



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN EL DNA INDUCIDAS POR LA
HISTAMINA EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA NEUROGENESIS EN EL
MESENCÉFALO DE LA RATA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
FERNANDA VARGAS ROMERO

TUTOR PRINCIPAL
DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
[Instituto Nacional de Cancerología](#)
DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA
[Instituto de Neurobiología, UNAM](#)

Ciudad de México. Enero, 2017



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.

AGRADECIMIENTOS INTITUCIONALES

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio a cargo del Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez, del Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Laboratorio de Carcinogénesis, a cargo del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Nacional de Cancerología bajo la tutela del Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez y la colaboración del Dr. Ernesto Soto Reyes Solís y el Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra.

El Comité Tutor que asesoró esta tesis estuvo conformado por:

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís	Instituto Nacional de Cancerología
Dr. Alfredo Varela Echavarría	Instituto de Neurobiología, UNAM
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN208713 y PAPIIT IN213716) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 131281).

Los estudios de maestría de la alumna Fernanda Vargas Romero fueron apoyados por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de registro 662044 y el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

El jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Rocío Salceda Sacanelles
Vocal	Leonor Pérez Martínez
Vocal	Inti Alberto De La Rosa Velázquez
Vocal	Lorena Aguilar Arnal
Secretario	Rosana Pelayo Camacho

CONTENIDO

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	1
II. RESUMEN / ABSTRACT.....	3
III. ANTECEDENTES.....	5
1. Células troncales neurales.....	5
2. Desarrollo del sistema nervioso central.....	6
2.1. Formación del mesencéfalo.....	7
2.1.1. Neuronas dopaminérgicas.....	10
2.1.1.1. Especificación a linaje dopaminérgico.....	11
2.1.1.2. Diferenciación a linaje dopaminérgico.....	12
2.1.1.3. Formación de la vía nigro-estriatal.....	13
3. La histamina.....	15
3.1. Histamina en el sistema nervioso central adulto.....	15
3.1.1. Distribución del sistema histaminérgico.....	15
3.1.2. Síntesis y metabolismo de la histamina.....	16
3.1.3. Los receptores histaminérgicos en el sistema nervioso central.....	18
3.2. Histamina durante el desarrollo del sistema nervioso central.....	20
3.2.1. Efecto de la histamina sobre células troncales neurales corticales y de mesencéfalo ventral.....	21
4. El papel de la epigenética durante el desarrollo del cerebro.....	22
4.1. Metilación del DNA.....	23
4.2. Desmetilación del DNA.....	25
4.3. Las modificaciones postraduccionales de histonas.....	27
4.4. Modificaciones epigenéticas durante la diferenciación neuronal y glial.....	28
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
V. HIPÓTESIS.....	33
VI. OBJETIVO	33
1. Objetivo general.....	33
2. Objetivos particulares.....	33

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
1. Animales.....	34
2. Inyecciones intrauterinas.....	34
3. Histología.....	35
4. Inmunohistoquímicas.....	36
5. Aclaramiento de cerebros acoplado a tinción contra tirosina hidroxilasa.....	37
6. Extracción de DNA.....	38
7. Inmunoprecipitación de DNA metilado e hidroximetilado y análisis de enriquecimiento por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo.....	38
8. Extracción de RNA.....	43
9. Formación de cDNA: reacción de retrotranscripción y análisis de expresión por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo.....	44
10. Análisis estadístico.....	46
VIII. RESULTADOS.....	47
1. La administración intrauterina de histamina disminuye los niveles de LMX1A en progenitores dopaminérgicos en el MV.....	47
2. La administración temprana de HA disminuye la expresión de genes tempranos y tardíos de diferenciación dopaminérgica.....	47
3. La histamina disminuye el enriquecimiento de 5mc en exones de genes tardíos asociados a diferenciación dopaminérgica.....	49
4. 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 nigroestriatal.....	52
IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	54
X. PERSPECTIVAS.....	62
XI. REFERENCIAS.....	63
XI. ANEXO I.....	74
1. Imágenes suplementarias correspondiente al diseño experimental.....	74
XII. ANEXO II.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

