

59  
25



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN.**

**Caracterización de la captura del ácido  
 $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en células  
de astrocitoma humano U373 MG  
y modulación por histamina.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :  
ENRIQUE SÁNCHEZ LEMUS**

**ASESOR: Dr. JOSE ANTONIO G. ARIAS MONTAÑO  
CO-ASESOR: Dr. DANIEL MARTÍNEZ FONG**

**CUAUTITLÁN IZCALLÍ, EDO. DE MEX.**

**1999**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN.**

275021



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS

Caracterización de la captura del ácido G-aminobutírico (GABA)

en células de estroma linfo humano J373.16 y modulación por histamina.

que presenta el pasante Manoel Sánchez López  
con número de cuenta 8914161 para obtener el TITULO de:  
Cuñico Farmacéutico

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex. a 4 de Febrero de 1999

PRESIDENTE	Dr. Ricardo V. Santiago Díez	
VOCAL	M. en C. Luisa Martínez Aguilar	
SECRETARIO	Dr. Daniel Martínez-Fonn	
PRIMER SUPLENTE	O.F.B. Ma. Esther Revuelta Mijanda	
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. Francisco López Mejía	

## *Agradecimientos.*

A mis padres, Socorro y Enrique, por su sacrificio y apoyo incondicional durante toda la carrera. Soy solo producto de su esfuerzo, dedicación y cariño (espero que no se arrepientan de su obra).

A mis hermanos, Johny, César y Jesús, por soportarme.

A mi familia, especialmente a mis tías Lety, Blanca, Eli y Chomi, por seguir queriéndome a pesar de la falta de tiempo para convivir.

A mis amigos, a todos mis cuates del 1154 por esas fiestas relajadoras que hicieron mas ameno el trayecto recorrido, a mis amigos de las distintas generaciones que tuve oportunidad de conocer, y especialmente a Angeles, Chayo y Elizabeth, sus sabios consejos y críticas me hicieron conocerme mejor.

A mis compañeros de laboratorio, al Super-Soriajaso, al Alex, al Danys, a Marthita, a Adrianita y al Tamagochi, por su ayuda intelectual y los jueves sociales intensos.

A mis Asesores, Dr José Antonio Arias Montaña, por la paciencia y tiempo que dedicó para poder realizar la fase experimental de esta tesis, así como su acertada revisión del trabajo escrito; y al Dr. Daniel Martínez Fong por su disposición y valiosos comentarios.

A Claudia, por ser la cariñosa mitad del alma mía.

...Sí, el yo, con su contradicción y confusión,  
es el que más sinceramente habla de su ser;  
-ese yo que crea quiere y valora;  
ese yo que es el criterio y el valor de las cosas...

...Un orgullo nuevo me ha sido enseñado por mi yo;  
lo enseñó ahora a los hombres:  
No hundir ya la cabeza en la arena de las cosas celestiales,  
sino llevarla bien erguida,  
una cabeza terrena que establezca el sentido de la tierra.

F. Nietzsche.

# ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. CÉLULAS GLIALES.	1
1.2. HISTAMINA EN EL SNC.	3
1.3. RECEPTORES PARA HISTAMINA.	4
1.4. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.	7
1.5. HISTAMINA Y CÉLULAS GLIALES.	9
1.6. TRANSPORTADORES PARA GABA.	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	13
3. HIPÓTESIS.	15
4. OBJETIVOS.	16
4.1. OBJETIVOS GENERALES.	16
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	16
5. MÉTODOS.	17
5.1. CULTIVO CELULAR.	17
5.2. CAPTURA DE [3H]GABA.	17
5.2.1. <i>Cinética de la captura de GABA.</i>	19
5.2.2. <i>Dependencia del Na<sup>+</sup> en la captura de GABA</i>	19
5.2.3. <i>Caracterización farmacológica del transportador de GABA</i>	19
5.2.4. <i>Caracterización del efecto de la histamina sobre la captura de GABA</i>	19
5.3. DETERMINACIÓN DE PROTEINAS.	20
5.4. REACTIVOS.	20
6. RESULTADOS.	21
6.1. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTE DE GABA.	21
6.1.1. <i>Dependencia de iones de Na<sup>+</sup>.</i>	21
6.1.2. <i>Dependencia de la concentración de sustrato.</i>	21
6.1.3. <i>Caracterización farmacológica del transportador de GABA.</i>	25
6.2. EFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA CAPTURA DE GABA.	25
6.2.1. <i>Cinética del efecto de la histamina sobre la captura de GABA.</i>	25
6.2.3. <i>Efecto de la histamina sobre la dependencia del sustrato.</i>	27
7. DISCUSIÓN.	31
7.1. ¿CAPTURAN GABA LAS CÉLULAS U373 MG?.	32

7.2. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DEL TRANSPORTADOR DE GABA. ....	33
7.3. REGULACIÓN POR HISTAMINA. ....	35
8. CONCLUSIONES. ....	41
9. BIBLIOGRAFÍA. ....	42

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. CÉLULAS GLIALES.

El Sistema Nervioso puede ser definido como una red intrincada de circuitos neuronales, que llevan a cabo múltiples funciones tales como el control del movimiento, la percepción sensorial, el aprendizaje y la memoria, el control de la secreción endócrina, etc. (Schwartz, 1991; Kandel, 1995).

Pueden distinguirse en este sistema varios tipos de células, las cuales son divididas en dos grupos. El primer grupo está constituido por las células neuronales, con morfología variada, pero que sin embargo son muy similares fisiológicamente. Su función consiste en la transmisión de información, principalmente a través de la liberación de neurotransmisores (sinapsis química) o bien por el paso de iones (sinapsis eléctrica) y otras moléculas pequeñas a través de las denominadas uniones comunicantes. El segundo grupo de células lo conforman las células gliales (Cuadro 1), a las cuales antiguamente se les confería la función única de sostén del tejido nervioso, pero que en la actualidad se sabe llevan a cabo otras funciones importantes como la formación de la mielina, el intercambio metabólico con neuronas, la fagocitosis de células destruidas y la captura y liberación de neurotransmisores o sus precursores (Snell, 1994; Kandel, 1995).

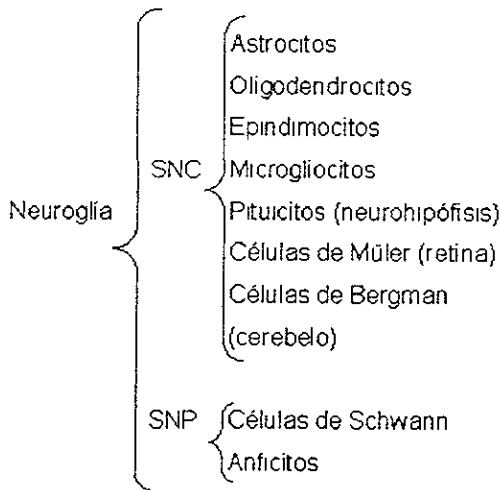
Además, existen evidencias de la existencia en las células gliales de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  con densidades similares a las reportadas para los canales iónicos neuronales. De esta manera se atribuyen a la glía tres posibles funciones en la transmisión de señales (Barres, 1991):

#### 1. Regulación de la concentración extracelular del ion $\text{K}^+$



- 2. Regulación de la microcirculación sanguínea y
- 3. Modulación de la transmisión sináptica al capturar y liberar neurotransmisores.

Las células gliales expresan también receptores para diversos neurotransmisores (Verkhatsky et al., 1998). Se han descrito así receptores purinérgicos, adrenérgicos  $\alpha_1$ , receptores para sustancia P, glutamatérgicos, GABAérgicos, glicinérgicos y receptores para bradícina y citocinas. De particular interés para este trabajo son los estudios que reportan la expresión de receptores de histamina en células gliales (Nakahata et al., 1986; Inagaki et al., 1989; Hill, 1990; Hill et al., 1997), lo que sugiere que éstas son un blanco importante para este modulador.



**Cuadro 1. Glía.** Tipos celulares de la neuroglía presentes tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en el Sistema Nervioso Periférico (SNP).

## 1.2. HISTAMINA EN EL SNC.

La histamina ( $\beta$ -aminoetilimidazol) es un autacoide conocido ampliamente por ser un mediador químico en tejidos periféricos, donde participa en una variedad de funciones tanto en condiciones normales como patológicas, tales como la reacción alérgica inmediata y la secreción gástrica. Sin embargo, en los últimos años se han generado evidencias experimentales que indican que la histamina es un importante transmisor químico en el Sistema Nervioso Central (SNC), con una significativa contribución a la regulación de diversas funciones cerebrales. La histamina está ampliamente distribuida en el SNC de los mamíferos, y estudios inmunohistológicos recientes han permitido generar un mapa de las vías histaminérgicas en el SNC de la rata, mostrando una amplia distribución de las mismas (Wada et al., 1991).

Entre las funciones cerebrales que pueden ser reguladas por la histamina se encuentran los estados de vigilia y sueño, la circulación cerebral, la temperatura corporal, la actividad locomotora, la homeostasis cardiovascular, la percepción del dolor, la ingestión de agua y alimentos y las conductas sexual, de defensa y de agresión (Schwartz et al., 1991; Wada et al., 1991).

La difusión de la histamina a través de la barrera hematoencefálica es mínima y en consecuencia sus efectos sobre los tejidos cerebrales se deben al neuromodulador sintetizado en el propio SNC a partir de la L-histidina, transportada al interior de las células por un proceso activo para ser posteriormente descarboxilada en el citosol (Schwartz et al., 1991).

En el SNC la histamina es sintetizada por una población reducida de neuronas localizadas en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo posterior (Wada et al., 1991). Estas células envían proyecciones a prácticamente todo el SNC, desde el bulbo olfatorio hasta la médula espinal. Aunque la inervación debida a

estas proyecciones es muy heterogénea, la mayor densidad de fibras histaminérgicas se encuentra en la

corteza cerebral, los ganglios basales, el tálamo, el hipotálamo y el bulbo raquídeo. Regiones con menor inervación son el hipocampo, los colículos inferior y superior, el cerebelo y la médula espinal (Panula et al., 1989; Wada et al., 1991).

Los axones de las neuronas histaminérgicas establecen pocos contactos característicos de las sinápsis químicas (Takagi et al., 1986) y de manera predominante se encuentran rodeando a otros elementos neuronales (somata, axones o terminales nerviosas). Debido a esta carencia de contactos sinápticos verdaderos se ha considerado que la histamina no es un neurotransmisor típico, sino un neuromodulador que regula a nivel pre y postsináptico los efectos transsinápticos de otros transmisores (ver Arias-Montaño y Guerrero-Serna, 1995).

A diferencia de lo que ocurre con otros neurotransmisores o moduladores, no existe un sistema de recaptura de alta afinidad para la histamina, lo que sugiere que una vez liberada al espacio extracelular, su acción se termina de manera exclusiva por la captura y degradación por neuronas postsinápticas y por células gliales en las que se encuentra presente la enzima metiltransferasa de histamina (Schwartz et al., 1991).

