



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

ITZEL ESCOBEDO AVILA

TUTOR

DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ



Facultad de Química
UNAM

2010



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez en la División de Neurociencias, en el Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Rosa Estela Navarro González	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia	Facultad de Medicina-UAEM Hospital del Niño Morelense
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Anayansi Molina Hernández, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, que contribuyó de manera significativa en la asesoría de este trabajo tanto a nivel técnico como académico.

El proyecto fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (IN226703, IN224207 e IN2224210)

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 16 de diciembre de 2010.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Jesús Adolfo García Sainz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretaria	Dra. Clorinda Arias Álvarez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. Rosa Estela Navarro González	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Rocío Salceda Sacanelles	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dedico esta tesis a mis padres,
por su gran amor y apoyo
incondicional

A mis hermanos por su cariño y
comprensión

A mi abuelita por su compañía y
detalles

A Damián por la alegría y motivación que me da

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quiero agradecer a la UNAM por su grandeza y por ser el espacio que me ha permitido superarme tanto académica como personalmente. Por hacer valer mi gran orgullo universitario.

Al Dr. Iván Velasco por permitirme realizar este proyecto, por su gran apoyo y por las oportunidades que me ha dado en mi formación académica.

A mis padres no tengo palabras suficientes para expresar lo agradecida que me siento por el apoyo que siempre me dan en todo aspecto, por la fuerza que me inspiran día con día y por el gran ejemplo de lucha que son.

A mis hermanos por la convivencia y los grandes momentos que vivimos juntos y por su cariño y apoyo en los momentos difíciles.

A mi abuelita por sus cuidados, por consentirme, por las historias que me cuenta y tanto me gustan y por su compañía.

También incluyo en esta tesis a Damián por ser la personita que me alegra cada día con sus sonrisas y por el gran amor que siento por ti.

A mi madrinita consentida por el cariño que siempre me demuestras, por tu gran apoyo y sobre todo, por el gran detalle que tuviste conmigo cuando me operaron. Gracias!

A mis tíos y primos que aunque no nos veamos tan seguido como me gustaría, saben que siempre los tengo presentes y se que tengo todo su apoyo. Los quiero mucho!!

A mis amigas de toda la vida, no saben lo feliz que me hace que mantengamos nuestra amistad después de tantos años.

A Ulises, por tu amor y apoyo, por siempre estar a mi lado cuando más te necesito. Por tu honestidad y los bonitos momentos que paso a tu lado.

A mis compañeros de laboratorio, tanto los que se han ido como las nuevas generaciones, gracias por su apoyo y amistad.

Agradezco a mis amigos del IFC y de la Facultad de Ciencias, por los momentos dentro y fuera de lo académico que me hacen disfrutar cada día en el labo.

A Ana, por su apoyo, ayuda y consejos de tantos años y de nuevo gracias por compartir tu proyecto conmigo.

¡México, Pumas, Universidad!

ÍNDICE

Resumen	6
Lista de abreviaturas	7
Introducción	10
Histamina en el sistema nervioso central.....	10
Antecedentes en adulto.....	11
La posible participación de la histamina en el desarrollo del Sistema Nervioso Central durante la embriogénesis.....	9
Receptores histaminérgicos.....	15
Células troncales neurales (CTNs).....	20
Neuronas dopaminérgicas y enfermedad de Parkinson.....	24
Justificación	26
Hipótesis	28
Objetivos	28
Metodología	29
Resultados	34
Discusión	46
Perspectivas	50
Bibliografía	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidónico
AADC	descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
Ac. A	ácido ascórbico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	adenosin-monofosfato cíclico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BMPs	proteínas morfogénicas de hueso (del inglés “bone morphogenic proteins”)
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
Ca ²⁺	calcio
CNTF	factor neurotrófico ciliar (del inglés “ciliar neurotrophic factor”)
CRE	elemento de respuesta a AMPc (del inglés “cAMP responsive element”)
CREBP	proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CT	célula troncal
CTNs	células troncales neurales
DA	dopaminérgicas (neuronas)
DAT	transportador de dopamina
dUTP	desoxiuridina-trifosfatada
EGF	factor de crecimiento epidermal (del inglés “epidermal growth factor”)
FGFb	factor de crecimiento fibroblástico básico (del inglés “basic fibroblast growth factor”)
FGF8	factor de crecimiento fibroblástico 8 (del inglés “fibroblast growth factor 8”)
Fn	fibronectina
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	proteína ácida glial fibrilar
GMPc	guanosín-monofosfato cíclico
HA	histamina
HDC	L-histidina descarboxilasa

HNMT	histamina-N-metiltransferasa
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución (del inglés “high performance liquid chromatography”)
Ins(1,4,5)P3	inositol-1,4,5-trifosfato
MAO-B	monoamina oxidasa B
MAPK	quinasas activadas por mitógenos (del inglés “mitogen activated kinases”)
MesV	mesencéfalo ventral
NCX	intercambiador de sodio-calcio (Na^+ - Ca^{2+})
Nes	nestina
NO	óxido nítrico
PBS	solución salina de fosfatos (del inglés “phosphate buffered saline solution”)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polymerase chain reaction”)
PFA	paraformaldehído
PKA	proteína cinasa A
PLC	fosfolipasa C
PLO	poli-L-ornitina
Shh	sonic hedgehog
SNC	sistema nervioso central
SNCa	suero normal de cabra
TdT	transferasa de desoxinucleótidos terminales
TGF- β	factor de crecimiento transformante β (del inglés “transforming growth factor β ”)
TH	tirosina hidroxilasa
t-MeHA	tele-metilhistamina
Tuj1	anticuerpo que reconoce β tubulina III
TUNEL	marcaje de residuos de desoxiuridina trifosfato mediante la desoxittransferasa (del inglés “terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling”)

INTRODUCCIÓN

HISTAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Metabolismo

La histamina (HA) es una amina biogénica que se encuentra distribuida en una amplia variedad de tejidos, incluido el cerebro, por lo cual debe su nombre a la palabra griega “histos” que significa “tejido”. Esta amina se sintetiza en las neuronas a partir del aminoácido precursor L-histidina. Su síntesis involucra 2 pasos: el transporte de L-histidina al interior de la célula, que se lleva a cabo por el transportador de L-aminoácidos, y su posterior descarboxilación por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC), que se localiza en el citoplasma neuronal y es altamente específica. Una vez que se sintetiza, es transportada a vesículas sinápticas por medio del transportador vesicular de monoaminas, y ante un estímulo despolarizante, es liberada al espacio sináptico y posteriormente es reconocida por sus receptores específicos en la membrana post-sináptica. La histamina es inactivada por enzimas catabólicas como la histamina-N-metiltransferasa (HNMT) y la monoamina oxidasa B (MAO-B). No se ha descrito un mecanismo de inactivación por recaptura neuronal, sin embargo, se han descrito mecanismos de captura por células astrogiales (Huszti, 2003, 1990). La metilación parece ser la principal vía de catabolismo de la HA de manera extraneuronal. La tele-metilhistamina (t-MeHA) se encuentra presente en el cerebro a los mismos niveles que la HA y con una distribución similar. Posterior a la metilación, se da una desaminación oxidativa hacia ácido tele-metilimidazolacético, reacción que es catalizada por la MAO-B. Esta reacción representa el producto final del metabolismo de la histamina en el cerebro (Huszti, 1998; Haas y Panula, 2003; Nissinen y Panula, 1995; Schwartz, *et al.*, 1991) (Fig. 1).

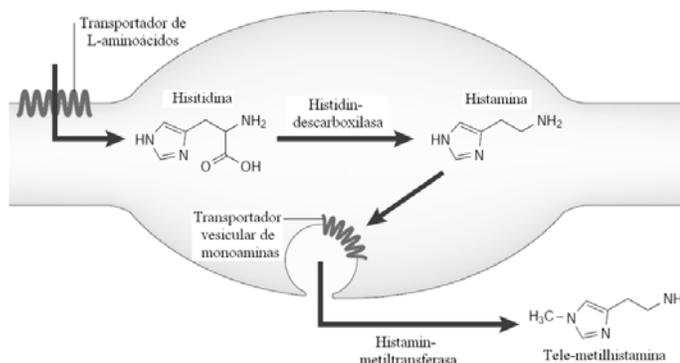


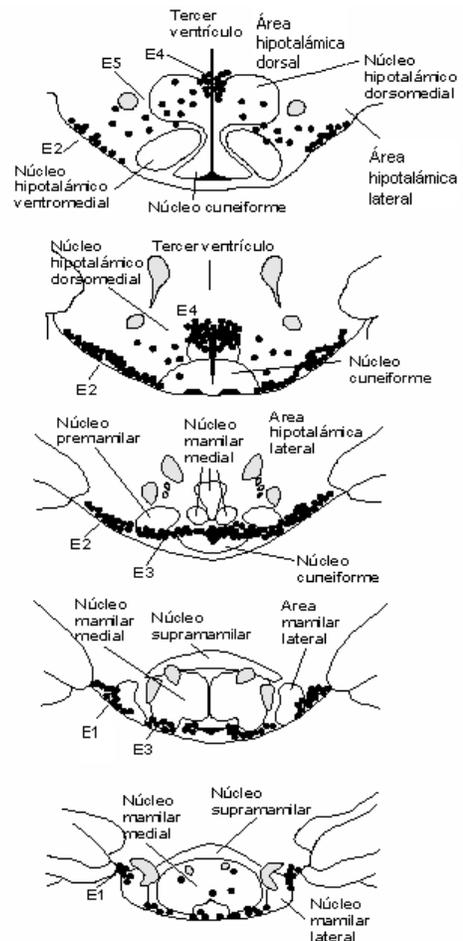
Figura 1. Síntesis, transporte y metabolismo neuronal de histamina. La HA se sintetiza a partir del precursor L-histidina, el cual entra a la célula por un transportador específico de L-aminoácidos. La enzima HDC se encarga de sintetizar la histamina, que posteriormente será transportada para ser almacenada 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).

Antecedentes en adulto

En el sistema nervioso central (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, *et al.*, 1991; Martínez-Mir *et al.*, 1990). La HA es un neurotransmisor que ha sido propuesto por nuestro grupo como un importante modulador del desarrollo del SNC al inducir la proliferación y diferenciación de células precursoras neurales (Molina-Hernández y Velasco, 2008).

En el cerebro adulto, el sistema histaminérgico 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. En el cerebro de rata, se han definido 5 grupos celulares que corresponden a las neuronas histaminérgicas concentradas en la zona del núcleo tuberomamilar (Fig. 2).

Figura 2. Organización 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).



Las principales áreas de proyección histaminérgica varían de acuerdo a la especie, pero en general abarcan la mayor parte del SNC desde el bulbo olfatorio hasta la médula espinal (Fig. 3).

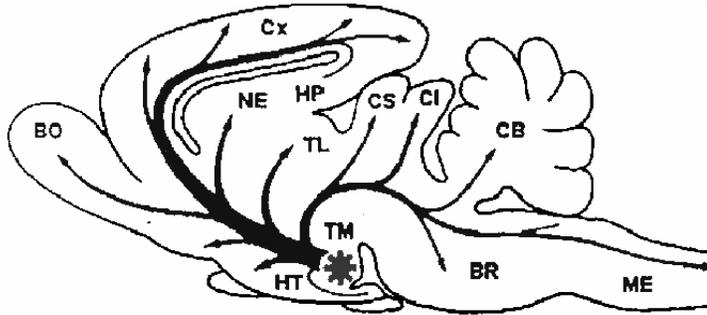


Figura 3. Diagrama sagital del sistema histaminérgico en cerebro de rata. Las flechas representan las fibras de proyección histaminérgica a partir de los cuerpos celulares en el núcleo tuberomamilar (asterisco). Abreviaturas: ME, médula espinal; BR, médula oblonga; CB, cerebelo; TM, núcleo tuberomamilar; HT, hipotálamo; CI, colículo inferior; CS, colículo superior; TL, tálamo; HP, hipocampo; NE, estriado; Cx, corteza; BO, bulbo olfatorio. (tomado de Wada *et al* 1991)

La posible participación de la HA en el desarrollo del sistema nervioso central durante la embriogénesis

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

Durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados, la HA es uno de los primeros neurotransmisores en aparecer, presentando concentraciones mucho mayores que en el sistema nervioso de adultos. Durante el desarrollo del cerebro de mamíferos, la HA se encuentra tanto en neuronas 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 esta población es distinta a la que se observa en el organismo adulto, ya que la primera corresponde con la ubicación de las neuronas serotoninérgicas en el núcleo raphe durante su desarrollo (Kinuen *et. al*, 1998; Karlstedt *et al.*, 2003).

