



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ EFECTO DE LA HISTAMINA EN LA
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES DE
MESENCÉFALO VENTRAL ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

ITZEL ESCOBEDO AVILA



TUTOR

DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

2008



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Escobedo
Avila
Itzel
56 08 58 90
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301653251

2. Datos del Tutor

Dr.
Jaime Iván
Velasco
Velázquez

3. Datos del Sinodal 1

Dra.
María de Lourdes
Massieu
Trigo

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
Anayansi
Molina
Hernández

5. Datos del sinodal 3

M. en I. B. B.
Alette
Ortega
Gómez

6. Datos del Sinodal 4

Biól.
Nidia Samara
Rodríguez
Rivera

7. Datos del Trabajo Escrito

Efecto de la histamina en la diferenciación de células troncales de mesencéfalo ventral
88 pp
2008

A mi mamá y papá, por su amor y apoyo incondicional

A mis hermanos por su cariño y apoyo

A Ulises por ser mi felicidad y la mejor compañía

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurociencias, laboratorio AL-101 de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Iván Velasco Velázquez.

Este trabajo fue apoyado por la por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (IN226703 e IN224207) y la Fundación Miguel Alemán (C/076/05<).

Durante el desarrollo de esta tesis, se recibió una excelente asesoría tanto a nivel técnico como académico por parte de la Dra. Anayansi Molina Hernández.

El Jurado que llevó a cabo la revisión del presente trabajo, estuvo conformado por:

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Dra. Anayansi Molina Hernández

M. en I.B.B. Alette Ortega Gómez

Biól. Nidia Samara Rodríguez Rivera

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a la UNAM, por toda su belleza y por ser el mejor espacio y la mejor oportunidad para desarrollarme académica y personalmente.

Al Dr. Iván Velasco por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto y por sus comentarios en la revisión de esta tesis.

A Alette, Dra. Lourdes y de nuevo Ana y Nidia por sus observaciones y comentarios en la revisión de esta tesis.

A Ana, por su amistad, paciencia, apoyo y por compartir conmigo sus conocimientos histaminérgicos y muchos otros más 😊. Gracias por toda tu orientación y por compartir conmigo este proyecto.

A Nidia, Gris, Natllely, Rodrigo, Eugenia, Erika, Fabián y Emmanuel por aclararme mis dudas y tratar de responder mis interminables preguntas. Gracias por su amistad, apoyo, experiencias y sonrisas que le dan el “toque de alegría” a cada día en el labo.

A mi mamá, por siempre demostrarme su interminable amor y apoyo, por su fortaleza y por hacer lo imposible por que me sienta contenta en cualquier circunstancia. Gracias por siempre estar ahí y por tu alegría que siempre nos divierte y hace pasar buenos momentos.

A mi papá por siempre esforzarte en darnos lo mejor para salir adelante, por saber superarte ante cualquier obstáculo y por tus palabras de aliento cuando más lo he necesitado.

A mis hermanos Berenice, Teresa y Gerardo y a mi abuelita Juanita por apoyarme en mis proyectos, por su esfuerzo por entenderme y no les queda de otra que aceptarme jeje 😊, por demostrarme su cariño y por consentirme con mis guisados favoritos al llegar a cenar a casita. Los quiero muchísimo!!

A mis tías, tíos, primas y primos, por todos sus buenos deseos y por la alegría y buenos momentos que pasamos en cada "reunión familiar", por hacerme sentir querida todos y cada uno de ustedes, por sus llamadas de larga distancia cada cumpleaños, ida y llegada de paseo y por los pasados y futuros viajes en carretera para ir a vernos 😊. Los quiero mucho!!

A Ulises, por haber llegado a mi vida y hacerme disfrutar cada día. Gracias por tu amor, por tu sinceridad y confianza, por tu apoyo, por tu paciencia, por los momentos increíbles que siempre paso a tu lado y por las interminables cosas que me haces sentir día con día.

A mis amigas de siempre que tanto las quiero y con las cuales comparto los momentos y experiencias más valiosas. A Ximena, por tantos años de risas y momentos agradables desde la secu, por compartir la pasión universitaria e interés por los asuntos sociales, políticos y culturales que nos rodean. Por tu ingenioso sarcasmo que tanto me divierte y por tu asesoría en materia de linux y pdf's. A Adriana, por ser mi confidente # 1, por tu alegría característica, por la gran amistad que creamos en tan poco tiempo, por tu apoyo en tantas cosas que nos han pasado en estos años y por las consultas médicas que han salvado a la familia😊.

A Melisa por los montones de conferencias y cursos que compartimos y disfruté en tu compañía, por hacerme valorar la amistad y por acordarte de mí y mandarme mensajes que siempre me animan.

A la enorme lista de amigos de la Facultad de Ciencias que siempre recuerdo con sonrisas y que de alguna u otra manera me han acompañado y apoyado a lo largo de la carrera y me han hecho vivir nuevas y gratas experiencias. A los biólogos: Laura, Paty Ramos, Claudia, Marisol, Isaac, Alejandro, Tony, Paola, Kenneth, Joel, Miguel, Huguito, Circe, Alfredo, Carla y Marco. Y por supuesto al inigualable grupo de físicos: Dulce, Laura, Chucho, Gil, Román, Oscar, Etsaan, Damián, Felipe y Daniel.

A todos y cada uno de ustedes,

Gracias!!!!

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	2
Resumen	4
Introducción	5
Desarrollo del sistema nervioso central (SNC)	5
Especificación del mesencéfalo	9
Neurogénesis y gliogénesis	12
Histamina en el sistema nervioso central adulto	15
Histamina durante el desarrollo embrionario	20
Células troncales (CTs)	26
Células troncales neurales (CTNs)	28
Proliferación y diferenciación de células troncales neurales	30
Neuronas dopaminérgicas y enfermedad de Parkinson	32
Justificación	34
Hipótesis	36
Objetivos	36
Metodología	37
Resultados	52
Discusión	67
Conclusiones	75
Perspectivas	76
Bibliografía	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido ascórbico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BMPs	proteínas morfogénicas de hueso
CNTF	factor neurotrófico ciliar
CT	célula troncal
CTNs	células troncales neurales
DA	dopaminérgicas (neuronas)
EGF	factor de crecimiento epidermal
FGFb	factor de crecimiento fibroblástico básico
FGF8	factor de crecimiento fibroblástico 8
Fn	fibronectina
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	proteína acídica glial fibrilar
HA	histamina
HDC	L-histidina descarboxilasa
HNMT	histamina-N-metiltransferasa
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfato
MAO-B	monoamina oxidasa B
MesV	mesencéfalo ventral

MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
Nes	nestina
NGS	suero normal de cabra (por sus siglas en inglés)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFA	paraformaldehído
PKA	proteína cinasa A
PLC	fosfolipasa C
PLO	poli-L-ornitina
Shh	sonic hedgehog
SNC	sistema nervioso central
TGF- β	factor de crecimiento transformante β
TH	tirosina hidroxilasa
Tuj1	anticuerpo que reconoce β tubulina III

RESUMEN

La histamina (HA) es un neurotransmisor que, en el organismo adulto, está involucrado en la regulación de diversas funciones fisiológicas como el sueño y la vigilia, la actividad motora, la regulación térmica y la regulación endocrina. Durante el desarrollo embrionario, esta amina biogénica es uno de los primeros neurotransmisores en aparecer, presentando concentraciones mayores que en el organismo adulto, específicamente en la región del mesencéfalo ventral (MesV); sin embargo, no se conoce su función durante el desarrollo del sistema nervioso.

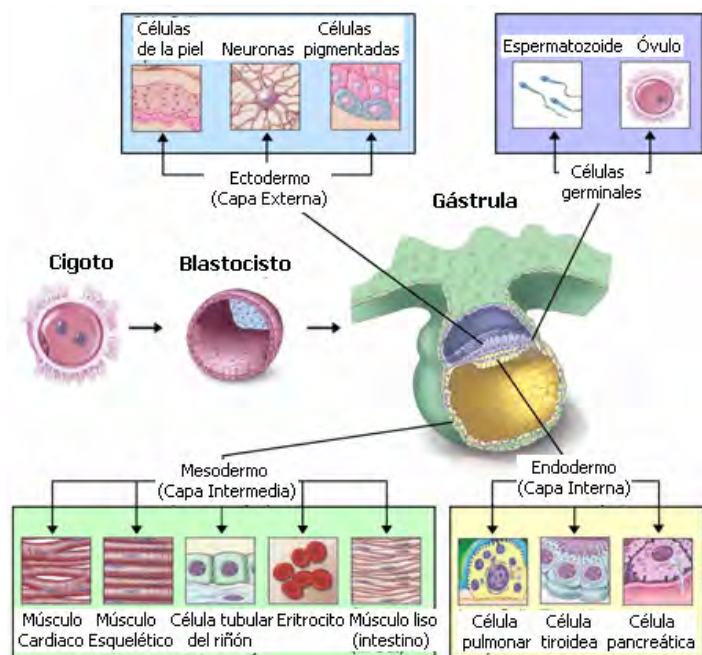
En este trabajo se estandarizó un método de cultivo que nos permitió manejar eficientemente la proliferación y diferenciación de CTN del MesV de rata y, con la aplicación de este método, se estudió el efecto de diversas concentraciones de HA sobre la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular. Por medio de RT-PCR, se encontró que tanto los precursores no diferenciados como los diferenciados, expresan los 3 receptores histaminérgicos. Estudios de inmunocitoquímica, mostraron que la HA a una concentración de 10 μ M, fue capaz de promover la diferenciación neuronal, aumentando la cantidad de neuronas en un 76.01% con respecto al control. Estos resultados indican que la HA pudiera estar cumpliendo una función importante durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central, favoreciendo la diferenciación neuronal.

INTRODUCCIÓN

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Durante el desarrollo, la gastrulación es un proceso en el cual se forman las 3 capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo (Fig. 1). Todo el sistema nervioso se desarrolla a partir del ectodermo dorsal, estructura de donde se origina la placa neural, que se define como una capa de células epiteliales indiferenciadas que poseen un alto grado de plasticidad y que, a lo largo del desarrollo, proliferan, adquieren identidades regionales y producen un gran número y variedad de tipos neuronales y gliales requeridos para la construcción del sistema nervioso maduro (Gilbert, 2003).

Figura 1. Diferenciación de tejidos. A partir de las 3 capas embrionarias que se originan durante la gastrulación (ectodermo, mesodermo y endodermo), se da la diferenciación de los diversos tipos celulares especializados que conforman al organismo (modificado de Winslow, 2001).

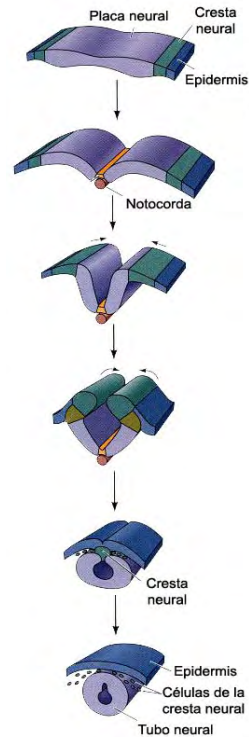


Posterior a la formación de la placa neural ocurre un proceso llamado neurulación, mediante el cual la notocorda envía señales inductoras a la placa neural produciendo una invaginación por la línea media de la misma, elevando los bordes laterales y dando origen a los pliegues neurales y a la placa del piso. De la fusión de las puntas dorsales de los pliegues neurales se forma el tubo neural, el cual es el rudimento embrionario del sistema nervioso central (SNC) (Fig. 2) (Smith y Schoenwolf, 1997; Sadler, 2005).

La diferenciación del tubo neural en las diversas regiones que conforman al SNC, se produce simultáneamente en 3 diversas maneras:

- A nivel anatómico, el tubo neural y su cavidad aumentan de tamaño y se comprimen para formar las cámaras cerebrales y de la médula espinal.
- A nivel tisular, las poblaciones celulares dentro de la pared del tubo neural se reacomodan entre sí para formar las diferentes regiones funcionales del cerebro y de la médula espinal.
- A nivel celular, las células del neuroepitelio se diferencian en los numerosos tipos de células nerviosas (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos) y en células de soporte presentes en el cuerpo.

Figura 2. Proceso de neurulación. Se esquematiza cómo, a partir de la placa neural, por inducción de la notocorda se produce la invaginación de la placa neural y la unión de los pliegues neurales para dar origen al tubo neural, las células de la cresta neural y la epidermis (modificada de Gilbert, 2003).



La regionalización del tubo neural se da como resultado de una serie de movimientos morfogénicos que doblan, pliegan y contraen el tubo neural. El tubo neural está regionalizado en dos ejes neurales primarios:

1. Eje antero-posterior: la polaridad anterior del SNC en vertebrados se vuelve aparente con la división morfológica del tubo neural (Twyman, 2001). Sin embargo, esta regionalización se da incluso antes de que la porción posterior del tubo se ha formado. En la región anterior, el tubo neural da origen a las tres vesículas cerebrales primarias denominadas: prosencéfalo (encéfalo anterior), mesencéfalo (encéfalo medio) y romboencéfalo (encéfalo posterior); en la parte posterior se formará la

médula espinal. Cuando la porción posterior del tubo neural se ha cerrado, las vesículas primarias se subdividen y forman las vesículas secundarias; el prosencéfalo da origen al telencéfalo y diencéfalo, el mesencéfalo se mantiene y, el romboencéfalo da origen al metencéfalo y mielencéfalo. Todas estas regiones a su vez, producen regiones encefálicas adicionales en el adulto (Fig. 3) (Gilbert, 2003).

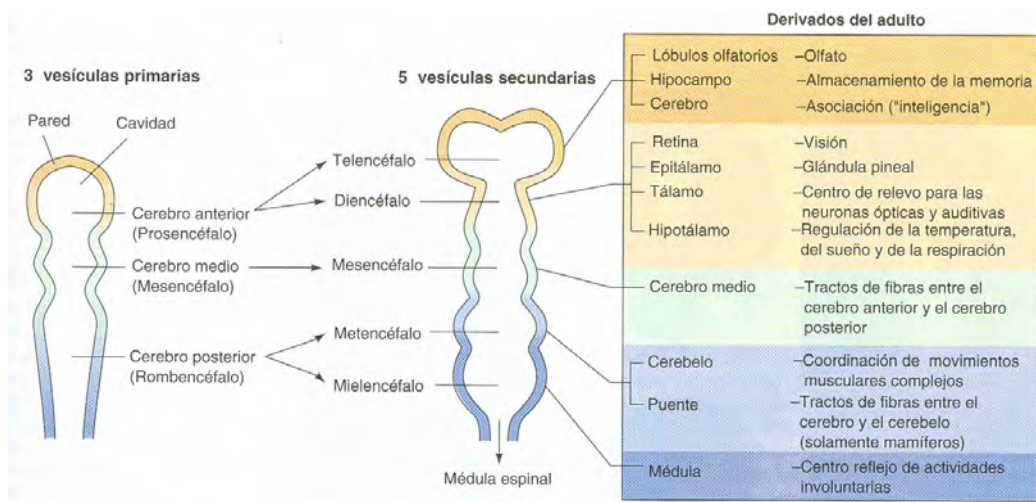


Figura 3. Desarrollo temprano del cerebro humano. De izquierda a derecha, se muestra la regionalización del tubo neural en las tres vesículas cerebrales primarias (prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo), que posteriormente darán origen a las 5 vesículas cerebrales secundarias. Mientras que en el estado adulto, se muestran las estructuras específicas, derivadas de cada región del tubo neural en el embrión. (Figura tomada de Gilbert, 2003).

2. Eje dorso-ventral: el tubo neural de vertebrados muestra una polaridad dorso-ventral, la cual se establece desde el estadio de placa neural. Una vez que el tubo neural se ha cerrado, el extremo más dorsal del tubo neural (línea media dorsal), se forma por una estructura denominada la placa del techo, la cual emite señales como las proteínas

morfogénicas de hueso (BMPs) que a su vez activan la expresión de Dorsalina-1 y permiten mantener la polaridad dorsal del tubo neural. Por otro lado, en la línea media ventral, se forma otra estructura denominada la placa del piso, la cual libera señales como Sonic Hedgehog (Shh), que establecen el patrón del eje ventral (Twyman, 2001).

La especificación de los linajes celulares para la formación del SNC durante el desarrollo, está dada por una compleja interacción entre las cascadas de señalización de moléculas protéicas denominadas morfógenos, cuya acción se da de manera dependiente de su concentración. Entre estas moléculas se encuentran: los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), la familia de proteínas wingless/Wnt (Wnt), la superfamilia de factores de crecimiento transformante β (TGF- β), el Shh y los antagonistas de las BMPs como la nogina, la cordina y la folistatina (Wessely y De Robertis, 2002).

ESPECIFICACIÓN DEL MESENCÉFALO

Como ya se mencionó, durante la embriogénesis, la división temprana de la placa neural se va delimitando progresivamente mediante una gran variedad de mecanismos que llevan al establecimiento de las subregiones que finalmente, darán origen a poblaciones celulares específicas de cada región del cerebro en el organismo adulto. El destino de ciertas regiones del neuroepitelio

que todavía no han madurado por completo, está determinado por la acción en conjunto de determinados factores de transcripción, cuya expresión depende de señales organizadoras.

En vertebrados, el territorio mesencefálico se especifica poco después de la inducción del neuroectodermo a partir del epiblasto dorsal de la gástrula. Morfológicamente, el mesencéfalo se encuentra delimitado en su parte anterior, por la vesícula del diencéfalo y en su parte posterior por el istmo, que lo separa del cerebro posterior (Fig. 3). El desarrollo del mesencéfalo es altamente dependiente de las señales organizadoras provenientes del istmo (Prakash y Wurst, 2004).

El mesencéfalo se establece molecularmente, incluso antes de que la división morfológica aparezca. Esta especificación se debe a los patrones de expresión específicos de los factores de transcripción “orthodenticle homologue 2” (Otx2), “paired box 2” (Pax2) y “engrailed 1” (En1) en el neuroectodermo anterior, que posteriormente se delimitan por el establecimiento de centros de señalización en el límite del mesencéfalo y romboencéfalo y en la porción anterior del surco neural (Nakamura y Watanabe, 2005).

Otx2 es un factor de transcripción que se expresa en el prosencéfalo y mesencéfalo. “Gastrulation brain homeobox” (Gbx2) es otro factor de transcripción, que se expresa en el romboencéfalo en estadios más tempranos del desarrollo. En fases tempranas, los dominios de expresión de Otx2 y Gbx2 se sobrelapan en la región del istmo. Se ha visto que el límite caudal del

dominio de expresión de Otx2 corresponde con el límite caudal de la región del mesencéfalo, por lo que Otx2 resulta esencial para definir la identidad del mesencéfalo y el límite entre el mesencéfalo y el romboencéfalo se define por una interacción de señales de represión entre Otx2 y Gbx2 (Nakamura y Watanabe, 2005).

Entre los factores de crecimiento que son importantes para la expresión de los factores de transcripción en el mesencéfalo está el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) (Nakamura, Katahira et al., 2005). Se cree que la región del istmo (límite entre el mesencéfalo y romboencéfalo) funciona como un organizador para definir estas dos regiones, siendo la molécula organizadora, FGF8. Sin embargo, la vía de transducción de señales hacia el destino mesencefálico río abajo de la señal de FGF8, aún se desconoce (Nakamura, Katahira et al., 2005; Nakamura y Watanabe, 2005) (Fig. 4).

