

37
rej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

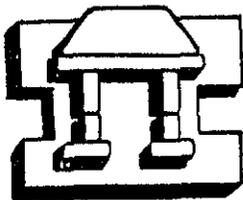
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

EFFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA PROLIFERACION DE UNA
LINEA CELULAR DERIVADA DE UN ASTROCITOMA HUMANO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
ADRIANA HERNANDEZ ANGELES

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE ANTONIO ARIAS MONTAÑO



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA

ABRIL DE 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27 6830



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LA VERDADERA META

**Señalate metas elevadas, esfuérzate
por alcanzarlas, empeñate por lograr
rápida y correctamente lo que ambicionas.**

**Sueña con ello, vive para ello, lucha por ello,
sé constante y fiel a ti mismo, y tan seguro como
que hay estrellas en el cielo, llegarás a tiempo a
la verdadera meta de la vida.**

Herman Hitz.

INDICE

	Pag.
Resumen	i
Lista de abreviaturas	iii
1.- Antecedentes	
1.1.- Introducción	1
1.2.- Inervación histaminérgica del Sistema Nervioso Central	2
1.3.- La histamina como neuromodulador	3
1.4.- Receptores para histamina	5
1.4.1.- Receptores H1	5
1.4.2.- Receptores H2	6
1.4.3.- Receptores H3	7
1.5.- Células gliales	9
1.6.- Histamina y proliferación de células gliales	11
2.- Planteamiento del problema	13
3.- Objetivos	15
4.- Métodos	
4.1.- Cultivo celular	16
4.2.- Unión de [³ H]mepiramina a membranas celulares	16
4.3.- Formación de fosfatos de [³ H]inositol	17
4.4.- Determinación de la concentración de calcio intracelular	18
4.5.- Determinación de la incorporación de [³ H]timidina	19
4.6.- Análisis de resultados	19
4.7.- Materiales	19

5.- Resultados	
5.1.- Unión de [³ H]mepiramina a membranas de células U373MG	21
5.2.- Formación de fosfatos de inositol ([³ H]IPs) en células U373MG	21
5.3.- Movilización de calcio intracelular por histamina	24
5.4.- Efecto de la histamina sobre la incorporación de [³ H]timidina	24
5.5.- Efecto de los activadores e inhibidores de la PKC sobre la incorporación de [³ H]timidina	27
6.- Discusión	33
6.1.- Características de los receptores H ₁ presentes en las células U373MG	34
6.2.- Histamina y la proliferación de las células gliales	34
6.3.- Posibles mecanismos del efecto proliferativo de la histamina	36
6.4.- PKC y la proliferación celular	39
7.- Conclusiones	43
8.- Bibliografía	44

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres Juan y María, por que sin ustedes y sin su apoyo no hubiera podido salir adelante ni realizar este sueño, gracias por todo lo que me han dado, pero sobre todo por respetar y apoyar cada una de mis desiciones.

A mis hermanos, Juan Luis, Ricardo y Erika, por soportarme.

A toda mi familia, por que siempre me ha apoyado y consentido, en especial a mis abuelitas Rosa y Esperanza y a mis tías, Rosa María, Martina, Albina, Malena.

A mis tíos Gerardo, Jorge, Pablo, Alfonso y Roberto.

A mis tíos Camilo y Benita.

A todos mis primos.

A mis compañeros de la carrera, en especial al original grupo 3 de la generación 1994 y a todos los que conocí durante el trayecto de la misma en especial a : Mario, Bety, Erika, Linda, Sergio, Ramsés, Daniel, Elizabeth, Julisa, Oliver, Oscar, Luis, Adriana y José Luis, Alejandra, por los agradables momentos que compartimos juntos, sobre todo por los gratos recuerdos de nuestras salidas al campo.

A mis amigas, Jimena, Mónica y Dolores, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por soportarme y creer en mí.

Al Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, del CINVESTAV- IPN.
Por las facilidades otorgadas para la realización de la presente tesis.

A mis compañeros del famosísimo laboratorio 4: Ricardo, Enriquito, Daniel, Alex y Tere, porque siempre me hicieron sentir parte del equipo y en especial a Enrique Soria, por su ayuda en la realización de los experimentos.

A mi asesor, Dr. José Antonio Arias M., por su paciencia y disposición a resolver cada una de mis dudas.

A Mary Quintanar, por sus porras, atenciones y por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo.

A Olga, Alicia y Nacho por todo lo que me ayudaron de una u otra forma en la realización de los experimentos, pero sobre todo por ser buenos compañeros.

A todos los profesores que han contribuido en mi formación como profesional.

Al Dr. Fernando García Hernández, por que sus clases me sirvieron para decidir mi futuro profesional, por creer en mí y lograr que no perdiera la confianza en mí misma.

Finalmente a mis revisores de tesis, profesora Martha Salcedo, Dr. Othon Hernández, Dr. Diego Arenas y al Dr. Arturo Baiza, por sus opiniones y sugerencias.

Gracias a todos por creer en mí y en este trabajo.

ADRIANA.

DEDICATORIA.

Con cariño para mis padres.

RESUMEN

La **histamina** está ampliamente distribuida en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos y diversas evidencias indican que tiene una función importante como neuromodulador. Farmacológicamente los **receptores** para histamina se clasifican en tres subtipos denominados H_1 , H_2 y H_3 , acoplados a diferentes mecanismos de transducción de señales. Por otra parte, la lesión al tejido cerebral de cualquier etiología induce un proceso denominado gliosis reactiva, caracterizada por la hipertrofia y la hiperplasia de células gliales, principalmente de los **astrocitos**.

Con base en lo anterior y utilizando como modelo de estudio a la línea celular U373-MG, derivada de un **astrocitoma** humano, el objetivo de la presente tesis fue determinar el efecto de la histamina en la **proliferación** de las células de origen glial y establecer los mecanismos celulares involucrados. Para evaluar la proliferación celular se determinó la incorporación de [3H]timidina al DNA celular.

Los resultados obtenidos indican que las células U373-MG expresan receptores del subtipo H_1 con una densidad (B_{max}) de 180 ± 6 fmol.mg de proteína y una constante de disociación (K_d) para el antagonista H_1 mepiramina de 0.61 ± 0.10 nM. Estos receptores están acoplados a la producción de fosfatos de inositol (EC_{50} para la histamina de 2.8 ± 0.4 μ M, efecto máximo de $495 \pm 12\%$ de la basal), así como a la movilización de calcio intracelular (incremento de 344 ± 22 nM sobre una basal de 118 ± 6 nM). La histamina estimuló la incorporación de [3H]timidina ($169 \pm 5\%$ de la basal con 100 μ M del agonista; EC_{50} , 3.4 ± 1.0 μ M). Este efecto fue bloqueado por la mepiramina (1 μ M), pero no por ranitidina o tioperamida, antagonistas de los receptores H_2 y H_3 , respectivamente. El TPA (un activador de la cinasa C de proteína, PKC)

estimuló también la proliferación celular, pero de manera no aditiva al efecto de la histamina. Dos antagonistas de la PKC (estaurosporina y H-7) disminuyeron la incorporación basal de [³H]timidina (inhibición de $87 \pm 4\%$ y $81 \pm 6\%$, respectivamente), previniendo su utilización como herramientas farmacológicas para analizar la función de la PKC.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que la línea celular U373-MG expresa una alta densidad de receptores para histamina del subtipo H₁, acoplados a la producción de fosfatos de inositol y a la movilización de calcio intracelular. La activación de estos receptores estimula la incorporación de [³H]timidina, lo que indica un efecto mitogénico de la histamina en las células de origen glial, sugiriéndose la participación de la PKC en dicho efecto.

ABREVIATURAS

AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
[Ca²⁺]_i	Concentración intracelular de calcio
DAG	Diacilglicerol
EC₅₀	Concentración efectiva media
GABA	Acido γ -aminobutírico
IPs	Fosfatos de inositol
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
Kd	Constante de disociación
PKA	Cinasa A de proteína
PKC	Cinasa C de proteína
PIP₂	4,5-bifosfato de fosfatidil inositol
SNC	Sistema Nervioso Central
S.E.M.	Error estándar de la media
TPA	12-tetradecanoil-13-acetato de forbol

1. ANTECEDENTES

1.1. INTRODUCCION

La histamina fue aislada de diversos tejidos biológicos desde hace aproximadamente 60 años y desde entonces se han investigado sus efectos farmacológicos, principalmente en los tejidos periféricos no neurales. Avances recientes en el estudio de la función de la histamina han incluido estudios con ligandos radioactivos que han permitido el reconocimiento de sus receptores, así como el análisis de los efectos de la estimulación de dichos receptores en los procesos de señalización intracelular y sus consecuencias en la función de las células.

La histamina se encuentra presente en casi todos los tejidos y se le ha asignado un papel como mediador u hormona local. Sin embargo, no en todos los tejidos la histamina es liberada por los mastocitos y dependiendo de las especies, puede ser detectada en basófilos, plaquetas, células endoteliales y neuronas. Existen evidencias de que la síntesis de la histamina puede ser inducida y que incluso puede ser almacenada, lo que sugiere funciones alternativas para el transmisor.

La histamina está ampliamente distribuida en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, y existen fuertes evidencias de que tiene un papel como neurotransmisor o neuromodulador, encontrándose presente en compartimientos neuronales y no neuronales. Estudios inmunohistológicos 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 actividad locomotora, la percepción del dolor, la ingestión de agua y alimentos, la homeostasis

cardiovascular y las conductas sexual, de defensa y de agresión, así como la regulación de la temperatura y mecanismos de control neuroendocrino (Schwartz et al., 1991).

Por otra parte, la lesión de cualquier etiología (traumáticas, infecciosas, isquémicas, etc.) al tejido cerebral induce un proceso denominado gliosis reactiva, caracterizado por hiperplasia e hipertrofia de las células gliales y por la presencia de abundantes astrocitos reactivos (Norton et al., 1992; Amat et al., 1996). Datos recientes indican que la mayoría de los astrocitos en proliferación derivan de astrocitos pre-existentes, indicando un proceso activo de replicación celular (Amat et al., 1996) en respuesta a mediadores químicos diversos como las citocinas.

Dado que se ha reportado la presencia de sus receptores en los astrocitos, la presente tesis abordó el estudio de la posible función de la histamina en la regulación de la proliferación de células de origen glial, lo que sería relevante para la comprensión de los procesos inflamatorios que se presentan en el SNC en respuesta a lesiones diversas.

1.2. INERVACION HISTAMINERGICA DEL SNC

Localización de las neuronas histaminérgicas.

Los cuerpos celulares de las neuronas histaminérgicas se encuentran localizadas en una reducida área del cerebro, en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo. En el cerebro de la rata, donde se ha estudiado con mayor detalle su distribución, las neuronas histaminérgicas se encuentran en cinco grupos denominados E1 a E5 (Wada et al., 1991).

Vías aferentes y eferentes del sistema histaminérgico.