El desarrollo del sistema histaminérgico difiere de otros sistemas aminérgicos debido a que estos últimos presentan dos picos de concentración: uno prenatal y otro postnatal, mientras que el histaminérgico presenta dos picos de concentración prenatal (Fig. 4).

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 HA en diversas regiones del cerebro durante el desarrollo embrionario y establecer su concentración. 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, alcanzando las concentraciones detectadas en el adulto, a partir del día E20 (Vanhala *et al.*, 1994; Auvinen y Panula, 1988) (Fig. 4).

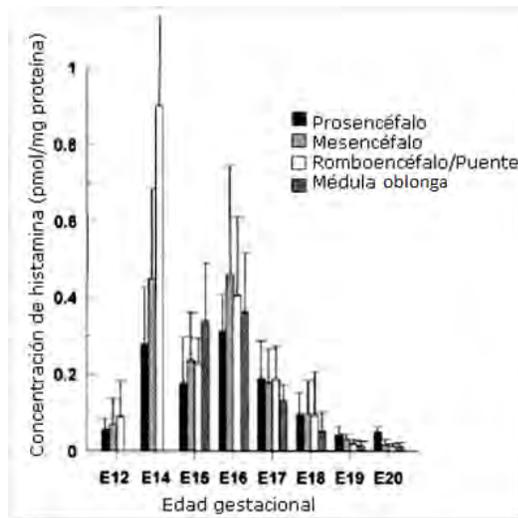


Figura 4. Concentraciones de histamina en diversas regiones del cerebro durante el desarrollo embrionario. En particular, en la región del mesencéfalo se detectan bajas concentraciones al día E12, y posteriormente hay un incremento en la concentración de histamina al día 14 de desarrollo y otro al día 16, seguidos de un decremento observado hasta la etapa postnatal (modificado de Vanhala *et al.*, 1994).

Nuestro grupo reportó el efecto *in vitro* de la HA en células troncales neurales provenientes de la corteza cerebral de rata E14 sobre la proliferación, muerte y diferenciación celular. Se observó que la HA es capaz de favorecer significativamente la proliferación celular, en mayor medida por la activación del receptor H_2 (Fig. 5A), mientras que disminuye significativamente la muerte celular apoptótica durante la etapa de proliferación (Fig. 5B). Por otro lado, la HA fue capaz de incrementar 3 veces la diferenciación neuronal debido a la activación del receptor H_1 , disminuyendo significativamente la diferenciación glial (astrocítica), además de aumentar, de manera dependiente de la concentración, la muerte celular apoptótica (Fig. 5; Molina-Hernández y Velasco, 2008).

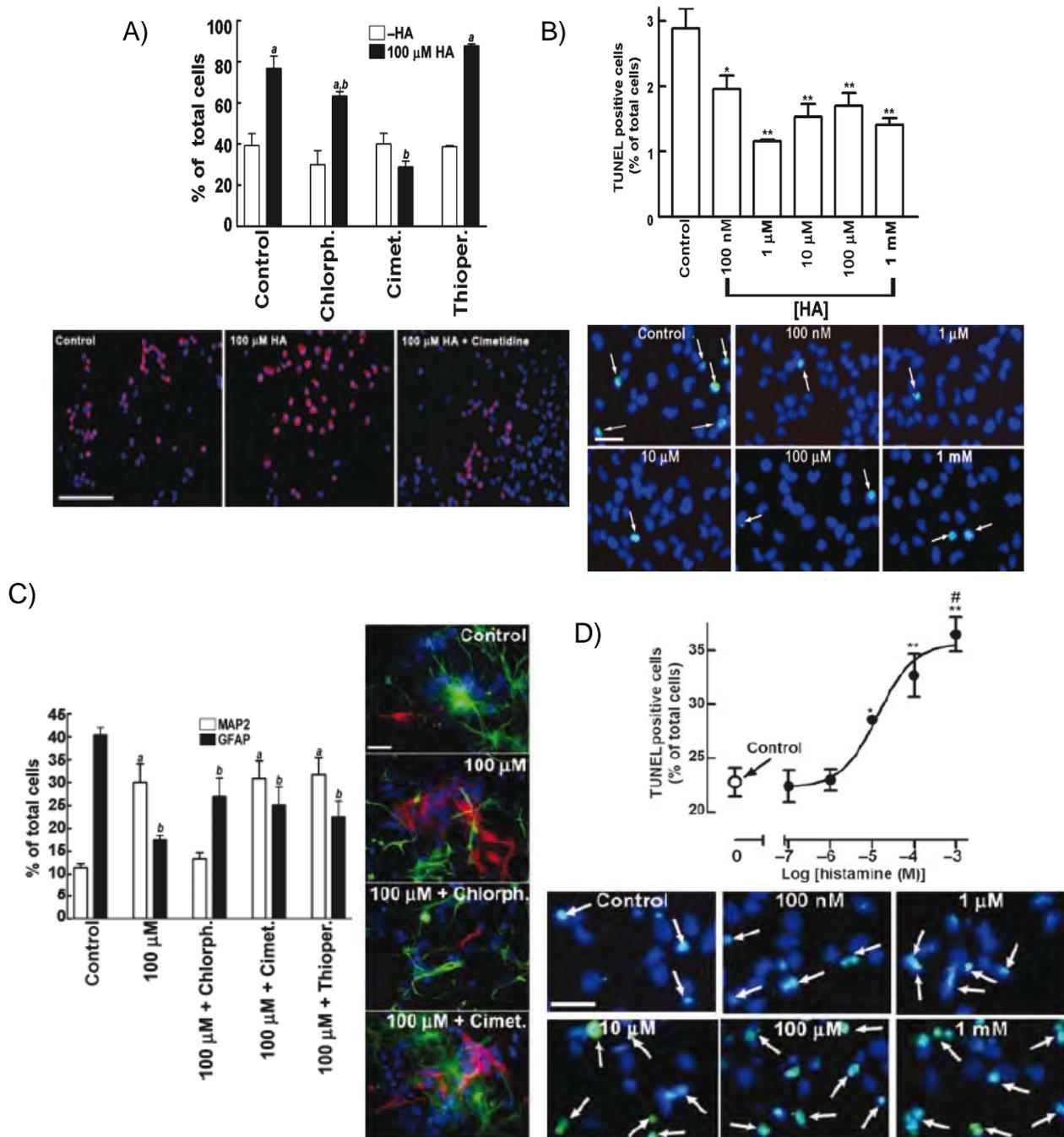


Figura 5. Efecto de la HA sobre la proliferación y diferenciación *in vitro* de células de corteza cerebral de rata E14. **A)** Cuantificación e imágenes de inmunotinciones de experimentos de incorporación de BrdU (rojo) donde se observa el efecto antagonista de cimetidina en el incremento en la incorporación de BrdU inducido por el tratamiento con 100 μ M de HA. **B)** Cuantificación e imágenes de TUNEL (verde) donde observamos que la HA reduce la proporción de células apoptóticas en la etapa de proliferación. **C)** Análisis farmacológicos e imágenes representativas del efecto de la HA sobre la diferenciación de CTNs donde se observa que la clorfeniramina, antagonista del receptor H_1 , es capaz de revertir el aumento en la diferenciación neuronal (MAP2, rojo) promovida por el tratamiento con 100 μ M de HA. **D)** Incremento en la apoptosis dosis-dependiente en las células diferenciadas tratadas con concentraciones crecientes de HA. Gráfica e imágenes representativas (TUNEL, verde) (Molina-Hernández y Velasco, 2008).

RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS

En mamíferos, la HA 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 SNC de mamíferos y activan diversas vías de señalización, mientras que el receptor H₄ se detecta predominantemente en sistema nervioso periférico (Fig. 9):

Receptor H₁: Este receptor fue descubierto en 1966. Es una proteína de 56 kDa cuyo tamaño es de 487 aminoácidos. En el humano, el gen que lo codifica se localiza en el cromosoma 3, en el sitio 3p14-p21 (Hill *et al*, 1997).

En SNC, se encuentra ampliamente distribuido en las regiones del tálamo, hipotálamo posterior, hipocampo, corteza, amígdala y en la parte basal del cerebro anterior, mientras que en el cerebelo presenta bajas densidades. Este receptor es una proteína de siete dominios transmembranales y se acopla a la proteína Gq/11. Se encarga de regular acciones excitadoras y su función principal es la activación de la fosfolipasa C (PLC), que lleva a la formación de dos segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P₃). La activación de receptores a Ins(1,4,5)P₃ libera calcio (Ca²⁺) de almacenes intracelulares, lo cual activa, al menos 4 procesos dependientes de Ca²⁺:

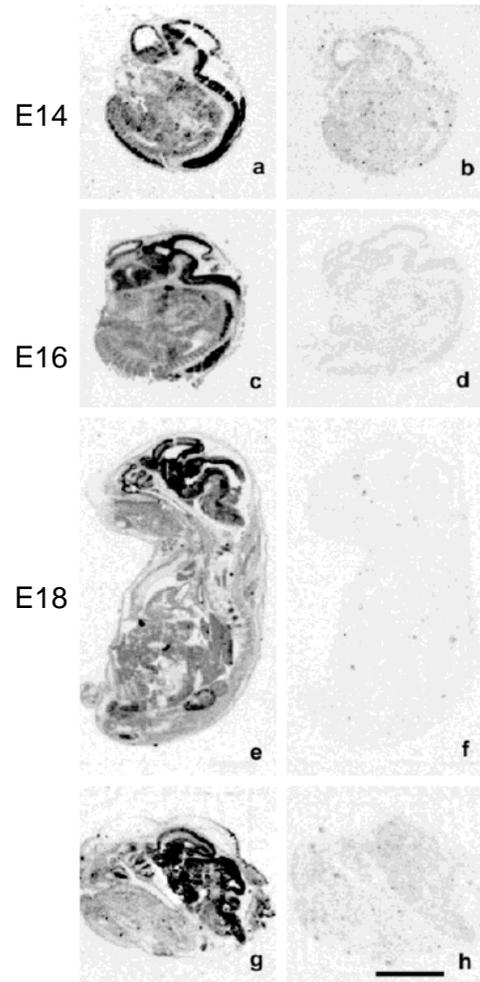
- apertura de canales catiónicos, que causan despolarización
- activación neuronal del intercambiador de Na⁺-Ca²⁺ (NCX), que también causa despolarización.
- formación de óxido nítrico (NO) y GMP cíclico (GMPc).
- apertura de canales K⁺, que causa hiperpolarización.

Los antihistamínicos clásicos actúan como antagonistas de este receptor.

Durante el desarrollo embrionario, la expresión del RNA mensajero del receptor H₁ se ha detectado al día E14 en el romboencéfalo, prosencéfalo y mesencéfalo, así como en tejidos periféricos (Fig. 6, 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. 6, c y d). También se observa en el diencefalo y en la corteza cerebral. Para el

día E18, la expresión se observa en la corteza cerebral, en el neuroepitelio ventricular (Fig. 6, 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. 6, g y h) (Kinnunen, *et al.*, 1998) (Fig. 6).

Figura 6. Pruebas de hibridación donde se muestra la expresión del ARNm del receptor H₁ 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 acetil-transferasa de *S. aureus* (modificado de Kinnunen *et al.* 1998)



Receptor H₂: Este receptor fue descubierto en 1972 y es una proteína de 359 aminoácidos que pesa 59 kDa. En humano, el gen que lo codifica se localiza en el cromosoma 5. 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), que se encarga de fosforilar la proteína que activa al elemento de unión al ADN CREBP, que media la activación transcripcional de genes dependientes de AMP cíclico

(AMPC). Regula el potencial de membrana neuronal favoreciendo la despolarización, generado por un efecto bloqueador sobre los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Haas y Panula, 2003).

En el desarrollo embrionario, este receptor se encuentra ampliamente distribuido en diversas áreas del SNC. No se tienen estudios en estadios anteriores al E15, sin embargo se sabe que a partir de este estadio en adelante, se observa la expresión del receptor en las partes frontal y caudal del área del núcleo de raphe. Esto 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 H_2 podría jugar un papel regulador y guiar la distribución de las neuronas histaminérgicas durante el desarrollo embrionario (Fig. 7).



Figura 7. Expresión del ARNm del receptor H_2 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 H_3 : Fue descubierto en 1983. Este receptor presenta varias isoformas (se cree que por lo menos 3 de ellas son funcionales) que van de 326 a 445 aminoácidos y con un peso aproximado de 70 kDa. El gen que lo codifica se encuentra en el cromosoma 20. 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 activación por sustancias agonistas, inhibe la síntesis y liberación de HA, mientras que su inhibición por antagonistas, incrementa la liberación de HA. En el SNC, se expresan ampliamente como autoreceptores presinápticos, principalmente en el núcleo accumbens, 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 y a canales de Ca²⁺ de alto umbral activados por voltaje. Inhibe la producción de AMPc y activa la vía de las MAP cinasas. 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).

