



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LA HISTAMINA DURANTE LA  
DIFERENCIACIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS  
MESENCEFÁLICAS Y SU CORRELACIÓN CON LOS  
CAMBIOS EN LAS MARCAS EPIGENÉTICAS DEL ADN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

FERNANDA VARGAS ROMERO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ  
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MARZO DE 2015

Facultad de Medicina





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.

# CONTENIDO

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	1
II. RESUMEN / ABSTRACT.....	3
III. ANTECEDENTES.....	5
1. Desarrollo embrionario de mamíferos.....	5
1.1. Desarrollo del sistema nervioso central.....	7
1.2. Células troncales.....	9
1.2.1. Células troncales neurales.....	10
2. Formación del mesencéfalo.....	12
2.1 Neuronas dopaminérgicas.....	15
2.1.1. Especificación a linaje dopaminérgico.....	16
2.1.2. Diferenciación a linaje dopaminérgico.....	17
2.1.3. Formación de la vía nigro-estriatal.....	18
3. La histamina.....	21
3.1. Histamina en el sistema inmunológico.....	21
3.2. Histamina en el sistema nervioso central adulto.....	22
3.2.1. Distribución del sistema histaminérgico.....	22
3.2.2. Síntesis y metabolismo de la histamina.....	23
3.2.3. Los receptores histaminérgicos en el sistema nervioso central.....	25
3.3. Histamina durante el desarrollo del sistema nervioso central.....	27
3.3.1. Distribución de los receptores histaminérgicos.....	29
3.3.2. Efecto de la histamina sobre células troncales neurales corticales y de mesencéfalo ventral.....	31
4. El papel de la epigenética durante el desarrollo del cerebro.....	33
4.1. Metilación del ADN.....	34
4.2. Desmetilación del ADN.....	36
4.3. Las modificaciones postraduccionales de histonas.....	38

4.4. Modificaciones epigenéticas durante la diferenciación neuronal y glial.....	39
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	43
V. HIPÓTESIS.....	44
VI. OBJETIVO .....	44
1. Objetivo general.....	44
2. Objetivos particulares.....	44
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	46
1. Animales.....	46
2. Inyecciones intrauterinas.....	46
3. Histología.....	48
4. Inmunohistoquímicas.....	49
5. Extracción de ADN.....	50
6. Conversión por bisulfito y secuenciación.....	51
6.1. Conversión por bisulfito de sodio.....	51
6.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	52
6.3. Extracción de ADN a partir de fragmentos de un gel de agarosa.....	53
6.4. Ligación de fragmentos de ADN a un plásmido.....	54
6.5. Transformación de bacterias competentes por medio de choque térmico.....	56
6.6. Purificación de plásmidos de ADN por Miniprep.....	56
6.7. Identificación de fragmentos insertados en un plásmido a partir de digestiones enzimáticas.....	57
7. Inmunoprecipitación de ADN metilado e hidroximetilado.....	58
8. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo.....	61
9. Análisis estadístico.....	64
VIII. RESULTADOS.....	65

1. Los receptores histaminérgicos RH <sub>1</sub> y RH <sub>2</sub> se encuentran distribuídos a lo largo del desarrollo del mesencéfalo en la rata.....	65
2. La histamina ejerce su función en etapas tempranas durante la neurogénesis dopaminérgica en el mesencéfalo de la rata.....	68
3. La alteración que sufre la población dopaminérgica debida a un estímulo con histamina se mantiene a largo plazo y altera la formación de la vía nigro-estriatal.....	70
4. La histamina es capaz de cambiar los patrones de metilación y desmetilación en el adn de tejido mesencefalico de ratas de E14.....	72
IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	77
X. REFERENCIAS.....	85
XI. ANEXO.....	95

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

FIGURA 1. Representación de las primeras etapas de desarrollo embrionario en ratón.....	5
FIGURA 2. Esquematización de las primeras etapas del desarrollo embrionario.....	7
FIGURA 3. Derivados de la capa germinal ectodérmica.....	8
FIGURA 4. Proceso de neurulación y formación del tubo neural.....	9
FIGURA 5. Proceso de diferenciación de una célula totipotencial hacia células troncales que producen linajes neuronales y gliales.....	11
FIGURA 6. Proceso de diferenciación de las células troncales neurales a lo largo del desarrollo.....	12
FIGURA 7. Formación de las vesículas cerebrales.....	13
FIGURA 8. Etapas del proceso de la diferenciación de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas.....	14
FIGURA 9. Representación gráfica de la evolución temporal de la formación de la vía nigro-estriatal en rata.....	20
FIGURA 10. Distribución de las fibras de neuronas histaminérgicas a lo largo del cerebro en mamíferos.....	23
FIGURA 11. Síntesis y metabolismo de la histamina en el cerebro.....	24
FIGURA 12. Vías de señalización activadas por los receptores histaminérgicos en el sistema nervioso central.....	27
FIGURA 13. Representación de las curva de neurogénesis, gliogénesis y concentración de histamina a lo largo del desarrollo del cerebro.....	28
FIGURA 14. Hibridación <i>in situ</i> de los tres receptores histaminérgicos durante el desarrollo del cerebro de la rata.....	30
FIGURA 15. Efecto de la histamina sobre el desarrollo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.....	32

FIGURA 16. Mecanismo químico de la metilación en citosinas.....	35
FIGURA 17. Vía completa de la dinámica de modificaciones que existen en cistosas.....	37
FIGURA 18. Correlación de la presencia de 5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina y 5-carboxicitosina sobre la diferenciación neuronal y glial.....	41
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	
FIGURA 19. Proceso de inyección cerebral intrauterina.....	48
FIGURA 20. Reacción de bisulfito de sodio.....	51
FIGURA 21. Ejemplificación de una secuencia del ADN que se convirtió por medio de bisulfito de sodio.....	52
FIGURA 22. Estandarización de las temperaturas medias óptimas para amplificar las secuencias de los genes <i>Th</i> , <i>Oct4</i> y <i>Gapdh</i> convertidas por bisulfito de sodio.....	54
FIGURA 23. Ejemplificación de una digestión enzimática.....	58
FIGURA 24. Ejemplo de 4 muestras sonicadas.....	59
FIGURA 25. Eficiencia de anticuerpo por inmunoprecipitación con respecto a los controles internos.....	60
FIGURA 26. Estandarización de temperaturas medias para los oligonucleótidos usados durante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	62
FIGURA 27. Ejemplo de una gráfica obtenida a partir de una curva estándar de INPUT.....	64
<b>RESULTADOS</b>	
FIGURA 28. Expresión del RH <sub>1</sub> durante cuatro etapas representativas de la neurogénesis en mesencéfalo.....	66
FIGURA 29. Expresión del RH <sub>2</sub> durante cuatro etapas representativas de la neurogénesis en mesencéfalo.....	68
FIGURA 30. Expresión de tirosina hidroxilasa en cuatro diferentes etapas de la neurogénesis en mesencéfalo al inyectar	

intrauterinamente histamina.....	69
FIGURA 31. Análisis de la formación de la vía nigro-estriatal al inyectar histamina en etapas tempranas de la neurogénesis dopaminérgica.....	71
FIGURA 32. Análisis de modificaciones de citosinas en un fragmento del gen de <i>Th</i> a través de bisulfito de sodio y secuenciación.....	73
FIGURA 33. Análisis de modificaciones de citosinas en el enhancer proximal del gen de <i>Oct4</i> a través de bisulfito de sodio y secuenciación.....	74
FIGURA 34. Efecto de la histamina sobre los porcentajes de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en tres genes en E14.....	75

# ÍNDICE DE TABLAS

## INTRODUCCIÓN

TABLA 1. Localización y niveles de expresión de los receptores histaminérgicos durante el desarrollo del sistema nervioso central.....	30
--	----

## DISEÑO EXPERIMENTAL

TABLA 2. Anticuerpos primarios usados para inmunohistoquímicas.....	49
TABLA 3. Anticuerpos secundarios usados para inmunohistoquímicas.....	50
TABLA 4. Oligonucleótidos usados para la reacción en cadena de la polimerasa después de un tratamiento por bisulfito de sodio.....	52
TABLA 5. Diseño experimental para realizar la reacción en cadena de la polimerasa.....	53
TABLA 6. Diseño experimental para realizar la reacción de ligación.....	55
TABLA 7. Diseño experimental para la digestión enzimática.....	57
TABLA 8. Diseño experimental para realizar la mezcla de inmunoprecipitación.....	59
TABLA 9. Anticuerpos usados para el inmunoprecipitación de ADN metilado e hidroximetilado.....	60
TABLA 10. Preparación de anticuerpos para la inmunoprecipitación.....	61
TABLA 11. Oligonucleótidos usados para analizar las inmunoprecipitaciones de ADN metilado e hidroximetilado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	62
TABLA 12. Diseño experimental para realizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	63

# I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5caC	5-carboxilcitosina	H3K27me3	trimetilación de la lisina 27 de la histona 3
5hmC	5-hidroximetilcitosina		
5hmU	5-hidroximetiluracilo	HA	histamina
5fC	5-formilcitosina	HDC	histidina descarboxilasa
5mC	5-metilcitosina	hMeDIP	inmunoprecipitación de ADN hidroximetilado
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -cetoglutarato		
AC	adenilato ciclasa	ICG	isla CpG
ADN	ácido desoxiribonucleico	IP	inmunoprecipitación
AMPc	AMP cíclico	IP <sub>3</sub>	inositol trifosfato
ARNm	ARN mensajero	L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
BSA	albúmina sérica bovina	MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
CT	umbral de ciclo		
CTN	células troncales neurales	MAP2	proteína asociada a microtubulos 2
CTPN	células troncales/ progenitoras neurales	MBP	proteínas de unión a ADN metilado
CPN	progenitores neurales		
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc	MCI	masa celular interna
		mDA	mesencefálicas dopaminérgicas
DA	dopamina	MeDIP	inmunoprecipitación de ADN metilado
DAG	diacil glicerol		
DNMT	ADN metiltransferasa	meDNA	control de ADN metilado
E	día embrionario	Mes	mesencéfalo
EA	eficiencia de amplificación	MV	mesencéfalo ventral
EP	enfermedad de Parkinson	NF- $\kappa$ B	factor nuclear kappa B
GFAP	proteína acidica fibrilar glial	P	postnatal
GMPC	GMP cíclico	PcG	grupos policomb
H3K4me3	trimetilación de la lisina 4 de la histona 3	PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PLC	fosfolipasa C
qPCR	PCR cuantitativo
RHs	receptores histaminérgicos
RH <sub>1</sub>	receptor histaminérgico 1
RH <sub>2</sub>	receptor histaminérgico 2
RH <sub>3</sub>	receptor histaminérgico 3
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SAM	S-adenosil-L-metionina
rpm	revoluciones por minuto
Shh	Sonic hedgehog
SN	sustancia nigra
SN-ST	nigroestriatal
SNC	sistema nervioso central
SNCa	suero normal de cabra
ST	estriado
TH	tirosina hidroxilasa
Tm	temperatura media
unDNA	control de ADN no metilado
VMAT	transportador vesicular de monoaminas

## II. RESUMEN

Durante la formación del mesencéfalo (Mes), la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas ocurre durante los días 9 al 15 de desarrollo embrionario (E) de la rata. Durante este proceso, la regulación de las marcas epigenéticas en las histonas y en el ADN es esencial para la expresión de genes asociados al fenotipo dopaminérgico. El proceso de la desmetilación del ADN juega un papel importante durante la neurogénesis, ya que un aumento de la marca de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) se ha relacionado con la activación transcripcional de los genes neuronales. La histamina (HA) presenta un incremento transitorio entre E14-E16 en el Mes y se ha reportado mediante hibridación *in situ* la expresión de los tres receptores histaminérgicos (RH) en esta región. Recientemente se demostró que la inyección de HA en E12 disminuye el número de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. En este trabajo se analizó la expresión de RH<sub>1</sub> y RH<sub>2</sub> en progenitores neurales y neuronas del Mes. Se realizaron inyecciones intrauterinas con HA en el Mes a distintos días (E10, E12, E14 y E16) y se encontró que solamente los embriones inyectados en E10 y E12 tuvieron una disminución de la población dopaminérgica mesencefálica, sugiriendo que la HA ejerce sus efectos sobre progenitores neurales dopaminérgicos. A nivel epigenético se observó que la HA inyectada en E12 disminuyó las marcas de metilación (5mC) y desmetilación (5hmC) en el exón 1 de *Th* (gen que codifica para la enzima limitante en la síntesis de dopamina), en comparación con el control. Sin embargo, en el enhancer proximal de *Oct4*, un gen no dopaminérgico, la marca de 5mC también disminuyó después de la inyección de HA. Finalmente, se observó un efecto a largo plazo en el sistema dopaminérgico, ya que cuando se administró HA en E12 hubo una disminución notable de las fibras positivas a tirosina hidroxilasa durante la formación de la vía nigro-estriatal, 6 días después de la inyección. Estos resultados en conjunto nos ayudarán a entender los efectos de la HA en la regulación de la diferenciación dopaminérgica, lo que podría ser de utilidad para diseñar estrategias para contender con la degeneración de neuronas dopaminérgicas, responsable de la enfermedad de Parkinson.

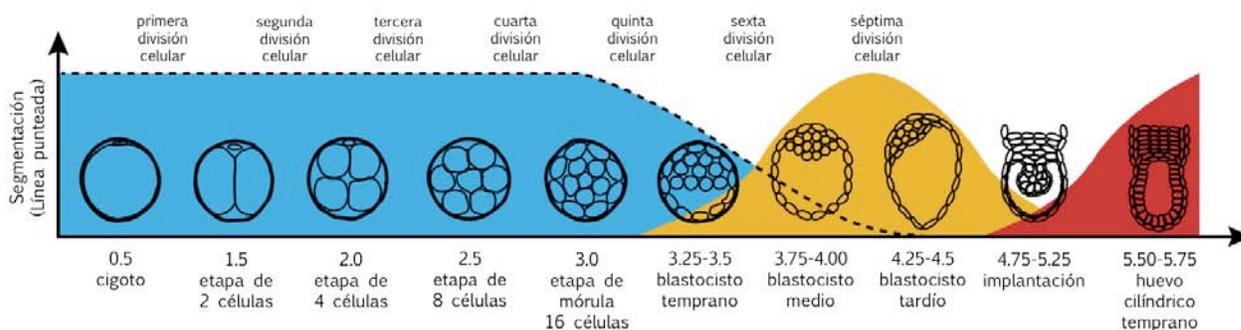
## II. ABSTRACT

During midbrain (MB) formation, dopaminergic neuron (nDA) differentiation occurs between embryonic days (E) 9 to 15 in rat. During this process, the regulation of epigenetic marks in histones and in DNA are essential for the expression of genes associated to dopaminergic phenotype. The DNA demethylation process has an important role during neurogenesis since an increase of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) has been associated with transcriptional activation of neuronal genes. Histamine (HA) presents a transient increase between E14-E16 in MB and it has been reported by *in situ* hybridization, the expression of the three histaminergic receptors (HR) in this region. Recently, it was demonstrated that an injection with HA in E12 decreases the number of mesencephalic nDA. In this work, it was analyzed the expression of HR<sub>1</sub> and HR<sub>2</sub> in mesencephalic neural progenitors and neurons. On the other hand, we administered HA by *in utero* injections at different stages in MB (E10, E12, E14 and E16) and we found that only embryos injected at E10 and E12 had a decrease in nDA population, suggesting that HA exerts its effects on mesencephalic progenitor cells. At the epigenetic level, we observed that HA injected at E12 was able to decrease methylation (5mC) and demethylation marks (5hmC) at exon 1 on *Th*, (gene coding for the rate-limiting enzyme for dopamine synthesis). Nevertheless, at in proximal enhancer of *Oct4*, a non-dopaminergic gene, the 5mC mark was also decrease after HA injection. Finally, we found that HA could have a long-term effect on the dopaminergic system, since the administration of HA at E12 decrease neuronal fibers positive to tyrosine hydroxylase during formation of nigrostriatal pathway, 6 days after the injection. These findings will help us to understand the effects of HA during regulation of nDA differentiation and to design strategies to contend with nDA degeneration, responsible for Parkinson's disease.

### III. ANTECEDENTES

#### 1. DESARROLLO EMBRIONARIO DE MAMÍFEROS

Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de los mamíferos, un evento importante es la segmentación celular, la cual ocurre de manera meridional y ecuatorial a partir de un óvulo fertilizado (Gilbert, 2013). A partir del momento en que se llega a la etapa de 8 células compactas, empiezan a activarse genes característicos de células totipotentes y pluripotentes. Al llegar a la etapa de 16 células, el genoma de cada célula estará hipometilado, teniendo células con característica de pluripotencia (Gilbert, 2013). A partir de esta etapa, las células están listas para diferenciarse hacia los diferentes tejidos que formarán al embrión (Gilbert, 2013; Guo et al., 2014; Kohli y Zhang, 2013; Smith et al., 2014; Wang et al., 2014) y se dará la formación de la mórula, la cual generará dos principales grupos celulares (FIG. 1):



**FIGURA 1. Representación de las primeras etapas de desarrollo embrionario en ratón.** El estadio embrionario en cada etapa está dado en días. En azul se muestra la segmentación que presentan las células a partir de un óvulo fertilizado. En amarillo se muestra la etapa de blastocisto. En rojo la formación del epiblasto. Modificado de Boroviak y Nichols, 2014.

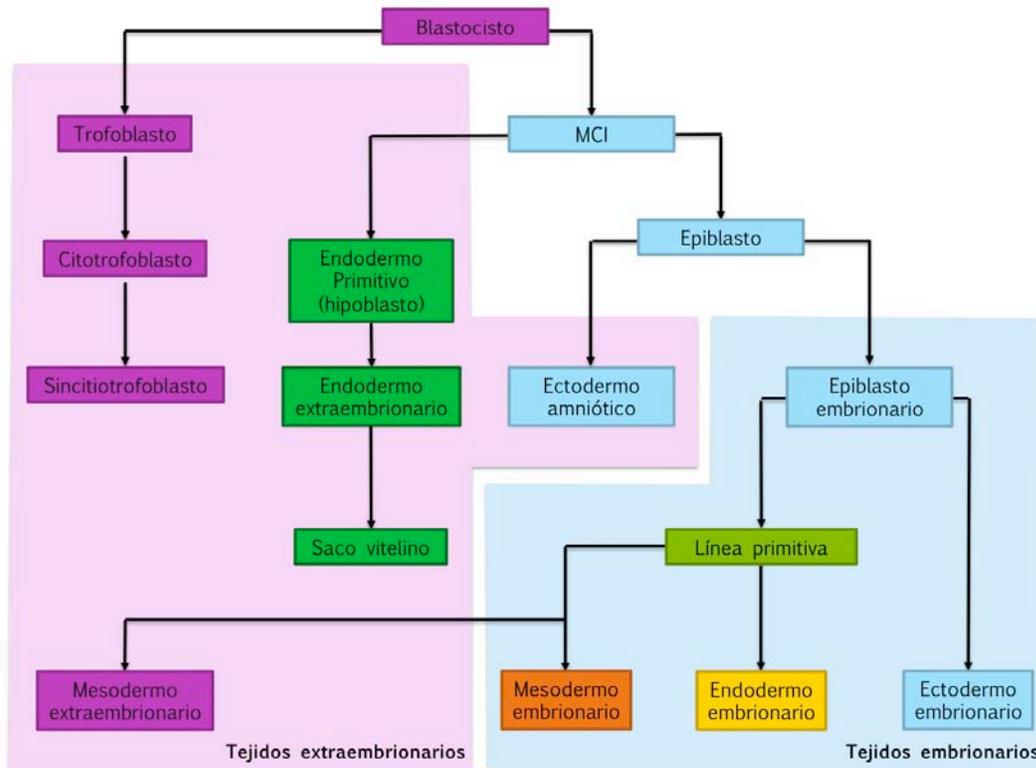
1. Un grupo pequeño de células en el interior que darán lugar a la masa celular interna (MCI), que durante la formación del blastocisto generará los diferentes linajes que constituyen al embrión.

2. Un grupo grande de células externas que se convertirán en el trofoblasto, el cual dará lugar al corion y la placenta, las cuales proveerán al feto de oxígeno y nutrientes provenientes de la madre.

Una vez que se dan estas etapas de la división celular, se lleva a cabo la gastrulación. Durante ésta etapa, las células mesodermales en desarrollo migran a través de la línea primitiva para llegar al interior del embrión en formación. La primera segmentación de células dentro de la MCI forma dos capas: el endodermo primitivo y el epiblasto. La gastrulación comienza en el extremo posterior del embrión, en donde surgen las células del nodo.

Durante el desarrollo, la formación de la línea primitiva, la cual se ubica a lo largo del eje antero-posterior del embrión, dará origen al mesodermo y al endodermo, mientras que los precursores ectodermales se formarán a partir de las células que se encuentran de manera anterior y lateral a la línea primitiva. Las células que se encuentran en el nodo, darán lugar a la notocorda (Gilbert, 2013; Sadler, 2005). El embrión de los mamíferos tiene dos centros de señalización: uno en el nodo y otro en el endodermo visceral anterior. Los centros en conjunto trabajan para formar los patrones anteriores del embrión.

Al final de la gastrulación, se formará la cabeza y las estructuras anteriores del embrión. Posteriormente, la formación del resto de los órganos se dará a través de la diferenciación de células del epiblasto caudal alrededor del nodo posterior (**FIG. 2**).

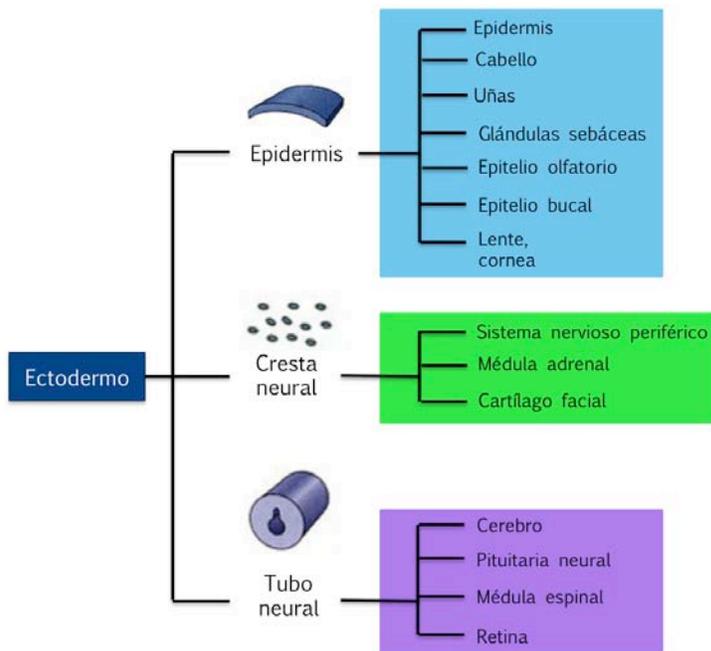


**FIGURA 2. Esquematación de las primeras etapas del desarrollo embrionario.** En rosa se muestra la formación de tejido extraembrionario el cuál proveerá al embrión de los nutrientes necesarios para su crecimiento. En azul se ejemplifica la formación de las tres capas embrionarias, las cuales darán origen a los tejidos del organismo. Modificado de Gilbert, 2013.

## 1.1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Durante la formación del embrión, una de las tres capas germinales: el ectodermo, la cual es la capa externa que cubre a la gastrula tardía, formará tres regiones principales (FIG. 3):

1. La epidermis
2. La placa neural, la cual posteriormente involucrará para formar el tubo neural, precursor del sistema nervioso central (SNC).
3. Y entre la epidermis y el SNC se formará la cresta neural, la cual formará el sistema nervioso periférico y los melanocitos.

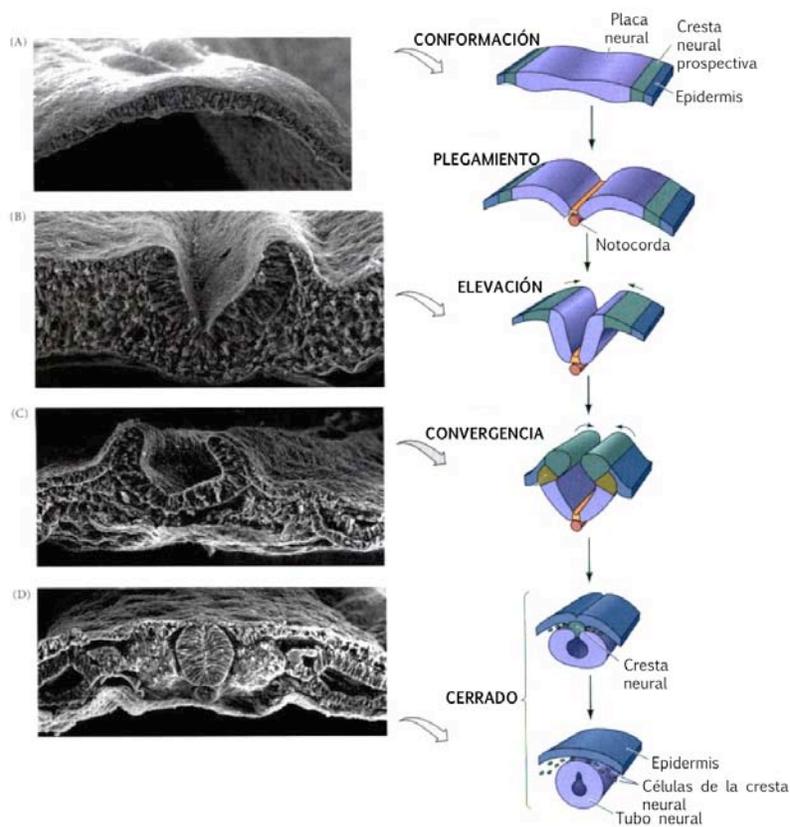


**FIGURA 3. Derivados de la capa germinal ectodérmica.** Se dividen principalmente en tres: la epidermis, la cresta neural (que formará el sistema nervioso periférico, cartílago facial y médula adrenal) y el tubo neural (que formará el cerebro y la médula espinal). Modificado de Gilbert, 2013.

Las células de la placa neural se caracterizan por expresar a la familia de los factores de transcripción SOX (SOX1, 2 y 3), los cuales activan genes que especifican a las células que forman parte de la placa neural e inhiben la formación de la epidermis y la cresta neural al bloquear la expresión de factores de transcripción específicos de estas regiones. La expresión de esta familia de factores de transcripción compromete a las células de la placa neural a ser precursoras neurales, las cuales formarán todos los tipos celulares del SNC.

La placa neural se encuentra en la superficie del embrión. Por lo tanto, durante la formación del tubo neural, debe incorporarse hacia el interior del embrión. Este proceso se acompaña de la neurulación, la cual consiste en la proliferación de las células de la placa neural dirigidas por las células que las rodean. Mediante la participación de la notocorda, las células de esta placa recibirán señales inductoras para que esta región se invagine por la línea media de la misma, separándose de la superficie y elevando los bordes laterales, teniendo como resultado el origen de los pliegues neurales. A partir de la coalescencia de las células del mesénquima se formarán cavidades que se unen

para crear el tubo neural. Durante la fusión del tubo neural, un grupo de células del neuroectodermo más dorsal se separarán para formar las crestas neurales; mientras que las células ectodermales que no siguen el programa de diferenciación neural, darán origen a la epidermis (**FIG. 4**; Gilbert, 2013; Massarwa et al., 2014; Sadler, 2005; Smith y Schoenwolf, 1997; Wilde et al., 2014). Durante este proceso también se dará la formación del eje antero-posterior y una vez formado el tubo neural, durante el desarrollo de éste se dará el establecimiento del eje dorso-ventral (Sadler, 2005; Simon et al., 2003).



**FIGURA 4. Proceso de neurulación y formación del tubo neural.** El tubo neural se forma a partir de la placa neural, la cual a partir de la notocorda y las células aledañas de la misma, se invaginará formando así tres principales regiones: la epidermis, la cresta neural y el tubo neural. Modificado de Gilbert, 2013.

## 1.2. CÉLULAS TRONCALES

Durante la organogénesis temprana se requiere de la coordinación de las interacciones de diferentes partes del embrión. Algunas de estas interacciones crean sitios privilegiados de nichos de células troncales. Estos nichos proveen al medio de moléculas de matriz extracelular, factores yuxtacrinos y paracrinos que

permiten a las células permanecer indiferenciadas y su presencia es crítica para la formación de tejidos especializados (Gilbert, 2013).