### 1.3. RECEPTORES PARA HISTAMINA.

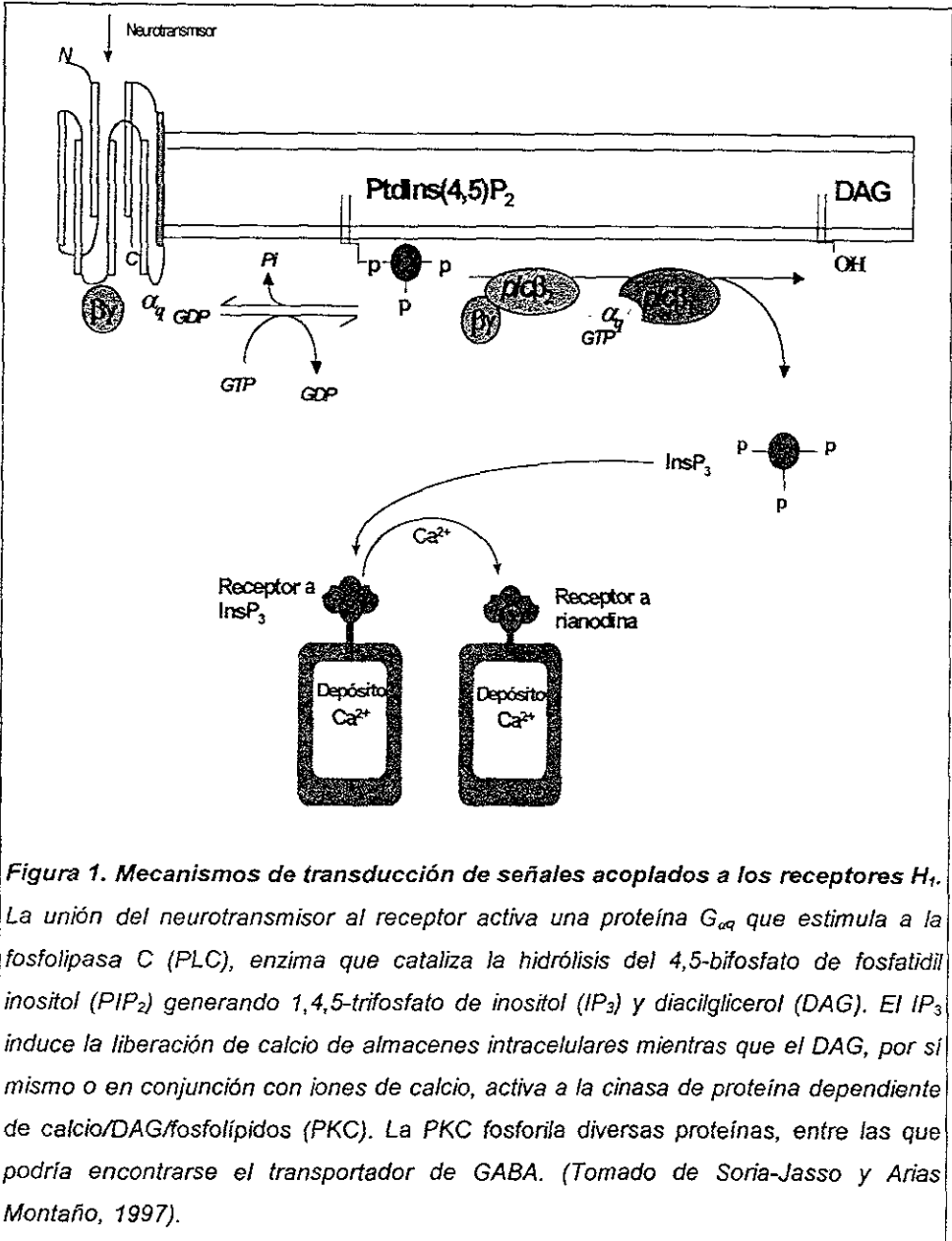
Los efectos de la histamina se ejercen mediante la activación de tres tipos de receptores ( $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_3$ ), diferenciados principalmente por sus características farmacológicas (Hill, 1990; Hill et al., 1997), aunque también se ha determinado la estructura molecular de los subtipos  $H_1$  y  $H_2$  (Leurs et al., 1995). En el SNC los receptores  $H_1$  y  $H_2$  son postsinápticos, mientras que el subtipo  $H_3$  muestra una

localización presináptica, ya sea en las propias terminales histaminérgicas (autorreceptores) o bien como heterorreceptor en axones de neuronas que liberan otros neurotransmisores (Hill, 1990; Leurs et al., 1995; Arranget et al., 1983, 1987; Hill et al., 1997).

Los receptores  $H_1$  se encuentran presentes tanto en células neuronas como en células gliales o de origen glial (Inagaki et al., 1989; Arias-Montaña et al., 1994) y son abundantes en el hipotálamo, la corteza cerebral, el complejo amigdalóide y la médula espinal (Schwartz et al., 1991; Wada et al., 1991; Hill et al., 1997).

Para el subtipo  $H_2$  se ha observado una alta densidad en la corteza cerebral, el neocórtex, el tálamo y el hipotálamo (Schwartz et al., 1991; Wada et al., 1991; Traiffort et al., 1992). Si bien la mayor parte de los receptores  $H_2$  se encuentra en neuronas, se ha demostrado su presencia en células gliales y en vasos sanguíneos (Wada et al., 1991; Hill, 1990).

Los receptores  $H_3$  se localizan principalmente en la corteza cerebral, el neocórtex, la sustancia negra, el hipocampo y el tálamo, así como en el núcleo tuberomamilar, donde se encuentran las neuronas histaminérgicas. Una proporción significativa de este tipo de receptor se encuentra en las propias terminales histaminérgicas, donde funcionan como autorreceptores, regulando la síntesis y la liberación de la histamina (Hill, 1990; Arias-Montaña y Guerrero, 1995; Hill et al., 1997).



**Figura 1. Mecanismos de transducción de señales acoplados a los receptores H<sub>1</sub>.** La unión del neurotransmisor al receptor activa una proteína G<sub>αq</sub> que estimula a la fosfolipasa C (PLC), enzima que cataliza la hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidil inositol (PIP<sub>2</sub>) generando 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> induce la liberación de calcio de almacenes intracelulares mientras que el DAG, por sí mismo o en conjunción con iones de calcio, activa a la cinasa de proteína dependiente de calcio/DAG/fosfolípidos (PKC). La PKC fosforila diversas proteínas, entre las que podría encontrarse el transportador de GABA. (Tomado de Soria-Jasso y Arias Montaña, 1997).

#### 1.4. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.

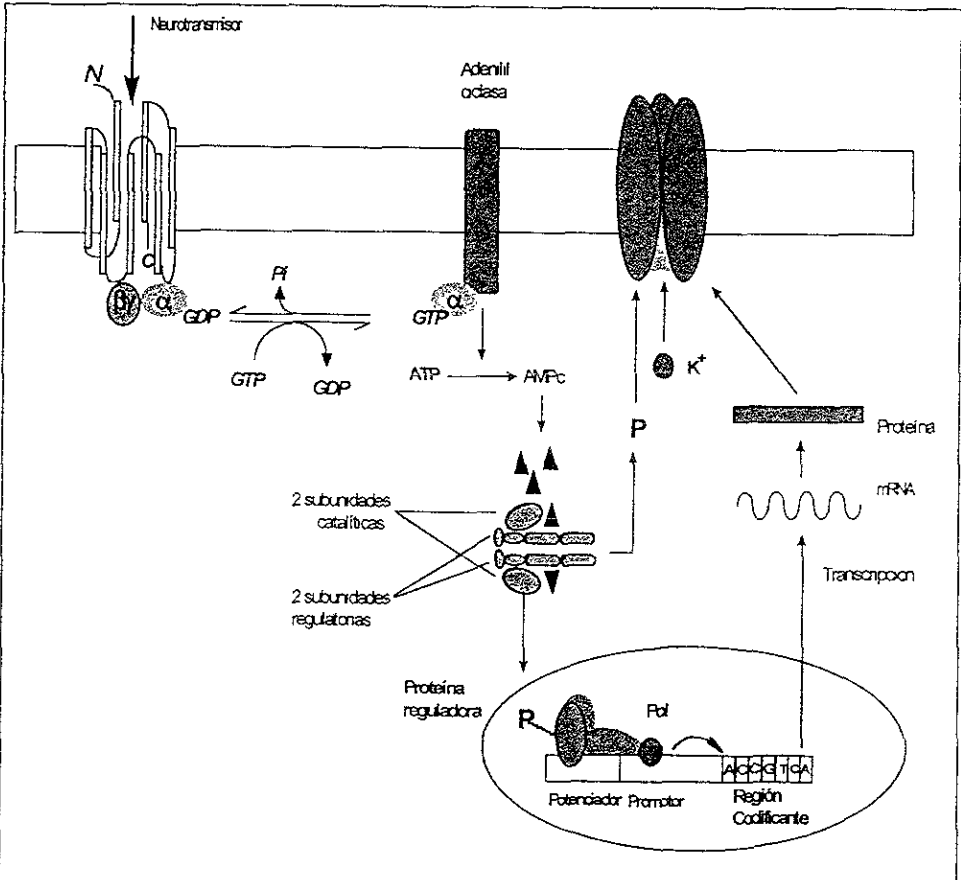
Otra diferencia entre los tres subtipos de receptores histaminérgicos es el mecanismo de transducción de señales a que se encuentran acoplados cada uno de ellos (Hill, 1990; Hill et al., 1997).

**Receptores H<sub>1</sub>.** La activación del receptor H<sub>1</sub> (Fig. 1) estimula, mediante una proteína G<sub>αq</sub>, a una o más isoformas de la fosfolipasa C dando lugar a la formación de dos segundos mensajeros, el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol o DAG.

El IP<sub>3</sub> provoca a su vez la movilización de Ca<sup>2+</sup> a partir de depósitos intracelulares al unirse a receptores-canales localizados en ellos (Berridge, 1993). El aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular activa cinasas C de proteínas (PKC) que al unirse a la membrana plasmática son estimuladas por el DAG. Las diferentes isoformas de la PKC fosforilan a diversas proteínas como otras enzimas, canales iónicos, receptores y transportadores, modulando así su función (Tian et al., 1994, González y Ortega, 1997; Corey et al., 1994).

**Receptores H<sub>2</sub>.** La activación del receptor H<sub>2</sub> estimula la formación de AMPc por efecto de una adenilil ciclasa activada por proteínas G estimuladoras, G<sub>αs</sub> (Hill, 1990; Hill et al., 1997). La acumulación de AMPc estimula la actividad de cinasas A de proteínas (PKA) que tienen efecto sobre la función de otras proteínas, ya sea directamente o bien induciendo la expresión de las mismas (Fig. 2). Además de la activación de la PKA, el aumento en la concentración del AMPc conduce a la apertura de canales iónicos, en especial a los permeables a iones de Ca<sup>2+</sup> (Hill, 1990).

**Receptores H<sub>3</sub>.** Se considera que el receptor H<sub>3</sub> (Arrang, et al., 1983) pertenece también a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Leurs et al., 1995).



**Figura 2. Mecanismos de transducción de señales acoplados a la activación de receptores  $H_2$ .** La unión del agonista al receptor activa a una proteína  $G_{\alpha s}$  la cual estimula a la enzima adenilil ciclasa (AC) misma que hidroliza al trifosfato de adenosina (ATP) generando monofosfato cíclico de adenosina, AMPc. El AMPc activa a su vez a la cinasa de proteína dependiente de AMPc (PKA) y ésta podría fosforilar al transportador de GABA modulando así su función. (Tomado de Soria-Jasso y Arias Montaño, 1997).

Los agonistas  $H_3$  inhiben la liberación de histamina inducida por  $K^+$  o por veratridina en rebanadas de la corteza cerebral, el hipocampo y el tálamo. El efecto inhibitorio de los agonistas disminuye si se incrementa la magnitud del estímulo o si se eleva la concentración extracelular del ion  $Ca^{2+}$ , lo que sugiere que la regulación de los canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje, probablemente por proteínas G $\alpha$ , es el mecanismo responsable de la modulación de la liberación tanto de la histamina como de otros neurotransmisores (Hill, 1990; Hill et al., 1997). Un estudio reciente mostró que la activación de los receptores  $H_3$  puede efectivamente inhibir la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje del tipo N (Endou et al., 1994), lo que permitiría explicar su efecto inhibitorio sobre la liberación de la propia histamina y de otros neurotransmisores como la noradrenalina, la acetilcolina, la dopamina y el GABA (Hill et al., 1997; García et al., 1997).