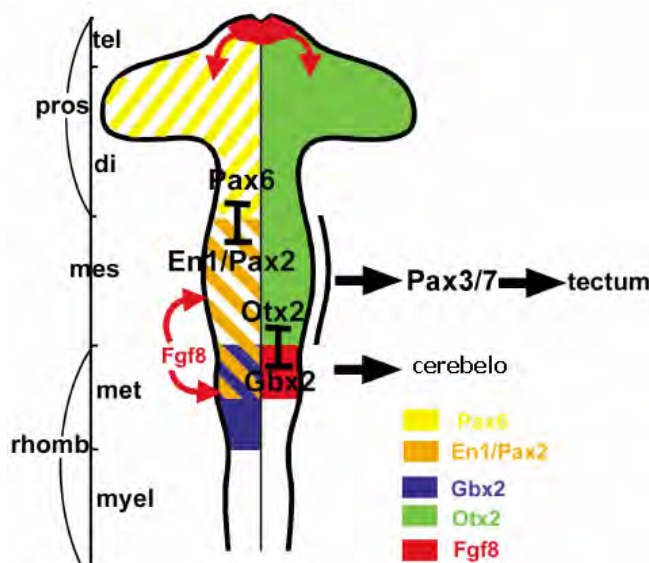


Figura 4. Esquema de las vesículas cerebrales y la interacción de diversos factores de transcripción que determinan el destino de cada región. Se observa que un sobrelape en la expresión de Otx2, Pax2 y En1, definen el territorio del mesencéfalo, mientras que la señal de FGF8 en el mesencéfalo, reprime la expresión de Otx2 e induce la expresión de Gbx2 y así, el cambio en el destino del mesencéfalo hacia metencefalo (modificado de Nakamura y Watanabe, 2005).

NEUROGÉNESIS Y GLIOGÉNESIS

Como se dijo antes, para la formación del SNC, se requiere de la producción de diversos tipos celulares neuronales y gliales.

La capa celular del tubo neural, denominada neuroepitelio germinal, es el primordio del SNC y consiste en células multipotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en células neuronales y gliales por medio de los procesos denominados neurogénesis y gliogénesis. Estas células se denominan células troncales neurales (CTNs) y tienen la capacidad de autorrenovarse y de producir progenitores intermediarios que están comprometidos a un destino neuronal o glial.

Durante el desarrollo, la neurogénesis precede a la gliogénesis. En el SNC de mamíferos, las neuronas se generan principalmente durante el desarrollo embrionario temprano, mientras que la glía se produce durante el desarrollo tardío y posterior al nacimiento (Fig. 6) (Bertrand *et al.*, 2002).

En el mesencéfalo de rata, la neurogénesis comienza alrededor del día 10 de desarrollo embrionario (E10), alcanza un pico al día 14 (E14) y decrece hasta poco antes del nacimiento (Götz *et al.*, 2005) (Fig. 5).

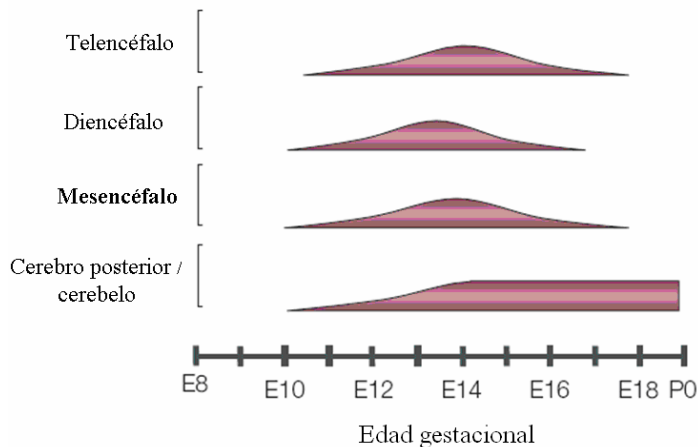


Figura 5. Neurogénesis. Representación del curso temporal del proceso de neurogénesis en diversas regiones del SNC de roedores, desde el octavo día embrionario hasta el nacimiento. En particular, en el área del mesencéfalo, la neurogénesis comienza al día E10, mostrando un pico de producción neuronal en el día E14 (modificado de Götz *et al.*, 2005).

Estudios genéticos realizados en *Drosophila* y modelos de vertebrados muestran que existen algunos “genes proneurales” activados por factores de transcripción como los pertenecientes a la familia bHLH (basic helix-loop-helix, por sus siglas en inglés), que son necesarios y suficientes para iniciar el desarrollo de linajes neuronales y promover la generación de progenitores que están comprometidos a diferenciación, inhibiendo a su vez destinos gliales (Bertrand *et al.*, 2002; Morrison, 2001).

Inicialmente, la neurogénesis es promovida por la expresión de factores bHLH como son la familia de neurogenina y Mash, cuya expresión depende de señales neurogénicas como las ya mencionadas BMPs y eritropoyetina. Cuando estas proteínas se encuentran en altas concentraciones en las CTNs, activan la vía de diferenciación neuronal e inhiben la diferenciación glial. Al mismo tiempo, por medio de un proceso denominado inhibición lateral, la vía de señalización de Notch regula y/o inhibe la expresión de genes proneurales en otras células, bloqueando su entrada a la vía neuronal. Así, la regulación de genes proneurales es un mecanismo clave que mantiene un balance entre los

progenitores que se dirigen a la vía de diferenciación neuronal, los progenitores que se mantienen indiferenciados y los que producen otros tipos celulares gliales (Morrison, 2001) (Fig. 6).

Posteriormente, la gliogénesis inicia por la inducción de diversas señales gliogénicas, como las del factor neurotrófico ciliar (CNTF) y las BMPs. Estas señales activan la diferenciación glial y, en paralelo, inhiben la neurogénesis a través de varios mecanismos como la activación de inhibidores proneurales como el Id (inhibidor de diferenciación) y los pertenecientes a la familia Hes. Por otro lado, se ha demostrado que la señalización de Notch presenta una actividad gliogénica y actúa inhibiendo la actividad de genes proneurales promoviendo así, la entrada a la vía de diferenciación glial (Bertrand et al., 2002; Morrison, 2001) (Fig. 6).

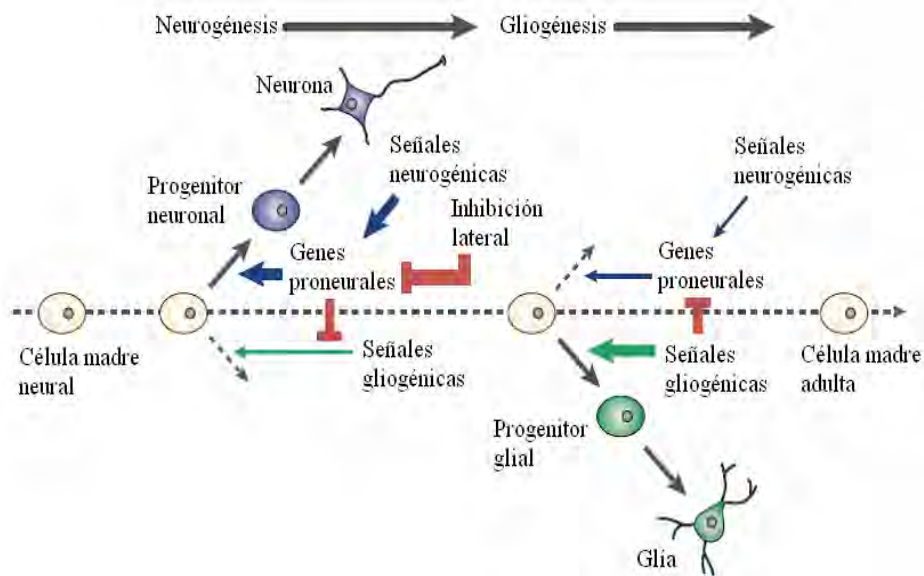


Figura 6. Modelo de neurogénesis y gliogénesis durante el desarrollo neural. En el curso temporal del desarrollo neural, ocurre primero el proceso de generación de neuronas y posteriormente ocurre la generación de glía. La activación de ambos procesos depende de factores intrínsecos y extrínsecos que regulen las propiedades de los precursores neurales. Las señales neurogénicas, son factores extrínsecos que regulan la activación de genes proneurales, promoviendo el arresto del ciclo celular, la diferenciación neuronal y a su vez, inhibiendo la diferenciación glial. También hay un evento de inhibición lateral sobre genes proneurales, dado por la señalización de Notch, que inhibe la expresión de genes proneurales, evitando su entrada a la vía de diferenciación neuronal. Por otro lado, las señales gliogénicas son factores que inhiben a los genes proneurales, y actúan sobre los precursores neurales para inducir la diferenciación glial (modificado de Bertrand *et al.*, 2002).

HISTAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ADULTO

La histamina (HA) es una amina biogénica que es sintetizada en las neuronas a partir del aminoácido precursor L-histidina. Su síntesis involucra 2 pasos: el transporte de la histidina al interior de la célula, que se lleva a cabo por el transportador de L-aminoácidos, y su posterior descarboxilación en las vesículas sinápticas por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC), que es altamente específica. Posteriormente es liberada por un estímulo despolarizante, reconocida por sus receptores específicos en la membrana post y pre-sináptica, e inactivada por enzimas catabólicas como la histamina-N-

metiltransferasa (HNMT) y la monoamina oxidasa B (MAO-B) (Huszti, 1998; Haas y Panula, 2003; Nissinen y Panula, 1995; Schwartz, Arrang *et al.*, 1991) (Fig. 7). Sin embargo, el sitio de inactivación de la HA todavía no se conoce y es tema de estudio de diversos investigadores.

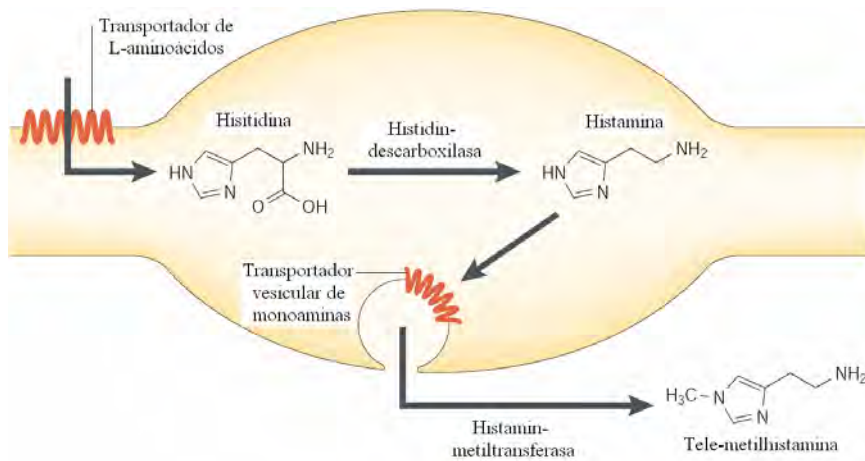


Figura 7. Transporte y metabolismo neuronal de histamina. La HA se sintetiza a partir del precursor L-histidina, el cual entra a la célula por un transportador específico de L-aminoácidos. La enzima HDC se encarga de sintetizar la histamina, que posteriormente será transportada para ser almacenada en vesículas por el transportador vesicular de monoaminas. Al ser liberada por algún estímulo despolarizante, se inactiva por enzimas catabólicas como la HNMT (modificado de Haas y Panula, 2003).

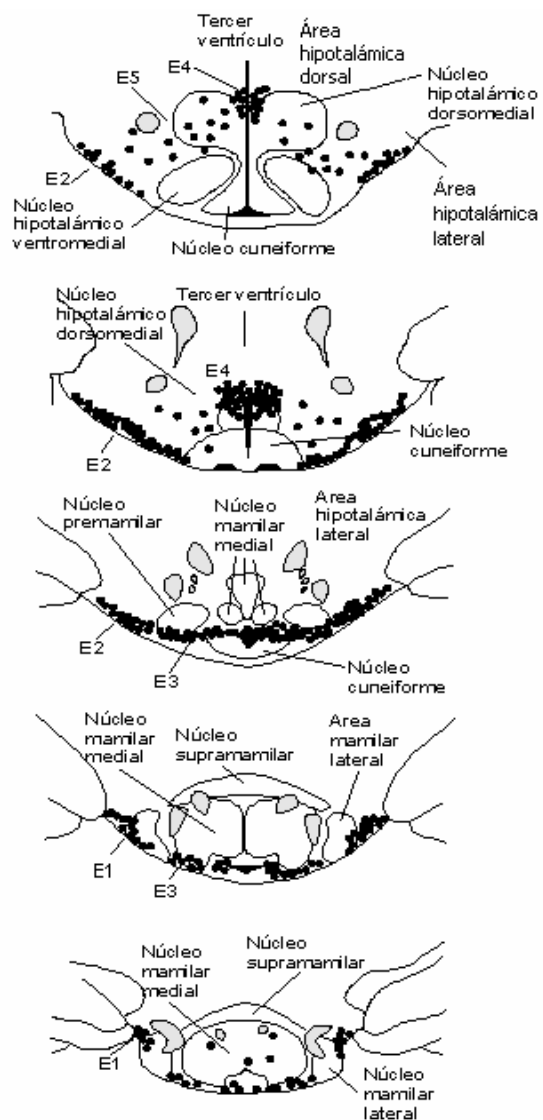
La HA es un neurotransmisor que ha sido propuesto por nuestro grupo como un importante modulador del desarrollo neuronal (neurorregulador) en el SNC.

En el SNC de mamíferos, la HA está involucrada en la regulación de diversas funciones fisiológicas como el sueño y la vigilia, la actividad motora, la regulación térmica y cardiovascular, el balance hídrico y la regulación endocrina (Schwartz, Arrang *et al.*, 1991; Martínez-Mir *et al.*, 1990).

El sistema histaminérgico en el cerebro está conformado por un grupo de neuronas (aproximadamente 64,000) altamente conservado a lo largo de la

evolución. En vertebrados, las neuronas productoras de histamina se localizan en el núcleo tuberomamilar, que forma parte del hipotálamo posterior (Fig. 8). Las principales áreas de proyección histaminérgica varían de acuerdo a la especie, pero en general abarcan la mayor parte del sistema nervioso central (hipocampo, hipotálamo, corteza cerebral, bulbo olfatorio, amígdala, sustancia nigra y estriado).

Figura 8. Localización del sistema histaminérgico en el núcleo tuberomamilar. Serie de esquemas de secciones del hipotálamo posterior de rata. Se ilustran en puntos negros 5 grupos celulares (E1-E5) que corresponden a las neuronas histaminérgicas concentradas en la zona del núcleo tuberomamilar. Los grupos E1 (caudal) y E2 (rostral) se localizan en la superficie lateral del núcleo mamilar; el grupo E3 corresponde a la superficie ventral del cuerpo mamilar; el grupo E4 se localiza en la parte dorsolateral y el E5 se dispersa entre los grupos E2 y E4 (modificado de Onodera *et. al.*, 1994).



En mamíferos, la histamina en el cerebro actúa a través de receptores metabotrópicos (acoplados a proteínas G). Se han clonado 4 receptores histaminérgicos (H₁-H₄), de los cuales 3 (H₁-H₃) se encuentran ampliamente distribuidos en diversas regiones del cerebro de mamíferos y activan diversas vías de señalización, mientras que el receptor H₄ se detecta predominantemente en sistema nervioso periférico (Fig. 9):

Receptor H₁: Es una proteína cuyo tamaño es de 486-491 aminoácidos. En SNC, se expresa en las regiones del tálamo, hipocampo, corteza, amígdala y en la parte basal del cerebro anterior. Se acopla a la proteína Gq/11. Este receptor regula acciones excitadoras. Su función principal es la liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares mediante la activación de receptores a inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) a través de la vía de la fosfolipasa C (PLC).

Receptor H₂: Es una proteína de 358-359 aminoácidos. En SNC, este tipo de receptores se expresa ampliamente en los ganglios basales, hipocampo y amígdala. También se expresa en células piramidales, núcleo de raphe y sustancia nigra. Este receptor se acopla a proteínas Gs y activa la vía de la proteína cinasa A (PKA). Regula acciones excitadoras, generando un efecto bloqueador de los canales de Ca²⁺ y K⁺, regulando el balance hídrico, y la secreción hormonal.

Receptor H₃: presenta varias isoformas (se cree que por lo menos 3 de ellas son funcionales) que van de 326 a 445 aminoácidos. Este receptor permite una autoinhibición en la liberación del neurotransmisor, es decir, controla la síntesis

y liberación endógena de histamina en el cerebro, principalmente en neuronas del núcleo tuberomamilar (Maeda *et.al.*, 2008). Su estimulación por sustancias agonistas, inhibe la síntesis y liberación de HA, mientras que su inhibición por antagonistas, incrementa la liberación de HA. En SNC, se expresan ampliamente como autoreceptores presinápticos, principalmente en el núcleo acumbens, el estriado, el bulbo olfatorio, la sustancia nigra y la amígdala y en menores densidades, se expresa en el hipotálamo. Este receptor se encuentra constitutivamente activo y se acopla a proteínas Gi/o. La señalización a través de este receptor, también afecta la liberación de otros neurotransmisores además de la histamina, como dopamina, serotonina, norepinefrina y diversos péptidos (Haas y Panula, 2003; Raber, 2007).

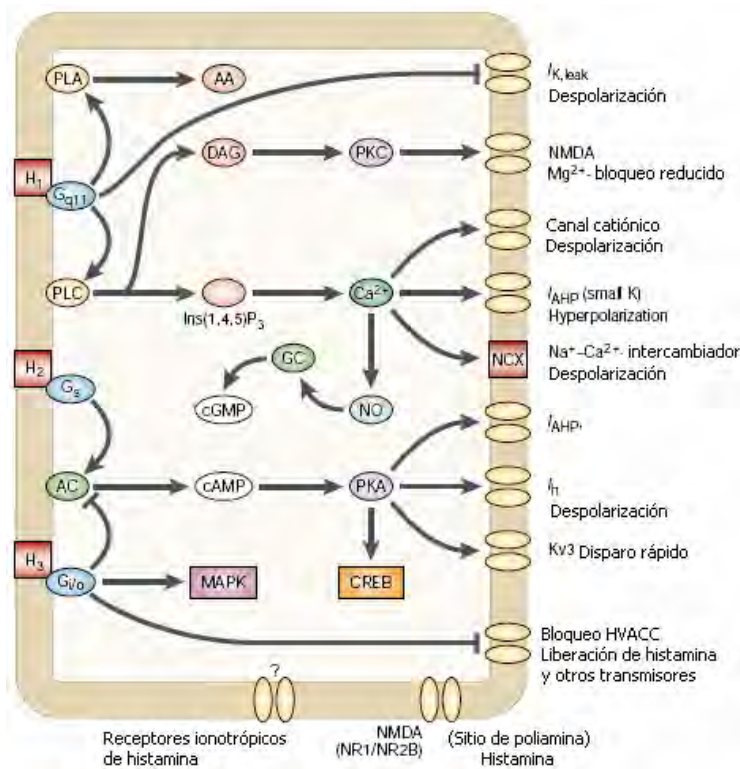


Figura 9. Vías de señalización activadas por receptores histaminérgicos. De lado izquierdo se muestran los 3 receptores histaminérgicos del SNC, que se encuentran acoplados a proteínas G, y el cuadro contiene las vías de señalización y moléculas blanco que son activadas y/o bloqueadas en cada caso (modificado de Haas y Panula, 2003).

