de las neuronas GnRHérgicas mediante la activación de receptores para histamina del subtipo H1 acoplados positivamente a la formación de fosfatos de inositol.

## INTRODUCCION.

### **Regulación neuroendócrina de la reproducción: El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.**

En los vertebrados la regulación del aparato reproductor la realiza el sistema neuroendócrino al integrar información relevante para la reproducción y coordinar el funcionamiento de los órganos involucrados en esta función mediante mensajes químicos (hormonas y neurotransmisores). Los tres principales órganos que participan en el control neuroendócrino de la reproducción conforman lo que se conoce como el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas o eje reproductivo (Everett, 1994).

El hipotálamo es una estructura del cerebro que se encuentra en la base del cráneo justo sobre la hipófisis. Recibe fibras nerviosas que provienen de casi todo el sistema nervioso y de él salen fibras que se encuentran involucradas en el control del sistema autónomo y por lo tanto en la homeostasis de las funciones vegetativas (Guyton, 1972; Page, 1994).

Una de las funciones del hipotálamo es la regulación del control endócrino del organismo. Esta función la realiza al secretar hacia el sistema porta hipotálamo-hipofisario hormonas que actúan sobre células de la hipófisis facilitando o inhibiendo la secreción de hormonas hipofisarias que a su vez entran en la circulación sistémica para actuar sobre sus órganos blanco. Una de las funciones reguladas de esta manera por el hipotálamo es la reproducción (Everett, 1994; Page, 1994)

El sistema nervioso central recibe una enorme cantidad de información de factores ambientales e internos que influyen en la función reproductiva, tales como: la intensidad de la luz, la duración del día, la temperatura, la cantidad de alimento, la presencia de congéneres, el peso corporal, la reserva energética, las emociones, etc. El cerebro procesa e integra esta información y a través de una vía final común de integración modula la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Everret, 1994)

La GnRH se secreta en la eminencia media del hipotálamo hacia los vasos del sistema porta. La secreción de la GnRH es pulsátil y al parecer lo que se modula es la amplitud y/o la frecuencia de dichos pulsos. La GnRH secretada

alcanza a sus células blanco, los gonadotropos, en la hipófisis donde estimula la secreción de las gonadotropinas (Everett, 1994; Page 1994 ).

La hipófisis es una glándula localizada en la base del cráneo sobre una estructura ósea que se conoce como silla turca. Consta de dos lóbulos que anatómicamente, ontogénicamente y funcionalmente son distintos. El lóbulo anterior o adenohipófisis agrupa a células endócrinas que producen hormonas que regulan aspectos fisiológicos muy distintos. Dentro de estas células, las que más evidentemente participan en la regulación de la reproducción, son los gonadotropos que producen las hormonas conocidas como gonadotropinas que son la hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH) las cuales se secretan a la circulación sistémica (Everett, 1994; Page 1994 ).

La secreción pulsátil de la GnRH es seguida de una secreción también pulsátil de las gonadotropinas. La pulsatilidad en la secreción de estas hormonas parece ser indispensable para un funcionamiento apropiado del aparato reproductor. (Everett, 1994).

Los órganos blanco de las gonadotropinas son las gónadas. En ellas las gonadotropinas estimulan la gametogénesis y la secreción de hormonas esteroideas, que a su vez participan en la regulación de la gametogénesis y en la preparación de todo el organismo, principalmente del tracto reproductivo, para la reproducción.

Dentro de este eje regulador de la reproducción existen otros mecanismos de comunicación (llamados de retroalimentación) entre los órganos que lo conforman con los cuales se informa al sistema de su estado de funcionamiento. Así, los esteroideos parecen participar en el control de la secreción de la GnRH en el hipotálamo y en la modulación de la respuesta de los gonadotropos a la GnRH. También las gonadotropinas y la misma GnRH están involucradas en el control de la secreción de la GnRH. (Everett, 1994).

### **Las células GT<sub>1</sub> como modelo para estudiar la biología de las neuronas GnRHérgicas.**

Debido a la distribución difusa de las neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo y área preóptica, así como a su escaso número (alrededor de dos mil células por cerebro) (Silverman *et al.*, 1994) muchas preguntas acerca del

funcionamiento del sistema neuronal GnRHérgico permanecen sin respuesta. Por ejemplo existen muchos estudios farmacológicos que demuestran que en la regulación de la secreción de la GnRH están involucrados una gran cantidad de neurotransmisores y neuromoduladores. Sin embargo, se desconoce cuales son los receptores participantes y si estos neuromediadores actúan directamente sobre las neuronas secretoras de la GnRH o a través de interneuronas (Kordon *et al.*, 1994).

Parte de estos problemas han podido ser estudiados gracias a la reciente obtención de tres líneas celulares inmortalizadas provenientes de neuronas secretoras de la GnRH. Estas líneas fueron obtenidas por Pamela Mellon (Mellon *et al.*, 1990) mediante la técnica de tumorigénesis dirigida genéticamente. Para lograrlo se hicieron ratones transgénicos con un gen híbrido consistente en la región codificadora de un oncogen (antígeno T del SV40) bajo el control de la región reguladora (promotor) del gen de la GnRH, de manera que aquellas neuronas que se diferenciaron y expresaron a la GnRH, también expresaron al oncogen resultando consecuentemente en la generación de un tumor. El tumor fue disecado, disociado y las células fueron cultivadas en cajas de petri para separar las células gliales de las neuronales. Una vez que se tuvo una población homogénea que presentaba un fenotipo neuronal distintivo, se hizo una clonación y se obtuvieron tres líneas celulares que se designaron como GT<sub>1.1</sub>, GT<sub>1.3</sub> y GT<sub>1.7</sub>.

El fenotipo de estas células es claramente el de neuronas bien diferenciadas. Forman procesos neuríticos que se interconectan y que contienen gránulos de secreción que contienen a la GnRH (Liposits *et al.*, 1991). Además expresan marcadores específicos de neuronas como los genes de la enolasa específica neuronal y el de la proteína de neurofilamentos de 68 kDa., así como proteínas asociadas a membranas de vesículas sinápticas (VAMP-2 y SNAP-25) y no expresan marcadores gliales como la proteína fibrilar ácida glial o la proteína básica de mielina (Weiner *et al.*, 1992).

Un factor importante para que estas células se consideren un buen modelo de neuronas neurosecretoras es el hecho de que secretan a la GnRH en respuesta a la despolarización de su membrana. Así, si se tratan con veratridina, un activador de los canales de sodio que propagan los potenciales de acción, se obtiene un aumento de la secreción de la GnRH (Mellon *et al.*, 1990). También se produce un aumento de la secreción si se depolarizan las células por su exposición a concentraciones altas de potasio en el medio. Si las

células se tratan con tetrodotoxina, un bloqueador de los canales de sodio, se impide la secreción provocada con la veratridina, pero además la tetrodotoxina inhibe la secreción basal, lo que sugiere que estas neuronas son capaces de generar y propagar potenciales de acción espontáneos que tienen como resultado la secreción de la GnRH. La despolarización provocada con potasio es insensible a la tetrodotoxina pero es sensible a la ausencia de calcio en el medio, por lo que parece que la despolarización inducida con potasio actúa a través de canales de calcio dependientes de voltaje (Weiner *et al.*, 1992; Martínez de la Escalera *et al.*, 1993). Estos resultados coinciden con los obtenidos en explantes de hipotálamo (Drouva *et al.*, 1981) demostrando que en las células GT<sub>1</sub> la secreción de la GnRH está acoplada a la despolarización membranal de igual forma a como lo está en neuronas neurosecretoras no transformadas.

Otra característica sobresaliente de las neuronas GT<sub>1</sub> y que refuerza la idea de que son un buen modelo de neuronas neurosecretoras de la GnRH, es el hecho de que la secreción espontánea que se puso en evidencia al tratarlas con tetrodotoxina se da de manera pulsátil con una frecuencia de aproximadamente un pulso cada 26 min, con una duración promedio de 19 minutos y con una amplitud de 132% sobre el mínimo de secreción inmediato anterior (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992a; Wetsel *et al.*, 1992; Krsmanovic *et al.*, 1992). Estos parámetros coinciden muy cercanamente con la frecuencia de secreción de la GnRH que se observa en roedores *in vivo* que es de un pulso aproximadamente cada media hora. Estos resultados muestran que las neuronas secretoras de la GnRH tienen la capacidad intrínseca de generar pulsos de secreción, funcionando como osciladores celulares, lo que hace pensar que estas células tienen el potencial de constituir en sí mismas al generador de pulsos de la GnRH del hipotálamo.

Por otro lado la inyección de células GT<sub>1</sub> en el cerebro de ratones hipogonádicos que carecen del gen de la GnRH, revierte el fenotipo ya que las células extienden neuritas hacia la eminencia media y este tratamiento promueve el crecimiento de las gónadas (Silverman *et al.*, 1992)

Un número muy grande de neuromediadores se encuentran involucrados en la regulación de la secreción de la GnRH *in vivo* (Kordon *et al.*, 1994), y en el caso de las células GT<sub>1</sub> la secreción de la GnRH también es modulada por gran número de neurotransmisores. Por ejemplo, la secreción aumenta al tratar a las células con noradrenalina, la cual al parecer actúa a través de receptores  $\beta_1$ -

adrenérgicos acoplados positivamente a la adenilato ciclasa (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992b). La dopamina lo hace a través de receptores D<sub>1</sub> también acoplados a la formación de AMP cíclico (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992c). Otros neurotransmisores como las endotelinas (Krsmanovic *et al.*, 1991), la histamina (Hol, 1994; Noris *et al.*, 1995) e incluso la misma GnRH (Krsmanovic *et al.*, 1993) parecen actuar a través de receptores que promueven el aumento de la concentración intracitoplasmática de calcio, probablemente al activar la vía de señalización de la hidrólisis de fosfolípidos de inositol. Finalmente los aminoácidos neurotransmisores como el glutamato (Mahachoklertwattana *et al.*, 1994) y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994; Hales *et al.*, 1994) también modulan la secreción de la GnRH en las neuronas GT<sub>1</sub>, al parecer al modular el potencial de membrana.

Por todo lo antes mencionado, parece claro que las neuronas de las líneas celulares GT<sub>1</sub> son un buen modelo para estudiar diversos aspectos de la biología de las neuronas GnRHérgicas. Sin embargo no hay que perder de vista que este tipo de estudios representan una enorme simplificación de un sistema muy complejo, en el cual la interacción de las neuronas secretoras de la GnRH con otros elementos del sistema nervioso no existe. Además por el hecho de ser células transformadas no se puede descartar la posibilidad de que las neuronas GT<sub>1</sub> no expresen receptores que normalmente se expresan en las neuronas GnRHérgicas *in vivo*, ni que expresen receptores que las neuronas normales no expresan.

### **La histamina como transmisor neuroendócrino: Receptores para histamina.**

La histamina es una amina biogénica que se sintetiza a partir de la histidina gracias a la acción de la descarboxilasa de histidina y puede ser catabolizada por la acción de dos enzimas, la histamina-N-metiltransferasa o la diamino oxidasa (Beaven *et al.*, 1976).

La histamina se encuentra en células cebadas en casi todos los tejidos y su papel como mediadora de la inflamación, como reguladora de la secreción gástrica y de la contracción del músculo liso han hecho que sea considerada como una hormona local o autacoide (Hill, 1990). Más recientemente se ha encontrado que la histamina cumple con los requisitos necesarios para que sea

considerada un neurotransmisor. Así, se ha visto que la histamina se encuentra en el cerebro, específicamente en gránulos de secreción de algunas neuronas, las cuales contienen a la enzima necesaria para sintetizarla. En el cerebro la secreción de histamina puede ser provocada por despolarizaciones y la secreción es dependiente de calcio (Timmerman, 1989; Schwartz *et al.*, 1991).