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. 8).

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. Por otro lado, se ha sugerido que el bloqueo específico del receptor H₃ 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 (Acevedo *et al.*, 2007; Raber, 2007).

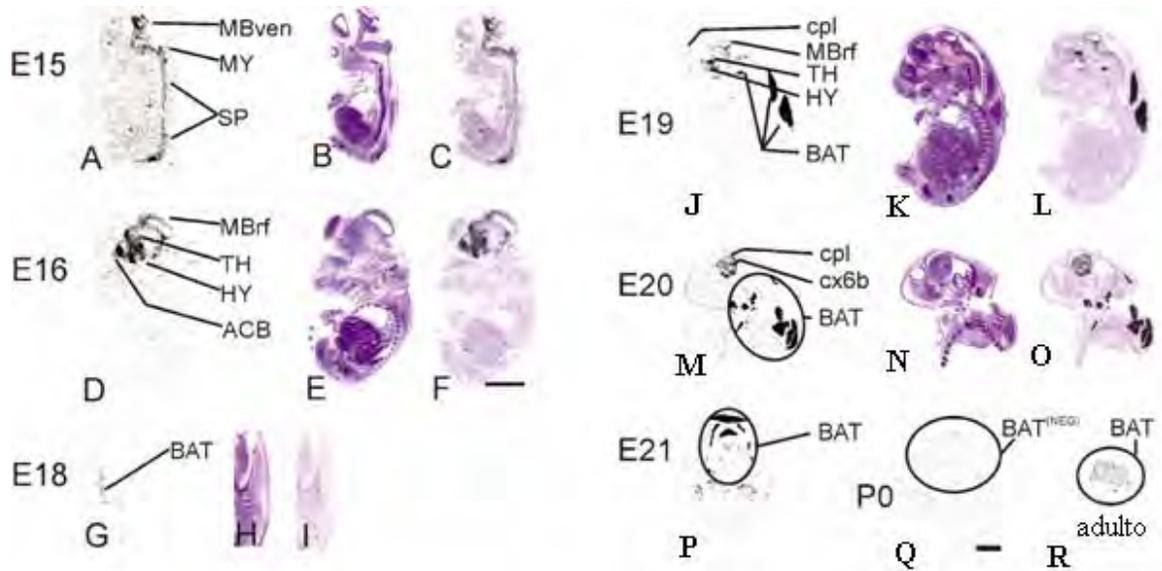


Figura 8. Expresión del receptor H_3 durante el desarrollo en rata. Las figuras de lado izquierdo (A, D, G, J, M y P) muestran la expresión del receptor H_3 , mientras que las de lado derecho (B, E, H, K, N y Q) corresponden a tinciones con hematoxilina-eosina. La composición de ambas imágenes para cada 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). Por otro lado, 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).

son las células troncales embrionarias, las cuales están resultando ser un tema de gran interés debido a sus propiedades biológicas e importancia médica.

- 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. 10).

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.

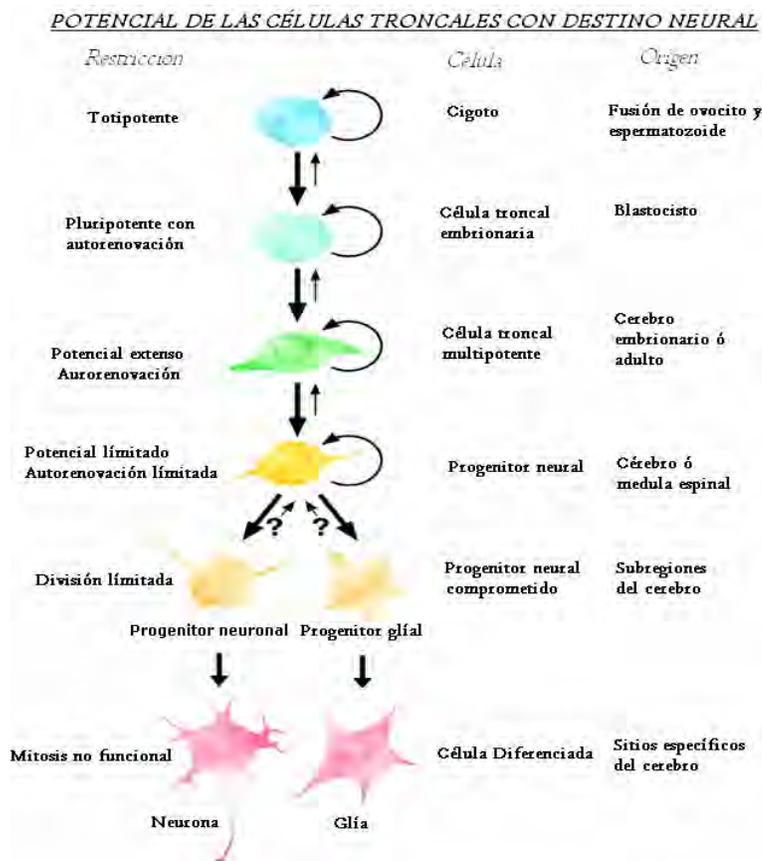


Figura 10. Potencial de las células troncales con destino neural. Se muestra cómo a partir de una célula troncal totipotente, se va dando una especialización y compromiso celular hasta generar los tipos especializados de células que conforman al SNC. Se ilustran los grados de restricción que dan origen a la diferenciación de neuronas (modificada de Gage, 2000).

Para la formación del SNC, se requiere 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 (Temple, 2001).

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. 10) (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), el cual decrece hasta poco antes del nacimiento (Götz *et al.*, 2005) (Fig. 11).

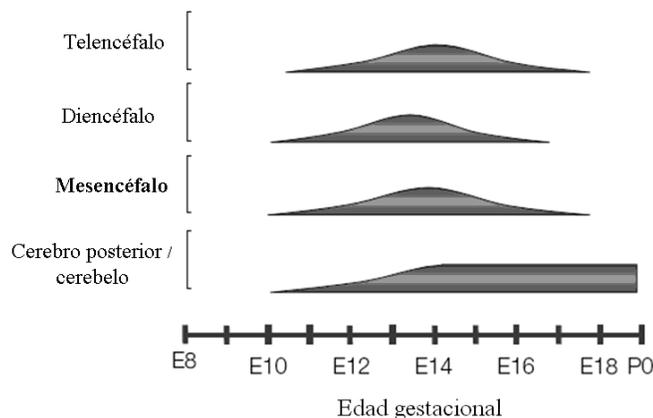


Figura 11. Neurogénesis. Representación del curso temporal del proceso de neurogénesis en diversas regiones del SNC de roedores, desde el octavo día embrionario hasta el nacimiento. En particular, en el área del mesencéfalo, la neurogénesis comienza al día E10, mostrando un pico de producción neuronal 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 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. 12).

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, inhibiendo la actividad de genes proneurales promoviendo así, la entrada a la vía de diferenciación glial (Bertrand et al., 2002; Morrison, 2001) (Fig. 12).

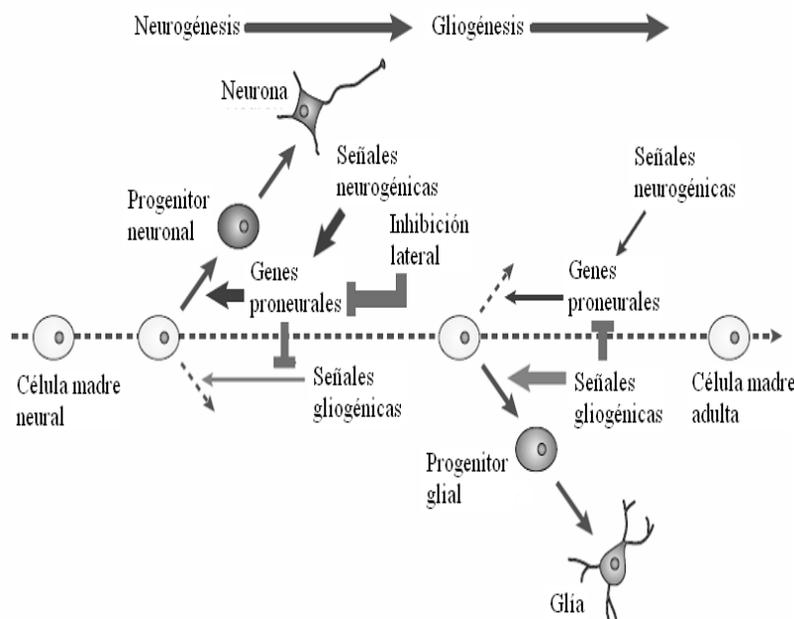


Figura 12. Modelo de neurogénesis y gliogénesis durante el desarrollo neural. En el curso temporal del desarrollo neural, ocurre primero el proceso de generación de neuronas y posteriormente ocurre la generación de glía. La activación de ambos procesos depende de factores intrínsecos y extrínsecos que regulan 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).

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. Sin embargo, 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, constituyendo el 75% de las neuronas dopaminérgicas del cerebro adulto (Ang, 2006). Se ha determinado la localización de estos grupos neuronales gracias a estudios inmunohistoquímicos que identifican el patrón de expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), y se han definido como los grupos A8-A10.

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. 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).

Durante el desarrollo embrionario del cerebro, la especificación del fenotipo dopaminérgico depende de la interacción de factores como Sonic Hedgehog (Shh), derivado de la línea media ventral de la placa del piso, y el factor de crecimiento fibroblástico 8 (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 llevan a la activación de factores de transcripción como Nurr1, En1/2, Otx2, Lmx1a/b, Msx 1/2, Neurogenina 2 y Mash1 en una secuencia temporal, que llevan a la inducción neural y al posterior mantenimiento de las neuronas DA del mesencéfalo (Ang, 2006).

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa 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). Actualmente, el sistema dopaminérgico en mesencéfalo, es ampliamente estudiado debido a su implicación en desórdenes neurológicos, por lo que 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.

RESUMEN

La histamina 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 en este periodo concentraciones mayores que en el Sistema Nervioso Central adulto, específicamente en la región del mesencéfalo ventral (MesV); sin embargo, aún no se conoce su función durante el desarrollo del Sistema Nervioso.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de diversas concentraciones de histamina en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte de células troncales neurales del MesV de rata *in vitro* mediante la aplicación de técnicas de inmunocitoquímica, ensayos de BrdU y TUNEL. Por medio de RT-PCR, se estudió la expresión de marcadores de diferenciación hacia linaje dopaminérgico, así como la expresión de cada uno de los receptores de histamina.

Se encontró que la histamina incrementa hasta 2 veces la muerte celular en cultivos diferenciados a todas sus concentraciones. Por otro lado, la diferenciación neuronal se vio promovida a la concentración de 10 μM , obteniendo un incremento del 21.56 al 37.72 % con respecto al control. También encontramos que estas células presentan la capacidad de diferenciarse hacia linajes neuronales específicos como son el dopaminérgico, en donde se observó que la histamina disminuye a la mitad la población de neuronas dopaminérgicas.

En conjunto, estos resultados indican que la histamina pudiera estar actuando como una señal que regula la diferenciación neuronal así como el establecimiento de poblaciones neuronales específicas como el linaje dopaminérgico durante el desarrollo del Sistema Nervioso.

JUSTIFICACIÓN

Como ya se mencionó en la introducción, 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 desde edades tempranas del desarrollo embrionario. Durante un periodo temprano 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). Por ello, nuestro grupo ha propuesto que la histamina podría jugar un papel importante durante la embriogénesis, específicamente en el desarrollo del sistema nervioso central.

Además, durante el desarrollo embrionario, 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.

En experimentos realizados previamente en el laboratorio, se ha visto que en células provenientes de corteza cerebral de rata de 14 días de desarrollo embrionario, la histamina es capaz de promover la proliferación celular, reducir la muerte celular apoptótica en la etapa de proliferación e inducirla en la etapa de diferenciación, dependiente de su concentración.

Hasta el momento se desconoce la relevancia funcional de la histamina durante el desarrollo embrionario y se tienen evidencias de su presencia, de la existencia de sus receptores y efectos durante el desarrollo neural, en particular en la corteza, en donde se ha demostrado que la HA tiene efectos reguladores sobre la proliferación, diferenciación neuronal y muerte celular. Debido a esto, resulta importante y sumamente interesante el estudio del sistema histaminérgico en células precursoras neurales, ya que brindará la oportunidad de conocer nuevos reguladores de los procesos de determinación y diferenciación neuronal. Por lo anterior, el presente estudio está enfocado en

evaluar el papel que la HA podría tener sobre procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la muerte en cultivos de precursores obtenidos de la región de mesencéfalo ventral de rata, y su impacto sobre el curso temporal de procesos tan importantes como la neurogénesis.