HISTAMINA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Durante el desarrollo, la HA se encuentra ampliamente distribuida en diversos tejidos del embrión, mayormente durante la segunda mitad de desarrollo tanto de rata como de ratón (Nissinen y Panula, 1995).

Durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados, la histamina es uno de los primeros neurotransmisores en aparecer, presentando concentraciones incluso varias veces mayores que en el sistema nervioso de adultos. Durante el desarrollo del cerebro de mamíferos, la HA se encuentra tanto en neuronas en la región del mesencéfalo como en mastocitos; se han identificado neuronas inmunorreactivas para HA en el SNC embrionario, las cuales presentan grandes proyecciones a diversas regiones del cerebro (Auvinen y Panula, 1988). Es interesante señalar que la población de células que sintetizan HA aparece transitoriamente durante el desarrollo, y es distinta a la que se observa en el organismo adulto, ya que la primera corresponde con el desarrollo de las neuronas serotoninérgicas en el núcleo raphe (Kinuen *et. al*, 1998; Karlstedt *et al.*, 2003).

El desarrollo del sistema histaminérgico difiere de otros sistemas aminérgicos debido a que éstos últimos presentan dos picos de concentración: uno prenatal y otro postnatal, mientras que el histaminérgico presenta dos picos de concentración prenatal (Fig. 10).

Las células nerviosas inmunorreactivas para histamina, aparecen en el puente y mesencéfalo en el día E13 (Nissinen y Panula, 1995). Por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se ha podido detectar la concentración de histamina en diversas regiones del cerebro durante el desarrollo embrionario. En particular en el mesencéfalo, se detectan bajas concentraciones hasta el día E12, presentando sus más altas concentraciones en los días E14 y E16, seguidos por un decremento en los días E17 y E18, y alcanzando las concentraciones vistas en el adulto, a partir del día E20 (Vanhala *et al.*, 1994; Auvinen y Panula, 1988) (Fig. 10).

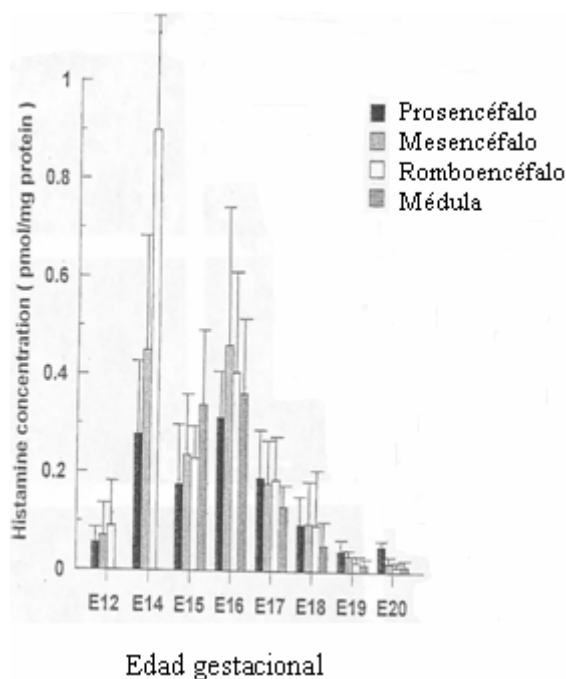


Figura 10. Concentraciones de histamina en diversas regiones del cerebro durante el desarrollo embrionario. En particular, en la región del mesencéfalo se detectan bajas concentraciones al día E12, y posteriormente hay un incremento en la concentración de histamina al día 14 de desarrollo y otro al día 16, seguidos de un decremento observado hasta la etapa postnatal (modificado de Vanhala *et al.*, 1994).

Bajo condiciones normales, los receptores histaminérgicos H₁ y H₂, se encuentran en células neuronales, gliales y endoteliales, mientras que los receptores H₃ se encuentran en células neuronales. Estos receptores se han

detectado en cerebro de fetos de roedores mediante algunas técnicas como Northern blot e hibridación *in situ* (Panula *et al.*, 2000; Raber, 2007).

Receptor H₁: En el día E14, la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del receptor H₁ se ha detectado en el romboencéfalo y prosencéfalo, así como en tejidos periféricos (Fig. 11, a y b). El patrón de expresión se vuelve más pronunciado hacia el día E16, cuando la expresión se puede observar en el puente, neuroepitelio superior del tectum, neuroepitelio ventricular y tálamo, así como en el funículo ventral de la médula espinal (Fig. 11, c y d). También se observa en el diencéfalo y en la corteza. Para el día E18, la expresión se observa en la corteza cerebral, en el neuroepitelio ventricular (Fig. 11, e y f). Posteriormente, se da un decremento en la expresión del receptor H₁ hasta el nacimiento, lo cual correlaciona con el decremento observado en la concentración de histamina durante el desarrollo embrionario (Fig. 11, g y h) (Kinnunen, *et al.*, 1998) (Fig. 11).

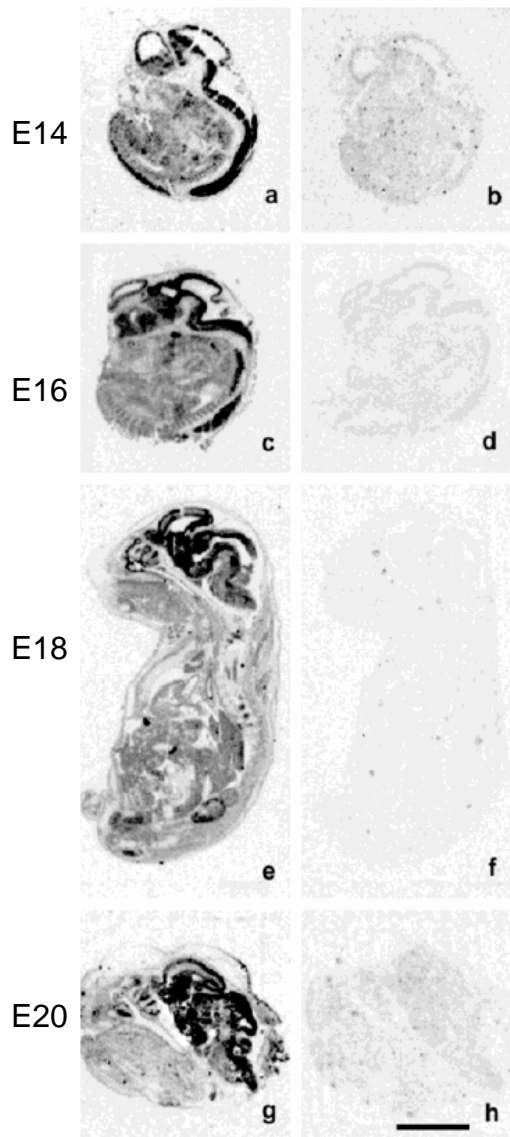


Figura 11. Pruebas de hibridación donde se muestra la expresión del ARNm del receptor H_1 en fetos de rata de 14, 16, 18 y 20 días de desarrollo embrionario. De lado izquierdo se muestra la expresión del ARNm y de lado derecho se muestran controles negativos con sondas de cloranfenicol acetiltransferasa de *S. aureus* (modificado de Kinnunen *et. al.*, 1998).

Receptor H_2 : Este receptor se encuentra ampliamente distribuido en diversas áreas del SNC. No se tienen estudios en estadíos anteriores al E15, sin embargo se sabe que a partir de este estadío en adelante, se observa la expresión de este receptor en las partes frontal y caudal del área del núcleo de raphe. Ésto coincide con la producción transitoria de HA en las neuronas de este núcleo, observada a edades tempranas del desarrollo. A lo largo del desarrollo y hasta el nacimiento, la expresión de este receptor es observada en el área del núcleo tuberomamilar, la parte ventral del hipotálamo y la parte más

externa de la corteza cerebral (Karlstedt *et. al.*, 2001) . En general, los patrones de expresión de este receptor en el núcleo raphe y tuberomamilar, correlacionan temporalmente con el desarrollo del sistema histaminérgico en el cerebro. Así, se cree que el receptor H₂ podría jugar un papel regulador y guiar la distribución de las neuronas histaminérgicas durante el desarrollo embrionario (Fig. 12).



Figura 12. Expresión del ARNm del receptor H₂ durante el desarrollo embrionario detectado mediante pruebas de hibridación *in situ*. En E15, las puntas de flecha señalan el área rostral y caudal del núcleo raphe, donde la expresión es mayor, mientras que en E17, la expresión se concentra en el área del núcleo tuberomamilar y el hipotálamo (modificado de Karlstedt, 2001).

Receptor H₃: Se cree que este receptor juega un papel muy importante durante el desarrollo embrionario. Se ha detectado la expresión temprana de este receptor exclusivamente en el SNC en los días 15 y 16 de desarrollo embrionario. En el día E15 se observa una mayor expresión en el epitelio ventricular del mesencéfalo, así como en la médula oblonga y en la médula espinal; mientras que en el día 16, la expresión se detecta en la parte dorsal del mesencéfalo, el tálamo, hipotálamo y núcleo accumbens. Hacia el día E18, se observa el mismo patrón de expresión que en el día E16. Posteriormente, en E19 y hasta el nacimiento, el patrón de expresión es distinto que el observado

en estadios más tempranos, encontrándose mayormente en la placa cortical (Karlstedt *et. al.*, 2003; Héron, 2001) (Fig. 13).

A pesar de que la mayoría de los estudios se enfocan en los efectos a corto plazo que podría tener la HA en el cerebro durante el desarrollo embrionario, poco se ha estudiado acerca de los efectos que el incremento de la HA en el cerebro embrionario pudiera tener a largo plazo, en el organismo adulto. En este sentido se ha sugerido que el bloqueo específico del receptor H_3 durante el desarrollo embrionario, podría afectar negativamente las pruebas conductuales de reconocimiento de objetos, aprendizaje espacial en el laberinto de agua e inhibición de pre-pulso (Raber, 2007; Acevedo *et al.*, 2007).

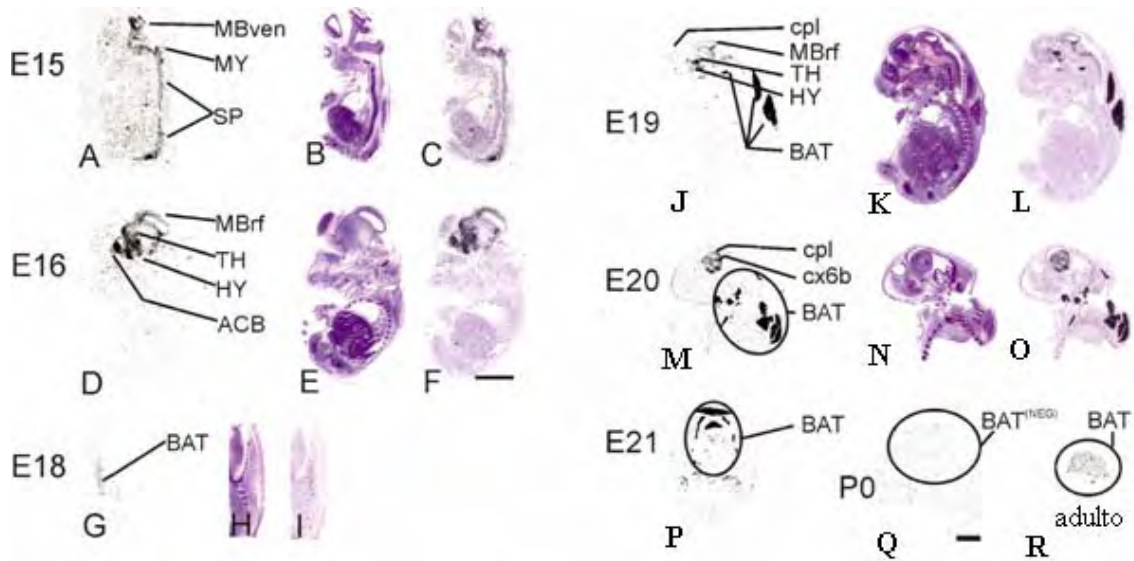


Figura 13. Expresión del receptor H_3 durante el desarrollo en rata. Las figuras de lado izquierdo (A, D, G, J, M y P) muestran la expresión del receptor H_3 , mientras que las de lado derecho (B, E, H, K, N y Q) corresponden a tinciones con hematoxilina-eosina. La composición de ambas imágenes para cada caso, corresponde a las figuras C, F, I, L, O y R. Las estructuras observadas son: epitelio ventricular del mesencéfalo (MBven), médula (MY), médula espinal (SP), techo del mesencéfalo (MBrf), tálamo (TH), hipotálamo (HY), núcleo acumbens (ACB), tejido adiposo (BAT) y placa cortical (cpl) (modificado de Karlstedt, 2001).

Debido a esto, se ha propuesto que la histamina podría jugar un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso, a pesar de que todavía no se conoce el mecanismo a través del cual podría estar actuando (Fioretti *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha sugerido que la histamina actúa como un regulador autócrino durante el desarrollo, a través de mecanismos intracelulares y que podría estar implicada en mecanismos de crecimiento y diferenciación celular (Nissinen y Panula, 1995).

CÉLULAS TRONCALES

Dependiendo de las características o función celular, se han adoptado diferentes nombres para referirse a las células precursoras de algún linaje en particular. Sin embargo, de manera general, célula troncal es el nombre que se le da a las células no diferenciadas (no especializadas) que presentan un potencial de diferenciación para generar diversos linajes celulares y que mantienen la capacidad teórica de autorrenovarse indefinidamente. Estas células se pueden clasificar en tres tipos:

- Célula troncal totipotente: son las más primitivas y el término se refiere al cigoto unicelular, que es la única célula que tiene la capacidad de dar origen a todos los tipos celulares que componen al embrión, así como a tejidos extraembrionarios (placenta, cordón umbilical), pero no presenta la capacidad de autorrenovación.

- Células troncales pluripotentes: estas células tienen la capacidad de autorrenovarse y de producir las células que componen las 3 capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. Por lo tanto, pueden dar origen a cualquier linaje celular dentro de un organismo. Las células pluripotentes mejor caracterizadas son las células troncales embrionarias.
- Células troncales multipotentes: tienen la capacidad de autorrenovarse y de dar origen a los diversos tipos celulares que pertenecen a un linaje específico. Ejemplos: hematopoyético, neural.

En general, las células con amplio ó restringido potencial de diferenciación, capacidad de autorrenovarse y capacidad limitada de proliferación se han denominado células progenitoras, por la dificultad que existe para determinar si una célula del SNC presenta todas las características de célula troncal (CT) (Baizabal *et al.*, 2003; Gage, *et al.*, 1995) (Fig. 14).

Las CTs embrionarias (pluripotentes) están resultando ser un tema de gran interés debido a sus propiedades biológicas y potencial importancia médica. Para efectos de este trabajo, me voy a referir específicamente a las células troncales neurales, que de acuerdo con la clasificación anteriormente descrita, se incluyen en el grupo de células troncales multipotentes.

POTENCIAL DE LAS CÉLULAS TRONCALES CON DESTINO NEURAL

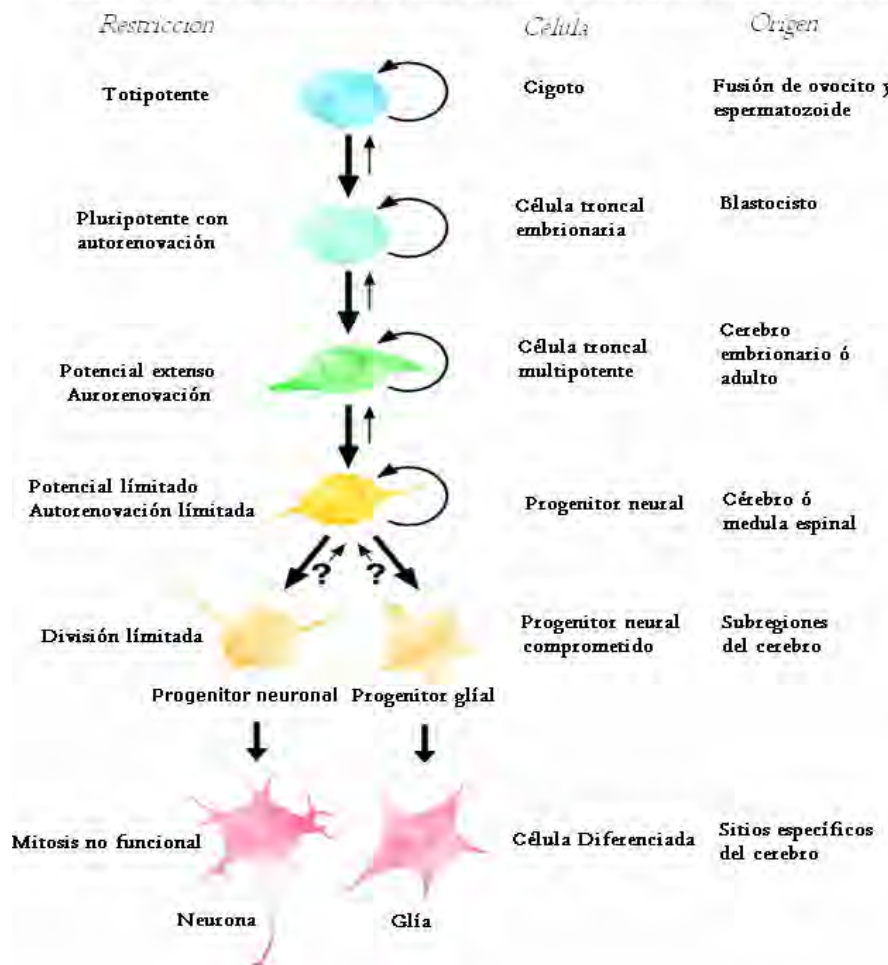


Figura 14. Potencial de las células troncales con destino neural. Se muestra cómo a partir de una célula troncal totipotente, se va dando una especialización y compromiso celular hasta generar los tipos especializados de células que conforman al SNC. Se ilustran los grados de restricción que dan origen a la diferenciación de neuronas (modificada de Gage, 2000).

CÉLULAS TRONCALES NEURALES

Una característica intrínseca del Sistema Nervioso es su enorme diversidad celular. En el cerebro adulto, neuronas específicas producen neurotransmisores y receptores especializados y tienen contactos eléctricos o químicos con otras células.

Las CTNs son los progenitores de todos los tipos celulares especializados del SNC. Estas células se encuentran en diversas regiones del cerebro embrionario, neonato y adulto. Funcionalmente, se definen como células no diferenciadas, que presentan la capacidad de autorrenovarse a largo plazo, y de diferenciarse y dar origen a los tres tipos celulares que componen el sistema nervioso maduro: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Como ya mencioné anteriormente, estas células se originan durante la formación de la placa neural y posiblemente constituyen el tipo celular predominante del neuroectodermo. Mientras continúa el desarrollo, se forma el tubo neural y las células troncales neurales se vuelven progresivamente menos abundantes y emergen progenitores celulares más restringidos.

En el Sistema Nervioso, el modelado aparente en los ejes antero-posterior y dorso-ventral ocurre tempranamente, de manera paralela con la inducción neural. Debido a esto, las células troncales aisladas de diferentes regiones neurales generan células específicas de cada región *in vitro*. Así, las células troncales en vertebrados parecen estar especificadas posicionalmente. Por otro lado, los diferentes tipos celulares neurales se originan a un tiempo determinado, que es característico de una región y especie en particular. Como ya se mencionó, en el SNC, las neuronas se originan antes que la glía, y determinados tipos celulares tienen edades de origen específicas. Así que las células troncales a parte de estar especificadas posicionalmente, también

tienen información temporal que refleja los cambios de los progenitores dependiendo del estadio de desarrollo en que se encuentran (Temple, 2001).

PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES NEURALES

Durante el desarrollo en vertebrados, los precursores neurales tienen que pasar por procesos de proliferación, migración y diferenciación en una secuencia ordenada espacio-temporal para que se de un desarrollo apropiado del sistema nervioso. Esto requiere de interacciones celulares complejas que se presentan a lo largo del desarrollo embrionario.

Las señales morfogénicas de los factores de crecimiento son elementos clave durante el desarrollo, ya que pueden promover la inhibición o activación de los procesos de proliferación, diferenciación y control de la sobrevivencia. Generalmente, la actividad de factores específicos, depende del tipo celular al que van dirigidos y mayormente, del estado de diferenciación en que se encuentran. Existe un gran número de factores de crecimiento que tienen diversos efectos sobre los precursores neurales y que han sido encontrados durante el desarrollo del SNC (Panchision y McKay, 2002; Gage, *et. al.*, 1995).

El factor de crecimiento epidermal (EGF) y el FGFb parecen tener un amplio espectro de acción, promoviendo la proliferación y aumentando la sobrevivencia y crecimiento de precursores neurales a diferentes estadios

durante el desarrollo embrionario y en varias regiones del SNC (Santa-Olalla y Covarrubias, 1995; Saarimäki-Vire *et. al.*, 2007).

Los estudios relacionados al establecimiento fenotípico de células neurales y su habilidad de responder ante diversos factores, se facilitan cuando estos precursores se aíslan y expanden en presencia de factores de crecimiento, que resultan elementos clave para promover los procesos de proliferación y dirigir la diferenciación neural. En conjunto, es posible el aislamiento de poblaciones celulares de tejido del SNC embrionario y su mantenimiento, proliferación y diferenciación en condiciones *in vitro*, bajo la acción de múltiples factores. Estudios recientes han mostrado que el cultivo de progenitores neurales aislados de roedores se expande eficientemente en presencia de EGF y FGFb (Saarimäki-Vire *et. al.*, 2007). En estos sistemas de cultivo, la ausencia de estos factores mitogénicos y la adición de suero o algún otro factor, promueven la diferenciación de estos progenitores neurales a células neuronales y gliales. Un claro ejemplo que ha sido ampliamente estudiado, es el mantenimiento de progenitores neurales en cultivos adherentes, en presencia de FGFb, lo cual promueve que estos cultivos se diferencien hacia diversos tipos neuronales (Carpenter *et.al.*, 1999).

El propósito de este trabajo es estudiar el efecto del la HA sobre diferentes parámetros celulares como la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular de CTN del mesencéfalo ventral (MesV) en presencia del factor mitogénico FGFb y en ausencia del mismo. De este modo trataremos de

entender *in vitro* la función de la HA durante los picos de concentración de esta amina biogénica presentes *in vivo*.

NEURONAS DOPAMINÉRGICAS EN MESENCÉFALO Y ENFERMEDAD DE PARKINSON

En vertebrados, existen diversos grupos de neuronas dopaminérgicas (DA) ubicados en diferentes regiones del cerebro, tales como el bulbo olfatorio, la retina, el hipotálamo y el mesencéfalo. La formación más grande de neuronas DA se ubica en la región del mesencéfalo ventral dentro de la sustancia nigra y la zona tegmental ventral. Durante el desarrollo embrionario del cerebro, la especificación del fenotipo dopaminérgico depende de la interacción de factores como Shh, derivado de la línea media ventral de la placa del piso, y FGF8, derivado del borde entre el mesencéfalo y metencéfalo (istmo), que se sabe son muy importantes para la especificación de precursores dopaminérgicos, y cuyos efectos se regulan por medio de factores de transcripción como Nurr1 y En-1, que llevan a la inducción neural y al posterior mantenimiento de las neuronas DA del mesencéfalo.

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo cuya principal característica es la pérdida progresiva de neuronas DA de la región del mesencéfalo. Estas neuronas son la fuente de dopamina del estriado, un neurotransmisor relacionado con las funciones motoras, por lo que una pérdida

de éstas, conlleva a la aparición de disfunciones motoras (Riaz *et.al.*, 2002).

Por lo cual, en la actualidad, las células precursoras de estas neuronas (DA) y el estudio de los mecanismos que permiten su eficiente generación, poseen un valor clínico muy elevado, por su posible aplicación para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

JUSTIFICACIÓN

Como ya se mencionó en la parte introductoria, se cuenta con datos que indican que las primeras células inmunorreactivas para histamina aparecen alrededor del día 13 de gestación en el mesencéfalo y que los 3 receptores para histamina, así como la enzima que la sintetiza, están presentes en el SNC a edades tempranas del desarrollo embrionario. La histamina tiene una mayor concentración que la reportada en adulto en las regiones del mesencéfalo, el puente y la médula (Vanhala et al., 1994; Auvinen y Panula, 1988). Se ha propuesto que la histamina podría jugar un papel importante durante el desarrollo embrionario y más específicamente en el desarrollo del sistema nervioso.

Los cultivos *in vitro* son herramientas experimentales muy útiles para el estudio de los mecanismos que se dan durante el desarrollo del cerebro y gracias a la utilización de estos modelos se sabe que las células troncales de estadíos más tempranos producen más neuronas y tienen una menor tendencia a producir glía, que aquellas de estadíos más avanzados (Baizabal JM, *et. al.*, 2003).

Además, durante el desarrollo la etapa de mayor producción de neuronas coincide con el primer pico de concentración de HA (E14) en la región del mesencéfalo (Götz y Huttner, 2005), lo cual resulta muy interesante y nos ha llevado a pensar que es posible que exista una relación entre los picos

de neurogénesis y la concentración de HA en este día y que ésta pudiera ejercer algún efecto sobre las CTN del mesencéfalo ventral, relevante para la formación del SNC.

Con respecto a los métodos de cultivo, se han realizado estudios que indican que los precursores neurales derivados de la corteza y del mesencéfalo de embriones en estadíos tempranos, tienen un mayor potencial neurogénico, y precursores derivados de embriones en estadíos más tardíos, presentan un mayor potencial gliogénico, específicamente en la diferenciación de astrocitos. Además, se ha reportado que en cultivo se reproduce el curso temporal para la generación de neuronas y glía, ya que un menor número de pasajes genera mayor número de neuronas, comparado con cultivos de mayor tiempo y con mayor número de pasajes, en los que se obtienen una mayor población de células gliales (Chang *et al.*, 2004).

Debido a que la función de la histamina durante el desarrollo embrionario no ha sido determinada aún, resulta importante y sumamente interesante el estudio del sistema histaminérgico en células precursoras neurales, por lo que el presente estudio está enfocado en evaluar la función que la histamina podría tener sobre diversos procesos celulares como la proliferación, sobrevivencia y diferenciación en cultivos de la región de mesencéfalo ventral de rata, y así poder estudiar el papel de la HA sobre el curso temporal de procesos tan importantes como la neurogénesis.

HIPÓTESIS

La histamina es capaz de modular la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de células troncales neurales *in vitro*, aisladas de mesencéfalo ventral de rata de 12 días de desarrollo embrionario.

OBJETIVOS

General:

Estudiar el efecto de la histamina durante la proliferación y la diferenciación *in vitro* de células troncales neurales aisladas de mesencéfalo ventral de rata,

Específicos:

1. Determinar las condiciones adecuadas *in vitro* para el estudio del efecto de la HA sobre las CTN del mesencéfalo ventral de rata.
2. Evaluar la presencia de receptores histaminérgicos en cultivos de mesencéfalo ventral de rata de 12 días de desarrollo embrionario.
3. Estudiar el efecto de diversas concentraciones de histamina en la sobrevivencia, proliferación y diferenciación neuronal *in vitro*.
4. Determinar como se afecta la expresión de los receptores para HA por los tratamientos con HA durante la proliferación y la diferenciación celular.

METODOLOGÍA

I. DISECCIÓN DEL MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA DE 12 DÍAS DE DESARROLLO EMBRIONARIO

Para la obtención de CTN de mesencéfalo ventral, se utilizaron ratas Wistar de 12 días de gestación, proporcionadas por el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Estas ratas se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron los embriones, a partir de los cuales se hizo la extracción de CTN de mesencéfalo ventral.

Para llevar a cabo la extracción de los embriones y la disección, el área de trabajo y los instrumentos utilizados, se desinfectaron previamente con etanol al 70%. Se siguen los siguientes pasos:

1. Hacer una incisión en la parte baja del abdomen de la rata gestante de 12 días; localizar y extraer el útero que contiene los embriones.
2. Colocar el útero en una caja petri con solución salina para el mantenimiento de tejidos (Krebs/Mg²⁺/BSA; ver apéndice 1). Por cada rata se obtienen de 12 a 18 embriones aproximadamente.
3. En la caja petri, extraer los embriones del útero, mediante la remoción del saco vitelino y transferirlos a una nueva caja con solución fresca.

Para la disección de la región del mesencéfalo ventral, se utiliza un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1500) (Fig. 15).

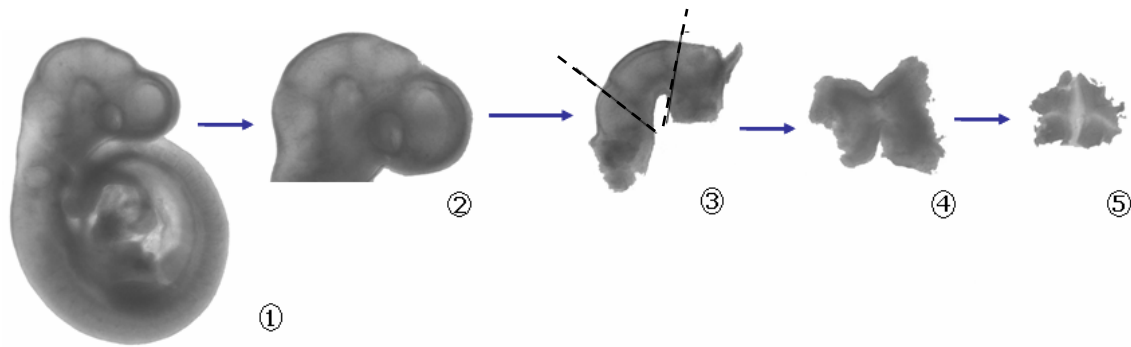


Figura 15. Se esquematiza la metodología de disección del área del mesencéfalo ventral de embriones de rata de 12 días de desarrollo. Una vez que se ha extraído el embrión del útero y se ha removido el saco vitelino (1), se retira la cabeza del resto del embrión (2) para facilitar su manipulación. Posteriormente, se quita la parte frontal de la cabeza para poder aislar el tejido neural. Una vez que se ha removido el tejido excedente y se tiene sólo el tubo neural, se observa claramente el área del mesencéfalo al centro del tubo neural, marcada con las líneas punteadas (3). Ésta se abre por su parte dorsal, para dejar expuesta el área del mesencéfalo ventral (4). Una vez que queda expuesta el área, se remueve el tejido excedente de los extremos y se va eliminando lo que corresponde a la parte dorsal. Así, queda disectado el mesencéfalo ventral (5).

II. CULTIVO PRIMARIO DE CTN DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA E12

Las porciones de tejido obtenidas por disección se transfieren a un tubo de 15 ml (Corning 430791), con 5 ml de solución fisiológica Krebs nueva y se realiza el siguiente procedimiento:

1. Centrifugar los fragmentos de mesencéfalo ventral fetal a 1000 rpm (200 x g) en una centrífuga de mesa (Thermo Forma 1L GP) durante 5 minutos a 4° C.
2. Desechar el sobrenadante y agregar 950 µl de solución fisiológica Krebs fría al botón que contiene los fragmentos de tejido.
3. Disociar mecánicamente los fragmentos de tejido con la ayuda de una micropipeta de 1 ml (Gilson P1000), subiendo y bajando el émbolo suavemente de 6 a 8 veces para deshacer el tejido y obtener las células en suspensión.

4. Dejar reposar la suspensión durante 3 minutos para que los fragmentos no disociados se sedimenten.
5. Recuperar el sobrenadante y se transfiere a un tubo nuevo, cuidando de no tomar los fragmentos sedimentados.
6. Agregar nuevamente 950 μ l de solución fisiológica Krebs fría al sedimento que contiene los fragmentos de tejido, y repetir los pasos 3, 4, y 5, juntando así los 2 sobrenadantes recuperados del tubo anterior.
7. La suspensión obtenida a partir de la mezcla de los 2 sobrenadantes, se lleva a un volumen final de 5 ml con solución fisiológica Krebs y se centrifuga nuevamente a 200 x g durante 5 minutos a 4° C.
8. Una vez obtenido el botón celular, retirar el sobrenadante y agregar de 1 a 3 ml (dependiendo del tamaño del botón) de medio N2 (Ver apéndice 1) para resuspender el botón.
9. Tomar una alícuota de la suspensión y cuantificar la cantidad de células obtenidas utilizando la cámara de Neubauer, contando el número de células en 4 cuadrantes de la cuadrícula de la cámara. Para obtener el número total de células en la suspensión, se realiza el siguiente cálculo:

$$\begin{aligned} & \# \text{ de células} / 4 \text{ campos} \times 2 \text{ (factor de dilución)} \times 10,000 \text{ (factor del} \\ & \text{hemocitómetro)} \times \text{ml del volumen en el que se resuspendieron las células} \\ & = \# \text{ total de células en la suspensión} \end{aligned}$$

10. Una vez calculado el número de células obtenido, sembrar de 1 a 1.5 millones de células por caja de cultivo de 10 cm de diámetro, previamente tratadas toda la noche con poli-L-ornitina (PLO, Sigma; 15 µg/ml) y 2 horas con fibronectina (Fn, Invitrogen; 1 µg/ml) en 7 ml finales de medio N2 y 10 ng/ml de FGFb (R & D systems y Peprotech).
11. Incubar a 37° C y 5% de CO₂ para su expansión, adicionando diariamente FGFb a una concentración final de 10 ng/ml y cambiar el medio cada 2 días, hasta alcanzar una confluencia de 60 a 80%.

A estos cultivos se les denomina en pasaje 0 (P0).

III. PASAJE DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CTN DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA E12

Una vez que los cultivos en P0 alcanzan una confluencia de 80%, fueron pasados a cajas de 24 pozos (1.77 cm²/pozo, Corning 3524) a una densidad de 15,000 células por pozo para comenzar el experimento con tratamientos con HA (Sigma).

1. Para despegar las células, se retira el medio de cultivo de la caja P0 y se hace un lavado de 5 minutos con 5 ml de solución PBS-EDTA 0.1 mM (Ver apéndice 1), previamente calentada a 37° C.
2. Agregar 7 ml de PBS-EDTA nuevo y dejar 5 minutos incubando a 37° C y 5% de CO₂.

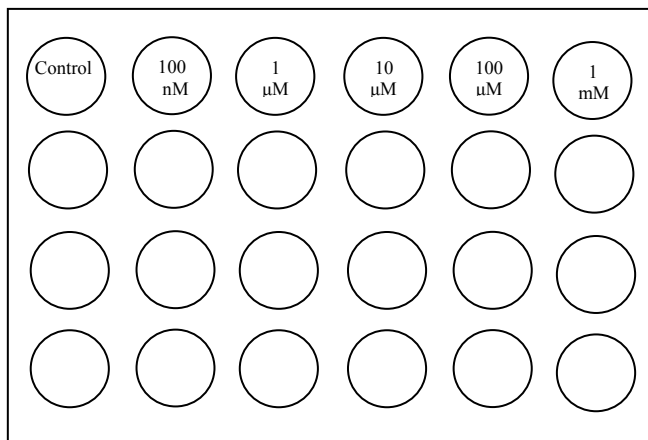
3. Despegar las células con la ayuda de una pipeta de 10 ml, subiendo y bajando la solución a una velocidad y fuerza constantes, para que se despeguen las células de la caja.
4. Observar al microscopio la caja para verificar que se haya despegado la totalidad de las células. En caso de que no haya sido así, repetir los pasos 2 y 3.
5. Las células en suspensión se recuperan en un tubo de 15 ml y se centrifugan a 1 500 rpm (300 x g) durante 10 minutos a 4° C.
6. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 1 a 3 ml de medio N2, dependiendo del tamaño del botón.
7. Calcular la cantidad de células utilizando la cámara de Neubauer de la misma manera que se explicó anteriormente.
8. Una vez calculado el número de células, se siembran 15 000 células por pozo en cajas de cultivo de 24 pozos o 450 000 células por pozo en cajas de 6 pozos, previamente tratadas toda la noche con PLO y 2 horas con Fn en 0.5 ml o 1.5 ml finales de medio N2 y 10 ng/ml de FGFb, respectivamente.

A estos cultivos celulares se les denomina en pasaje 1 (P1). El procedimiento a seguir es el mismo cuando se requiere pasar células de P1 a P2.

IV. TRATAMIENTOS CON HISTAMINA

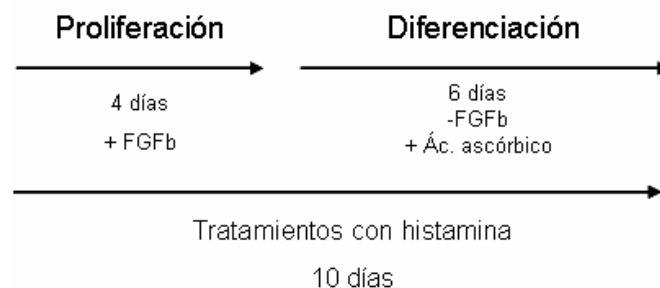
Los tratamientos se comienzan el mismo día que se pasan las células de P0 a P1 ó de P1 a P2.

Se prepara un stock de histamina a 500 mM (Ver apéndice 1). Posteriormente, se hacen diluciones a partir del stock y se dan los tratamientos, de la siguiente forma:



Para:	Agregar:	De una dilución:
100 nM	2 μl	25 μM
1 μM	2 μl	250 μM
10 μM	2 μl	2.5 mM
100 μM	2 μl	25 mM
1 mM	2 μl	250 mM

Para continuar el experimento, se dejan 4 días en proliferación, cambiando el medio cada 2 días y agregando 10 ng/ml de FGFb y tratamientos con HA diariamente. Posterior a la proliferación se comienza la diferenciación, retirando el FGFb y agregando ácido ascórbico (AA) como antioxidante a una concentración de 2 mM cada cambio de medio. En esta etapa, también se dan tratamientos con histamina diariamente, durante 6 días. Estas condiciones se esquematizan de la siguiente forma:



Una vez que han concluido las etapas de proliferación y diferenciación, las células sembradas en cajas multipozos de 24 se fijan con solución de paraformaldehído (PFA) al 4% (Ver apéndice 1) para hacer inmunotinciones.