Igualmente importante para el establecimiento del papel de la histamina como un neurotransmisor fue la demostración de la presencia de tres subtipos de receptores para histamina en el cerebro, y el hecho de que las neuronas con estos receptores responden a la histamina modificando la secreción de sus neurotransmisores así como sus potenciales de membrana (Timmerman, 1989; Schwartz *et al.*, 1991). Además se ha observado que la secreción de un gran número de hormonas hipofisarias se ve afectada por la histamina intracerebral (Knigge y Warberg., 1991a, 1991b; Donoso y Alvarez., 1984)

La histamina sintetizada intracitoplasmáticamente parece que podría tener un papel en el control de la proliferación celular (un efecto muy poco estudiado) (Hill, 1990), mientras que la histamina secretada se une al menos a tres receptores específicos diferentes denominados H1, H2 y H3, activando varias señales intracelulares entre las que se encuentran: la movilización de calcio, la producción de AMP cíclico, la activación de proteín-quinasas y la modulación de la actividad de canales iónicos (Hill, 1991a). La clasificación de los subtipos de receptores para la histamina se basa en diferencias farmacológicas, ya que cada uno de los subtipos se une a distintos agonistas y antagonistas. Sin embargo, también parece existir una diferencia funcional que coincide con la clasificación farmacológica (Timmerman *et al.*, 1989; Haaksma *et al.*, 1990; Hill, 1990; Parsons *et al.*, 1991; Mitsuhashi *et al.*, 1992)

**Los receptores para histamina del subtipo H1** se han caracterizado como los receptores sobre los cuales actúan los antihistamínicos clásicos (utilizados para combatir alergias) como la difenidramina, la mepiramina, la triprolidina y la clorfeniramina. Hasta la fecha no se cuenta con un agonista muy potente y selectivo, siendo el mejor candidato la 2-tiazoliletilamina (Haaksma *et al.*, 1990; Hill, 1990). Estos receptores son glicoproteínas que pertenecen a la familia de receptores de 7 asas transmembranales (Fujimoto *et al.*, 1993) que se encuentran acoplados a la hidrólisis de fosfolípidos de inositol, la cual provoca movilización del calcio citoplasmático (Hill, 1991a). Median respuestas funcionales en muchos tejidos, tales como la contracción del músculo liso,

incremento en la permeabilidad vascular, glicógenolisis en el cerebro y liberación de hormonas hipofisarias y de la glándula suprarrenal (Hill, 1990; Haaksma et al., 1990; Parsons, 1991; Hill, 1991b.; Mitsuhashi y Payan, 1992). En el cerebro los receptores H1 median respuestas electrofisiológicas excitadoras provocando despolarizaciones, probablemente al influir en canales dependientes de voltaje mediante la translocación de calcio (Schwartz *et al.*, 1991).

**Los receptores para histamina del subtipo H2** se caracterizaron inicialmente con el antagonista burinamida, que después resultó ser mucho más potente como antagonista de los receptores H3 (Black *et al.*, 1972;). De la burinamida se derivaron otros antagonistas selectivos como la metiamida y la cimetidina. Esta última resultó muy útil para tratar padecimientos relacionados con secreciones gástricas excesivas (úlceras), lo que impulsó al desarrollo de más antagonistas como la ranitidina, la famotidina y la nizatidina entre muchos otros. El primer agonista descrito para estos receptores fue la 4-metilhistamina, que es poco potente. La impromidina (que resultó ser un antagonista H3) y el dimaprit son más potentes, siendo el último muy selectivo (Hill 1990; Haaksma et al., 1990; Parsons, 1991; Hill, 1991b; Mitsuhashi y Payan, 1992). Los receptores H2 son glicoproteínas, con 7 dominios transmembranales, acopladas a la adenilato ciclase mediante una proteína  $G_s$ , por lo que transducen las señales que reciben mediante el sistema de segundos mensajeros del AMP cíclico (Hill, 1991a). Están implicados en funciones tales como: la secreción gástrica, la contracción cardíaca a través de efectos ionotrópicos y cronotrópicos, el relajamiento de algunos músculos lisos y la inhibición de las funciones de algunos linfocitos (Hill, 1990 y 1991b; Parsons, 1991). En el nivel neuronal los receptores para histamina del subtipo H2 parecen mediar efectos depresivos, pues inhiben los disparos de potenciales de acción al provocar hiperpolarizaciones. Sin embargo, también provocan una abreviación de las posthiperpolarizaciones, lo que resulta en una potenciación de señales excitadoras como las despolarizaciones inducidas por aminoácidos excitadores (Schwartz *et al.*, 1991).

**Los receptores del subtipo H3** fueron propuestos originalmente para explicar los efectos que la histamina tiene sobre su propia secreción en el cerebro, por lo que son considerados como receptores presinápticos. La farmacología de este efecto discrepaba con la farmacología conocida para los

otros dos subtipos de receptores, pues tanto agonistas como antagonistas de los otros receptores aquí se comportaban como antagonistas, algunos muy potentemente (Hill, 1990). Un agonista selectivo de estos receptores es la R- $\alpha$ -metilhistamina y la tioperamida es un antagonista selectivo (Haaksma *et al.*, 1990). En general se puede decir que los enantiómeros que corresponden a la configuración S de la L-histidina se unen preferentemente a los receptores H3, mientras que los enantiómeros correspondientes a la D-histidina son más potentes en los receptores H2, por otro lado el receptor H1 no es estereoselectivo (Schwartz *et al.*, 1991). El sistema efector de los receptores H3 aún no se conoce pero se cree que una proteína G está involucrada y algunos candidatos son, la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, la activación de canales de potasio y la inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje (Hill, 1991b). La acción mejor establecida de los receptores H3 es la inhibición presináptica de la liberación de varios neurotransmisores como: la misma histamina, la serotonina y la norepinefrina en el sistema nervioso central, así como de la acetilcolina la norepinefrina y algunos neuropéptidos en el sistema nervioso periférico. Estas acciones pueden deberse a la restricción del influjo de calcio, posiblemente debido a cambios en la fosforilación de canales iónicos.(Haaksma *et al.*, 1990; Hill, 1990; Schwartz *et al.*, 1991) Finalmente, en las neuronas así como en alguno tejidos periféricos no neurales la síntesis de histamina es inhibida por la estimulación de los receptores H3 (Hill, 1990).

## ANTECEDENTES.

### **Evidencias anatómicas que apuntan hacia una posible participación de la histamina en la regulación de la secreción de la GnRH.**

La histamina se encuentra en altas concentraciones en el hipotálamo, sobretodo en la eminencia media y los núcleos arcuatos, supraquiasmáticos y mamilares (Brownstein *et al.*, 1974). Aunque se han encontrado células cebadas en la eminencia media (Pollard *et al.*, 1976), es claro que una buena parte de la histamina en ella proviene de neuronas capaces de producirla pues contienen la enzima descarboxilasa de L-histidina. Los cuerpos celulares de las neuronas histaminérgicas se encuentran en la región posterolateral del hipotálamo, mientras que las fibras histaminérgicas abundan en el hipotálamo mediodorsal y en el área preóptica, zonas donde se sintetizan las hormonas liberadoras

hipofisiotrópicas. También se han observado un gran número de terminales nerviosas que contienen histamina en las regiones donde las hormonas liberadoras hipotalámicas son secretadas hacia los vasos portales (Wilcox *et al.*, 1982; Panula *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 1984; Silverman *et al.*, 1988; Inagaki *et al.*, 1988; Panula *et al.*, 1989). Gracias a estos datos es posible pensar que exista un sustrato anatómico para que se de una regulación histaminérgica de la secreción de la GnRH.

Hasta la fecha no hay reportes de experimentos en los cuales se demuestre específicamente que las neuronas GnRHérgicas poseen receptores para histamina o bien a la enzima que la degrada, la histamina metiltransferasa. De igual manera no se ha demostrado que exista una sinapsis de una neurona histaminérgica hacia una GnRHérgica, probablemente debido a que las neuronas histaminérgicas proyectan fibras de apariencia varicosa que establecen pocos contactos sinápticos clásicos con otras neuronas y al escaso número de neuronas GnRHérgicas.

### **Mediciones de cambios en la secreción de la GnRH como respuesta a la manipulación de la concentración de histamina.**

En 1955 Sawyer fue el primero en demostrar que la administración intracerebro-ventricular de histamina estimula al eje reproductivo pues induce ovulación en conejas estrogenizadas. También se encontró que la administración intracerebro-ventricular de histamina facilita la secreción de la hormona luteinizante en ratas ovariectomizadas y estrogenizadas (Libertum *et al.*, 1976) así como en ratas en proestro (Donoso *et al.*, 1978) y que la inoculación de una sustancia inhibidora de la síntesis de histamina directamente en el hipotálamo inhibe la secreción de LH a la sangre periférica (Horno *et al.*, 1989). En los trabajos antes mencionados se demostró que la administración intravenosa de histamina no tiene este efecto y dado que la histamina no atraviesa la barrera hemato-encefálica, es claro que el efecto facilitador de la secreción de LH no se da a nivel de la hipófisis sino a nivel central. Lo anterior fue comprobado por Miyake (Miyake *et al.*, 1987), quien administró histamina a adenohipófisis en cultivo sin encontrar facilitación de la secreción de LH. También demostró el efecto facilitador central de la histamina sobre la secreción de la GnRH en explantes de hipotálamo mediobasal obtenido de ratas .

Se ha observado que en ovejas ovariectomizadas la administración de antagonistas del receptor para histamina del subtipo H1 deprime los niveles basales así como los estimulados por la administración de estrógenos, de la LH en la circulación (Van Kirk, 1989). Por otro lado también se encontró que la estimulación que la histamina ejerce sobre la secreción de la GnRH a partir de explantes de hipotálamo mediobasal en cultivo, se reproduce con agonistas y se bloquea con antagonistas selectivos de los receptores H1 (Miyake, 1987). Estos resultados hacen pensar que es el receptor del subtipo H1 el que se encuentra involucrado en este efecto de la histamina. Sin embargo otros trabajos implican al receptor H2 (Donoso *et al.*, 1983), pues se ha demostrado que la facilitación de la secreción de LH mediada por histamina en ratas es mimetizada por un agonista de estos receptores. Este conflicto vá aún mas lejos, pues se encontró que la estimulación estrogénica de la secreción de la LH en la rata es bloqueada por la administración en conjunto de antagonistas de receptores para histamina de los subtipos H1 y H2, mas no por la administración de cada uno de ellos por separado (Horno *et al.*, 1989).

Aunque la participación de la histamina en la facilitación de la secreción de la GnRH es muy clara, hasta la fecha ningún trabajo ha discernido si dicha acción es directa sobre las neuronas GnRHérgicas o indirecta. Por eso y dado que existe controversia en los resultados que intentan discernir el tipo de receptor que media esta función, en nuestro laboratorio decidimos estudiar el efecto que la histamina tiene sobre la secreción de GnRH en las células GT<sub>1</sub> y el tipo de receptor involucrado.

## HIPOTESIS.

Los antecedentes antes mencionados indican claramente que la histamina está involucrada en la regulación central de la secreción de la GnRH, más específicamente en la facilitación de dicha secreción. Estos datos podrían explicarse planteando la hipótesis de que **la histamina puede estimular al eje reproductivo vía una acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas**. Algunos resultados farmacológicos y bioquímicos de nuestro grupo de trabajo refuerzan esta idea y además nos han hecho pensar que el receptor involucrado pertenece al subtipo H1 (ver discusión).