## 1.5. HISTAMINA Y CÉLULAS GLIALES.

Como se mencionó anteriormente, los receptores para histamina se encuentran distribuidos en todo el SNC, tanto en células gliales como en neuronas. Particularmente, existen estudios en los que se han identificado receptores histaminérgicos en astrocitos (células de la glía en el SNC). El receptor para histamina más abundante en astrocitos *in vivo* es el  $H_1$  (Nakahata et al., 1986; Inagaki y Wada, 1994), si bien se ha detectado el subtipo  $H_2$ , aunque en en mucho menor proporción (Inagaki y Wada, 1994). Estas distribuciones han sido evaluadas en animales de laboratorio como la rata y el cobayo, aunque para usos prácticos se les considera generales para todos los mamíferos, teniendo presente no obstante que pueden presentarse variaciones de especie a especie.

En este sentido, dada la heterogeneidad de tipos celulares que presentan las diversas regiones del SNC, se han generado líneas celulares de origen glial que han sido ampliamente utilizadas para el estudio neuroquímico-funcional de



los neurotransmisores. Por ejemplo, a fin de ser utilizada como modelo para el estudio de los efectos de la histamina sobre las células gliales, se han caracterizado las propiedades de los receptores  $H_1$  en la línea celular U373 MG, derivada de un astrocitoma humano (Arias-Montaña et al., 1994), y que se utilizó en la presente tesis. Estudios realizados en el laboratorio por L.E. Soria Jasso (tesis doctoral en proceso), utilizando inmunohistoquímica y microscopía confocal, han mostrado que las células U373 MG tienen la morfología característica de los astrocitos y que expresan de manera abundante a la proteína fibrilar ácida glial.

Así mismo, A. Hernández (tesis de licenciatura en proceso), realizando experimentos de unión específica de radioligandos (*binding*), determinó una alta densidad de receptores  $H_1$  (180 fmol/mg proteína) en membranas de células U373 MG. La afinidad de dichos receptores por el antagonista  $H_1$  mepiramina (constante de disociación o  $K_D = 0.6$  nM) es muy similar a la reportada para los receptores  $H_1$  presentes en tejidos cerebrales de varias especies (Hill, 1990).

En conjunto, estos datos indican que las células U373 MG poseen naturaleza astrocítica y que expresan receptores para histamina del subtipo  $H_1$  con propiedades semejantes a los caracterizados en el cerebro del cobayo, de la rata y de células de origen glial 1321N1 (Hill and Young, 1981; Nakahata, 1986).

Se ha reportado que en las células U373 MG la histamina induce la liberación de [ $^3H$ ]GABA previamente capturado (Soria-Jasso y Arias-Montaña, 1996). El efecto de la histamina se debe a la activación de receptores  $H_1$  y a la movilización subsecuente de  $Ca^{2+}$  a partir de depósitos intracelulares, involucrando la inversión de la vectorialidad del transporte de GABA, presumiblemente por la activación del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ . Estos resultados sugieren que uno de los mecanismos por los cuales la histamina

podría regular la función del SNC es a través de la liberación del GABA previamente capturado por las células gliales.

Existe también la posibilidad de que la propia captura de GABA por parte de las células gliales sea también modulada positiva o negativamente por la activación de receptores histaminérgicos H<sub>1</sub>, los cuales tienen una localización eminentemente postsináptica (Nakahata et al., 1986; Hill, 1990; Corey et al, 1994; Tian et al., 1994; Hill et al., 1997). Esta es la hipótesis que fue abordada en el presente trabajo.

## 1.6. TRANSPORTADORES PARA GABA.

Los transportadores se encuentran en todos los tipos de células y sirven como conductos por los cuales tienen acceso a la célula nutrientes como la glucosa y los aminoácidos así como diversos iones. Sin embargo, en el SNC los transportadores forman parte de sistemas de control de la transmisión sináptica regulando la concentración y duración del efecto de los neurotransmisores en la sinapsis. En este sentido se atribuyen a los transportadores presentes en el SNC cuatro funciones básicas (Borden, 1996):

- 1) Terminación de la transmisión sináptica,
- 2) Prevención de la acumulación de los neurotransmisores en el espacio sináptico,
- 3) Secuestro del neurotransmisor para su reutilización y
- 4) Liberación posterior en procesos dependientes o independientes de calcio.

Estudios *in vitro* indican que las células gliales, y en particular los astrocitos, tiene la capacidad de capturar tanto al GABA como al ácido glutámico (Schousboe, 1977, 1978; Balcar et al., 1979; Snell, 1994), por lo que se infiere que participan en la modulación de la transmisión inhibitoria y excitadora, respectivamente, mediada por estos neurotransmisores.

En relación a la captura del GABA, el principal transmisor inhibitor del SNC, se han identificados hasta la fecha cuatro tipos de transportadores pertenecientes a la familia de transportadores acoplados a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Liu et al., 1993). Estos transportadores se encuentran principalmente en el SNC (Cuadro 2) y presentan características estructurales y funcionales que permiten diferenciarlos farmacológicamente (Borden, 1996).

Transportador de GABA	Dependencia de $\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$	Localización más abundante
GAT-1	sí	Cerebro
GAT-2	sí	Cerebro, retina, hígado
GAT-3	sí	Cerebro, retina
BGT-1	sí	Cerebro, hígado

*Cuadro 2. Transportadores de GABA. Se indican los tejidos en los cuales se expresa con mayor abundancia el transportador correspondiente (Borden, 1996).*

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los contactos de las terminales histaminérgicas con otras fibras nerviosas y con células gliales sugieren que en el SNC la histamina se comporta como neuromodulador más que como un neurotransmisor (Tagaki, et. al, 1985; Arias-Montaño y Guerrero-Serna, 1995). Sin embargo, las funciones cerebrales que son reguladas por la histamina y en particular los mecanismos por los cuales ejerce sus efectos reguladores no están aún establecidos con certeza.

Las células gliales, especialmente los astrocitos, son de gran importancia para la función sináptica (Schousboe, 1977 y 1978; Barres, 1991 y Verkhrastky et al., 1998). En células de origen glial y sobre todo en los astrocitos, se observa una alta densidad de receptores para histamina pertenecientes al subtipo  $H_1$  (Nakahata et al, 1986; Hill, 1990; Inagaki y Wada, 1994; Arias-Montaño et al, 1994; Hill et al., 1997 y A. Hernández, tesis de licenciatura en proceso), por lo que puede plantearse que la activación de dichos receptores es responsable de los efectos de la histamina. En particular, nos interesó estudiar las características del transporte de GABA en células de origen glial (cinética, dependencia de la concentración de  $Na^+$  y de GABA), su identidad farmacológica y el posible efecto de la histamina sobre la captura del transmisor, aspecto que sería de suma importancia para la modulación de la transmisión sináptica GABAérgica en el SNC.

Para el efecto se utilizó como modelo de estudio a la línea celular U373 MG, derivada de un glioma maligno humano (astrocitoma grado III, American Cell Type Collection). Estas células conservan la morfología típica de los astrocitos tipo II y estudios inmunocitoquímicos con microscopía confocal han mostrado la expresión de la proteína fibrilar ácida (GFAP), característica de células astrocíticas (Soria-Jasso y Arias-Montaño, resultados no publicados).

Las células U373 MG poseen receptores para histamina del tipo  $H_1$ , acoplados a la formación de los segundos mensajeros  $IP_3$  y diacilglicerol y por lo tanto a la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular y a la activación de la cinasa C de proteína (Hill y Young, 1981; Soria-Jasso y Arias-Montaño, 1996). La activación de la PKC puede desencadenar una serie de cambios morfofisiológicos en la célula debidos a la fosforilación de proteínas tales como receptores, transportadores y enzimas. Entre las proteínas que serían blanco de la acción de la PKC se encontrarían los transportadores de GABA (Corey et al., 1993 y Tian et al., 1994), por lo que la activación de receptores para histamina  $H_1$  podría conducir a la regulación de la captura de GABA.

Así, uno de los posibles efectos de la activación de los receptores  $H_1$  para histamina sería la regulación de la captura de GABA por parte de células de origen glial. Por lo antes señalado, en la presente tesis se estudió el transporte de GABA en las células U373 MG con base en la hipótesis que se plantea a continuación.

### 3. HIPÓTESIS.

La activación de los receptores  $H_1$  puede modular el transporte del GABA, positiva o negativamente, mediante los propios segundos mensajeros generados ( $IP_3$  y diacilglicerol) o bien por cinasas de proteína activadas por los sistemas de señalización intracelular.

## 4. OBJETIVOS.

Para el abordaje de la hipótesis propuesta se plantearon los siguientes objetivos:

### 4.1. OBJETIVOS GENERALES..

Caracterizar el transporte de GABA en células de astrocitoma humano U373 MG.

Determinar el efecto de la histamina sobre la captura del neurotransmisor.

### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES..

1. Demostrar la existencia de un mecanismo de transporte de GABA en las células U373 MG.
2. Determinar la cinética de captura de GABA.
3. Determinar la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para el sustrato y la velocidad máxima de captura ( $V_{max}$ ).
4. Identificar farmacológicamente el tipo de transportador de GABA.
5. Evaluar el efecto de la histamina sobre la captura de GABA.

## 5. MÉTODOS.

### 5.1. CULTIVO CELULAR.

Las células fueron cultivadas en una mezcla de medios DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) y F-12 (50:50%, v:v), a la que se adicionó suero fetal bovino (10%) y antibióticos (1% de una solución de penicilina-estreptomicina, 10,000 UI/ml y 10 mg/ml, respectivamente).

Las células sembradas en botellas de cultivo fueron resembradas en cajas multipozos (24) de la siguiente manera:

Después de eliminar el medio de cultivo, se lavaron las células con solución amortiguadora de fosfatos (PBS; pH 7.4). Posteriormente se despegaron y disociaron utilizando tripsina al 0.25% durante 3-4 minutos. La tripsina se inactivó con medio de cultivo conteniendo suero fetal (10%) y se centrifugó la suspensión a 90 x g por 5 min. La pastilla formada se resuspendió en medio de cultivo y se adicionó 1 ml de esta suspensión (aproximadamente 300,000 células) a cada pozo.

### 5.2. CAPTURA DE [<sup>3</sup>H]GABA.

Después de haber eliminado el medio de cultivo de cada pozo, se lavaron las células con 500 µl de solución Krebs-HEPES (Tabla 1) y posteriormente se adicionaron 300 µl de esta solución conteniendo [<sup>3</sup>H]GABA (30 nM). La captura del transmisor marcado se detuvo a los 30 min, excepto en los experimentos donde se determinó la cinética (1, 5, 10, 20, y 30 min) agregando 500 µl de Krebs-HEPES frío, aspirando la solución y lavando después 5 veces con 300 µl de la solución Krebs-HEPES fría.



Las células fueron posteriormente lisadas adicionando 300  $\mu$ l de NaOH (0.1 N) y manteniendo a temperatura ambiente durante al menos 1 h. Se neutralizó la suspensión con 300  $\mu$ l de HCl (0.1 N). La radioactividad presente en cada pozo se determinó transvasando el contenido a viales, adicionando 5 ml de líquido de centelleo (Tabla 2) y midiendo las desintegraciones por minuto (d.p.m.) en un contador de líquido de centelleo (Beckman LS 6000TA).