Las neuronas histaminérgicas reciben aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral y del septum, y envían axones a prácticamente todo el SNC. La inervación histaminérgica ha sido estudiada mediante técnicas inmunocitoquímicas utilizando anticuerpos contra la histamina y contra la enzima responsable de su síntesis, la descarboxilasa de histidina (Watanabe et al., 1984; ver revisiones de Arias-Montaño y Guerrero, 1995 y de Wada et al., 1991).

Síntesis y degradación de la histamina.

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).

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.

1.3. LA HISTAMINA COMO NEUROMODULADOR

Los axones de las células histaminérgicas poseen varicosidades múltiples, la mayoría de las cuales establecen contacto con elementos neuronales (somas, axones o terminales nerviosas; Takagi et al., 1986), pero

sólo unos cuantos de estos contactos sinápticos muestran características de sinapsis verdaderas, lo que ha llevado a postular que en el SNC la histamina es un neuromodulador y no un neurotransmisor.

El término neuromodulador denota a una sustancia química capaz de modificar la excitabilidad de las células neuronales en las que existen receptores para dicha sustancia, mediante mecanismos bioquímicos (como la formación de segundos mensajeros) y/o electrofisiológicos (la apertura o el cierre de canales iónicos). En consecuencia, un neuromodulador no origina por sí mismo respuestas postsinápticas que conduzcan a la generación y propagación de potenciales de acción, sino que modula, a nivel pre y postsináptico y facilitando o inhibiendo, los efectos trans-sinápticos de los neurotransmisores que actúan sobre la misma célula.

La histamina es liberada al espacio extracelular por la terminal nerviosa en respuesta a la despolarización (mimetizada experimentalmente con estimulación eléctrica o concentraciones elevadas del ion potasio), de manera dependiente de la concentración extracelular de iones Ca^{2+} así como de la temperatura, en un proceso que es inhibido por iones de Mg^{2+} . En conjunto, estos datos indican que la exocitosis es el principal mecanismo responsable de la liberación del neuromodulador (Schwartz et al., 1991; ver también Arias-Montaña y Guerrero, 1995).

Una vez liberada, la histamina difunde hacia las células vecinas activando a los receptores presentes en un número variable de neuronas y otras células, y cabe destacar que las varicosidades de las fibras histaminérgicas establecen también contacto con células gliales, vasos sanguíneos de bajo calibre y capilares (Takagi et al, 1986; Hill, 1990).

1. 4. RECEPTORES PARA HISTAMINA

Los receptores histaminérgicos han sido divididos en tres subtipos denominados H₁, H₂ y H₃ (Hill., 1990; Hill et al., 1997), con base en estudios cuantitativos *in vitro*, en tejidos periféricos aislados y en diferentes preparaciones de tejidos cerebrales (rebanadas, sinaptosomas y membranas). Los receptores histaminérgicos fueron clasificados inicialmente por Ash y Shild en 1966, quienes introdujeron el término H₁ para designar a los receptores bloqueados por bajas concentraciones de los antihistaminicos clásicos como la mepiramina.

1.4.1 Receptores H₁.

El estudio de la distribución y las propiedades bioquímicas del receptor H₁ ha sido posible en gran medida por el desarrollo de ligandos radioactivos que permiten el reconocimiento del receptor. El primer radioligando selectivo para el receptor H₁ ([³H]mepiramina) fue introducido en 1977 para identificar a los receptores H₁ del músculo liso longitudinal del íleon (Hill et al., 1977). Siguiendo este reporte inicial, los sitios de unión para ligandos H₁ han sido demostrados en un gran número de tejidos incluyendo el cerebro de los mamíferos, la retina, el intestino, el sistema genitourinario, la médula adrenal, el hígado, las células endoteliales, las células de origen glial y los linfocitos (Hill, 1990).

El principal antagonista selectivo del receptor H₁ es la mepiramina, dada su alta afinidad (constante de disociación o K_d = 0.8 nM). Muchos antagonistas del receptor H₁ cruzan la barrera hematoencefálica, siendo la temelastina uno de los más potentes con una K_d de 0.3 nM. De manera opuesta a lo que ocurre para los antagonistas, el receptor H₁ tiene baja afinidad por los agonistas, siendo la 2-metilhistamina, la 2-tiazoliletilamina, la 2-piridiletilamina y la betahistamina los agentes más comúnmente usados como agonistas H₁ (Hill et al., 1997).

El análisis autoradiográfico del receptor H_1 ha sido también posible mediante el uso de [3H]mepiramina, debido a su baja velocidad de disociación, permitiendo establecer la distribución de dichos receptores en el cerebro de la rata y del cobayo, así como en la espina dorsal de los primates.

Mecanismos de transducción de señales.

La estimulación de un amplio número de receptores de superficie induce un incremento en los niveles intracelulares de calcio, evento asociado con la hidrólisis de fosfolípidos de membrana por una enzima, la fosfolipasa C, activada por proteínas G del tipo $G_{\alpha q}$. En diversos tejidos la estimulación de los receptores H_1 induce la hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidil-inositol (PIP_2) conduciendo a la formación de dos segundos mensajeros, el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y el diacilglicerol (DAG; Hill et al., 1997).

El IP_3 , liberado al citosol, moviliza iones de Ca^{2+} que se encuentran almacenados en depósitos intracelulares mientras que el DAG es retenido en la membrana, donde activa a la proteína cinasa C (PKC), ya sea por sí mismo o en una acción sinérgica con los iones de Ca^{2+} liberados por el IP_3 (Berridge, 1993).

Es interesante destacar que en rebanadas del cerebro de los mamíferos, la formación de fosfatos de inositol corresponde de manera muy estrecha a la distribución regional y las características farmacológicas de los receptores H_1 (Hill, 1990).

1.4.2 Receptores H_2 .

Estos receptores tienen a la yodoaminopotentidina como el antagonista más potente con una K_d de 0.3 nM. Otros antagonistas selectivos son la buromamida, la tiotidina, la cimetidina y la ranitidina. Los receptores H_2 se encuentran

presentes en numerosas áreas cerebrales y en particular se observa una alta densidad en la corteza y en el neocórtex. La mayor parte de estos receptores se encuentran en neuronas, aunque también se observan en células gliales y en vasos sanguíneos de pequeño calibre (Hill, 1990; Hill et al., 1997).

Mecanismos de transducción de señales.

Tanto en el SNC como en tejidos periféricos la activación de los receptores H_2 está asociada a la producción del monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), por estimulación de una o varias isoformas de la enzima adenilciclase a través de proteínas $G_{\alpha s}$ (Hill et al., 1997).

Además de la activación de la cinasa dependiente de AMPc (PKA), el aumento en la concentración del AMPc conduce a la apertura de canales iónicos, en especial a los permeables a iones de Ca^{2+} , considerándose que el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} es el mecanismo responsable de la mayor parte de los fenómenos fisiológicos asociados a la activación de receptores H_2 (Hill, 1990).

1.4.3 Receptores H_3 .

Los antagonistas con mayor selectividad son el clobenpropit ($K_d = 0.13$ nM) y la tioperamida ($K_d = 3-4$ nM), los que en conjunto con el agonista *R*- α -metil-histamina (1,500 veces más potente que la propia histamina), han permitido caracterizar a estos receptores en el SNC (Hill et al., 1997). Los receptores 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, 1996; Hill et al., 1997).

Se ha documentado también la presencia de heterorreceptores presinápticos H_3 que inhiben la liberación de serotonina, acetilcolina, noradrenalina, dopamina (Hill et al., 1997). Estudios realizados recientemente en el laboratorio han permitido adicionar el neurotransmisor inhibidor GABA (ácido γ -aminobutírico) a la lista de transmisores cuya liberación es regulada por la histamina a través de la activación de receptores H_3 (García et al., 1997).

Mecanismos de transducción de señales.

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 $G\alpha_o$, es el mecanismo responsable de la modulación de la liberación tanto de la histamina como de otros neurotransmisores (Hill, 1990; Hill et al., 1997).

1.5. CELULAS GLIALES

Los cuerpos celulares de las neuronas y los axones están rodeados por células gliales, existiendo entre 10 y 50 veces más células gliales que neuronas en el SNC de los vertebrados. Por mucho tiempo a las células gliales se les confirió la función única de sostén del tejido nervioso, pero en la actualidad se sabe que 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.

Las células gliales expresan también receptores para neurotransmisores (Verkhatsky et al., 1998) describiéndose receptores purinérgicos, adrenérgicos α_1 , receptores para sustancia P, glutamatérgicos, GABAérgicos, glicinérgicos y receptores para bradicinina y citocinas. De particular interés para este trabajo son los estudios que reportan la expresión de receptores de histamina en células gliales (Inagaki et al., 1989, 1991; Kondu et al., 1991; Inagaki and Wada, 1994), lo que sugiere que éstas son un blanco importante para este modulador. Además, existen evidencias de la presencia en las células gliales de canales de Ca^{2+} , de Na^+ y de K^+ con densidades similares a las reportadas para las células neuronales.

Las células gliales se dividen en microglía y macroglía (Kandel, 1995). La microglía corresponde a los fagocitos que actúan durante traumatismos, infecciones u otros procesos lesivos. La macroglía consiste de tres tipos predominantes: los oligodendrocitos, las células de Schwann y los astrocitos. Los oligodendrocitos y las células de Schwann son células pequeñas con relativamente pocos procesos que aíslan a los axones formando la vaina de mielina, la cual acelera la conducción de las señales eléctricas. Los oligodendrocitos se encuentran en el SNC y las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP).

ASTROCITOS

Se consideran las células gliales más importantes y dentro de sus funciones se encuentran las siguientes (Kandel, 1995):

- a) Rodean las regiones sinápticas capturando con alta afinidad algunos neurotransmisores como el glutamato y el GABA, removiéndolos del espacio sináptico y contribuyendo así a terminar sus efectos.
- b) Los astrocitos tienen prolongaciones que conectan a los capilares sanguíneos con las neuronas y que contribuyen a formar la barrera hematocefálica, la cual sirve como protección previniendo que sustancias tóxicas de la sangre entren al cerebro. Además, esta organización sugiere también un papel nutricional para los astrocitos.
- c) Junto con la microglía remueven desechos neuronales ayudando a sellar daños en los tejidos cerebrales.

Los astrocitos se derivan del neuroectodermo del tubo neural, y tienen características morfológicas y ultraestructurales que los distinguen del resto de la glía en el SNC de los mamíferos. Como su nombre lo indica los astrocitos tienen una apariencia estrellada como puede observarse en una preparación de tejido nervioso con impregnación de plata, y han sido clasificados en dos tipos: los astrocitos protoplasmáticos, característicos de la materia gris, con gruesos y extensos procesos ramificados que parecen "proyecciones espinosas", y los astrocitos fibrosos, característicos de la materia blanca, con procesos relativamente largos, delgados y lisos con pocas ramificaciones. Los organelos que aparecen en el citoplasma de los astrocitos se encuentran dispersos, lo que les confiere una apariencia acuosa, conteniendo pocas mitocondrias y

ribosomas, con escaso retículo endoplásmico liso, algunos cuerpos de Golgi, cuerpos multivesiculares y cuerpos que presumiblemente corresponden a lisosomas (Fedoroff, 1986; Noback, 1993; Sperelakis, 1995).