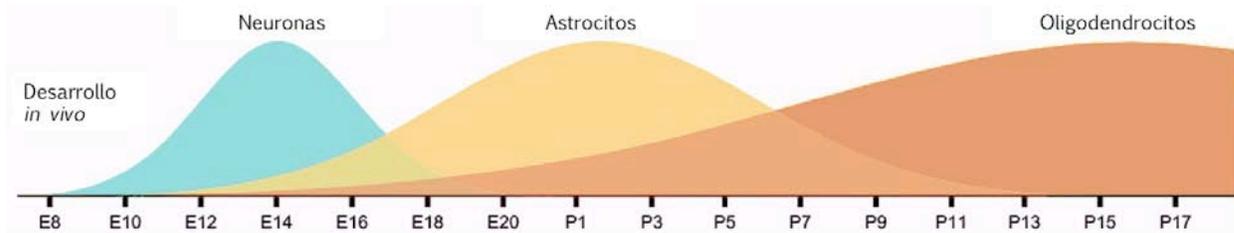
Las células troncales se definen como células inmaduras, no diferenciadas, con una alta capacidad de autorreplicación y que pueden diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo. Las células troncales juegan un papel importante durante el desarrollo embrionario, ya que sitúan el inicio de los linajes que componen los tejidos de dicho embrión (Gilbert, 2013; Mayani H. de Pelayo et al., 2011).

A lo largo del desarrollo de los mamíferos se generan diversos tipos de células troncales. El óvulo fertilizado, o cigoto, se define como una célula totipotencial, capaz de producir tejido embrionario así como tejido extraembrionario. Hasta el estadio de mórula, cada célula es idéntica a las otras. Conforme avanza el desarrollo, el embrión alcanza el estadio de blastocisto, en el que cada una de las células que forma parte de la MCI es capaz de formar células de cualquier tejido del organismo. De manera *in vitro*, se ha demostrado que células extraídas de la MCI se distinguen por la incapacidad de dar origen a las estructuras extraembrionarias; sin embargo mantienen su capacidad de autorenovación, por esta razón se les considera células troncales pluripotenciales (**FIG. 5**; Mayani H. de Pelayo et al., 2011).

### **1.2.1. CÉLULAS TRONCALES NEURALES**

En la mayoría de los tejidos, entre las células troncales y su progenie totalmente diferenciada, existen poblaciones intermedias de células progenitoras/precursoras, las cuales poseen una capacidad proliferativa limitada y un restringido potencial de diferenciación (Gage, 2000; Götz y Huttner, 2005; Mayani H. de Pelayo et al., 2011). Estas poblaciones son consideradas como células troncales multipotenciales, ya que pueden generar diversos linajes celulares dentro de un mismo tejido. Dentro de estas poblaciones se encuentran las células troncales neurales (CTN; **FIG. 5**), las cuales darán lugar a todas las





**FIGURA 6. Proceso de diferenciación de las células troncales neurales a lo largo del desarrollo.** La generación de los tres linajes dentro del cerebro ocurren en secuencia y temporalmente durante el desarrollo del cerebro. En ratas, el momento de mayor neurogénesis se da en E14, de astrocitogénesis en P2 y de oligodendrogénesis en P14. Modificado de Sauvageot y Stiles, 2002.

Algunos factores transcripcionales encargados de generar este cambio entre linaje neuronal a glial son MASH1 y NGN1/2, en donde se ha visto que ratones con una mutación sencilla de *Mash1*, *Ngn1* o *Ngn2*, presentan defectos en la diferenciación neuronal y como compensación, existe una diferenciación prematura de astrocitos en diferentes regiones del cerebro (Bertrand et al., 2002; Sauvageot y Stiles, 2002).

## 2. FORMACIÓN DEL MESENCÉFALO

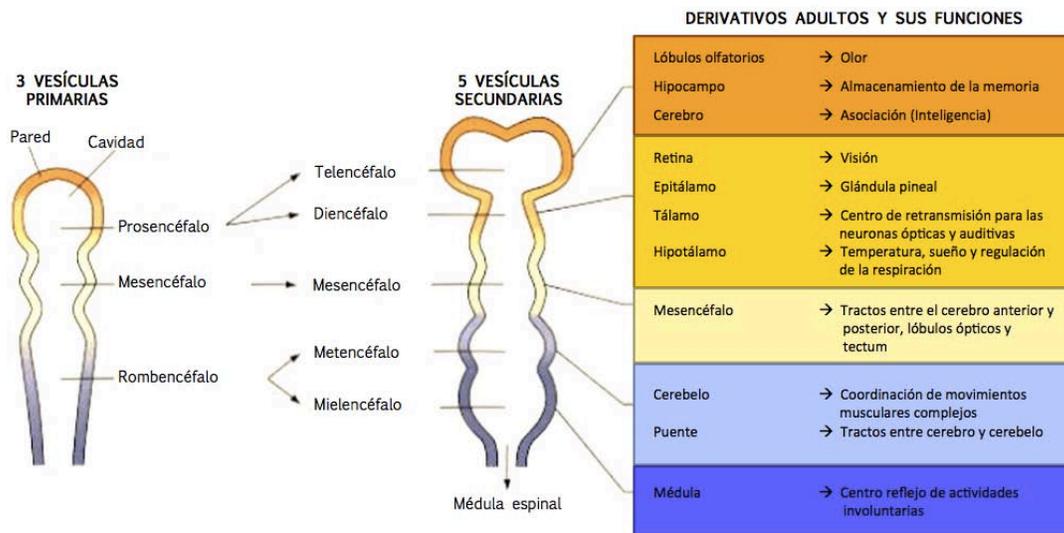
Para la formación del cerebro se necesita de procesos altamente regulados y coordinados que permitan, de manera organizada, la formación de las regiones más primitivas que posteriormente darán lugar a las regiones más especializadas del cerebro (Gilbert, 2013).

La diferenciación del tubo neural hacia diferentes regiones del cerebro y la médula espinal ocurre de manera simultánea a tres niveles diferentes:

1. Nivel anatómico: en donde el tubo neural y el lumen se contraen y protruyen para formar las cavidades del cerebro y la médula espinal.
2. Nivel tisular: donde las poblaciones de las paredes del tubo se arreglan de tal manera que forman regiones funcionales diferentes en el cerebro.
3. Nivel celular: donde las células neuroepiteliales se diferencian a diversos tipos neuronales y células gliales.

Al inicio del desarrollo del cerebro, el tubo neural se encuentra como un tubo lineal. Sin embargo, justo antes de que el extremo posterior de esta estructura se cierre, el extremo anterior presenta cambios drásticos (Gilbert, 2013; Massarwa et al., 2014; Sadler, 2005). Los primeros cambios que se dan es la formación de las tres vesículas primarias:

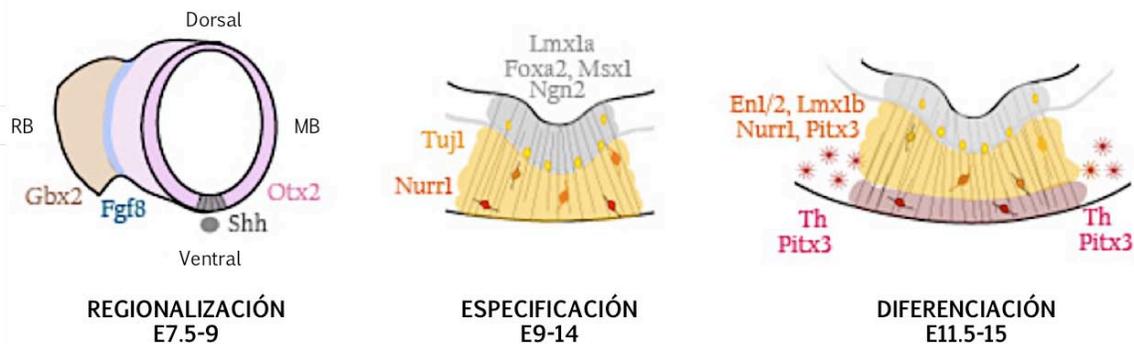
1. Prosencéfalo. La cual formará los hemisferios cerebrales.
2. Mesencéfalo (Mes). En donde se formarán estructuras específicas como el núcleo rojo y la sustancia negra.
3. Romboencéfalo. Que dará lugar al cerebelo y a la médula oblongata.



**FIGURA 7. Formación de las vesículas cerebrales.** Después de la formación del tubo neural, la región anterior del cerebro forma las tres vesículas primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Posteriormente estas vesículas se subdividen conforme el cerebro se desarrolla, formando las cinco vesículas secundarias y posteriormente las regiones más especializadas que se encuentran en el cerebro adulto. Modificado de Gilbert, 2013.

Cuando el extremo posterior del tubo neural se cierra, al mismo tiempo en el extremo anterior se formarán las vesículas secundarias. El prosencéfalo se convierte en telencéfalo y diencefalo. El rombencéfalo desarrollará los patrones segmentarios que especificará las regiones donde se originarán nervios determinados (Gilbert, 2013). Y el Mes no se subdividirá en otras vesículas y continuará su desarrollo en regiones más específicas (FIG. 7).

La regionalización del Mes (**FIG. 8**) se inicia por el posicionamiento de centros de señalización, los cuales se encuentran: 1) en la línea media de la región ventral del tubo neural en formación el cual definirá el sistema de desarrollo de neuronas ventrales y 2) en la frontera entre Mes y rombencéfalo (llamado organizador ístmico), el cual establecerá la identidad regional de manera antero-posterior, estableciendo fronteras que definen el destino celular entre el Mes y el rombencéfalo (Abeliovich y Hammond, 2007; Gale y Li, 2008). Las distintas regiones en el eje antero-posterior se establece en E7.5 durante el desarrollo del ratón, principalmente por la presencia de FGF8 y la interacción co-represiva de *Otx2* el cual se expresa en Mes y *Gbx2* que se expresa en rombencéfalo. De esta manera se delimitarán las fronteras entre ambas regiones en E9.5 (Abeliovich y Hammond, 2007; Gale y Li, 2008; Hidalgo-Sánchez et al., 1999; Martinez-Barbera et al., 2001).



**FIGURA 8. Etapas del proceso de la diferenciación de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas.** El proceso de la diferenciación está limitado a tres principales etapas. La regionalización se identifica por la formación de dos centros de señalización, en donde se liberan diferentes morfógenos que inducen la expresión de factores de transcripción los cuales interactúan para poder delimitar las fronteras del Mes y el eje dorso-ventral del mismo; posteriormente las CTN que se encuentran en la región mas ventral del Mes comienzan a especificarse hacia neuronas mDA y éstas comenzarán a expresar genes tempranos de diferenciación dopaminérgica como *Lmx1a*, *Foxa2*, *Msx1*, entre otros. Una vez comprometidas estas células hacia este linaje comenzarán el proceso de diferenciación; durante este proceso comenzarán a expresar enzimas como TH y genes tardíos de este linaje como *Nurr1*, *Pitx3*, entre otros. (MB) Mesencéfalo; (RB) Rombencéfalo. Modificado de Gale y Li, 2008.

Posteriormente, el centro de señalización que se encuentra en la línea media ventral del tubo neural liberará Sonic hedgehog (SHH), el cual será necesario para

la formación del eje dorso-ventral (Bayly et al., 2007; Gale y Li, 2008). Esta proteína, en conjunto con FGF8, serán indispensables para la especificación de células progenitoras neurales (CPN) mesencefálicas (Abeliovich y Hammond, 2007; Luo, 2012). Por otro lado, para que estas células se mantengan en proliferación y sobrevivan, necesitan de la interacción de factores transcripcionales que son liberados en el organizador ístmico como, WNT1 y Engrailed 1 y 2 (EN1/2) (Chi et al., 2003; Gale y Li, 2008; Prakash et al., 2006). De esta forma, ocurre una serie de movimientos morfogénicos que doblan, pliegan y contraen al tubo neural para dar origen al Mes (Massarwa et al., 2014).

## **2.1. NEURONAS DOPAMINÉRGICAS**

Como resultado de la regionalización dorso-ventral en el Mes, se originan subdivisiones celulares denominadas m1-m7, las cuales se caracterizan por la expresión diferencial de factores de transcripción que dará lugar a diferentes tipos neuronales (Lahti et al., 2013), uno de ellos serán las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (mDA), las cuales se encuentran en la región m7 y se caracterizan por la expresión de genes específicos de linaje dopaminérgico como Lmx1a/b (Hoekstra et al., 2013; Tian et al., 2012; Yan et al., 2011). Las neuronas mDA representan aproximadamente el 75% de todas las neuronas mesencefálicas en el cerebro adulto. Éstas se originan en la región más ventral del Mes y posteriormente éstas se extienden rostralmente al tálamo ventral o al borde del hipotálamo (Ang, 2006; Smidt et al., 2003).

El descubrimiento de la dopamina (DA) en 1958 como neurotransmisor y no solo como un intermediario en la síntesis de noradrenalina y adrenalina ha provocado interés en la investigación de su función biológica tanto en el cerebro adulto como en el desarrollo en áreas como el control del movimiento, la adicción, el estrés, etcétera. Este interés también se da debido a la importancia de su ausencia en el estriado (ST) y sus repercusiones en enfermedad de Parkinson

(EP), entre otros (Bertler y Rosengren, 1959; Carlsson, 1959; Carlsson et al., 1958; Fuxe, 1965; Schultz, 2007; Smidt et al., 2003).

Anatómicamente, estas neuronas se dividen en tres principales subgrupos (Ang, 2006; Baier et al., 2012; Gale y Li, 2008; Luo, 2012): el grupo lateral A9, el cual corresponde a las neuronas de la sustancia nigra pars compacta (SN). Estas neuronas proyectan sus axones hacia el ST dorsal y formará la vía nigro-estriatal (SN-ST) y su principal función es el control del movimiento voluntario. También están el grupo medial A10 y el grupo lateral A8, los cuales corresponden a las neuronas del área ventral tegmental y el área retrorubral, respectivamente. Estos dos grupos forman el sistema mesocortical límbico, el cual está involucrado en procesos de retroalimentación y emocionales.

La DA es sintetizada por las neuronas dopaminérgicas. La síntesis de esta catecolamina consiste en pasar de L-tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) mediante la acción de la enzima limitante en la síntesis de DA, tirosina hidroxilasa (TH). Después de la hidroxilación que lleva a cabo la tirosina, la L-DOPA se convierte en DA gracias a otra enzima: la descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (Luo, 2012; Sharples et al., 2014). La DA sintetizada es almacenada en vesículas al ser transportada por el transportador vesicular de monoaminas (VMAT). La DA será liberada una vez que las neuronas mDA se despolaricen (Luo, 2012; Sharples et al., 2014).

### **2.1.1. ESPECIFICACIÓN A LINAJE DOPAMINÉRGICO**

La formación de las neuronas mDA se da a partir de la regionalización y formación de los ejes antero-posterior y dorso-ventral del Mes. Una vez que se han posicionado las CTN en la región más ventral del Mes, éstas pueden especificarse al linaje neural dopaminérgico. Esta etapa depende de que la definición de fronteras entre una vesícula cerebral y otra se haya dado correctamente (Veenvliet et al., 2013). Durante el proceso de especificación las señales inductoras de SHH también tendrán un impacto importante sobre las CTN,

ya que la abundancia de una de las proteínas efectoras de la vía de SHH, GLI1, también puede inducir la expresión ectópica de marcadores de linaje dopaminérgico (Bayly et al., 2007; Blaess et al., 2006; Smidt et al., 2003).

A pesar de que no se sabe con certeza todas las cascadas génicas que desencadenan la especificación de neuronas mDA, se ha reportado que durante este proceso, existe la activación transcripcional de diferentes genes, los cuales se expresan de manera temporal y secuencial. La expresión de *Otx2*, *Lmx1b* y *En1/2* se limita a inicios de la especificación en E9 y posteriormente se expresarán genes como *Lmx1a* y *Msx1/2* alrededor de E9.5, seguidos de *Ngn2* y *Mash1* hasta E10.75 (Andersson et al., 2006a; Ang, 2006). Además de estos genes, se ha reportado la presencia de otros genes como *Foxa2* y *Ngn2*, los cuales también presentan una aparición temporal durante las primeras etapas de especificación (Andersson et al., 2006b; Ferri et al., 2007; Gale y Li, 2008; Kele et al., 2006) (**FIG. 8**).

Finalmente, durante las últimas etapas de especificación las células pasan por las últimas divisiones celulares alrededor de E9.5 y E13.5 (Ang, 2006) y comenzarán a expresar genes específicos de diferenciación neuronal.

### 2.1.2. DIFERENCIACIÓN A LINAJE DOPAMINÉRGICO

Durante la diferenciación, las neuronas mDA inmaduras comenzarán a expresar otros factores de transcripción indispensables para el mantenimiento de las neuronas mDA como NURR1 y PITX3, así como marcadores generales de diferenciación neuronal como  $\beta$ III-Tubulina. Al mismo tiempo, factores de transcripción como SOX2, los cuales tienen como principal función la inhibición de la diferenciación mesodermal, disminuyen su actividad transcripcional. De manera similar a los pasos anteriores, éstos y otros factores de transcripción específicos de esta etapa necesitan que las etapas que los preceden se hayan realizado correctamente (Ang, 2006; Gale y Li, 2008; Veenvliet et al., 2013). Se sabe por ejemplo, que FOXA2 es necesario para la activación transcripcional de

*Nurr1* durante E10.5, justo después de que *Shh* finaliza su función en el mesencéfalo ventral (MV). Además, también se ha reportado que *NGN2* es indispensable para pasar de la zona proliferativa a una intermedia y que en ausencia de este factor, se reduce el número de células positivas a *NURR1* (Ang, 2006; Ferri et al., 2007; Gale y Li, 2008).

Conforme el proceso de desarrollo embrionario avanza, las NPC se irán diferenciando hacia un fenotipo de neuronas mDA maduras, el cual se caracterizará por la aparición de marcadores celulares como TH, VMAT, los receptores a DA y el transportador de DA. Algunos de estos marcadores, como TH, dependen de la unión de *NURR1* en su promotor para ser activado transcripcionalmente a partir de E11.5 (**FIG. 8**; Gale y Li, 2008; He et al., 2011a; Luo, 2012; Smidt et al., 2003).

De esta manera, el control de la expresión de diversos genes dopaminérgicos de manera coordinada y secuencial durante el desarrollo del Mes y el control de la presencia de factores transcripcionales durante los días siguientes, ayudará a la maduración, mantenimiento y sobrevivencia de estas neuronas, lo que permitirá la formación de redes neuronales complejas como la vía SN-ST.

### **2.1.3. FORMACIÓN DE LA VÍA NIGROESTRIATAL.**

Durante la diferenciación y maduración de las neuronas mDA, se da la extensión de axones, lo que resulta en la formación de diferentes vías: la vía SN-ST, la vía mesolímbica y la vía mesocortical (Luo, 2012).

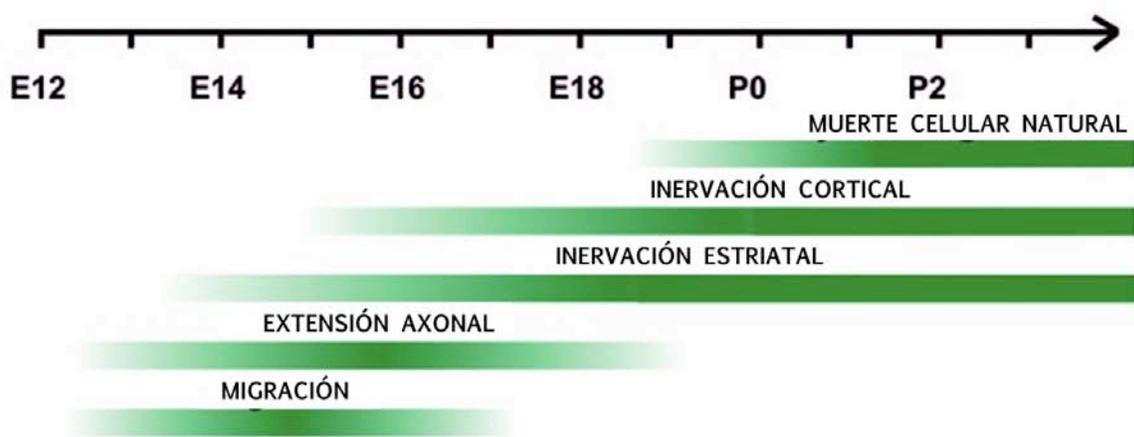
La vía SN-ST es el mayor tracto formado por el sistema dopaminérgico. Los somas de las neuronas que forman esta vía se encuentran en la SN y sus axones forman una densa inervación al núcleo caudado y el putamen, los cuales constituyen el ST en roedores. El 80% de todas las neuronas mDA ejercen su actividad en el ST. La vía SN-ST juega un papel muy importante en el control de movimientos motores voluntarios y la degeneración de esta vía causa en

humanos la EP, la cual es causada por una falta de DA en el estriado (Ang, 2006; Baier et al., 2012; Luo, 2012; Sharples et al., 2014).

Posterior a la inducción de la expresión de TH en las neuronas mDA en proceso de la diferenciación, éstas comenzarán a extender sus axones hacia sus posiciones finales en E13. Primero, las neuronas mDA migrarán de manera ventral y posteriormente, migrarán lateralmente a lo largo de fibras orientadas tangencialmente para así formar la SN. Ulteriormente, los axones de las neuronas mDA comenzarán a proyectarse dorsalmente y después cambiarán su dirección hacia el telencéfalo en respuesta a señales extrínsecas que se encuentran en el Mes dorsal y señales repulsivas que se encuentran en el tallo cerebral caudal. Durante su camino hacia el telencéfalo, en E16, los axones atravesarán el diencefalo a través del haz medial del telencéfalo, el cual se distingue por la expresión de señales quimioatrayentes que guiarán a los axones hacia su destino (Gates et al., 2004; Hegarty et al., 2013). Además, se ha demostrado que el tálamo previene la entrada de estos axones mediante la acción de inhibidores dependientes de contacto, los cuales contribuyen como guía hacia el ST (Hegarty et al., 2013; Nakamura et al., 2000). Uno de los factores de transcripción más relevantes para la orientación y guía que tienen los axones para llegar al Mes es NKX2.1. Se ha demostrado que en su ausencia existe un cruce aberrante de las fibras a través del haz medial en el diencefalo caudal, lo que sugiere que los factores de repulsión necesitan de este factor transcripcional para aparecer (Hegarty et al., 2013; Kawano et al., 2003).

Una vez que los axones atraviesan el haz medial del telencéfalo, se dirigirán hacia el ST. Para lograr esto, de nuevo se ayudarán de señales quimioatrayentes presentes en el ST y de quimiorepulsión secretadas por la corteza (Gates et al., 2004; Hegarty et al., 2013). Dentro de este último proceso está involucrada la EfrinaB2, la cual se libera en el ST y su receptor EphB1 se expresa en las neuronas mDA. Ésto sugiere que la interacción entre EfrinaB2 y EphB1 en el ST asegura que los axones de las neuronas mDA de la SN se establezcan en el ST

dorsal (Egea y Klein, 2007; Hegarty et al., 2013). Por lo tanto, estos axones en condiciones óptimas alcanzarán el ST hacia el día E18 de desarrollo embrionario. La inervación de estas fibras continuará hasta la primera semana de nacimiento, cuando se establecen todos los axones en las regiones correspondientes (FIG. 9).



**FIGURA 9. Representación gráfica de la evolución temporal de la formación de la vía nigroestriatal en rata.** Las neuronas mDA comienzan a migrar y extender sus axones hacia el día E14. Estas fibras neuronales alcanzan el estriado hacia el día E18 y esta inervación continuará hasta la primera semana después del nacimiento. Modificado de Hegarty et al., 2013.

Se ha demostrado que el sistema dopaminérgico en el adulto puede interactuar con el sistema histaminérgico, el cual se ha sugerido como un sistema regulador de otros sistemas, además del dopaminérgico. En el caso particular del sistema dopaminérgico, se ha correlacionado el incremento en los niveles de histamina (HA) en la SN o un aumento en las fibras histaminérgicas en el ST, con el desarrollo en la EP (Anichtchik et al., 2000; Panula y Nuutinen, 2013; Rinne et al., 2002). Por tal motivo, el estudio del sistema histaminérgico sobre la población dopaminérgica ha llamado la atención en los últimos años ya que se desconocen los mecanismos por los cuales podría tener acción sobre las neuronas mDA.

### 3. LA HISTAMINA

La HA fue descubierta en 1910 por Dale y Laidlaw (Dale y Laidlaw, 1910; Ramos-Jiménez et al., 2009), quienes demostraron que esta molécula inducía la contracción del músculo liso intestinal y también vasodilatación. Sin embargo, no fue hasta 1927 cuando Best y colaboradores (Best et al., 1927) aislaron la HA del hígado y pulmón, mostrando que era un constituyente natural de diversos tejidos y derivando así su nombre, el cual viene de la raíz griega *histos*, que significa tejido (Ramos-Jiménez et al., 2009). Por ser una molécula presente en la mayoría de los tejidos, además de tener funciones necesarias para cada uno de ellos, la HA ha sido tema de investigación alrededor del mundo por más de un siglo.

#### 3.1. HISTAMINA EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

Dependiendo del tejido y el receptor que active la HA, ésta ejercerá diferentes funciones. A nivel fisiológico esta amina es capaz de promover la secreción de ácidos gástricos, la contracción muscular y la vasodilatación. Sin embargo, en el caso del sistema inmunológico, la HA juega un papel importante tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. Se ha observado que los ratones deficientes en la enzima que se encarga de sintetizar HA, la histidina descarboxilasa (HDC), muestran niveles elevados de citocinas proinflamatorias (Haas et al., 2008). A través de la activación de los receptores histaminérgicos (RH) 1, 2 y 4, la HA está involucrada en los mecanismos de inflamación. En el caso de la activación del RH<sub>1</sub>, se promoverá la adhesión y quimiotaxis de los eosinófilos y neutrófilos (Ramos-Jiménez et al., 2009); además es capaz de favorecer la proliferación de células T y B (Nakane et al., 2004; Ramos-Jiménez et al., 2009). Al activarse el RH<sub>2</sub>, el cual se expresa en leucocitos, se reduce la activación, quimiotaxis y desgranulación de los neutrófilos y eosinófilos. Cuando existe activación del RH<sub>4</sub> se promueve la quimiotaxis de los mastocitos, eosinófilos y células dendríticas, sin efecto de desgranulación; además, se induce cambio en

la localización tisular de los mastocitos, los cuales se ha reportado que se encuentran en grandes cantidades en la piel y las mucosas, entre otros (Haas et al., 2008; Metcalfe et al., 1997; Ramos-Jiménez et al., 2009). Finalmente, se sabe que en las células cebadas y en las células de origen hematopoyético en presencia de prostaglandinas u otros fármacos que interactúan con la adenilato ciclasa (AC), existe un aumento en la formación de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) y consiguientemente una inhibición en la liberación de HA (Tung y Lichtenstein, 1981). Por lo tanto, se puede considerar a la HA como un agente relevante para el funcionamiento del sistema inmunológico.

### **3.2. HISTAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ADULTO**

La HA también es un neurotransmisor/neuromodulador liberada en el SNC, donde regula diversas funciones motrices, cognitivas, homeostáticas y de desarrollo. Ésta es sintetizada y transportada dentro del cerebro de casi todas las especies animales (Haas y Panula, 2003). La HA del SNC se sintetiza dentro del cerebro de manera independiente a la HA liberada en el resto del organismo.

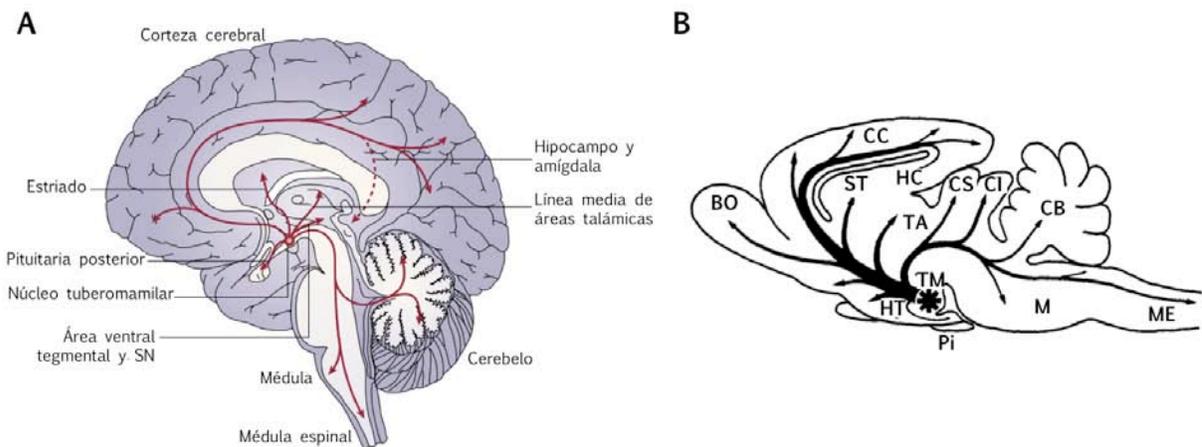
#### **3.2.1. DISTRIBUCIÓN DEL SISTEMA HISTAMINÉRGICO**

En el SNC la HA es liberada por neuronas histaminérgicas y mastocitos. Las neuronas histaminérgicas, se encuentran en el núcleo tuberomamilar, en la parte posterior del hipotálamo (Ekstrom et al., 1995; Haas y Panula, 2003; Panula y Nuutinen, 2013).