**Tabla 1. Composición del buffer Krebs-HEPES.**

Reactivo	Concentración Final (mM)
NaCl	127
KCl	3.73
MgSO <sub>4</sub>	1.18
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.18
CaCl <sub>2</sub>	1.8
Hepes	20
D-Glucosa	11
pH final = 7.4	

**Tabla 2. Composición del líquido de centelleo.**

Reactivo	Cantidad
POPOP	1.2 g
PPO	24.0 g
Tolueno	4 L
Tritón	2 L

### **5.2.1. Cinética de la captura de GABA.**

Para determinar la cinética de la captura de GABA se incubaron las células con [ $^3\text{H}$ ]GABA (30 nM) por periodos de 1 a 30 min. Una vez determinado el tiempo óptimo de captura, se evaluó la dependencia con respecto a la concentración de GABA, utilizando diferentes concentraciones (1–1000  $\mu\text{M}$ ) realizando diluciones de una solución de [ $^3\text{H}$ ]GABA/GABA no marcado. Para cada concentración se determinó la captura en ausencia de  $\text{Na}^+$ , la cual fue sustraída de la captura total.

### **5.2.2. Dependencia del $\text{Na}^+$ en la captura de GABA.**

Para demostrar la presencia de un transporte activo de GABA se evaluó la captura utilizando solución Krebs-HEPES normal y una solución Krebs-HEPES sin iones de  $\text{Na}^+$  (sustituídos equimolarmente por LiCl).

### **5.2.3. Caracterización farmacológica del transportador de GABA.**

Para identificar el tipo de transportador de GABA presente en las células U373 MG se utilizaron inhibidores ( $\beta$ -alanina, ácido nipecótico, guvacina y SK&F 89976-A), los cuales se incorporaron al medio de incubación 10 min antes de agregar la solución Krebs-HEPES conteniendo [ $^3\text{H}$ ]GABA (30 nM).

### **5.2.4. Caracterización del efecto de la histamina sobre la captura de GABA.**

Para evaluar la acción de la histamina sobre la captura de GABA, se incubaron las células (10- 120 min) con 100  $\mu\text{M}$  de histamina a 37°C. La histamina fue retirada del medio por lavado con la solución Krebs-HEPES antes de incubar con solución conteniendo [ $^3\text{H}$ ]GABA (30 nM). Una vez obtenida la

cinética del efecto de la histamina (ver resultados), en la mayoría de los experimentos la incubación con [ $^3\text{H}$ ]GABA correspondió a 2 h.

### 5.3. DETERMINACIÓN DE PROTEINAS.

Las células fueron lisadas con NaOH (0.1 N) como se describió anteriormente. La suspensión fue neutralizada con HCl (0.1 N) y se centrifugó a 15,000 x g durante 3 min. Se resuspendió la pastilla en 1 ml de solución Krebs-HEPES y se determinó la cantidad de proteínas presentes de acuerdo al método de Lowry et al. (1951).

### 5.4. REACTIVOS.

Los siguientes fármacos fueron obtenidos de RBI, Research Biochemicals International (Natick, MA, USA): ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), ácido nipecótico, histamina y  $\beta$ -alanina. El [ $^3\text{H}$ ] GABA (80 Ci/mmol) fue adquirido de Amersham. La guvacina y el SK&F 89976-A fueron proporcionados por el Dr. Arturo Ortega (CINVESTAV) y por el Dr. Ubaldo García (CINVESTAV), respectivamente

## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTE DE GABA.

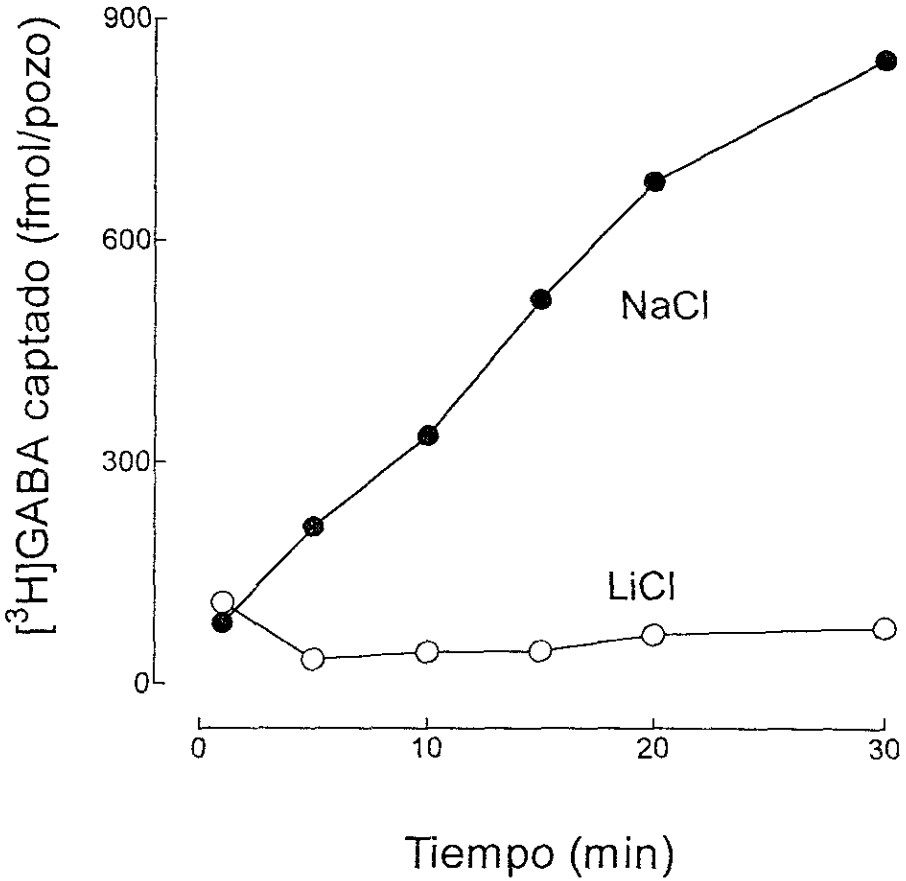
#### 6.1.1. Dependencia de iones de $\text{Na}^+$ .

En presencia del ión  $\text{Na}^+$  ( $\text{NaCl}$ ) las células U373 MG capturaron [ $^3\text{H}$ ]GABA de manera lineal en el intervalo estudiado (30 min). La substitución equimolar de  $\text{NaCl}$  por  $\text{LiCl}$  inhibió la captura en más del 90% (Gráfico 1). Así mismo, la captura de [ $^3\text{H}$ ]GABA mostró dependencia de la concentración extracelular del ión  $\text{Na}^+$ , ya que la captura disminuye conforme el gradiente  $[\text{Na}^+]_{\text{extracelular}}/[\text{Na}^+]_{\text{intracelular}}$  se reduce (gráfico 2).

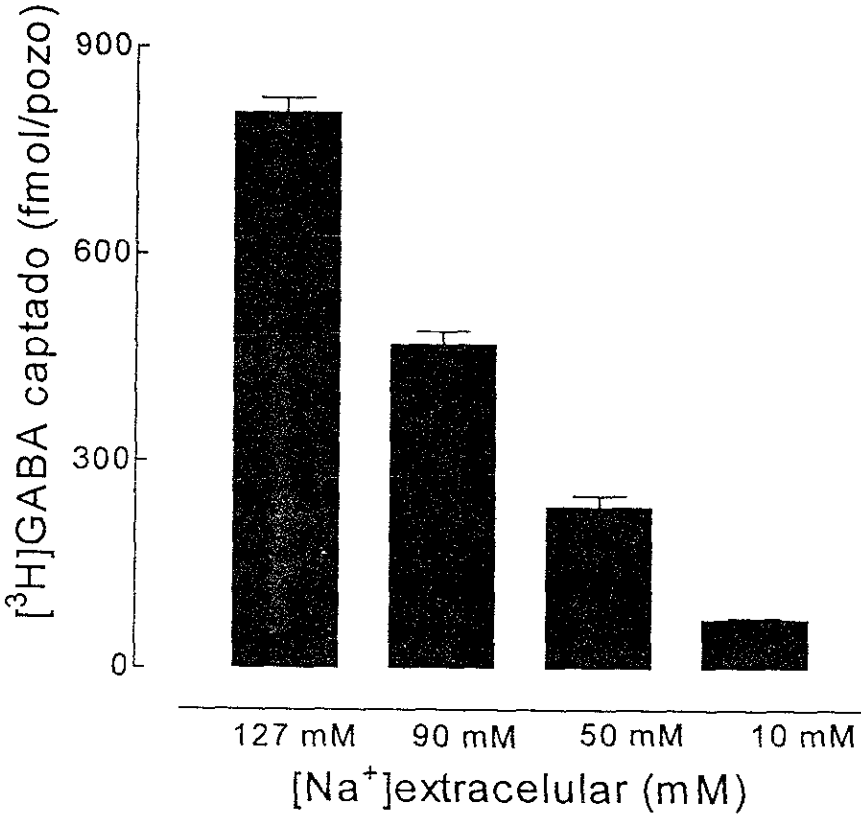
#### 6.1.2 Dependencia de la concentración de sustrato.

La captura de [ $^3\text{H}$ ]GABA dependió también de la concentración del sustrato (Gráfico 3), con un valor para la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de  $299 \pm 7 \mu\text{M}$  ( $n = 8$  determinaciones). La capacidad máxima de transporte ( $V_{\text{max}}$ ) correspondió a  $680 \pm 10$  fmoles de GABA por mg de proteína ( $n = 8$ ).

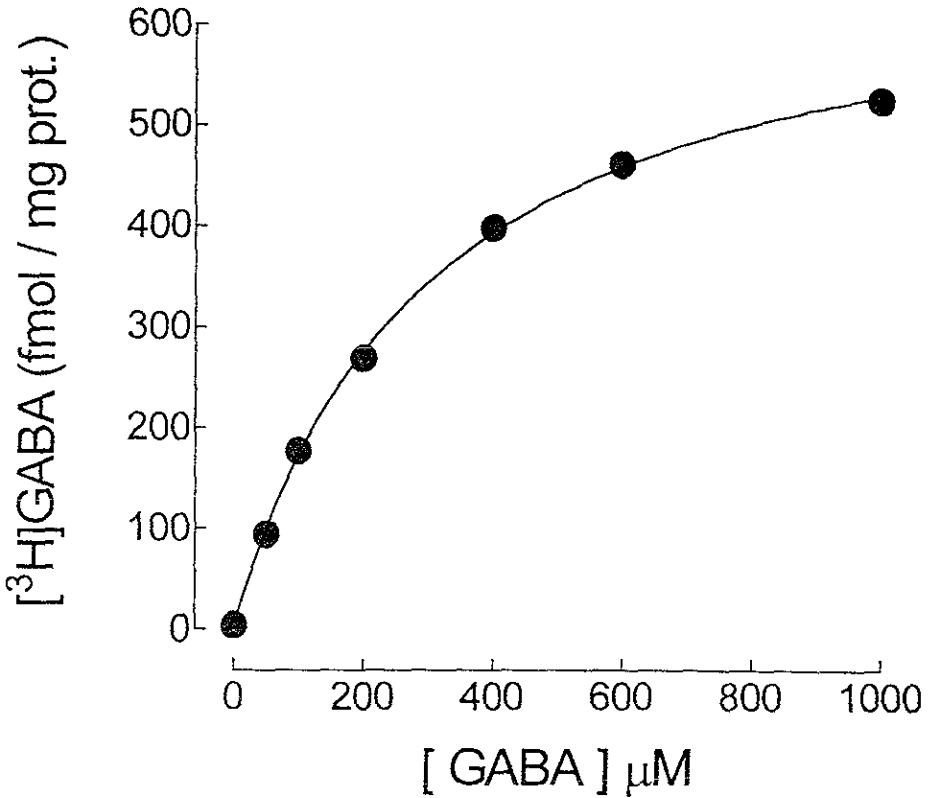
Cabe señalar que este valor corresponde solo a la captura de [ $^3\text{H}$ ]GABA. A la concentración más alta utilizada (1 mM) la relación de GABA no marcado con el [ $^3\text{H}$ ]GABA (30 nM) fue de  $\sim 33\ 000$ , por lo que puede asumirse que el transporte total de GABA es 33 000 veces el determinado para [ $^3\text{H}$ ]GABA. Así, la captura máxima total puede estimarse en  $0.75 \pm 0.01$  nmoles de GABA por mg de proteína por min.