La hipótesis particular de este estudio fue que **las neuronas GnRHérgicas tienen receptores para histamina** a través de los cuales se estimula la secreción de la GnRH. Una predicción que se desprende de esta hipótesis, y cuya comprobación es el objetivo de este trabajo, consiste en plantear que **las células GT<sub>1-1</sub>, que al parecer son un buen modelo de neuronas GnRHérgicas, expresan receptores para histamina del subtipo H1**.

## OBJETIVO.

Para sustentar la hipótesis antes mencionada, decidimos **estandarizar una metodología que nos permitiese caracterizar de manera directa la existencia de receptores para histamina del subtipo H1 en células GT<sub>1-1</sub>**. Existen varias formas posibles para demostrar la presencia de dichos receptores en las células, por ejemplo podrían utilizarse anticuerpos dirigidos específicamente contra el receptor H1 y con ellos intentar inmunoprecipitar al receptor o bien teñir a las células con estos anticuerpos marcados fluorescentemente. Sin embargo estos anticuerpos no se encuentran disponibles comercialmente y producirlos implicaría demasiado tiempo y esfuerzo que no es necesario invertir pues existen otros métodos más sencillos para la detección del receptor. Otra opción que consideramos muy seriamente fue la determinación de la presencia, en las células, del RNA mensajero que codifica al receptor. El gen de este receptor ya fue clonado por Fujimoto (Fujimoto *et al.*, 1993) a quien le solicitamos el cDNA para poder utilizarlo como sonda en un ensayo de "Northern Blot". Sin embargo este investigador se mostró reticente a compartir con nosotros este material. Elegimos hacer

estudios de unión de un ligando radioactivo selectivo de receptores para histamina del subtipo H1. Esto por ser una técnica sencilla y previamente caracterizada en la literatura como apta para determinar la presencia de dichos receptores.

## MATERIAL Y METODOS.

### Reactivos.

La mepiramina, triprolidina y ranitidina las adquirimos de Research Biochemicals Inc. (Natick, MA, USA.). El compuesto radioisotópico  $^3\text{H}$ -mepiramina fue adquirido en Amersham (Little Chalfont, UK, USA.). En Sigma (ST. Luis, MO, USA.) obtuvimos el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), la aprotinina y la albúmina de suero bovino (BSA). Los medios de cultivo: Dulbecco con solución salina modificada de Eagle (DMEM) y Opti-MEM, así como el suero fetal bovino, la solución amortiguadora de fosfatos (PBS), la solución salina balanceada de Hank (HBSS), la tripsina-EDTA y la penicilina/estreptomicina, fueron adquiridas en Gibco (Grand Island, NY, USA.). El azul de Coomassie G-250 lo obtuvimos de Bio-Rad (Richmond, CA, USA.). El ácido fosfórico y el etanol fueron de Merck (Naucalpan de Juárez, Edo. de México, MX.)

### Cultivo celular.

Las células GT<sub>1-1</sub> fueron donadas por el Dr. Richard Weiner de la Universidad de California en San Francisco. A esta línea celular la mantuvimos congelada (en nitrógeno líquido) en tubos de 1 ml. con un medio suplementado con dimetil sulfóxido, el cual evita que se formen cristales de agua muy grandes, previniendo así que las membranas de las células se rompan por dichos cristales al congelarlas. Cuando fue requerido expandir el cultivo para tener suficientes células con las cuales trabajar, descongelamos a las células sumergiendo el tubo que las contenía en un baño a 37°C y vertimos el contenido directamente sobre una caja de petri de 100 mm. de diámetro (Costar Corporation, Cambridge, MA, USA.), la cual contenía 10 ml. de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 U/ml. de penicilina/estreptomicina. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, cambiando el medio cada 3-4 días hasta que

las células alcanzaron confluencia. En esos momentos las células, que se adhieren al fondo, han llenado la caja y para que siguieran creciendo fue necesario dividir los cultivos.

Para subcultivar a las células, éstas fueron despegadas de la caja petri cambiando el medio por 5 ml. HBSS que contenía 0.05% de tripsina y 0.53 mM de EDTA. La suspensión de células fue transferida a un tubo de centrifuga y añadimos 5 ml. de medio con suero, pues el suero contiene inhibidores de la tripsina, si la tripsina siguiese actuando mataría a las células. Centrifugamos la suspensión a 1500 r.p.m. en una centrifuga clínica durante 5 min. Retiramos el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 100 ml. de DMEM y sembradas en 10 cajas petri.

Cuando tuvimos alrededor de 40 cajas y las células alcanzaron entre 60 y 80% de confluencia, el medio de cultivo fue cambiado por Opti-MEM libre de suero, al no tener suero estas células dejan de dividirse y se diferencian, adquiriendo un fenotipo más neuronal, pues comienzan a extender neuritas. Las células fueron incubadas en este medio por un día y con ellas se prepararon membranas para los ensayos de pegado.

### **Preparación de Membranas.**

Utilizamos una preparación o extracto de las membranas de las células para determinar si las células GT<sub>1,1</sub> tienen receptores para histamina del subtipo H1 en su membrana. Hicimos una preparación muy cruda en la que solo separamos al citoplasma de todos los demás componentes, y utilizamos todos esos componentes para determinar si existían en ellos sitios de unión específicos para ligandos de receptores del subtipo H1. Obtuvimos la preparación cruda de membranas de células GT<sub>1,1</sub> haciendo ligeras modificaciones de la técnica utilizada por Inagaki (Inagaki *et al.*, 1989) para obtener membranas y hacer estudios de pegado de <sup>3</sup>H-mepiramina en cultivos primarios de astrocitos.

A cada caja petri con células GT<sub>1,1</sub> confluentes y que habían estado durante un día en medio sin suero le retiramos el medio y le agregamos 2 ml. de PBS frío suplementado con los inhibidores de proteasas PMSF (1 mM.) y aprotinina (0.1 unidades inhibitoras de tripsina/ml). Las cajas fueron guardadas a 4°C durante 10 min. y fueron raspadas con un gendarme de plástico (Costar). La suspensión celular de 20 cajas petri fue puesta en un tubo de centrifuga y

centrifugada a 1500-2000 r.p.m. durante 5 min. en la centrifuga clínica, las células fueron resuspendidas en 10 ml. de PBS frío con los inhibidores de proteasas y fueron lisadas por sonicación dando 3 pulsos de 5 seg. en el nivel 2 de un sonicador B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA.). El lisado fue centrifugado a 100,000 X g. (40,000 r.p.m. en el rotor 90 Ti) durante 1 hr. a 4°C en la ultracentrifuga Beckman XL-90 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA.). Retiramos el sobrenadante y el sedimento fue lavado con 1 ml. de PBS con los inhibidores de proteasas y finalmente el sedimento fue resuspendido en 2 ml. de la misma solución con la ayuda de un homogeneizador. Guardamos el lisado congelado a -70°C hasta hacer el ensayo de pegado. Una pequeña alícuota fue separada para hacer la determinación de la concentración de proteínas.

### **Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford.**

Al hacer los experimentos de unión con un ligando radioactivo necesitábamos conocer la cantidad de material celular que utilizábamos, con el objeto de poder expresar la cantidad de sitios de unión que existen por unidad de material celular, así como para poder estandarizar la técnica y encontrar reproducibilidad entre ensayos independientes. Determinamos la cantidad de material celular midiendo la cantidad de proteínas en el homogeneizado, utilizamos para ello la técnica de Bradford. Tomamos una pequeña muestra del lisado e hicimos diluciones 1:2 1:10 y 1:20 en H<sub>2</sub>O. A 10 µl. de dichas diluciones o al lisado sin diluir les agregamos 10 µl. de NaOH 1 N y las incubamos a temperatura ambiente durante una noche. Al día siguiente agregamos 80 µl. de H<sub>2</sub>O y 1 ml. de reactivo de Bradford (0.01% azul de Coomassie G-250, 4.7% etanol, 8.5% ácido fosfórico). Medimos la densidad óptica a 590 nm. en un espectrofotómetro. Paralelamente hicimos una curva patrón, con concentraciones variantes BSA, sobre la cual interpolamos la densidad óptica de las muestras problema para deducir la concentración de proteínas en éstas. El rendimiento de nuestra preparación de membranas fue en términos generales de 1 mg de proteína por cada caja petri de 100 mm. de diámetro, así la concentración final de nuestra preparación se encontraba alrededor de 15 mg de proteína por mililitro. De este homogenado tomamos 70 µl. para cada tubo de los ensayos de pegado lo que contenía alrededor de 1 mg de proteína.

## Estudio de Unión con un Radioligando.

Estos ensayos, a grandes rasgos, consistieron en incubar el extracto membranal con un ligando radioactivo específico de los receptores para histamina del subtipo H1. Después el ligando unido a las membranas se separó del no unido mediante filtración y se cuantificó la cantidad de radioligando unido. La especificidad de esta unión se verificó al desplazar al radioligando con ligandos no radioactivos para el receptor.

Curva de Saturación.- En tubos de 12 X 7 mm. pusimos: 0.5-1 mg de proteínas de la preparación membranal en presencia o ausencia de mepiramina 1 mM. y distintas concentraciones (2-50 nM.) de  $^3\text{H}$ -mepiramina, aforamos a 0.5 ml. con PBS suplementado con BSA al 0.1%. La mezcla se incubó durante 60 min. a 25°C y la reacción se paró agregando 4 ml. de PBS+BSA frío y filtrando inmediatamente al vacío a través de una membrana de fibra de vidrio GF/C (Whatman, Maidstone, UK, USA.). Los filtros fueron lavados tres veces con 4 ml. de PBS+BSA frío y fueron puestos en un frasco de centelleo, donde se dejaron secar toda la noche. Agregamos a cada frasco 10 ml. de líquido de centelleo 3a70B (Research Products International Corp., Mount Prospect, IL, USA.) y determinamos la radioactividad atrapada en los filtros por espectroscopía de centelleo. La lectura obtenida de los tubos que contenían 1 mM. de mepiramina fría correspondió al pegado inespecífico de  $^3\text{H}$ -mepiramina. Mientras que la lectura de los tubos sin mepiramina fría correspondió al pegado total. La resta del pegado total menos el pegado inespecífico, fue igual al pegado específico. Con los resultados de este experimento hicimos una gráfica de saturación en la cual fue graficada la cantidad de mepiramina tritiada unida específicamente a las membranas como función de la cantidad de  $^3\text{H}$ -mepiramina adicionada. Lo que se espera es observar que la curva en un principio aumente, es decir mientras más  $^3\text{H}$ -mepiramina se adicione mas  $^3\text{H}$ -mepiramina se unirá a las membranas, pero llegará el momento en el que todos los receptores hayan unido  $^3\text{H}$ -mepiramina, es decir se hallan saturados, en ese momento por mas  $^3\text{H}$ -mepiramina que adicionemos ya no veremos unión específica de ésta a las membranas, y la curva adquirirá una pendiente igual a cero, es decir será paralela al eje de las abscisas.

El análisis de Scatchard es una transformación matemática de la curva de saturación. Consiste en graficar en el eje de las ordenadas el cociente de la cantidad de ligando unido entre la cantidad de ligando no unido y en el eje de

las abscisas la cantidad de ligando unido. Así transformamos a la curva en una recta de pendiente negativa. La intersección de esta recta con las abscisas equivale al número de receptores y el inverso de la pendiente nos da una idea de la afinidad entre el ligando y el receptor.