Las principales áreas de proyección de las neuronas histaminérgicas varían ligeramente entre diferentes especies. Sin embargo, las áreas inervadas por fibras histaminérgicas, que son esenciales para el funcionamiento del SNC se conservan. El sistema histaminérgico inerva a la mayor parte del cerebro, principalmente la corteza cerebral, amígdala, SN y ST (**FIG. 10**). La densidad de fibras histaminérgicas en el hipocampo, tálamo, retina y la médula espinal varían entre

especies (Eriksson et al., 1998; Haas y Panula, 2003; Haas et al., 2008; Schwartz et al., 1991; Wada et al., 1991; Watanabe y Yanai, 2001).

La HA regula una gran cantidad de procesos dentro del cerebro; tiene un papel importante dentro del control del ciclo de sueño-vigilia, cognición, aprendizaje, memoria, ingesta de alimentos, homeóstasis y mecanismos sensoriales y motores (Haas y Panula, 2003; Haas et al., 2008; Panula y Nuutinen, 2013).

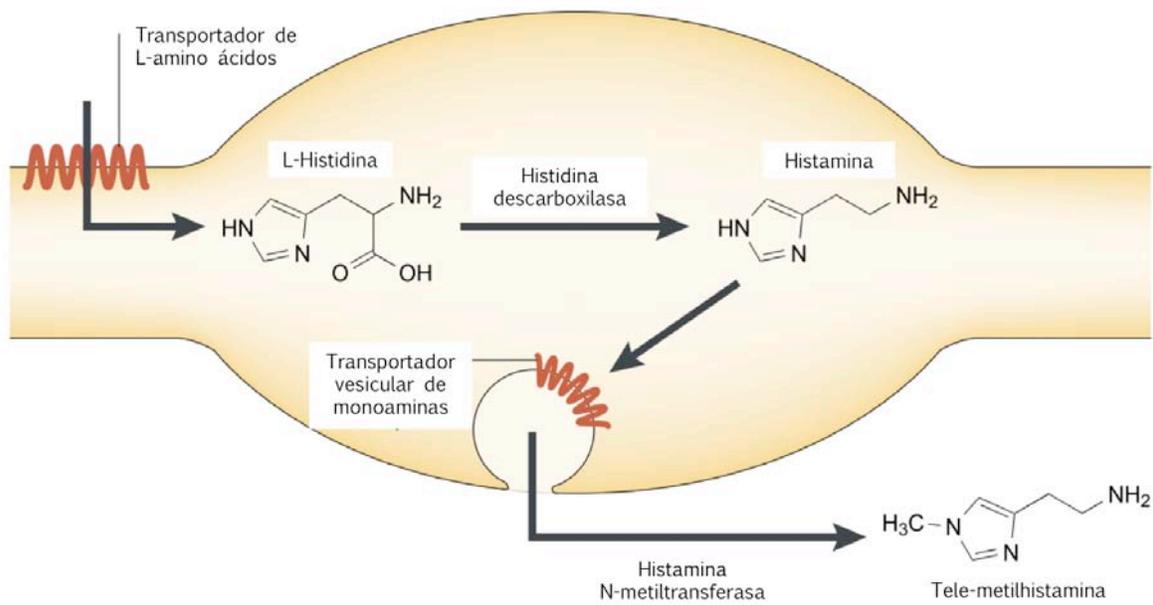


**FIGURA 10. Distribución de las fibras de neuronas histaminérgicas a lo largo del cerebro en mamíferos.** Vista sagital de las conexiones que genera el sistema histaminérgico en el cerebro de humano (A) y rata (B). Las flechas representan las conexiones que generan las fibras histaminérgicas desde el núcleo tuberomamilar (TM; asterisco en B). Abreviaturas: (BO) bulbo olfatorio, (CC) corteza cerebral, (ST) estriado, (HC) hipocampo, (TA) tálamo, (HT) hipotálamo, (CS) colículo superior, (CI) colículo inferior, (TM) núcleo tuberomamilar, (Pi) pituitaria, (CB) cerebelo, (M) médula, (ME) médula espinal. Modificado de Haas y Panula, 2003; Wada et al., 1991.

### 3.2.2. SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA HISTAMINA

La HA pertenece a la familia de las aminas biogénicas. Ésta es sintetizada a partir del aminoácido esencial L-histidina, el cual es tomado del fluido cerebroespinal por las neuronas a través del transportador de L-aminoácidos. Posteriormente, este aminoácido sufrirá una descarboxilación mediada por la HDC, la cual es una enzima dependiente de piridoxal 5'-fosfato (o vitamina B6) (Haas et al., 2008; Maintz y Novak, 2007). La HA sintetizada se almacenará en vesículas transportadoras de monoaminas. Hasta que se reciba un estímulo y la neurona se despolarice, la HA podrá liberarse al espacio sináptico, donde a través de la

unión de uno de los tres receptores histaminérgicos (RH<sub>1</sub>-RH<sub>3</sub>) reportados en cerebro, podrá ejercer sus funciones (**FIG. 11**). El nivel de HA en el tejido cerebral se ha reportado que es más bajo en comparación a otras aminas biogénicas. Sin embargo, su velocidad de acción es considerablemente más rápida a otras aminas liberadas en el cerebro y ejerce funciones más variables (Haas et al., 2008).



**FIGURA 11. Síntesis y metabolismo de la HA en el cerebro.** El transportador de L-aminoácidos introduce a la L-histidina al citosol de las neuronas en donde la HA es sintetizada, mediante la acción de la enzima HDC. La HA es almacenada por transportadores vesiculares de monoaminas y es liberada después de que las neuronas se despolarizan. Después de su liberación y su unión a receptores específicos, la HA es metilada por medio de la histamina N-metiltransferasa, la cual se encuentra postsinápticamente y en células gliales. La tele-metilhistamina ya no ejercerá efecto sobre las células adyacentes, ya que esta no es reconocida por los receptores histaminérgicos Haas y Panula, 2003.

La síntesis y liberación de la HA están reguladas a través de la activación del RH<sub>3</sub>, el cual ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa para que el sistema funcione adecuadamente. Por otro lado, la inactivación de la HA se da en el espacio extracelular una vez que ésta ejerce su función en neuronas postsinápticas, a través de una metilación gracias a la acción de la histamina N-metiltransferasa (**Fig. 11**). Una vez convertida la HA en tele-metilhistamina, ésta ya

no tendrá efecto sobre los RHs. Se desconocen mecanismos de inactivación por recaptura neuronal, sin embargo, se sugiere que este mecanismo podría estar presente en astrocitos y células endoteliales (Haas et al., 2008; Huszti, 1998, 2003; Maintz y Novak, 2007).

### 3.2.3. LOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La HA ejerce sus funciones a través de la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Se conoce la existencia de 4 RHs (RH<sub>1</sub>-RH<sub>4</sub>), de los cuales los receptores RH<sub>1</sub>-RH<sub>3</sub> se encuentran distribuidos a lo largo del SNC y en el caso del RH<sub>4</sub>, se ha detectado predominantemente en tejidos periféricos, sin embargo su existencia en cerebro aún es controversial. Cada receptor está acoplado a una proteína G diferente y por lo tanto ejerce una función diferente en la célula que lo expresa:

**Receptor H<sub>1</sub>.** Fue el primero en ser identificado al estudiarse la participación de la HA en respuestas alérgicas. Es una proteína de aproximadamente 486-491 aminoácidos dependiendo de la especie. Está acoplado a una proteína G $\alpha_{q/11}$  y a la fosfolipasa C (PLC). La activación de estas proteínas incluyen la síntesis de: 1) inositol trifosfato o ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>) el cual a su vez promoverá la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular y 2) diacilglicerol (DAG). El Ca<sup>2+</sup> liberado es capaz de activar procesos diferentes como: la apertura de canales catiónicos, los cuales causan despolarización, la activación de transportadores intercambiadores de Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> lo cual también causa despolarización, la producción de ácido araquidónico, óxido nítrico, GMP cíclico (GMPc) y la apertura de canales de K<sup>+</sup>, lo cual causa hiperpolarización. En el caso del DAG, este es capaz de activar a la proteína cinasa C (PKC), lo cual puede causar excitación en el tálamo, ST y corteza cerebral. Otra función desencadenada por la activación de este receptor incluye el bloqueo de la conductancia baja en K<sup>+</sup> (**FIG. 12**; Haas y Panula, 2003; Haas et al., 2008). Además, este receptor es capaz de activar a la AMP-cinasa (un punto

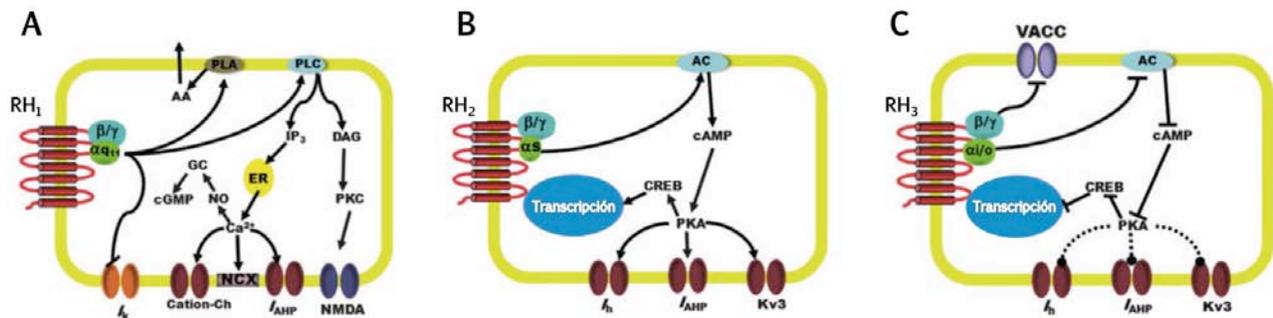
de control para la obtención de energía), el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y factores transcripcionales clave para el control de la impronta génica (Molina-Hernández et al., 2012). Este receptor se expresa mayoritariamente en regiones relacionadas con sistema neuroendócrino, de comportamiento y control de la ingesta de alimentos, es decir, en el hipotálamo, tallo cerebral, tálamo, amígdala, bulbo olfatorio, hipocampo y corteza cerebral (Haas et al., 2008; Hill et al., 1997). Por otro lado, se ha encontrado que en algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia y la depresión, el RH<sub>1</sub> disminuye su expresión, lo cual refuerza la importancia de este receptor en el SNC (Haas et al., 2008).

**Receptor H<sub>2</sub>.** Este receptor está compuesto de 358-359 aminoácidos y se encuentra acoplado a la proteína G $\alpha_s$  y por lo tanto es capaz de activar a la AC e inducir la formación de AMPc. La formación de este segundo mensajero estimula a la proteína cinasa A (PKA), la cual puede activar a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), los canales catiónicos activados por hiperpolarización y canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje y de Ca<sup>2+</sup> (FIG. 12; Haas y Panula, 2003; Haas et al., 2008; Hill et al., 1997; Molina-Hernández et al., 2012). El RH<sub>2</sub>, al igual que el RH<sub>1</sub>, se encuentra distribuido por casi todo el tejido cerebral; mayoritariamente en el giro dentado del hipocampo, la corteza piriforme, el núcleo supraquiasmático y el núcleo rojo (Hill et al., 1997; Karlstedt et al., 2001), lo cual sugiere tener funciones en la nocicepción y la formación de recuerdos.

**Receptor H<sub>3</sub>.** Este receptor contiene varias isoformas y el número de aminoácidos se encuentra entre 326-445, dependiendo de la isoforma que se produzca. Se encuentra acoplado a la proteína G $\alpha_{i/o}$ , a canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje y a la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (FIG. 12). Además, está acoplado de manera negativa a la síntesis de AMPc. Este receptor se ha denominado autoreceptor, ya que a diferencia del RH<sub>1</sub> y RH<sub>2</sub>, se encuentra localizado en neuronas histaminérgicas presinápticas y su función principalmente

es controlar la liberación y la síntesis de HA (Haas y Panula, 2003; Hill et al., 1997; Molina-Hernández et al., 2012).

En resumen, los receptores  $H_1$  y  $H_2$  tienen acciones principalmente sobre neuronas excitatorias y por el contrario, la activación del receptor  $H_3$  causa la autoinhibición de neuronas histaminérgicas al inhibir la liberación de HA y otros neurotransmisores (Haas y Panula, 2003).



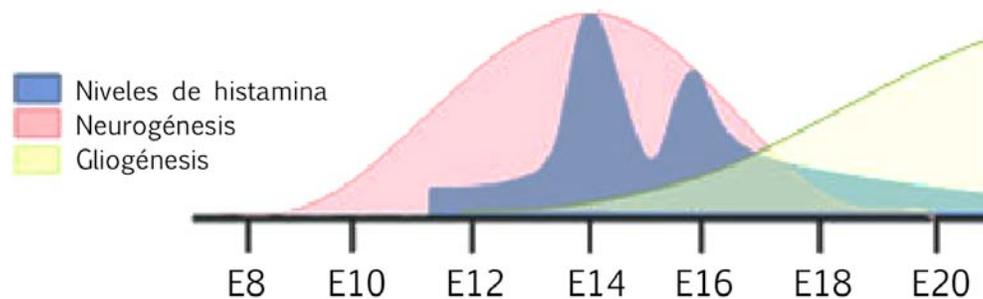
**FIGURA 12. Vías de señalización activadas por los receptores histaminérgicos en el sistema nervioso central.** Se pueden observar las vías de señalización activadas por los tres diferentes receptores histaminérgicos:  $RH_1$  (A),  $RH_2$  (B) y  $RH_3$  (C), acomodados a sus respectivas proteínas G. Abreviaturas: (PLA) fosfolipasa A; (AA) ácido araquidónico; (PLC) fosfolipasa C; ( $IP_3$ ) inositol-1,4,5-trifosfato; (DAG) diacil glicerol; (PKC) proteína cinasa C; (ER) retículo endoplásmico; (NO) óxido nítrico; (GC) guanilato ciclasa; (cGMP) GMP cíclico; (NMDA) N-metil-D-aspartato; ( $I_{AHP}$ ) canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ ; (NCX) intercambiador de  $Na^+/Ca^{2+}$ ; (Cation-Ch) canales catiónicos; ( $I_K$ ) canales de potasio; (AC) adenilato ciclasa; (cAMP) AMP cíclico; (PKA) proteína cinasa A; (CREB) proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico; (Kv3) canales de  $K^+$  activados por voltaje; ( $I_h$ ) canales cationicos activados por hiperpolarización; (VACC) canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje. Modificado de Molina-Hernández et al., 2012.

### 3.3. HISTAMINA DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Durante el desarrollo embrionario, Auvinen y colaboradores, detectaron por primera vez neuronas histaminérgicas en el cerebro (Auvinen y Panula, 1988). Ellos observaron que en E13, estas células se encuentran localizadas en la región del Mes y metencéfalo. Posteriormente, en E15 este sistema se encuentra en el MV y el romboencéfalo. Este sistema histaminérgico fue denominado sistema transitorio, ya que las neuronas que contienen HA presentes en estas áreas son diferentes a las encontradas en el núcleo tuberomamilar en el cerebro adulto, las

cuales aparecen en E20, justo cuando las neuronas del romboencéfalo ya no son detectadas. Estos datos fueron reforzados cuando se analizó la expresión de la enzima HDC mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímicas (Auvinen y Panula, 1988; Kinnunen et al., 1998; Nissinen y Panula, 1995; Nissinen et al., 1995; Vanhala et al., 1994).

La HA es uno de los primeros neurotransmisores en aparecer durante el desarrollo del cerebro; sus mayores concentraciones se encuentran entre E14-E16. Posteriormente, su concentración baja gradualmente hasta alcanzar en E20 las concentraciones que se encuentran en el SNC adulto (Molina-Hernández et al., 2012; Panula et al., 2014; Vanhala et al., 1994). Este pico de mayor síntesis de HA coincide con el periodo de diferenciación neuronal que ocurre en diferentes regiones cerebrales en el desarrollo (FIG. 13; Götz y Huttner, 2005; Sauvageot y Stiles, 2002) lo cual sugiere que la HA podría ser un modulador del cerebro en desarrollo al actuar como un factor neurogénico (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Molina-Hernández et al., 2013)



**FIGURA 13. Representación de las curvas de neurogénesis, gliogénesis y concentración de histamina a lo largo del desarrollo del cerebro.** Se puede observar que los picos de mayor concentración de HA (azul) coinciden con el pico de mayor producción de neuronas (rosa). Modificado de Molina-Hernández et al., 2012.

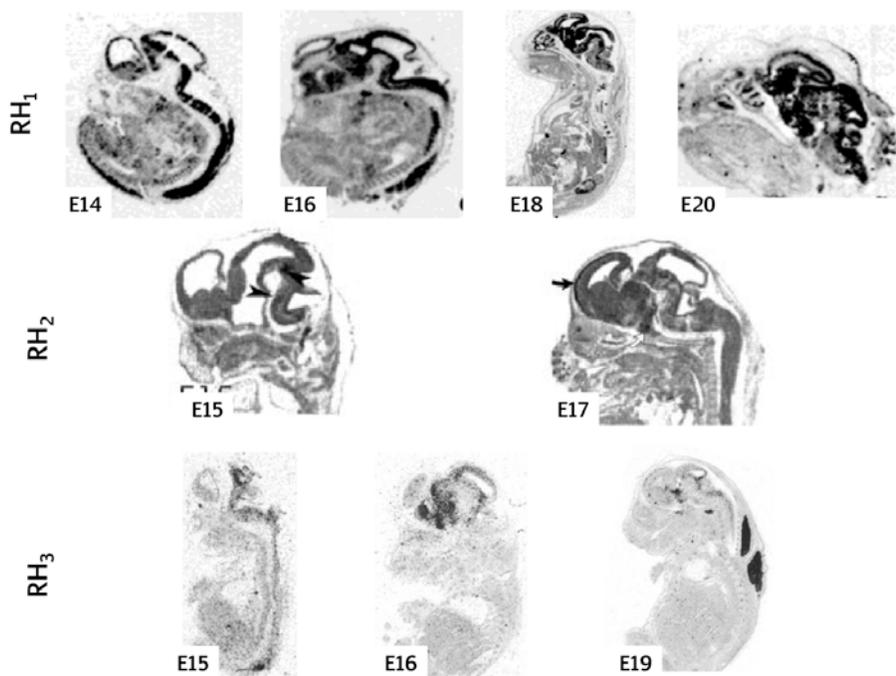
### 3.3.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS

Hasta la fecha se ha reportado la presencia de los receptores RH<sub>1</sub>-RH<sub>3</sub> mediante hibridación *in situ* de E14 en adelante, en las diferentes regiones del cerebro en desarrollo (**FIG. 14 y TABLA 1**):

**Receptor H<sub>1</sub>.** Este receptor fue descubierto en 1998 por Kinnunen y colaboradores durante el desarrollo del embrión de rata. Demostraron que se expresa a partir de E14 y que está principalmente en la médula espinal, rombencéfalo y el neuroepitelio ventricular del telencéfalo. Posteriormente, en E18, este receptor muestra una señal uniforme en la médula espinal y muestra una señal discreta en el funículo ventral. En esta etapa, también se encuentra expresado en la corteza cerebral, el neuroepitelio ventricular y la zona marginal. En E20, la señal que se encontraba en la corteza cerebral disminuye y la señal se enriquece en el neuroepitelio en desarrollo (Kinnunen et al., 1998; Molina-Hernández et al., 2012; Panula et al., 2014).

**Receptor H<sub>2</sub>.** A diferencia del RH<sub>1</sub>, se sabe poco sobre su presencia en el desarrollo del SNC. Se ha podido detectar a lo largo del cerebro en desarrollo a partir de E15, además de que es claramente distinguible en regiones específicas como el núcleo de raphe. En E17 su expresión también se da predominantemente en el hipotálamo y la placa cortical (Karlstedt et al., 2001; Molina-Hernández et al., 2012; Panula et al., 2014).

**Receptor H<sub>3</sub>.** De la misma manera que el RH<sub>2</sub>, el RH<sub>3</sub> se ha encontrado a partir de E15. Sin embargo, su presencia se restringe a ciertas áreas como el epitelio ventricular del Mes, la médula y la médula espinal. En E16, la señales que se presentaban en la médula y médula espinal desaparecen y ahora comienza a expresarse en el hipotálamo y el núcleo accumbens. En etapas mas tardías como E19, este receptor se detecta en la placa cortical y en capas corticales profundas. Esta expresión se mantiene hasta el nacimiento del neonato (Héron et al., 2001; Karlstedt et al., 2003; Molina-Hernández et al., 2012; Panula et al., 2014).



**FIGURA 14. Hibridación *in situ* de los tres receptores histaminérgicos durante el desarrollo del cerebro de la rata.** Para el receptor RH<sub>1</sub> se puede ver la expresión uniforme en las primeras etapas embrionarias y posteriormente se restringirá a regiones específicas como el hipotálamo. A diferencia del RH<sub>1</sub>, el RH<sub>2</sub> y el RH<sub>3</sub> muestran su expresión a partir de E15. El RH<sub>2</sub> muestra una expresión uniforme a lo largo del cerebro y el RH<sub>3</sub> muestra una expresión mas específica. Modificado de Karlstedt et al., 2001, 2003; Kinnunen et al., 1998.

**TABLA 1. Localización y niveles de expresión de los receptores histaminérgicos durante el desarrollo del sistema nervioso central.**

Receptor	Región	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20
RH <sub>1</sub>	Telencéfalo	+++		++			+++	++
	Mesencéfalo	+++		+++			+++	+++
	Médula espinal	+++		+++			ND	ND
RH <sub>2</sub>	Telencéfalo		++		+++			
	Mesencéfalo		++		++			
	Médula espinal		ND		++			
RH <sub>3</sub>	Telencéfalo		ND	++	++	++		
	Mesencéfalo		++	+	++	++		
	Médula espinal		+	ND	ND			

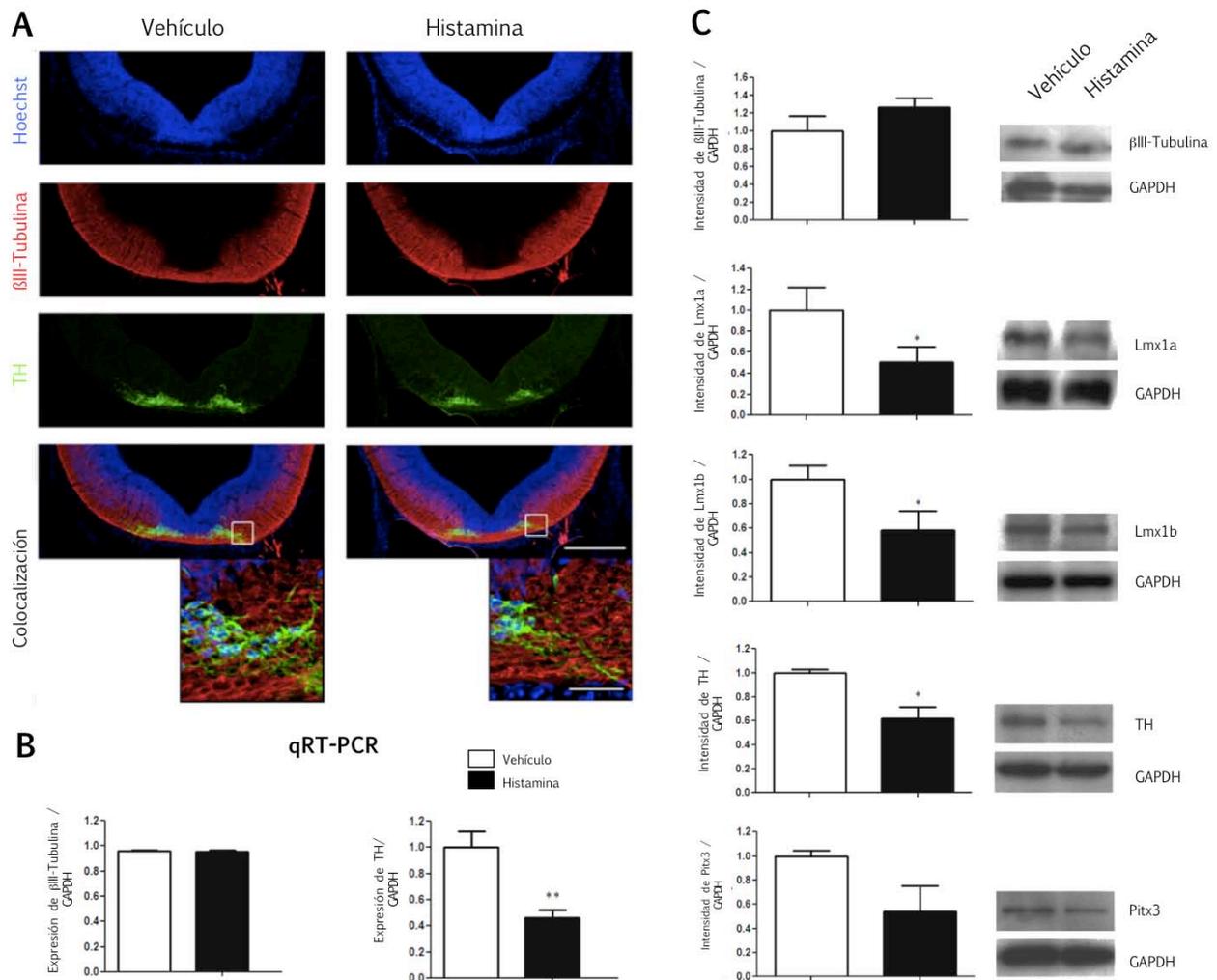
+++ alto; ++ bajo; + muy bajo; ND no detectable. Tabla basada en Karlstedt et al., 2001, 2003; Kinnunen et al., 1998; Molina-Hernández et al., 2012.

### 3.3.2. EFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE CÉLULAS TRONCALES NEURALES CORTICALES Y DE MESENCÉFALO VENTRAL.

Hasta ahora se ha probado que las células troncales/progenitores neurales (CTPN) son de utilidad para el estudio de procesos intrínsecos y extrínsecos que afectan la proliferación, migración, muerte celular y diferenciación. Además, se ha demostrado que la HA media diferentes procesos sobre las CTN, a través de la activación de sus diferentes receptores.

En el caso de las CTPN corticales, se ha mostrado que la HA es capaz de incrementar la proliferación *in vitro* de de estas células a través de la activación del RH<sub>2</sub> y también es capaz de incrementar la muerte celular. Por otro lado, a través de la activación del RH<sub>1</sub> la HA puede aumentar el número de neuronas maduras positivas a la proteína asociada a microtubulos 2 (MAP2), pero no el número de astrocitos. (Molina-Hernández y Velasco, 2008). Además, otros reportes han demostrado que la HA incrementa *in vivo* la expresión de los factores transcripcionales *Ngn1* y *FoxP2*, los cuales son indispensables para la formación de capas profundas en la corteza cerebral (Molina-Hernández et al., 2013; Rodríguez-Martínez et al., 2012).

Recientemente, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, también se demostró que la HA era capaz de tener un efecto sobre las CTPN originarias de Mes, aunque no era similar a los datos ya reportados. Por un lado, al analizar el principal linaje proveniente del MV: las neuronas dopaminérgicas, se demostró que la HA al ser inyectada a altas concentraciones, era capaz de disminuir el número de células positivas a TH sin cambiar el número de neuronas totales positivas a  $\beta$ III-Tubulina.



**FIGURA 15. Efecto de la histamina sobre el desarrollo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.** (A) Cortes coronales de embriones de E14 inyectados en E12 con HA o vehículo. Se puede apreciar que la marca de  $\beta$ III-Tubulina, expresada por neuronas tempranamente diferenciadas no muestra diferencia entre los embriones inyectados con HA o vehículo. Sin embargo, cuando se analizó la presencia de neuronas dopaminérgicas positivas a TH, se observó una disminución de esta marca en los embriones tratados con HA. (B) Se realizó qRT-PCR para analizar la expresión del transcrito tanto de  $\beta$ III-Tubulina como de TH y se muestran un efectos similares a los observados por inmunofluorescencias. (C) Finalmente al analizar la expresión de la proteínas  $\beta$ III-Tubulina y TH, se observó un efecto similar. Además, se mostró una disminución en la expresión de factores transcripcionales específicos de linaje dopaminérgico como Lmx1a, Lmx1b Pitx3. (GAPDH) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Modificado de Escobedo-Avila et al., 2014.

Este efecto se dió de manera específica a través de la activación del  $RH_1$ , descubrimiento obtenido al inyectar los diferentes antagonistas para el  $RH_1$  o  $RH_2$ . Adicionalmente, un estímulo de HA también era capaz de disminuir la presencia de factores transcripcionales específicos de linaje dopaminérgico como: LMX1A,

LMX1B y PITX3 (**FIG. 15**). Por otro lado, la HA disminuyó la proliferación de CTPN, ya que al analizarse la marca de fosfohistona H3, ésta disminuía significativamente en los embriones inyectados con HA.