**Gráfico 1.** *Cinética de la captura de  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  en presencia y ausencia de sodio. La gráfica corresponde a un experimento representativo de tres realizados. La captura se expresa como dpm/pozo y corresponde a los valores (promedio  $\pm$  SEM) de determinaciones por triplicado.*



*Gráfico 2. Dependencia del gradiente de sodio extracelular en la captura de [<sup>3</sup>H]GABA. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados. Los valores corresponden al promedio ± SEM de determinaciones por triplicado.*



**Gráfico 3.** Dependencia de la concentración de sustrato en la captura de  $[^3\text{H}]\text{GABA}$ . La gráfica corresponde a un experimento representativo de 8 realizados. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de determinaciones por triplicado. La captura en ausencia de  $\text{Na}^+$  fue determinada para cada concentración y se sustrajo de la captura total. La línea corresponde al ajuste a una hipérbola mediante regresión no lineal. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  se indican en el texto.

### 6.1.3. Caracterización farmacológica del transportador de GABA.

El gráfico 4 muestra el efecto de cuatro inhibidores del transporte de GABA, mismos que tienen diferentes afinidades por los transportadores clonados a la fecha. La inhibición en todos los casos dependió de la concentración y los valores de la concentración media inhibitora ( $IC_{50}$ ) obtenidos se muestran en la tabla 3, comparándolos con los reportados para la inhibición de la captura de GABA por los 4 transportadores.

**Tabla 3. Valores de  $IC_{50}$  para la inhibición de la captura de GABA.**

	Línea U373 MG	GAT1 (Rata)	GAT2 (Rata)	GAT3 (Rata)	BGT1 (Humano)
$\beta$ -alanina	2835 $\pm$ 240	2990 $\pm$ 197	66 $\pm$ 9	110 $\pm$ 40	1100 $\pm$ 66
Guvacina	1326 $\pm$ 77	39 $\pm$ 6	228 $\pm$ 38	378 $\pm$ 18	1420 $\pm$ 201
Ácido nipecótico	2551 $\pm$ 429	24 $\pm$ 6	113 $\pm$ 33	159 $\pm$ 30	2350 $\pm$ 253
SK&F 89976-A	216 $\pm$ 32	0.64 $\pm$ 0.19	550 $\pm$ 225	349 $\pm$ 151	7210 $\pm$ 36

Los valores ( $\mu$ M) obtenidos para la captura de GABA en las células U373 MG corresponden al promedio  $\pm$  SEM de los datos combinados de al menos 3 experimentos. Los datos para los transportadores clonados corresponden a los valores reportados (Tomado parcialmente de Borden, 1996).

## 6.2. EFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA CAPTURA DE GABA.

### 6.2.1. Cinética.

Con la finalidad de observar el efecto de la histamina sobre el transporte



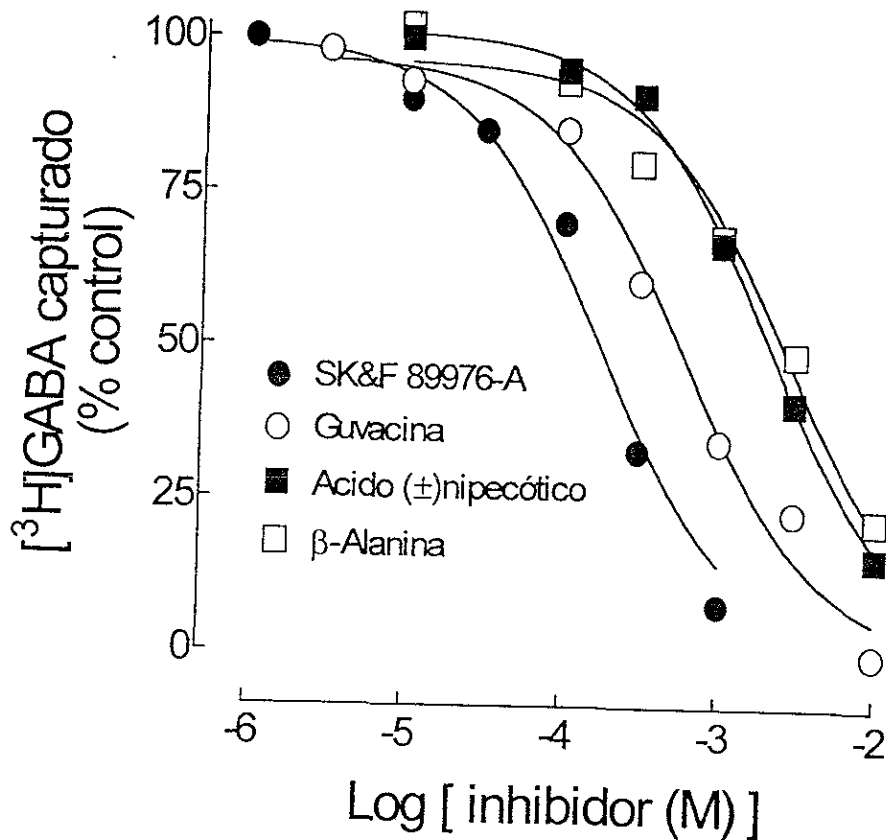


Gráfico 4. Efecto de inhibidores selectivos sobre la captura de  $[^3\text{H}]\text{GABA}$ . La gráfica corresponde a un experimento representativo de 4 realizados. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de determinaciones por triplicado y la captura se expresa como porcentaje del control (captura total menos captura en un medio sin iones de  $\text{Na}^+$ ). La línea corresponde al ajuste a una función logística mediante regresión no lineal.

de [ $^3\text{H}$ ]GABA, las células se preincubaron con 100  $\mu\text{M}$  del agonista durante 15-120 min. En estas condiciones, la captura de [ $^3\text{H}$ ]GABA aumentó de manera significativa desde los 15 min y se mantuvo durante el tiempo total de estudio, 2 h (Gráfico 5).

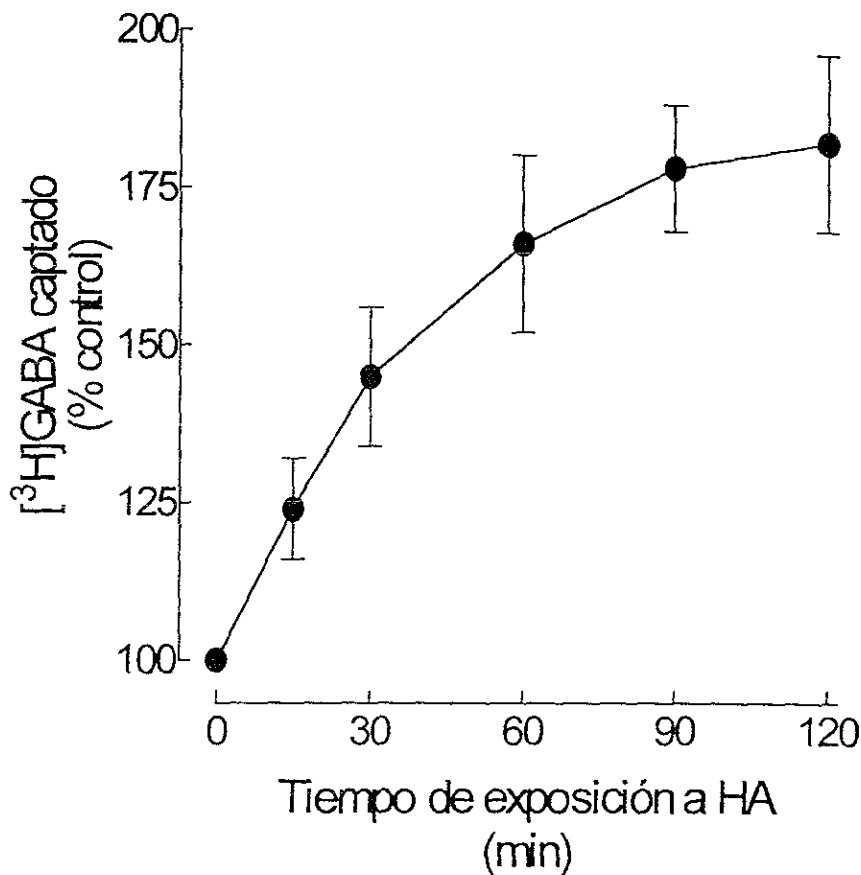
### 6.2.3. Efecto de la histamina sobre la dependencia del sustrato.

La captura de [ $^3\text{H}$ ]GABA se determinó en función de diferentes concentraciones del sustrato (1-1000  $\mu\text{M}$ ) en células preincubadas con histamina (100  $\mu\text{M}$ , 20 o 120 min) y en células control. La incubación durante 20 min con histamina no modificó significativamente la  $V_{\text{max}}$ , pero redujo la  $K_m$  por GABA ( $P < 0.05$ , prueba  $t$  de Student; Gráfico 6 y Tabla 4). En contraste, la incubación durante 120 min con histamina no modificó la  $K_m$  por el sustrato pero aumentó significativamente la  $V_{\text{max}}$  (Gráfico 7 y Tabla 4).

**Tabla 4. Efecto de la histamina sobre las constantes cinéticas ( $K_m$  y  $V_{\text{max}}$ )**

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (% control)
A) 20 min		
Control	331 $\pm$ 13	100 $\pm$ 1 (790 $\pm$ 10 fmol/mg prot.)
Histamina	252 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	103 $\pm$ 7
B) 120 min		
Control	283 $\pm$ 9	100 $\pm$ 2 (570 $\pm$ 10 fmol/mg prot.)
Histamina	287 $\pm$ 14	131 $\pm$ 4 <sup>a</sup>

Los valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM de los valores combinados de 4 experimentos. <sup>a</sup> Estadísticamente diferente del valor control ( $P < 0.05$ , prueba  $t$  de Student).



**Gráfico 5.** Efecto de la histamina sobre la captura de  $[^3\text{H}]$ GABA en relación al tiempo de exposición. La captura de  $[^3\text{H}]$ GABA se expresa como porcentaje del control. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de los datos de 4 experimentos.