Curvas de Competencia.- En estos experimentos lo que se trató de hacer fue desplazar una cierta cantidad de  $^3\text{H}$ -mepiramina unida a las membranas con concentraciones crecientes de distintos ligandos no radioactivos. Lo que esperamos es que aquellos ligandos que se unen al mismo receptor que el ligando marcado, sean eficientes en desplazarlo mientras que los ligandos específicos para otros receptores no desplazarán a la marca. En tubos de 12 X 7 mm. pusimos: 0.5-1 mg de proteínas de la preparación membranal, 3 nM. de  $^3\text{H}$ -mepiramina y concentraciones crecientes de antagonistas histaminérgicos. La reacción fue incubada y detenida como en los experimentos de saturación. Expresamos la unión como porcentaje de la unión específica en ausencia de competidores.

## RESULTADOS.

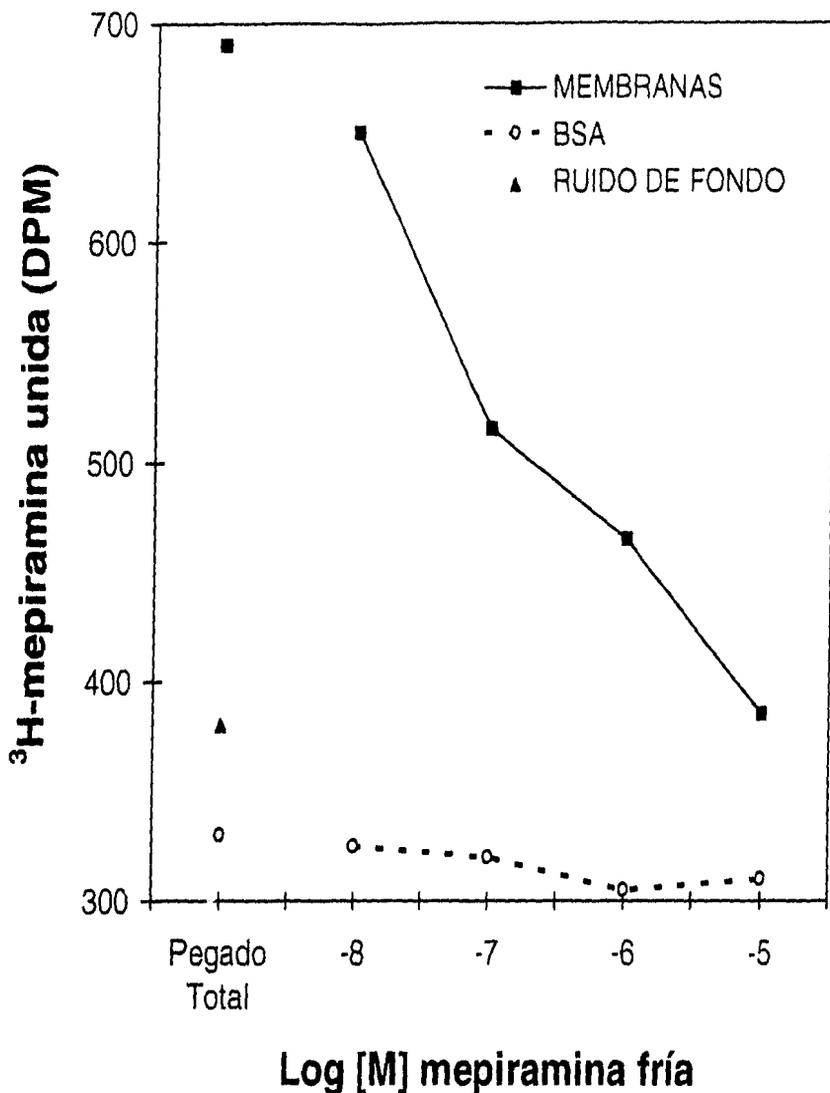
### Estandarización de la Técnica.

Esta metodología ha sido ampliamente reportada en la literatura, sin embargo cada sistema necesita que se le hagan adaptaciones. El primer paso a seguir consistió en determinar la cantidad de membranas que debían ser utilizadas en los ensayos, para este propósito se diseñó un experimento que consistió en incubar distintas cantidades de proteína membranal con 3 nM de  $^3\text{H}$ -Mepiramina en presencia o ausencia de un exceso (10  $\mu\text{M}$ ) de mepiramina no marcada radioactivamente. Se decidió utilizar una concentración de 3 nM de  $^3\text{H}$ -Mepiramina porque en uno de los reportes en los que se describe esta técnica se menciona que esta concentración es adecuada para hacer los ensayos de unión, pues se encuentra cercana a la constante de afinidad (Kd) entre la mepiramina y los receptores para histamina del subtipo H1 (Inagaki *et al.*, 1989). Como resultado de este experimento encontramos que al utilizar entre 1 y 0.6 mg. de proteína membranal eramos capaces de encontrar una diferencia sustancial entre el pegado total y el pegado inespecífico, es decir el pegado específico era alto, del 45-50% del pegado total (Tabla 1). Cuando utilizamos cantidades mayores de proteína (2.5-4 mg.) los filtros se taparon, y con las cantidades menores de 0.3 mg. de proteína el pegado específico no era muy grande. Este experimento se realizó dejando que el tiempo de incubación fuese de 60 min.; esta duración ha sido reportada como más que suficiente para que se alcance el equilibrio de unión entre la mepiramina y el receptor H1 incluso con concentraciones muy pequeñas de mepiramina (Inagaki *et al.*, 1989), no obstante, este experimento se repitió pero esta vez algunas de las replicas se incubaron por hasta 2½ horas y no encontramos que el porcentaje de unión específica se modificase. Estos dos experimentos los realizamos utilizando como amortiguador PBS ya que se ha reportado que este ensayo se lleva a cabo con amortiguadores de pH neutro y no se ha reportado que se necesite de algún cofactor especial para la unión. Utilizamos en un principio PBS por ser el mismo amortiguador con el que se extrajeron las membranas. La temperatura de incubación utilizada fue la temperatura ambiente y dado que se obtuvo un pegado específico adecuado no consideramos necesario modificar este parámetro.

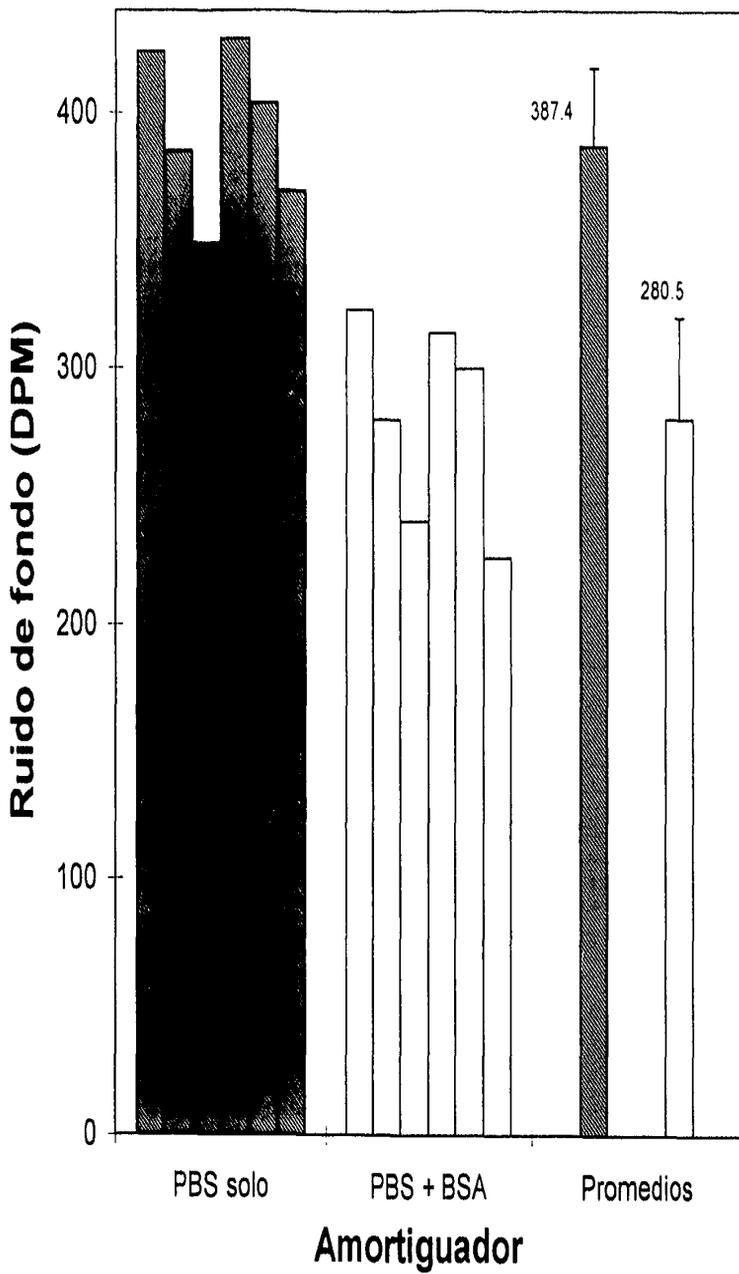
Tabla 1. Determinación de la cantidad de pegado específico como función de la cantidad de proteína utilizada en el ensayo de unión de  $^3\text{H}$ -mepiramina.

mg. de proteína	Resultado (% de pegado específico)
4	Se tapó el filtro
2.5	Se tapó el filtro
1	50 %
0.6	45 %
0.3	< 20 %

Para verificar que la unión específica de la  $^3\text{H}$ -mepiramina que observamos fuese realmente con la preparación membranal se decidió hacer un experimento de competencia en el cual se incubo 1 mg. de proteínas membranales con 3 nM de  $^3\text{H}$ -mepiramina y concentraciones crecientes de mepiramina fría, paralelamente se realizó otra curva en la cual en lugar de las membranas se adiciono BSA. Encontramos que el pegado de la  $^3\text{H}$ -mepiramina a las membranas se desplazaba de manera dependiente de la dosis de mepiramina fría adicionada (fig. 1). En las muestras que no contenían membranas no se observo ningún pegado específico que pudiese ser desplazado, esto se comprobó cuando se hicieron las curvas de saturación, en este caso aunque se aumentase la concentración de  $^3\text{H}$ -mepiramina, el ruido de fondo (pegado de  $^3\text{H}$ -mepiramina al filtro en ausencia de membranas y mepiramina fría) prácticamente no aumentó (datos no mostrados). En este experimento nos percatamos que el echo de adicionar BSA podría ser capaz de reducir la cantidad de pegado inespecífico, pues cuando se agrego BSA la unión basal a los filtros, o ruido de fondo disminuyó. Por este motivo se llevo a cabo un experimento en el cual se probó hacer el ensayo utilizando un amortiguador al que se le había adicionado 0.1% de BSA vs. uno ensayo con PBS solo. Observamos una reducción del ruido de fondo (figura 2) lo que tuvo como consecuencia un aumento de alrededor de un 20 % en el pegado



**Figura 1.- La unión de la  $^3\text{H}$ -mepiramina es a las membranas de las células.** 1mg. de proteína de la fracción membranal de células  $\text{GT}_{1,1}$  1mg. de BSA o PBS solo fue incubado con 3 nM de  $^3\text{H}$ -mepiramina y las concentraciones indicadas de mepiramina fría durante 60 min. a  $25^\circ\text{C}$ . Tras la incubación, el ligando unido fue separado del ligando no unido mediante filtración al vacío y fue cuantificado por espectroscopía de centelleo. La unión de  $^3\text{H}$ -mepiramina se expresa como desintegraciones por minuto (DPM). Cada punto representa la media de tres réplicas; en ningún caso el error estandar fué mayor del 10%.