1. 6. HISTAMINA Y PROLIFERACION DE CELULAS GLIALES

La proliferación de las células gliales es un proceso que se observa en la inflamación y lesión del tejido cerebral. Durante este proceso (gliosis) los astrocitos producen y responden a diversos factores de crecimiento y citocinas. Además de encontrarse presentes en neuronas los receptores para histamina, en particular los pertenecientes al subtipo H₁, se localizan en las células gliales y sobre todo en los astrocitos (Inagaki et al., 1989, 1991; Kondu et al., 1991; Inagaki and Wada, 1994).

A fin de ser utilizada como modelo para el estudio de los efectos de la histamina sobre las células gliales, se han estudiado las características de la línea celular U373MG, derivada de un astrocitoma humano (Arias-Montaña et al., 1994). En esta línea celular la activación de los receptores H₁ induce la formación de fosfatos de inositol y la movilización de iones de calcio a partir de depósitos intracelulares (Soria-Jasso y Arias-Montaña, 1996) y en experimentos preliminares realizados en el laboratorio se ha observado que la exposición a la histamina estimula su proliferación, estimada mediante la incorporación de [³H]timidina. Así, estos resultados sugieren que entre los factores responsables de gliosis podría encontrarse también la histamina, posibilidad que fue abordada en esta tesis.

Múltiples estudios han demostrado que la PKC tiene un papel importante en diversas funciones, entre ellas la que se incluye la proliferación celular (Berridge, 1993). Como se mencionó antes, la activación de los receptores H₁ induce la hidrólisis del PIP₂ produciendo diacilglicerol (DAG) e IP₃. El DAG activa

a la PKC, ya sea por sí mismo o en conjunto con los iones de Ca^{2+} cuya liberación es producida por el IP_3 .

La PKC cataliza la transferencia del grupo fosfato terminal del ATP a residuos de serina o de treonina, cuya fosforilación induce cambios conformacionales en la proteína respectiva, los cuales a su vez provocan cambios funcionales. La PKC fosforila a un gran número de proteínas celulares que incluyen receptores, canales iónicos, proteínas del citoesqueleto, enzimas, otras cinasas (inclusive la propia PKC), factores que regulan la expresión de genes y productos de oncogenes como la proteína pp60 (Sheperd, 1994).

Por lo anterior, uno de los posibles mecanismos por los cuales la histamina podría inducir la proliferación de las células de origen glial sería a través de la activación de la PKC, como consecuencia de la formación del diacilglicerol, uno de los segundos mensajeros producidos por efecto de la fosfolipasa C sobre fosfolípidos de membrana.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se señaló en la parte inicial de esta tesis, existen evidencias de que la histamina es un importante modulador de la función del SNC. 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. En células de origen glial y sobre todo en los astrocitos, se observa una alta densidad de receptores para histamina pertenecientes al subtipo H₁, por lo que puede plantearse que la activación de dichos receptores es responsable de los efectos de la histamina. En particular, nos interesó estudiar el posible efecto de la histamina sobre la proliferación de las células de origen glial, aspecto de suma importancia en respuesta a lesiones del SNC, y los mecanismos celulares involucrados.

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 (L. E. Soria-Jasso y J.A. Arias-Montaña, resultados no publicados). Además, las células U373 MG son capaces de capturar al neurotransmisor GABA mediante un transportador dependiente de Na⁺ y Cl⁻ y que ha sido identificado en nuestro laboratorio como un transportador BGT-1 (E Sánchez-Lemus, tesis de licenciatura en proceso).

Experimentos preliminares habían mostrado que efectivamente la histamina estimula la proliferación de la línea celular U373 MG, estimada mediante la incorporación de [³H]timidina, por lo que el presente proyecto se planteó caracterizar este efecto y establecer los mecanismos responsables del mismo. El sistema celular elegido facilitaría el análisis de los procesos de formación de segundos mensajeros en respuesta a la activación de receptores para histamina y sus efectos sobre la proliferación de células de origen glial. Dado que los antecedentes sugieren la participación de cinasas de proteína en la proliferación celular, se planteó estudiar también la participación de la PKC.

3. OBJETIVOS

Con base en los antecedentes anteriores se plantearon los siguientes objetivos para la presente tesis:

Objetivo general

Determinar el efecto de la histamina sobre la proliferación de células de origen glial y establecer los mecanismos celulares involucrados.

Objetivos particulares

1. Confirmar la presencia de receptores H_1 en la línea celular U373 MG mediante la unión del antagonista selectivo [3H]mepiramina.
 2. Confirmar el acople de los receptores H_1 a la formación de fosfatos de inositol y a la movilización de Ca^{2+} a partir de depósitos intracelulares.
 3. Determinar el efecto de la histamina sobre la proliferación celular mediante el análisis de la incorporación de [3H]timidina.
 4. Caracterizar farmacológicamente el subtipo de receptor responsable del efecto de la histamina sobre la proliferación celular.
 5. Determinar si la activación de la PKC es responsable del efecto de la histamina sobre la proliferación celular.
-

4. METODOS

4.1 Cultivo celular

La línea celular U373 MG se cultiva como monocapa en cajas de cultivo (150 cm²) o en cajas multipozos (24 pozos/caja). 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⁻¹ y 10 mg.ml⁻¹, respectivamente). Los cultivos se mantienen a 37°C bajo una atmósfera de 5% de bióxido de carbono.

Las células sembradas en botellas de cultivo fueron resemebradas 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.

4.2 Unión de [³H]mepiramina a membranas celulares

Las células se lisaron por incubación (15 min, 4°C) en una solución amortiguadora de Tris (10 mM) conteniendo EGTA (1 mM). Las membranas celulares se obtuvieron por centrifugación (2 x 20 min a 20,000 x g). La pastilla resultante se resuspendió en una solución Tris (50 mM).

Alícuotas de la suspensión membranal se incubaron con concentraciones crecientes (0.1 – 10 nM) del ligando [^3H]mepiramina en ausencia y presencia de mepiramina no marcada (1 μM). Después de 60 min a 30°C la incubación se detuvo por filtración a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B). Después de lavar 3 veces con solución de incubación, la cantidad de [^3H]mepiramina unida a las membranas se determinó por medición de la radioactividad retenida en los filtros.

4.3 Formación de fosfatos de [^3H]inositol

Se utilizaron células cultivadas en caja multipozos (24 pozos por caja). El medio de cultivo se removió y se reemplazó por medio DMEM conteniendo [^3H]mio-inositol (0.5 $\mu\text{Ci/pozo}$) y mio-inositol no marcado, 10 μM (Arias-Montaña y Young, 1993a,b). Después de 24 horas las células se lavaron con solución Krebs-Henseleit conteniendo 10 mM de LiCl y se incubaron durante 15 min a 37°C antes de adicionar la histamina, continuándose la incubación durante 30 min. La reacción se detuvo aspirando el medio de incubación y adicionando 0.5 ml de ácido perclórico frío conteniendo 1 mM de EGTA y 1 mg/ml de ácido fítico (IP_6).

Después de 15-20 min sobre hielo, se adicionaron 0.4 ml de una mezcla de trioctilamina y freón (50%:50%), se agitó y se centrifugó a 1,000 x g durante 5 min. Una muestra (0.38 ml) de la fase superior formada se colocó en un tubo de plástico y se adicionaron 3 ml de solución Tris, 50 mM. La mezcla así obtenida se depositó en columnas de plástico que contenían 2 ml de resina de intercambio iónico (Dowex AG 1-X8, forma formiato, malla 100-200). El [^3H]inositol remanente y el [^3H]glicerofosfoinositol formado fueron eluidos con 10 ml de agua y 10 ml de una solución 60 mM de formiato de amonio/5 mM de tetraborato de sodio, respectivamente. Los fosfatos de [^3H]inositol ([^3H]IP₁, [^3H]IP₂ y [^3H]IP₃) fueron eluidos de manera conjunta con 10 ml de una solución

conteniendo 800 mM de formiato de amonio/100 mM de ácido fórmico, determinándose su producción por centelleometría en la fase líquida.

4.4 Determinación de la concentración intracelular de Ca^{2+}

La determinación de Ca^{2+} intracelular se llevó a cabo en suspensiones de las células U373 MG de acuerdo a la técnica descrita en un artículo previo por Soria-Jasso y Arias-Montaño (1996). Brevemente, se utilizaron células cultivadas en botellas de material plástico. Una vez alcanzada la confluencia, la monocapa celular fue lavada con 10 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} conteniendo EDTA (0.6 mM), y sometidas a la acción de 4 ml de tripsina/EDTA (500-750 unidades BAEE ml^{-1} /0.6 mM) durante 2-3 min. La acción de la tripsina fue detenida al adicionar 5 ml de medio de cultivo. La suspensión de células así obtenida fue centrifugada a $90 \times g$ por 5 min, y las células se resuspendieron en 5 ml de solución amortiguadora Krebs-HEPES conteniendo el indicador fluorescente fura 2-AM (2 μM) y albúmina bovina (5 $mg \cdot ml^{-1}$). Después de 30 min de incubación a $37^\circ C$ el fura 2-AM no captado se eliminó por centrifugación ($90 \times g$, 5 min).

Alícuotas de la suspensión celular fueron colocadas en la celda de un fluorómetro Perkin Elmer (LB-50) y sometidas a excitación en dos longitudes de onda (340 y 380 nM), determinando el cociente de la emisión a 510 nM. Para cada muestra, se obtuvieron los parámetros R_{max} y R_{min} , donde R_{max} corresponde a la fluorescencia obtenida al lisar las células con Tritón X-100 (1%) y R_{min} a la fluorescencia remanente después de la adición de EGTA (5 mM). La concentración de Ca^{2+} intracelular fue calculada de acuerdo a la ecuación descrita por Grynkiewicz y cols. (1985):

$$[Ca^{2+}] = [K_D] \frac{[R - R_{min}] [S_{f2}]}{[R_{max} - R] [S_{b2}]}$$

donde R es el cociente de fluorescencia (F_1/F_2), S_{f2} y S_{b2} corresponden al colorante no unido y unido a Ca^{2+} respectivamente, y K_D es la constante de disociación del Fura 2-AM para iones Ca^{2+} (224 nM).

4.5 Determinación de la incorporación de [3H]timidina

Las células U373 MG se cultivan en cajas multipozos. Después de 24 horas el medio se substituye por una mezcla DMEM/F-12 sin suero y la incubación se continúa por 48 horas. Después de este periodo se adicionó la histamina durante 24 horas. Durante las últimas 4 horas de este lapso se adicionó [3H]timidina (1 μ Ci/pozo). Posteriormente se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con solución Krebs-Henseleit antes de adicionar 0.8 ml de ácido tricloroacético (5%). Después de 20 min se lavaron los pozos con etanol 2 veces y se adicionaron 0.4 ml de NaOH 0.1 M, dejando reposar por 12 horas. La solución de NaOH se neutralizó con un volumen equivalente de HCl (0.1 M) para ser posteriormente depositada en viales de plástico a los que se agregó líquido de centelleo para determinar la incorporación de [3H]timidina al DNA celular.