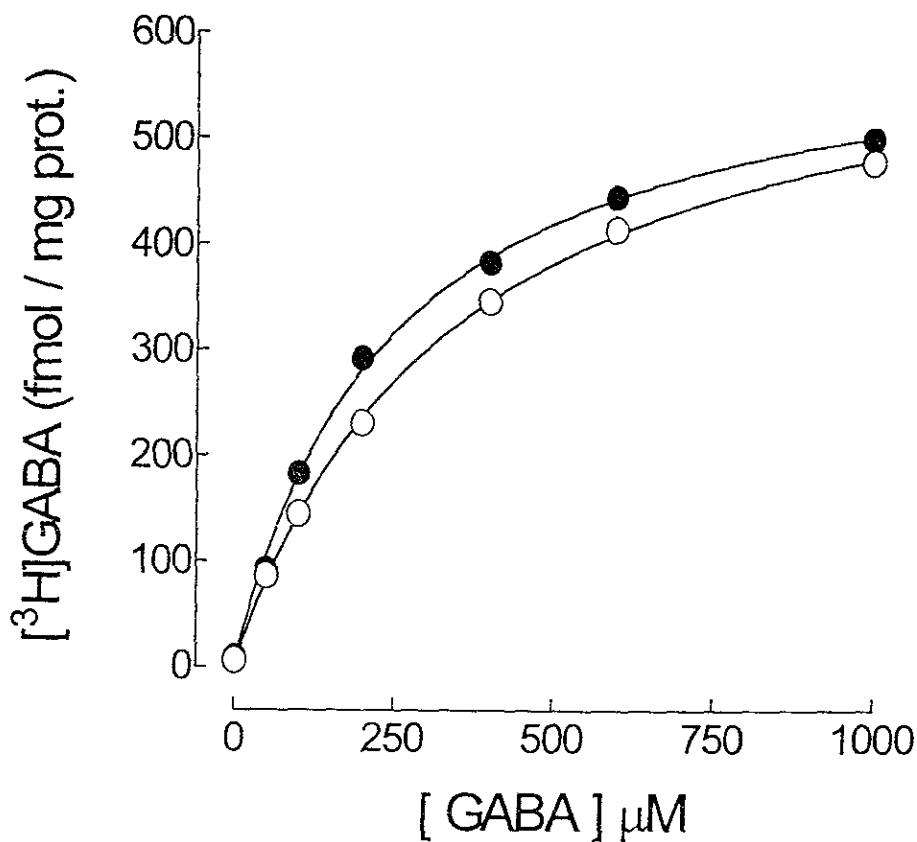


Gráfico 6. Efecto de la incubación durante 20 min con histamina sobre la captura de [<sup>3</sup>H]GABA. La gráfica corresponde a un experimento representativo de 4 realizados. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de determinaciones por triplicado. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  se muestran en la tabla 4. ● Histamina; ○ Control.

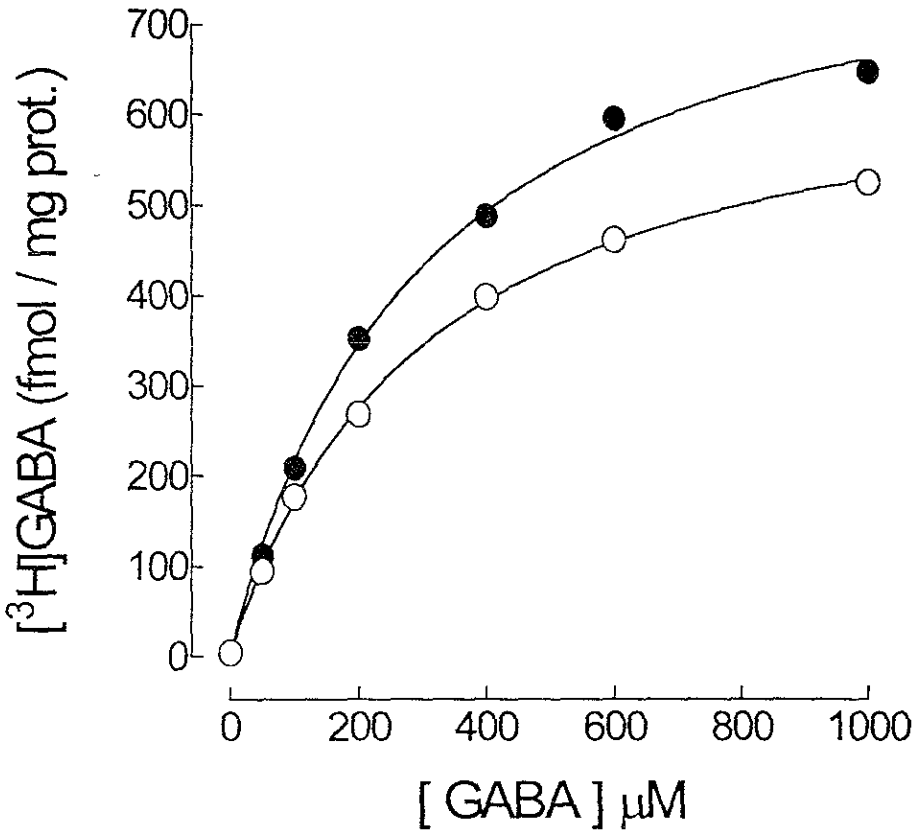


Gráfico 7. Efecto de la incubación durante 120 min con histamina sobre la captura de  $[^3\text{H}]\text{GABA}$ . La gráfica corresponde a un experimento representativo de 4 realizados. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de determinaciones por triplicado. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  se muestran en la tabla 4. ● Histamina; ○ Control.

## 7. DISCUSIÓN.

La captura de los neurotransmisores por las propias neuronas y por las células gliales circundantes a la sinápsis, es uno de los mecanismos por los cuales se regula la transmisión sináptica química. Los astrocitos son células gliales que están involucradas en una variedad de funciones entre las cuales se encuentra de manera relevante la captura de sustancias neuroactivas (Barres, 1991; Attwell y Mobbs, 1994), en particular del GABA, el principal transmisor inhibitorio del SNC (Schousboe, 1977 y 1978; Larsson et al., 1986). Esta función involucra a los astrocitos en la regulación de la transmisión sináptica química, asociándolos con funciones más complejas de las que tradicionalmente se les ha asignado.

Las células gliales poseen también receptores para varios tipos de neurotransmisores, lo cual sustenta que podrían tener roles activos en la función del SNC (Murphy y Pearce, 1987; Barres, 1991; Pellerin, 1997). La caracterización de la línea celular U373 MG, derivada de un astrocitoma humano, reveló la presencia de receptores  $H_1$  para histamina (Arias-Montaña et al., 1994), con propiedades similares a sus análogos del cerebro de mamíferos (Hill y Young, 1981).

En la línea celular U373 MG la activación de receptores  $H_1$  induce la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana dando lugar a segundos mensajeros ( $IP_3$  y diacilglicerol) y movilización de iones de  $Ca^{2+}$  a partir de depósitos intracelulares (Arias-Montaña et al., 1994; Soria-Jasso y Arias-Montaña, 1996). Lo anterior indica que las células U373 MG son un buen modelo para estudiar los efectos de la histamina mediados por receptores  $H_1$  en células gliales y sus efectos sobre la función glial.

## 7.1. ¿CAPTURAN GABA LAS CÉLULAS U373 MG?

Los transportadores de GABA pertenecen a la familia de transportadores acoplados a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , es decir, que funcionan sólo para co-transportar el complejo  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{GABA}$  (Borden, 1992; Mager et al., 1993). Al eliminar del medio extracelular al  $\text{Na}^+$  el transporte se inhibe, por lo que entra a la célula sólo el GABA que es capturado de manera pasiva por el gradiente de concentración existente (Gráfico 1).

Al modificar el gradiente de concentración de  $\text{Na}^+$  se modifica también de manera proporcional la captura de  $[\text{}^3\text{H}]\text{GABA}$  (Gráfico 2), lo que sugiere que efectivamente se encuentra involucrado un sistema de co-transporte de GABA con iones  $\text{Na}^+$  en las células U373 MG. En cuanto a la dependencia del ión  $\text{Cl}^-$ , experimentos preliminares realizados en el laboratorio, en los que el  $\text{NaCl}$  fue sustituido por metil-sulfonato de sodio, han mostrado también una dependencia importante del ión  $\text{Cl}^-$  en la captura de GABA, ya que ésta se abate prácticamente a niveles basales. En línea con lo anterior, Borden (1992) ha mostrado que la sustitución del  $\text{Cl}^-$  por acetato disminuye en 95% la captura de GABA con respecto a los valores control.

La teoría que explica el fenómeno de captura de GABA acoplado a iones es la siguiente: la unión del complejo  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{GABA}$  al transportador provoca un cambio conformacional en éste que induce la orientación del complejo hacia el espacio intracelular donde el GABA es liberado. Al concluir esta fase, el transportador retoma su conformación original y puede unirse a una nueva molécula de sustrato (Mager et al., 1993).

La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) es una medida del grado de afinidad del transportador por su sustrato. Estudios de captura de GABA en

rebanadas de la corteza cerebral de la rata, en células aisladas y en sinaptosomas revelan una multitud de transportadores con valores de  $K_m$  que se encuentran en el rango de  $2 \mu\text{M}$  a  $2 \text{mM}$  (Wood et al., 1986; Larsson et al., 1986). Nuestros resultados indicaron la presencia de un transportador con  $K_m = 299 \pm 7 \mu\text{M}$ , indicativa de una moderada afinidad por el GABA.

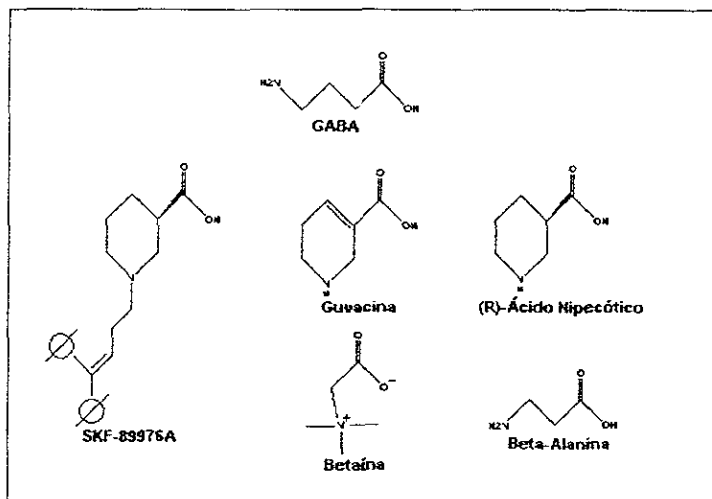
## 7.2. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DEL TRANSPORTADOR DE GABA.

Para el transportador de GABA BGT-1, clonado a partir de una genoteca humana, se han reportado valores de  $K_m$  de  $79 \mu\text{M}$  (López-Corcuera et al., 1992) y  $93 \mu\text{M}$  (Yamauchi et al., 1992). Estos valores son 3 veces menores que los encontrados en esta tesis para el transportador presente en las células U373 MG ( $K_m = 299 \pm 7 \mu\text{M}$ ). Sin embargo, los valores reportados para otros transportadores clonados (GAT-1, GAT-2 y GAT-3) son 25-30 veces menores (por ejemplo  $7 \mu\text{M}$  para GAT-1, Borden, 1996), lo que sugeriría que la captura de GABA en la línea celular U373 MG podía deberse a un transportador semejante al BGT-1. Para establecer con mayor precisión el tipo de transportador de GABA expresado por las células U373 MG, se estudió el efecto de distintos bloqueadores selectivos de la captura del transmisor.

Los transportadores pueden ser inhibidos por sustancias cuya estructura química tenga relación con la estructura que funciona como sustrato. Existen inhibidores del transporte de GABA que guardan similitud con éste en cuanto a su grupo carboxilo terminal, siendo el resto de la molécula lo que determina la afinidad a los diferentes tipos de transportadores, GAT-1, GAT-2, GAT-3 y BGT-1 (Fig. 5, Borden, 1996).



Si se compara el patrón de inhibición obtenido para el transportador presente en las células U373 MG, con los patrones reportados para los cuatro tipos principales de transportadores de GABA clonados, se observa una mayor similitud con el BGT-1 de humano (ver Tabla 3). En particular, el transportador identificado tiene una muy baja afinidad por el ácido nipecótico y por la  $\beta$ -alanina, que contrasta con la alta afinidad mostrada por el GAT-1 por el ácido nipecótico y por el GAT-2 por la  $\beta$ -alanina. El transportador GAT-3 presenta por su parte una afinidad intermedia por el ácido nipecótico, la  $\beta$ -alanina y la guvacina, mientras que el transporte de GABA en la células U373 MG muestra una afinidad baja o muy baja por los mismos fármacos. Si consideramos que la línea celular utilizada es derivada de un astrocitoma humano, resulta aceptable la identidad con el transportador BGT-1.