HIPÓTESIS

La histamina es capaz de modular *in vitro* la proliferación y diferenciación de células troncales neurales previamente 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. Evaluar el efecto de la histamina en la proliferación, diferenciación y muerte neuronal *in vitro* y determinar la concentración de histamina que modifica estos parámetros.
2. Identificar la expresión de los receptores de HA durante la proliferación y la diferenciación celular.
3. Estudiar por RT-PCR, si la histamina afecta la expresión de marcadores dopaminérgicos.

METODOLOGÍA

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

Para la obtención de CTN de mesencéfalo ventral, se utilizan ratas Wistar de 12 días de gestación. Estas ratas se sacrifican por decapitación y se obtienen los embriones, a partir de los cuales se hace la extracción de CTN de mesencéfalo ventral (Fig. 13).

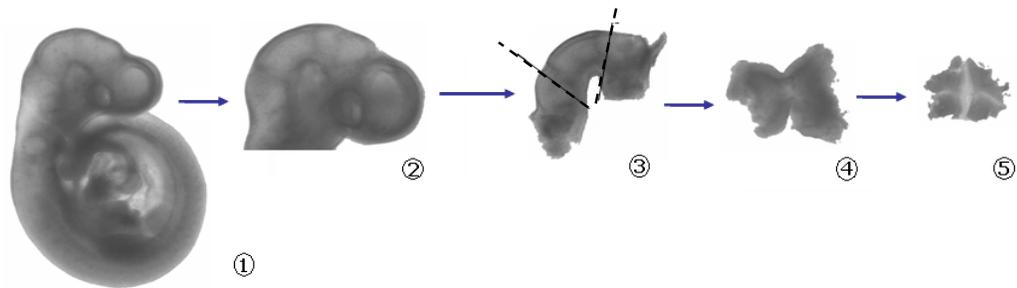


Figura 13. Se esquematiza la metodología de disección del área del mesencéfalo ventral de embriones de rata de 12 días de desarrollo. Una vez que se ha extraído el embrión del útero, se remueve el saco vitelino (1), se retira la cabeza del resto del embrión (2) para facilitar su manipulación. Posteriormente, se quita la parte frontal de la cabeza para poder aislar el tejido neural. Una vez que se ha removido el tejido excedente, se obtiene sólo el tejido neural de la región; 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 de los extremos para eliminar lo que corresponde a la región 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 centrifugan y posteriormente se disocian mecánicamente con la ayuda de una micropipeta. Se cuantifica la cantidad de células obtenidas y se siembran a una densidad de 1 a 1.5 millones de células por caja de cultivo de 10 cm de diámetro, previamente tratadas con poli-L-ornitina (PLO, 15 $\mu\text{g/ml}$) y fibronectina (Fn, 1 $\mu\text{g/ml}$) en 7 ml finales de medio N2 y 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb), adicionando diariamente FGFb y cambiando el medio cada 2 días, hasta alcanzar una confluencia de 60 a 80%. A estos cultivos se les denomina en pasaje 0 (P0).

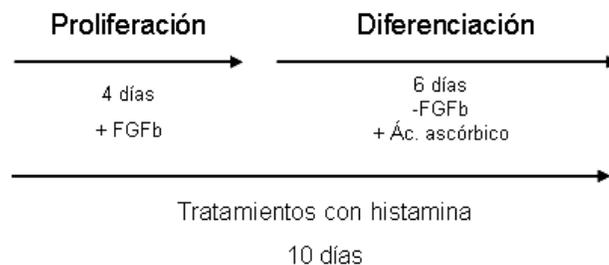
III. PASAJE DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CTN DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA E12

Una vez que los cultivos del P0 alcanzan una confluencia de 80%, se pasan a cajas de 24 pozos previamente tratadas con poli-L-ornitina (PLO, 15 µg/ml) y fibronectina (Fn, 1 µg/ml) a una densidad de 15,000 células por pozo, para comenzar el experimento con tratamientos con HA. A estos cultivos se les denomina pasaje 1 (P1).

IV. TRATAMIENTOS CON HISTAMINA

Los tratamientos se comienzan el mismo día que se pasan las células del P0 al P1. Estos tratamientos consisten en agregar concentraciones crecientes de HA que van desde 100 nM hasta 1 mM diariamente.

Los cultivos se mantienen durante 4 días en condiciones de proliferación (medio N2+FGFb), cambiando el medio cada 2 días y agregando 10 ng/ml de FGFb y tratamientos con HA diariamente. Posterior a este periodo se comienza la diferenciación, retirando el FGFb y agregando ácido ascórbico (Ác. A) como antioxidante a una concentración de 2 mM en 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:



V. TRATAMIENTOS CON ANTAGONISTAS

Se usarán antagonistas a los receptores histaminérgicos (H₁, H₂ y H₃) para estudiar el efecto de las diversas concentraciones de histamina en la proliferación y diferenciación celular, mediado por cada receptor. Para el receptor H₁, se usó el antagonista clorfeniramina (1 µM); para el receptor H₂, se usó el antagonista cimetidina (30 µM) y para el receptor H₃ se usó tioperamida (1 µM) como antagonista. Los cultivos celulares fueron tratados con estas

concentraciones de antagonistas, durante las etapas de proliferación y diferenciación diariamente.

VI. INMUNOCITOQUÍMICA

Una vez que han concluido las etapas de proliferación y diferenciación, los cultivos celulares se fijan con una solución de PFA al 4% durante 1 hora para hacer inmunotinciones. Posteriormente se permeabiliza la membrana con 0.3 % de Tritón X-100 y se bloquean posibles uniones inespecíficas del anticuerpo con 10% de suero normal de cabra (SNCa) en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Las células se incuban con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos Primarios:

Anticuerpo monoclonal anti-nestina	1:100
Anticuerpo anti-TH	1:1000
Anticuerpo anti-GABA	1:2000
Anticuerpo monoclonal anti-tubulina- β III (Tuj1)	1:2000
Anticuerpo policlonal anti- β -tubulina-III	1:2000
Anticuerpo monoclonal anti-MAP2	1:500
Anticuerpo policlonal anti-GFAP	1:2000

Anticuerpos Secundarios:

- 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

Los núcleos son teñidos con Hoechst 33258 a 1 ng/mL.

VII. ENSAYO DE BRDU

El análisis de proliferación celular se lleva a cabo por medio del ensayo de incorporación de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU). Este ensayo consiste en incubar con BrdU a una concentración de 10 μ M durante 3 horas los cultivos celulares tratados al tercer día de proliferación y después se cambia el medio para retirar el BrdU no incorporado. Al día siguiente se fijan los cultivos con una solución de PFA al 4%. Posteriormente, las células se incuban con HCl 1N por 30 minutos, y se neutraliza lavando con una solución de borato de sodio 0.1 M.

Se bloquea con 0.3 % de Tritón X-100 y 10% de suero normal de cabra (NGS) en PBS. Las células se incuban con anticuerpo primario anti-BrdU de rata a una dilución 1:100 en solución de bloqueo sin Tritón X-100. Posteriormente se usa anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-IgG de rata hecho en cabra a una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo sin Tritón X-100. Los núcleos son teñidos con Hoechst 33258 a 1 ng/mL.

VIII. TUNEL

Para evaluar la muerte celular apoptótica, se usó el ensayo de TUNEL (Terminal deoxytransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling, por sus siglas en inglés). Este ensayo se basa en la incorporación de desoxiuridina (dUTP) biotinilada por medio de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en roturas de cadenas dobles o simples del ADN. La biotina actúa como señal que puede ser detectada por medio de fluorescencia.

IX. 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 a una densidad de 450 mil células por pozo. Una vez que se han cumplido 4 días de proliferación y 6 de diferenciación bajo los diversos tratamientos con histamina, se realiza la extracción de ARN por el método de TRIZOL. Se resuspende en agua el ARN, se cuantifica la cantidad de ARN obtenida y se toma 1 µl para correr un gel de agarosa al 1% para observar el ARN ribosomal 18S y 28S.

X. RT-PCR

Una vez que se ha realizado la extracción de ARN, es necesario retrotranscribirlo para obtener el ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc) que pueda ser amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se utilizan 500 ng de ARN. Se cuantifica el ADNc, y una vez cuantificado, se utilizan 500 ng para su amplificación por PCR de los distintos receptores de histamina: H₁, H₂ y H₃, y marcadores dopaminérgicos: TH, DAT, En-1, Pitx3 y Lmx1b.

Para el caso de cada receptor, se usa como control negativo de la reacción una mezcla de reactivos sin agregar ADNc. Como control positivo para los receptores a histamina se usa ADNc de corteza cerebral de adulto, en donde sabemos que se expresan estos receptores. Como control positivo para los diversos marcadores dopaminérgicos, se usó ADNc de sustancia nigra de rata adulta, donde se expresan todos los marcadores empleados.

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

XI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

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

RESULTADOS

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

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la presencia de receptores histaminérgicos en células del mesencéfalo ventral (MesV) por medio de RT-PCR en el tejido intacto de mesencéfalo E12 (sin cultivar), en cultivos no diferenciados y diferenciados sin exponer a los tratamientos de HA. Como control se analizó su expresión en tejido de corteza cerebral de adulto (Ctl+), en donde se sabe que se expresan los 3 receptores histaminérgicos. Encontramos que a edad temprana del desarrollo embrionario (E12) tanto en células no diferenciadas como en células diferenciadas, así como en el tejido sin cultivo se expresan los tres receptores histaminérgicos, observando las bandas que corresponden a cada uno de los tamaños esperados para cada receptor. Para el caso del receptor H₃ se expresan las 3 isoformas que han sido reportadas (Fig. 14).

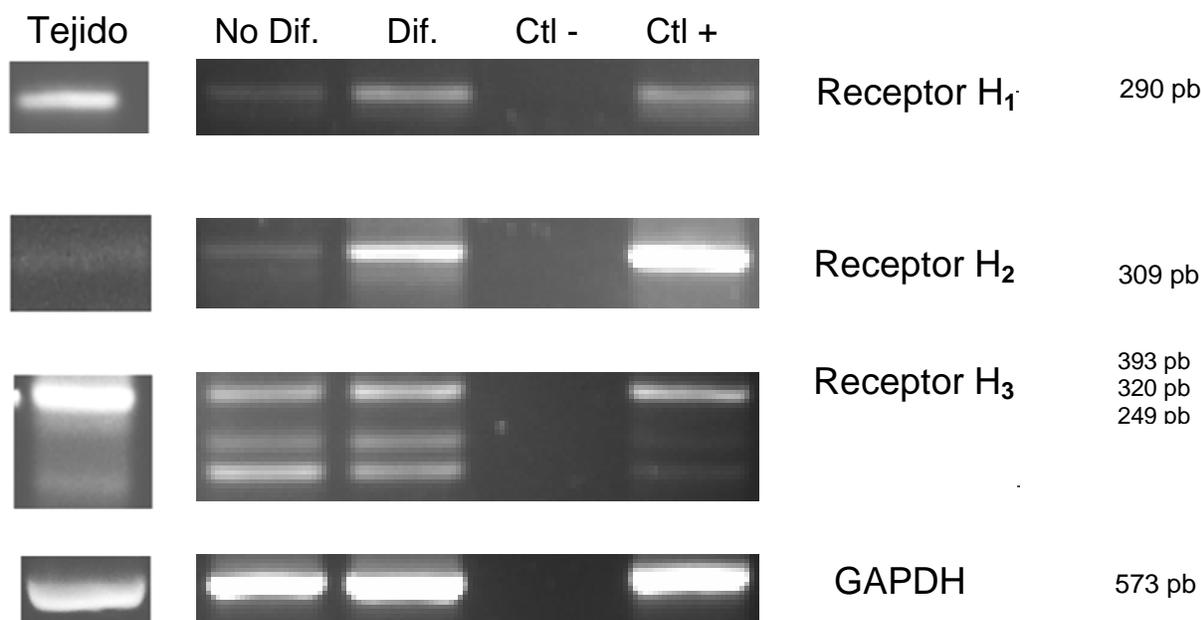


Figura 14. Expresión de los receptores histaminérgicos en células diferenciadas (Dif.) y no diferenciadas (No Dif.), así como el control de carga, gliceraldehído,3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se observa que tanto en las células diferenciadas como en las no diferenciadas se expresan los 3 receptores para HA reportados en el sistema nervioso central. De lado derecho, se muestran los tamaños de las bandas esperadas. Como control positivo (Ctl+) se usó corteza cerebral de rata adulta y como control negativo (Ctl-) se utilizó RNA. Se muestran las imágenes representativas de 3 experimentos.