4.6 Análisis de resultados

Todos los datos se expresan como la media \pm el error estándar (S.E.M.) correspondiente. Las curvas de concentración-respuesta fueron ajustadas a una ecuación logística (Hill) mediante regresión no lineal utilizando el programa Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

4.7 Materiales

La [3H]timidina (actividad específica, 86 Ci.mmol $^{-1}$), el *mio*[3H]inositol (17.2 Ci.mmol $^{-1}$) y el fura 2-AM fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA). Los fármacos mepiramina (maleato de pirilamina), diclorhidrato de

histamina, clorhidrato de ranitidina, maleato de tioperamida, estaurosporina, H-7 y el TPA (12-tetradecanoil-13-acetato de forbol) fueron comprados a Research Biochemicals International (Natick, MA, USA). El TPA y la estaurosporina fueron disueltos en etanol mientras que las demás sustancias fueron disueltas en agua.

5. RESULTADOS

5.1 Unión de [³H]mepiramina a las membranas de las células U373 MG

La figura 1 muestra un experimento representativo de la unión saturante de la [³H]mepiramina a las membranas de las células U373 MG. La constante de disociación (K_d) obtenida por regresión no lineal correspondió a 0.61 ± 0.10 nM con una densidad de receptores (B_{max}) de 180 ± 6 fmoles por mg de proteína (medias \pm SEM de los valores obtenidos en tres experimentos con diferentes preparaciones membranales).

5.2 Formación de fosfatos de [³H]inositol ([³H]IPs) en las células U373 MG

En presencia de LiCl (20 mM) y después de una incubación de 30 min la acumulación basal de [³H]IPs fue 380 ± 20 dpm ($n = 4$). Como puede apreciarse en la figura 2, donde los valores representan las medias \pm S.E.M. ($n = 4$), la histamina estimuló la formación de [³H]IPs de manera dependiente de la concentración. La formación máxima en presencia del agonista correspondió a $495 \pm 12\%$ de la basal con una concentración efectiva media (EC_{50}) de 2.8 ± 0.4 μ M y un coeficiente de Hill (n_H) de 1.3 ± 0.2 , no estadísticamente diferente de la unidad ($P > 0.05$, prueba t de Student).

En la misma figura 2 puede apreciarse que el efecto de 100 μ M de histamina ($483 \pm 26\%$) fue revertido en presencia de un antagonista selectivo H_1 , mepiramina (1 μ M), misma que redujo la formación de [³H]IPs a un valor no estadísticamente diferente de la basal ($105 \pm 6\%$; inhibición del $98 \pm 1\%$).

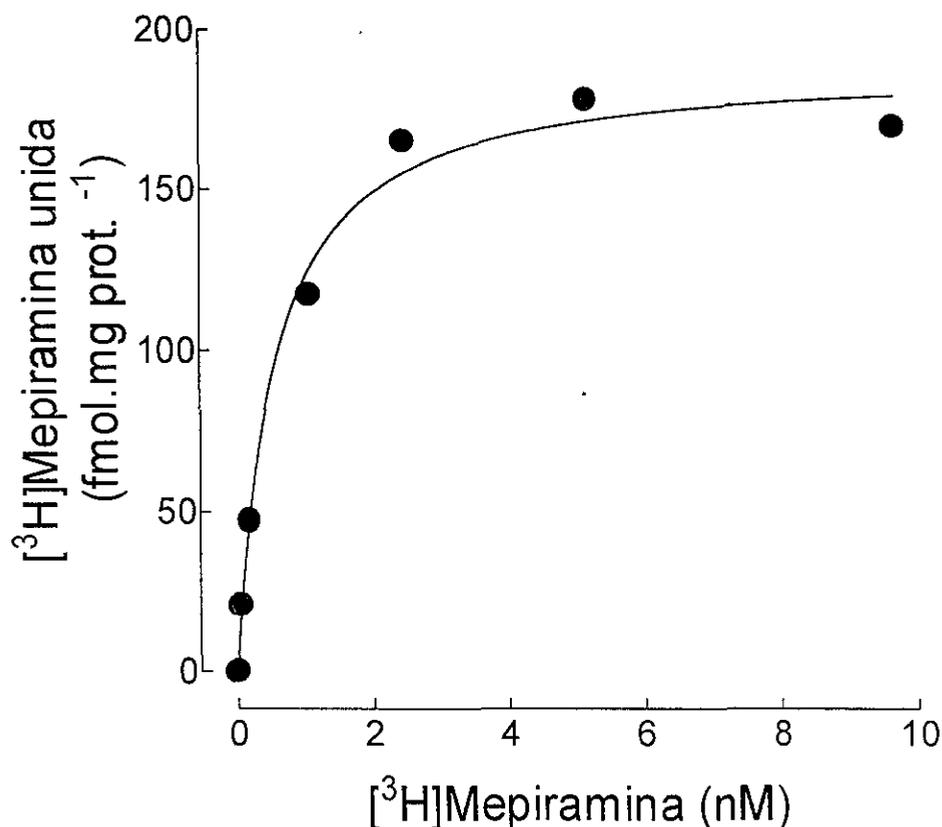


Fig. 1. Unión de [³H]mepiramina. Alícuotas de membranas de las células U373 MG fueron incubadas por 60 min a 37°C con diferentes concentraciones de [³H]mepiramina. La unión específica se determinó substrayendo de la unión total la unión en presencia de 1 μ M de mepiramina no marcada. Los valores son el promedio de duplicados de un experimento representativo de tres realizados con similar resultado. La línea es el ajuste a una hipérbola obtenido por regresión no lineal. Los valores de unión máxima y la constante de afinidad se proporcionan en el texto.

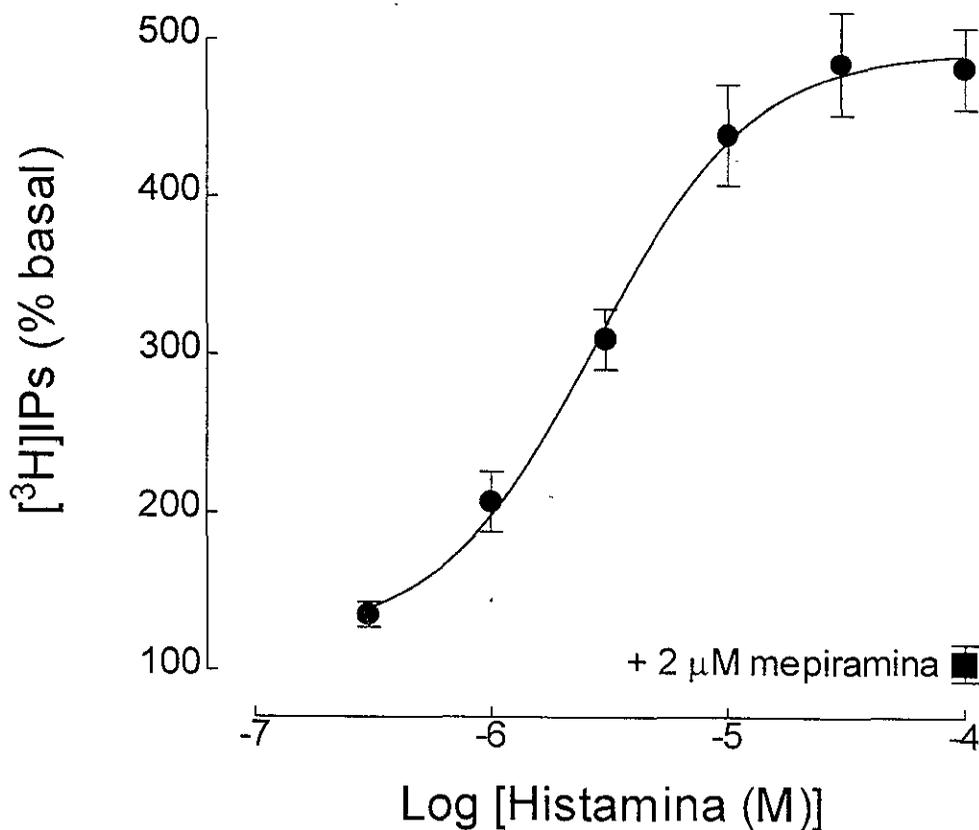


Fig. 2. Curva concentración-respuesta de la formación de fosfatos de [³H]inositol inducida por histamina. Las células fueron marcadas con [³H]inositol e incubadas con histamina (30 min, 37°C) en solución Krebs-Henseleit conteniendo LiCl (20 mM) como se describe en Métodos. La formación de los fosfatos de [³H]inositol se expresa como porcentaje de la basal. Los valores de la gráfica corresponden a las medias \pm S.E.M. de los datos de 4 experimentos. La línea es el ajuste a una ecuación logística (Hill) obtenido por regresión no lineal. Los valores obtenidos para el efecto máximo, la concentración efectiva media (EC₅₀) y el coeficiente de Hill (n_H) se indican en el texto.

5.3 Movilización de Ca^{2+} por histamina en las células U373 MG

La figura 3 muestra el efecto de la histamina sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Puede advertirse que la histamina, a una concentración de 100 μ M, produce un aumento importante en la $[Ca^{2+}]_i$, la cual alcanza un valor promedio al pico de 462 ± 21 nM ($n = 6$ determinaciones), siendo el valor basal de 118 ± 6 nM. Después de un descenso rápido de la $[Ca^{2+}]_i$ se observa una fase de meseta, que en experimentos previos del laboratorio (Soria-Jasso y Arias-Montaño, 1996) se ha demostrado que es debida a la entrada de iones de Ca^{2+} del medio extracelular, proceso conocido como entrada capacitativa. La figura 3 muestra también que en presencia del antagonista H_1 , mepiramina (1 μ M), no se produce el efecto de la histamina sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

5.4 Efecto de la histamina sobre la incorporación de [3 H]timidina en las células U373 MG

La incorporación basal de [3 H]timidina, determinada en 31 experimentos fue de $107\,240 \pm 9249$ dpm por pozo (lo que equivale a $107\,240 \pm 9249$ dpm por mg de proteína).

La adición de histamina (100 μ M) durante 24 horas produjo un aumento significativo en la incorporación de [3 H]timidina llevándola a $164 \pm 5\%$ de la basal ($n = 31$ determinaciones). El análisis del patrón temporal del efecto de la histamina sobre la incorporación de [3 H]timidina (figura 4) mostró que se requieren incubaciones mayores a 12 h para la expresión del efecto. En consecuencia, en la mayoría de los experimentos la incubación con histamina fue por 24 h.