FIGURA 1. Proceso de diferenciación de las células troncales neurales a lo largo del desarrollo.....	6
FIGURA 2. Proceso de neurulación y formación del tubo neural.....	8
FIGURA 3. Formación de las vesículas cerebrales.....	9
FIGURA 4. Etapas del proceso de la diferenciación de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas durante el desarrollo del ratón.....	10
FIGURA 5. Representación gráfica de la evolución temporal de la formación de la vía nigroestriatal en rata.....	14
FIGURA 6. Inervación de las fibras de neuronas histaminérgicas a lo largo del cerebro en mamíferos.....	16
FIGURA 7. Síntesis y metabolismo de la HA en el cerebro.....	17
FIGURA 8. Vías de señalización activadas por los receptores histaminérgicos en el sistema nervioso central.....	20
FIGURA 9. Representación de las curva de neurogénesis, gliogénesis y concentración de histamina a lo largo del desarrollo del cerebro de la rata.....	21
FIGURA 10. Mecanismo químico de la metilación en citosinas.....	24
FIGURA 11. Vía completa de la dinámica de modificaciones que existen en citosinas.....	26

DISEÑO EXPERIMENTAL

FIGURA 12. Proceso de inyección cerebral intrauterina.....	36
FIGURA 13. Ejemplo de una gráfica obtenida a partir de una curva estándar de INPUT.....	42

RESULTADOS

FIGURA 14. Expresión de LMX1A en el mesencéfalo al inyectar intrauterinamente histamina.....	48
FIGURA 15. Análisis de expresión de diferentes genes encargados de la diferenciación dopaminérgica después de una	

inyección intrauterina con histamina.....	49
FIGURA 16. Efecto de la histamina sobre los porcentajes de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en genes de especificación y diferenciación dopaminérgica.....	51
FIGURA 17. Análisis de la formación de la vía nigroestriatal al inyectar histamina en etapas tempranas de la neurogénesis dopaminérgica.....	53
FIGURA 18. Mecanismo de acción propuesto de la HA sobre la regulación de genes tardíos de diferenciación dopaminérgica mesencefálica.....	59

ANEXO I

FIGURA

SUPLEMENTARIA 1. Control de calidad de 4 muestras sonicadas para realizar MeDIP/hMeD.....	74
--	----

FIGURA

SUPLEMENTARIA 2. Eficiencia de anticuerpo por inmunoprecipitación con respecto a los controles internos.....	74
---	----

FIGURA

SUPLEMENTARIA 3. Mapa representativo de cada gen utilizado para los análisis de metilación e hidroximetilación.....	75
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

DISEÑO EXPERIMENTAL

TABLA 1. Anticuerpos usados para inmunohistoquímicas.....	37
TABLA 2. Diseño experimental para realizar la mezcla de inmunoprecipitación.....	39
TABLA 3. Anticuerpos usados para el inmunoprecipitación de DNA metilado e hidroximetilado.....	40
TABLA 4. Oligonucleótidos usados para analizar las inmunoprecipitaciones de DNA metilado e hidroximetilado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	41
TABLA 5. Diseño experimental para realizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	42
TABLA 6. Diseño experimental para realizar la reacción de transcriptasa reversa.....	44
TABLA 7. Oligonucleótidos usados para analizar la expresión de diferentes genes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	45
TABLA 8. Diseño experimental para realizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	45

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5caC	5-carboxilcitosina	DAG	diacilglicerol
5hmC	5-hidroximetilcitosina	DNMT	DNA metiltransferasa
5hmU	5-hidroximetiluracilo	DMSO	dimetilsulfoxido
5fC	5-formilcitosina	E	día embrionario
5mC	5-metilcitosina	EA	eficiencia de amplificación
α -KG	α -cetoglutarato	EN1	Engrailed 1
AA	ácido araquidónico	EN2	Engrailed 2
AC	adenilato ciclasa	eNOS	Óxido nítrico sintetasa dependiente de Ca^{2+}
AMPc	AMP cíclico	EP	enfermedad de Parkinson
CC	corteza cerebral	ER	retículo endoplásmico
CI	culículo inferior	GC	guanilato ciclasa
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc	GMPc	GMP cíclico
CS	culículo superior	H3K4me3	trimetilación de la lisina 4 de la histona 3
DNA	ácido desoxirribonucleico	H3K27me3	trimetilación de la lisina 27 de la histona 3
mRNA	RNA mensajero	HA	histamina
BER	reparación por escisión de base	HC	hipocampo
BO	bulbo olfatorio	HDAC1	desacetilasa de histona 1
BSA	albúmina sérica bovina	HDC	histidina descarboxilasa
Cation-Ch	canales catiónicos	hMeDIP	inmunoprecipitación de DNA hidroximetilado
CB	cerebelo	HT	hipotálamo
CT	umbral de ciclo	ICG	isla CpG
CTN	células troncales neurales	I_{AHP}	canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}
CTPN	células troncales/ progenitoras neurales	I_{h}	canales catiónicos activados por hiperpolarización
CPN	progenitores neurales		
DA	dopamina		
DAB	diaminobencidina		