EFFECTO DE DIVERSAS CONCENTRACIONES DE HISTAMINA EN LA PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y MUERTE NEURONAL *IN VITRO*

CÉLULAS EN PROLIFERACIÓN

Efecto de la histamina sobre la identidad celular

Para analizar si la HA ejerce algún efecto sobre la población celular que expresa nestina en los cultivos durante la etapa de proliferación (en presencia de FGFb), se realizaron inmunocitoquímicas en las condiciones tratadas con diferentes concentraciones de HA. Se evaluó la expresión del marcador nestina (Nes), que es una proteína de filamentos intermedios ampliamente utilizada para identificar precursores neurales indiferenciados, haciendo conteos de células positivas para Nes en 10 campos aleatorios de 3 experimentos por duplicado para cada condición (control y tratamientos con concentraciones crecientes de HA). En la figura 15, se muestran la gráfica e imágenes representativas de los resultados obtenidos. En todas las condiciones se obtuvo un porcentaje mayor al 90% de células Nes+, lo cual indica que en ninguna concentración, la HA modifica la proporción de los precursores neurales, y corrobora que estos cultivos se componen, en su mayoría, por células troncales neurales indiferenciadas.

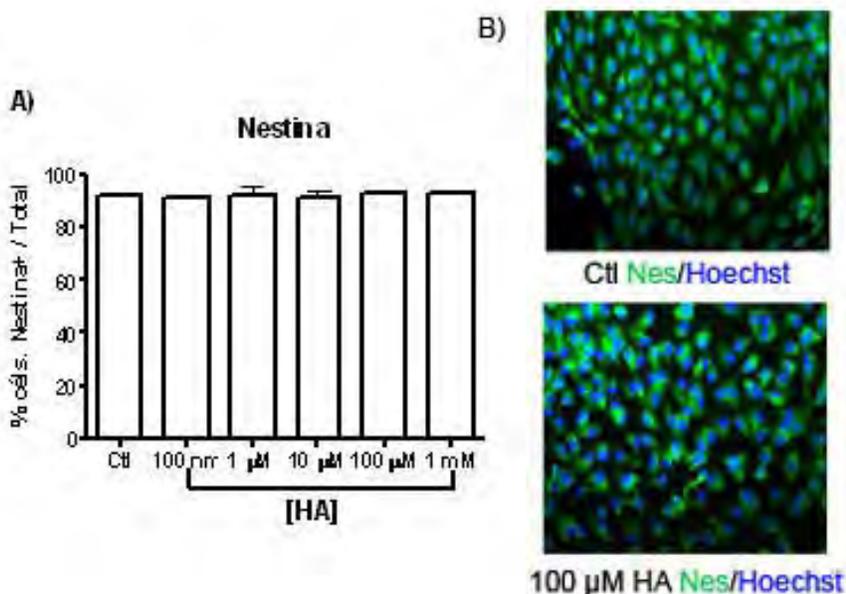


Figura 15. Efecto de la HA sobre la población celular que expresa nestina en cultivos en proliferación (en presencia de FGFb). A) La HA no es capaz de modificar el porcentaje de células positivas a nestina. Las barras representan los porcentajes promedio más el error estándar. B) Imágenes representativas (tomadas a 40 x) de células positivas a nestina (verde) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul).

Efecto de la histamina sobre la proliferación celular

Una vez que observamos que la HA no modifica la proporción e identidad de precursores neurales, decidimos evaluar el efecto de las concentraciones crecientes de HA sobre la proliferación. Para ello, se realizaron ensayos de BrdU, en donde se evaluó la incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina al ADN durante la fase S del ciclo celular, lo cual indica que las células están proliferando. Después de fijar los cultivos celulares con una solución de PFA al 4%, se realizaron las inmunocitoquímicas para detectar células que incorporaron BrdU, es decir que se encuentran en la fase S del ciclo celular. Al realizar los conteos celulares, observamos que la HA no modifica de manera significativa la proliferación de estas células a ninguna concentración (Fig. 16).

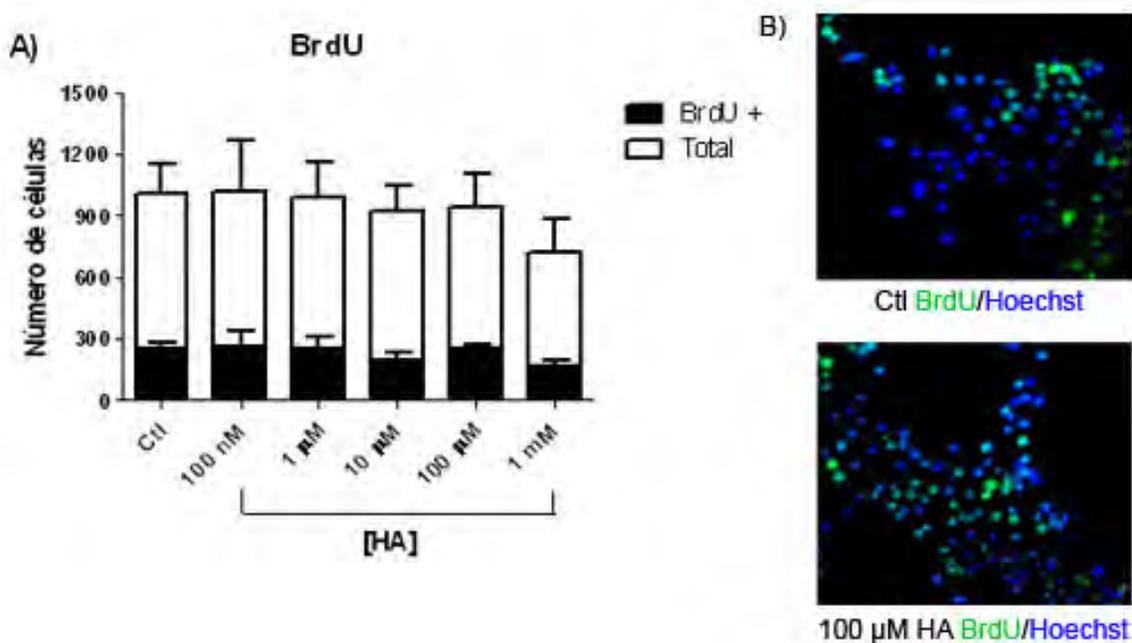


Figura 16. Efecto de la HA sobre la proliferación celular de cultivos no diferenciados. A) La gráfica muestra el número de células totales más las barras de error; n=4. B) Se muestran imágenes representativas (tomadas a 40x) de células positivas para BrdU (verde) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul).

Efecto de la histamina sobre la muerte celular

Para explorar si la HA ejerce algún efecto sobre el proceso de muerte celular, evaluamos apoptosis en cultivos indiferenciados realizando ensayos tipo TUNEL, el cual se basa en la incorporación de desoxiuridina (dUTP) fluoresceinada en el ADN fragmentado, característico de células apoptóticas. En general, los porcentajes de muerte celular son muy bajos, menor al 10%, y no se observa variabilidad significativa en ninguna condición con respecto al control (Fig. 17). Esto sugiere que la HA no tiene un efecto sobre la muerte celular tipo apoptótica en estas células.

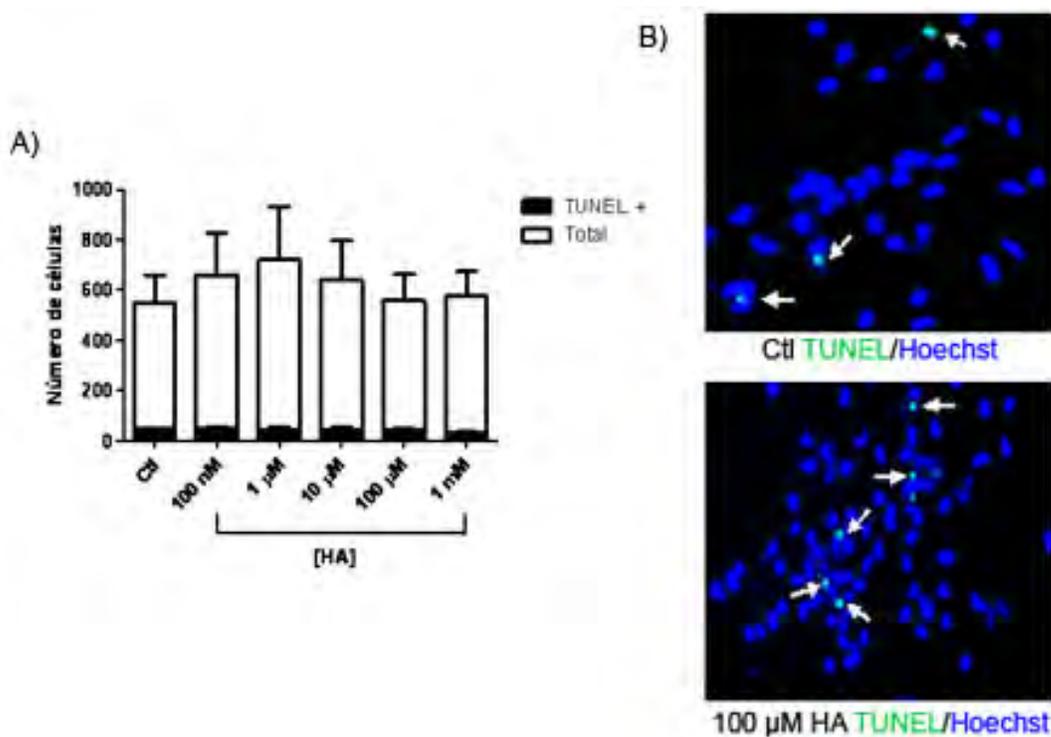


Figura 17. Efecto de la HA sobre la muerte celular de cultivos en etapa de proliferación. A) La gráfica muestra el número de células total y positivo para la marca de TUNEL con sus barras de error; n=3. B) Se muestran imágenes representativas de células positivas para TUNEL (verde) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul). Las flechas señalan células positivas para la marca de TUNEL.

CÉLULAS DIFERENCIADAS

Efecto de la histamina sobre la identidad celular

Para estudiar si la HA es capaz de modificar la identidad celular de los cultivos diferenciados (sin FGFb y con ácido ascórbico como antioxidante), se realizaron inmunocitoquímicas para evaluar la presencia de neuronas, utilizando anticuerpos para la detección de neuronas jóvenes (Tuj1) y neuronas maduras (MAP2). Se hicieron conteos celulares en 10 campos aleatorios de fotos tomadas a 40x de 3 experimentos independientes.

Se observó que la concentración de 10 μM de HA favorece la diferenciación neuronal, aumentando significativamente el porcentaje de células Tuj1+ con respecto a las condiciones control, de 21.56% al 37.72% (Fig. 18). Para el caso de las tinciones contra MAP2, se observa una tendencia a aumentar la proporción de neuronas maduras con las concentraciones de 10 μM y 100 μM de HA. Sin embargo, este aumento no tuvo diferencia estadísticamente con respecto al control (Fig. 18), posiblemente debido a que en este estadio los cultivos no están completamente diferenciados y las células aún no expresan este marcador neuronal, y todavía encontramos células positivas para nestina. Con el propósito de hacer un análisis más profundo y validar estos resultados, se evaluó mediante el uso de antagonistas si alguno de los receptores histaminérgicos estaba involucrado en estos cambios. Para ello, se dieron tratamientos diarios con 1 μM de clorfeniramina (antagonista del receptor H1), 30 μM de cimetidina (antagonista del receptor H2) y 1 μM de tioperamida (antagonista del receptor H3) o bien, una combinación de los tres antagonistas. Encontramos que tanto el receptor H1 como el receptor H2 están involucrados en la diferenciación neuronal observada con 10 μM de HA, ya que al bloquear los receptores H1 y H2 con clorfeniramina y cimetidina respectivamente, observamos disminución en el porcentaje de neuronas Tuj1+ obtenido (Fig. 19), por lo que la activación de estos receptores promueve un incremento en la diferenciación neuronal.

Por otro lado, al evaluar la diferenciación glial, no se observan diferencias significativas en ninguna concentración y en todos los casos, los porcentajes de diferenciación glial son menores que los obtenidos de diferenciación neuronal, lo cual indica que nuestros cultivos

se diferencian preferentemente hacia linajes neuronales, concordante con la edad del tejido con la que estamos trabajando (Fig. 20).