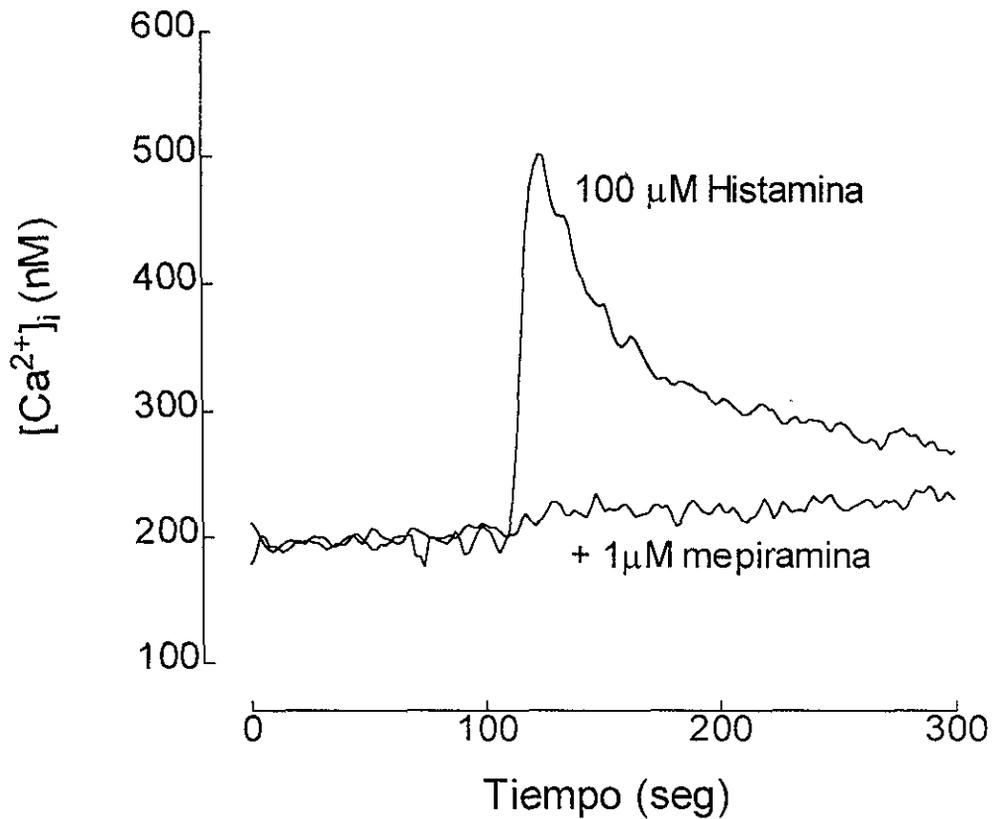


Fig. 3. Cambios en la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) inducidos por histamina. Las células fueron suspendidas en solución Krebs-Henseleit e incubadas con el indicador fluorescente fura 2-AM a fin de determinar la $[Ca^{2+}]_i$ como se describe en Métodos. Se muestra un trazo representativo de 6 determinaciones con 100 μ M de histamina en presencia y ausencia de un antagonista H_1 , mepiramina (1 μ M).

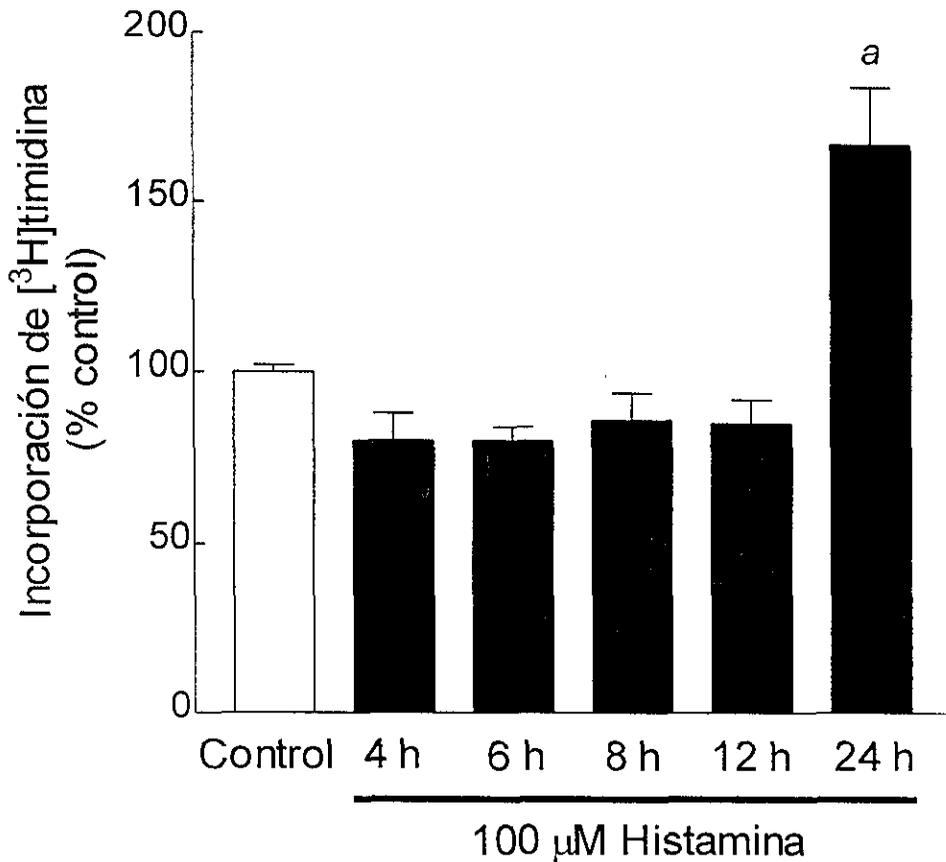


Fig. 4. Curso temporal del efecto de la histamina sobre la incorporación de [³H]timidina. Las células U373 MG fueron incubadas con histamina (100 μ M) durante 24 h y la [³H]timidina se adicionó durante las últimas 4 h. La incorporación de [³H]timidina se expresa como un porcentaje de la incorporación basal (en ausencia de histamina). Los valores corresponden a las medias \pm S.E.M. de determinaciones por cuadruplicado de un experimento representativo de 3 realizados con resultados semejantes. ^a Significativamente diferente de la basal ($P < 0.05$, análisis de varianza de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett).

La acción de la histamina sobre la incorporación de [³H]timidina dependió de la concentración del agonista como se observa en la figura 5, donde el efecto se expresa como un porcentaje de la incorporación de [³H]timidina producida por 100 μM de histamina en cada experimento. La concentración efectiva media (EC₅₀) fue de 3.4 ± 1.0 μM con un coeficiente de Hill (n_H) de 1.0 ± 0.2 .

En acuerdo con los datos mostrados antes para la formación de fosfatos de [³H]inositol y para el aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺, inducida por histamina, efectos ambos mediados por receptores H₁, la incorporación de [³H]timidina inducida por 100 μM de histamina fue completamente bloqueada por un antagonista selectivo H₁, la mepiramina (figura 6), a una concentración de 1 μM. En contraste, los antagonistas selectivos H₂ (ranitidina, 10 μM) y H₃ (tioperamida, 1 μM) no tuvieron efecto significativo.

5.5 Efecto de activadores e inhibidores de la PKC sobre la incorporación de [³H]timidina estimulada por la histamina sobre en las células U373 MG

El fármaco 12-tetradecanoil-13-acetato de forbol (TPA), un activador directo de la PKC, estimuló también la incorporación de [³H]timidina en las células U373 MG (figura 7).

La adición simultánea de TPA (100 nM) y de histamina (100 μM) aumentó la captura de [³H]timidina con un valor de $254 \pm 10\%$ de la basal ($91 \pm 7\%$ del efecto de TPA solo) estadísticamente diferentes de los esperados para un efecto aditivo (valor teórico para aditividad, $325 \pm 10\%$ de la basal).

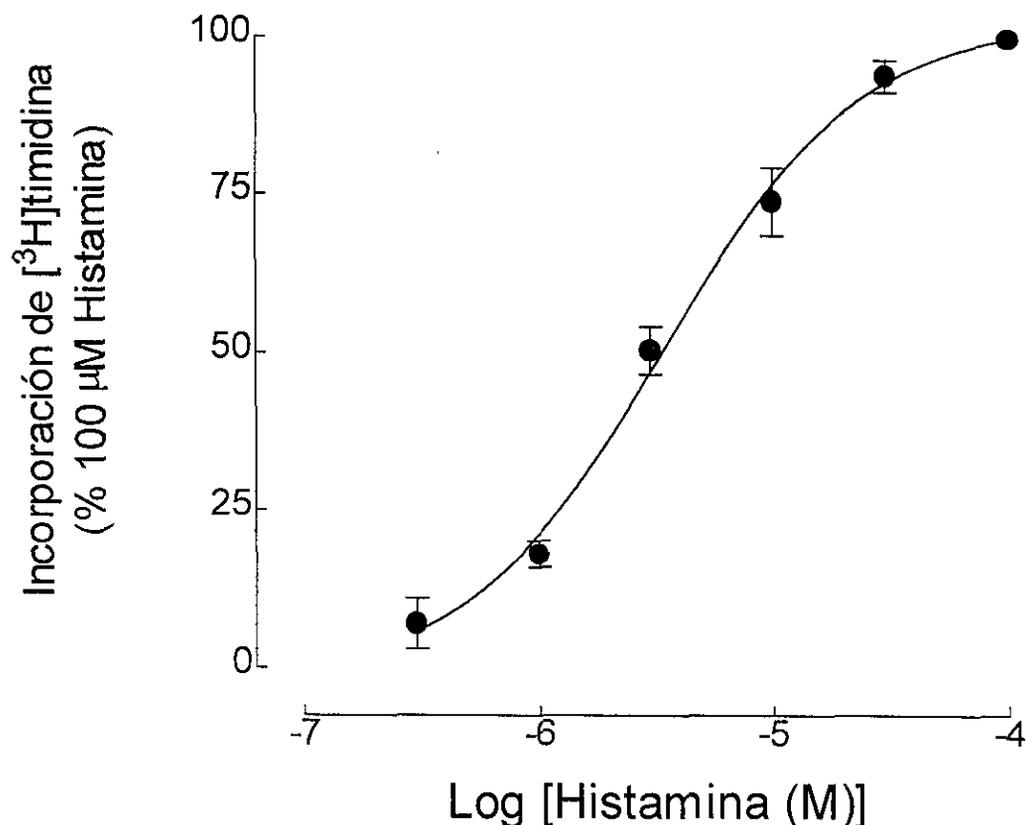


Fig. 5. Curva concentración-respuesta de la incorporación de [³H]timidina inducida por histamina. La histamina estuvo presente durante 24 horas y la [³H]timidina se adicionó durante las últimas 4 h de incubación. La incorporación de [³H]timidina se expresa como un porcentaje de la respuesta obtenida en cada experimento con 100 μM de histamina. Los valores corresponden a las medias ± S.E.M. de los datos combinados de 4 experimentos con 4 determinaciones para cada condición. La línea es el ajuste a una ecuación logística (Hill) obtenido por regresión no lineal. Los valores obtenidos para la concentración efectiva media (EC₅₀) y el coeficiente de Hill (n_H) se indican en el texto.