I _k	canales de potasio	PKA	proteína cinasa A
IP	inmunoprecipitación	PKC	proteína cinasa C
IP ₃	inositol trifosfato	PLA	fosfolipasa A
Kv3	canales de K ⁺ activados por voltaje	PLC	fosfolipasa C
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina	qPCR	PCR cuantitativo
M	médula	RB	rombencéfalo
MAP2	proteína asociada a microtúbulos 2	RHs	receptores histaminérgicos
MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos	RH ₁	receptor histaminérgico 1
		RH ₂	receptor histaminérgico 2
		RH ₃	receptor histaminérgico 3
MB	midbrain	rpm	revoluciones por minuto
MBP	proteínas de unión a DNA metilado	SAH	S-adenosil-L-homocisteína
mDA	mesencefálicas dopaminérgicas	SAM	S-adenosil-L-metionina
ME	médula espinal	SC	suero de caballo
MeDIP	inmunoprecipitación de DNA metilado	Shh	Sonic hedgehog
meDNA	control de DNA metilado	SN	sustancia nigra
Mes	mesencéfalo	SN-ST	nigroestriatal
MV	mesencéfalo ventral	SNC	sistema nervioso central
NF-κB	factor nuclear kappa B	ST	estriado
NMDA	N-metil-D-aspartato	TA	tálamo
NCX	intercambiador de Na ⁺ /Ca ²⁺	TH	tirosina hidroxilasa
NO	óxido nítrico	TM	núcleo tuberomamilar
P	postnatal	Tm	temperatura media
PBSMT	PBS + 2% leche sin grasa + 0.5% de Triton X-100	unDNA	control de DNA no metilado
PCR	reacción en cadena de la polimerasa	VACC	canales de Ca ²⁺ activados por voltaje
Pi	pituitaria	VMAT	transportador vesicular de monoaminas

II. RESUMEN

Durante la formación del mesencéfalo (**Mes**) de la rata, la diferenciación dopaminérgica ocurre entre los días embrionarios (**E**) 9 al 15. Durante este proceso, es fundamental la regulación de señales extrínsecas e intrínsecas que modulan la expresión de diferentes factores transcripcionales de manera temporal y espacial. Adicionalmente, las modificaciones de marcas epigenéticas en histonas y el DNA son esenciales para la expresión de genes asociados a fenotipo dopaminérgico. El proceso de desmetilación de DNA tiene un papel importante durante la neurogénesis, ya que se sabe que un incremento de 5-hidroximetilcitosina (**5hmC**) se ha asociado a activación transcripcional de genes neuronales. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que una inyección de histamina (**HA**) en E12, disminuye el número de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Sin embargo, se desconoce el posible mecanismo de acción por el cual esta amina podría actuar durante la neurogénesis dopaminérgica. En este trabajo, por medio de inyecciones intrauterinas, demostramos que la HA disminuye la expresión de genes tempranos de especificación mesencefálica dopaminérgica como *Lmx1a*, *Msx1* y *Foxa2* y genes tardíos de diferenciación dopaminérgica, como *Pitx3* y *Th* sugiriendo un papel importante de la HA durante el proceso de compromiso y diferenciación de neuronas mesencefálicas dopaminérgicas. Además, la HA disminuye el porcentaje de enriquecimiento de 5-metilcitosina (**5mC**) en los exones de *Pitx3* y *Th*, sugiriendo un importante papel de esta amina durante el proceso de transcripción y *splicing* de estos genes. Finalmente, se encontró que la HA tenía un efecto a largo plazo en el sistema dopaminérgico, ya que la administración de esta amina en E12 disminuye el número de fibras positivas a TH durante la formación de la vía nigroestriatal, 6 días después de la inyección. Estos resultados sugieren que la HA podría contribuir a la regulación de la diferenciación neuronal mesencefálica dopaminérgica durante el desarrollo del mesencéfalo.