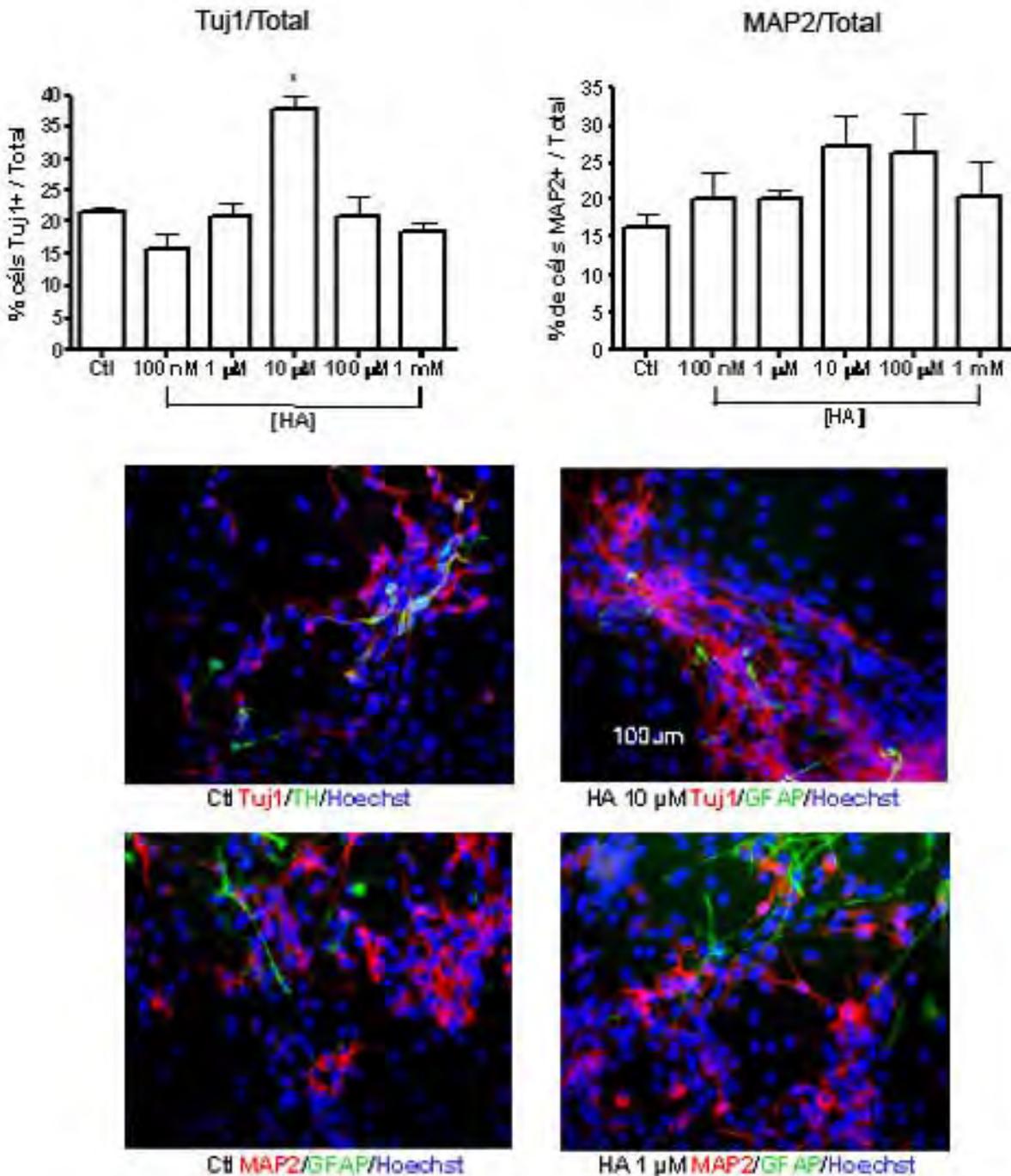


Figura 18. Efecto de la HA sobre la diferenciación neuronal y glial. Las gráficas muestran los porcentajes promedio de las células totales cuantificadas más las barras de error estándar. En la parte inferior se muestran imágenes representativas de los experimentos cuantificados; n=3.

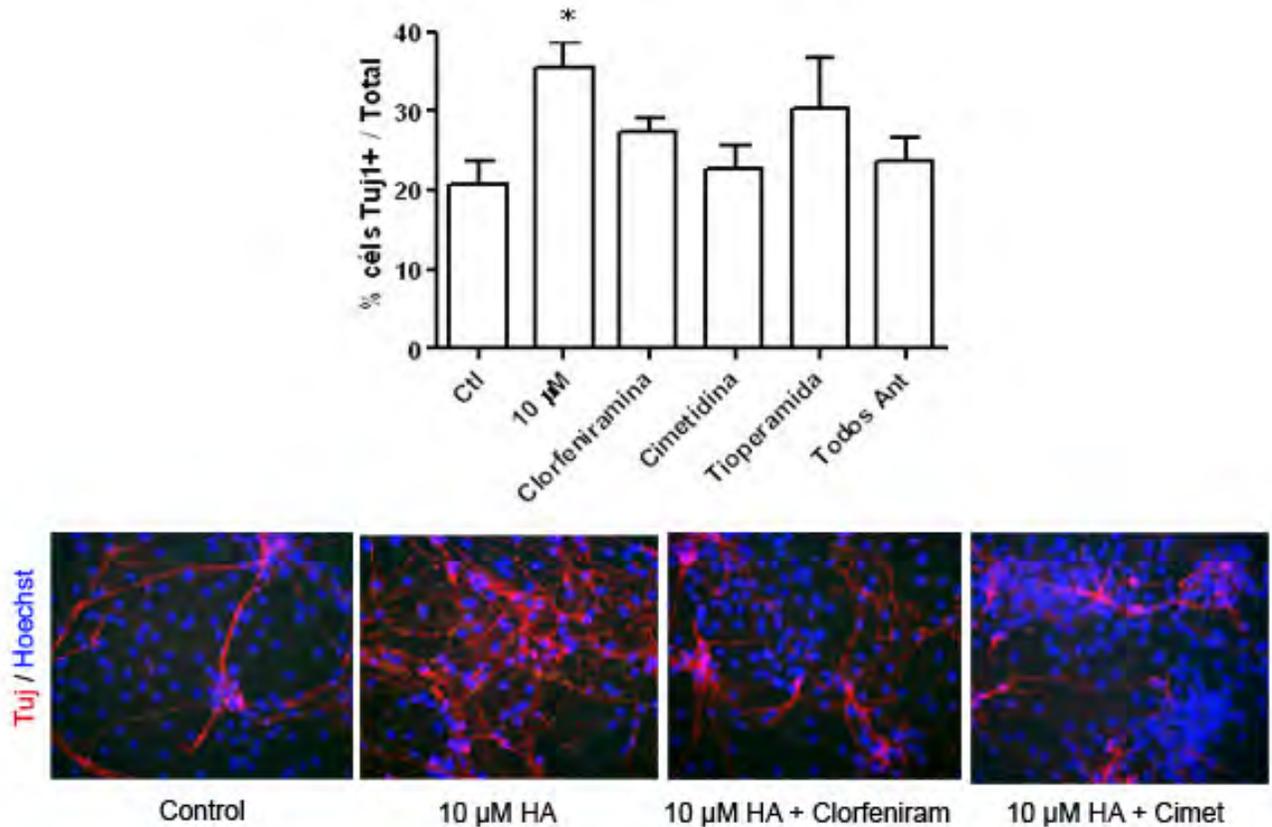


Figura 19. Análisis farmacológicos para evaluar el efecto de los antagonistas para los receptores histaminérgicos sobre la diferenciación neuronal. Gráfica e imágenes representativas (tomadas a 40x) de células positivas para Tuj1 (rojo) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul); n=3.

Con el propósito de caracterizar poblaciones neuronales específicas que se pueden diferenciar a partir de estos cultivos, se analizó el linaje dopaminérgico, mediante un anticuerpo para detectar tirosina hidroxilasa (TH), la enzima limitante en la síntesis de dopamina. Observamos que las concentraciones de 100 nM y 1 mM de HA, se disminuye a la mitad el porcentaje de neuronas positivas a TH (Fig. 20). También se observó que estas células presentan capacidad de diferenciación hacia linajes gabaérgico y serotoninérgico (no mostrado).

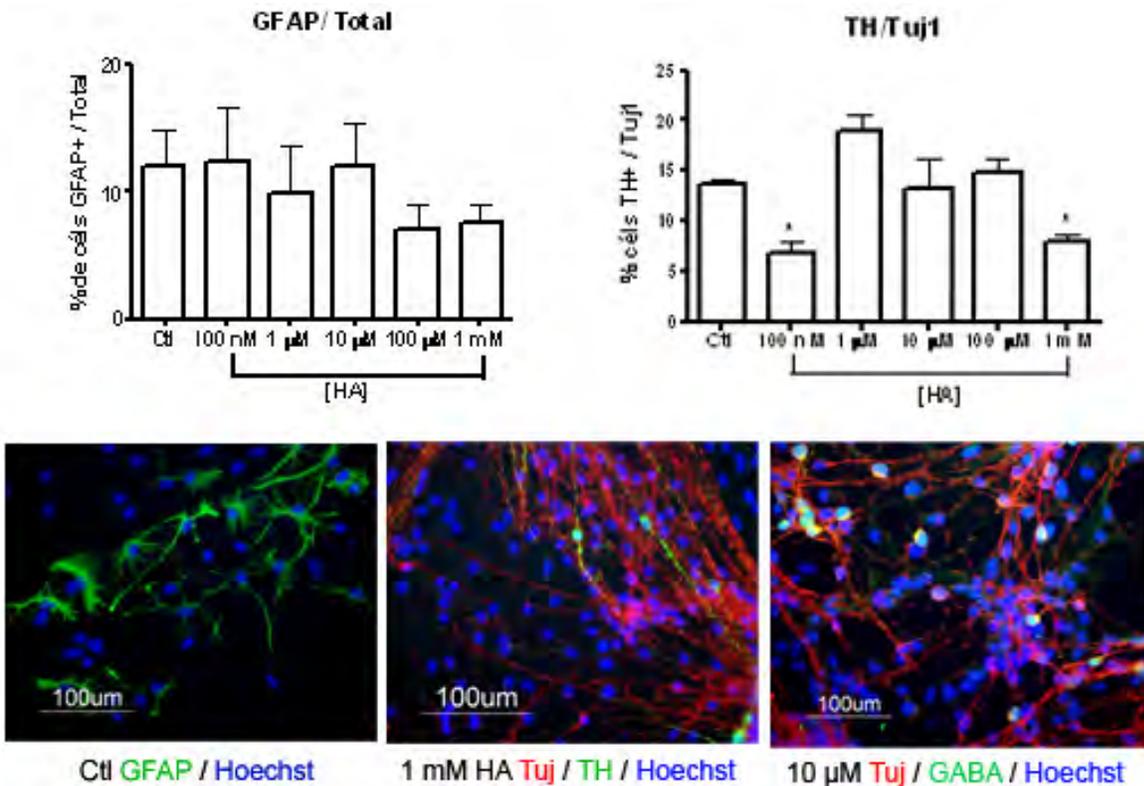


Figura 20. Efecto de la HA sobre la diferenciación hacia diversos linajes neurales. Se muestran imágenes representativas (tomadas a 40x) de células positivas para Tuj1 (rojo), TH, GABA, GFAP (verde) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul); n=3.

Efecto de la histamina sobre la muerte celular

A pesar de que durante la etapa de diferenciación se ve una disminución en la proporción de muerte celular apoptótica en la condición control (<4%) con respecto a la etapa de proliferación (>10%), en esta etapa todas las concentraciones de HA, a excepción de la concentración de 100 μM, incrementan los porcentajes de muerte celular de manera significativa con respecto al control (Fig. 21). Con el propósito de analizar a detalle el tipo de células positivas para la marca de TUNEL, se realizaron coinmunotinciones para MAP2, marcador de neuronas maduras, y en dos experimentos se observó que no existe colocalización de TUNEL con MAP2, lo que sugiere que la muerte celular se está dando en un tipo celular distinto a las neuronas maduras (Fig. 21). Para determinar la población celular sobre la cual se está dando la muerte celular, es necesario hacer inmunotinciones para detectar otros tipos celulares.