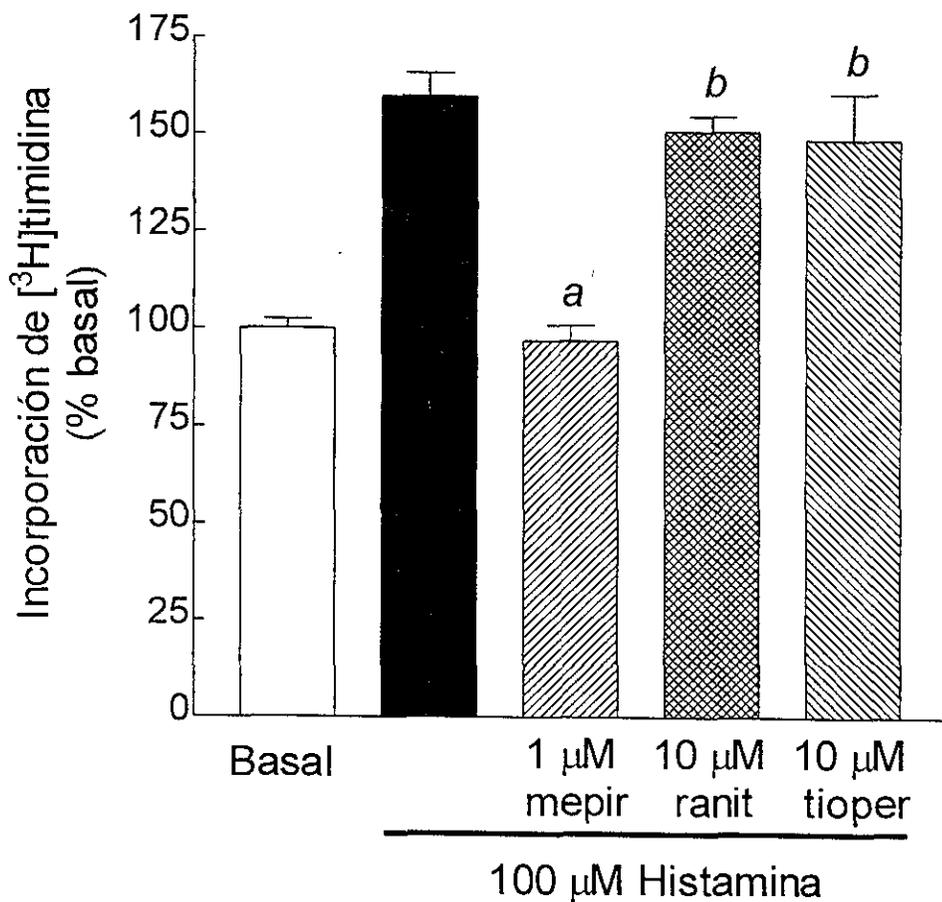


Fig. 6. Antagonismo de la incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina inducida por histamina. El agonista (histamina) estuvo presente durante 24 horas y la $[^3\text{H}]$ timidina se adicionó durante las últimas 4 h de incubación. Los antagonistas se adicionaron 30 min antes que la histamina. La incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina se expresa como un porcentaje de la incorporación basal. Los valores corresponden a las medias \pm S.E.M. de los datos combinados de 3 experimentos con 6 determinaciones para cada condición. ^aSin diferencia estadística respecto a la basal; ^bsin diferencia estadística respecto al efecto de la histamina sola; análisis de varianza de una vía y prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls. mepir, mepyramina; ranit ranitidina; tioper, tioperamida.

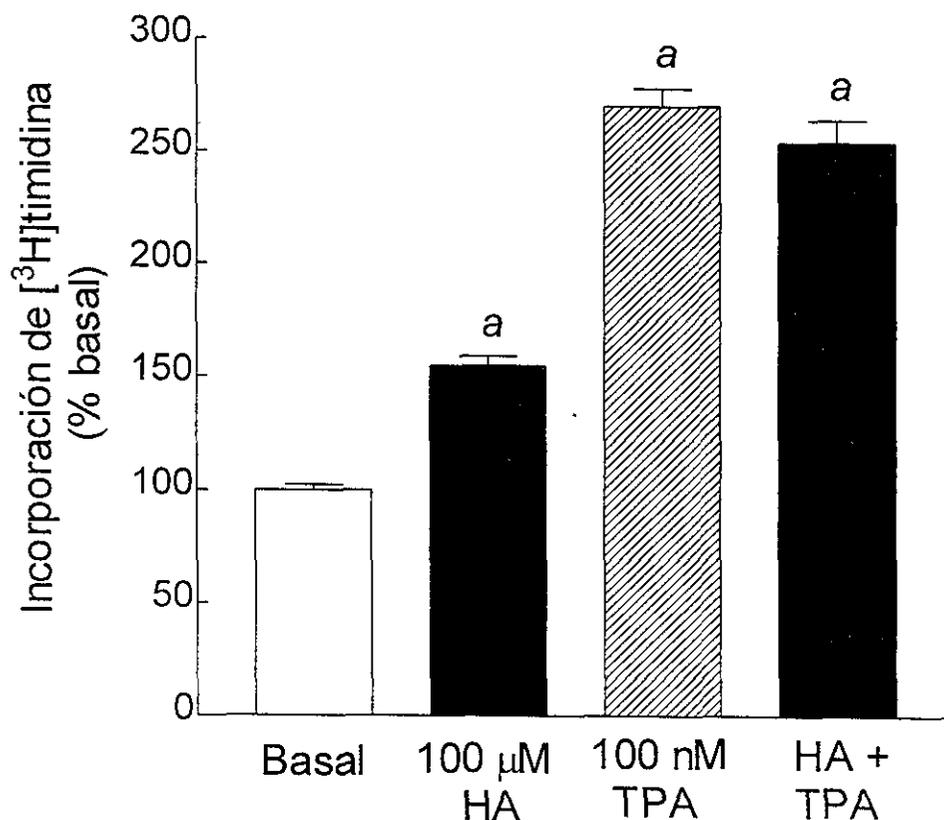


Fig. 7. Efecto del TPA en la incorporación de [³H]timidina. El TPA (100 nM), la histamina (100 μM) o la combinación de TPA + histamina estuvieron presentes por 24 h y la [³H]timidina se adicionó durante las últimas 4 h. La incorporación de [³H]timidina se expresa como un porcentaje de la incorporación basal. Los valores corresponden a las medias ± S.E.M. de los datos combinados de 3 experimentos con 6 determinaciones para cada condición. ^a Valores significativamente diferentes de la basal ($P < 0.05$, análisis de varianza de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett).

A fin de estudiar con mayor detalle el posible papel de la PKC en el efecto de la histamina, se utilizaron dos inhibidores, la estaurosporina y el fármaco H-7. Sin embargo, ambos compuestos mostraron un importante efecto inhibitor sobre la incorporación basal de [³H]timidina, disminuyendo la misma a $19 \pm 6\%$ (10 μ M H-7, $n = 3$) y a $13 \pm 4\%$ de la basal (10 nM estaurosporina, $n = 4$), además de prevenir cualquier efecto de la histamina (figura 8). Los efectos de los inhibidores de la PKC sobre la incorporación de [³H]timidina no se debieron a lesión o muerte celular, ya que la viabilidad celular, evaluada por la exclusión del colorante azul de tripano, no fue afectada por los antagonistas a las concentraciones utilizadas (10 μ M para el H-7 y 10 nM para la estaurosporina).

6. DISCUSION

Además de estar presentes en las neuronas, los receptores para histamina del tipo H₁ se encuentran también localizados en células gliales, en particular en los astrocitos (Inagaki et al., 1989, 1991; Kondu et al., 1991; Inagaki and Wada, 1994). Las células U373 MG, pertenecientes a una línea derivada de un astrocitoma humano, muestran características que confirman su procedencia glial. Entre estas características se encuentran las siguientes:

1. Una morfología semejante a la descrita para los astrocitos tipo II, con apariencia estrellada.
2. Presentan inmunoreactividad positiva para la proteína fibrilar ácida glial, determinada con microscopía confocal de fluorescencia (L.E. Soria-Jasso y J.A. Arias-Montaña, datos no publicados).
3. Poseen un sistema de captura del neurotransmisor inhibitor GABA (ácido γ -aminobutírico) que depende de la presencia en el medio extracelular de iones de sodio y cloruro (E. Sánchez Lemus, tesis de licenciatura en proceso).

Las células U373 MG, parecen constituir en consecuencia un buen modelo para estudiar células astrocíticas, y en particular el efecto de la activación de receptores para histamina sobre la función celular.

Los resultados de la presente tesis muestran que en la línea celular U373 MG, derivada de un astrocitoma humano, la histamina induce proliferación, evaluada por la incorporación de [³H]timidina al DNA celular, al activar receptores para histamina pertenecientes al tipo H₁. Los datos obtenidos sugieren también que el efecto mitogénico de la histamina se debe a la

activación de la PKC, inducida por la hidrólisis de fosfoinosítidos y/o la movilización de iones de Ca^{2+} de depósitos intracelulares.

6.1 Características de los receptores H_1 presentes en las células U373 MG

En las células U373 MG se determinó la presencia de receptores H_1 cuya afinidad por el radioligando [^3H]mepiramina (K_d 0.61 ± 0.10 nM) es muy similar a la reportada para los receptores presentes en diversos tejidos cerebrales de varias especies (ver Hill, 1990). La densidad determinada en este estudio correspondió a 180 fmoles de receptor por mg de proteína, mayor que la densidad promedio reportada para diversas regiones del Sistema Nervioso Central, 100 fmoles por mg de proteína (Hill, 1990).

Además, nuestros resultados mostraron que los receptores H_1 detectados son funcionales, ya que su activación por la histamina indujo la formación de fosfatos de inositol (Fig. 2) y la movilización de iones de Ca^{2+} de depósitos intracelulares (Fig. 3), indicando la formación del segundo mensajero IP_3 (ver también Soria-Jasso y Arias-Montaño, 1996).

6.2 Histamina y proliferación de células gliales

Los astrocitos se encuentran involucrados en diversas funciones del SNC de los mamíferos tales como terminar el efecto de neurotransmisores excitadores e inhibidores como el ácido glutámico y el GABA respectivamente, amortiguar los cambios de la concentración extracelular del ion K^+ debidos a la actividad sináptica y proveer, mediante la glicogenólisis, sustratos energéticos para el metabolismo neuronal (Barres, 1991; Attwell and Mobbs, 1994). Además, los astrocitos poseen receptores para diversos neurotransmisores (Murphy and Pearce, 1987; Barres, 1991), lo que ha llevado a postular un papel más activo de los astrocitos en la función del SNC.

En particular, la lesión del tejido cerebral de cualquier etiología induce gliosis reactiva, caracterizada por hiperplasia e hipertrofia glial, así como por la presencia de abundantes astrocitos reactivos (Norton et al., 1992; Amat et al., 1996). Aunque originalmente se aceptó que la mayoría de los astrocitos reactivos no eran generados por división celular (Norton et al., 1992), datos recientes indican que la mayoría de los astrocitos en proliferación derivan de astrocitos pre-existentes, indicando un proceso activo de replicación celular (Amat et al., 1996). En línea con esto, se ha demostrado la proliferación de los astrocitos en ratas y ratones adultos (Korr, 1986).