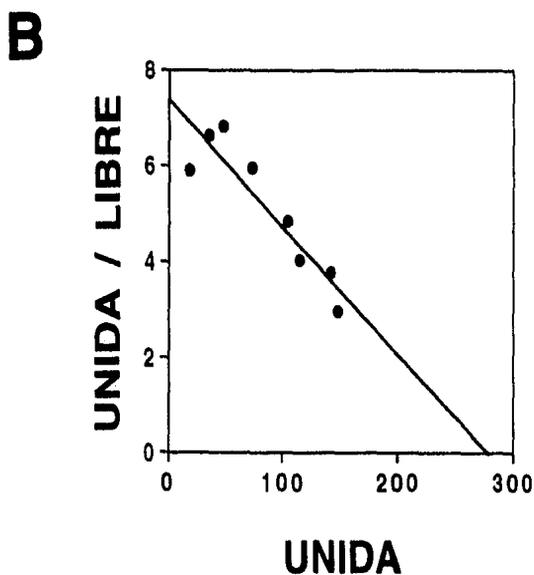
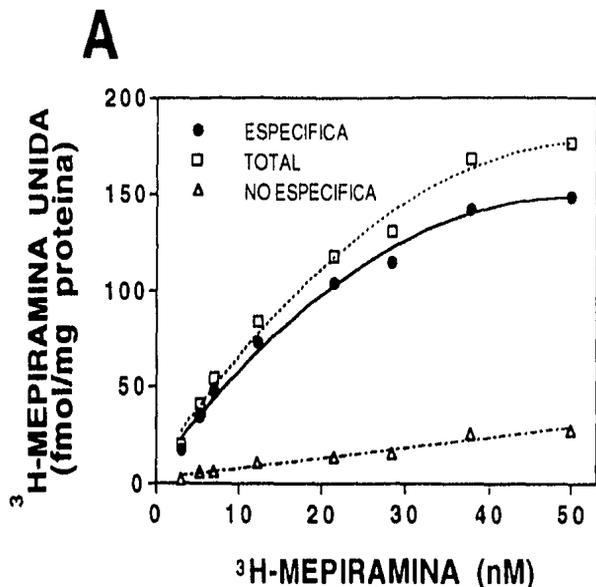
**Figura 2.-** La presencia de BSA en el amortiguador de la incubación reduce el ruido de fondo. Se incubó 3 nM de <sup>3</sup>H-mepiramina en amortiguador (PBS) solo o suplementado con BSA durante 60 min. a 25°C. Después de la incubación la mezcla se filtró al vacío y la radioactividad atrapada en los filtros se cuantificó mediante espectroscopía de centelleo. Se realizaron seis replicas para cada situación experimental las cuales se muestran, así como los promedios de las mismas. Las barras representan la desviación estandard.

especifico; por esa razón todos los experimentos siguientes se llevaron a cabo con PBS al que se le adiciono BSA.

### **Unión de un Ligando Selectivo de Receptores para Histamina del Subtipo H1 a Membranas de Células GT<sub>1,1</sub>: Curva de Saturación y Análisis Tipo Scatchard.**

Para determinar la presencia de receptores para histamina del subtipo H1 en las células GT<sub>1,1</sub>, hicimos experimentos de unión utilizando un ligando radioactivo específico de estos receptores. Incubamos una cierta cantidad de extracto membranal ( $\approx 1$  mg.) con concentraciones crecientes de <sup>3</sup>H-mepiramina, en presencia o ausencia de un exceso de mepiramina fría. Con los resultados de las muestras que contenían mepiramina fría se graficó el pegado inespecífico, la curva de esta gráfica es una recta pues la cantidad de <sup>3</sup>H-mepiramina que se une inespecíficamente a la preparación membranal es directamente proporcional a la cantidad de <sup>3</sup>H-mepiramina adicionada. Con los resultados de las muestras que no tenían mepiramina fría se graficó el pegado total, la curva de esta gráfica tiene en un principio una pendiente mayor que la del pegado inespecífico, pero la pendiente va cambiando hasta que la curva se vuelve paralela a la recta del pegado inespecífico. Cuando restamos estas dos curvas obtuvimos la curva de saturación del pegado específico. Haciendo estas curvas de saturación en las que se empleó <sup>3</sup>H-mepiramina como un ligando específico de los receptores H1 encontramos sitios de unión saturables y específicos en las preparaciones membranales crudas de las células GT<sub>1,1</sub> (figura 3A). Para determinar los parámetros de esta unión, realizamos un análisis tipo Scatchard, en este análisis no se calculó la cantidad de <sup>3</sup>H-mepiramina no unida a las membranas, en su lugar se utilizó la concentración de <sup>3</sup>H-mepiramina adicionada pues se considera que la diferencia entre estos dos parámetros es despreciable ya que la cantidad de <sup>3</sup>H-mepiramina que se une a las membranas es muy pequeña en relación a la cantidad de <sup>3</sup>H-mepiramina adicionada (serca del 1%). El análisis tipo Scatchard mostró un número aparente de 279 fmol. de receptores H1 por mg. de proteína, los cuales presentaron una constante de disociación aparente de 37.8 nM. (figura 3B).

Reportamos la magnitud de estos parámetros como aparente debido a que, aunque se encuentren sitios de unión de mepiramina específicos y saturables en una preparación membranal, la afinidad y el número de



**Figura 3.-** La  $^3\text{H}$ -mepiramina se une a membranas de células GT1-1 de manera específica y saturable, con una  $K_d$  aparente de 37.8 nM y una densidad aparente de 279 fmol/mg de proteína. A) Isotherma de saturación obtenida al incubar 1 mg de proteínas membranales con concentraciones crecientes (2-50 nM) de  $^3\text{H}$ -mepiramina por 60 min a 25°C. La unión no específica se determinó en la presencia de 1 mM. de mepiramina. Tras la incubación, el ligando unido a las membranas se separó del ligando no unido mediante filtración al vacío y se cuantificó por espectroscopía de centelleo. Cada punto representa la media de determinaciones hechas por triplicado. B) Gráfica tipo Scatchard de la unión específica de la  $^3\text{H}$ -mepiramina.

receptores que se describen al hacer análisis de Scatchard varían entre experimentos. Una posible explicación para esto es que el grado de glicosilación de los receptores afecta su afinidad por el ligando. A su vez es posible que el grado de glicosilación dependa del grado de diferenciación de las células, pues esto se ha demostrado en células de músculo liso (Mitsuhashi, 1989). Aunque las células fueron dejadas por una noche en medio sin suero para provocar la diferenciación, probablemente en distintas preparaciones membranales el grado de diferenciación de la células haya sido distinto, provocando así las diferencias en cuanto a la afinidad aparente de los receptores en los distintos experimentos. De igual manera es posible que la cantidad de receptores por célula cambie con el grado de diferenciación. Otra posible explicación es que haya habido diferencias en el grado de fraccionamiento entre una preparación membranal y otra lo cual podría crear distintos entornos membranales alrededor de los receptores y esto afectar la afinidad de los mismos, pues se piensa que la interacción del receptor con otras proteínas, por ejemplo proteínas G, influye en la afinidad de éste por sus ligandos (Hill *et al.*, 1990).

### **Curvas de Competencia.**

Para caracterizar aún más estos sitios de unión realizamos ensayos de competencia en los cuales incubamos  $\approx 1$  mg de proteínas membranales con una cantidad no saturante de  $^3\text{H}$ -mepiramina (3 nM) y las concentraciones indicadas de mepiramina, triprolidina (ambos ligandos de receptores para histamina del subtipo H1) o ranitidina (ligando de receptores para histamina del subtipo H2). Calculamos el porcentaje de unión específica con respecto a las muestras que no contenían ligando competidor, con estos datos se hicieron las gráficas de desplazamiento. El análisis de competencia mostró que la unión de  $^3\text{H}$ -mepiramina puede ser desplazada con ligandos selectivos para receptores H1 como la mepiramina y la triprolidina en concentraciones tres órdenes de magnitud inferiores que las necesarias para lograr el mismo desplazamiento con el ligando selectivo para receptores H2 ranitidina, en otras palabras los ligandos para receptores H1 desplazan a la  $^3\text{H}$ -mepiramina más potentemente que el ligando para receptores H2. Esto es consistente con la idea de que lo que se está marcando radioactivamente en la preparación membranal es un receptor del subtipo H1. (figura. 4).

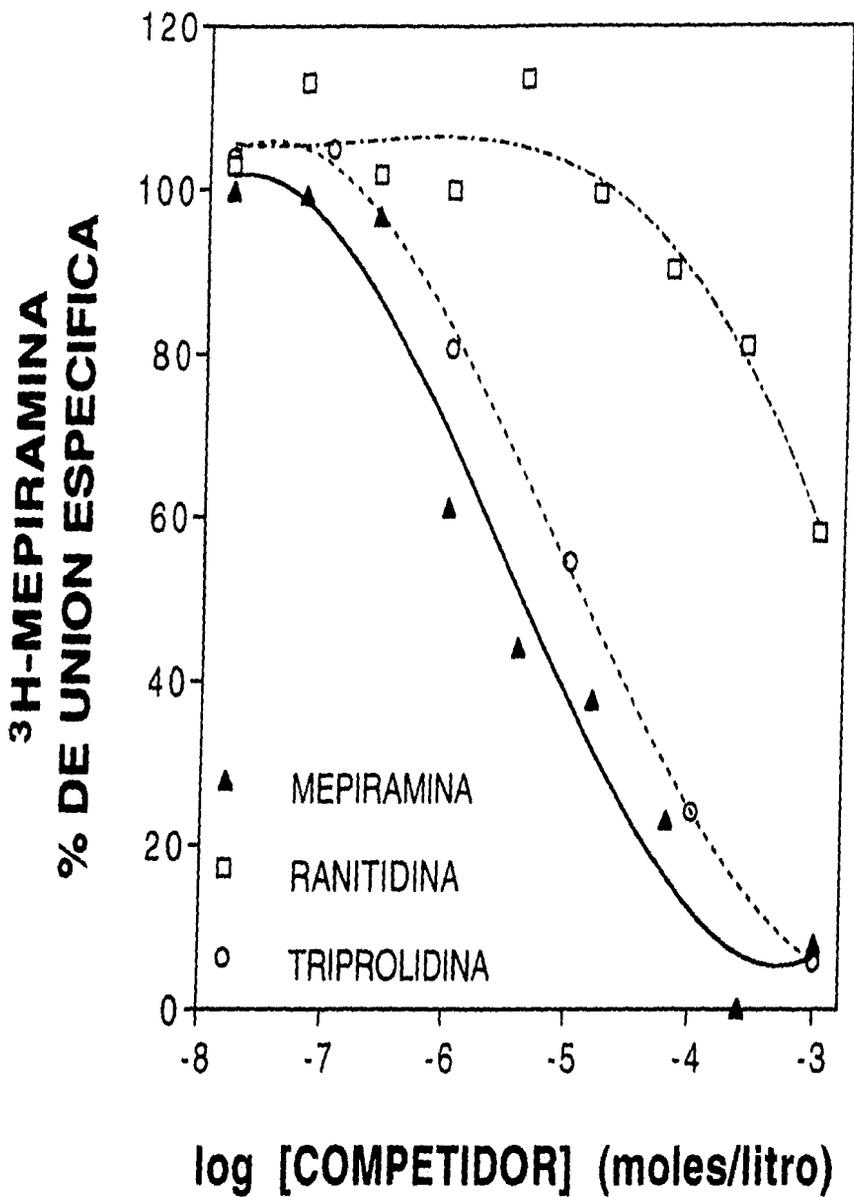


Figura 4.- Los antagonistas de receptores H1 mepiramina y triprolidina desplazan la unión de la  $^3\text{H}$ -mepiramina con una potencia tres órdenes de magnitud mayor que el antagonista de receptores H2 ranitidina. Se incubaron 1 mg de proteína de la fracción membranal de células  $\text{GT}_{1,1}$  con 3 nM de  $^3\text{H}$ -mepiramina y las concentraciones indicadas de los antagonistas. La unión está expresada como porcentaje de la unión específica en ausencia del competidor.