En conjunto, estos datos indican que la HA podría tener un papel muy importante durante la diferenciación de CTPN en las diferentes regiones del cerebro en desarrollo y que por lo tanto es importante conocer los mecanismos de acción por lo cuales esta amina actúa.

#### **4. EL PAPEL DE LA EPIGENÉTICA DURANTE EL DESARROLLO DEL CEREBRO**

En las últimas décadas, el estudio sobre el control en el desarrollo embrionario se ha enfocado en la regulación de la expresión de diferentes factores transcripcionales específicos que activan a su vez genes de manera espacial y temporal. Sin embargo, en la última década se ha incrementado el estudio sobre otro nivel de regulación: la epigenética; la cual ha dado nuevas pistas sobre el origen y mantenimiento en la expresión de diferentes genes en los diversos tipos celulares presentes durante el desarrollo.

La epigenética se ha definido de diferentes maneras, Adrian Bird en el 2007 propuso a la epigenética como la adaptación estructural de las regiones cromosómicas con el fin de registrar, señalar o perpetuar estados de actividad alterados (Bird, 2007); ésta definición enfatiza de manera dinámica los mecanismos epigenéticos que coordinan y regulan la expresión de genes (van Heesbeen et al., 2013).

De manera específica, se ha demostrado que el control en la diferenciación de CTN hacia los diferentes linajes neuronales y gliales requiere de un riguroso control en los patrones de marcas de histonas y de ADN a lo largo del genoma, para cumplir de manera coordinada la formación de un cerebro funcional.

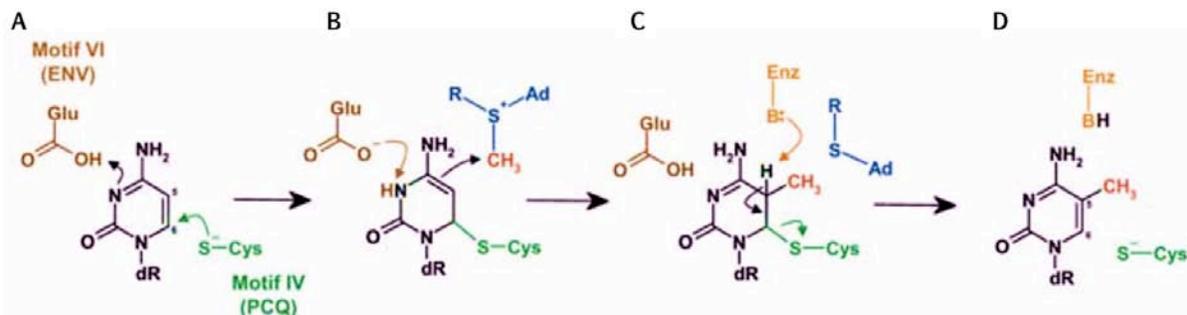
#### 4.1. METILACIÓN DEL ADN

La metilación en el ADN ocurre en la posición C5 de las citosinas (5mC). Esta marca se encuentra distribuida a lo largo de todo el genoma, incluyendo cuerpos de genes, repetidos endógenos y elementos transposables y su principal función es la de reprimir la transcripción de genes específicos. Sin embargo, esta marca se encuentra específicamente en dinucleótidos CpG, los cuales se encuentran principalmente en islas CpG (ICG). Las ICG son secuencias ricas en C y G (abundancia  $\approx 65\%$ ), comparado con el resto del genoma (abundancia  $\approx 40\%$ ), miden aproximadamente 1000 pb y de manera global se encuentran cerca o en los promotores de los genes de manera hipometilada (Bird, 2002; Illingworth y Bird, 2009; Shen y Zhang, 2013; Suzuki y Bird, 2008).

El mecanismo de acción para la incorporación de grupos metilo, de manera general consiste en la unión al ADN de las enzimas ADN metil transferasas (DNMTs), posteriormente se realiza una eversión de la base blanco para la incorporación del grupo metilo, lo cual permitirá un ataque nucleofílico de una cisteína conservada de las DNMTs hacia el C6 de la citosina; la formación de un enlace covalente en esta posición entre el C6 y la enzima, permite un ataque electrofílico hacia el grupo metilo que conserva la donadora de grupos metilos, S-adenosil-L-metionina (SAM). La molécula SAM al donar el grupo metilo, se convierte en S-adenosil-L-homocisteína (SAH) y finalmente por medio de una eliminación del protón que se encuentra en la posición C5, se dará la resolución del enlace covalente entre la DNMT y la citosina metilada. (**FIG. 16 y FIG. 17**) (Cheng et al., 2011; Hermann et al., 2004).

En los mamíferos, se han identificado tres DNMTs, dentro de las cuales la DNMT3a y DNMT3b establecen los patrones iniciales de metilación CpG (*de novo*); mientras que la DNMT1 mantiene los patrones de metilación durante la replicación del ADN y su reparación. Además, existe una enzima con alta homología a las DNMT con función reguladora: la DNMT3L. Esta proteína a pesar de tener una secuencia de aminoácidos similar a las DNMT3, carece del dominio

catafítico. Sin embargo, se sabe que la DNMT3L interactúa directamente con las DNMT3a/b y es capaz de estimular la metilación del ADN *in vitro*, además de que la actividad de metilación depende de la cantidad de DNMT3L que se encuentre presente, lo cual sugiere que esta proteína tiene un efecto estimulador. Adicionalmente, se ha reportado que la DNMT3L también regula el reclutamiento de las DNMT3 a través de la unión con H3K4 no metilada en sitios donde debe establecerse una metilación del ADN *de novo* (Bestor, 2000; Cheng et al., 2011; Hata et al., 2002; Suetake et al., 2004).



**FIGURA 16. Mecanismo químico de la metilación en citosinas.** La reacción de metilación es catalizada por las ADN metil transferasas (DNMT) e involucra (A) la interacción de dos motivos de esta misma enzima con la citosina (Motif VI; café y Motif IV; verde), la interacción principal se da en el C6 en donde interactúa el motivo IV (verde) con la citosina para formar el intermediario dihidrocitosina, el cual se encuentra unido covalentemente a la enzima (B; morado y verde). Esta unión permitirá que la S-adenosil-L-metionina (SAM; azul) sufra de un ataque electrofílico y que por lo tanto, el grupo metilo (CH<sub>3</sub>) se una covalentemente al intermediario (C). La resolución del enlace covalente entre la citosina y la DNMT se dará gracias a la eliminación del protón que se encuentra en la posición C5 y la citosina metilada se regresará a su posición original en el ADN. Modificado de Hermann et al., 2004.

Este proceso de metilación junto con la modificación postraduccional de histonas juega un papel importante en la modulación de la estructura de la cromatina. Entre las principales funciones que tiene la metilación del ADN se encuentran: el control de la impronta génica, el silenciamiento de genes, la inactivación del cromosoma X, los mecanismos de *splicing* alternativo y la estabilidad genómica (Bird, 2002; Cheng et al., 2011; Lyko et al., 2010; Shen y Zhang, 2013). Estas funciones, en particular el silenciamiento transcripcional, se puede dar a través de la unión de proteínas de unión a ADN metilado (MBP), las

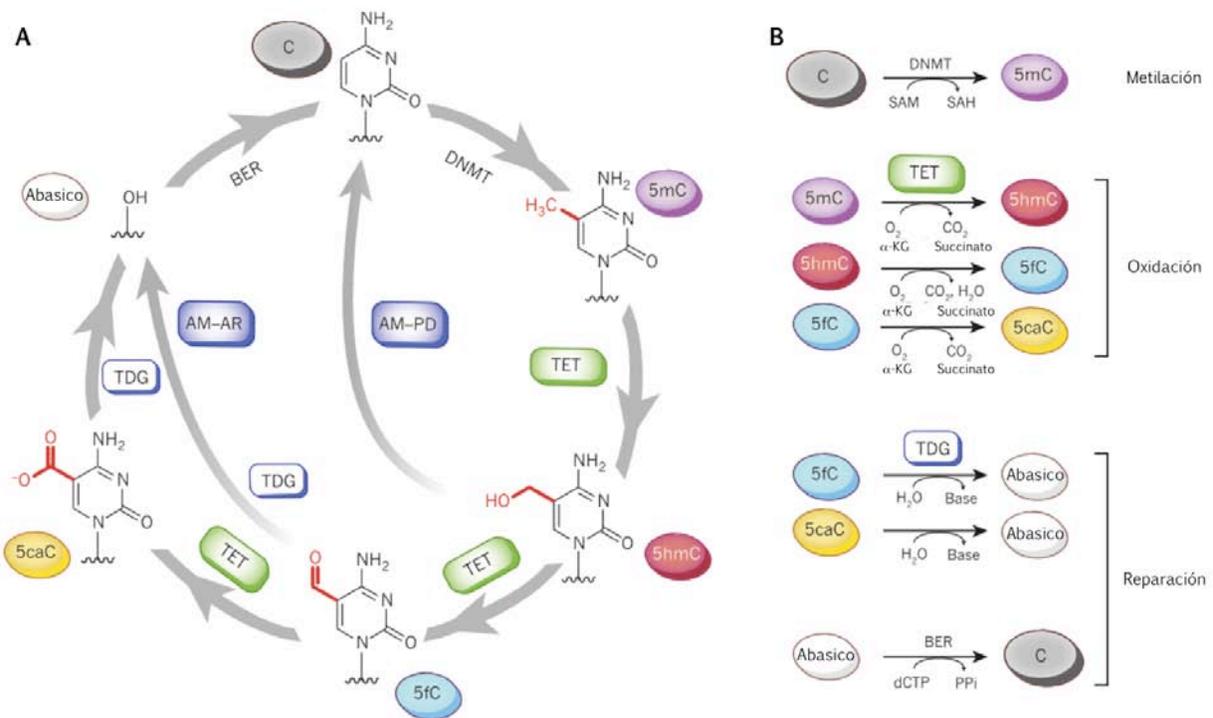
cuales pueden reclutar co-represores para silenciar a un gen determinado (Klose y Bird, 2006).

## 4.2. DESMETILACIÓN DEL ADN

Recientemente, en el 2009, se descubrió que la marca de 5mC también podía pasar por un proceso de oxidación, generando 5-hidroximetilcitosina (5hmC), la cual se encontraba abundantemente en neuronas de Purkinje y células troncales embrionarias (Kriaucionis y Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009).

La 5hmC es producida gracias a la acción de las enzimas TET (*Ten Eleven Translocation* por sus siglas en inglés) a través de oxidaciones que sufre la 5mC. La familia de las enzimas TET esta conformada por tres enzimas (TET1, TET2 y TET3), las cuales se encuentran expresadas en distintos tipos celulares y sus patrones de expresión son excluyentes durante las distintas etapas de desarrollo. Estas enzimas usan el  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) para realizar la reacción y además, cualquiera de las tres enzimas puede realizar la conversión de 5mC a 5hmC, y ésta última oxidarla a 5-formilcitosina (5fC) y después a 5-carboxilcitosina (5caC) (Delatte et al., 2014; Ito et al., 2011). A través de su actividad catalítica, las enzimas TET pueden desmetilar mediante dos vías (**FIG. 17**):

1. Desmetilación pasiva: en la cual existe una dilución de la 5mC a través de divisiones celulares. Al mismo tiempo, debido a la conversión de la 5mC a 5hmC, existe una disminución en la actividad de la DNMT1. Este tipo de desmetilación se ha visto durante la maduración de células germinales primordiales y en cigotos después de la fecundación (Hackett et al., 2013; Inoue y Zhang, 2011; Yamaguchi et al., 2013).



**FIGURA 17. Vía completa de la dinámica de modificaciones que existen en citosinas.** A) Representación integrada de los cambios que sufren las citosinas no modificadas. A través de las DNMT éstas pueden convertirse a 5mC y posteriormente pueden ser oxidadas a través de la acción de enzimas TET por medio de dos vías: la vía de dilución de la marca de 5hmC (AM-PD) a través de divisiones celulares y la vía de restauración activa (AM-AR) en la cual 5hmC se seguirá oxidando por acción de las enzimas TETs hasta su último grado de oxidación y posteriormente por medio de la vía TDG/BER se sustituirá la 5caC por una citosina no modificada. B) Reacciones individuales que ocurren en el proceso de metilación, desmetilación (oxidación) y reparación. Modificada de Kohli y Zhang, 2013.

- Desmetilación activa: la cual consiste en la oxidación completa de la 5mC hasta 5caC. El último estado de oxidación desestabiliza la cadena de ADN y por lo tanto puede ser removida con facilidad por enzimas TDGs creando un sitio carente de base, el cual será reparado por la vía de reparación por escisión de base (BER) que introducirá una citosina sin modificaciones (Delatte et al., 2014; Guo et al., 2011; He et al., 2011b). De manera alternativa, puede ocurrir una desaminación inicial de la 5hmC hacia 5-hidroximetiluracilo (5-hmU), por medio de las enzimas AID/APOBEC y posteriormente continuar por la vía BER (Guo et al., 2011). Este proceso se ha visto abundantemente en células troncales embrionarias de ratón y

es importante para borrar rápidamente los patrones de metilación y mantener listos los genes de pluripotencia para la transcripción (Kohli y Zhang, 2013; Wossidlo et al., 2011).

### **4.3. LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS**

El ADN se encuentra empacado dentro de un complejo formado por proteínas y ácidos nucleicos conocido como cromatina. Su unidad fundamental, el nucleosoma, está formado por aproximadamente 165 pb de ADN enrolladas alrededor de un octámero de histonas (dos de cada una: H2A, H2B, H3 y H4). La cromatina puede ser regulada por medio de diferentes mecanismos como: la metilación del ADN, ARN no codificantes, remodeladores de cromatina dependientes de ATP, variantes de histonas y modificaciones postraduccionales de histonas (Felsenfeld y Groudine, 2003; Kouzarides, 2007).

Las modificaciones postraduccionales de histonas ocurren en los extremos amino de las histonas, las cuales protruyen de la estructura del nucleosoma. Estas modificaciones ocurren en los residuos de aminoácidos que se encuentran accesibles a proteínas reguladoras y por lo tanto pueden resultar en la relajación o compactación de la cromatina. Dentro de las modificaciones que pueden sufrir las histonas se encuentra la metilación de lisinas y argininas, la fosforilación de serinas y treoninas, la ubiquitinación y SUMOilación de lisinas, la acetilación de lisinas y la ADP-ribosilación (Bannister y Kouzarides, 2011; Bannister et al., 2002; Felsenfeld y Groudine, 2003; Peserico y Simone, 2011).

La metilación en las lisinas de histonas a diferencia de las otras modificaciones, puede mono-, di- o tri-metilarse y dependiendo del nivel de metilación y su localización en la histona, representará diferentes resultados a nivel transcripcional. Esta marca, para poder tener un efecto sobre la regulación en la expresión génica, necesita de: 1) proteínas que establezcan la modificación covalente (también llamados *writers*); 2) proteínas que se encarguen de leer esta marca y así reclutar complejos protéicos que efectúen la acción (también

llamados *readers*) y 3) proteínas que puedan eliminar esta marca cuando ya no se requiera la señal (también llamados *erasers*) (Bannister y Kouzarides, 2011; Kouzarides, 2007).

Otra de las modificaciones que también ha representado ser importante para la regulación de la expresión génica es la acetilación de histonas, la cual, a diferencia de la metilación, está asociada únicamente a la relajación de la cromatina, ya que la acetilación neutraliza las cargas positivas de las histonas, convirtiendo las aminos en amidas y reduciendo así la capacidad de las histonas para unirse al ADN.

En conjunto, la presencia de marcas de histonas generará un código que representará la actividad o represión transcripcional de determinados genes y por lo tanto un comportamiento diferente en los diferentes linajes celulares.

#### **4.4. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL Y GLIAL**

Durante la diferenciación de células troncales embrionarias hacia linaje neuronal y glial existe una regulación de las diferentes etapas por las cuales deben pasar estas células, las cuales deben ocurrir de manera coordinada.

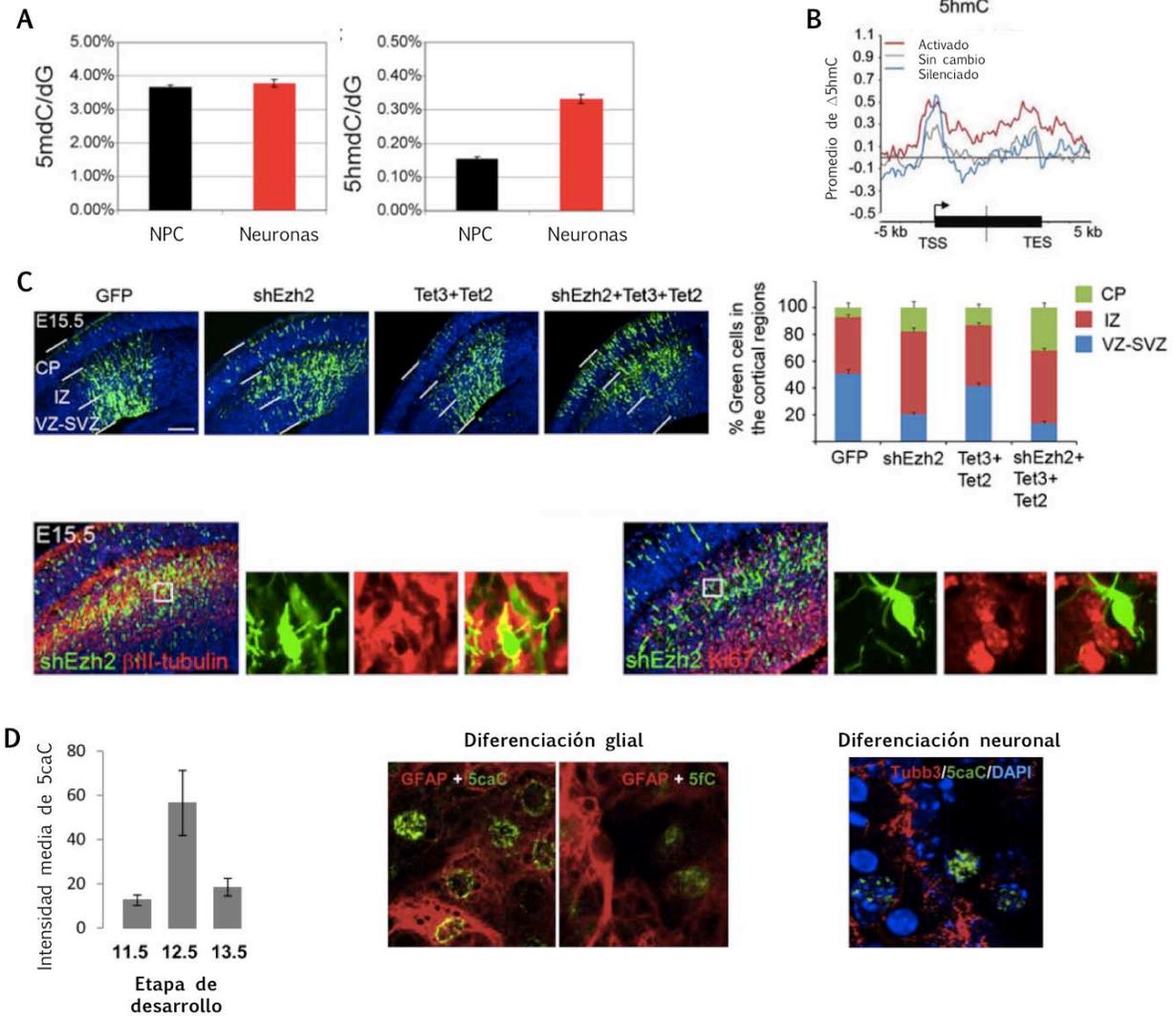
Los primeros mecanismos de regulación epigenética se da en los primeros estadios del desarrollo embrionario. En esta etapa la metilación del ADN juega un papel importante, ya que los patrones de metilación tanto del genoma de la madre como del padre son borrados para establecer la pluripotencialidad de las células que darán origen a un nuevo organismo (Guo et al., 2014; Smith et al., 2014). Conforme el desarrollo avanza, se establecerán de nuevo los patrones de metilación para silenciar genes de pluripotencia y se establecerán dominios bivalentes temporales, los cuales deben estar listos para la activación transcripcional. Éstas marcas están dadas por la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) y la trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3),

las cuales se encuentran en el mismo nucleosoma (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006; Coskun et al., 2012).

Posteriormente, durante el cierre del tubo neural, se ha demostrado que la metilación sigue siendo esencial para el desarrollo del embrión, ya que la delección en las DNMT1 o DNMT3b, resulta en la letalidad del embrión. La ausencia de DNMT3a resulta en la muerte del ratón en el día P30, lo cual indica la importancia de las DNMTs durante el desarrollo (Coskun et al., 2012; Li et al., 1992; Okano et al., 1999). Además, se ha mostrado que la sobreexpresión de la MBP: MeCP2, durante el proceso del cierre del tubo neural, provoca la falta de regionalización de las CTN en el tubo neural ventral y además, adelanta la diferenciación de éstas, provocando la muerte de células tempranamente diferenciadas (Petazzi et al., 2014).

Durante la especificación de las CTPN, debe haber una coordinación de las etapas de diferenciación neuronal y glial (Sauvageot y Stiles, 2002). Bajo un contexto epigenético, se ha visto que existe un reclutamiento de complejos coactivadores con actividad de acetiltransferasas de histonas como p300/CBP (hacia las regiones donde se encuentran los genes *Ngn1* y *Ngn2* (sección 1.1.1. CÉLULAS TRONCALES NEURALES)). Este complejo puede reclutar a su vez acetilasas de histonas y promover el relajamiento de la cromatina e incrementar la actividad transcripcional de estos genes y por lo tanto la diferenciación neuronal. Al mismo tiempo se promoverá la hipermetilación de promotores de genes gliales y el reclutamiento de desacetilasas de histonas, lo cual promoverá el silenciamiento de estos genes (van Heesbeen et al., 2013).

De manera general, se ha sugerido que la desmetilación del ADN podría ser importante durante la diferenciación de CTN hacia linaje neuronal o glial. A pesar de saberse de la presencia abundante de 5hmC en el SNC adulto con respecto a otros tejidos (Jin et al., 2011; Kriaucionis y Heintz, 2009), recientemente se ha sugerido que el proceso de desmetilación también juega un papel importante durante el desarrollo del cerebro.



**FIGURA 18. Correlación de la presencia de 5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina y 5-carboxicitosina sobre la diferenciación neuronal y glial.** Durante el proceso de neurogénesis la marca de 5hmC muestra un incremento que correlaciona con la transición de células progenitoras neurales (NPC) hacia neuronas (A). Este incremento se da exclusivamente sobre el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el cuerpo del gen (B). Durante la neurogénesis se ha demostrado que la marca de 5hmC va de la mano con el establecimiento de las marcas bivalentes y que al haber una baja expresión de Ezh2 y una sobreexpresión de TET2/3, se acelera la migración hacia las regiones más dorsales: placa cortical (CP) y zona intermedia (IZ), lo cual indica que se acelera la diferenciación neuronal al incrementar la marca de  $\beta$ III-Tubulina y bajar la marca de proliferación de CTN (Ki67). Por otro lado, la gliogénesis se ha asociado a un incremento transitorio de la marca de 5caC y 5fC, las cuales se encuentran únicamente en células gliales en proceso de diferenciación. (VZ-SVZ) zona ventricular y subventricular. Modificado de Hahn et al, 2013; Kim et al, 2014; Wheldon et al, 2014.

Por una parte, en la neurogénesis, se ha mostrado durante el paso de CTN hacia neuronas corticales, que existe un incremento de la marca de 5hmC, mientras que 5mC se mantiene constante durante este proceso (FIG. 18A; Hahn

et al., 2013), lo que sugiere que la 5hmC, al no tener una presentar un patrón inverso a la 5mC, actúa de manera independiente a la metilación del ADN y que además es una marca lo suficientemente estable para participar en la regulación epigenética. Durante este proceso, para promover la actividad transcripcional se de genes tejido específico, la 5hmC se encuentra de manera abundante en regiones intragénicas (**FIG. 18B**; Hahn et al., 2013; Kim et al., 2014). Por otro lado, esta marca se ha asociado a marcas bivalentes como la H3K27me3, ya que se ha visto que tanto la enzima Ezh2 encargada de establecer la trimetilación en la lisina 27, como las enzimas encargadas del proceso de desmetilación (TET2 y TET3), trabajan en conjunto para la migración y diferenciación de CTN corticales; por lo tanto, al haber una alteración en la expresión de ambas enzimas, existe una falla en la diferenciación de estas CTN (**FIG. 18C**; Hahn et al., 2013).

En el caso de la diferenciación glial, recientemente se ha relacionado este proceso con los últimos dos intermediarios en la desmetilación del ADN, la 5fC y la 5caC; ya que se ha encontrado una mayor expresión de estas citosinas modificadas durante el proceso de gliogénesis, además de una expresión específica en este linaje celular. La presencia de estos marcadores se ha asociado a la expresión de genes gliales además de que se ha relacionado el proceso de la gliogénesis con el mecanismo de desmetilación dependiente de TDGs (**FIG. 18D**; Wheldon et al., 2014).

Estos reportes en conjunto, destacan la importancia de la regulación de las marcas de histonas, de ADN, su intercomunicación y la función del ambiente para la reprogramación epigenética que determinará la especificación de linaje neural a partir de las células troncales embrionarias.

## IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha mostrado hasta la fecha que el desarrollo de neuronas mDA requiere de un riguroso control de las señales extracelulares, factores de transcripción y regulación de la expresión génica, durante las diferentes etapas de la diferenciación neuronal.

Por un lado, la HA se ha sugerido como un componente importante en el ambiente celular, el cual podría tener un papel durante la diferenciación de CTPN mesencefálicas. Se sabe que la HA al ser administrada intrauterinamente en altas concentraciones en E12, es capaz de disminuir el número de neuronas mDA sin afectar el número total de neuronas tempranas; sugiriendo que la HA ejerce un efecto específico sobre el linaje dopaminérgico. Sin embargo, estos datos no clarifican sobre qué población mDA está actuando la HA, ya sean CTPN, neuronas dopaminérgicas en proceso de diferenciación o una etapa intermedia.

Por otro lado, dentro de los mecanismos más importantes que regulan la diferenciación dopaminérgica, está la regulación de las marcas de histonas y ADN, las cuales interaccionan entre sí para regular la expresión de diferentes genes de manera temporal y así desencadenar el proceso de neurogénesis dopaminérgica. Recientemente, se demostró que la marca 5hmC podría regular y desencadenar el proceso de neurogénesis cortical, probablemente por la interacción con marcas bivalentes. Por lo tanto, este proceso podría extrapolarse a otras regiones del cerebro en desarrollo.

Se sabe poco sobre la regulación de estas marcas epigenéticas dadas por condiciones en el ambiente durante la neurogénesis. Adicionalmente, a pesar de saberse del posible papel de la HA durante la neurogénesis en Mes o en corteza, no existen reportes que demuestren los mecanismos de acción por los cuales ésta amina podría actuar. Estos antecedentes en conjunto, podrían dar indicios de una posible asociación de la HA con la regulación de algunas marcas epigenéticas (como las encargadas en el proceso de desmetilación del ADN) durante el control de la diferenciación hacia linaje dopaminérgico y consecuentemente podría tener implicaciones a largo plazo sobre la formación de la vía SN-ST.

## **V. HIPÓTESIS**

La administración de HA, podría alterar los patrones de metilación y desmetilación en genes de diferenciación dopaminérgica, causando defectos en la diferenciación de progenitores neurales mesencefálicos y así una disminución en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

## **VI. OBJETIVO**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Investigar si existe un cambio en las marcas de metilación e hidroximetilación en el gen que codifica para la enzima limitante en la síntesis de dopamina: TH. Además, analizar las poblaciones dopaminérgicas mesencefálicas que se ven afectadas por la histamina, y determinar los efectos de la administración de esta amina a largo plazo sobre neuronas dopaminérgicas diferenciadas.

### **2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Caracterizar la expresión de los dos receptores histaminérgicos ( $RH_1$  y  $RH_2$ ) con posible función en la diferenciación neuronal en estadios representativos de la neurogénesis en el mesencéfalo; y su expresión en células troncales/progenitoras neurales y neuronas.
2. Investigar sobre qué poblaciones dopaminérgicas tiene efecto la histamina durante el proceso de neurogénesis, mediante la inyección de esta amina en diferentes fases de la diferenciación dopaminérgica.

3. Analizar si existe un cambio en los patrones de metilación e hidroximetilación en el gen de *Th* cuando existe un estímulo de histamina en el mesencéfalo.
4. Evaluar si los cambios de la histamina en etapas tempranas de la neurogénesis se mantienen a largo plazo; hasta la formación de la vía nigro-estriatal.

## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1. ANIMALES

En este estudio se usaron ratas de la cepa Wistar en distintos días de gestación. Estas ratas son apareadas durante 24 h para controlar la edad de los embriones y se mantienen en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en cajas individuales con la temperatura controlada a 23°C y ciclos de luz-obscuridad de 12 h. Los animales tienen acceso libre a alimento y agua. Una vez que se lleva a cabo el procedimiento quirúrgico, las ratas se mantienen en recuperación en el Vivario del Instituto de Fisiología Celular en las mismas condiciones que en el Bioterio. Todos los animales usados en este estudio se adquirieron y manejaron de acuerdo a los lineamientos de los *National Institutes of Health* y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

### 2. INYECCIONES INTRAUTERINAS

Para esta metodología, usamos un sistema de microinyección guiado por una sonda de ultrasonido, la cual permite la manipulación de embriones *in utero*, permitiendo así, el desarrollo posterior dentro de la madre para poder analizar en los días posteriores el efecto de la inyección. Para este trabajo, se analizó el efecto de la HA *in vivo* y se inyectaron intrauterinamente a embriones de E10, E12, E14 y E16.

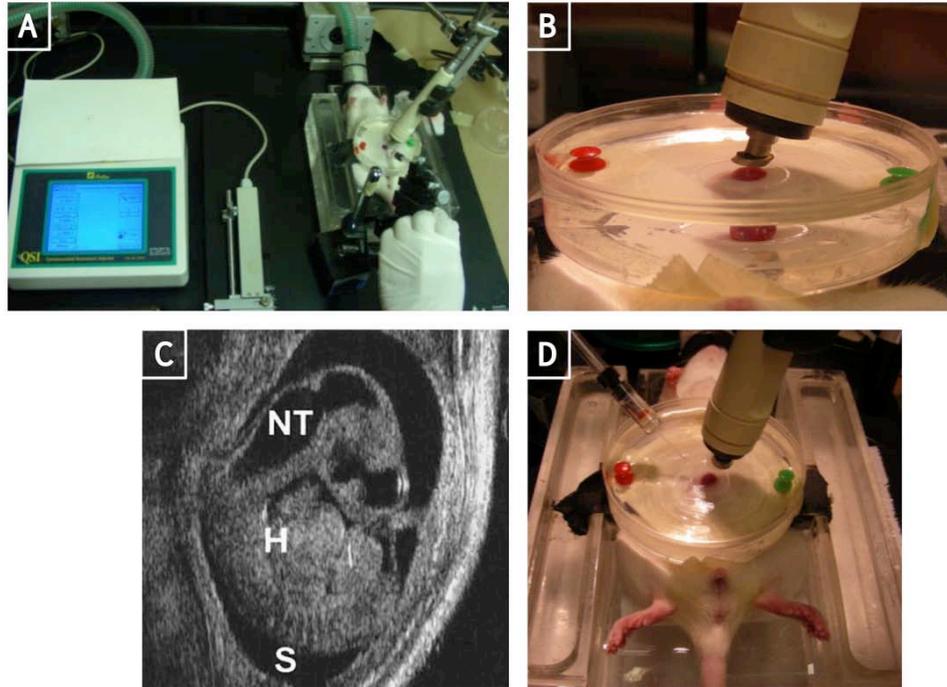
Para poder visualizar a cada embrión durante la cirugía, se utilizó un sistema de ultrasonido MHF-1 Ultraview (E-Technologies) con una sonda que cuenta con una distancia focal de 7 mm y una frecuencia de 35 ó 50 MHz. Previo a la cirugía, es necesario esterilizar el material que se va a usar, por lo que un día antes del procedimiento, se colocó el material necesario en una solución de cloruro de benzalconio.

El día de la cirugía, la rata gestante es anestesiada por medio de inhalación de sevoflurano (5%) en una cámara de inducción. Posteriormente, la rata se coloca en una base de manipulación y se conecta a una manguera por la que se le suministra la anestesia inhalatoria durante toda la cirugía (1%) por medio de un vaporizador. Se corrobora que la rata se encuentre completamente anestesiada observando una postura relajada y falta del acto reflejo al presionar firmemente con una pinza la pata y la cola.

Una vez que la rata se encuentra anestesiada, se rasura el pelo de la región donde se hará la incisión, la piel se limpia con antiséptico y se realiza una laparotomía abdominal para exponer los cuernos uterinos. Una vez expuestos, se registra el número de embriones que hay en cada cuerno uterino, para llevar un control de aquellos embriones que serán inyectados. Posteriormente, se aísla un embrión a través de una caja de Petri con una base de silicón, la cual se llena con PBS 1x estéril a 37°C, para cubrir completamente al embrión, con dos finalidades: poder mantenerlo a una temperatura adecuada y para ser visualizado durante la inyección. Se coloca la sonda de ultrasonido por encima del embrión aislado para registrar una imagen en tiempo real a través de la pared uterina. Se localiza la estructura del cerebro en la pantalla y el sitio donde se realizará la inyección. Las agujas de microinyección se construyen con microcapilares pulidos (capilares de vidrio de borosilicato, 1 x 0.58 mm, Sutter Instruments). La aguja se coloca en el sujetador de un inyector automático y la inyección del fármaco se realiza controlando la velocidad y el volumen de la inyección (**FIG. 19**). Para este estudio se inyectaron 50 µg en 2 µl de HA en los ventrículos laterales y como control se inyectó H<sub>2</sub>O estéril en la misma región.

Una vez que el número deseado de embriones se ha inyectado, ambos cuernos uterinos se regresan al interior de la madre en su posición anatómica original. Para cerrar la cavidad, se suturan con puntos separados las incisiones de la musculatura abdominal y la piel. Finalmente se aplica analgésico (Buprenorfina; 0.1 mg/kg, Pisa Laboratories) y la rata gestante se mantiene en

recuperación el tiempo deseado en una jaula limpia en el Vivario del Instituto de Fisiología Celular. Dos o seis días después de la inyección, se administró eutanasia a las ratas gestantes mediante una sobredosis de anestesia (Pentobarbital Sódico; 63mg/mL, Pfizer).



**FIGURA 19. Proceso de inyección cerebral intrauterina.** (A) Sistema de inyección y ultrasonido que se usa durante la cirugía. Después de que se realiza la laparotomía abdominal y que se cuenta el número de engrosamientos, los cuales corresponden cada uno a un embrión, se aísla un embrión en una caja de petri con PBS 1X a 37°C (B). Por medio de una sonda de ultrasonido es posible observar las diferentes estructuras del embrión, las cuales se transmiten a una computadora (C). En la imagen se muestra el tubo neural (NT), corazón (H) y somitas (S). De esta manera, por medio de un inyector es posible administrar la sustancia deseada en los ventriculos (D).

### 3. HISTOLOGÍA

Los embriones de día E12, E14, E16 y E18 se fijan a 4°C por inmersión con paraformaldehído al 4% en PBS por 6, 24, 48 o 72 h, respectivamente. Posteriormente se crioprotegieron toda la noche con sacarosa al 30% y fueron embebidos en Tissue Tec OTC compound (Sakura), se congelaron a -20°C y se colocaron en el crióstato para cortarlo. Se realizaron cortes sagitales seriados de

20  $\mu\text{m}$  de espesor, los cuales fueron recuperados en laminillas cargadas electrostáticamente (con carga positiva; VWR Micro Slides, 25 x 75 x 1 mm).

#### 4. INMUNOHISTOQUÍMICAS

Para hacer inmunotinciones en los cortes sagitales obtenidos mediante la técnica de criostato, primero se da un lavado al tejido con PBS 1x durante 5 min. Posteriormente, el tejido fue permeabilizado con triton X-100 al 0.3% y se bloquearon posibles uniones inespecíficas del anticuerpo con suero normal de cabra (SNCa) al 10% en PBS. Posteriormente se incubaron con anticuerpo primario diluïdos en PBS con SNCa al 10%, a 4°C o a temperatura ambiente, por 16 h. Se usaron los siguientes anticuerpos:

**TABLA 2. Anticuerpos primarios usados para inmunohistoquímicas.**

Anticuerpo	Origen	Marca	Dilución	Temperatura de incubación
RH <sub>1</sub>	Conejo	Santa Cruz	1:150	25°C
RH <sub>2</sub>	Cabra	Santa Cruz	1:150	25°C
Nestina	Ratón	Millipore	1:500	25°C ó 4°C
Nestina	Ratón	Hibridoma	1:50	25°C ó 4°C
$\beta$ III-Tubulina	Ratón	Covance	1:1000	25°C ó 4°C
Tirosina Hidroxilasa	Conejo	Pel-Freez	1:1000	4°C

Pasadas las 16 h, se retiró el anticuerpo primario y se lavó tres veces el tejido con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1% en PBS. Después se incubó el tejido con anticuerpo secundario diluido en PBS con SNCa al 10% y BSA al 0.1% durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios usados fueron los mostrados en la **TABLA 3**.

Finalmente los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (1 ng/mL; SIGMA). Las inmunotinciones fueron visualizadas con un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse TE2000-U) o un microscopio OLYMPUS BX51WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) y fotografiadas con una cámara digital Nikon (DMX1200

F). Algunas imágenes fueron observadas y fotografiadas a través de un microscopio Confocal Olympus FV1000.

**TABLA 3. Anticuerpos secundarios usados para inmunohistoquímicas.**

Anticuerpo	Origen	Marca	Dilución
Alexa Fluor 594 anti-IgG	Conejo hecho en cabra	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 568 anti-IgG	Ratón hecho en cabra	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 568 anti-IgG	Cabra hecho en burro	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Ratón hecho en cabra	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Conejo hecho en cabra	Molecular Probes	1:500

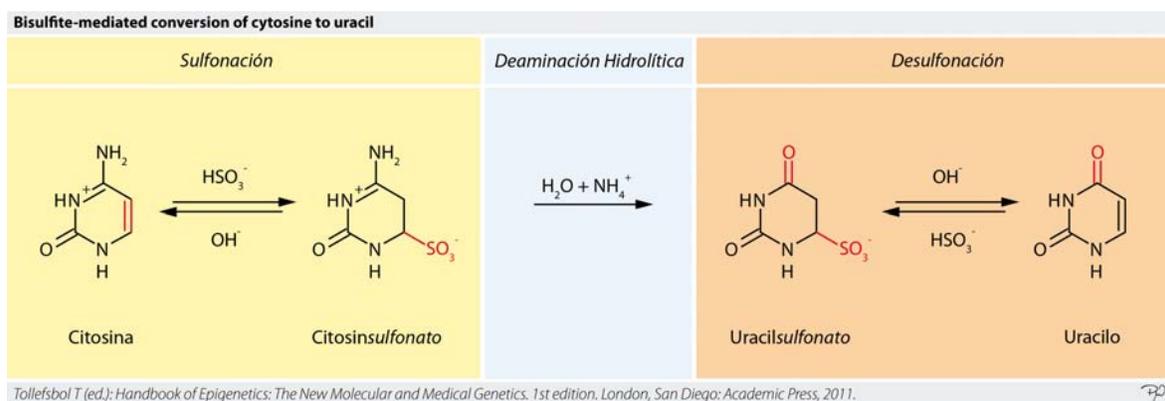
## 5. EXTRACCIÓN DE ADN

Se obtuvo ADN a partir del Mes de embriones de E14 inyectados dos días antes con H<sub>2</sub>O estéril o con HA, de acuerdo al siguiente protocolo:

Se realiza una disección del Mes, se resuspende y se disgrega en buffer de lisis con 200 ng/mL de Proteínasa K a 37°C por 16 h. Posteriormente se agrega una solución cloroformo/alcohol isoamílico (en una relación 49:1) y se homogeneiza la muestra. Se centrifuga a 14000 rpm por 5 min a 4°C y posteriormente se toma la primer fase superior de la solución. Se agrega isopropanol con el fin de precipitar el ADN y hacerlo visible. Se centrifuga a la misma velocidad por el mismo tiempo que en el paso anterior y el ADN se lava con etanol al 70%. Finalmente, después de este último lavado se tira el sobrenadante y el ADN adherido a la pared del tubo se deja secar para quitar residuos de alcohol. El ADN se resuspende a 37°C en H<sub>2</sub>O estéril. Se cuantifican las muestras con la ayuda de un NanoDrop 2000c y determinando la relación A260/A280 se comprueba la pureza de la extracción. Finalmente las muestras se almacenan a -20°C hasta su posterior uso.

## 6. CONVERSIÓN POR BISULFITO DE SODIO Y SECUENCIACIÓN

Esta técnica nos permite identificar, en conjunto con la secuenciación, qué citosinas se encuentran modificadas en un fragmento de ADN de interés. La base de esta técnica es convertir citosinas no modificadas a uracilo, a partir de tres pasos: sulfonación, deaminación y desulfonación (**FIG. 20**). De esta manera, las citosinas modificadas no podrán convertirse de citosina a uracilo y permanecerán como citosina durante la reacción.



**FIGURA 20. Reacción de bisulfito de sodio.** Los pasos limitantes para la conversión por bisulfito de sodio de citosinas no modificadas a uracilos son: la sulfonación, desaminación y desulfonación. Esta conversión no se puede lograr en citosinas modificadas, dado a que no se puede hacer un ataque nucleofílico de parte del ácido sulfónico.

Para poder identificar la secuencia y sus citosinas modificadas, se necesitan varias técnicas, las cuales se describen en seguida:

### 6.1. Conversión por bisulfito de sodio

El ADN extraído se convierte por medio de la técnica de bisulfito de sodio siguiendo las especificaciones que indica el Kit EZ DNA Methylation Kit, (ZYMO RESEARCH® Cat. D5001). Se incuba cada muestra con M-Dilution Buffer y CT Conversion Reagent durante 16 h a 50°C para realizar la sulfonación y deaminación del ADN. Posteriormente, por medio de columnas se lava la muestra, se agrega M-Desulphonation Buffer para desulfonar, se precipita por medio de alcohol y se eluye el ADN en M-Elution Buffer.

## 6.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Para amplificar el fragmento convertido por bisulfito se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para realizar esta técnica se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido de los genes de interés: *Th*, *Oct4* y *Gapdh*. Para diseñar estos oligonucleótidos se tuvieron que tomar en cuenta dos cosas:

1. Los oligonucleótidos se deben de diseñar a partir de la secuencia convertida
2. La secuencia del oligonucleótido debe de estar preferentemente en una región en donde no se encuentren sitios CpG (FIG. 21)

### SECUENCIA INICAL DE NUCLEOTIDOS

```
CCTTAGGAAATCCAGCATGGTCTCCCTGTGTGCCCTGGTGGTTAGAGAGCTCAGCGGTCTCCTGTCCCA
CAGAATACCAGCCAGCCCTGCCCTACGTCGTCGCTCGGGCTGAGGGTGATTAGAGGCAGGTGCCGTGACA
GTGGATGCAATTAGATCTAATGGGACGGAGGCTTTCTCGTCGCCCTCGCTCCATGCCACCCCGCCCTCCCT
CAGGCCACAGCAGGCGTGGAGAGGATGCGCAGGAGGTAGGAGGTGGGGGACCCAGAGGGGCTTTGACGTCAGCC
TGCCCTTTAAAGAGGGCGCTGCCCTGGCGAGGGCTGTGGAGACAGAACTCGGGACCACCAGCTTGCACTATGC
CCACCCCAAGCGCCCTGCCACAGCCCAAGGGCTTCAGAAGGGCGCTCAGAGCAGGATGCCAAGCAGGC
CGAGGCTGTACCGTGGAGGATATGCTGTACCCGGAGGTATCCGGAGCAGCTTTGTACTGTAGATGGG
TGGATACCCAGGCTGGGAGTCTACCCAGCGTCTGGCACTCAGGGTTGGAGTGGTTCTTGGTCCCACTTTGTC
TGAGGGTTAGTTGGGTCTAGCCCTGGTAGATAGTCTGTGCTTGGGTAATGCTTCTGCTGTGCTGCTGCTG
GACTCCGAGAGACAGCCAGTGTCTGTCTCACTACGCCAGCCCTCCTAGGGCTTCTGTGGGTCTAGTTTCAT
GAAGTAGGGGAAATCTCC
```

### MODIFICACION DEL ADN POR BISULFITO

```
TTTTAGGAAATTTAGTATGGTTTTTTTTGTGTGTTTTGGTTGGTTAGAGAGTTTTAGCGGTTTTTTGTTTTA
TAGAATATTAGTTAGTTTTTTTACGTCGTTTCGGGTTGAGGGTGATTAGAGGTAGGTGTTTGTGATA
GTGGATGTAATTAGATTTAATGGGACGGAGGTTTTTTCGTCGTTTTTCGTTTTAGTTAATTTTCGTTTTTT
TAGGTATAGTAGCCGTCGAGAGCATGCCGTAGGAGGTAGGAGTGGGGATTTAGAGGGTTTTGACGTTAGTT
TGGTTTTAAAGAGGGCGTTTTGTTTGGCGAGGGTTGTGGAGATAGAATTCGGGATTTAGTTTGTATTATGT
TTATTTTTAGCGTTTTTTCGTTATAGTTTAAGGGTTTTAGAGGGTCTTTTTAGAGTAGGATGTTAAGTAGGT
CGAGGTTGTTACGGTGGAGGATATGTTGTTATTCGGAGTATTCGGAGTAGTTTTTGTATTGTAGATGGG
TGGATATTTAGGTGGGAGTTTATTTAGCGTTTGGTATTAGGGTTGGAGTGGTTTTTGGTTTTATTTTGT
TGAGGGTTAGTTGGGTTTTAGTTTTGGTAGATAGTTTTGTTTTGGGTAATGTTTTTGTGTGTTTTGTTG
GATTTCCAGAGAGATAGTTAGTTGTTTTTATTACGTTAGTTTTTTTAGGGTTTTTGTGGTTTTAGTTTAT
GAAGTAGGGGAAATTTTT
```

FIGURA 21. Ejemplificación de una secuencia del ADN que se convirtió por medio de bisulfito de sodio. Fragmento del gen *Th* en el cual se muestra la secuencia inicial de nucleótidos y cómo al pasar por la técnica de bisulfito de sodio, las citosinas pasan a ser timinas. En rojo y naranja se muestra la secuencia que se tomará en cuenta para realizar los oligonucleótido sentido y antisentido respectivamente.

Los oligonucleótidos diseñados junto con el tamaño del producto se muestran en la siguiente tabla:

**TABLA 4. Oligonucleótidos usados para la reacción en cadena de la polimerasa después de un tratamiento por bisulfito de sodio.**

Gen	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido	Tamaño
TH	F: 5' GTAGGTGTTTGTGATAGTGGATG 3'	R: 5' AAAACCACTCCAACCCTAAATA 3'	439 pb
OCT4	F: 5' TTAGGGATTTATGGTAGAGGTGA 3'	R: 5' CCAACACCTCTAAACCTAATCC 3'	440 pb
GAPDH	F: 5' GTTTTTGGTTTTTGGGTTTT 3'	R: 5' TTTTCACCTAACACTACACAAAAA 3'	444 pb

Para realizar la PCR, se utilizaron las siguientes cantidades:

**TABLA 5. Diseño experimental para realizar la reacción en cadena de la polimerasa.**

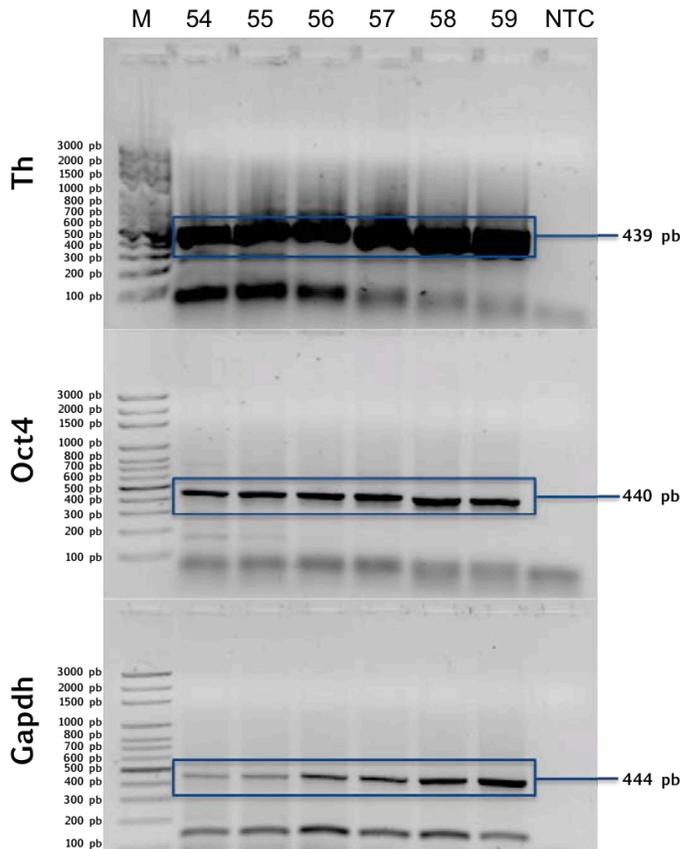
Reactivo	Cantidad
Buffer PCR 10X (20mM Tris-HCl; pH 8.4, 50mM KCl)	3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (2mM)	1.2 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Oligonucleótido Sentido (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Oligonucleótido Antisentido (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
ADN convertido por bisulfito de sodio	1 $\mu$ l
Taq Polimerasa de ADN (1U)	0.1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O estéril	21.7 $\mu$ l
Volumen final	30 $\mu$ l

Previamente, por medio de una estandarización de la temperatura media ( $T_m$ ) se obtiene la banda deseada de manera óptima para cada gen. La temperatura más adecuada para los tres genes fue a 59°C, por lo tanto la reacción de polimerización se realizó a esta temperatura. Los productos se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (**FIG. 22**). Se corta de los productos de amplificación deseados (ver **TABLA 3**) y se realiza una extracción de ADN.

### **6.3. Extracción de ADN a partir de fragmentos de un gel de agarosa.**

De las bandas obtenidas después de la amplificación por PCR se realizó una extracción de ADN del gel de agarosa siguiendo las especificaciones que indica el Kit QIAEX® II Gel Extraction Kit, (QIAGEN® Cat. 20021). Se incubó el fragmento de agarosa con el ADN en Buffer QX1 y se agregan 5  $\mu$ l de perlas, las cuales ayudarán a la purificación del ADN. Se incubó la muestra por 10 min a 50°C para solubilizar la agarosa y unir el ADN con las perlas. Se realizan lavados con

Buffer QX1 y Buffer PE el cual contiene etanol y permitirá la precipitación del ADN. Se eliminan los residuos de alcohol por evaporación y posteriormente se solubiliza el ADN en H<sub>2</sub>O esteril a 50°C. Se centrifuga la muestra a 13000 rpm y se recupera el sobrenadante.



**FIGURA 22. Estandarización de las temperaturas medias óptimas para amplificar las secuencias de los genes *Th*, *Oct4* y *Gapdh* convertidas por bisulfito de sodio.** Los números 54, 55, 56, 57, 58 y 59 indican las temperaturas en°C a las que se probó la reacción de PCR. Se puede observar que la temperatura ideal en donde se observó una banda de 439, 440 o 444 pb, respectivamente, fue a 59°C para los tres genes. Las bandas que se encuentran en la parte inferior de cada gel representan los dímeros de oligonucleótidos que se dieron durante la reacción. (M) marcador de peso molecular; (NTC), control sin templado.

#### 6.4. Ligación de fragmentos de ADN a un plásmido.

El ADN purificado se inserta en el plásmido pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (PROMEGA Cat. 3600) con resistencia a ampicilina, de acuerdo a las especificaciones del kit. Para realizar la reacción de ligación de cada gen se usaron las siguientes cantidades de los reactivos del kit:

**TABLA 6. Diseño experimental para realizar la reacción de ligación.**

Reactivo	Cantidad
Buffer de ligación rápido 2x	5 $\mu$ l
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector (50 ng)	1 $\mu$ l
Ligasa de ADN T4 (3U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Aforar con H <sub>2</sub> O estéril a un volumen de	10 $\mu$ l

La ligación se realiza en una relación 3:1 (inserto:plásmido). Para saber cuántos ng/ $\mu$ l se necesitan por tamaño de fragmento purificado se usa la siguiente fórmula:

$$\frac{(ng \text{ de vector})(\text{tamaño en kb del inserto})}{\text{tamaño en kb del vector}} \times \frac{3}{1} = ng \text{ del inserto}$$

Los cálculos para los genes usados fueron los siguientes:

1. *Th*

$$\frac{(50 \text{ ng}/\mu\text{l})(0.439 \text{ kb})}{3.015 \text{ Kb}} \times \frac{3}{1} = 21.84 \text{ ng}/\mu\text{l del inserto}$$

2. *Oct4*

$$\frac{(50 \text{ ng}/\mu\text{l})(0.440 \text{ kb})}{3.015 \text{ kb}} \times \frac{3}{1} = 21.89 \text{ ng}/\mu\text{l del inserto}$$

3. *Gapdh*

$$\frac{(50 \text{ ng}/\mu\text{l})(0.444 \text{ kb})}{3.015 \text{ kb}} \times \frac{3}{1} = 22.09 \text{ ng}/\mu\text{l del inserto}$$

Se mezcla la reacción y se incuba por 1 h a temperatura ambiente y por 16 h a 4°C. Posteriormente se almacenan las muestras a -20°C hasta requerir su uso.

## **6.5. Transformación de bacterias competentes por medio de choque térmico.**

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 $\alpha$  competentes por cloruro de rubidio con 5  $\mu$ l de la reacción que contiene el plásmido ligado con el inserto deseado. Se incuban por 30 min a 4°C y posteriormente se transforman las bacterias por medio de un choque de calor por 1 min a 42°C, se dejan a 4°C por 2 min y posteriormente se recuperan por 1h a 37°C en medio LB sin ampicilina. Transcurrido el tiempo se centrifugan los tubos con las bacterias a 5000 rpm por 5 min y se siembran en cajas de petri con medio LB/Agar con 100  $\mu$ g/ $\mu$ l de ampicilina. Las bacterias se dejan crecer por 16 h a 37°C y se seleccionan 8 colonias independientes que presentan resistencia a ampicilina. Se amplifica el número de bacterias de dichas colonias en 10 mL de medio LB con 100  $\mu$ g/ $\mu$ l de ampicilina durante 16 h a 37°C y posteriormente se purifican los plásmidos incorporados a las bacterias.

## **6.6. Purificación de plásmidos de ADN por Miniprep**

Se centrifugan las bacterias obtenidas en la amplificación y se purifican los plásmidos de ADN siguiendo las especificaciones que indica el Kit QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN<sup>®</sup> Cat. 27106). Se resuspende el pellet de bacterias en Buffer P1 con RNasa A, se agrega Buffer P2 para romper las paredes celulares de la bacteria y se invierte la muestra de 4-6 veces. Se neutraliza la reacción con Buffer N3 y se centrifuga a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante se transfiere a una columna y se centrifuga de nuevo a 13000 rpm por 1 min para concentrar el ADN en la columna. Posteriormente se lava y precipita con Buffer PE. Se remueven los residuos de etanol y se eluye el ADN en H<sub>2</sub>O estéril. Se cuantifican las muestras con la ayuda de un NanoDrop 2000c y determinando la relación A260/A280 se comprueba la pureza de la extracción. Finalmente las muestras se almacenan a -20°C hasta su posterior uso.

### 6.7. Identificación de fragmentos insertados en un plásmido a partir de digestiones enzimáticas.

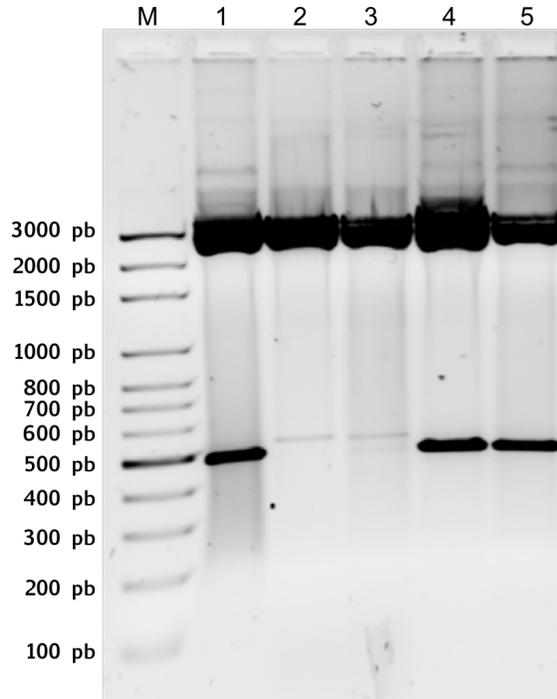
Antes de secuenciar los fragmentos insertados en el plásmido se verifica la presencia de la banda con el tamaño esperado de los genes amplificados por PCR. Para ello se realizó una digestión enzimática para ambos extremos del sitio multiclonal donde se insertó el fragmento. Basados en el mapa del plásmido, se realizó una digestión con 2U de la enzima EcoR I (NEW ENGLAND Bio Labs® Cat. R0101S) por 1 µg de plásmido purificado. Se usaron las siguientes cantidades para realizar la reacción:

**TABLA 7. Diseño experimental para digestión enzimática.**

Reactivo	Cantidad
10X EcoR I Reaction Buffer	2 µl
EcoR I (2U)	0.1 µl
Aforar con H <sub>2</sub> O estéril a un volumen de	20 µl

La digestión se incubó a 37°C por 2 h y transcurrido el tiempo se corrió un gel al 1% de agarosa para verificar la digestión. Una vez que se verificó que se encontraba el inserto del tamaño del fragmento deseado (**FIG. 23**) se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

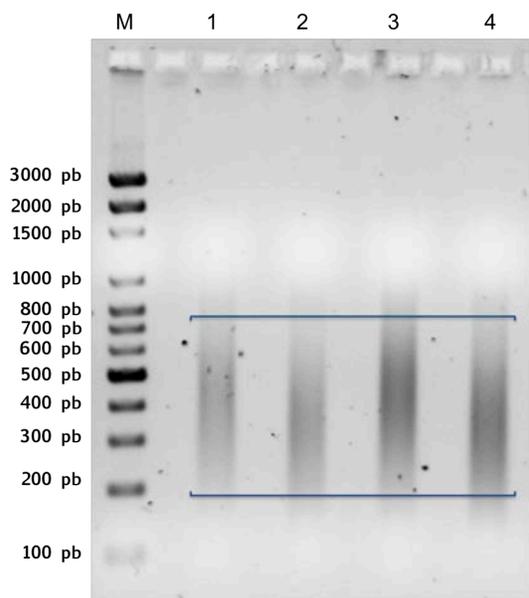
**FIGURA 23. Ejemplificación de una digestión enzimática.** Se corrió un gel de agarosa al 1% en el cual se cargaron digestiones enzimáticas de plásmidos purificados. Los números (1, 2, 3, 4 y 5) representan colonias independientes. Como se puede observar, las colonias 1, 4 y 5 tenían en sus plásmidos los fragmentos de interés, con peso entre 400 y 500 pb; mientras que para las colonias 2 y 3 no es claro. A la izquierda del gel se puede ver el peso al que corresponden las bandas del marcador de peso molecular (M).