Los factores de crecimiento se encuentran involucrados en la regulación tanto de la división celular normal como en la generación de tumores. Ciertos receptores acoplados a proteínas G (bombesina, bradicina, angiotensina II y endotelina-1) pueden actuar como factores de crecimiento al estimular a la PKC, a través de la producción de los segundos mensajeros trifosfato de inositol (IP_3) y el diacilglicerol o DAG (Berridge, 1993; Boarder, 1994). La PKC podría entonces fosforilar y activar a la proteína Raf-1 que a su vez activa a una cascada de cinasas, siendo el resultado final la fosforilación y activación de factores de transcripción y la activación de ciertos genes (Egan and Weinberg, 1993).

Además existen reportes que indican que la actividad de la enzima descarboxilasa de histidina, responsable de la formación de la histamina a partir del aminoácido histidina, se encuentra aumentada en los tejidos que experimentan crecimiento acelerado o reparación tisular (Watanabe et al., 1981; Bartholeyns and Fozard, 1985). Así, la histamina podría actuar también como factor de crecimiento al activar receptores acoplados a la formación de IP_3 y DAG y de esta manera activando a la PKC.

Nuestros experimentos mostraron que en las células U373 MG la histamina estimuló la proliferación, tomando como índice la incorporación de [³H]timidina al DNA celular. La proliferación celular conlleva el paso de un estado de no división (fase G₀ del ciclo) a un estado caracterizado por la replicación del DNA (fase G₁/S; Berridge, 1993). La incorporación de [³H]timidina al DNA ocurre durante la replicación del mismo y puede así considerarse como un índice de la proliferación celular.

La adición de histamina (100 μM) durante 24 horas produjo un aumento significativo en la incorporación de [³H]timidina llevándola a 164 ± 5% de la basal con una concentración efectiva media (EC₅₀) de 3.4 ± 1.0 μM. Cabe destacar que el efecto de la histamina requirió incubaciones mayores de 12 horas, como se observa en la Fig. 4. Diversos estudios han mostrado que los efectos a largo plazo del DAG, como la proliferación y diferenciación celulares, requieren de un aumento sostenido en los niveles de DAG por al menos varias horas (Nishizuka, 1995), lo cual explicaría nuestros resultados.

La incorporación de [³H]timidina inducida por la histamina fue completamente bloqueada por un antagonista selectivo H₁, la mepiramina, como puede apreciarse en la Fig. 5, pero no por antagonistas selectivos H₂ (ranitidina) y H₃ (tioperamida), lo que indica que el efecto proliferativo de la histamina se ejerce a través de la activación de receptores H₁, cuya presencia había sido evidenciada por los experimentos con el antagonista H₁ [³H]mepiramina, mostrando sitios de unión con alta afinidad por el ligando.

6.3 Posibles mecanismos del efecto proliferativo de la histamina

Los astrocitos expresan niveles elevados de PKC (Bhat, 1995) y los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo sugieren que el efecto estimulante de la histamina sobre la incorporación de [³H]timidina en las células

U373 MG podría deberse a la activación de una o más isoformas de la PKC por acción del DAG, uno de los segundos mensajeros generados por la hidrólisis de fosfoinosítidos inducida por la activación de receptores H₁:

1. La activación de los receptores H₁ estimula la hidrólisis del difosfato de fosfatidil inositol (PIP₂) conduciendo a la producción de IP₃ y DAG. Este último es conocido por su efecto estimulante sobre ciertas isoformas de la PKC (formas clásicas y nuevas), ya sea por sí mismo o bien en combinación con los iones de Ca²⁺ liberados por la acción del IP₃ sobre los depósitos intracelulares (Mochly-Rosen y Kauvar, 1998). La concentración efectiva media (EC₅₀) de la histamina para estimular la incorporación de [³H]timidina fue de 3.4 ± 1.0 μM, coincidiendo con la EC₅₀ determinada en este mismo estudio para la acumulación de fosfatos de [³H]inositol ([³H]IPs), misma que correspondió a 2.8 ± 0.4 μM, y con la EC₅₀ reportada para la movilización de calcio inducida por la histamina en las mismas células (1.86 y 4.6 μM; Young et al., 1998a,b).
2. Un efecto estimulador sobre la proliferación celular fue también observado cuando las células fueron incubadas durante 24 horas con TPA, un fármaco que activa directamente a la PKC actuando en el sitio de unión a DAG (Mochly-Rosen y Kauvar, 1998).
3. Finalmente, es interesante destacar que los efectos de la histamina y del TPA sobre la incorporación de [³H]timidina no fueron aditivos, lo que sugiere que ambas sustancias ejercen sus efectos a través de una vía común que sería la activación de la PKC.

Con el propósito de estudiar con mayor detalle la función de la PKC en el efecto mitogénico de la histamina, se decidió estudiar el efecto de dos inhibidores de la PKC, la estaurosporina y el fármaco H-7, que actúan en los

sitios catalítico y de unión al ATP, respectivamente (Mochly-Rosen and Kauvar, 1998), sobre la incorporación de [³H]timidina inducida por la histamina.

Sin embargo, ambos compuestos ejercieron un muy importante efecto inhibitorio sobre la incorporación basal de [³H]timidina, con inhibición del $81 \pm 6\%$ con 10 μ M de H-7 y de $87 \pm 4\%$ con 10 nM de estaurosporina. Estos datos sugieren que la PKC tiene un papel muy importante en la proliferación de las células U373 MG incluso en ausencia de estímulos exógenos, pero previnieron el uso de dichos inhibidores como herramientas metodológicas para confirmar la función de la PKC en la síntesis de DNA inducida por histamina.

Cabe destacar que las concentraciones de ambos inhibidores fueron seleccionadas como cercanas a los valores de la concentración media efectiva (IC_{50}) reportados para la inhibición *in vitro* de la PKC, y que corresponden a 9 μ M para el H-7 y 9 nM para la estaurosporina de acuerdo a los reportes de Nishikawa et al. (1986) y de Wilkinson y Hallam (1994).

Por otra parte, es posible señalar que los efectos de los inhibidores de la PKC sobre la incorporación de [³H]timidina no se debieron a la lesión o muerte celular inducidos por la estaurosporina o por el H-7, ya que la viabilidad celular, evaluada por la exclusión del colorante azul de tripano, no fue afectada por los antagonistas a las mismas concentraciones.

Existen estudios con resultados similares a los obtenidos en la presente tesis. Por ejemplo, se ha demostrado que la histamina estimula el crecimiento *in vitro* de células de gliomas humanos (Van der Ven et al., 1993), así como la incorporación de [³H]timidina al DNA de astrocitos del cerebelo y de la corteza frontal mantenidos en cultivo primario (Rodríguez et al., 1989; Guizzetti et al., 1996; Guizzetti and Costa, 1996). En este último reporte, los autores del mismo se refieren a datos no publicados de su laboratorio para indicar que la

proliferación de células de astrocitoma humano 1321N1 depende de la activación de la PKC.

6.4 PKC y proliferación celular

¿Cómo podría la activación de la PKC inducida por la histamina y otros factores de crecimiento, estimular la proliferación celular? Existen evidencias de que en diversos tipos celulares la hidrólisis de fosfoinosítidos, que conduce a la formación de los segundos mensajeros IP_3 y DAG, tiene un efecto mitogénico contribuyendo a cambios en el metabolismo celular que culminan en la síntesis de DNA en la transición del ciclo celular de la fase G_0 a G_1/S (Berridge, 1993).

Existen tres familias de isoformas de la PKC (Mochly-Rosen and Kauvar, 1998). La primer familia comprende las isoformas denominadas clásicas (α , β , γ) que son activadas por iones de Ca^{2+} y DAG. Una segunda familia está formada por las isoformas nuevas (δ , ϵ , η , θ), caracterizadas por ser independientes de los iones de Ca^{2+} pero sensibles a DAG. La tercer familia corresponde a las isoformas atípicas (ζ , ι ó λ , μ), que no son activadas por DAG o ésteres de forbol.

Una vez activada, la PKC fosforila a un gran número de proteínas celulares incluyendo receptores de superficie, proteínas de membrana, canales iónicos, proteínas nucleares y varios productos de proto-oncogenes, algunos de los cuales siguen la ruta de señalizadores nucleares.

Un proceso clave en la estimulación de la proliferación celular es la activación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes específicos, existiendo tres mecanismos generales (Bhat, 1995):

- 1) Activación de cinasas que se translocan al núcleo donde actúan sobre los factores de transcripción residentes modificando su unión al DNA.
- 2) Fosforilación directa de un factor de transcripción latente por receptores de membrana con actividad de cinasa o bien por cinasa asociadas con la subsecuente translocación nuclear del factor.
- 3) Liberación de factores de transcripción unidos a proteínas (v. gr. por desfosforilación de la misma, ver más adelante), permitiendo la translocación hacia el núcleo.

Cascada de las MAPK.

La PKC puede activar a la cascada de las cinasas denominadas genéricamente MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) que conforman un mecanismo de señalización hacia el núcleo en respuesta a estímulos extracelulares. En particular la isoforma clásica α de la PKC fosforila y activa a la proteína Raf -1 que a su vez activa a la vía de las MAPK, resultando finalmente en la fosforilación y activación de factores de transcripción y de genes (Egan y Weinberg, 1993; Nishizuka, 1995). La activación de los factores de transcripción Jun/Fos y NF- κ B parece deberse al efecto de la PKC sobre la vía de las MAPK.

Otras vías de señalización.

El aumento en la concentración intracelular de iones de Ca^{2+} inducido por la histamina y otros transmisores acoplados a la formación de IP_3 por activación de la fosfolipasa C, puede coadyuvar a la activación y expresión de genes inducidos por la PKC. Los iones de Ca^{2+} activan a la fosfatasa calcineurina la que desfosforila al factor NF-ATc, el que en el estado desfosforilado se trasloca al núcleo donde interactúa con la subunidad nuclear de NF-AT activando a los

factores de transcripción Jun/Fos (Nishizuka, 1995). Así, la vía de señalización IP_3/DAG puede tener efectos sinérgicos (por efecto de la PKC y de los iones de Ca^{2+}) sobre la expresión de los mismos factores de transcripción.

En diversas células la PKC y otras cinasas reguladas por señales extracelulares (*Janus kinases* o JNK y *signal transducers and activators of transcription* o STATs) parecen confluir sobre la vía de señalización de las MAPK. Sin embargo, los mecanismos precisos son aún desconocidos (Nishizuka, 1995).

Consideraciones finales.

Como se señaló en la introducción a esta tesis, la proliferación de células gliales, en particular de los astrocitos, es un proceso que se observa en la inflamación y lesión del tejido cerebral. Se considera que este proceso, denominado gliosis es inducido por diversos factores de crecimiento y citocinas producidos por varias células, entre ellas los propios astrocitos.

Los resultados de la presente tesis indican que la histamina podría ser también un potente estímulo proliferativo al activar a los receptores H_1 presentes en los astrocitos e inducir una cascada de señalización iniciada por la hidrólisis de fosfoinosítidos y que parece involucrar a la PKC.

Así, los datos de este estudio permiten plantear ciertas posibilidades interesantes. Por ejemplo, de nuestros resultados podría inferirse que los fármacos que bloquean a los receptores H_1 y que atraviesan la barrera hematoencefálica (difenhidramina, mepiramina, clorfeniramina) podrían ser útiles como ayudar a reducir la lesión celular que se produce en los procesos traumáticos o isquémicos que afectan al SNC.