El pequeño desplazamiento que se observa a altas concentraciones de ranitidina puede ser explicado por el hecho de que los antagonistas histaminérgicos no son totalmente específicos para uno u otro receptor, así pues era incluso de esperar este desplazamiento debido a altas concentraciones de ranitidina.

### **Comunicación de los resultados.**

Como resultado de este trabajo fue posible escribir un reporte completo junto con los resultados mencionados en los antecedentes inmediatos, el cual dio lugar a un artículo que se sometió para su publicación y fue aceptado en la revista "Endocrinology Vol. 136 pág. 2697".

### **DISCUSION.**

Existen evidencias de que la histamina es un importante neuroregulador del eje reproductivo. Como se mencionó anteriormente la administración de histamina afecta la secreción de la hormona luteinizante actuando a nivel del sistema nervioso central al facilitar la secreción de la GnRH (Kordon *et al.*, 1994). La administración de histamina intracerebro-ventricular, mas no la intravenosa, provoca la secreción de la LH *in vivo* y de la GnRH *in vitro* a partir de explantes hipotalámicos. Por otra parte el bloqueo central de los receptores para histamina o la inhibición de la síntesis de histamina, tienen como consecuencia una disminución de la secreción de la GnRH y de la LH (Libertum *et al.*, 1976; Donoso *et al.*, 1978; Miyake *et al.*, 1987; Van Kirk *et al.*, 1989; Horno *et al.*, 1989)

Los intentos para elucidar el tipo de receptor involucrado en el efecto facilitador de la secreción de la GnRH debido a la histamina han arrojado resultados conflictivos. Por un lado la administración de antagonistas de receptores del subtipo H1 a ovejitas ovariectomizadas y estrogenizadas reduce la concentración de la LH circulante; asimismo, la estimulación histaminérgica de la secreción de la GnRH de fragmentos de hipotálamo es mimetizada y bloqueada respectivamente, por agonistas y antagonistas de receptores del subtipo H1. Resultados discrepantes con estos son el de que en ratas ovariectomizadas y estrogenizadas se requiere de la administración conjunta de

antagonistas de receptores H1 y H2 para bloquear la secreción de la LH y el de que la administración de agonistas H2 estimulan la secreción. Esto podría deberse a que la regulación de la secreción de la GnRH se da mediante una intrincada red de interneuronas y a que las neuronas histaminérgicas proyectan fibras "varicosas" que establecen pocos contactos sinápticos clásicos con otras neuronas, así la secreción de histamina podría difundir en el cerebro y afectar la actividad de varias neuronas (Russell, 1990; Wada, 1991). Por lo tanto, se puede pensar que la histamina no solo ejerce acciones directamente sobre neuronas GnRHérgicas, sino también en circuitos neuronales aferentes a éstas. Por ejemplo, se ha demostrado que la histamina afecta la secreción hipotalámica de aminas biogénicas, más específicamente, la secreción de noradrenalina por rebanadas de hipotálamo es estimulada por la activación de receptores para histamina del subtipo H2 (Blandina, 1989; Bealer, 1993), aunque hay resultados que discrepan, (Ohtsuka, 1989) y es conocido que estas aminas biogénicas como la dopamina y la norepinefrina están involucradas en la secreción de la GnRH (Kordon, 1994).

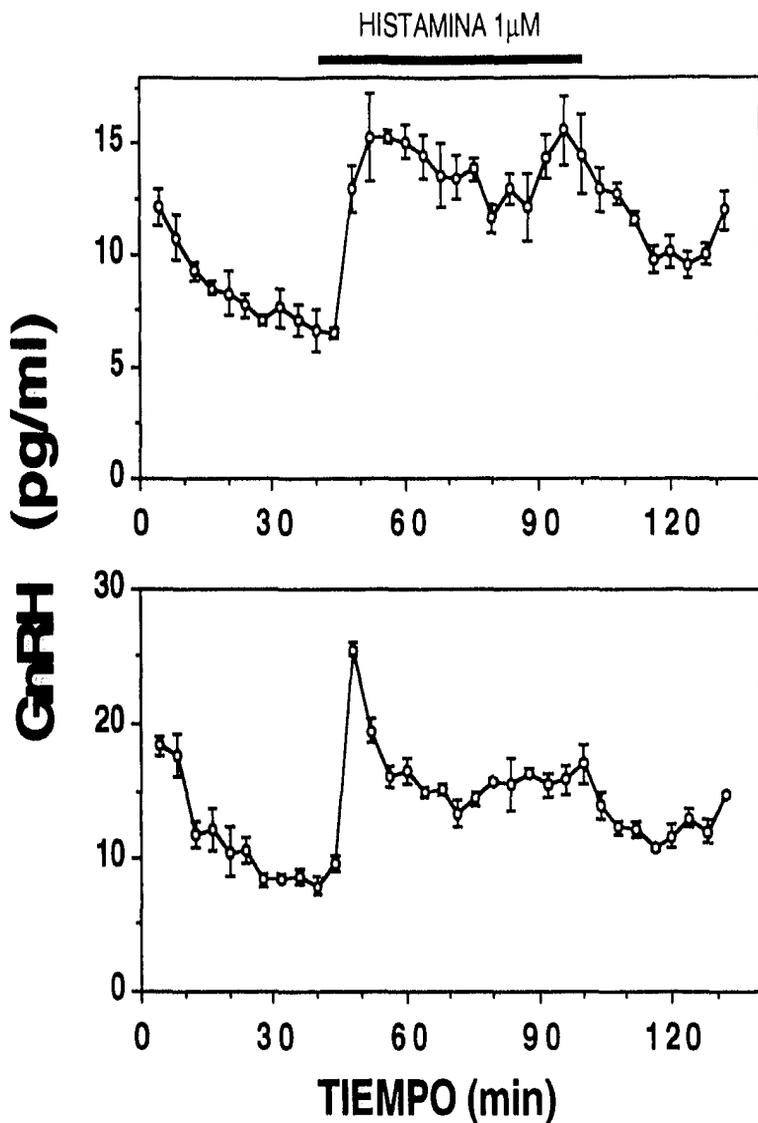
El presente trabajo se realizó para demostrar la presencia de receptores para histamina del subtipo H1 en la línea de neuronas GnRHérgicas GT1-1. Las propiedades de unión del radioligando  $^3\text{H}$ -mepiramina, selectivo de receptores para histamina del subtipo H1, documentan la presencia de estos receptores en estas células neurosecretoras de la GnRH. La afinidad aparente que presentan los receptores H1 de las células GT<sub>1,1</sub> por la mepiramina ( $K_d=37.8$  nM) se encuentra dentro de los intervalos reportados en otros tejidos (Hill, 1990) y el número aparente de receptores que hallamos ( $B_{\text{max}}=279$  fmol/mg. de proteína) es muy similar al previamente reportado en astrocitos y en preparaciones de membranas de corteza cerebral (Inagaki, 1989). Como se menciona anteriormente los ligandos de receptores para histamina no son del todo selectivos entre los distintos subtipos de dichos receptores, por lo que para discernir con mayor certidumbre el tipo de receptor que se estaba marcando con la  $^3\text{H}$ -mepiramina se realizaron ensayos de competencia, los cuales dieron como resultado que los ligandos que se ha descrito como mas selectivos de los receptores H1 fueron capaces de desplazar la marca radioactiva con una potencia tres ordenes de magnitud mayor que un ligando que se considera mas selectivo de los receptores H2. Estos resultados son consistentes con los resultados farmacológicos en los que se midió la secreción de la GnRH y la producción de fosfatos de inositol como respuesta a la administración de histamina en

presencia de antagonistas selectivos para los distintos subtipos de receptores para histamina.

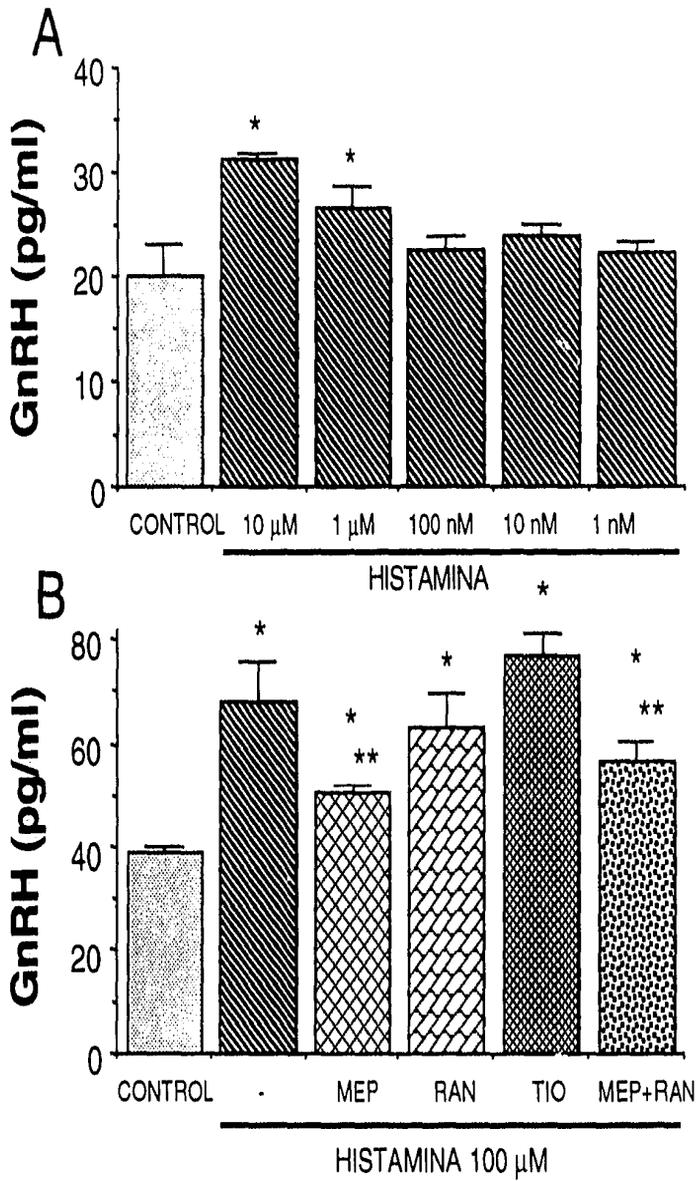
Los resultados a los que me he referido fueron obtenidos por nuestro grupo de trabajo. Una presentación preliminar de ellos se hizo en la 76ª reunión anual de la Sociedad de Endocrinología de EE.UU. y un muy detallado reporte fue hecho por Dirk Hol en 1994, en su tesis de licenciatura. A continuación hago una breve descripción de los mismos.

**Facilitación de la secreción de la GnRH de células  $GT_{1,1}$  por la administración de histamina.** Con el propósito de analizar si las neuronas GnRHérgicas expresan receptores para histamina gracias a los cuales se pueda modular directamente la secreción de la GnRH, se hicieron experimentos en los cuales la células  $GT_{1,1}$  fueron perfundidas con histamina y la GnRH secretada al medio de cultivo fue monitoreada mediante un radioinmunoensayo. Justo después de la infusión de histamina observamos un rápido aumento en la concentración de la GnRH en el medio de incubación y la concentración de GnRH en el medio se mantuvo elevada mientras la histamina estuvo presente. Cuando se suspendió la infusión de histamina, se observó un rápido descenso de la secreción de la GnRH (figura 5). Cuando se hicieron estudios farmacológicos de esta respuesta se observó una facilitación de la secreción de la GnRH directamente dependiente de la dosis de histamina (figura 6A). Por otro lado, dicha facilitación fue inhibida por la administración de concentraciones equimolares de mepiramina, un antagonista selectivo de receptores para histamina del subtipo H1, pero no fue bloqueada por ranitidina ni por tioperamida que son antagonistas de receptores de los subtipos H2 y H3, respectivamente (figura 6B). Estos resultados son consistentes con la idea de que las neuronas  $GT_{1,1}$  tienen receptores para histamina del subtipo H1 mediante los cuales la histamina facilita la secreción de la GnRH de manera sostenida, reversible y dependiente de la dosis.