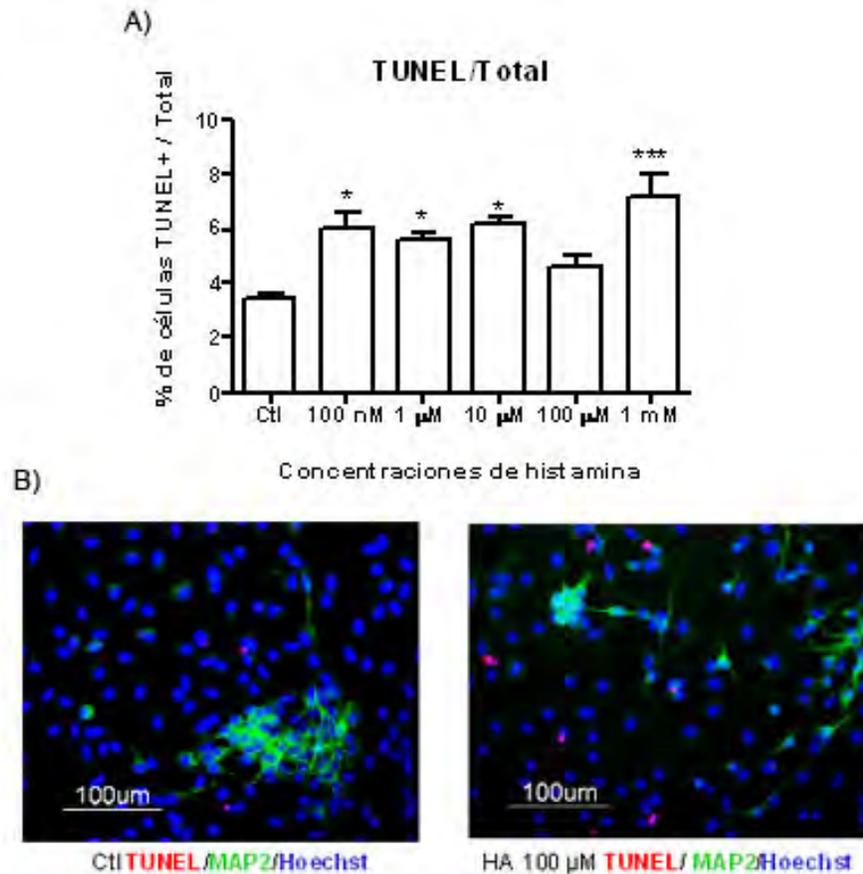


Figura 21. Efecto de la HA sobre la muerte celular de cultivos diferenciados. A) La gráfica muestra el promedio de los porcentajes obtenidos a partir de 2 experimentos realizados de manera independiente con sus respectivas barras de error. B) Se muestran imágenes representativas de células positivas para TUNEL (rojo), MAP2 (verde) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul).

EFFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS EN CÉLULAS DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA DE 12 DÍAS DE DESARROLLO EMBRIONARIO (E12).

Una vez que se corroboró la expresión de los tres receptores histaminérgicos en condiciones control, se examinó por RT-PCR su expresión en las etapas de proliferación y diferenciación en presencia de los tratamientos con concentraciones crecientes de HA. Se encontró que los tres receptores se expresan en todas las condiciones, aunque a diferente nivel, dependiendo de la concentración de HA con la que se trataron las células. Estos cambios se observan tanto en células no diferenciadas como en células diferenciadas (Fig. 22).

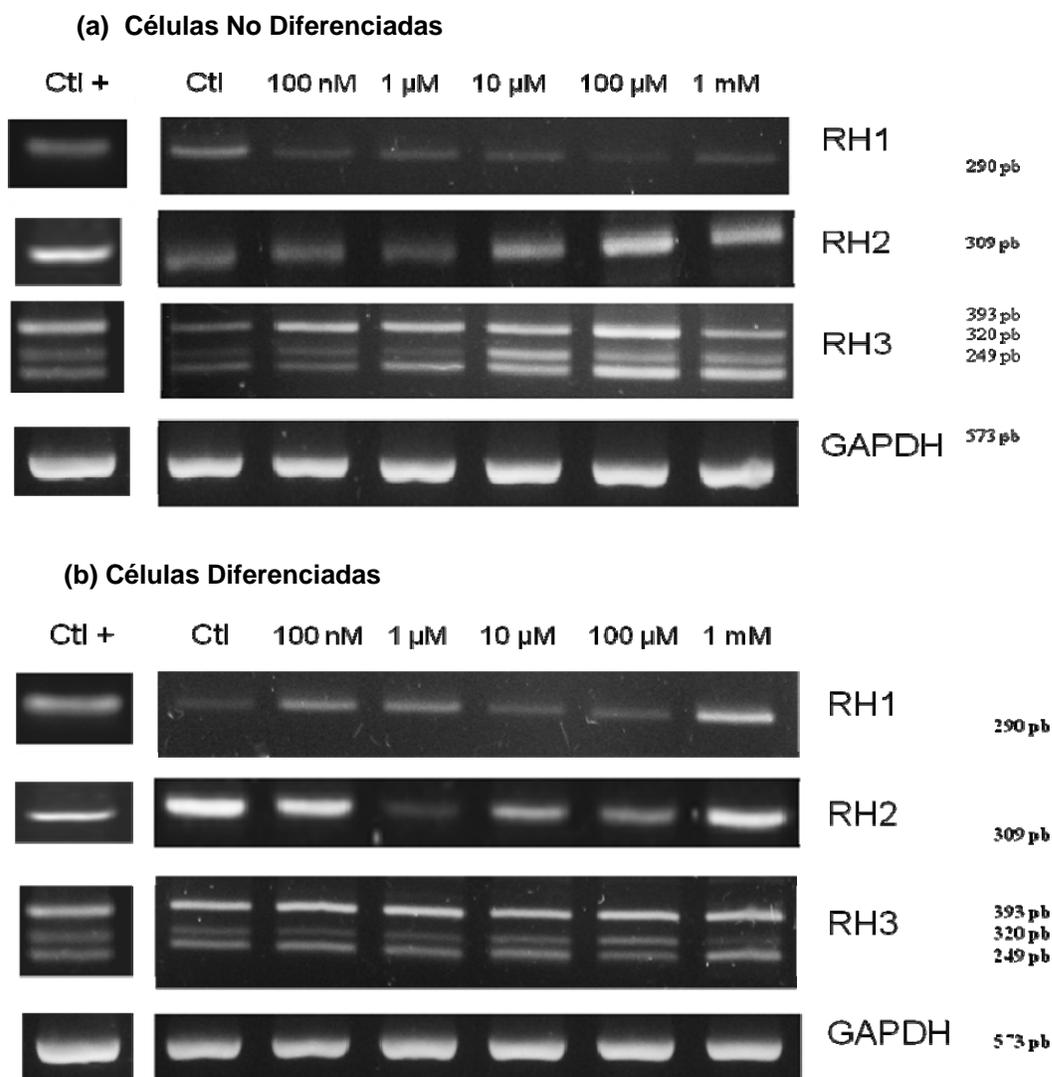


Figura 22. Efecto de la HA sobre la expresión de los receptores histaminérgicos H1, H2 y H3 tanto en células no diferenciadas (a) como en células diferenciadas (b) que fueron expuestas a tratamientos con diferentes concentraciones de histamina, así como el control de GAPDH. La banda del receptor H1 corresponde 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+) ADNc de corteza cerebral de rata adulta. Imágenes representativas de 3 experimentos.

EFFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DOPAMINÉRGICOS EN CÉLULAS DE MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA DE 12 DÍAS DE DESARROLLO EMBRIONARIO (E12).

Debido a que la formación más grande de neuronas DA se ubica en la región del mesencéfalo ventral, constituyendo el 75% de las neuronas dopaminérgicas del cerebro adulto, el último objetivo de este trabajo fue evaluar si los tratamientos con HA afectaban

la expresión de diversos marcadores dopaminérgicos AADC, DAT, En-1, Lmx1b y TH. La especificación de este linaje dopaminérgico depende de la activación de factores de transcripción como En1/2, Lmx1a/b, que llevan a la inducción neural y al posterior mantenimiento de las neuronas DA del mesencéfalo. Por otro lado, los marcadores AADC, DAT y TH, son esenciales para la diferenciación terminal, el metabolismo y transporte dopaminérgico.

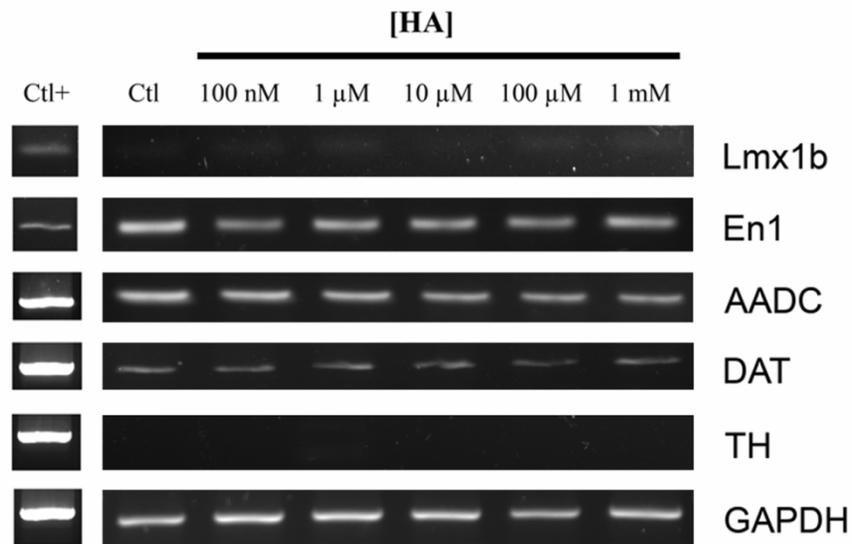
En la figura 23 se muestran los patrones de expresión obtenidos por RT-PCR para los marcadores mencionados. En los cultivos no diferenciados observamos que En-1 mantiene los mismos niveles de expresión con los diferentes tratamientos con HA, el cual efectivamente es un factor requerido para la especificación temprana del fenotipo neuronal dopaminérgico. Para el caso de Lmx1b, no observamos que se expresara en estos cultivos, a pesar de que es un marcador normalmente expresado en progenitores neurales, así como en neuronas inmaduras y maduras. También se expresaron tempranamente la AADC y DAT, lo cual se hubiera esperado preferentemente en la etapa de diferenciación. Finalmente, TH no se expresó en estos cultivos, corroborando la presencia de células indiferenciadas.

Para el caso de los cultivos diferenciados, observamos lo siguiente:

- Aquí sí se expresa Lmx1b
- Se mantiene la expresión de En-1 aunque a niveles menores que en las células no diferenciadas
- Aumenta la expresión de la AADC y se mantiene la expresión del DAT
- Se expresa TH

En todos los casos, observamos que en la concentración de 1 mM de HA, disminuyen los niveles de expresión de estos marcadores, lo cual correlaciona con los experimentos de inmunocitoquímica, en donde observamos que a esta concentración disminuye la proporción de neuronas dopaminérgicas obtenidas.

(a) Células No Diferenciadas



(b) Células Diferenciadas

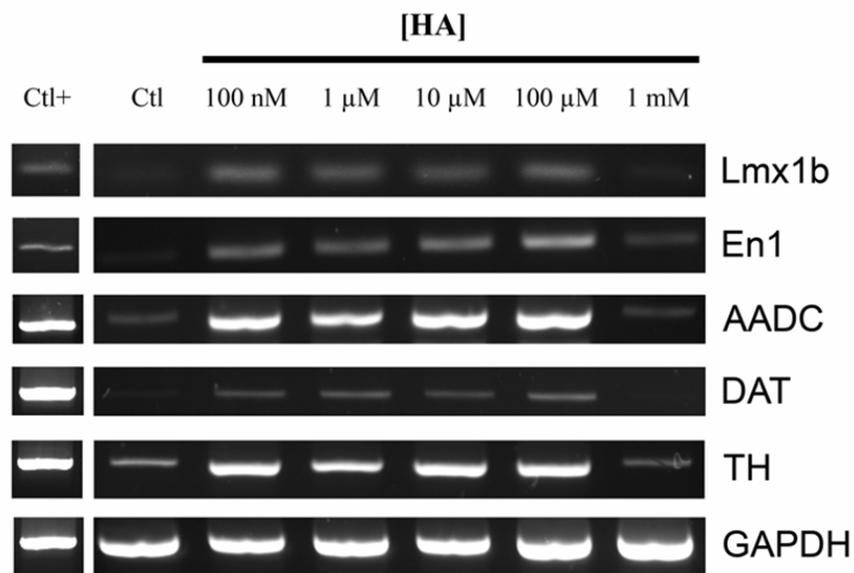


Figura 23. Efecto de la HA en la expresión de marcadores dopaminérgicos tanto en células no diferenciadas (a) como en células diferenciadas (b) que fueron expuestas a tratamientos con diferentes concentraciones de histamina, así como el control de GAPDH. Se usó como control positivo (Ctl+) ADNc de sustancia nigra de rata adulta.