V. INMUNOCITOQUÍMICA

Anticuerpos Primarios:

Anticuerpo monoclonal anti-nestina	1:100
(Developmental Studies Hybridoma Bank)	
Anticuerpo anti-TH	1:1000
(Pelfreeze)	
Anticuerpo monoclonal anti-tubulina- β III	1:2000
(Covance, Berkeley, CA)	
Anticuerpo policlonal anti-tubulina- β III	1:2000
(Covance, Berkeley, CA)	
Anticuerpo policlonal anti-GFAP	1:2000
(DAKO)	

Anticuerpos Secundarios (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR):

Alexa Fluor 568 anti-IgG de conejo hecho en cabra

Alexa Fluor 568 anti-IgG de ratón hecho en cabra

Alexa Fluor 488 anti-IgG de rata hecho en cabra

Alexa Fluor 488 anti-IgG de ratón hecho en cabra

Todos se usan en una dilución 1:1000

Para las inmunocitoquímicas se lleva acabo el siguiente procedimiento:

1. Absorber el medio N2.
2. Lavar 2 veces con PBS 1X (Ver apéndice 1).
3. Fijar las células en PFA al 4% por 20 minutos (Ver apéndice 1). A partir de aquí se puede continuar el procedimiento fuera de la campana.
4. Retirar el PFA y hacer 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X + 0.1 % BSA (Ver apéndice 1), en agitación.
5. Aplicar solución bloqueadora de PBS 1X + 0.3% de Tritón X-100 + 10% de NGS (Ver apéndice 1) durante 45 minutos a TA.
6. Hacer 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X + 0.1% BSA.
7. Incubar toda la noche a 4° C con 20 µl del o los anticuerpos primarios + 10% de NGS.

Cubrir cada pozo con un pedazo de parafilm para distribuir homogéneamente el anticuerpo en todo el pozo.

8. Recuperar los anticuerpos primarios y lavar 3 veces con PBS 1X + 0.1% BSA.
9. Adicionar el o los anticuerpos secundarios + PBS 1X + 10% de NGS e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
10. Recuperar los anticuerpos secundarios y hacer 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X + 0.1% BSA.

11. Teñir los núcleos por 5 minutos con una solución de Hoechst (1 ng/ml) / PBS 1X.

12. Lavar 3 veces con PBS 1X.

VI. EXTRACCIÓN DE ARN

Para hacer extracción de ARN, se parte de las mismas condiciones de cultivo sólo que en este caso, las células se siembran en cajas de 6 pozos (Corning 3516) a una densidad de 450, 000 células por pozo. Una vez que se han cumplido 4 días de proliferación y 6 de diferenciación bajo los diversos tratamientos con histamina, como se explicó en párrafos anteriores, se realiza la extracción de ARN por el método de TRIZOL (Invitrogen) a partir del siguiente protocolo:

1. Agregar 1 ml de TRIZOL (Invitrogen) y homogenizar con el vortex 60 seg.
2. Incubar 15 min a 30° C
3. Agregar 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIZOL
4. Agitar en vortex 15 seg
5. Incubar 3 min a 30° C
6. Centrifugar 15 min a 4000 rpm a -2-8° C
7. Transferir solo la parte acuosa (parte superior) a un tubo nuevo
8. Agregar 500 µl de isopropanol
9. Agitar en vortex 15 seg.

10. Incubar 10 min a 30° C
11. Centrifugar 10 min a 4000 rpm a -2-8° C
12. Quitar el sobrenadante con una pipeta pasteur estirada
13. Lavar con 1 ml de etanol absoluto
14. Agitar en vortex 15 seg.
15. Centrifugar 5 min a 4000 rpm a -2-8° C
16. Lavar con 1 ml de etanol al 75%
17. Agitar en vortex 15 seg
18. Centrifugar 5 min a 4000 rpm a -2-8° C
19. Quitar el etanol y dejar secar con el ependorf volteado sobre una sanita.
20. Una vez que se haya evaporado todo el etanol, agregar 20 µl de agua inyectable, raspando las paredes del tubo y resuspendiendo de manera vigorosa.
21. Incubar 10 min a 60° C
22. Centrifugar 10 seg.
23. Resuspender nuevamente y tomar 1 µl para correr un gel de agarosa al 1% para observar el ARN ribosomal 18S y 28S.
24. Si se observa íntegro el ARN, tomar 1 µl en 59 µl para cuantificar en el espectrofotómetro (Factor de dilución = 60).

Para calcular la cantidad de ARN, utilizar la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/ml} = \text{Absorbancia a 260 nm} \times \text{Factor de dilución} \times 40$$

VII. RT-PCR

Una vez que se ha realizado la extracción de ARN, es necesario retrotranscribirlo para obtener cADN que pueda ser amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se utilizan 500 ng de ARN, calculados con la fórmula anterior y se sigue este protocolo:

1. Poner en cada tubo 500 ng de ARN total de cada condición (tratamientos con y sin histamina) y calentar a 65° C durante 15 minutos.

2. Poner los tubos en hielo durante 5 minutos.

3. Preparar una mezcla que contenga por cada tubo:

1 µl de primers (hexámeros) aleatorios (5 nmol/ml, 50µM)

1 µl de una mezcla de dNTPs a 10 mM (ver apéndice 1)

lo que falte para 13 µl con H₂O ultrapura, inyectable

4. Calentar a 65° C durante 5 minutos

5. Incubar en hielo 1 minuto

6. Centrifugar brevemente

7. Agregar por tubo los siguientes reactivos (Invitrogen):

4 µl de 5X First-strand buffer

1 µl de DTT 0.1 M

1 µl de RNasa OUT (40 U Inhibidor de RNAsa recombinante)

1 µl de SuperScript III RT (200 U/ µl)

La reacción tiene un volumen total de 20 µl.

8. Mezclar con la pipeta suavemente, y si se esta trabajando con primers aleatorios, incubar a 25° C durante 5 minutos.
9. Incubar a 50° C durante 1 hora, o a 55° C para primer gene-specific.
10. Inactivar la reacción a 70° C durante 15 minutos.
11. Cuantificar y utilizar 100 ng de cADN para la PCR, utilizando la siguiente

fórmula:

$$\mu\text{g/ml} = \text{Absorbancia a 260 nm} \times \text{Factor de dilución} \times 50$$

Una vez cuantificado, el cADN puede ser utilizado para amplificación por PCR mediante el siguiente protocolo:

1. Agregar a cada tubo 500 ng de cADN de cada condición.
2. Por cada tubo de PCR, preparar una mezcla de los siguientes reactivos

(Invitrogen):

5 μl del buffer PCR 10X (200 mM Tris-HCl pH8.4, 500 mM de KCl)

1.5 μl de una solución a 50 mM de MgCl₂ (1.5 mM) para H1R y H3R

ó

2 μl de una solución a 50 mM de MgCl₂ (2 mM) para H2R y GAPDH

1 μl de mezcla de dNTPs a 10 mM cada uno (Ver apéndice 1)

1 μl de primer para amplificar 5'→3', a partir de stock de 20 pmol

(Ver apéndice 1)

1 μl de primer para amplificar 3'→5', a partir de stock de 20 pmol

0.4 μl de Taq polimerasa de ADN (5 U/ μl)

lo que falte para 50 μl con H₂O ultrapura, inyetable

3. Mezclar suavemente y centrifugar de 2 a 5 segundos.

Las condiciones de la PCR se ajustaron de la siguiente forma:

Etapas	Temperatura y tiempo	
	H1R y H3R	H2R y GAPDH
Desnaturalización	95° C durante 15 minutos	95° C durante 15 minutos
Ciclos	30 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 1 minuto	30 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 1 minuto
Alineación	58° C durante 1 minuto	62° C durante 1 minuto
Polimerización	72° C durante 1 minuto	72° C durante 1 minuto
Extensión	74° C durante 10 minutos	74° C durante 10 minutos

Para el caso de cada receptor, se usó como control negativo de la reacción una mezcla de reactivos sin agregar cADN, y como control positivo se usó cADN de corteza de adulto, que sabemos que expresa estos receptores.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y el tamaño de los productos de la reacción fue determinando mediante la comparación con un estándar de peso molecular después de teñir el gel con bromuro de etidio.

VIII. ENSAYO DE CRISTAL VIOLETA

Para evaluar el número de células se llevó a cabo el ensayo de cristal violeta, que nos permite cuantificar los componentes membranales presentes en las células, basados en la densidad óptica obtenida (Velázquez *et. al.*, 2003). Para esto, se siguen estos pasos:

1. Retirar el medio a los cultivos celulares.

2. Lavar los pozos 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X tibio.
3. Fijar las células con 10% de formol-PBS 1X, pH 7.4 durante 20 minutos.
4. Retirar el formol.
5. Lavar 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X.
6. Dejar secar a temperatura ambiente.
7. Agregar 400 μ l de solución de cristal violeta al 0.5%, durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación suave.
8. Lavar la solución de cristal violeta a chorro de agua con agua bidestilada hasta que no salga colorante.
9. Secar a temperatura ambiente.
10. Agregar una solución acuosa de ácido acético glacial al 33% en agua bidestilada para eluir el colorante.
11. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

IX. ENSAYO DE MTT

Se llevó a cabo el ensayo de reducción de MTT par determinar la sobrevivencia y viabilidad celular (Mosmann, 1983; Denizot, 1986). Se usa el siguiente protocolo:

1. Agregar 30 μ L de MTT de un stock de 5 mg/ml a las cajas de cultivo que contienen medio N2 y se encuentran en el último día de la etapa de proliferación o diferenciación.

2. Incubar de 1 a 3 horas a 37 °C, dependiendo del número de células, para permitir la formación de cristales de formazán.
3. Retirar el medio y agregar 1 ml de isopropanol para que los cristales de formazán sean disueltos.
4. Recuperar el isopropanol y medir la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

X. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos se presentan con barras de error estándar (S.E.M.). Se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) seguidos de la prueba de Student-Newman-Keuls. El análisis estadístico de los resultados obtenidos, se llevó a cabo utilizando el software GraphPad InStat 3.0, y las gráficas presentadas se realizaron con el software GraphPad Prism 4.0.

RESULTADOS

ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CTN DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA

El primer objetivo de este trabajo fue estandarizar un método mediante el cual se pudieran expandir precursores neurales y diferenciar células neuronales satisfactoriamente, bajo la exposición a diferentes concentraciones de histamina. El protocolo se estandarizó de la siguiente forma.

1. AISLAR PRECURSORES NEURALES DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA, A PARTIR DE EMBRIONES DE RATA DE 12 DÍAS DE DESARROLLO.

En este primer paso, se hicieron diversos experimentos en los cuales se aisló el tejido a partir de embriones de 14 días de desarrollo, debido a que éste es el día en el que se ha reportado que, *in vivo*, se da un pico en el proceso de neurogénesis en el área de mesencéfalo, lo cual nos pareció una edad óptima para la extracción del tejido. Sin embargo, vimos que la proporción de neuronas obtenidas a partir de los experimentos realizados en estos cultivos era muy baja, y la diferenciación astrocítica era mayor (Fig. 16). En este caso no se hicieron conteos celulares, ya que a partir de nuestras observaciones, determinamos que la cantidad de neuronas obtenidas era muy baja con respecto al el número de células presentes en el cultivo. Ya que los cultivos a partir de embriones E14 mostraron tener poca eficiencia para la diferenciación

neuronal, se decidió usar como modelo y metodología experimental, cultivos más jóvenes (de embriones de 12 días de desarrollo) debido a que es una etapa en la que *in vivo* ya ha iniciado el proceso de neurogénesis sin haber llegado a su pico de producción neuronal y también, debido a que diversos autores señalan que el uso de precursores de días tempranos de desarrollo, promueven una mayor diferenciación neuronal que los provenientes de días posteriores, ya que se ha visto que los cultivos *in vitro* afectan de alguna manera las propiedades de diferenciación celular, en comparación con lo que se observa *in vivo* (O’Keeffe *et. al.*, 2005; Chang *et. al.*, 2004; Yan *et. al.*, 2001). En estos cultivos se obtuvo una mayor eficiencia en la obtención de neuronas Tuj1+ que en los cultivos de edad E14 (Fig. 16). Por lo cual decidimos continuar la metodología experimental de este trabajo con cultivos a partir de embriones E12.

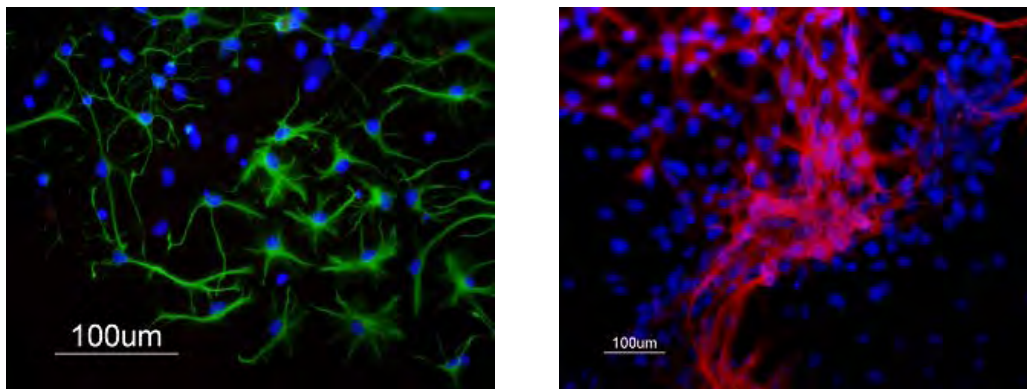


Figura 16. Se muestra la comparación de imágenes representativas de inmunotinciones realizadas en cultivos diferenciados durante 6 días, obtenidos a partir de embriones E14 (izquierda) en donde no se observan neuronas, sólo células GFAP+ (verde) y E12 (derecha) en donde es claro que hay una mayor población neuronal (Tuj1+, rojo). Ambas imágenes fueron tomadas a un aumento de 40X.

2. DETERMINACIÓN DEL PASAJE EXPERIMENTAL PARA LOS TRATAMIENTOS CON HISTAMINA.

Una vez que se extrae el tejido de los embriones, se siembra en cajas de 10 cm de diámetro a una densidad de 1 a 1.5 millones de células. A este cultivo se le denomina pasaje 0. Cuando estos cultivos llegaban a una confluencia de aproximadamente el 80%, las células se resembraban a pasaje 1 para que proliferaran más tiempo y posteriormente se comenzaban los tratamientos con histamina en pasaje 2. Sin embargo, para el caso de las células provenientes de mesencéfalo ventral, vimos que se obtiene una baja proporción de diferenciación neuronal en este pasaje.

Para evaluar la diferenciación neuronal en estos cultivos, se realizaron inmunotinciones con marcadores para precursores neurales (nestina), neuronas diferenciadas (MAP2) y astrocitos (GFAP). En esta condición tampoco se realizaron conteos, ya que la detección de neuronas es muy baja o casi nula en algunas condiciones, pero se muestran imágenes representativas de cada caso (Fig. 17).

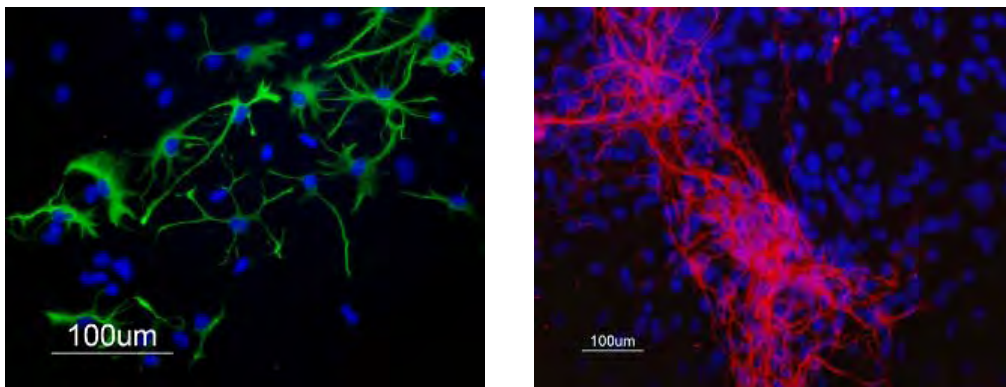


Figura 17. Se muestra la comparación de imágenes representativas de inmunotinciones realizadas en cultivos extraídos de embriones de 12 días, diferenciados durante 6 días en pasaje 2 (izquierda) y en pasaje 1 (derecha) en donde se ve que en pasaje 1 hay una mayor población neuronal. GFAP+ (verde); MAP2 (rojo); Hoechst (azul).

3. OPTIMIZACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR

Al realizar los experimentos en pasaje 1, se siembran en cajas de 24 pozos a una densidad de 15, 000 células por pozo. Este aspecto también fue modificado, ya que en un inicio, la densidad utilizada era de 10, 000 células por pozo, pero en estos experimentos se observaba que las células no proliferaban lo suficiente, y no sobrevivían a los 6 días de diferenciación. En cambio, al sembrar a densidades de 20, 000 células por pozo, al llegar a la etapa de diferenciación, se obtenían demasiadas células, lo cual propiciaba que se despegaran en capas y no se pudiera llevar a cabo su análisis. Así que se optó por la densidad de 15, 000 células por pozo (Fig. 18).

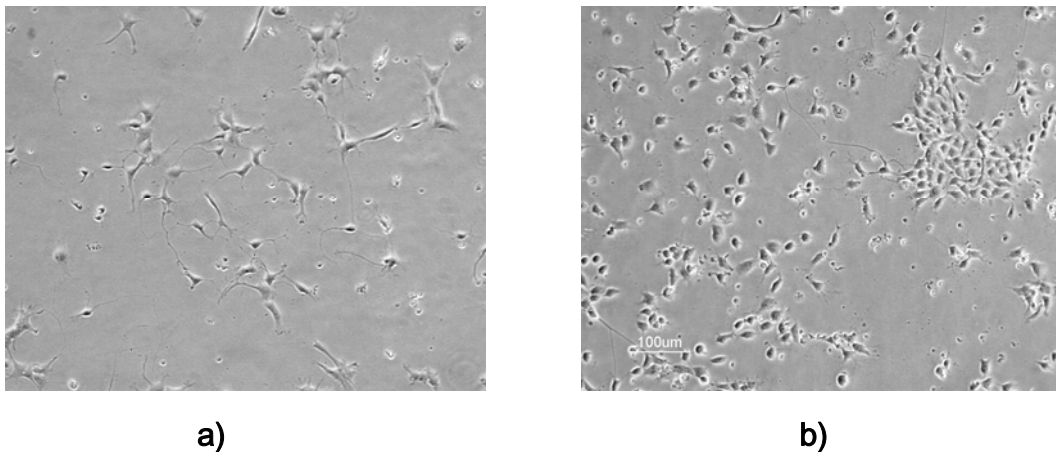


Figura 18. Imágenes en campo claro de cultivos celulares de MesV a partir de embriones E12, después de la etapa de proliferación de 4 días, sembrados a densidades de 10,000 (a) y 15,000 (b) células por pozo. Barra de escala para ambos casos = 100 μ m.

Es importante mencionar que para la estandarización de cada uno de los puntos anteriores, no se hicieron cambios en la concentración de HA que fue utilizada en cada condición, ni en la concentración de bFGF utilizada durante la etapa de proliferación ni de ácido ascórbico en la etapa de diferenciación. Por

lo que las condiciones de cultivo estandarizadas, no se vieron afectadas por cambios en estos parámetros.

Una vez optimizadas estas condiciones de cultivo, se evalúa el efecto que ejercen las diversas concentraciones de histamina sobre los precursores neurales.

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS EN CÉLULAS DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA DE 12 DÍAS DE DESARROLLO EMBRIONARIO (E12).

Una vez optimizadas las condiciones de cultivo, el segundo objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de receptores histaminérgicos en mesencéfalo ventral de rata de 12 días de desarrollo embrionario, tanto en células no diferenciadas como en células diferenciadas, para lo cual se realizó extracción de ARN (Fig. 19) y reacciones de RT-PCR en cada una de las condiciones experimentales.