**Figura 5.** Estructura del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y de los fármacos inhibidores de su captura. Cada inhibidor presenta en común con el GABA un ácido carboxilo terminal, por lo que el resto de su estructura es lo que le confiere selectividad a uno o más tipos de transportadores. Tomado de Borden, 1996.

La evidencia funcional sugiere por tanto, que el transportador para GABA presente en las células de la línea U373 MG, es del tipo BGT-1 humano, sin embargo, para tener la certeza de ello sería necesario caracterizarlo molecularmente, utilizando por ejemplo anticuerpos que reconocen a los diferentes transportadores o bien oligonucleótidos que reconozcan al RNAm correspondiente. Este abordaje se realiza actualmente por M. Ruiz (Tesis doctoral en proceso), en colaboración con el Dr. A. Ortega (Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV).

### 7.3. REGULACIÓN POR HISTAMINA.

La activación de receptores para histamina provoca cambios intracelulares que regulan diversas funciones de la célula. Estos cambios son frecuentemente mediados por la fosforilación de diversas proteínas como canales iónicos, enzimas, receptores, transportadores, etc. En el caso de la regulación inducida por histamina del transporte de GABA, la modulación observada podría deberse a tres mecanismo generales:

1. Fosforilación de los transportadores membranales de GABA, modificando su conformación e incrementando la captura del transmisor.
2. Aumento del número de transportadores membranales de GABA por translocación de proteínas que pudieran estar almacenadas en membranas internas; y
3. Síntesis de nuevas proteínas transportadoras.

Así, los efectos observados dependerán del tiempo en que se produzcan los cambios. A tiempos cortos (< 15 min) es posible observar cambios debidos

sólo a fosforilación, a tiempos más largos (< 30 min) serán apreciables también cambios inducidos por movimientos de translocación, y a tiempos prolongados (> 30 min), las modificaciones pueden ser atribuidas también a síntesis de *novο* de proteínas.

La regulación por histamina dada por un estímulo de 20 min, condujo a un transporte máximo que no difirió del valor control, mientras que la afinidad por el sustrato ( $K_m$ ) se vio aumentada de manera moderada pero significativa ( $252 \pm 15 \mu M$  vs  $331 \pm 13 \mu M$ ; Gráfico 6 y Tabla 4). En contraste, cuando la incubación con histamina fue por 120 min, la relación entre constantes se invierte, no observándose cambio alguno en la  $K_m$  pero advirtiéndose un aumento significativo en la captura máxima que correspondió a  $131 \pm 4\%$  de los valores control (Gráfico 7 y Tabla 4).

Estos resultados sugieren que a los 20 min la histamina sólo ha provocado la fosforilación de los transportadores ya existentes conduciendo a un aumento en la afinidad por el sustrato. La cantidad máxima de GABA que puede ser transportada no se modifica, sugiriendo que la cantidad de transportador permanece constante.

El estímulo de 120 min con histamina, en contraste, no modificó la afinidad por el sustrato pero aumento la captura máxima de GABA, lo que sugiere que el aumento en la captura del neurotransmisor es debido a un incremento de la cantidad de transportadores funcionales presentes en la membrana celular. Este efecto puede deberse a la translocación de transportadores almacenados y/o a la síntesis de nuevos transportadores, debido a la activación de los genes correspondientes en un proceso presumiblemente mediado por los segundos mensajeros  $IP_3$  y diacilglicerol.

La fosforilación de proteínas (transportadores, enzimas, receptores, canales iónicos, etc.) se lleva a cabo por cinasas de proteínas, especialmente la PKA y la PKC dependiendo del segundo mensajero involucrado. La PKA, proteína cinasa dependiente de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), actúa cuando el segundo mensajero es AMPc, formado a partir de la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP) por el efector primario adenilil ciclasa (AC), enzima activada a su vez por proteínas  $G\alpha_s$ . Una vez formado, el AMPc se une a las subunidades reguladoras y permite la activación de las subunidades catalíticas de la PKA (Hill, 1990; Hill et al., 1997).

La PKC, proteína cinasa dependiente de diacilglicerol/ $Ca^{2+}$ /fosfolípidos, es activada por el sistema de segundos mensajeros trifosfato de inositol/diacilglicerol,  $IP_3$ /DAG. El  $IP_3$  y el DAG son formados por la hidrólisis del bifosfato de fosfatidil inositol,  $PIP_2$ , catalizada por el efector primario fosfolipasa C (PLC), la cual es activada por proteínas  $G\alpha_q/11$ . El  $IP_3$  moviliza  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares evocando la migración a membrana y activación, junto con el DAG, de la PKC (Berridge, 1993).

La histamina puede activar ambos procesos, dado que la activación de receptores  $H_1$  estimula la formación de los segundos mensajeros  $IP_3$  y DAG, mientras que la activación de los receptores  $H_2$  conduce a la formación de AMPc (Hill, 1990; Hill et al., 1997). Experimentos realizados en el laboratorio han mostrado que las células U373 MG expresan una alta densidad de receptores  $H_1$  ( $180 \pm 6$  fmol/ mg proteína) cuya afinidad por el antagonista selectivo  $H_1$ , mepiramina ( $0.61 \pm 0.10$  nM) es muy similar a la reportada para los receptores  $H_1$  presentes en el SNC de varias especies (ver Hill, 1990). Se ha demostrado también que en las células U373 MG la activación de los receptores  $H_1$  se encuentra acoplada a la hidrólisis de fosfoinosítidos y a un aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (Arias-Montaña et al., 1994; Soria-Jasso y Arias-Montaña, 1994).

Por otra parte, la histamina no induce aumento alguno en la formación de AMPc (Young et al., 1998), a pesar de existir los mecanismos necesarios ya que la forskolina así como la activación de receptores adrenérgicos  $\beta$  y para adenosina  $A_1$ , incrementan de manera importante la formación de AMPc (comunicación personal, Dr. J.M. Young, Universidad de Cambridge). Lo anterior indica que las células U373 MG no expresan receptores  $H_2$  acoplados a la estimulación de la adenilil ciclasa.

En conjunto, los datos anteriores sugieren que los efectos de la histamina sobre la captura de GABA se deben a la activación de receptores  $H_1$ . Si bien no se determinaron los mecanismos precisos, es factible postular la participación de la cinasa de proteína C (PKC) que sería activada por la formación de los segundos mensajeros  $IP_3$  y DAG, como resultado de la hidrólisis de fosfoinosítidos estimulada por la activación de receptores  $H_1$ .

La identificación de la cinasa o cinasa de proteína involucradas en la posible regulación del transporte de GABA por fosforilación está fuera de los objetivos de la presente tesis. Sin embargo, se puede plantear al respecto el uso de fármacos inhibidores o activadores de las dos principales cinasas de proteínas conocidas, la PKC y la PKA. En el caso de la PKC se podrían emplear inhibidores como la estaurosporina, el H-7, la bisindolilmaleimida y la calfoestina C, los cuales bloquean de manera directa a la enzima (Mochly-Rosen y Kauvar, 1998). Como activadores de la PKC pueden utilizarse los ésteres de forbol, que activan a la enzima al unirse al sitio para diacilglicerol.

Para descartar la participación de la PKA se contaría con inhibidores potentes como los fármacos H-1004, H-89 y Rp-cAMPS-trietilamina, los cuales antagonizan al AMPc e impiden la activación de la enzima (Parker-Botelho et al., 1988; Hidaka et al., 1984; Inagaki et al., 1985). Como activadores de la PKA son ampliamente utilizados la forskolina que es un activador directo de la adenilil

ciclasa, por lo que aumenta la formación de AMP cíclico. Otras opciones farmacológicas son los análogos permeables como el 8-Br-AMPc (Pan et al., 1994; González y Ortega, 1997; Chneiweiss et al., 1991; Laurenza et al., 1987).

Como se ha mencionado con anterioridad, la fosforilación es uno de los mecanismos más comunes de modulación celular. En particular, el estudio de la fosforilación de proteínas transportadoras de GABA o de aminoácidos excitadores (glutamato/aspartato) ha sido extendido a varios modelos experimentales. Ejemplos de estos trabajos son los de Tian et al. (1994) en sinaptosomas estriatales, de González y Ortega (1997) en cultivos primarios de la glía de Bergmann de pollo, de Casado et al. (1991, 1993) en cultivos primarios de células gliales de corteza cerebral de rata, y de Corey et al. (1993) en ovocitos de *Xenopus*. En todos estos trabajos la fosforilación de la proteína transportadora resultó en modulación (inhibición o estimulación) de la cantidad de moléculas movilizadas a través de la membrana. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5. Efecto de la fosforilación sobre el transporte de aminoácidos transmisores.**

Modelo Experimental	Neurotransmisor estudiado	Cinasa de proteína participante	Efecto de la fosforilación sobre el transporte	Referencia
Cultivos primarios de células gliales de rata	Glutamato	PKC	Aumento	Casado et al., 1991 y 1993.
Ovocitos de <i>Xenopus</i>	GABA	PKC	Aumento	Corey et al., 1993
Sinaptosomas estriatales	GABA	PKA	Disminución	Tian et al., 1994
Células gliales de Bergmann	Glutamato/ Aspartato	PKC	Disminución	González y Ortega, 1997.

Como puede observarse en la tabla 5, existen reportes contradictorios sobre el efecto de la estimulación de la PKC sobre el transporte de glutamato en células gliales, ya que Casado et al. (1991, 1993) reportan un efecto estimulador en cultivos primarios de células gliales de rata, mientras que en células de la glía de cerebelo (Bergmann) de pollo, González y Ortega (1997) reportaron que el éster de forbol TPA, que activa directamente a la PKC, disminuye la actividad del transportador de aspartato/glutamato. La diferencia en resultados podría deberse al tipo celular estudiado y/o a la presencia de diferentes transportadores en los sistemas analizados.

En el caso del GABA, la PKC estimula el transporte del mismo en ovocitos de *Xenopus* transfectados con el transportador GAT-1 (Corey et al., 1993), mientras que la activación de la PKA produce el efecto opuesto sobre la captura en sinaptosomas del estriado (Tian et al., 1994), donde la captura del neurotransmisor se debería a las terminales de los axones recurrentes de las neuronas GABAérgicas de proyección.

En resumen, nuestros resultados muestran que las células U373 MG capturan GABA y que este proceso se debe un transportador identificado farmacológicamente como BGT-1. Los datos de la presente tesis muestran también que la histamina puede estimular el transporte de GABA, presumiblemente por activación de la PKC.

Debido a su homogeneidad y facilidad de cultivo, así como a la conservación de las características de los astrocitos, la línea celular U373 MG puede ser en consecuencia un modelo útil para estudiar con mayor detalle la modulación del o los transportadores de GABA presentes en células gliales.