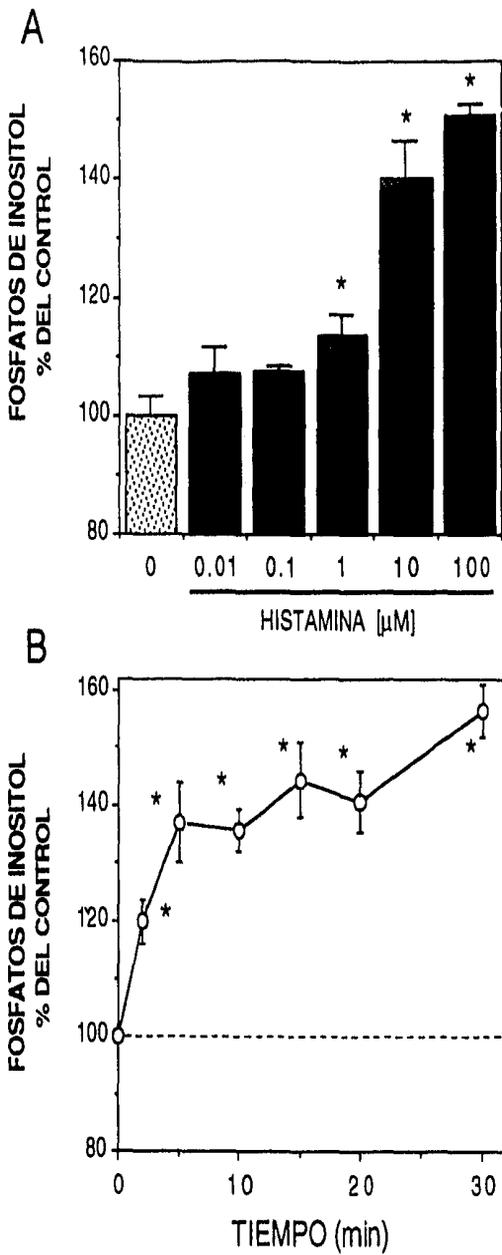
**Facilitación por la histamina de la formación de fosfatos de inositol en células  $GT_{1,1}$ .** Como se mencionó anteriormente, los receptores para histamina del subtipo H1 habitualmente se encuentran acoplados positivamente a la hidrólisis de fosfoinosítidos (Haaksma *et al.*, 1990; Parsons *et al.*, 1991), y dado que los primeros estudios farmacológicos con las células  $GT_{1,1}$  indicaban la participación de receptores del subtipo H1, se decidió analizar el efecto de la histamina sobre la producción de fosfatos de inositol en células  $GT_{1,1}$ . Se encontró que la histamina facilita la formación de fosfatos de inositol en células



**Figura 5.- Efecto de la infusión de 1  $\mu$ M de histamina. sobre la secreción de la GnRH por células GT<sub>1-1</sub> en perfusión. Cámaras Sykes -Moore con dos laminillas cubiertas de células (50-70% de confluencia) fueron perfundidas con solución salina de Locke, luego de un período de equilibrio de una hora, se colectaron fracciones cada 4 minutos y se midió la concentración de la GnRH por radioinmunoensayo. Se ilustran dos experimentos representativos.**



**Figura 6.- Efecto de la aplicación de histamina sobre la secreción de la GnRH por células  $GT_{1,1}$  en cultivo estático.** A) Cultivos tratados por 30 min. con concentraciones decrecientes de histamina (1 nM - 10  $\mu$ M). B) Cultivos tratados con 100  $\mu$ M de histamina sola, o en combinación con concentraciones equimolares de los antagonistas selectivos de receptores H1, H2 o H3 mepiramina (MEP), ranitidina (RAN) y tioperamida (TIO), respectivamente. \*,  $P < 0.05$  vs el grupo control, \*\*,  $P < 0.05$  vs el grupo tratado con histamina sola.



**Figura 7.- Efecto de la aplicación de histamina sobre la acumulación de  $^3$ H-fosfatos de inositol en células  $GT_{1,1}$ .** A) Células cultivadas durante 30 minutos en presencia de concentraciones crecientes de histamina (10 nM-100  $\mu$ M). B) Células cultivadas hasta por 30 minutos en presencia de 100  $\mu$ M de histamina. \*,  $P < 0.05$  vs el grupo control.

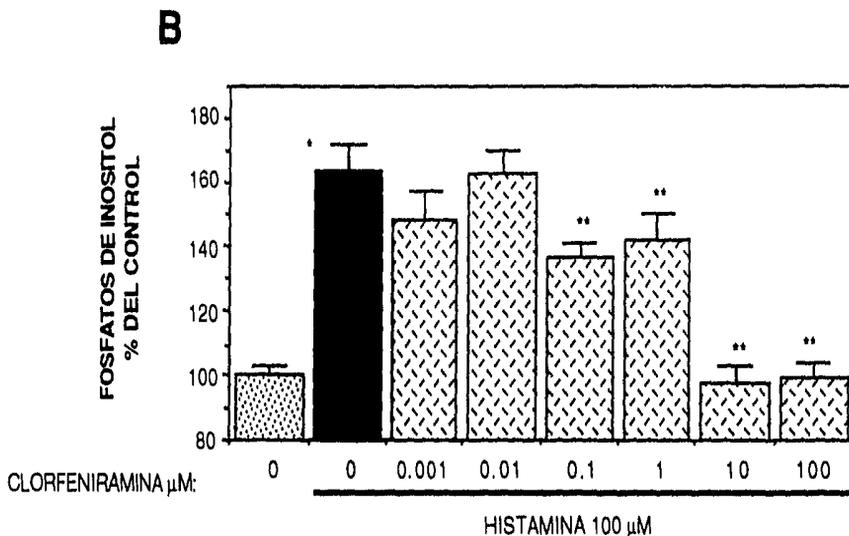
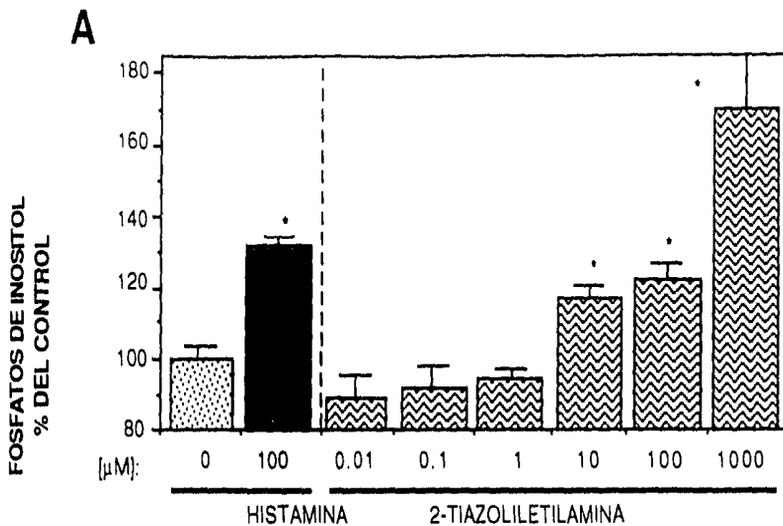


Figura 8.- A) Efecto del agonista de receptores para histamina del subtipos H1, 2-tiazoliletilamina, sobre la acumulación de  $^3\text{H}$ -fosfatos de inositol en células  $\text{GT}_{1-1}$ . Los cultivos fueron tratados por 30 min. con 100 mM de histamina o con concentraciones crecientes de 2-tiazoliletilamina (10 nM-1 mM). \*  $P < 0.05$  vs el grupo control. B) Efecto del antagonistas de receptores para histamina del subtipos H1, clorfeniramina, sobre la estimulación de la acumulación de  $^3\text{H}$ -fosfatos de inositol inducida por histamina en células  $\text{GT}_{1-1}$ . Los cultivos fueron tratados por 30 min. con 100  $\mu\text{M}$  de histamina sola o combinada con concentraciones crecientes del antagonista. \*,  $P < 0.05$  vs el grupo control, \*\*,  $P < 0.05$  vs el grupo tratado con histamina sola.

GT<sub>1,1</sub>, en forma paralela a la facilitación de la secreción de la GnRH. Este efecto se dió en forma dependiente de la dosis, y del tiempo (figura 7). Cuando hicimos estudios farmacológicos los resultados indicaron que la formación de fosfatos de inositol estaba mediada por receptores con características de receptores H1 ya que: La facilitación de la formación de fosfatos de inositol debida a la administración de histamina fue mimetizada por la 2-tiazoliletilamina (figura 8A), un agonista de receptores para histamina del subtipo H1, mas no por el dimaprit, un agonista de receptores H2, ni por la  $\alpha$ -metil histamina, un agonista de receptores H3. Por otro lado, el efecto inducido por la histamina fue bloqueado por la administración de los antagonistas selectivos de receptores H1, clorfeniramina (figura 8B) y mepiramina pero no por los antagonistas de los receptores H2 o H3, ranitidina y tioperamida respectivamente.

Estos resultados junto con los obtenidos en el presente trabajo, refuerzan las similitudes entre la fisiología hipotalámica y la de las células GT<sub>1,1</sub> (ej., expresión de receptores con propiedades farmacológicas análogas e identidad de los segundos mensajeros acoplado el efecto de la histamina) sugiriendo una vez más que las neuronas GT<sub>1,1</sub> son un buen modelo de neuronas GnRHérgicas.

En general estos resultados coinciden con los reportes previos que indican una facilitación de la secreción de la GnRH debida a la histamina. El hecho de que las neuronas GT<sub>1,1</sub> se derivaron en forma clonal de neuronas secretoras de la GnRH, nos permite pensar que la aplicación exógena de la histamina activa directamente células secretoras de la GnRH, sugiriendo que los efectos reportados de la histamina sobre el aparato reproductor tanto *in vivo* como *in vitro* podrían ejercerse, al menos en parte, por una acción directa sobre estas neuronas.

No hay que perder de vista que las neuronas GT<sub>1,1</sub>, son células transformadas que pueden estar expresando receptores que las neuronas GnRHérgicas no expresen, o bien pueden expresar receptores en cantidades diferentes a las que las neuronas normales expresan, ya que la expresión de receptores puede estar influenciada por información que otras neuronas transmiten a las GnRHérgicas. Por ejemplo, se han observado diferencias en la facilitación de la secreción de la GnRH debida a la histamina dependiendo del sexo del animal experimental, lo cual se podría explicar si la expresión de los receptores para histamina en las células secretoras de la GnRH fuese dependiente de esteroides, y obviamente en nuestro sistema experimental no

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

existen neuronas capaces de transmitir a las células  $GT_{1,1}$  este tipo de información.

### CONCLUSION.

Las células  $GT_{1,1}$  tienen en sus membranas sitios de unión específicos para la  $^3H$ -mepiramina, un radioligando de receptores para histamina del subtipo  $H_1$ .

Si estos resultados se suman a los datos farmacológicos podemos con mucha certeza afirmar que las células  $GT_{1,1}$  tienen receptores para histamina del subtipo  $H_1$ , a través de los cuales la histamina facilita la secreción de la GnRH.

La existencia de receptores para histamina en las células  $GT_{1,1}$  sugiere que la histamina puede estimular, al menos en parte, al eje reproductivo directamente en la superficie de las neuronas GnRHérgicas mediante la activación de receptores para histamina del subtipo  $H_1$  acoplados positivamente a la formación de fosfatos de inositol.