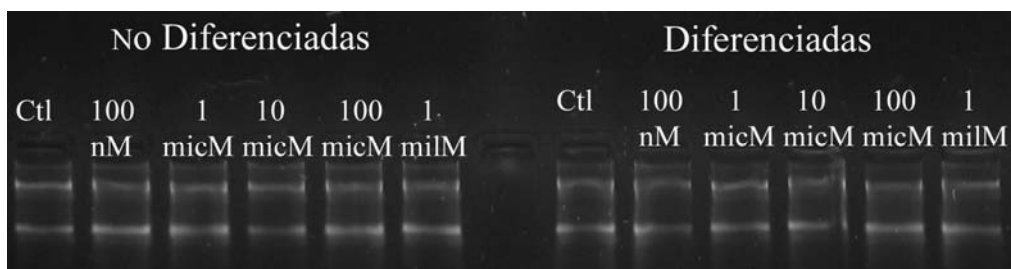
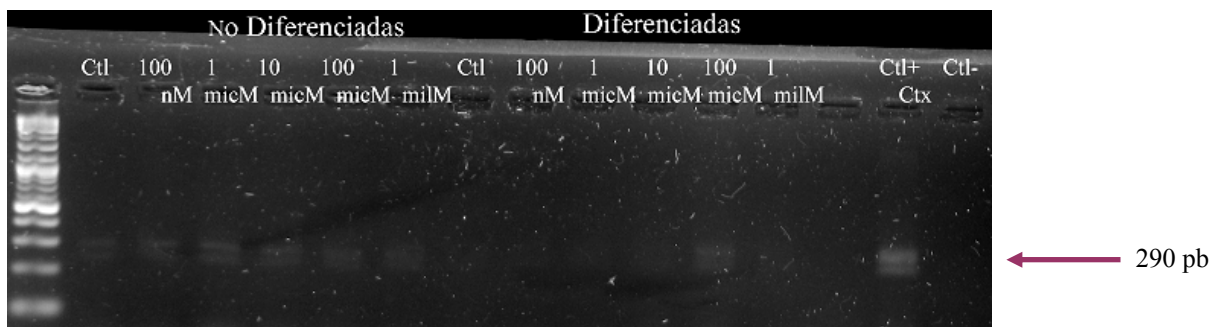


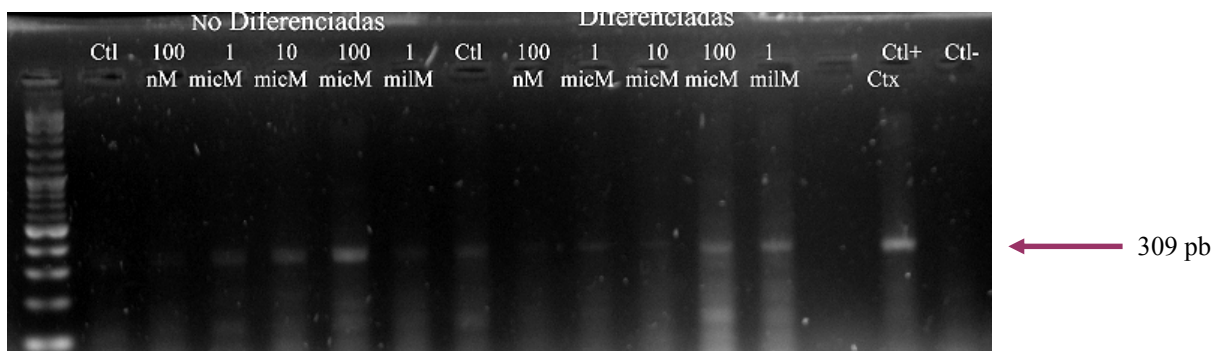
Figura 19. Imagen de electroforesis de un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del RNA. Se observan las bandas del RNA ribosomal 18S y 28S en cada condición tanto en células no diferenciadas como en células diferenciadas.

Se encontró que tanto en células no diferenciadas como en células diferenciadas, se expresan los tres receptores histaminérgicos (Fig. 20). Sin embargo, como se observa en la figura, es evidente que hay cambios en los niveles de expresión de cada uno, dependiendo de la concentración de HA con la que se trataron las células. Estos cambios se dan tanto en células no diferenciadas como en células diferenciadas. Para efectos de este trabajo, sólo se evaluó la presencia de estos receptores en células no diferenciadas y diferenciadas; sin embargo, resulta interesante un posterior análisis del papel que juega cada uno de los receptores en la proliferación y diferenciación celular, y las causas por las cuales se da una expresión diferencial de los mismos en cada concentración.

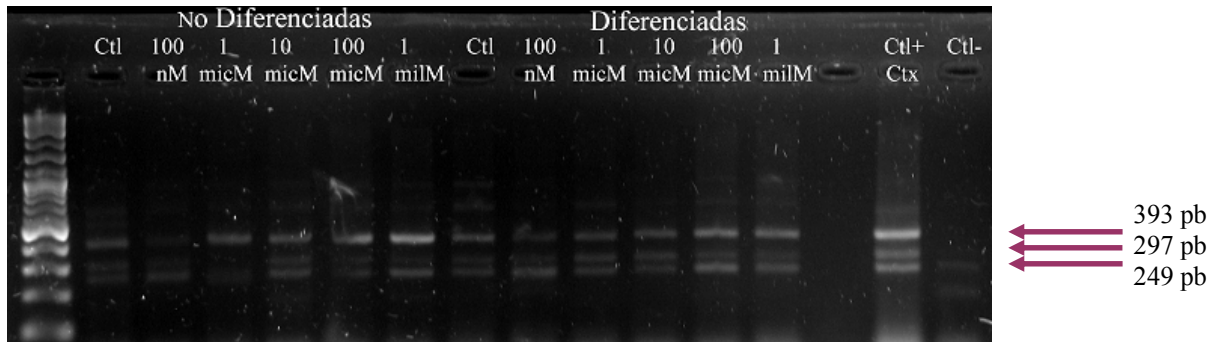
a) H1



b) H2



c) H3



d) GAPDH

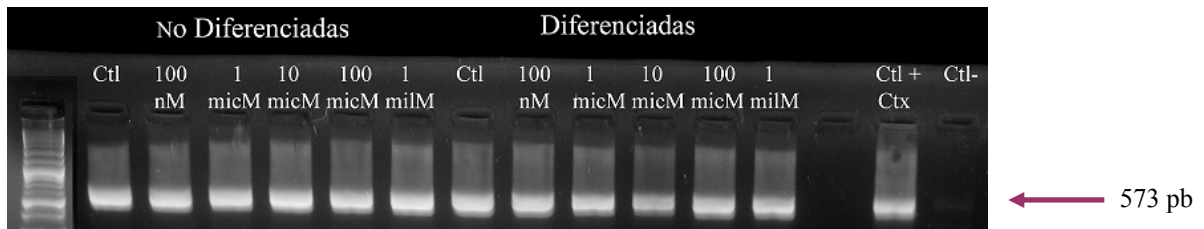


Figura 20. Electroforesis en geles de agarosa al 2% para evaluar la expresión de los receptores histaminérgicos H1 (a), H2 (b) y H3 (c) tanto en células diferenciadas como en células no diferenciadas que fueron expuestas a tratamientos con diferentes concentraciones de histamina, así como el control de GAPDH (d). La banda del receptor H1 corresponde a 290 pb. La banda del receptor H2 corresponde a 309 pb y las bandas de las 3 isoformas del receptor H3 corresponden a 249, 297 y 393 pb. La banda de GAPDH corresponde a 573 pb. Se usó como control positivo (Ctl+) corteza cerebral de rata adulta y como control negativo (Ctl-) se hizo la PCR sin cDNA. Imágenes representativas de 3 experimentos.

EFFECTO DE DIVERSAS CONCENTRACIONES DE HISTAMINA EN LA SOBREVIVENCIA,

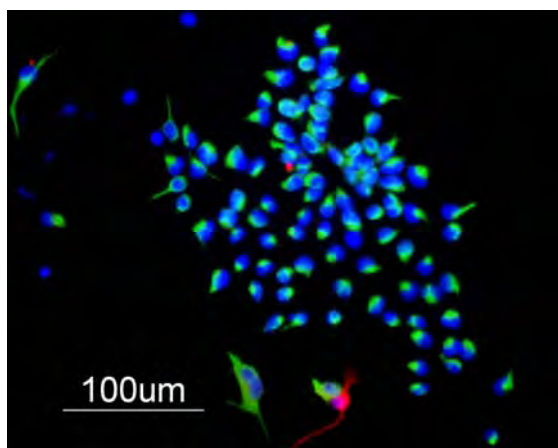
PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL *IN VITRO*

Una vez que confirmamos la expresión de los receptores en cada condición y etapa de diferenciación, se procedió a evaluar el efecto que ejercen las diversas concentraciones de histamina sobre los precursores neurales.

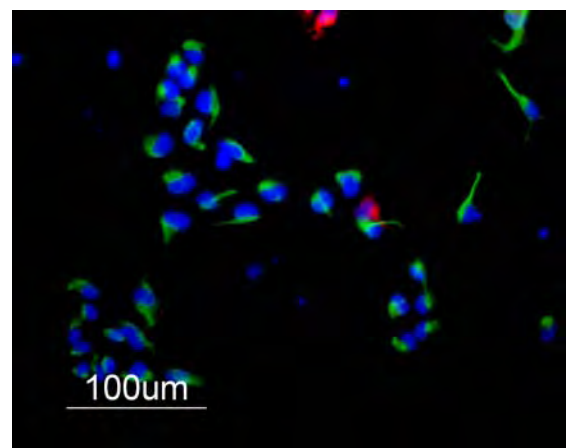
CÉLULAS EN PROLIFERACIÓN

Efecto de la histamina sobre la identidad celular

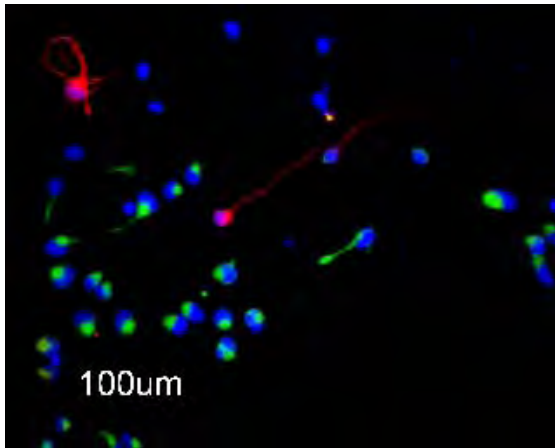
Para estudiar si la HA ejerce algún efecto sobre la identidad celular en nuestros cultivos en proliferación, que también estuvieron bajo el tratamiento con FGFb, se analizó la identidad celular mediante inmunocitoquímicas, en donde se evaluó la expresión del marcador nestina (Nes), que es una proteína de filamentos intermedios ampliamente utilizada para identificar precursores neurales indiferenciados. Una vez realizadas las inmunocitoquímicas, se hicieron conteos de células positivas para Nes, GFAP (astrocitos) y Tuj1 (neuronas), en 10 campos aleatorios. La Figura 21 muestra las imágenes y gráficas representativas de los resultados obtenidos en 3 experimentos independientes. Se observa que en todas las condiciones se obtiene un porcentaje mayor del 90% de células Nes+, lo cual indica que nuestros cultivos se componen principalmente de células indiferenciadas. Sin embargo, también observamos que en todas las condiciones hay un bajo porcentaje de células positivas para marcadores de células diferenciadas (GFAP y Tuj1), lo cual indica que se está dando un bajo grado de diferenciación temprana en nuestros cultivos, principalmente hacia el linaje neuronal (Tuj1+).



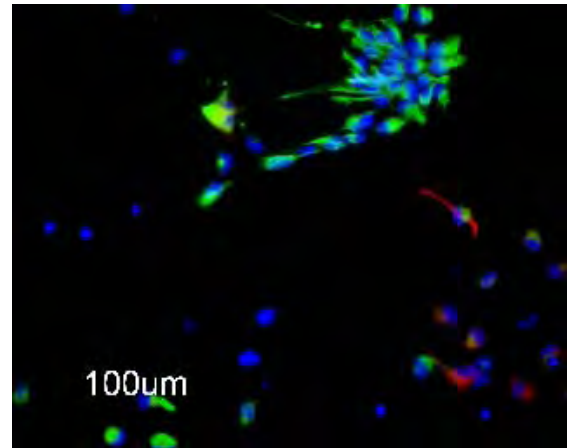
Ctl **Tuj1**/**Nes**/**Hoechst**



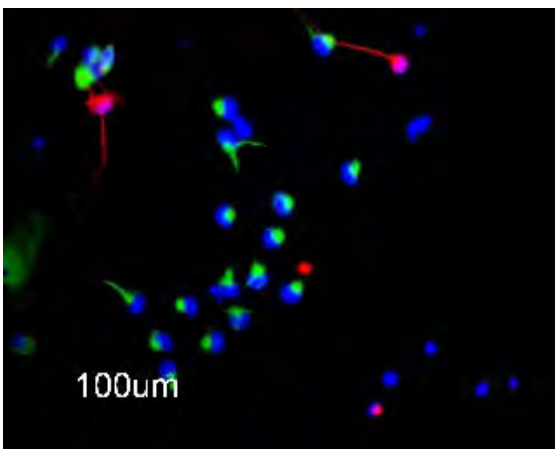
HA 100 nM **Tuj1**/**Nes**/**Hoechst**



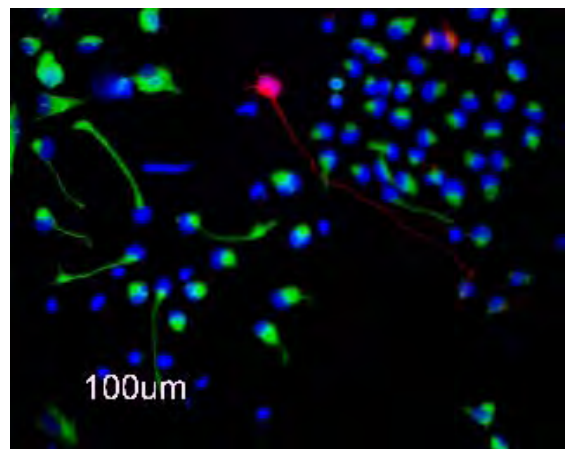
HA 1 μM TuJ1/Nes/Hoechst



HA 10 μM TuJ1/Nes/Hoechst



HA 100 μM TuJ1/Nes/Hoechst



HA 1 mM TuJ1/Nes/Hoechst

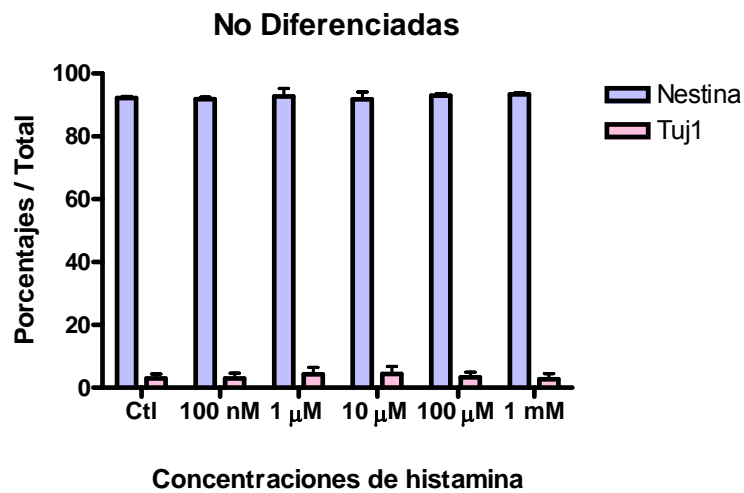


Figura 21. Imágenes de inmunotinciones y gráfica de porcentajes de células en etapa de proliferación. En las imágenes se muestran células positivas para nestina (verde) y TuJ1 (rojo) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul). La gráfica muestra los porcentajes con sus respectivas barras de error; n=3; barra de escala de las imágenes 100 μm .

Efecto de la histamina sobre el número de células

a) Cristal violeta

La proliferación se evaluó mediante el ensayo de cristal violeta, a partir del cual se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 22, en donde las mediciones se expresan como porcentajes de absorbancia en cada una de las condiciones más las barras de error estándar. En general, es claro que en las células en proliferación, la HA ejerce un efecto sobre la proliferación dependiendo de su concentración; sin embargo, la mayor absorbancia se dio en la concentración de 100 nM, en donde la proliferación aumenta en un 13.47% con respecto al control. Aunque los resultados no presentaron significancia estadística, se observa una tendencia clara que conforme va aumentando la concentración de HA, la absorbancia decrece y un efecto positivo sobre la proliferación celular sólo se observa en las concentraciones de 100 nM y 1 μ M.

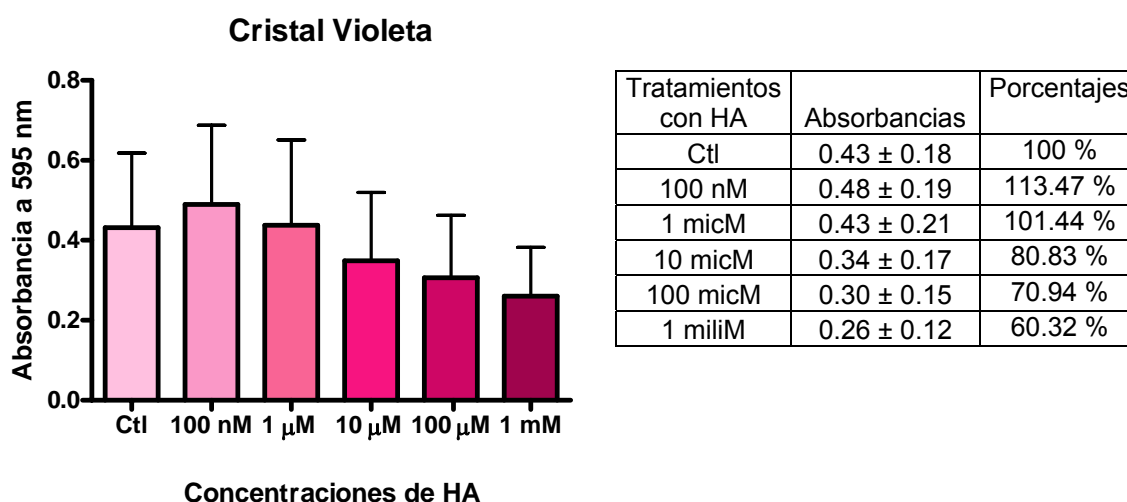


Figura 22. Ensayo de cristal violeta en células no diferenciadas. Gráfica de absorbancias obtenidas en cada tratamiento y valores de absorbancias y porcentajes de equivalencia con respecto al control. El mayor incremento en la proliferación se observa en la concentración de 100 nM. La gráfica se muestra con barras de error estándar. n=3

b) MTT

Se llevó a cabo el ensayo de reducción de MTT, para determinar el efecto potencial de la HA sobre la supervivencia *in vitro* de las CTNs de MesV. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo determinar la actividad mitocondrial de las células bajo los diferentes tratamientos. Así, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Abajo se muestran la gráfica de las absorbancias registradas en cada condición (Fig. 23). En este caso, el efecto de la HA es mayor en la concentración de 100 μ M, en donde la supervivencia se ve incrementada en un 38.26 % con respecto al control, aunque este efecto no alcanza significancia estadística. A diferencia de los ensayos de cristal violeta, la HA aumenta la supervivencia en la mayoría de los tratamientos, a excepción de su menor concentración (100 nM).