DISCUSIÓN

Los diferentes tipos celulares que conforman el Sistema Nervioso Central, se originan en un tiempo determinado, que es característico de cada región y especie en particular. La capacidad de las células troncales neurales para generar diferentes tipos de neuronas y glía, depende de la acción de determinantes intrínsecos y de señales extracelulares, así como de la regulación precisa de los procesos de proliferación, migración, diferenciación y muerte celular.

De manera general, la diferenciación neuronal ocurre previa a la de células gliales. Se han realizado estudios *in vitro* en donde se ha visto que los precursores neurales derivados de la corteza y del mesencéfalo de embriones en estadíos tempranos, tienen un mayor potencial neurogénico, mientras que precursores derivados de embriones en estadíos más tardíos, presentan un mayor potencial gliogénico, específicamente hacia la diferenciación de astrocitos (Chang *et al.*, 2004). A partir de los resultados obtenidos hasta el momento, podemos decir que nuestros cultivos reproducen el curso temporal para la generación de neuronas y glía, lo cual sugiere que el método de cultivo utilizado en este trabajo mantiene las propiedades temporales de diferenciación de los precursores neurales obtenidos a partir de MesV. Esto fue corroborado en nuestro sistema, ya que a partir de cultivos de precursores neurales en su mayoría positivos a nestina (>90%), obtuvimos altos porcentajes de diferenciación neuronal (>20%), y bajos porcentajes de diferenciación glial (<10%), incluso con los tratamientos con HA.

Los análisis de proliferación y muerte celular en nuestros cultivos indiferenciados no mostraron cambios significativos en presencia de HA. Sin embargo, los porcentajes obtenidos de proliferación celular, corresponden a lo que ha sido observado en estudios *in vivo* para esta región del cerebro, donde para este día de desarrollo embrionario, se observa un porcentaje de proliferación del 32.6%, mientras que nosotros observamos un 36%. Con respecto a la muerte celular, también se ha reportado que los mayores procesos de muerte celular en esta región del cerebro se dan postnatalmente y no durante el desarrollo embrionario (Burke, 2003). Esto concuerda con

nuestros resultados en el sentido de que los niveles de TUNEL observados están por debajo del 10%, comparados con los reportados en la corteza cerebral en donde, en condiciones control, son aproximadamente del 22% y con la presencia de 1 mM de HA se incrementa a poco más del 35% (Molina-Hernández y Velasco, 2008). Otra observación interesante a este respecto es que a pesar de que en nuestros cultivos diferenciados observamos que la HA aumenta significativamente la muerte celular apoptótica, ésta no ocurre en las neuronas ni glía (astrocitos), ya que no observamos colocalización de las marcas de TUNEL y MAP2 ó GFAP. Por lo cual, sugerimos que la población que está siendo marcada con TUNEL son células no diferenciadas que aún expresan el marcador nestina, ya que hemos observado que en estos cultivos todavía se tienen altos porcentajes de células indiferenciadas (\approx 60%), por lo que estas células pudieran ser las que están pasando por un proceso de apoptosis, posiblemente con el objeto de definir el tamaño de la población celular final que se diferenciará a partir de estos cultivos. En este trabajo, la concentración más baja analizada de HA fue 100 nM, a partir de la cual obtuvimos diferencias significativas en muerte celular evaluada por TUNEL. Por ello, resulta de interés evaluar la muerte celular a concentraciones más bajas de HA y ver si a bajas concentraciones de HA se tiene una respuesta dependiente de la concentración.

En la etapa de diferenciación, hemos visto que por un lado, la concentración de 10 μ M de HA es capaz de incrementar la diferenciación neuronal de 21.56 a 37.72% con respecto al control, mientras que las concentraciones de 100 nM y 1 mM de HA producen una disminución en la proporción de células dopaminérgicas obtenidas en estos cultivos *in vitro*. Esto sugiere que los altos niveles de esta amina observados durante el desarrollo embrionario en la región del mesencéfalo están relacionados con el proceso de neurogénesis. En este trabajo se hizo un ensayo en donde se dieron tratamientos con HA sólo durante la etapa de proliferación ó sólo durante la etapa de diferenciación, y se evaluaron los fenotipos obtenidos a partir de estos cultivos (no mostrado). Aquí se vio que al parecer, la HA ejerce su mayor efecto sobre la diferenciación neuronal cuando se dan los tratamientos sólo en la etapa de diferenciación, ya que es así como obtuvimos una mayor proporción

de neuronas, incluso mayor, que dando los tratamientos durante las 2 etapas (41% con 10 μ M de HA).

Debido a que las curvas obtenidas de concentración respuesta fueron atípicas y con el objeto de hacer análisis más profundos para validar los resultados obtenidos, se realizaron análisis farmacológicos mediante el uso de antagonistas, en donde encontramos que la activación tanto del receptor H1 como el receptor H2 está involucrada en la diferenciación neuronal de células troncales derivadas de mesencéfalo ventral. Un posible mecanismo de acción mediante el cual la HA podría estar ejerciendo su función mediante la activación el receptor H1, podría ser por la modulación de niveles de Ca^{2+} intracelular. Aunque en otros estudios con células troncales se ha sugerido la producción del Ca^{2+} intracelular y su interacción con proteínas MAPK, por medio de la activación de receptores histaminérgicos, como un inductor de la proliferación celular, en este trabajo no encontramos efectos significativos de los tratamientos con HA sobre la proliferación celular. En otros sistemas como el serotoninérgico, se ha visto que variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular, es un mecanismo mediante el cual diversos receptores regulan la actividad de los conos de crecimiento variando la neuritogénesis, el crecimiento neuronal y de esta manera, regulando el proceso de neurogénesis (Meier et.al., 1991), lo cual pudiera estar ocurriendo en este sistema.

Con respecto a la activación del receptor H2, cuya vía de señalización está relacionada con la producción de AMPc, en otros sistemas se ha sugerido la acción de diferentes niveles de AMPc como posible regulador de la neurogénesis. Incluso, se ha visto que los canales de Ca^{2+} están asociados con la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), por lo que estos segundos mensajeros pudieran estar actuando en conjunto. Por lo cual, sería interesante analizar niveles de AMPc en nuestros cultivos.

Por otro lado, en la expresión de marcadores dopaminérgicos, observamos que en la etapa de proliferación no hubo cambios significativos en sus niveles de expresión. Encontramos una expresión temprana de los marcadores AADC y DAT. Sin embargo, el marcador Lmx1b no se expresó, a diferencia de la etapa de diferenciación, en donde vimos que ahora sí se expresó Lmx1b. Como lo mencionamos anteriormente, encontramos que en nuestros cultivos diferenciados tenemos una gran proporción de células

positivas para nestina, la cual pudiera ser responsable de la expresión de Lmx1b. Por otro lado, a pesar de que en los cultivos no diferenciados, en su mayoría también son positivos para el marcador nestina, suponemos que hay alguna influencia del FGFb y la HA en conjunto que no está permitiendo la expresión de este marcador. La expresión de TH no fue observada en la etapa de proliferación, y en la etapa de diferenciación se expresa en gran proporción.

En general, en todos los marcadores dopaminérgicos analizados que se expresan en la etapa de diferenciación, se ve una disminución en sus niveles de expresión en la concentración de 1 mM de HA, lo cual resulta muy interesante, ya que coincide lo anteriormente mencionado, que la HA ejerce sus efectos en la etapa de diferenciación y en esta concentración, en las inmunotinciones, también se observa una disminución del 50% en la proporción de neuronas dopaminérgicas con respecto al control, lo cual correlaciona con la disminución en la expresión de estos marcadores. Por otro lado, hay estudios en donde se ha reportado que la infusión directa de HA en sustancia nigra produce un daño selectivo sobre la población de neuronas dopaminérgicas, sugiriendo un efecto neurotóxico de la HA sobre esta población celular y en esa región en particular (Vizueté, *et.al.*, 2000). También ha sido reportado que en modelos de enfermedad de Parkinson originados por una lesión con 6-hidroxidopamina, la HA acelera la degeneración dopaminérgica producida por esta neurotoxina (Liu, *et. al.*, 2007). Estos datos sugieren que en nuestros cultivos, la HA a concentraciones milimolares, pudiera estar teniendo un efecto neurotóxico sobre la población dopaminérgica.

Con el paso de los años, se ha vuelto más claro que diversos neurotransmisores como las monoaminas y los aminoácidos GABA y glutamato están involucrados en el desarrollo y diferenciación de células neuronales y gliales, regulando acciones como la morfología celular, actividades enzimáticas, expresión de receptores y producción de segundos mensajeros. De manera general, en este trabajo, se ha visto que en los parámetros evaluados en los cultivos celulares (muerte, proliferación y diferenciación), los efectos de la HA se llevaron a cabo durante la etapa de diferenciación, por lo que sugerimos a la HA como un neurotransmisor involucrado en el desarrollo del SNC, regulando el proceso de neurogénesis durante la diferenciación de estas células.

PERSPECTIVAS

El protocolo de expansión y diferenciación neuronal a partir de cultivos de CTN de mesencéfalo ventral de embriones ratas E12 empleado 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 y marcadores dopaminérgicos analizados en estas etapas, lo cual nos brindó resultados interesantes que resultan herramientas muy útiles para llevar a cabo posteriores análisis como:

- Evaluar a nivel de segundos mensajeros (Ca^{2+} y AMPc) 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 receptor, y que los niveles de sus transcritos pueden regularse por el tratamiento con histamina.
- Realizar ensayos de *Western Blot* e inmunocitoquímicas para detectar receptores histaminérgicos y marcadores de diferenciación neuronal en cada condición.
- También es de interés para este proyecto realizar ensayos *ex vivo* mediante el cultivo de embriones completos, para evaluar de manera más directa la función y mecanismo de acción de la HA sobre la diferenciación neuronal en un sistema más cercano a las condiciones *in vivo*.

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.
- Agasse F, Bernardino L, Silva B, Ferreira R, Grade S y Malva JO. 2008. *Response to histamine allows the functional identification of neuronal progenitors, neurons, astrocytes, and immature cells in subventricular zone cell cultures*. *Rejuvenation Research*, 11(1): 187-200.
- Ang SL. 2006. *Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development*. *Development*, 133: 3499-3506.
- 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, Santa-Olalla J y 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.
- Burke, RE. 2003. *Postnatal developmental programmed cell death in dopamine neurons*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991: 69-79.
- 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.
- 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.
- 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 tuberomammillary 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.
- Hill SJ, Ganellin H, Timmerman JC, et. al. 1997. *International Union of Pharmacology. XIII: Classification of Histamine Receptors*. Pharmacological Reviews, 49(3): 253-278.
- Huszti Z, Rimanóczy A, Juhász A y Magyar K. 1990. *Uptake, metabolism, and release of [³H]-histamine by glial cells in primary cultures of chicken cerebral hemispheres*. Glia 3: 159-168.
- Huszti Z. 1998. *Carrier-mediated high affinity uptake system for histamine in astroglial and cerebral endothelial cells*. Journal of Neuroscience Research, 51: 551-558.
- Huszti Z. 2003. *Histamine uptake into non-neuronal brain cells*. Inflammation Research, 52(Suuplement 1): S03-S06.
- 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.

- Liu CQ, Chen Z, Liu FX, Hu DN y Luo JH. 2007. *Involvement of brain endogenous histamine in the degeneration of dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesioned rats*. *Neuropharmacology*, 53: 832-841.
- 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.
- Meier E, Hertz L y Schousboe A. 1991. *Neurotransmitters as developmental signals*. *Neurochemistry Internacional*, 19(1,2):1-15.
- Molina-Hernández A, Velasco I. 2008. *Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors*. *Journal of Neurochemistry*, : 1-12.
- Morrison SJ. 2001. *Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells*. *Current Opinion in Cell Biology*, 13: 666-672.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schwartz JC, Arrang JM, et al. 1991. *Histaminergic transmission in the mammalian brain*. *Physiology Review*, 71:1-51.
- Temple S. 2001. *The development of neural stem cells*. *Nature*, 414: 112-117.
- 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.
- Vizúete ML, Merino M, Venero JL, Santiago M, Cano J y Machado A. 2000. *Histamine infusion induces a selective dopaminergic neuronal death along with an inflammatory reaction in rat substantia nigra*. *Journal of Neurochemistry*, 75: 540-552.
- Wada H, Innagaki N, Yamatodani A y Watanabe T. 1991. *Is the histaminergic neuron system a regulatory center for the whole-brain activity?*. *Trends in neurosciences*, 14(9): 415-418.