## 7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE ADN METILADO E HIDROXIMETILADO

Se extrae el ADN del Mes de embriones de E14 y cada muestra se trata con 2  $\mu$ l de GenDNA RNase (*DNase-free*) por 1 ml de muestra de ADN y se incuba 1 h a 37°C. Posteriormente se realiza de nuevo una purificación de ADN a cada muestra. Cada muestra debe quedar a una concentración de 0.06  $\mu$ g/ $\mu$ l.

El ADN se sonica con la finalidad de obtener fragmentos de entre 100-600 pb. El programa de sonicación es de 30 seg, amplitud de 35%, *pulse on* de 5 seg, *pulse off* de 3 seg y se realiza de 2 a 3 veces. Se utilizó un sonicador Ultrasonic Processor (GENEQ, GEX500 Cat. SOVC505-00). Para verificar la formación de fragmentos de ADN del rango de tamaño deseado, se corre un gel de agarosa al 1% con las muestras deseadas (**FIG. 24**).



**FIGURA 24. Ejemplo de 4 muestras sonicadas.** Los números (1, 2, 3, y 4) representan muestras sonicadas al mismo tiempo, en donde se encuentran fragmentos de entre 200 y 700 pb. (M) marcador de peso molecular.

La inmunoprecipitación de ADN metilado o hidroximetilado (MeDIP o hMeDIP) se realiza siguiendo las especificaciones que indica el Kit MagMeDIP Kit (DIAGENODE® Cat. C02010021):

Preparación de perlas magnéticas. Se lavan las perlas magnéticas (Magbeads) con *bead wash buffer* y se almacenan a 4°C.

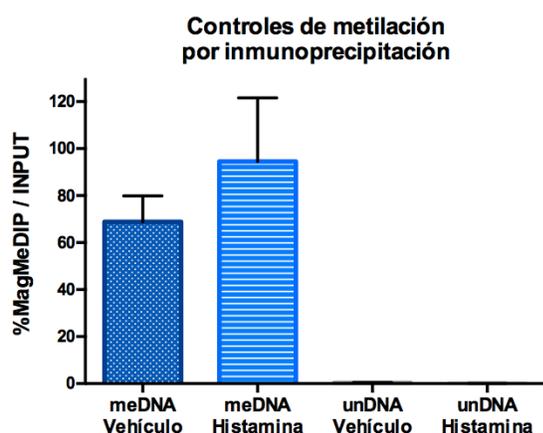
Preparación de la mezcla de inmunoprecipitación (IP). Para realizar la IP se realiza la siguiente mezcla con las siguientes cantidades consideradas para una IP:

**TABLA 8. Diseño experimental para realizar la mezcla de inmunoprecipitación.**

Reactivo	Cantidad
H <sub>2</sub> O estéril	37 µl
MagBuffer A	24 µl
MagBuffer B	6 µl
Control de ADN metilado (meDNA)	1.5 µl
Control de ADN no metilado (unDNA)	1.5 µl
Muestra de ADN (1.2 µg)	20 µl
Volumen final	90 µl

El control de ADN metilado (meDNA) y el control de ADN no metilado (unDNA) que se agregan a todas las muestras servirán como controles internos, que indicarán la eficiencia de los anticuerpos (**FIG. 25**). Se necesitan 1.2 µg de ADN sonificado por IP.

La muestra se incuba por 3 min a 95°C para permitir que se separen las cadenas de ADN y posteriormente se incuba por 1 min a 4°C.



**FIGURA 25. Eficiencia de anticuerpo por inmunoprecipitación con respecto a los controles internos.** En la gráfica se muestra el porcentaje de amplificación con respecto al INPUT de las muestras (vehículo o histamina) adicionadas con los controles internos meDNA y unDNA. Se puede apreciar que el anticuerpo de anti-5mC pudo inmunoprecipitar el control interno de meDNA, pero no genera señal de unDNA; lo que nos dice que el anticuerpo es altamente específico.

Antes de agregar el anticuerpo se recolectan 7.5 µl de cada mezcla, que corresponde al 10% del INPUT, es decir, la cantidad total de ADN sin inmunoprecipitar o el control de material de inicio. Las muestras se almacenan a -20°C hasta la evaluación por qPCR.

Preparación de anticuerpo. Se usaron los siguientes anticuerpos para la IP:

**TABLA 9. Anticuerpos usados para el inmunoprecipitación de ADN metilado e hidroximetilado.**

Anticuerpo	Origen	Marca	Concentración
5mC	ratón	Diagenode	2 µg/IP
5hmC	ratón	Diagenode	2.5 µg/IP

Se realiza la siguiente mezcla para diluir los anticuerpos para las IPs:

**TABLA 10. Preparación de anticuerpos para la inmunoprecipitación.**

Reactivo	Cantidad
Anticuerpo	0.30 $\mu$ l
MagBuffer A	0.60 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O estéril	2.10 $\mu$ l
MagBuffer C	2.00 $\mu$ l
Volumen final	5.00 $\mu$ l

Mezcla final de IP. Se mezclan los 75  $\mu$ l de la mezcla de IP, 5  $\mu$ l de la mezcla con el anticuerpo y 20  $\mu$ l de perlas lavadas previamente. Se deja en incubación por 21 h a 4°C en rotación constante.

MeDIP/hMeDIP. Se colocan los tubos con la mezcla final de IP en una gradilla magnética y se espera 1 min hasta que las perlas se concentren en un punto. Se descarta el sobrenadante y se realizan 3 lavados con MagWash Buffer-1 y un lavado con MagWash Buffer-2. Para cada lavado se deben colocar los tubos en la gradilla magnética y esperar a que se concentren.

Recuperación de ADN. Las muestras inmunoprecipitadas y lavadas junto con los INPUTs de cada muestra son tratadas con 100  $\mu$ l de Buffer para aislar ADN (DIBuffer) y 1  $\mu$ l de proteínasa K (incluida en el kit). Incubar por 15 min a 55°C y posteriormente por 15 min a 100°C. Centrifugar las muestras a 14000 rpm por 5 min a 4°C y transferir los sobrenadantes a un tubo nuevo. Almacenar a -20°C hasta su posterior uso.

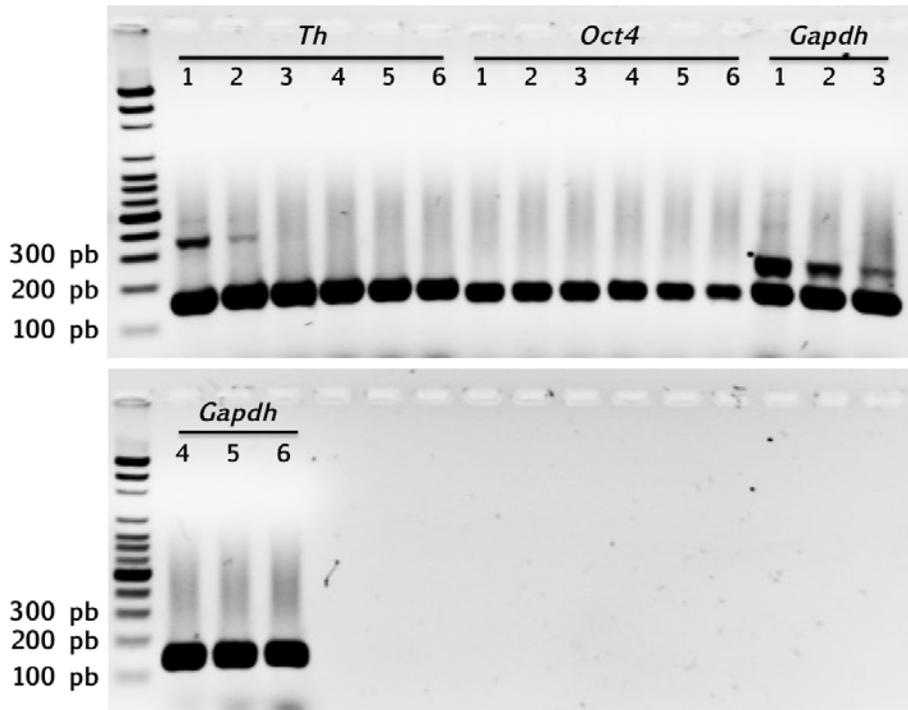
## **8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVO**

Para poder analizar la cantidad de ADN inmunoprecipitado se realiza una PCR cuantitativa (qPCR). Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

**TABLA 11. Oligonucleótidos usados para analizar las inmunoprecipitaciones de ADN metilado e hidroximetilado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.**

Gen	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido	Tamaño
TH	F: 5' GAGACAGAACTCGGGACC 3'	R: 5' CGGGTGACAGCATATCCTC 3'	145 pb
OCT4	F: 5' CGTCCCAACCTCAGTCTT 3'	R: 5' TCCCAATCCCACCCTCTA 3'	132 pb
GAPDH	F: 5' CTCATCCGGTCACTTCTC 3'	R: 5' GTAGCTGGGCCTCTCTCAT 3'	143 pb

Previo a la realización de la qPCR se estandariza la  $T_m$  óptima para cada par oligonucleótidos de cada gen, mediante una PCR convencional (FIG. 26).



**FIGURA 26. Estandarización de las temperaturas medias para los oligonucleótidos usados durante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.** Los números (1-6) muestran las diferentes temperaturas a las que se estandarizaron: 56°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C y 66°C, respectivamente. Se puede observar que la temperatura óptima a la cual sólo se amplifica una banda para *Th* (145 pb), *Oct4* (132 pb) o *Gapdh* (143pb), es a 62°C (4) por lo tanto se utilizó esa temperatura para analizar los ensayos de MeDIPs/hMeDIPs.

Para cada reacción de qPCR se realiza la siguiente mezcla:

**TABLA 12. Diseño experimental para realizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.**

Reactivo	Cantidad
SYBR-GREEN 1X	10 µl
Oligonucleótido Sentido (10 µM)	1 µl
Oligonucleótido Antisentido (10 µM)	1 µl
IP	5 µl
H <sub>2</sub> O estéril	3 µl
Volumen final	20 µl

Durante la qPCR, también se validan los oligonucleótidos. Para ello, se realiza una curva estándar con diluciones del INPUT 0.1%, 1% y 10% y se agrega la misma cantidad de INPUTs diluidos para las qPCRs (5 µl). La reacción de polimerización se realiza a 62°C (datos obtenidos en la PCR convencional; **FIG. 26**).

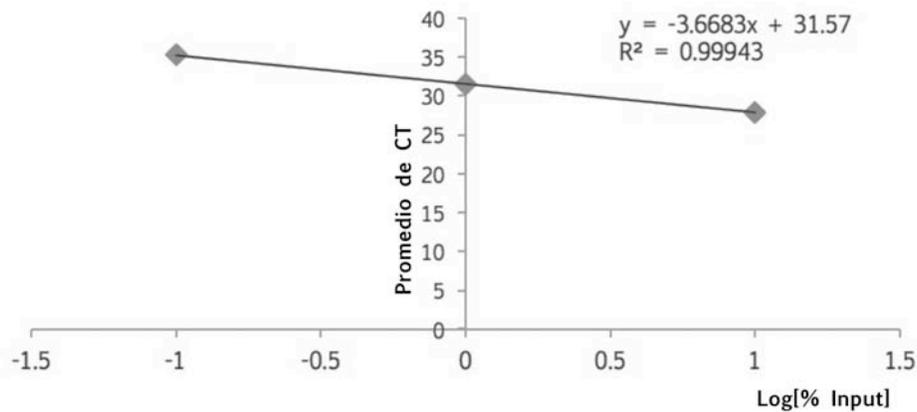
Una vez terminada la reacción, se grafican los umbrales de ciclo (*threshold cycle* por sus siglas en inglés; CTs) obtenidos contra el log[% INPUT], la pendiente y la ecuación resultante de esta gráfica nos permitió obtener la eficiencia de amplificación (EA; **ECUACIÓN 1**), la cual, para poder analizar los datos obtenidos, debe ser cercana a dos (**FIG. 27**).

$$EA = 10^{-1/m} \quad \text{(ECUACIÓN 1)}$$

Donde:

m: pendiente de la recta

EA: eficiencia de amplificación



**FIGURA 27. Ejemplo de una gráfica obtenida a partir de una curva estándar de INPUT.** Las concentraciones usadas fueron 0.1%, 1% y 10%. Una relación ( $R^2$ ) cercana a 1 permitirá que la eficiencia de amplificación (EA) sea a su vez cercana a 2 y por lo tanto se obtendrán datos confiables de las reacciones de amplificación durante la PCR.

Posteriormente se obtuvo el porcentaje en el que amplificaron las IPs obtenidas con respecto al porcentaje del INPUT, el cual indica la eficiencia de inmunoprecipitación con respecto al material inicial y se calcula de la siguiente manera (**ECUACIÓN 2**):

$$\% \text{ Input} = EA^{(CT \text{ Input} - CT \text{ IP})} (FD)(100) \quad \text{(ECUACIÓN 2)}$$

Donde:

FD: Factor de dilución del INPUT con el cual se compararon las IPs.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron tres experimentos independientes de diferentes ratas preñadas. Todos los datos son presentados como la media  $\pm$  error estándar de la media. Se realizó una prueba *t-student* para cada gen con el fin de comparar entre grupos tratados con HA y grupos control. Las gráficas fueron generadas usando el software de GraphPad Prism.

## VIII. RESULTADOS

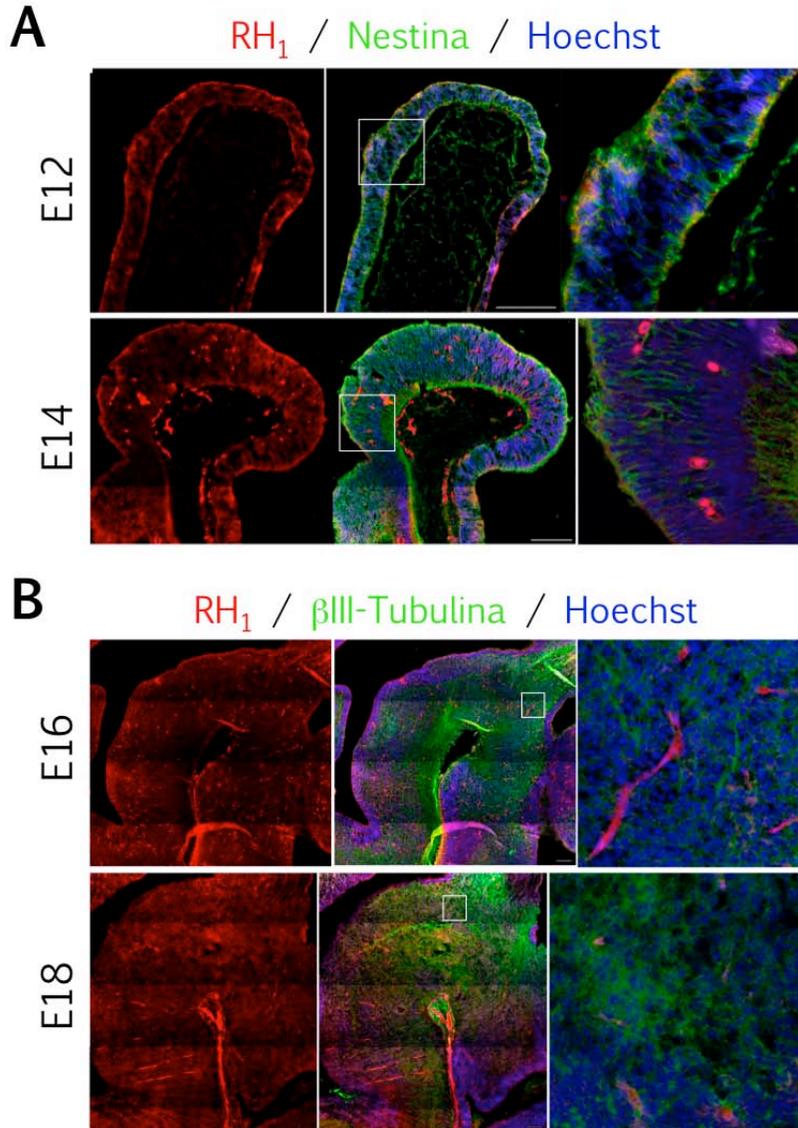
### 1. LOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS $RH_1$ Y $RH_2$ SE ENCUENTRAN DISTRIBUÍDOS A LO LARGO DEL DESARROLLO DEL MV EN LA RATA.

Previamente se había demostrado mediante hibridación *in situ* la presencia de los tres receptores histaminérgicos a lo largo del desarrollo de la rata a partir de E14 para el  $RH_1$  y a partir de E15 para los  $RH_2$  y  $RH_3$  (Karlstedt et al., 2001, 2003; Kinnunen et al., 1998). Además, mediante RT-PCR y Western-Blot se mostró la presencia del receptor  $RH_1$  y  $RH_2$  únicamente en E12 (Escobedo-Avila et al., 2014). Sin embargo, se desconoce la localización de estos receptores en diferentes poblaciones celulares durante el proceso de la neurogénesis a lo largo del Mes.

Por tal motivo, como primer objetivo, se analizó mediante inmunohistoquímicas, la presencia de los receptores  $RH_1$  y  $RH_2$  debido a que la activación de éstos han tenido un efecto sobre CTPN (Escobedo-Avila et al., 2014; Molina-Hernández y Velasco, 2008). Estos receptores fueron analizados en embriones de rata, durante cuatro etapas representativas de la neurogénesis en Mes:

- E12 para etapas previas a la mayor producción de neuronas, donde se espera encontrar una población heterogénea de CTPN comprometidas a un linaje en particular y células en proceso de diferenciación.
- E14 para el pico de mayor producción de neuronas en Mes, donde se espera encontrar una población heterogénea de poblaciones de CTPN comprometidas, células en proceso de diferenciación y neuronas tempranamente diferenciadas.
- E16 para neurogénesis tardía, donde se espera una población homogénea de neuronas diferenciadas.

- E18 para etapas representativas de maduración y mantenimiento del linaje neuronal



**FIGURA 28.** Expresión del RH<sub>1</sub> durante cuatro etapas representativas de la neurogénesis en mesencéfalo. Existe una expresión continua y homogénea del RH<sub>1</sub> durante la formación del Mes (rojo; E12, E14, E16 y E18). (A) Este receptor solo se observó en células progenitoras neurales positivas a Nestina (verde; ver acercamiento) y (B) no en neuronas tempranamente diferenciadas positivas a βIII-Tubulina (verde; ver acercamiento). Barra de escala: 500 μm.

Estas inmunohistoquímicas se hicieron a la par con anticuerpos que identificasen poblaciones celulares específicas, con el fin de analizar que poblaciones celulares expresaban estos receptores. Por un lado, para etapas tempranas (E10 y E12) se analizó la coexpresión de estos receptores con células positivas al marcador Nestina (marcador de CPN; **FIG. 28A**); y por otro lado, para

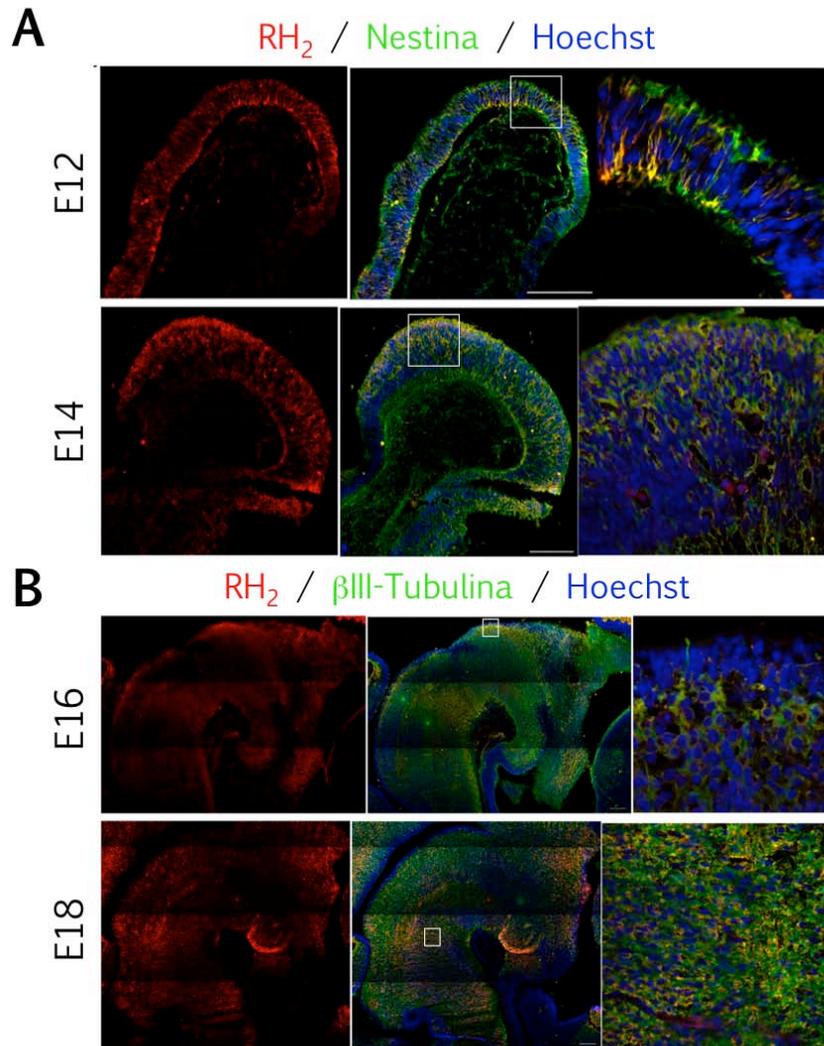
etapas tardías (E14 y E16) se analizó la colocación de los receptores con poblaciones positivas a  $\beta$ III-Tubulina (marcador de neuronas tempranamente diferenciadas; **FIG. 28B**).

Se logró observar que para el  $RH_1$ , durante los cuatro estadios representativos, éste se expresaba de manera uniforme en todo el Mes. Cuando se analizó qué tipo celular expresaba este receptor, se pudo observar que solamente en etapas tempranas colocalizaba con CPN marcadas con Nestina (**FIG. 28A**). Sin embargo, en etapas tardías, a pesar de que este receptor se expresaba en el Mes, no colocalizó con neuronas positivas a  $\beta$ III-Tubulina (**FIG. 28B**). Estos resultados sugieren un posible papel del receptor  $H_1$  sobre CTPN en etapas tempranas del desarrollo del Mes.

Cuando se investigó sobre la presencia del  $RH_2$ , se observó que durante el desarrollo del Mes este receptor se concentraba en regiones muy particulares. En E12 y E14, se presenta una distribución homogénea a lo largo del Mes (**FIG. 29A**). Sin embargo, para el día E16 y E18, la presencia de este receptor se encontraba en regiones más dorsales (**FIG. 29B**); además, conforme el desarrollo avanza, la presencia de este receptor también se da en regiones posteriores muy cercanas al romboencéfalo. Por otro lado, cuando se analizó la co-expresión de este receptor con marcadores de CPN o neuronas, se pudo observar que, a diferencia del receptor  $RH_1$ , este receptor se expresaba tanto células marcadas con Nestina, así como con  $\beta$ III-Tubulina (**FIG. 29**).

Estos resultados sugieren que la HA podría tener funciones diferentes dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre dado a la expresión diferencial de los RHs tanto de manera regional como celular.

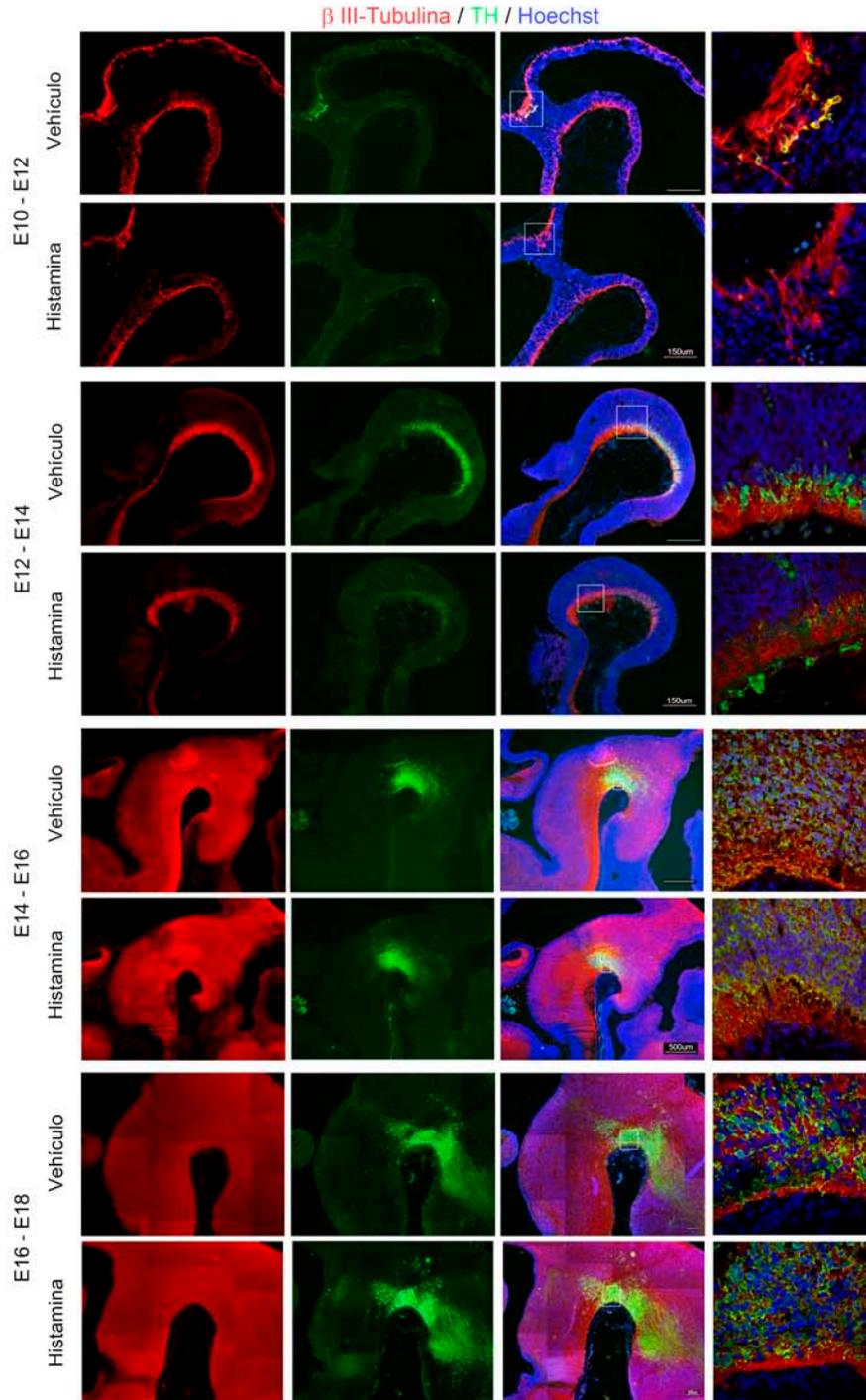
**FIGURA 29.** Expresión del  $RH_2$  durante cuatro etapas representativas de la neurogénesis en mesencéfalo. (A) Durante las primeras etapas de la neurogénesis (E12) la expresión de este receptor se da de manera homogénea a lo largo del mesencéfalo. (B) Conforme el desarrollo avanza, su expresión se concentra en regiones más dorsales (E14 y E16). Finalmente, para el día E18, su expresión se limita a regiones dorsales y posteriores muy cercanas al rombencéfalo. Este receptor colocalizó en los días analizados con células positivas a Nestina y  $\beta$ III-Tubulina (ver acercamientos). Barra de escala: 500  $\mu$ m.