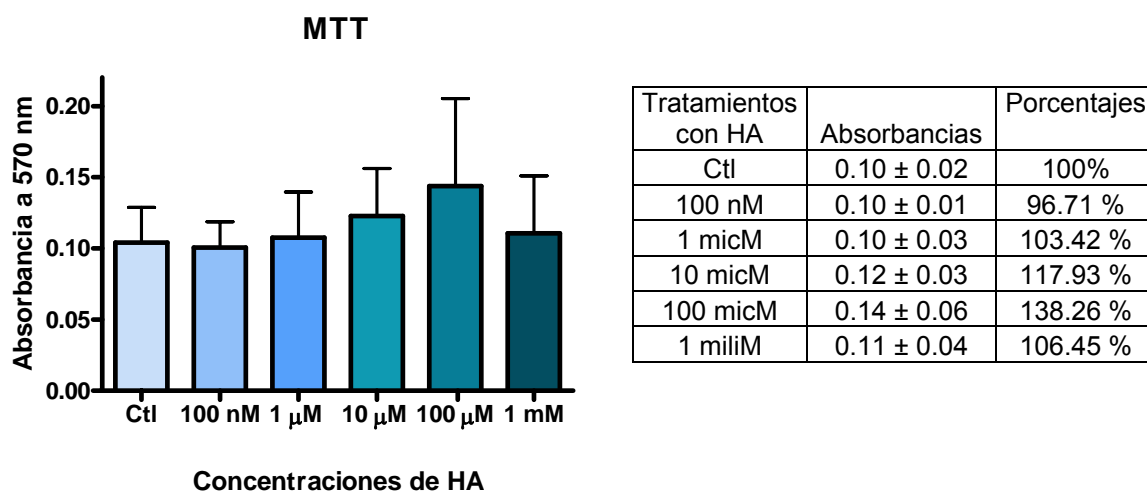


Figura 23. Ensayo de MTT en células no diferenciadas. Gráfica de absorbancias obtenidas en cada tratamiento y tabla con valores de absorbancias y porcentajes de equivalencia con respecto al control. El mayor incremento en la supervivencia se observa en la concentración de 10 μ M. La gráfica se muestra con barras de error estándar. n=3

CÉLULAS DIFERENCIADAS

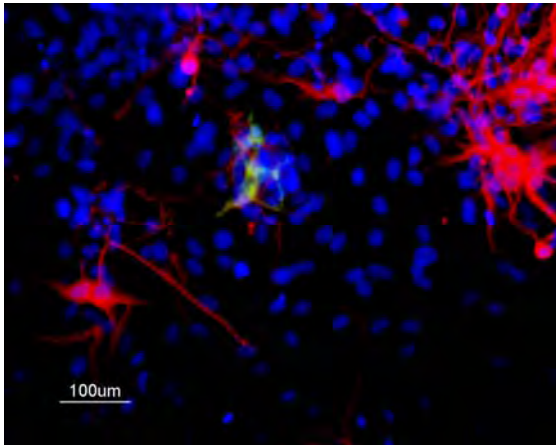
Para inducir la diferenciación celular, se retiró el FGFb del medio y los cultivos se dejaron diferenciar durante 6 días, cambiando medio y agregando AA cada 2 días y dando tratamientos con histamina diariamente.

Efecto de la histamina sobre la identidad celular

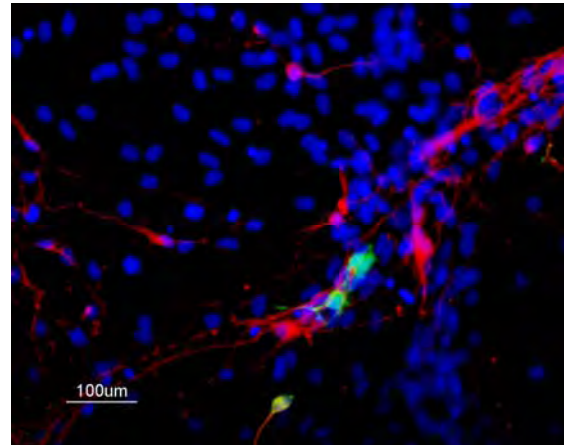
Para estudiar si la HA ejerce algún efecto sobre la identidad celular en nuestros cultivos diferenciados, se analizó la identidad celular mediante inmunocitoquímicas, en donde se evaluó la expresión de los marcadores Tuj1 (neuronas) y TH (neuronas dopaminérgicas). Una vez realizadas las inmunocitoquímicas, se hicieron conteos de células positivas para cada uno de los marcadores en 10 campos elegidos aleatoriamente. En la Figura 24 se muestran las gráficas e imágenes representativas de los resultados obtenidos. Se observa que en cada condición, la HA favorece la diferenciación de ciertos tipos celulares, ya que encontramos gran variabilidad en la identidad celular dependiendo de la concentración de HA con la cual fueron tratadas las células. En específico, la concentración de HA que favoreció significativamente la diferenciación neuronal fue 10 μM , mostrando un aumento en el porcentaje de producción neuronal del 76.01% con respecto al control; mientras que la concentraciones de 1 μM y 100 μM favorecieron la diferenciación dopaminérgica, aunque no significativamente, incrementando un 38.81% y

19.97% la cantidad de neuronas TH+ con respecto al número total de neuronas producidas, respectivamente.

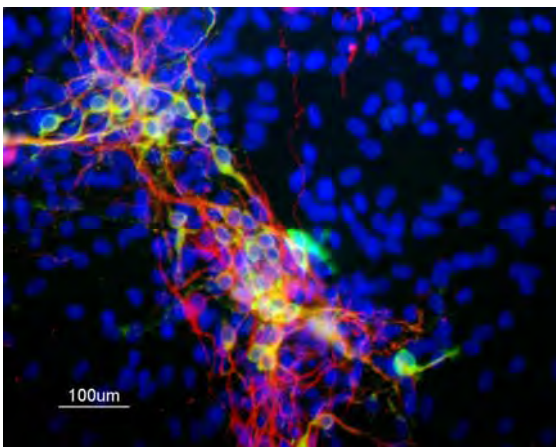
a)



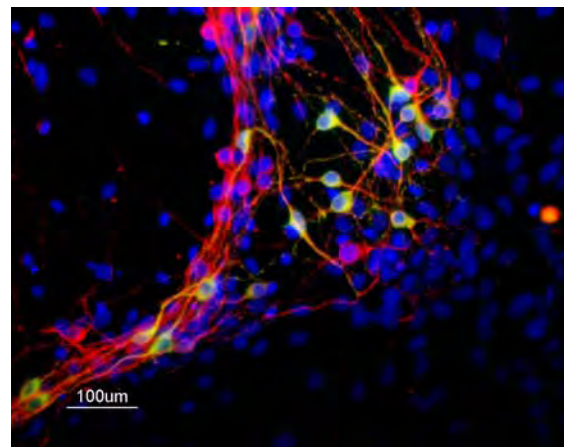
HA Ctl **Tuj1/TH/Hoechst**



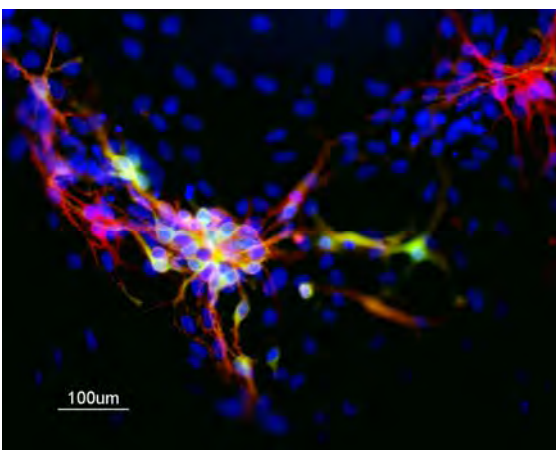
HA 100 nM **Tuj1/TH/Hoechst**



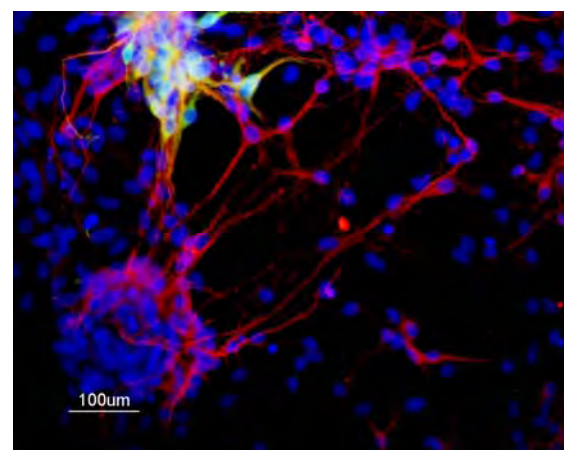
HA 1 µM **Tuj1/TH/Hoechst**



HA 10 µM **Tuj1/TH/Hoechst**



HA 100 µM **Tuj1/TH/Hoechst**



HA 1 mM **Tuj1/TH/Hoechst**

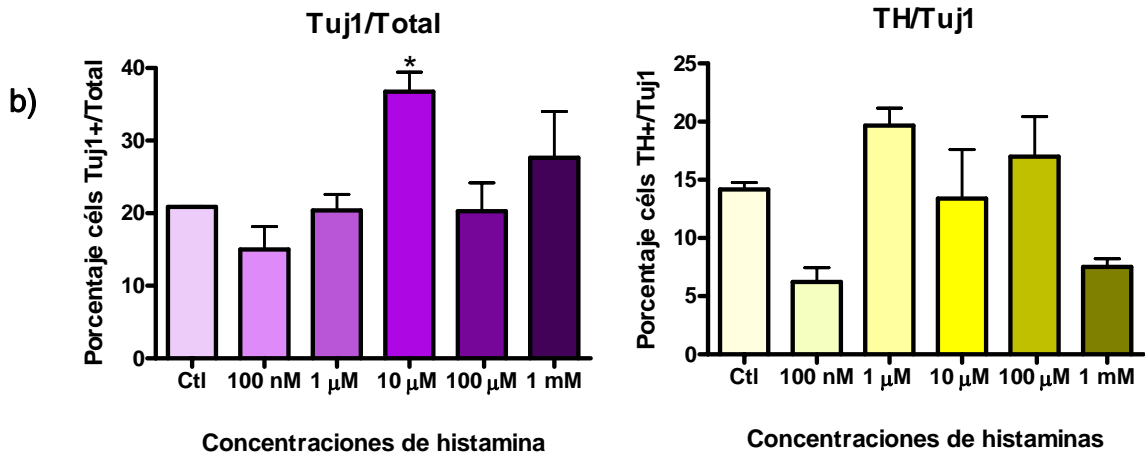


Figura 24. Imágenes y gráficas de inmunotinciones en células diferenciadas. (a) Imágenes representativas de cada tratamiento. (b) Valores obtenidos a partir de los conteos celulares en 10 campos. El mayor incremento en la diferenciación neuronal se observa en la concentración de HA de 10 μM ($p < 0.05$), mientras que 1 μM y 100 μM de HA aumentaron la diferenciación dopaminérgica. La gráfica se muestra con barras de error estándar. $n=3$

Efecto de la histamina sobre el número de células

a) Cristal violeta

En la etapa de diferenciación celular, se observaron pequeñas diferencias en el número de células en cada condición, evaluados por el ensayo de cristal violeta. Respecto al control, no se observó ninguna diferencia, ya que los porcentajes siempre fueron muy similares con respecto a las condiciones control.

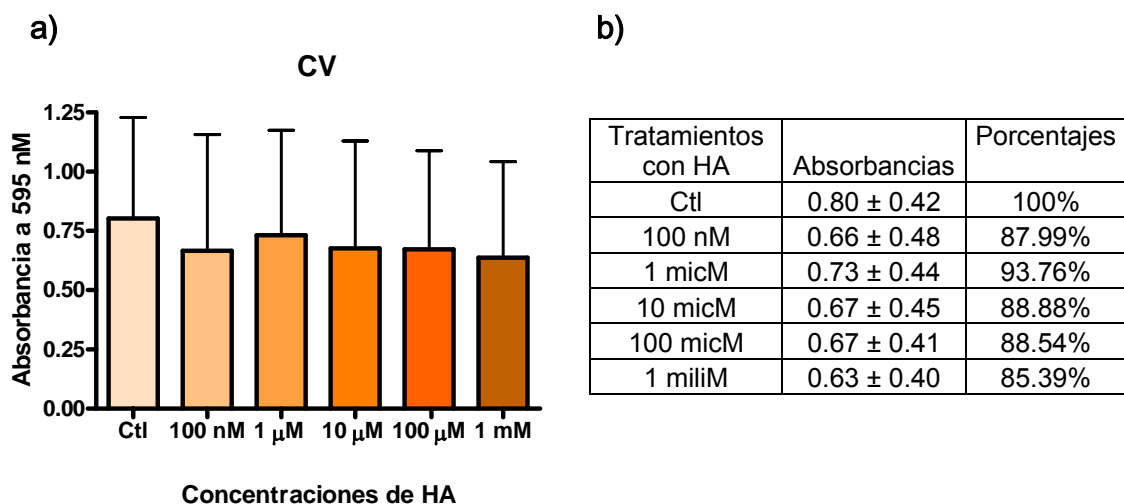


Figura 25. Ensayo de cristal violeta en células diferenciadas. (a) Gráfica de absorbancias obtenidas en cada tratamiento. (b) Valores de absorbancias y porcentajes con respecto al control. La gráfica se muestra con barras de error estándar. $n=3$

b) MTT

Con respecto a la supervivencia celular en la etapa de diferenciación, la histamina tampoco ejerce algún efecto, ya que los porcentajes se mantienen muy similares en cada condición, no mostrando cambio alguno con respecto al control.

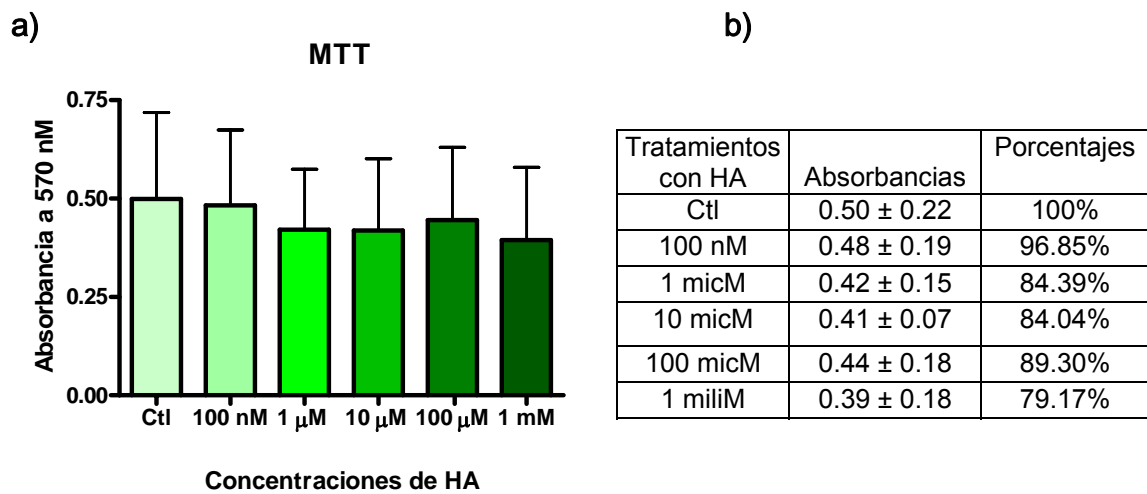


Figura 23. Ensayo de MTT en células diferenciadas. (a) Gráfica de absorbancias obtenidas en cada tratamiento. (b) Valores de absorbancias y porcentajes con respecto al control. La gráfica se muestra con barras de error estándar. n=3

DISCUSIÓN

ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CTN DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA

En el Sistema Nervioso Central de mamíferos, la neurogénesis es un proceso que comienza durante el desarrollo embrionario, y en ciertas regiones continúa postnatalmente hasta la adultez. Estas células neurales pasan por diferentes estadios de proliferación, migración, y diferenciación.

Una manera de estudiar estos procesos, es mediante el uso de cultivos primarios de precursores neurales tratados con factores de crecimiento y sustancias que nos permitan evaluar la respuesta celular ante diversas manipulaciones de su entorno.

En este trabajo, pudimos estandarizar un protocolo que nos permitió manejar eficientemente la proliferación y diferenciación de cultivos celulares provenientes de la región del MesV, encontrando que existe una gran variabilidad en las poblaciones celulares, dependiendo de las condiciones de cultivo en que se manejen las mismas. En nuestro caso, factores como la edad del tejido obtenido, la densidad celular a la que se sembraron los cultivos y el número de pasajes realizados, resultaron ser elementos clave para el manejo eficiente de estos cultivos.

Con respecto a la edad del tejido, se pudieron obtener resultados interesantes que nos indican que la extracción y manipulación *in vitro* de tejidos

de edades jóvenes, parecen comportarse (diferenciarse) *in vitro* de manera similar a cómo lo hacen tejidos un poco más avanzados en el desarrollo embrionario *in vivo*. Como se ha reportado que *in vivo*, la neurogénesis en la región del mesencéfalo presenta un pico de producción neuronal al día 14 de desarrollo embrionario (Götz et al., 2005), ésto nos llevó en un inicio a utilizar tejido proveniente de embriones de la edad de E14. Sin embargo, estos cultivos presentaron muy poca diferenciación neuronal. Por el contrario, los tejidos que obtuvimos de edad más temprana (E12), se comportaron satisfactoriamente con respecto a la diferenciación neuronal esperada, obteniendo un 21% de diferenciación neuronal en nuestros cultivos en condiciones control (Fig. 24, b), lo cual es un alto porcentaje que concuerda con la información que se tiene acerca de la diferenciación neuronal *in vivo*. Estos resultados concuerdan con un estudio previo que hay sobre el efecto de la edad gestacional en la diferenciación de CTNs provenientes de mesencéfalo ventral de rata (O'Keeffe y Sullivan, 2005), en donde se extrajo tejido embrionario de 12, 13 y 14 días de desarrollo y a partir de la formación de neuroesferas, se diferenciaron diversas poblaciones celulares. Aquí se obtuvo un mayor porcentaje de células Tuj1+ a partir de células provenientes de tejido E12, siendo éste de 18.3%. Lo cual sugiere que el método estandarizado en este trabajo, resulta más eficiente en cuanto a la diferenciación neuronal, ya que obtuvimos un mayor porcentaje de células Tuj1+ en nuestras condiciones control a partir de tejido E12 (21%), que en este estudio reportado.

En cuanto al número de pasajes realizados, se ha reportado que las propiedades de los precursores neurales embrionarios, se ven alteradas durante su proliferación *in vitro* (Chang *et. al.*, 2004; Yan, 2001). Así, otro factor importante que fue necesario considerar en este trabajo para establecer un protocolo de manejo eficiente de estos cultivos, fue la duración de la proliferación *in vitro*. Como se expuso en los resultados, nuestros cultivos se dejaban proliferar durante los pasajes 0 y 1, y posteriormente se comenzaban los tratamientos experimentales con histamina hasta el pasaje 2; sin embargo, observamos que para este tiempo, las células habían perdido su potencial de diferenciación neuronal. Ya que los cultivos presentaron muy baja diferenciación, decidimos optar por proliferar las células sólo en pasaje 0 y comenzar los tratamientos en pasaje 1, lo cual resultó una estrategia muy eficiente ya que se logró que las células mantuvieran una eficiente capacidad de diferenciación neuronal en comparación con los cultivos obtenidos a partir de los tratamientos en pasaje 2.