## 8. CONCLUSIONES

1. La línea celular glial U373 MG, derivada de un astrocitoma humano, expresa un transportador de GABA con una moderada afinidad por el sustrato ( $K_m$ ,  $299 \pm 7 \mu M$ ) pero con una muy alta capacidad de captura ( $V_{max}$ ,  $0.75 \pm 0.01$  nmoles de GABA por mg de proteína por minuto).
2. Las características farmacológicas de la captura de GABA en las células U373 MG permiten identificar al transportador responsable como BGT-1.
3. La histamina estimula la captura de GABA en las células U373 MG. Exposiciones cortas a la histamina aumentan la afinidad por el sustrato, sugiriendo un efecto sobre los transportadores presentes en la membrana, mientras que exposiciones mayores aumentan la captura máxima del neurotransmisor indicando un aumento en el número de transportadores, ya sea por movilización de proteínas ya sintetizadas o bien por estimulación de la síntesis de nuevos transportadores.
4. Los efectos de la histamina se deberían a la activación de receptores  $H_1$  cuya activación conduce a la formación de los segundos mensajeros 1,4,5-trifosfato de inositol y diacilglicerol. En consecuencia, es posible plantear que los efectos de la histamina sobre el transporte de GABA podrían deberse a los efectos de la cinasa C (PKC) activada por los productos de la hidrólisis de fosforositidos.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Arias-Montaño, J.A., Berger, V., Young, J.M. (1994). Calcium-dependence of histamine- and carbachol-induced inositol phosphate formation in human U373 MG astrocytoma cells: comparison with HeLa cells and brain slices. *Br. J. Pharmacol.* 111: 598-608.
2. Arias-Montaño, J.A., Guerrero-Serna, M.G. (1995) Neuromodulación: una nueva función para la histamina. *Revista Biomédica* 6: 222-236.
3. Arrang, J.M., Garbarg, M. (1983) Auto-inhibition of brain histamine release by a novel class (H<sub>3</sub>) of histamine receptor. *Nature* 302: 832-837.
4. Arrang, J.M., Garbarg, M. (1987) Auto-inhibition of histamine synthesis is mediated by presynaptic H<sub>3</sub>-receptors. *Neurosci.* 23: 149-157.
5. Attwell, D., Mobbs, P. (1994). Neurotransmitter transporters. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 353-359.
6. Balcar, V., Mark, J., Borg, J., Mandel, P. (1979). High-affinity uptake of  $\gamma$ -aminobutyric acid in cultured glial and neuronal cells. *Neurochem. Res.* 4:3, 339-354.
7. Barres, B. (1991). New roles for Glia. *J.Neurosc.* 11(12): 3685-3694.
8. Berridge, M. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361: 315-361.
9. Borden, L., Smith, K., Hartig, P., Branchek, T., Weinschank, R. (1992). Molecular heterogeneity of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transport system. *J. Biol. Chem.* 267(29): 21098-21104.
10. Borden, L. (1996). GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem. Int.* 29(4): 335-356.
11. Bruns, R.F., Miller, F.D., Merriman, R.L., Howbert, J.J., Heath, W.F., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T., Nakano, H. (1991). Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:288-293.
12. Casado, M., Zafra, F., Aragón, C., Gimenez, C. (1991). Activation of high-affinity uptake of glutamate by phorbol esters in primary glial cell cultures. *J. Neurochem.* 57: 1185-1190.

13. Casado, M., Bendahan, A., Zafra, F., Danbold, N., Aragón, C., Gimenez, C., Kanner, B. (1993). Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268:27313-27317.
14. Corey, J., Davidson, N., Lester, H., Brecha, N., Quick, M. (1994). Protein kinase C modulates the activity of a cloned  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus Oocytes* via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J. Biol. Chem.* 269: 14759-14767.
15. Chneiweiss, H., Cordier, J., Glowinski, J. (1991). Cyclic AMP accumulation induces a rapid desensitization of the cyclic AMP-dependent protein kinase in mouse striatal neurons. *J. Neurochem.* 57: 1708-1715.
16. Endou, M., Poli, E., Levi. (1994). Histamine  $H_3$ -receptor signalling in the heart: possible involvement of Gi/Go proteins and N-type  $Ca^{2+}$  channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 35: 3239-32466.
17. García, M., B. Florán, J.A. Arias-Montaño, J. Aceves, J.M. Young (1997) Histamine  $H_3$  receptor activation selectively inhibits dopamine  $D_1$  receptor-dependent [ $^3H$ ]GABA release from depolarisation-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 80: 241-249.
18. González, M., Ortega, A. (1997). Regulation of the  $Na^+$ -dependent high affinity glutamate/aspartate transporter in culture Bergmann glia by phorbol esters. *J. Neurosci. Res.* 50: 585-590.
19. Hernández-Angeles, A. Tesis de Licenciatura en proceso. CINVESTAV.
20. Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., Sasaki, Y. (1984): Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinases C. *Biochem.* 23: 5036-5041.
21. Hill, S., Young, J. (1981). Characterization of [ $^3H$ ]mepyramine binding to the longitudinal muscle of guinea-pig small intestine. *Mol. Pharmacol.* 19: 379-387.
22. Hill, S. (1990). Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol. Rev.* 42: 46-83.
23. Hill, S., Ganellin, C.R., Timmerman, J., Schwartz, J.C., Shankley, P., Young, J.M., Schunack, W., Levi, R., Hass, H.L. (1997). Classification of histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 49: 339-354.
24. Inagaki, M., Watanabe, M., Hidaka, H. (1985). N-(2-aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide, a newly synthesized protein kinase inhibitor,

- functions as a ligand in affinity chromatography. Purification of Ca<sup>2+</sup>-activated, phospholipid-dependent and other protein kinases. *J. Biol. Chem.* 260: 2922.
25. Inagaki, N., Fukui, H., Taguchi, Y., Wang, N.P., Yamatodani, N.A., Wada, H. (1989) Characterization of histamine H1-receptor on astrocytes in primary culture: [<sup>3</sup>H]-mepyramine binding studies. *Eur. J. Pharmacol.* 173: 43-51.
26. Inagaki, N., Wada, H. (1994). Histamine and prostanoid receptors on glial cells. *Glia* 11:102-109.
27. Kandel, E. Schwartz, J., Jessel, T. (1991). Principles of neural science. 3ª edición. Elsevier. pp. 123-134, 329-959.
28. Larsson, O.M., Griffiths, R., Allen, I., Schousboe, A. (1986). Mutual inhibition kinetic analysis of  $\gamma$ -aminobutyric acid, taurine, and  $\beta$ -alanine high-affinity transport into neurons astrocytes: evidence for similarity between the taurine and  $\beta$ -alanine carriers in both cell types. *J. Neurochem.* 47: 426-432.
29. Laurenza, A., Khandelwal, Y., De Souza, N.J., Rupp, R.H., Metzger, H., Seamon, K.B. (1987). Stimulation of adenilate cyclase by water-soluble analogs of forskolin. *Mol. Pharmacol.* 32:133-139.
30. Leurs, R., Smit, M.J., Timmerman, H. (1995). Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol. Ther.* 66: 519-527.
31. Liu Q-R et al. (1991). Molecular characterization of four pharmacologically distinct gamma-aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J. Biol. Chem.* 268: 2106-2112.
32. López-Corcuera, B., Liu, Q., Mandiyan, S., Nelson, H., Nelson, N. (1992). Expression of a mouse brain cDNA encoding novel  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter. *J. Biol. Chem.* 267:17491-17493.
33. Lowry, H., Rosebrough, N., Farr, L., Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
34. Mager, S., Naeve, J., Quick, M., Labarca, C., Davidson, N., Lester, H. (1993). Steady states, charge movements, and rates for cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* Oocytes. *Neuron* 10: 177-188.
35. Mochly-Rosen, D., Kauvar, L.M., 1998. Modulating protein kinase C signal transduction. In: August, J.T., Anders, M.W., Murad, F., Coyle, J.T. (Eds.) *Advances in Pharmacology*. Vol. 44, Academic Press, New York, pp. 91-145.

36. Murphy, S., Pearce, B. (1987) Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neurosci.* 22: 381-394.
37. Nakahata, N., Martin, M., Hughes, A., Hepler, J., Harden, K. (1986). H<sub>1</sub>-histamine receptors on human astrocytoma cells. *Mol. Pharmacol.* 29: 188-195.
38. Panula, P., U. Pirvola, S. Auvinen, M.S. Airaksinen (1989). Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neurosci.* 28: 586-610.
39. Parker-Botelho, L.H. (1988). cAMP analog antagonist of cAMP action. *Methods Enzimol.* 159:159-172.
40. Pellerin, L. Stolz, M., Sorg, O., Martin, J.L., Descheppe, C.F., Magistretti, P.J. (1997). Regulation of energy metabolism by neurotransmitter in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *Glia* 21: 74-83.
41. Schosusboe, A., Svenneby, G. (1977). Uptake and metabolism of GABA in astrocytes cultered from dissociated mouse brain hemispheres. *Neurochem. Res.* 2: 217-229.
42. Schosusboe, A., Krogsgaard-Larsen, P., Svenneby, G., Hertz, L. (1978). Inhibition of the high-affinity, net uptake of GABA into cultered astrocytes by  $\beta$ -proline, nipecotic acid and another compounds. *Brain Res.* 153: 623-626.
43. Schwartz, J.C., Arrang, J.M. Garbarg, M., Pollard, H., Ruat, M. (1991). Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol. Rev.* 71: 1-51.
44. Snell, R. (1994). Neuroanatomía clínica. 3a. edición. Iberoamericana, México. pp. 73-85.
45. Soria-Jasso, L.E., Arias-Montaño, J.A. (1996). Histamina H<sub>1</sub> receptor activation stimulates [<sup>3</sup>H]GABA release from human astrocytoma U373 MG cells. *Europ. J. Pharmacol.* 318: 185-192.
46. Soria-Jasso, L.E., Arias-Montaño, J.A. (1997). Señalización intracelular por segundos mensajeros. *Curso internacional precongreso. Actualización en Fisiología.* pp 85-104.
47. Soria-Jasso, L.E. Tesis doctoral en proceso. CINVESTAV.
48. Young, K., Pinnock, W., Gibson, W., Young, J.M. (1998). Dual effects of histamine and substance P on intracellular calcium levels in human U373 MG astrocytoma cells: role of kinase C. *Br. J. Pharmacol.* 123: 545-557.

49. Takagi, H., Y. Morishima, T. Matsuyama, H. Hayashi, T. Watanabe, H. Wada (1986). Histaminergic axons in the neostriatum and cerebral cortex of the rat: a correlated light and electron microscopic immunocytochemical study using histidine decarboxylase as a marker. *Brain. Res.* 364: 114-123.
50. Tian, Y., Kapatos, G., Granneman, J., Bannon, M. (1994). Dopamine and  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters: differential regulation by agents that promote phosphorylation. *Neurosci. Lett.* 173: 143-146.
51. Traiffort, E., Pollard, H., Moreau, J., Ruat, M., Schwartz, J., Martínez-Mir, M. and Palacios, J. (1992). Pharmacological characterization and autoradiographic localization of histamine  $H_2$ -receptors in human brain identified with  $^{125}I$ -iodoaminopotentidine. *J. Neurochem.* 59: 290-299.
52. Verkhatsky, A, Orkand, R, and Kettenmann H, 1998. Glial calcium: Homeostasis and signaling function. Department of Cellular Neuroscience, Mar-Delbrück for Molecular Medicine, Beln-Buch, Germany, and Institute of Neurobiology, University of Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico. *Physiol. Rev.* 78: 99-141.
53. Wada H, Inagaki, N, Yamatodani, A, Watanabe, T. 1991. Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole brain activity?. *Trend Neurosci.* 14:415-418.
54. Wood, J., Sidhu, S. (1986). Uptake of  $\gamma$ -aminobutyric acid by brain tissue preparations: a reevaluation. *J. Neurochem.* 46: 739-744.
55. Yamauchi, A., Uchida, S., Kwon, H., Preston, A., Robey, R., García-Perez, A., Burg, M., Handler, J. (1992). Cloning of a  $Na^+$  and  $Cl^-$  dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J. Biol. Chem.* 267: 649-652.