## 2. LA HISTAMINA EJERCE SU FUNCIÓN EN ETAPAS TEMPRANAS DURANTE LA NEUROGÉNESIS DOPAMINÉRGICA EN EL MESENCÉFALO DE LA RATA.

Dado que recientemente se demostró que la inyección intrauterina de la HA disminuye el número de neuronas dopaminérgicas en E14, era importante saber si este efecto se daba de manera general sobre cualquier población dopaminérgica del Mes, es decir, CTPN y neuronas diferenciadas; o si el efecto era específico sobre alguna de estas dos poblaciones. Por tal motivo, se inyectaron intrauterinamente 50  $\mu$ g de HA en los ventrículos de embriones de rata en estadios representativos del proceso de neurogénesis dopaminérgica (E10, E12, E14 y E16) y posteriormente estos embriones se dejaron desarrollar por 48 h.

Una vez cumplido el tiempo, los embriones fueron recuperados y para detectar a la población dopaminérgica, por medio de inmunohistoquímicas se analizó la presencia de la enzima limitante en la síntesis de DA: TH.



**FIGURA 30. Expresión de tirosina hidroxilasa en cuatro diferentes etapas de la neurogénesis en mesencéfalo al inyectar intrauterinamente histamina.**

Los embriones se analizaron dos días después de la inyección. Se puede observar que la adición intrauterina de HA durante E10 y E12 (ver aumentos) es capaz de disminuir la expresión de TH (neuronas dopaminérgicas; verde). Sin embargo, no se observó alguna disminución en la expresión de esta enzima al realizar una inyección con HA en días tardíos de la neurogénesis (E14 y E16). Barra de escala de 150 µm y 500 µm.

Los resultados mostraron que cuando se inyectaba HA en estadios tempranos del proceso de neurogénesis, ésta era capaz de disminuir total o parcialmente la expresión de TH (E12 y E14, respectivamente). En E16 y E18, no se observó ninguna diferencia en la presencia de TH en los embriones inyectados con HA comparados con los inyectados con vehículo. Adicionalmente, la expresión de  $\beta$ III-Tubulina (un marcador de neuronas tempranas), no cambio en ningun estadio en los embriones inyectados con HA comparados con los inyectados con vehículo (**FIG. 30**). Estos datos sugieren que el efecto de la HA se da en etapas tempranas de la neurogénesis, probablemente sobre CTPN dopaminérgicos mesencefálicos.

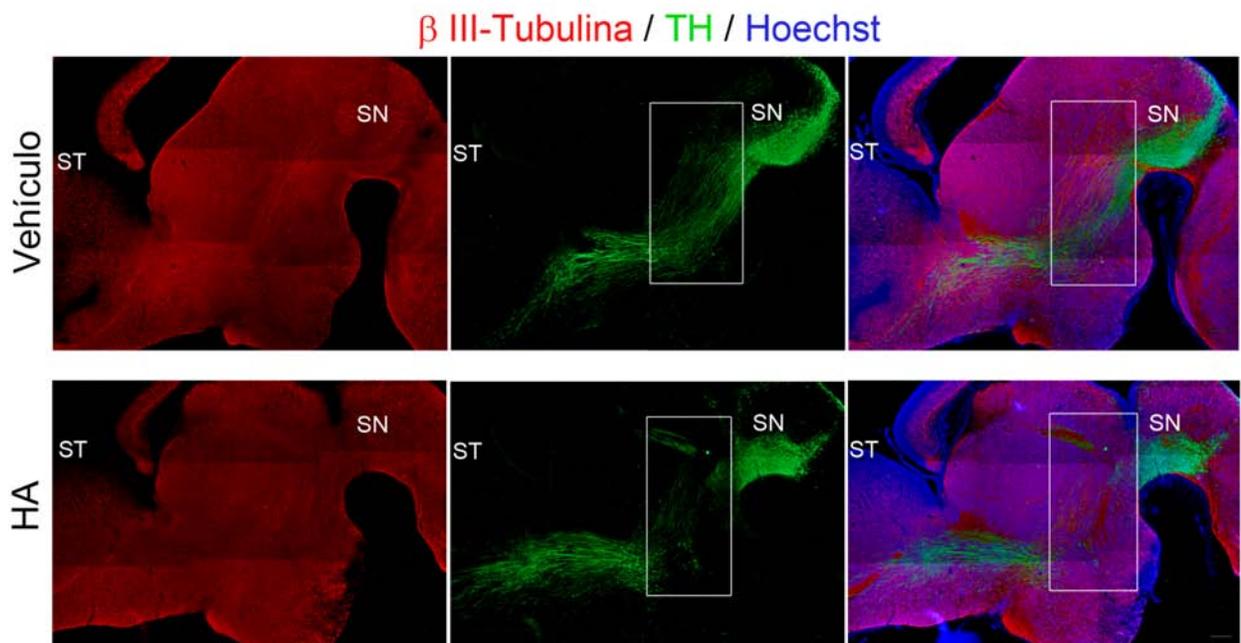
### **3. LA ALTERACIÓN QUE SUFRE LA POBLACIÓN DOPAMINÉRGICA DEBIDA A UN ESTÍMULO CON HISTAMINA SE MANTIENE A LARGO PLAZO Y ALTERA LA FORMACIÓN DE LA VÍA NIGRO-ESTRIATAL.**

Se sabe que en la etapa adulta, el sistema histaminérgico y el dopaminérgico en conjunto juegan un papel importante en mantener la vía SN-ST, ya que se ha demostrado que un aumento en la concentración de esta amina, coincide con la muerte de las neuronas dopaminérgicas y la enfermedad de Parkinson (Anichtchik et al., 2000; Panula y Nuutinen, 2013; Rinne et al., 2002).

Por tal motivo, nos propusimos investigar si el efecto de la HA sobre poblaciones dopaminérgicas tempranas tenía una consecuencia a largo plazo, afectando la formación de la vía SN-ST.

Para poder lograr este objetivo, se inyectaron intrauterinamente embriones de rata en E12 con 50  $\mu$ g/2  $\mu$ l de HA. Posterior a la inyección, los embriones se dejaron desarrollar por 6 días más para permitir la formación de la vía SN-ST y posteriormente, se recuperaron los embriones en E18. Mediante inmunohistoquímicas, se analizó la expresión de TH para poder evaluar el desarrollo de la vía.

Los resultados mostraron que un solo estímulo con HA fue suficiente para poder alterar la formación de la vía. Se observó una disminución en la formación de proyecciones y una falta de organización de estas células para proyectar hacia el ST, teniendo axones que proyectan hacia regiones que no son inervadas con normalidad (FIG. 34). Estos resultados sugieren que el efecto de la HA en etapas tempranas de la neurogénesis prevalece hasta etapas más tardías y es capaz de afectar la formación de la vía SN-ST.



**FIGURA 31. Análisis de la formación de la vía nigro-estriatal al inyectar histamina en etapas tempranas de la neurogénesis dopaminérgica.** Al administrar HA en el cerebro de embriones de E12 de rata y permitir el desarrollo del cerebro por 6 días más, se puede observar que la formación de la vía SN-ST es anómala (fibras TH+; verde). Se observa una disminución en la formación de proyecciones y la organización de estas células para proyectar hacia el ST no se realiza de manera ordenada (en el recuadro se aprecia que la HA produce un haz de fibras que se extiende hacia arriba y que no se presenta en la condición inyectada con vehículo). Esto indica que la adición temprana de HA previene la formación correcta de esta vía. Barra de escala: 500  $\mu$ m.

#### 4. LA HISTAMINA ES CAPAZ DE CAMBIAR LOS PATRONES DE METILACIÓN Y DESMETILACIÓN EN EL ADN DE TEJIDO MESENFALICO DE RATAS DE E14.

Una vez que observamos que la HA disminuye el número de neuronas mDA positivas a TH durante etapas tempranas de la neurogénesis y que este efecto se mantenía hasta la formación de la vía SN-ST, el siguiente objetivo era poder identificar un posible mecanismo de acción a nivel molecular que explicara este fenómeno.

Recientemente se ha demostrado que la marca de 5hmC se encuentra de manera abundante en el cerebro y que durante el desarrollo se asocia al proceso de diferenciación neuronal de CTN corticales (Hahn et al., 2013). Por otro lado, uno de los genes con mayor regulación epigenética durante el proceso de diferenciación neuronal mDA es *Th*. Este gen tiene tres regiones (dos río arriba del promotor y una en el primer exón de este gen) altamente reguladas. Se ha mostrado que el exón 1 está compuesto por varios sitios CpG y que la metilación en al menos un sitio CpG en esta región es capaz de reprimir la actividad transcripcional del gen de *Th* (Arányi et al., 2005; van Heesbeen et al., 2013; Romano et al., 2006).

Por esta razón, dados los efectos de la HA, es importante saber si ésta es capaz de disminuir la marca de 5hmC en el cuerpo del gen o en su caso incrementar la marca de 5mC en promotores de genes específicos de diferenciación dopaminérgica. Como primer acercamiento para este estudio, se analizó la distribución de 5mC y 5hmC en el primer exón del gen de *Th*.

Para cumplir este objetivo, se inyectaron intrauterinamente 50 µg/2 µl de HA en los ventrículos de embriones de rata de E12 y 48 h. después, se realizó una extracción de ADN del Mes de los embriones inyectados de cada rata (n=3). Finalmente se realizó la técnica de conversión por bisulfito de sodio y secuenciación. La secuenciación de 8 clonas elegidas de manera independiente mostró que la HA, aunque no era capaz de disminuir de manera global el número

de citosinas modificadas (61.18%) en comparación con el control (61.84%), sí era capaz de disminuirlas en sitios específicos de la secuencia elegida (FIG. 31).

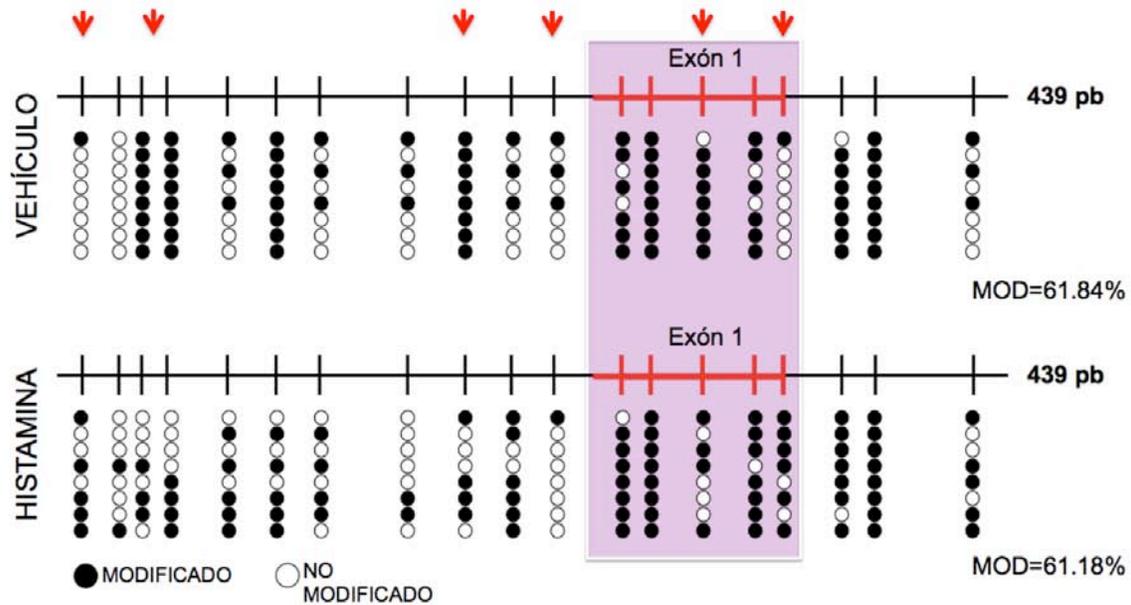
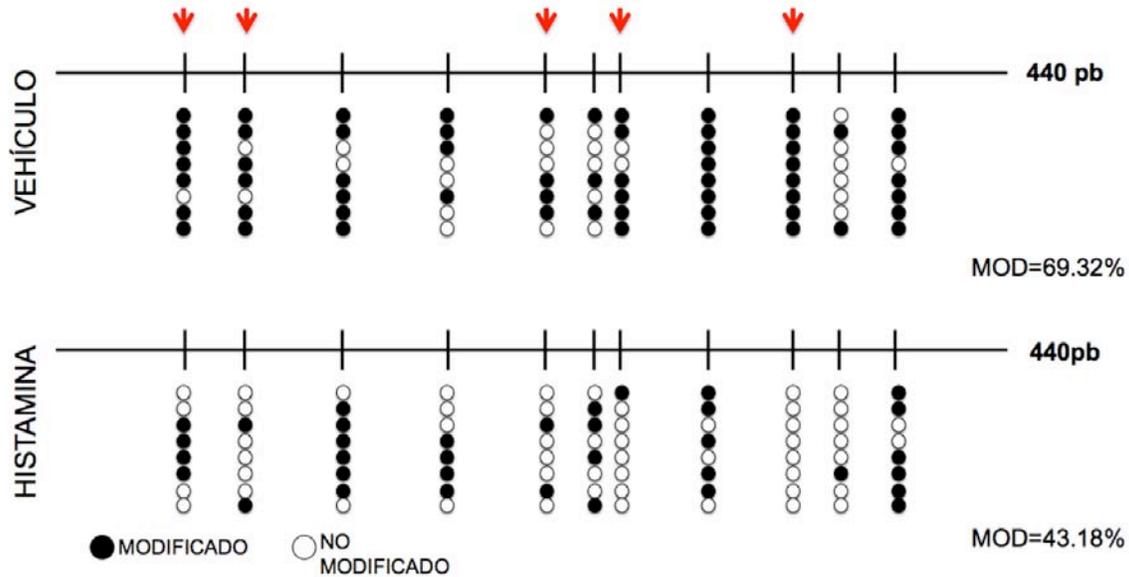


FIGURA 32. Análisis de modificaciones de citosinas en un fragmento del gen de *Th* a través de bisulfito de sodio y secuenciación. El fragmento elegido abarca el exón 1 (sombreado rojo) del gen de *Th* y el sitio de inicio de la transcripción. Cada columna de círculos representa un sitio CpG en la secuencia y cada fila representa una colonia independiente elegida al azar. Los círculos negros representan los sitios CpG que mostraron una modificación y los blancos representan sitios CpG sin modificación. El porcentaje de modificación (MOD) de citosinas en los embriones inyectados con HA y vehículo fue muy similar. Existen cambios puntuales en el número de citosinas modificadas en algunos sitios CpG (flechas rojas).

Para investigar si este efecto no se daba de manera inespecífica sobre el ADN, se analizó el patrón de citosinas modificadas en el enhancer proximal del gen de *Oct4* (un marcador de células troncales pluripotentes), en el cual también se ha demostrado que la metilación juega un papel importante para regular la expresión de éste gen (Hattori et al., 2004). Los resultados mostraron que la HA, a diferencia del efecto que tuvo en *Th*, era capaz de disminuir aún más el porcentaje de citosinas modificadas de manera global en el enhancer proximal de *Oct4*, cambiando su porcentaje de 69.32% a 43.18% (FIG. 32).



**FIGURA 33. Análisis de modificación de citosinas en el enhancer proximal del gen de *Oct4* a través de bisulfito de sodio y secuenciación.** El fragmento elegido abarca una sección del enhancer proximal del gen de *Oct4*. Cada columna de círculos representa un sitio CpG en la secuencia y cada fila representa una colonia independiente elegida al azar. Los círculos negros representan los sitios CpG que mostraron una modificación y los blancos representan sitios CpG sin modificación. El porcentaje de modificación (MOD) de citosinas en los embriones inyectados con HA tuvo una disminución en comparación con los embriones inyectados con vehículo. Existen cambios puntuales en el número de citosinas modificadas en algunos sitios CpG (flechas rojas).

Esta técnica, desafortunadamente no nos permite distinguir qué tipo de modificación están teniendo las citosinas. Por tal motivo, por medio de la técnica de MeDIP y hMeDIP, se usaron anticuerpos específicos para la marca de 5mC y 5hmC, para saber si la 5mC o la 5hmC estaban disminuyendo en los embriones inyectados con HA.

En el caso del exón 1 del gen de *Th*, una inyección de HA es capaz de disminuir de manera significativa tanto la marca de 5mC ( $0.8482 \pm 0.1205$ ,  $n=9$ ,  $p=0.0191$ ) como de 5hmC ( $2.477 \pm 0.1854$ ,  $n=9$ ,  $p=0.0060$ ) en comparación con el control (5mC:  $1.641 \pm 0.3297$ ,  $n=9$  y 5hmC:  $3.949 \pm 0.4855$ ,  $n=9$ ; **FIG. 33A**). En el caso del gen *Oct4*, la HA únicamente fue capaz de disminuir de manera significativa la marca de 5mC ( $0.7930 \pm 0.1128$ ,  $n=9$ ) en comparación con los embriones inyectados con vehículo ( $1.740 \pm 0.3110$ ,  $n=9$ ; **FIG. 33B**). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por medio de la técnica de conversión

por bisulfito de sodio y secuenciación (FIG. 31 Y 32). Además, al ver que la HA no tenía un efecto específico aparente sobre genes dopaminérgicos, se realizó un análisis de las mismas marcas para un gen constitutivo: *Gapdh*. Los datos obtenidos mostraron que ambas marcas en los embriones inyectados con HA, en comparación con los embriones control (5mC:  $0.9373 \pm 0.1934$ , n=9 y 5hmC:  $1.319 \pm 0.2804$ , n=9), disminuyeron de manera significativa ambas marcas (5mC:  $0.2665 \pm 0.06268$ , n=9 y 5hmC:  $0.4240 \pm 0.04246$ , n=9; FIG. 33C).

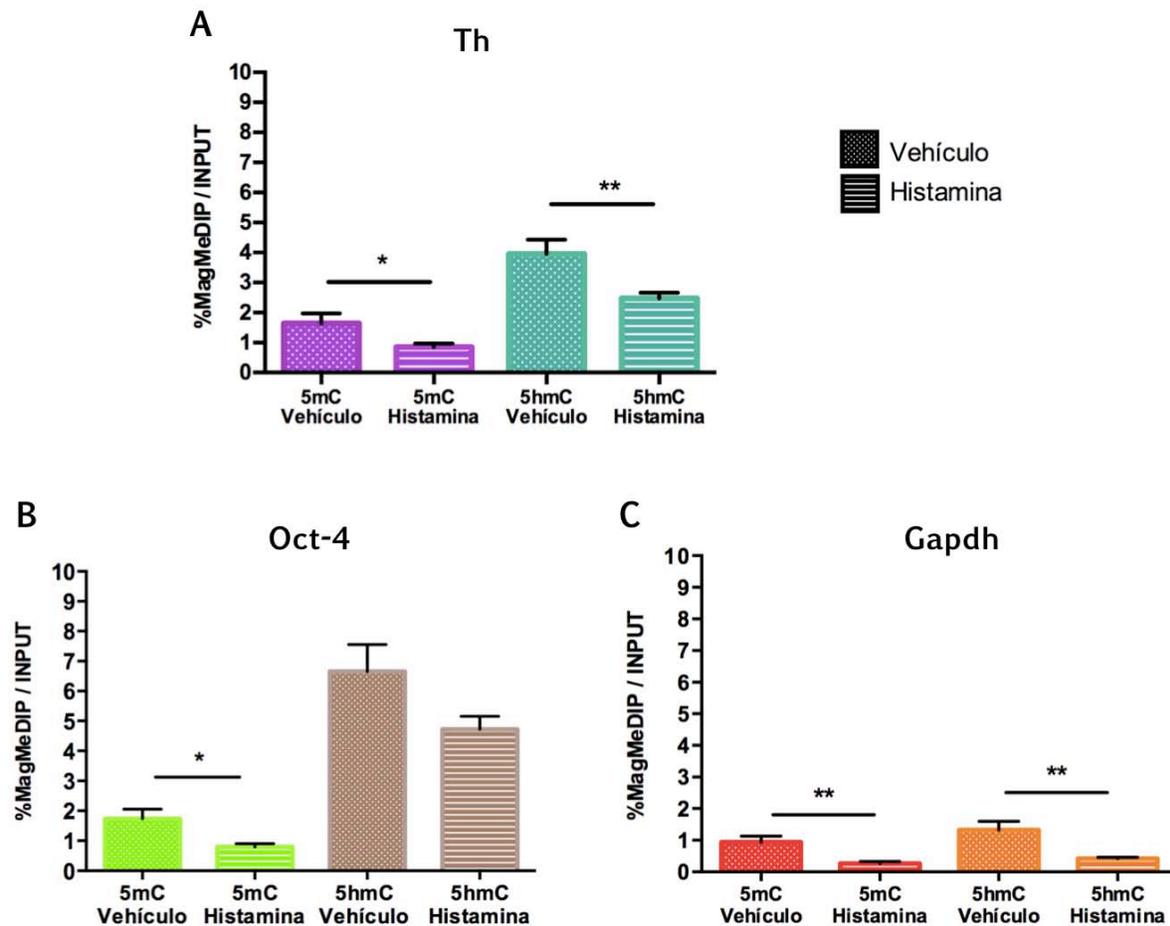


FIGURA 33. Efecto de la histamina sobre los porcentajes de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en tres genes en E14. El estímulo de HA en embriones de E12 es capaz de provocar una disminución significativa en las marcas de 5mC y 5hmC en el exón 1 de *Th* (A). Sin embargo, la HA también es capaz de disminuir la marca de 5mC en el gen de *Oct4* (B) y ambas marcas en el gen de *Gapdh* (C). \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$

Sin embargo, como los embriones inyectados con vehículo e HA mostraron una amplificación menor o similar al 1% de las marcas de 5mC y 5hmC, se consideró que la amplificación detectada era un posible ruido de fondo y que por lo tanto las marcas no se presentaron en esta región. Ésto puede explicarse ya que *Gapdh* es un gen que se encuentra constantemente expresado y por lo tanto debe haber una mayor actividad transcripcional en comparación a otros genes tejido específico.

## IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El control en la formación del SNC se da desde la formación de patrones bien definidos que producen el fenotipo de células troncales embrionarias pluripotentes. Conforme el desarrollo avanza, el control de la diferenciación de estas células troncales hacia un linaje específico como el neuronal está definido gracias a la acción de factores morfogénicos y factores transcripcionales que se expresan de manera temporal y secuencial (Gale y Li, 2008).

Por otro lado, se ha observado que el ambiente es uno de los factores con mayor influencia en el destino que llevarán las CTN. Una de las moléculas con impacto sobre la diferenciación de neuronas mDA es la HA. Durante el desarrollo del cerebro, ésta actúa tras la activación de tres RHs, lo cuales fueron reportados por primera vez mediante hibridación *in situ* en los años 2000 (Karlstedt et al., 2001, 2003; Kinnunen et al., 1998). Su presencia se encontró a partir de E14 en el caso del RH<sub>1</sub> y a partir de E15 para el RH<sub>2</sub> y RH<sub>3</sub> a lo largo del SNC en desarrollo. Recientemente también se reportó mediante RT-PCR y Western Blot la presencia de estos receptores en cultivos celulares de E12 de rata (Escobedo-Avila et al., 2014). Sin embargo, la presencia de estos receptores se desconoce en días previos a los ya reportados *in vivo* y además, en ninguno de los reportes previos se ha buscado saber que tipo de población celular expresa estos receptores.

Por esta razón, en este trabajo, mediante inmunohistoquímicas, se analizó la presencia del RH<sub>1</sub> y RH<sub>2</sub> mediante inmunofluorescencias en cortes sagitales de embriones de rata de E12, E14, E16 y E18 (etapas representativas de la neurogénesis en Mes).

Demostramos que ambos receptores se expresan a lo largo del Mes a inicios de la neurogénesis y que además se presentan de manera diferencial a lo largo de su desarrollo y en poblaciones diferentes, sugiriendo que cada receptor podría desempeñar una función diferente durante el desarrollo del Mes.

En el caso del RH<sub>1</sub>, su presencia se da de manera homogénea a lo largo de todas las etapas analizadas, además de que solo se mostraba presente en CPN positivas a Nestina en E12 y E14. Estos resultados refuerzan datos publicados, en donde se ha demostrado a través de inyecciones intrauterinas, que la HA en E14 mediante la activación de este receptor, es capaz de disminuir el número de neuronas mDA positivas a TH en E14 (Escobedo-Avila et al., 2014). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que durante el desarrollo del Mes, la presencia del RH<sub>1</sub> tiene una función importante durante el desarrollo de neuronas.

El RH<sub>2</sub>, se presentó a lo largo del Mes de manera homogénea durante los primeros días de desarrollo analizados (E12), posteriormente, su expresión se restringió a las regiones más posteriores y dorsales del Mes, además de que se expresó tanto en CPN positivas a Nestina como en neuronas tempranamente positivas a  $\beta$ III-Tubulina. Estos resultados sugieren una función diferente a la del RH<sub>1</sub>. Sin embargo, esta función se desconoce y por lo tanto debe ser analizada *in vivo* mediante la inyección de antagonistas o agonistas de este receptor o inclusive mediante el análisis de embriones que carezcan de la expresión de este receptor.

Durante la diferenciación de neuronas mDA, se ha reportado que la HA a concentraciones altas (50  $\mu$ g) es capaz de disminuir la proliferación de CTPN mesencefálicas y el número de neuronas mDA positivas a TH y otros factores transcripcionales específicos del linaje (Escobedo-Avila et al., 2014). El estudio de la HA sobre CTPN es relativamente nuevo y por lo tanto se desconocen los mecanismos por los cuales la HA puede ejercer diferentes funciones durante el desarrollo del cerebro (Escobedo-Avila et al., 2014; Molina-Hernández y Velasco, 2008; Molina-Hernández et al., 2013; Rodríguez-Martínez et al., 2012).

Por otro lado, el estudio del efecto de la HA sobre la diferenciación neuronal se ha realizado principalmente *in vitro* (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Rodríguez-Martínez et al., 2012). Esto representa una limitación dado que los estudios *in vitro* involucran una mayor manipulación de las células, además

de que un mantenimiento a largo plazo de poblaciones en diferenciación no indican realmente los estadios en los que se encuentran las células de manera *in vivo*.

Por tal motivo, para poder investigar el papel de la HA sobre la diferenciación de neuronas dopaminérgicas sin interferir con el ambiente natural en el que se encuentran las CTPN en proceso de diferenciación, en este trabajo se estableció un modelo de diferenciación neuronal *in vivo*. A través de inyecciones intrauterinas se inyectaron a embriones de la misma madre con HA y vehículo y, para investigar el momento en el que la HA ejercía sus efectos sobre las neuronas mDA, se realizaron inyecciones de HA a una concentración de 50 µg sobre cuatro etapas representativas del proceso de neurogenesis en Mes (E10, E12, E14 y E16). La disminución en las neuronas dopaminérgicas debido a la HA solo se observó en etapas tempranas de la neurogenesis, es decir, en E10 y E12. Por lo tanto, nuestro modelo sugiere que la HA actúa en el Mes sobre CTPN dopaminérgicos y que además, podría tener un efecto sobre el compromiso de estos progenitores para diferenciarse a neuronas mDA.

En la etapa adulta se ha reportado la participación del sistema histaminérgico en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. Se ha observado que en tejido post mortem de pacientes con EP, la SN presenta un incremento en los niveles de HA; estos datos correlacionan con otros estudios en donde se ha visto un incremento en el número de fibras histaminérgicas en la SN en pacientes Parkinsonianos (Anichtchik et al., 2000; Rinne et al., 2002). Estos datos sugieren que la regulación en la concentración de HA juega un papel importante sobre el sistema dopaminérgico, y que alteraciones en estas concentraciones podrían participar en el desarrollo de la EP.

Después de observar que la inyección de altas concentraciones de HA en etapas tempranas de la neurogenesis en Mes era capaz de disminuir el número de neuronas mDA, se analizó si este efecto podría permanecer a largo plazo y por lo tanto tener alguna consecuencia sobre la formación de la vía SN-ST. En

este trabajo mostramos que 50  $\mu\text{g}$  de HA inyectados en el tubo neural de embriones de E12 de rata, son suficientes para afectar la formación de la vía SN-ST en E18. Este efecto se vió reflejado al mostrar una desorganización de las fibras dopaminérgicas que inervan al estriado, ya que algunas de éstas se desorientaban e inervaban otras regiones. Adicionalmente, no se observó una recuperación total de la población dopaminérgica al compararlo con los embriones inyectados con vehículo.