En la misma línea, sería también de interés determinar si los antihistamínicos podrían ser de utilidad en la terapia de los tumores del SNC, en particular de aquéllos conformados por células de origen glial, como los gliomas.

7. CONCLUSIONES

1. La línea celular U373 MG expresa receptores para histamina H_1 con una alta densidad y con una afinidad por mepiramina similar a la reportada para los receptores presentes en diversos tejidos cerebrales.
 2. Los receptores H_1 están acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos y a la movilización de iones de Ca^{2+} a partir de depósitos intracelulares.
 3. La activación de los receptores H_1 estimula la incorporación de [3H]timidina en las células U373 MG, lo que indica un efecto mitogénico de la histamina en dichas células de origen glial.
 4. Aunque no de manera concluyente, nuestros resultados indican que el efecto mitogénico de la histamina se debe a la activación de la cinasa C de proteína, inducida por la hidrólisis de fosfoinosítidos y/o la movilización de iones de Ca^{2+} de depósitos intracelulares.
-

8. BIBLIOGRAFIA

- 1) Amat, J.A., H. Ishiguro, K. Nakamura, W.T. Norton (1996) Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds. *Glia* 16, 368-382.
 - 2) Arias-Montaño, J.A., J.M. Young (1993) Locus of action of Ni²⁺ on histamine-induced inositol phosphate formation in brain slices and HeLa cells. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 245, 221-228.
 - 3) Arias-Montaño, J.A., J.M. Young (1993) Histamine H₁-receptor characteristics on HeLa cells. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 245, 291-295.
 - 4) Arias-Montaño, J.A., V. Berger, J.M. Young (1994) Histamine- and carbachol-induced inositol phosphate formation in human U373 MG cells: receptor characteristics and Ca²⁺ dependence. *Br. J. Pharmacol.* 111, 598-608.
 - 5) Arias-Montaño, J.A., M.G. Guerrero (1995) Neuromodulación: una nueva función para la histamina. *Rev. Biomed.* 6, 222-236.
 - 6) Arrang, J.-M., M. Garbarg, J.C. Schwartz (1983) Auto-inhibition of brain histamine release by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature* 302, 832-837.
 - 7) Arrang, J.-M., M. Garbarg, J.C. Schwartz (1987) Auto-inhibition of histamine synthesis is mediated by presynaptic H₃-receptors. *Neurosci.* 23, 149-157.
 - 8) Attwell, D., P. Mobbs (1994) Neurotransmitter transporters. *Curr. Opinion Neurobiol.* 4, 353-359.
 - 9) Bartholeyns, N.R., J.R. Fozard (1985) Role of histamine in tumor development. *Trends Pharmacol. Sci.* 6, 123-125.
 - 10) Bhat, N.R. (1989a) Role of protein kinase C in glial cell proliferation. *J. Neurosci. Res.* 22, 20-27.
 - 11) Bhat, N.R. (1989b) Signal transduction mechanisms in glial cells. *Dev. Neurosci.* 17, 267-284.
 - 12) Barres, B.A. (1991) New roles for glia. *J. Neurosci.* 11, 3685-3694.
 - 13) Berridge, M.J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling, *Nature* 361, 315-325.
-

-
- 14) Boarder, M.R. (1994) A role for phospholipase D in control of mitogenesis. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 57-62.
 - 15) Chen, C., J. Chang, W.C. (1996) Potentiation of bradykinin-induced inositol phosphates production by cyclic AMP elevating agents and endothelin-1 in cultured astrocytes. *Glia* 16, 210-217.
 - 16) Egan, S.E., R.A. Weinberg (1993) The pathway to signal achievement. *Nature* 365, 781-783.
 - 17) Fedoroff, S., R. Vernadakis (1986) Astrocytes. Development, morphology and regional specialization of astrocytes. Vol 1, Academic Press, Florida. Pp. 105-243.
 - 18) García, M., B. Florán, J.A. Arias-Montaña, J. Aceves, J.M. Young (1997) Histamine H₃ receptor activation selectively inhibits dopamine D₁ receptor-dependent [³H]GABA release from depolarisation-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neurosci.* 80, 241-249.
 - 19) Grynkiewicz, G., M. Poenie, R.Y. Tsien (1985) A new generation of Ca⁺ indicator with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
 - 20) Guizzeti, M., L.G. Costa (1996) Inhibition of muscarinic receptor-stimulated glial cell proliferation by ethanol. *J. Neurochem.* 67, 2236-2245.
 - 21) Guizzeti, M., P. Costa, J. Peters, L.G. Costa (1996) Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 297, 265-273.
 - 22) Endou, M., E. Poli, R. Levi (1994) Histamine H₃-receptor signalling in the heart: possible involvement of Gi/Go proteins and N-type Ca²⁺ channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 35, 3239-32466.
 - 23) Hill, S.J., J.M. Young, D.M. Marrian (1977) Specific binding of ³H-mepyramine to histamine H₁-receptors in intestinal smooth muscle. *Nature* 270, 361-363.
 - 24) Hill, S. J. (1990) Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol. Rev.* 42, 46-84.
 - 25) Hill, S. J., C.R. Ganellin, H. Timmerman, J.-C. Schwartz, N.P. Shankley, J.M. Young, W. Schunak, R. Levi, H.L. Haas (1997) Classification of histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 49, 253-278.
-

-
- 26) Inagaki, N., H. Fukui, Y. Taguchi, N.P. Wang, A. Yamatodani, H. Wada (1989) Characterization of histamine H₁-receptor on astrocytes in primary culture: [³H]-mepyramine binding studies. *Eur. J. Pharmacol.* 173, 43-51.
 - 27) Inagaki, N., H. Fukui, Y. Taguchi, N.P. Wang, A. Yamatodani, H. Wada (1991) Single type-2 astrocytes show multiple independent sites of Ca²⁺ signaling in response to histamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4215-4219.
 - 28) Inagaki, N., H. Wada (1994) Histamine and prostanoid receptors on glial cells. *Glia* 11, 101-109.
 - 29) Kandel, E. (1995). *Essentials of neural science and behavior*. Apleton & Lange, Norwaik. pp. 22-24.
 - 30) Kondou, H., N. Inagaki, H. Fukui, Y. Koyama, A. Kanamura, H. Wada (1991) Histamine-induced inositol phosphate accumulation in type-2 astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 734-738.
 - 31) Korr, H. (1986) Proliferation and cell cycle parameters of astrocytes. In: Fedoroff, S., Vernadakis, A. (Eds.) *Astrocytes*. Vol. 3, Academic Press, New York, pp. 77-127.
 - 32) Leurs, R., M.J. Smit, H. Timmerman, H. (1995) Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol. Ther.* 66, 519-527.
 - 33) Mochly-Rosen, D., L.M. Kauvar (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.
 - 34) Murphy, S., B. Pearce (1987) Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neurosci.* 22, 381-394.
 - 35) Nishikawa, M., Y. Uemura, H. Hidaka, S. Shirakawa (1986) 1(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine (H7), a potent inhibitor of protein kinases, inhibits the differentiation of HL-60 cells induced by phorbol diester. *Life Sci.* 39, 1101-1107.
 - 36) Noback, C. (1993) *El Sistema Nervioso*. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill, México, D.F., pp. 16, 25, 27.
 - 37) Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9, 484-496.
-

-
- 38) Norton, W.T., D.A. Aquino, I. Hozumi, F.-C. Chiu, C.F. Brosnan (1992) Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem. Res.* 17, 877-885.
- 39) Panula, P., U. Pirvola, S. Auvinen, M.S. Airaksinen (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neurosci.* 28: 586-610.
- 40) Prell, G.D., J.P. Green (1986) Histamine as a neuromodulator. *Ann. Rev. Neurosci.* 9, 209-254.
- 41) Pollard, H., J. Moreau, J.M. Arrang, J.C. Schwartz (1993) A detailed autoradiographic mapping of histamine H₃ receptors in rat brain areas. *Neurosci.* 52, 169-189.
- 42) Rodríguez, J., J. Morán, I. Blanco, A.J. Patel (1989) Effect of histamine on the development of astroglial cells in culture. *Neurochem. Res.* 14, 696-700.
- 43) Schwartz, J. C., J.-M. Arrang, M. Garbarg, H. Pollard, M. Ruat (1991) Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol. Rev.* 71, 1-51.
- 44) Shepherd, G. (1994) *Neurobiology*. 3rd Ed. Oxford University Press, New York, pp. 169, 547, 640, 648-649.
- 45) Soria-Jasso, L.E., J.A. Arias-Montaña (1996) Histamine H₁-receptor activation stimulates [³H]GABA release from human U373 MG astrocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 318, 185-192.
- 46) Sperelakis, N. (1995) *Cell Physiology*. 2nd Ed., Academic Press, San Diego, pp. 312-324.
- 47) Stanimirovic, D.B., R. Ball, G. Mealing, P. Morley, J.P. Durkin (1995) The role of intracellular calcium and protein kinase C in endothelin-stimulated proliferation of rat type I astrocytes. *Glia* 15, 119-130.
- 48) Sumners, C., W. Tang, W. Paulding, M.K. Raizada (1994) Peptide receptors in astroglia: focus on angiotensin II and atrial natriuretic peptide. *Glia* 11, 110-116.
- 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) Van der Ven, L.T.M., I.M. Prinsen, G.H. Jansen, P.J.M. Roholl, R. Deferrari, R. Slater, W. Den Otter (1993) Growth of cultured human glioma tumor cells can be regulated with histamine and histamine antagonists. *Br. J. Cancer* 68, 475-483.
- 51) Verkhatsky, A., R. Orkand, H. Kettenmann (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* 78, 99-141.
- 52) Wada, H., N. Inagaki, A. Yamatodani, T. Watanabe (1991) Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole brain activity?. *Trend Neurosci.* 14, 415-418.
- 53) Watanabe, T., Y. Taguchi, K. Sasaki, K. Tsuyama, Y. Kitamura (1981) Increase in histidine decarboxylase activity in mouse skin after application of the tumor promoter tetradecanoylphorbol acetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 427-432.
- 54) Watanabe, T., Y. Taguchi, S. Shiosaka, J. Tanaka, H. Kubota, Y. Terano, M. Tohyama, H. Wada (1984) Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine carboxylase as a marker. *Brain Res. Rev.* 295, 13-25.
- 55) Wilkinson, S.E., T.J. Hallam (1994) Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation over-stated? *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 53-57.
- 56) Young, K.W., R.D. Pinnock, W. Gibson, J.M. Young (1998a) Dual effects of histamine and substance P on intracellular calcium levels in human U373 MG astrocytoma cells: role of protein kinase C. *Br. J. Pharmacol.* 123, 545-557.
- 57) Young, K.W., R.D. Pinnock, S.R. Nahorski (1998b) Determination of the inositol (1,4,5)trisphosphate requirement for histamine- and substance P-induced Ca^{2+} mobilisation in human U373 MG astrocytoma cells. *Cell Calcium* 24, 59-70.
-