Con respecto a la densidad celular, vimos que también es un factor importante para el adecuado manejo de los cultivos, ya que en cultivos con baja densidad celular, la sobrevivencia a las etapas de proliferación y diferenciación es muy baja. Por el contrario, en cultivos sembrados a mayor densidad celular (entre 15 mil y 20 mil células por pozo), observamos que los cultivos proliferaron y se diferenciaron de manera muy eficiente, sugiriendo que la interacción celular y posiblemente la secreción de diversos factores, resultan

un factor clave para el mantenimiento y plasticidad de los cultivos, ya que en estas condiciones es donde observamos una mayor proliferación y diferenciación neuronal. Incluso hay reportes que indican que existe un efecto directo de la densidad de cultivos sobre la diferenciación de CT de MesV hacia neuronas dopaminérgicas (Ko, *et. al.*, 2005)

En conjunto, ésto nos ha permitido determinar que, ya que sabemos que *in vivo* existe un programa celular intrínseco que regula las propiedades de los precursores neurales, y que *in vitro*, es necesario considerar una gran variedad de estos aspectos para poder mantener estos cultivos de la manera más eficiente posible y sobre todo, permitir que los precursores mantengan sus propiedades y capacidad de diferenciación como lo hacen en su ambiente natural (*in vivo*). Así, consideramos que los factores evaluados en este trabajo resultaron ser de gran importancia para el mantenimiento de las propiedades celulares de estos cultivos y sobre todo, el mantenimiento de su potencial de diferenciación neuronal para la conformación del SNC.

EFFECTO DE LA HISTAMINA EN LA SOBREVIVENCIA, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL *IN VITRO*

El estudio de los precursores neurales aislados durante el desarrollo embrionario, ha indicado que diversos grupos celulares llevan a cabo procesos mitóticos y posteriormente diferenciación neuronal y glial *in vitro*. Distintos factores de crecimiento y sus moléculas sustrato son esenciales para la

proliferación, la restricción de linajes y la determinación del destino de estas células. Las CTs multipotentes son células con linaje restringido al SNC, que pueden mantenerse e inducirse a diferenciación en respuesta a muchos de los factores que actúan también en el organismo adulto. Sin embargo, no se sabe qué combinación de factores ó moléculas sustrato están involucradas en la proliferación y diferenciación de cada grupo particular de estas células.

Una manera de estudiar estos procesos, es mediante el uso de cultivos primarios de precursores neurales tratados con diversos factores de crecimiento y sustancias que nos permitan evaluar la respuesta celular ante diversas manipulaciones de su entorno.

Ya que en condiciones de cultivo *in vitro* es improbable que se tengan todos los factores necesarios para inducir la proliferación y diferenciación de precursores neurales, es necesario estudiar las propiedades de las poblaciones de precursores neurales bajo la exposición a diversos agentes, que permitan caracterizar las poblaciones celulares diferenciadas a partir de éstas. Esto permitirá caracterizar la importancia de éstos factores en la diferenciación de precursores y su plasticidad en la conformación del Sistema Nervioso Central.

En este trabajo, investigamos si la histamina puede tener la capacidad de regular la proliferación, sobrevivencia y/o diferenciación de cultivos celulares derivados de mesencéfalo ventral de rata E12.

Nuestros resultados obtenidos a partir de ensayos de MTT y CV mostraron que en las células que se encuentran en estado no diferenciado

(etapa de proliferación) bajo tratamientos de bFGF, la HA presenta una clara tendencia en la regulación de la proliferación y supervivencia celular. En los resultados de CV, se observa una clara tendencia de la HA sobre la proliferación, dependiente de su concentración ya que a menores concentraciones, se promovió una mayor proliferación que a concentraciones mayores, mientras que en el ensayo de MTT, se vio que la HA favorece la supervivencia en la concentración de 10 μM , incrementándola en un 40 % con respecto al control. Los resultados en la etapa de proliferación, indican que el bFGF y la HA podrían estar actuando en conjunto. Es sabido que el bFGF favorece la proliferación de diversos cultivos celulares. Sin embargo, resultaría interesante una posterior evaluación de los mecanismos y la combinación de factores mediante los cuáles esta amina biogénica podría estar actuando.

Por otro lado, en la etapa de diferenciación, vimos que la HA favorece significativamente la diferenciación neuronal en la concentración de 10 μM , mientras que la diferenciación dopaminérgica se vio favorecida en las concentraciones de 1 μM y 100 μM , aunque estos resultados no mostraron significancia estadística.

Hay estudios que indican que el ácido ascórbico es un factor que promueve la diferenciación dopaminérgica (Yan, 2001). En este trabajo fue claro que la HA ejerce un efecto en la diferenciación dopaminérgica, mayor en la concentración de 100 μM de HA; por lo cual, ésta podría estar actuando en conjunto con el ácido ascórbico, promoviendo esta diferenciación.

La vía de acción de la HA en cada etapa no es clara aún; sin embargo, con base en nuestros resultados y debido a que se observaron diferencias en los niveles de expresión de cada receptor histaminérgico en los tratamientos durante la diferenciación celular, podríamos sugerir que los efectos de la histamina observados en la proliferación y supervivencia involucran receptores histaminérgicos y son específicos en cada caso. Por ejemplo el H1, del cual se sabe que su vía de señalización está involucrada en la liberación de calcio intracelular; o el receptor H3 que activa cinasas MAP, involucradas en la proliferación, las cuales también se sabe que son activadas por la acción de FGFb, el cual es bien sabido que juega un papel muy importante sobre la proliferación celular (Bloemers, *et.al.*, 1993; Haas y Panula, 2003). Sin embargo, es necesaria una posterior evaluación de las vías de señalización de los tres receptores histaminérgicos y su interacción con otras señales que se encuentran en la región del mesencéfalo durante el desarrollo embrionario, para aclarar los efectos observados por la HA.

La inducción de CTNs para diferenciarse hacia el linaje neuronal se vio favorecida a concentraciones micromolares de histamina, lo cual vimos que correlaciona con los altos niveles de esta amina observados durante el desarrollo embrionario en la región del mesencéfalo que son mucho mayores a los observados en el organismo adulto, específicamente en el día E14, donde se sabe también que *in vivo* se da el pico de neurogénesis.

Finalmente, la diferenciación de neuronas dopaminérgicas causada por el tratamiento con HA podría ser útil en la generación de neuronas que podrían utilizarse para la terapia celular de la enfermedad de Parkinson.

CONCLUSIONES

ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CTN DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA

En este trabajo se lograron estandarizar las condiciones adecuadas *in vitro* para la expansión y diferenciación de CTN de mesencéfalo ventral de rata, cuya aplicación nos permitió el estudio del efecto de la HA sobre éstas células.

EFFECTO DE LA HISTAMINA EN LA SOBREVIVENCIA, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL *IN VITRO*

Al aplicar el protocolo estandarizado, se logró estudiar el efecto de la histamina sobre las CTN aisladas de mesencéfalo ventral de rata, durante la proliferación y la diferenciación *in vitro*, comprobando la presencia de receptores histaminérgicos en cada etapa y condición de cultivo, así como los niveles de expresión de los receptores de HA de acuerdo a los tratamientos con HA aplicados, y de acuerdo a la etapa en que se encontraban los cultivos celulares (proliferación ó diferenciación). La histamina fue capaz de modular la proliferación y sobrevivencia de CTNs *in vitro* aisladas de MEsV de rata de 12 días de desarrollo embrionario, favoreciendo la diferenciación de neuronas Tuj1+ en la concentración de 10 μ M, obteniendo un 26.5 % de neuronas con respecto al total de células, mientras que en condiciones control el porcentaje fue 18.9%.

PERSPECTIVAS

El protocolo de expansión y diferenciación neuronal a partir de cultivos de CTN de mesencéfalo ventral de embriones ratas E12 estandarizado en este trabajo, nos permitió estudiar el efecto que tiene la histamina en etapas de proliferación y diferenciación celular, así como la presencia de receptores histaminérgicos en estas etapas, lo cual nos brindó resultados interesantes que resultan herramientas muy útiles para llevar a cabo posteriores análisis como:

- Procesos de muerte celular que pudieran estar llevándose a cabo de manera selectiva en nuestros cultivos.
- Evaluar el papel que juegan cada uno de los receptores en cada etapa y condición, ya que en este trabajo observamos que existe un nivel de expresión diferencial de cada uno, dependiendo de cada condición.
- Evaluar la expresión de receptores de FGF para estudiar una interacción que se pudiera estar dando con la HA específicamente en la etapa de proliferación.
- Realizar ensayos de BrdU para un análisis más detallado en la etapa de proliferación.
- Realizar ensayos de *Western Blot* e inmunocitoquímicas para detectar la HA en cada condición.

APÉNDICE 1. SOLUCIONES

EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DE CMN DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA DE DESARROLLO EMBRIONARIO DÍA 12 (E12)

- Solución Krebs 10X (500 ml)

NaCl	35.35 g
KCl	1.8 g
KH ₂ PO ₄	0.83 g
NaHCO ₃	10.7 g
Glucosa	12.85 g
Rojo de fenol	75 mg

- Solución Krebs 1X (500 ml)

Krebs 10X	50 ml
Albúmina	1.5 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	4 ml

CULTIVO PRIMARIO DE CMN DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA E12

- Medio N2 (1 litro)

Medio F12/DMEM (GIBCO)	12 g
------------------------	------

Glucosa	1.55 g	(8.6 mM)
Glutamina	0.073 g	(0.4 mM)
NaHCO ₃	1.69 g	(20 mM)
Insulina	0.025 g	

En 1 ml de NaOH (10 mM)

Apo-transferrina	0.1 g	
Putresina (1M)	100 µl	(100 µM)
Selenito de Sodio (300 µM)	60 µl	(30 nM)
Progesterona (300 µM)	66.6 µl	(20 nM)

pH 7.2

Filtrar en membrana de 0.22 µm y agregar 10 ml de antibiótico penicilina-estreptomicina 100X, concentración final al 1%.

PASAJE DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CMN DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA E12

- PBS-EDTA

PBS 1X	1 Lt.
EDTA (0.5 mM, pH 8)	20 ml

TRATAMIENTOS CON HISTAMINA

- Ácido Ascórbico 1000X [200mM]

- Histamina [500 mM]

Pesar 91.6 mg de hidrocloreuro de histamina ($C_5H_9N_3 \bullet 2HCl$ Sigma H 7250) y disolver en 1 ml de agua inyetable.

INMUNOCITOQUÍMICA

- PFA al 4%

Para preparar 20 ml de solución de paraformaldehído al 4%:

1. Tomar 15 ml de agua bidestilada.
2. Calentar en el horno de microondas durante 15 segundos.
3. Agregar 0.8 g de PFA y dejar en agitación.
4. Agregar 2 ml de PBS 10X
5. Agregar 16 μ l de NaOH al 42%
6. Añadir 3 ml de agua bidestilada para completar los 20 ml.
7. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
8. Filtrar en campana con membrana de 0.22 μ m.

Solución Salina Amortiguadora con fosfatos (PBS) 10X (1 Lt)

NaCl	80 g (1.37 M)
KCl	2 g (2.7 mM)
Na ₂ HPO ₄	27.07 g (10 mM)
NaH ₂ PO ₄	2.4 g (2 mM)

Esterilizar por autoclave

PBS BSA 0.1%

PBS 1X	100 ml
BSA	100 mg

- Solución Bloqueadora (10 ml)

PBS 1x	9 ml
NGS	1 ml
Tritón X-100	30 µl

RT-PCR

Para preparar la mezcla de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dUTP) se utilizan los siguientes reactivos (Roche):

dATP 10 µl

dGTP 10 µl

dCTP 10 µl

dUTP 10 µl

Agua estéril 60 µl

Los oligonucleótidos (primers) utilizados para cada receptor de histamina, fueron los siguientes:

H1 sentido 5' – CTTCTACCTCCCCACTTTGCT – 3'

antisentido 3' - TTCCCTTTCCCCCTCTTG – 5'

H2 sentido 5' – TTCTTGGACTCCTGGTGCTGC – 3'

 antisentido 3' – CATGCCCCCTCTGGTCCC – 5'

H3 sentido 5' – CCAGAACCCCCACCAGATG – 3'

 antisentido 3' – CCAGCAGAGCCCAAAGATG – 5'

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo SF, de Esch IJ y Raber J. 2007. *Sex- and histamine dependent long-term cognitive effects of methamphetamine exposure.* Neuropsychopharmacology, 32: 665-672.
- Auvinen S y Panula P. 1988. *Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain.* Journal of Comparative Neurology, 276: 289-303.
- Baizabal JM, Furlan-Magaril M y Santa-Olalla J, Covarrubias L. 2003. *Neural stem cells in development and regenerative medicine.* Archives of Medical Research, 34:572-588.
- Bertrand N, Castro DS y Guillemot F. 2002. *Proneural genes and the specification of neural cell types.* Nature Reviews Neuroscience, 3:517-530.
- Bloemers S. M., Leurs R., Smit M. J. *et al.* 1993. *Mouse P19 embryonal carcinoma cells express functional histamine H1-receptors.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 191: 118-125.
- Carpenter MK, Cui X, Hu Z, Jackson J, Sherman S, Seiger Å, Wahlberg LU. 1999. *In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells.* Experimental Neurology, 158:265-278.

- Chang MY, Park CH, Lee SY y Lee SH. 2004. *Properties of cortical precursor cells cultured long term are similar to those of precursors at later developmental stages*. Developmental Brain Research, 153: 89-96.
- Denizot F., Lang R. 1986. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. Journal of Immunological Methods, 89: 271–277.
- Fioretti B, Catacuzzeno L, Tata AM y Franciolini F. 2004. *Histamine activates a background, arachidonic acid-sensitive K channel in embryonic chick dorsal root ganglion neurons*. Neuroscience, 125: 119-127.
- Gage FH. 2000. Mammalian neural stem cells. Science, 287:1433-1438.
- Gage FH, Ray J y Fisher LJ. 1995. *Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS*. Annual Review of Neuroscience, 18: 159-192.
- Gilbert SF. 2003. Developmental Biology. Sinauer Associates, Inc. Massachussets, 391-425.
- Götz M y Huttner WB. 2005. *The cell biology of neurogenesis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6:777-788.
- Haas H y Panula P. 2003. *The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system*. Nature Reviews Neuroscience, 4:121-130.

- Héron A, Rouleau A, Cochois V, Pillot C, Schwartz JC, Arrang JM. 2001. *Expression analysis of the histamine H3 receptor in developing rat tissues*. Mechanisms of Development, 105: 167-173.
- Huszti Z. 1998. *Carrier-mediated high affinity uptake system for histamine in astroglial and cerebral endothelial cells*. Journal of Neuroscience Research, 51: 551-558.
- Karlstedt K, Åhman MJ, Anichtchik OV, Soinila S y Panula P. 2003. *Expression of the H3 receptor in the developing CNS and brown fat suggests novel roles for histamine*. Molecular and Cellular Neuroscience, 24: 614-622.
- Karlstedt K, Senkas A, Åhman MJ y Panula P. 2001. *Regional expression of the histamine H2 receptor in adult and developing rat brain*. Neuroscience, 102: 201-208.
- Kinnunen A, Lintunen M, Karlstedt K, Fukui H y Panula P. 1998. *In situ detection of H1-receptor mRNA and absence of apoptosis in the transient histamine system of the embryonic rat brain*. Journal of Comparative Neurology, 394: 127-137.
- Maeda K, Haraguchi M, Kuramasu A, et. al. 2008. *CLIC4 interacts with histamine H3 receptor and enhances the receptor cell surface expression*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 369(2): 603-608.

- Martínez-Mir MI et al. 1990. *Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in the brain of human and non-human primates*. Brain Research, 526: 322-327.
- Morrison SJ. 2001. *Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells*. Current Opinion in Cell Biology, 13: 666-672.
- Mosmann T. 1983. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunological Methods, 65:55-63.
- Nakamura H, Katahira T, Matsunaga E y Sato T. 2005. *Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development*. Brain Research Reviews, 49: 120-126.
- Nakamura H y Watanabe Y. 2005. *Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon*. International Journal of Developmental Biology, 49: 231-235.
- Nissinen MJ y Panula P. 1995. *Developmental patterns of histamine-like immunoreactivity in the mouse*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 43: 211-227.
- O'Keeffe GW y Sullivan AM. 2005. *Donor age affects differentiation of rat ventral mesencephalic stem cells*. Neuroscience Letters, 375: 101-106.
- Onodera K, Yamatodani A, Watanabe T y Wada H. 1994. *Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and*

- its relationship with behavioral disorders*. Progress in Neurobiology, 42: 685-702.
- Panchision D y McKay R. 2002. *The control of neural stem cells by morphogenic signals*. Current Opinion in Genetics and Development, 12: 478-487.
 - Panula P, Lintunen M y Karlstedt K. 2000. *Histamine in brain development and tumors*. Seminars in Cancer Biology, 10: 11-14.
 - Parkash N y Wurst W. 2004. *Specification of midbrain territory*. Cell and Tissue Research, 318:5-14.
 - Raber J. 2007. *Histamine-receptor mediated signalling during development and brain function in adulthood*. Cellular and Molecular Life Sciences, 64: 735-741.
 - Riaz SS, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF. 2002. *The controlled conversion of human neural progenitor cells derived from foetal ventral mesencephalon into dopaminergic neurons in vitro*. Developmental Brain Research, 136: 27-34.
 - Saarimäki-Vire J, Peltopuro P, Lahti L, *et. al.* 2007. *Fibroblast growth factor receptors cooperate to regulate neural progenitor properties in the developing midbrain and hindbrain*. Journal of Neuroscience, 27(3): 8581-8592.

- Sadler TW. 2005. *Embriology of neural tube development*. American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics, 135:2-8.
- Santa-Olalla J y Covarrubias L. 1995. *Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alfa (TGF- α), and basic fibroblast growth factor (bFGF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon*. Journal of Neuroscience Research, 42: 172-183.
- Schwartz JC, Arrang JM, et al. 1991. *Histaminergic transmission in the mammalian brain*. Physiology Review, 71:1-51.
- Smith JL y Schoenwolf GC. 1997. *Neurulation: coming to closure*. Trends in Neuroscience, 10: 510-517.
- Temple S. 2001. *The development of neural stem cells*. Nature, 414: 112-117.
- Twyman RM. 2001. *Developmental Biology*. BIOS Scientific Publishers. EUA, 275-291.
- Vanhala A, Yamatodani A, Panula P. 1994. *Distribution of histamine-, 5-hydroxytryptamine-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and nerve fibers in developing rat brain*. Journal of Comparative Neurology, 347: 101-114.

- Velázquez E, Ruiz-Albusac JM y Blázquez E. 2003. *Glucagon-like peptide-2 stimulates the proliferation of cultured rat astrocytes*. European Journal of Biochemistry, 270: 3001-3009.
- Wessely O y De Robertis EM. 2002. *Neural plate patterning by secreted signals*. Neuron, 33:489-91.
- Winslow T y Kirschstein R. 2001. *Stem cells: scientific progress and future research directions*.
- Yan J, Studer L y McKay RDG. 2001. *Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from Basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors*. Journal of Neurochemistry, 76:307-311.