## BIBLIOGRAFIA.

- Beaven M.A. (1976) *Histamine*. Physiology in medicine. Vol. 296:30-36.
- Black J.W., Duncan W.A.M., Durant C.J., Ganellin C.R. Parsons M.E. (1972) *Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors*. Nature Vol. 236:385-390.
- Brownstein M., Saavedra J., Paikovits M., Axelrod J. (1974) *Histamine content of hypothalamic nuclei of the rat*. Brain Res. Vol. 77:151-156.
- Donoso A. (1978) *Induction of prolactin and luteinizing hormone release by histamine in male and female rats and the influence of brain transmitter antagonists*. J. Endocrinol. Vol. 76:193-202.
- Donoso A.O., Zarate M.B. (1983) *Release of prolactin and LH by histamine agonists in ovariectomized rats under ether anesthesia*. Exp. Brain. Res. Vol. 52:277-280.
- Donoso A.O., Alvarez E.O. (1994) *Brain histamine as neuroendocrine transmitter*. Trends in Pharmacol. Sci. Vol. 6:98-100.
- Dorouva S., Epelbaum J., Henry M., Tapia-Arancibia L., Laplante E., Kordon C. (1981) *Ionic channels involved in LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus*. Neuroendocrinology. Vol. 32:155-162.
- Everett J.W. (1994) *Pituitary and hypothalamus: Perspectives and Overview*. In Knobil E., Nell J. D. (eds.) The Physiology of reproduction. Second Edition. Raven Press Ltd., N.Y. pp:1509-1526.
- Fujimoto K., Horio Y., Sugama K., Ito S., Liu Y.Q., Fukui H. (1993) *Genomic cloning of the rat histamine H<sub>1</sub> receptor*. Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 190:294-301.
- Guyton A.C. (1972) *Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso*. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C. V. México.
- Haakasma E.E. J., Leurs R., Timmerman H. (1990) *Histamine receptors: subclasses and specific ligands*. Pharmac. Ther. Vol. 47:73-104.
- Hales T.G., Sanderson M.J., Charles A.C. (1994) *GABA has excitatory actions on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons*. Neuroendocrinology Vol. 59:297-308.

- Hill S. (1990) *Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor*. Pharmacological Reviews, Vol.42: 45-83.
- Hill S.J. (1991a) Histamine and interactions between second messenger transduction systems. En *New perspectives in Histamine Resesarch De*. Birkâuser Verlag Basel. pag. 145-159.
- Hill S.J. (1991b) *Multiple histamine receptors: properties and functional characteristics*. Biochemical society transactions Vol. 20:122-125.
- Hol D. (1994) *Producción de fosfatos de inositol en respuesta a histamina en la línea neuronal hipotalámica GT1-1*. Tesis prof. IBB. UNAM.
- Horno N.M., Alvarez E.O. (1989) *The probable role of histamine in rostral hypothalamus on the prolactin and luteinizing hormone release induced by estrogen in conscious spayed rats*. J. Neural. Transm. (Gen. Sect) Vol. 78:249-264
- Inagaki N., Yamatodani A., Ando-Yamamoto M., Tohyama M., Watanabe T., Wada H. (1988) *Organization of histaminergic fibers in the rat brain*. J. Comp. Neurol. Vol. 273:283-300.
- Inagaki N., Fukui H., Taguchi Y., Wang N.P., Yamatodani A., Wada H. (1989) *Characterization of histamine H1-receptors on astrocytes in primary culture: [3H]mepyramine binding studies*. Eurp. J. Parmacol. Vol. 173 pp: 43-51
- Karsmanovic L.A., Stojilkovic S.S., Balla T., Al-damluji S., Weiner R.I., Catt K.J. (1991) *Receptors and neurosecretory action of endothelin in hypothalamic neurons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 88:11124-11128.
- Karsmanovic L.A., Stojilkovic S.S., Mertz L.M., Tomic M., Catt K.J. (1993) *Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 90:3908-3912.
- Kingge U., Warberg J. (1991a) *Neuroendocrine functions of histamine*. En *New perspectives in Histamine Resesarch De*. Birkâuser Verlag Basel. pag. 29-53
- Kingge U., Warberg J. (1991b) *The role of histamine in the neuroendocrine regulati3n of pituitary hormone secretion*. Acta endorinologica (Copenh) Vol. 124:609-619.

- Kordon C., Drouva S. V., Martinez de la Escalera G., Weiner R. I. (1994) *Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin*. In Knobil E., Nell J. D. (eds.) *The Physiology of reproduction*. Second Edition. Raven Press Ltd., N.Y. pp:1621-1681.
- Krsmanovic L.Z., Stojilkovic S.S., Merelli F., Dufour S., Virmani M., Catt K. (1992) *Calcium signaling and episodic secretion of GnRH in hypothalamic neurons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 89:8462-8466.
- Libertun C., McCann S. (1976) *The possible role of histamine in the control of prolactin and gonadotropin release*. Neuroendocrinology Vol. 20:110-120.
- Liposits Z., Merchenthaler I., Westel W.C., Reid J.J., Mellon P.L., Weiner R.I., Negro-Vilar A. (1991) *Morphological characterization of immortalized hypothalamic neurons (GT1-7) synthesizing LH-RH*. Endocrinology Vol. 129:1575-1583.
- Mahachoklertwattana P., Sanchez J., Kaplan S.L., Grumbach M.M. (1994) *NMDA receptors mediate the release of GnRH by NMDA in a hypothalamic GnRH neuronal cell line (GT1-1)*. Endocrinology Vol. 134:1023-1030.
- Martínez de la Escalera G., Choi A.L.H., Weiner R.I. (1992a) *Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone pulses: intrinsic properties of GT1-1 GnRH neuronal cell line*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 89:1852-1855.
- Martínez de la Escalera G., Choi A.L.H., Weiner R.I. (1992b)  *$\beta$ 1-Adrenergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines: Stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase*. Endocrinology Vol. 131:1397-1402.
- Martínez de la Escalera G., Gallo F., Choi A.L.H., Weiner R.I. (1992c) *Dopaminergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines: Stimulation of GnRH release via D1-receptors positively coupled to adenylate cyclase*. Endocrinology Vol. 131:2965-2971.
- Martínez de la Escalera G., Mendoza L., Ochoa A., Hol D. (1993) *Nuevas tendencias en el analisis experimental de la comunicación neuroendócrina: Las células GT1*. En: *Comunicación neuroendocrina bases celulares y moleculares*. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. CONACyT pp.277-2792.

- Martínez de la Escalera G., Choi A.L.H., Weiner R.I. (1994) *Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines*. Neuroendocrinology Vol. 59:420-425.
- Mellon P.L., Windel J.J., Goldsmith P.C., Padula C.A., Robles J.L., Weiner R.I. (1990) *Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis*. Neuron Vol.5:1-10.
- Mitsuhashi M., Payan D.G. (1989) *Receptor glycosylation regulates the affinity of histamine H1-receptors during smooth muscle cell differentiation*. Mol.Pharmacol. Vol. 35: 311-318.
- Mitsuhashi M., Payan D.G. (1992) *Functional diversity of histamine and histamine receptors*. J. Invest. Dermatol. Vol. 98:8S-11S.
- Miyake A., Ohtsuka S., Nishizaki T., Tasaka K., Aono T., Tanizawa O., Yamatodani A., Watanabe T., Wada H. (1987) *Involvement of H1 histamine receptor in basal and estrogen-stimulated luteinizing hormone-releasing hormone secretion in rats in vitro*. Neuroendocrinology Vol. 45:191-196.
- Noris G., Hol D., Clapp C., Martinez de la Escalera G. (1995) *Histamine directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion from GT<sub>1,1</sub> cells via H1 receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis*. Endocrinology Vol. 136: 2967-2973.
- Ohtuska S., Nishizaki T.,Tasaka K., Miyake A., Tanizawa O., Yamatodani A., Wada H. (1989) *Estrogen stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat hypothalamus independently through catecholamine and histamine in vitro*. Acta Endocrinologica (Copenh) Vol. 120:644-648.
- Page R.B. (1994) *The anatomy of the hypothalamo-hipophyseal complex*. In Knobil E., Nell J. D. (eds.) *The Physiology of reproduction*. Second Edition. Raven Press Ltd., N.Y. pp:1527-1620.
- Panulla P., Yang H., Costa E. (1984) *Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 81:2572-2576.
- Panulla P., Pivola U., Auvienen S., Airksinen M.S. (1989) *Histamine immunoreactive nerve fibers in the rat brain*. Neuroscience Vol. 28:585-610.
- Parsons M.E. (1991) *Histamine receptors: an overview*. Scand. J. Gastroenterol. Vol. 26 (suppl 180):46-52.

- Pollard H., Bischoff S., Lorens-Cortes C., Schwartz J. (1976) *Histidine decarboxylase and histamine in discrete nuclei of rat hypothalamus and the evidence for mast-cells in the median eminence*. Brain Res. Vol. 118:509-513.
- Russell W.L., Henry D.P., Phebus L.A., Clemens J.A. (1990). *Release of histamine in rat hypothalamus and corpus striatum in vivo*. Brain Res. Vol. 512:95-101.
- Sawyer C. (1955) *Rhinencephalic involvement in pituitary activation by intraventricular histamine in rabbit under nebutal anesthesia*. Am. J. Physiol. Vol. 180:37-46.
- Schwartz J.C., Arrang J.M., Garbarg M., Pollard H., Ruat M. (1991) *Histaminergic Transmission in mammalian brain*. Physiological Reviews Vol. 71:1-51.
- Silverman A.J., Roberts J.L., Dong K., Miller G.M., Gibson M.J. (1992) *Intrahypothalamic injection of cell line secreting gonadotropin-releasing hormone results in cellular differentiation and reversal of hypogonadism in mutant mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 89:10666-10672.
- Silverman A.J., Livne I., Witkin J.W. (1994) *The gonadotropin-releasing hormone neuronal systems: immunocytochemistry and in situ hybridization*. In Knobil E., Nell J. D. (eds.) *The Physiology of reproduction*. Second Edition. Raven Press Ltd., N.Y. pp:1683-1709.
- Timmerman H. (1989) *Histamine receptors in the central nervous system*. Pharm. Weekblad Scientific edition Vol. 11:146-50.
- Van Kirk E.A., Halterman S.D., Moss G.E., Rose J.D., Murdoch W.J. (1989). *Possible role of histamine in the regulation of secretion of luteinizing hormone in the ewe*. J. Anim. Sci. Vol. 67: 1006-1012
- Wada H., Inagaki N., Yamatodani A., Watanabe T. (1991) *Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity?*. Trends Neurosci. Vol. 14:415-418.
- Watanabe T., Taguchi Y., Shiosaka S., Tanaka J., Kubota H., Terano Y., Tohyama M., Wada H. (1984) *Distribution of histaminergic neurons in the central nervous system of the rat: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker*. Brain Res. Vol. 295:13-25.

- Weiner R.I., Wetsel W., Goldsmith P., Martinez de la Escalera G., Windel J., Padula C., Choi A., Negro-Vilar A., Mellon P.L. (1992) *Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines*. *Frontiers in neuroendocrinology* Vol. 13 No.2:95-119
- Westel W.C., Valença M., Merchanthaler I., Liposits Z., Lopez F., Weiner R.I., Mellon P.L., Negro-Vilar A. (1992) *Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized LH-RH secreting neurons*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89:4149-4153.
- Wilcox B., Seybold V. (1982). *Localization of neuronal histamine in rat brain*. *Neurosci. Lett*. Vol.29:105-110.