A pesar de que este último resultado podría correlacionarse con los datos publicados en EP, aún no se puede considerar un completo deterioro de la vía, dado a que el SNC se encuentra en desarrollo y durante la etapa neonatal existen mecanismos de compensación y plasticidad neuronal que podrían ayudar a que las ratas neonatales no presenten deficiencias en la actividad motriz. Se ha mostrado que en ratas neonatas lesionadas por 6-hidroxidopamina, tras la muerte de neuronas mDA, hay un aumento en las proyecciones serotoninérgicas (Snyder et al., 1986) y que probablemente a causa de este aumento, existe hiperactividad motora (Avalé et al., 2004; Miller et al., 1981; Zhang et al., 2001). Por tal motivo, para comprobar si pasa lo mismo a causa de un aumento en la concentración de HA, es necesario poder analizar mediante pruebas conductuales si los embriones inyectados en etapas tempranas de la neurogénesis presentan cambios en la actividad motriz en etapas postnatales.

En los últimos años se han estudiado los procesos limitantes para la regulación de genes existentes durante el proceso de diferenciación neuronal dopaminérgico. El enfoque de estos estudios se ha dado sobre la función de factores transcripcionales y las cascadas de señalización que llevan para activar otros genes específicos de este linaje. Hasta hace poco se comenzó a relacionar la importancia en el ambiente con la función en el remodelamiento de la cromatina y la importancia que tiene con la localización de factores transcripcionales específicos. Por ejemplo, se ha visto que la despolarización prolongada sobre neuronas mDA en proceso de diferenciación puede influir en el

estado epigenético del promotor de *Th*, resultando en un incremento en la unión de Nurr1 y modificadores de histonas que favorezcan la transcripción del gen (He et al., 2011a).

Adicionalmente, para el mantenimiento del estado diferenciado de estas neuronas, se ha demostrado que la metilación en al menos un sitio CpG en el primer exón del gen de *Th* (Arányi et al., 2005), es capaz de inactivar la transcripción de este gen, al acarrear factores de transcripción con función represora como KAISO, los cuales a su vez acarrean complejos Nco-R y desacetilasas de histonas (Arányi et al., 2005; van Heesbeen et al., 2013).

Por otro lado, una de las marcas epigenéticas que ha mostrado tener gran importancia sobre el proceso de diferenciación mDA es la 5hmC. Se ha mostrado que la regulación en la expresión de esta marca durante el paso de células troncales embrionarias a CTN es crucial para el desarrollo de neuronas mDA (Kim et al., 2014). Sin embargo no se ha estudiado de manera detallada la importancia del ambiente sobre el establecimiento de la 5hmC durante la diferenciación neuronal dopaminérgica, además de que no se ha estudiado este proceso de manera detallada sobre la expresión de genes limitantes en la diferenciación mDA.

Considerando los datos publicados recientemente sobre el posible papel de la HA en el ambiente y su importancia sobre CTN corticales y mesencefálicas (Escobedo-Avila et al., 2014; Molina-Hernández y Velasco, 2008; Molina-Hernández et al., 2013; Rodríguez-Martínez et al., 2012); además de los datos obtenidos en este trabajo. En este trabajo, dada la importancia del gen de *Th* para la diferenciación neuronal mDA, se estudió si esta amina era capaz de modificar los patrones de 5mC y 5hmC este gen. Mediante bisulfito de sodio y secuenciación pudimos observar que a pesar de que la HA no era capaz de alterar los niveles de citosinas modificadas de manera global; la HA disminuyó el número de citosinas modificadas en sitios muy particulares como en el exón 1 de este gen y el sitio de inicio de la transcripción.

Para comprobar que este efecto fuera específicamente sobre genes dopaminérgicos, se usó como control el gen *Oct4*, el cual es un gen expresado únicamente en células troncales pluripotentes o células germinales y se ha demostrado, con secuenciación posterior al tratamiento con bisulfito de sodio, que en células diferenciadas se encuentra altamente metilado y silenciado (Hattori et al., 2004). Nuestros resultados mostraron que los embriones inyectados con HA también sufrieron una disminución en el número de citosinas modificadas (del 37.71%) en el enhancer proximal de este gen, en comparación con el control. No existen estudios en los cuales se compruebe la existencia de la proteína de este gen en etapas posteriores de la diferenciación de células troncales embrionarias. Sin embargo, recientemente se demostró que este factor transcripcional en células troncales embrionarias, inhibe directamente la activación de Cdk1, un componente importante del ciclo celular; por lo tanto se asocia como un regulador de la entrada a la mitosis (Zhao et al., 2014). Estos resultados podrían respaldar los efectos de la HA, ya que también se demostró recientemente mediante la expresión de fosfohistona H3 que la HA era capaz de disminuir la proliferación en el mesencéfalo de ratas en E14 (Escobedo-Avila et al., 2014). Por otro lado, se ha reportado que OCT4 puede tener otras funciones dependiendo de con que tipo de factores interacciona y que por lo tanto no se le puede atribuir siempre la función de otorgar un estado pluripotencial en células troncales; por lo tanto, estos datos pueden respaldar nuestros resultados y otorgarle una nueva función a OCT4 durante el proceso de neurogenesis (Archer et al., 2011; Lee et al., 2010). Los resultados inesperados del efecto de la HA sobre los patrones de modificaciones de citosinas en el enhancer proximal de *Oct4*, sugieren que esta amina probablemente tiene un efecto a nivel global en la cromatina. Sin embargo, para comprobar la presencia de OCT4, debe realizarse un análisis más exhaustivo y analizar si existe transcripción del gen de *Oct4*.

Para poder diferenciar qué tipo de modificación estaba cambiando, por medio de MeDIP y hMeDIP, se identificó la proporción de 5mC y 5hmC en el exón

1 del gen de *Th* y en el enhancer proximal del gen de *Oct4*; además, para agregar otro control, se analizó el porcentaje de estas marcas en el promotor de *Gapdh*, un gen constitutivo. Los resultados mostraron una disminución significativa tanto de 5mC como 5hmC en el exón 1 del gen de *Th*. En el caso de *Oct4*, hubo una disminución significativa únicamente en la marca de 5mC. Por otro lado, *Gapdh* aunque mostró una disminución significativa en ambas marcas en los embriones tratados con HA; los porcentajes de inmunoprecipitación en los embriones control e HA fueron menores al 1% y por lo tanto se consideró que este porcentaje no es relevante y mas bien un posible ruido de fondo. Sin embargo, para comprobar la inexistencia de estas marca, se sugiere identificar mediante bisulfito de sodio si existe alguna modificación de citosinas, además de analizar la expresión de este gen por RT-PCR cuantitativo en embriones tratados con HA y vehículo.

Estos datos en conjunto sugieren un nuevo papel de la HA en la regulación de diferentes marcas de metilación y desmetilación sobre genes con funciones diferentes. La disminución de 5mC, 5hmC o ambas de una manera aparentemente inespecífica sobre genes con funciones diferentes en el ADN, sugiere que esta amina podría regular de manera directa o indirecta la expresión de enzimas encargadas en el proceso de metilación o desmetilación del ADN. Sin embargo, para demostrar esto, es necesario analizar mediante las mismas técnicas una mayor variedad de genes y además, mediante RT-PCR o un análisis de expresión global, buscar si existe un cambio en la expresión de enzimas encargadas en modificar marcas epigenéticas.

En conclusión, los resultados presentados demostraron que durante la embriogénesis de la rata, existe una interacción del sistema histaminérgico sobre el sistema dopaminérgico en etapas tempranas de la neurogénesis, el cual podría servir como un posible punto de regulación de la diferenciación mDA ya que al haber una alta concentración de HA existe una disminución en la población dopaminérgica diferenciada; efecto que se mantiene a largo plazo y provoca la

malformación de la vía SN-ST. Esta disminución se debe probablemente a una desregulación a nivel global de la cromatina, la cual afecta los patrones en las marcas de metilación y desmetilación en el ADN. Este estudio contribuye al conocimiento del papel de la HA en la generación de neuronas mDA y en la regulación de la estructuración de la cromatina mediada por estímulos extracelulares durante el compromiso de CTPN en el desarrollo del cerebro; conocimientos que podrán contribuir en la generación de nuevas estrategias para contener la EP, además de revelar nuevas acciones de la HA durante el desarrollo del cerebro.

## X. REFERENCIAS

Abeliovich, A., and Hammond, R. (2007). Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev. Biol.* 304, 447–454.

Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., and Ericson, J. (2006a). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124, 393–405.

Andersson, E., Jensen, J.B., Parmar, M., Guillemot, F., and Björklund, a (2006b). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development* 133, 507–516.

Ang, S.-L. (2006). Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* 133, 3499–3506.

Anichtchik, O. V, Rinne, J.O., Kalimo, H., and Panula, P. (2000). An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 163, 20–30.

Arányi, T., Faucheux, B. a, Khalfallah, O., Vodjdani, G., Biguet, N.F., Mallet, J., and Meloni, R. (2005). The tissue-specific methylation of the human tyrosine hydroxylase gene reveals new regulatory elements in the first exon. *J. Neurochem.* 94, 129–139.

Archer, T.C., Jin, J., and Casey, E.S. (2011). Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during primary neurogenesis. *Dev. Biol.* 350, 429–440.

Auvinen, S., and Panula, P. (1988). Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 276, 289–303.

Avale, M.E., Nemirovsky, S.I., Raisman-Vozari, R., and Rubinstein, M. (2004). Elevated serotonin is involved in hyperactivity but not in the paradoxical effect of amphetamine in mice neonatally lesioned with 6-hydroxydopamine. *J. Neurosci. Res.* 78, 289–296.

Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merckenschlager, M., et al. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* 8, 532–538.

Baier, C.J., Katunar, M.R., Adrover, E., Pallarés, M.E., and Antonelli, M.C. (2012). Gestational restraint stress and the developing dopaminergic system: an overview. *Neurotox. Res.* 22, 16–32.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.

Bannister, A.J., Schneider, R., and Kouzarides, T. (2002). Histone Methylation: Dynamic or Static? *Cell* 109, 801–806.

- Bayly, R.D., Ngo, M., Aglyamova, G. V, and Agarwala, S. (2007). Regulation of ventral midbrain patterning by Hedgehog signaling. *Development* 134, 2115–2124.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326.
- Bertler, A., and Rosengren, E. (1959). Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 15, 1958–1959.
- Bertrand, N., Castro, D.S., and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517–530.
- Best, C.H., Dale, H.H., Dudley, H., and Thorpe, W. V. (1927). The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. *J. Physiol.* 62, 397–417.
- Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2395–2402.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398.
- Blaess, S., Corrales, J.D., and Joyner, A.L. (2006). Sonic hedgehog regulates Gli activator and repressor functions with spatial and temporal precision in the mid/hindbrain region. *Development* 133, 1799–1809.
- Boroviak, T., and Nichols, J. (2014). The birth of embryonic pluripotency. *Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci.* 369, 1–10.
- Carlsson, A. (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.* 11, 490–493.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., and Waldeck, B. (1958). On the Presence of 3-Hydroxytyramine in Brain. *Science* 127, 16–17.
- Cheng, X., Hashimoto, H., Horton, J.R., and Zhang, X. (2011). Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-CpG Recognition, and Demethylation in Mammals. In *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*, (Elsevier), pp. 9–24.
- Chi, C.L., Martinez, S., Wurst, W., and Martin, G.R. (2003). The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* 130, 2633–2644.
- Coskun, V., Tsoa, R., and Sun, Y.E. (2012). Epigenetic regulation of stem cells differentiating along the neural lineage. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 762–767.

- Dale, H.H., and Laidlaw, P.P. (1910). The physiological action of  $\beta$ -iminazolyethylamine. *J. Physiol.* *41*, 318–344.
- Delatte, B., Deplus, R., and Fuks, F. (2014). Playing TETris with DNA modifications. *EMBO J.* *33*, 1198–1211.
- Egea, J., and Klein, R. (2007). Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol.* *17*, 230–238.
- Ekstrom, P., Holmqvist, B.I., and Panula, P. (1995). Histamine-immunoreactive neurons in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. Correlation with hypothalamic tyrosine hydroxylase- and serotonin-immunoreactive neurons. *J. Chem. Neuroanat.* *8*, 75–85.
- Eriksson, K.S., Peitsaro, N., Karlstedt, K., Kaslin, J., and Panula, P. (1998). Development of the histaminergic neurons and expression of histidine decarboxylase mRNA in the zebrafish brain in the absence of all peripheral histaminergic systems. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 3799–3812.
- Escobedo-Avila, I., Vargas-Romero, F., Molina-Hernández, A., López-González, R., Cortés, D., De Carlos, J. a, and Velasco, I. (2014). Histamine impairs midbrain dopaminergic development in vivo by activating histamine type 1 receptors. *Mol. Brain* *7*, 58.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* *421*, 448–453.
- Ferri, A.L.M., Lin, W., Mavromatakis, Y.E., Wang, J.C., Sasaki, H., Whitsett, J. a, and Ang, S.-L. (2007). *Foxa1* and *Foxa2* regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* *134*, 2761–2769.
- Fuxe, K. (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. *Zeitschrift Für Zellforsch. Und Mikroskopische Anat.* *65*, 573–596.
- Gage, F.H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science* (80- ). *287*, 1433–1438.
- Gale, E., and Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Mol. Brain* *1*, 1–10.
- Gates, M.A., Coupe, V.M., Torres, E.M., Fricker-Gates, R.A., and Dunnett, S.B. (2004). Spatially and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 831–844.
- Gilbert, S.F. (2013). *Developmental Biology* (Swarthmore College and the University of Helsinki, Helsinki: Sinauer, Andrew D.).
- Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 777–788.

- Guo, H., Zhu, P., Yan, L., Li, R., Hu, B., Lian, Y., Yan, J., Ren, X., Lin, S., Li, J., et al. (2014). The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* 511, 606–610.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G., and Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423–434.
- Haas, H., and Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 121–130.
- Haas, H.L., Sergeeva, O.A., and Selbach, O. (2008). Histamine in the Nervous System. *Physiol. Rev.* 88, 1183–1241.
- Hackett, J.A., Sengupta, R., Zylitz, J.J., Murakami, K., Lee, C., Down, T.A., and Surani, M.A. (2013). Germline DNA Demethylation Dynamics and Imprint Erasure Through 5-Hydroxymethylcytosine. *Science* 339, 448–452.
- Hahn, M.A., Qiu, R., Wu, X., Li, A.X., Zhang, H., Wang, J., Jui, J., Jin, S.-G., Jiang, Y., Pfeifer, G.P., et al. (2013). Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell Rep.* 3, 291–300.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., and Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129, 1983–1993.
- Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y.-G., Hattori, N., Ohgane, J., Tanaka, S., and Shiota, K. (2004). Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J. Biol. Chem.* 279, 17063–17069.
- He, X.-B., Yi, S.-H., Rhee, Y.-H., Kim, H., Han, Y.-M., Lee, S.-H., Lee, H., Park, C.-H., Lee, Y.-S., Richardson, E., et al. (2011a). Prolonged membrane depolarization enhances midbrain dopamine neuron differentiation via epigenetic histone modifications. *Stem Cells* 29, 1861–1873.
- He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., et al. (2011b). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303–1307.
- Van Heesbeen, H.J., Mesman, S., Veenvliet, J. V, and Smidt, M.P. (2013). Epigenetic mechanisms in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Development* 140, 1159–1169.
- Hegarty, S. V, Sullivan, A.M., and O’Keeffe, G.W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol.* 379, 123–138.
- Hermann, a., Gowher, H., and Jeltsch, a. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2571–2587.

- Héron, a, Rouleau, a, Cochois, V., Pillot, C., Schwartz, J.C., and Arrang, J.M. (2001). Expression analysis of the histamine H<sub>3</sub> receptor in developing rat tissues. *Mech. Dev.* *105*, 167–173.
- Hidalgo-Sánchez, M., Simeone, A., and Alvarado-Mallart, R.-M. (1999). Fgf8 and Gbx2 induction concomitant with Otx2 repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal prosencephalon. *Development* *126*, 3191–3203.
- Hill, S.J., Ganelli, C.R., Timmerman, H., Schwartz, J.C., Shankley, N.P., Young, J.M., Schunack, W., Levi, R., and Haas, H.L. (1997). International Union of Pharmacology . XIII . Classification of Histamine Receptors. *Pharmacol. Rev.* *49*, 26.
- Hoekstra, E.J., Mesman, S., de Munnik, W. a, and Smidt, M.P. (2013). LMX1B is part of a transcriptional complex with PSPC1 and PSF. *PLoS One* *8*, 1–13.
- Huszti, Z. (1998). Carrier-Mediated High Affinity Uptake System for Histamine in Astroglial and Cerebral Endothelial Cells. *J. Neurosci. Res.* *51*, 551–558.
- Huszti, Z. (2003). Histamine uptake into non-neuronal brain cells. *Inflamm. Res.* *52*, S03–S06.
- Illingworth, R.S., and Bird, A.P. (2009). CpG islands - “A rough guide.” *FEBS Lett.* *583*, 1713–1720.
- Inoue, A., and Zhang, Y. (2011). Replication-Dependent Loss of 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse Preimplantation Embryos. *Science* (80- ). *334*, 194–194.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J. a, He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* *333*, 1300–1303.
- Jin, S.-G., Wu, X., Li, A.X., and Pfeifer, G.P. (2011). Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Res.* *39*, 5015–5024.
- Karlstedt, K., Senkas, a, Ahman, M., and Panula, P. (2001). Regional expression of the histamine H<sub>2</sub> receptor in adult and developing rat brain. *Neuroscience* *102*, 201–208.
- Karlstedt, K., Åhman, M.J., Anichtchik, O. V, Soinila, S., and Panula, P. (2003). Expression of the H<sub>3</sub> receptor in the developing CNS and brown fat suggests novel roles for histamine. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 614–622.
- Kawano, H., Horie, M., Honma, S., Kawamura, K., Takeuchi, K., and Kimura, S. (2003). Aberrant trajectory of ascending dopaminergic pathway in mice lacking Nkx2.1. *Exp. Neurol.* *182*, 103–112.

Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A.L.M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., and Ang, S.-L. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133, 495–505.

Kim, M., Park, Y.-K., Kang, T.-W., Lee, S.-H., Rhee, Y.-H., Park, J.-L., Kim, H.-J., Lee, D., Lee, D., Kim, S.-Y., et al. (2014). Dynamic changes in DNA methylation and hydroxymethylation when hES cells undergo differentiation toward a neuronal lineage. *Hum. Mol. Genet.* 23, 657–667.

Kinnunen, A., Lintunen, M., Karlstedt, K., Fukui, H., and Panula, P. (1998). In situ detection of H1-receptor mRNA and absence of apoptosis in the transient histamine system of the embryonic rat brain. *J. Comp. Neurol.* 394, 127–137.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31, 89–97.

Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472–479.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.

Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929–930.

Lahti, L., Achim, K., and Partanen, J. (2013). Molecular regulation of GABAergic neuron differentiation and diversity in the developing midbrain. *Acta Physiol. (Oxf)*. 207, 616–627.

Lee, S.H., Jeyapalan, J.N., Appleby, V., Mohamed Noor, D.A., Sottile, V., and Scotting, P.J. (2010). Dynamic methylation and expression of Oct4 in early neural stem cells. *J. Anat.* 217, 203–213.

Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926.

Luo, Y. (2012). The function and mechanisms of Nurr1 action in midbrain dopaminergic neurons, from development and maintenance to survival. *Int. Rev. Neurobiol.* 102, 1–22.

Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., and Maleszka, R. (2010). The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.* 8, 1–12.

Maintz, L., and Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1185–1196.

Martinez-Barbera, J.P., Signore, M., Boyd, P.P., Puellas, E., Acampora, D., Gogoi, R., Schubert, F., Lumsden, A., and Simeone, A. (2001). Regionalisation of anterior neuroectoderm and its

competence in responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between OTX2 and GBX2. *Development* 128, 4789–4800.

Massarwa, R., Ray, H.J., and Niswander, L. (2014). Morphogenetic movements in the neural plate and neural tube: mouse. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 3, 59–68.

Metcalfe, D.D., Baram, D., and Mekori, Y.A. (1997). Mast Cells. *Physiol. Rev.* 77, 1033–1079.

Miller, F.E., Heffner, T.G., Kotake, C., and Seiden, L.S. (1981). Magnitude and duration of hyperactivity following neonatal 6-hydroxydopamine is related to the extent of brain dopamine depletion. *Brain Res.* 229, 123–132.

Molina-Hernández, A., and Velasco, I. (2008). Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *J. Neurochem.* 106, 706–717.

Molina-Hernández, A., Díaz, N.F., and Arias-Montañó, J.-A. (2012). Histamine in brain development. *J. Neurochem.* 122, 872–882.

Molina-Hernández, A., Rodríguez-Martínez, G., Escobedo-Ávila, I., and Velasco, I. (2013). Histamine up-regulates fibroblast growth factor receptor 1 and increases FOXP2 neurons in cultured neural precursors by histamine type 1 receptor activation: conceivable role of histamine in neurogenesis during cortical development in vivo. *Neural Dev.* 8, 4.

Nakamura, S., Ito, Y., Shirasaki, R., and Murakami, F. (2000). Local Directional Cues Control Growth Polarity of Dopaminergic Axons Along the Rostrocaudal Axis. *J. Neurosci.* 20, 4112–4119.

Nakane, H., Sonobe, Y., Watanabe, T., and Nakano, K. (2004). Histamine: its novel role as an endogenous regulator of Con A-dependent T cell proliferation. *Inflamm. Res.* 53, 324–328.

Nissinen, M.J., and Panula, P. (1995). Developmental patterns of histamine-like immunoreactivity in the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 211–227.

Nissinen, M.J., Karlstedt, K., Castrén, E., and Panula, P. (1995). Expression of histidine decarboxylase and cellular histamine-like immunoreactivity in rat embryogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 1241–1252.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99, 247–257.

Panula, P., and Nuutinen, S. (2013). The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 472–487.

Panula, P., Sundvik, M., and Karlstedt, K. (2014). Developmental roles of brain histamine. *Trends Neurosci.* 37, 159–168.

Pelayo, R., Santa-Olalla, J., and Velasco, I. (2011). Células troncales y medicina regenerativa (UNAM, PUIS).

Peserico, A., and Simone, C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 371832.

Petazzi, P., Akizu, N., García, A., Estarás, C., Martínez de Paz, A., Rodríguez-Paredes, M., Martínez-Balbás, M.A., Huertas, D., and Esteller, M. (2014). An increase in MECP2 dosage impairs neural tube formation. *Neurobiol. Dis.* 67, 49–56.

Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puelles, E., Gogoi, R., Hall, A., Panhuysen, M., Echevarria, D., Sussel, L., Weisenhorn, D.M.V., et al. (2006). A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* 133, 89–98.

Ramos-Jiménez, J., Garduño-Torres, B., and Arias-Montaño, J.A. (2009). Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev. Biomédica* 20, 100–126.

Rinne, J.O., Anichtchik, O. V., Eriksson, K.S., Kaslin, J., Tuomisto, L., Kalimo, H., and Ro, M. (2002). Increased brain histamine levels in Parkinson ' s disease but not in multiple system atrophy. 3, 954–960.

Rodríguez-Martínez, G., Velasco, I., García-López, G., Solís, K.H., Flores-Herrera, H., Díaz, N.F., and Molina-Hernández, a (2012). Histamine is required during neural stem cell proliferation to increase neuron differentiation. *Neuroscience* 216, 10–17.

Romano, G., Macaluso, M., Lucchetti, C., and Iacovitti, L. (2006). Transcription and Epigenetic Profile of the Promoter , First Exon and First Intron of the Human Tyrosine Hydroxylase Gene. 431–438.

Sadler, T.W. (2005). Embryology of neural tube development. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 135C, 2–8.

Sauvageot, C., and Stiles, C.D. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 244–249.

Schwartz, J.-C., Arrang, J.-M., Garbarg, M., Pollard, H., and Ruat, M. (1991). Histaminergic Transmission in the Mammalian Brain. *Physiol. Rev.* 71, 1–51.

Sharples, S. a, Koblinger, K., Humphreys, J.M., and Whelan, P.J. (2014). Dopamine: a parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Front. Neural Circuits* 8, 1–16.

Shen, L., and Zhang, Y. (2013). 5-Hydroxymethylcytosine: generation, fate, and genomic distribution. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 289–296.

- Simon, H.H., Bhatt, L., Gherbassi, D., Sgadó, P., and Alberí, L. (2003). Midbrain Dopaminergic Neurons: Determination of Their Developmental Fate by Transcription Factors. *Ann. New York Acad. Sci.* 991, 36–47.
- Smidt, M.P., Smits, S.M., and Burbach, J.P.H. (2003). Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur. J. Pharmacol.* 480, 75–88.
- Smith, J.L., and Schoenwolf, G.C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.* 20, 510–517.
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Humm, K.C., Karnik, R., Mekhoubad, S., Regev, A., Eggan, K., and Meissner, A. (2014). DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* 511, 611–628.
- Snyder, a M., Zigmond, M.J., and Lund, R.D. (1986). Sprouting of serotonergic afferents into striatum after dopamine-depleting lesions in infant rats: a retrograde transport and immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* 245, 274–281.
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., and Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J. Biol. Chem.* 279, 27816–27823.
- Suzuki, M.M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9, 465–476.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W. a, Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930–935.
- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–117.
- Tian, L.-P., Zhang, S., Zhang, Y.-J., Ding, J.-Q., and Chen, S.-D. (2012). Lmx1b can promote the differentiation of embryonic stem cells to dopaminergic neurons associated with Parkinson's disease. *Biothecnology Lett.* 34, 1167–1174.
- Tung, R.S., and Lichtenstein, L.M. (1981). Cyclic AMP agonist inhibition increases at low levels of histamine release from human basophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218, 642–646.
- Vanhala, A.N.U., Yamatodani, A., and Panula, P. (1994). Distribution of Histamine-, 5-Hydroxytryptamine-, and Tyrosine Hydroxylase-Immunoreactive Neurons and Nerve Fibers in Developing Rat Brain. *J. Comp. Neurol.* 347, 101–114.
- Veenliet, J. V., Alves Dos Santos, M.T.M., Kouwenhoven, W.M., von Oerthel, L., Lim, J.L., van der Linden, A.J.A., Koerkamp, M.J.A.G., Holstege, F.C.P., and Smidt, M.P. (2013). Specification of dopaminergic subsets involves interplay of En1 and Pitx3. *Development* 140, 3373–3384.

Wada, H., Inagaki, N., Yamatodani, A., and Watanabe, T. (1991). Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity? *Trends Neurosci.* *14*, 415–418.

Wang, K.-Y., Chen, C.-C., and Shen, C.-K.J. (2014). Active DNA demethylation of the vertebrate genomes by DNA methyltransferases: deaminase, dehydroxymethylase or demethylase? *Epigenomics* *6*, 353–363.

Watanabe, T., and Yanai, K. (2001). Studies on functional roles of the histaminergic neuron system by using pharmacological agents knockout mice and positron emission tomography. *Tohoku J. Exp. Med.* *195*, 197–217.

Wheldon, L.M., Abakir, A., Ferjentsik, Z., Dudnakova, T., Strohbuecker, S., Christie, D., Dai, N., Guan, S., Foster, J.M., Corrêa, I.R., et al. (2014). Transient accumulation of 5-carboxylcytosine indicates involvement of active demethylation in lineage specification of neural stem cells. *Cell Rep.* *7*, 1353–1361.

Wilde, J.J., Petersen, J.R., and Niswander, L. (2014). Genetic, Epigenetic, and Environmental Contributions to Neural Tube Closure. *Annu. Rev. Genet.* *583–611*.

Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C.J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W., and Walter, J. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.* *2*, 241.

Yamaguchi, S., Hong, K., Liu, R., Inoue, A., Shen, L., Zhang, K., and Zhang, Y. (2013). Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell Res.* *23*, 329–339.

Yan, C.H., Levesque, M., Claxton, S., Johnson, R.L., and Ang, S.-L. (2011). *Lmx1a* and *Lmx1b* function cooperatively to regulate proliferation, specification, and differentiation of midbrain dopaminergic progenitors. *J. Neurosci.* *31*, 12413–12425.

Zhang, K., Tarazi, F.I., and Baldessarini, R.J. (2001). Role of dopamine D4 receptors in motor hyperactivity induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesions in rats. *Neuropsychopharmacology* *25*, 624–632.

Zhao, R., Deibler, R.W., Lerou, P.H., Ballabeni, A., Heffner, G.C., and Cahan, P. (2014). A nontranscriptional role for Oct4 in the regulation of mitotic entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am. PNAS* *111*, 15768–15773.

## **XI. ANEXO**

Como parte de esta tesis y durante la estancia en el laboratorio del Dr. Iván Velasco Velázquez, se publicó el siguiente artículo, el cual sirvió como antecedente para la realización del proyecto de tesis.

### **Histamine impairs midbrain dopaminergic development in vivo by activating histamine type 1 receptors.**

Escobedo-Avila, I., Vargas-Romero, F., Molina-Hernández, A., López-González, R., Cortés, D., De Carlos, J. a, and Velasco, I. (2014). Mol. Brain 7, 58.