II. ABSTRACT

During rat midbrain (**MB**) formation, dopamine neuron differentiation occurs between embryonic days (**E**) 9 to 15. During this process, the regulation of extrinsic and intrinsic signals that modulate the expression of different transcription factors at a temporal and spatial way, are fundamental. In addition, the modifications of epigenetic marks in histones and DNA are essential for the expression of genes associated to dopaminergic phenotype. The DNA demethylation process has an important role during neurogenesis since increases of 5-hydroxymethylcytosine (**5hmC**) has been associated to transcriptional activation of neuronal genes. Recently, it was demonstrated that an injection of histamine (**HA**) in E12 decreases the number of midbrain dopamine neurons. However, the possible mechanism of action by which this amine could act during dopamine neurogenesis is poorly understood. Here we show that ultrasound guide injections of HA, precludes the expression of early midbrain dopaminergic (**mDA**) specification genes as *Lmx1a*, *Msx1* and *Foxa2*, and *Pitx3* and *Th*, late-genes associated to the dopaminergic neuron phenotype, suggesting an important role of HA during mDA commitment and differentiation process. Furthermore, HA decrease the percentage of 5-methylcytosine (**5mC**) on the exons of *Pitx3* and *Th*, suggesting an important role of HA during transcription and splicing processes. Finally, we found that HA has a long-term effect on the dopaminergic system, since the administration of HA at E12 decrease neuronal fibers positive to TH during formation of nigrostriatal pathway, 6 days after the injection. These findings suggest that HA might contribute to regulation of mDA neuron differentiation during MB development.

III. ANTECEDENTES

1. CÉLULAS TRONCALES NEURALES

Durante la organogénesis temprana en la formación de un embrión, 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; Pelayo et al., 2011).

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 (Temple, 2001). Dentro de estas poblaciones se encuentran las células troncales neurales (**CTN**), las cuales darán lugar a todas las neuronas del sistema nervioso central (**SNC**) y serán fuente para la formación de células macrogiales que darán lugar a los astrocitos y los oligodendrocitos (Götz y Huttner, 2005).

La diferenciación de CTN ocurre a diferentes tiempos en las diferentes regiones del cerebro en formación (Götz y Huttner, 2005). Sin embargo, el patrón de generación de neuronas y células gliales siempre se dará en el mismo orden. Específicamente durante el desarrollo de la rata, la formación de neuronas se dará entre los días 8 al 18 de desarrollo embrionario (**E**) y posteriormente, la formación de astrocitos y oligodendrocitos se dará entre E14 al día postnatal (**P**) 11 y E18 en adelante, respectivamente (**FIG. 1**). Este proceso coordinado se debe principalmente a la expresión temporal de factores de

transcripción proneurales, los cuales son capaces de promover destinos neuronales y a su vez inhibir destinos gliales (Sauvageot y Stiles, 2002).

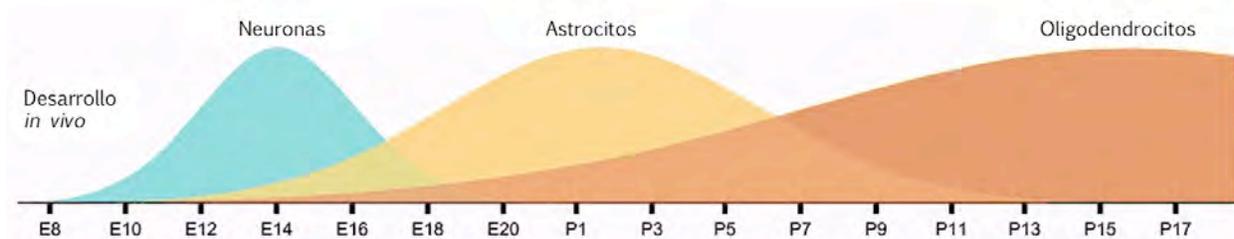


FIGURA 1. Proceso de diferenciación de las células troncales neurales a lo largo del desarrollo. La generación de los tres linajes dentro del cerebro ocurren en secuencia y temporalmente durante el desarrollo del cerebro. En ratas, el momento de mayor neurogénesis se da en E14, de astrocitogénesis en P2 y de oligodendrogénesis en P14. Modificado de Sauvageot y Stiles, 2002.

Algunos factores transcripcionales encargados de regular el cambio de linaje neuronal al 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. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Durante la formación del embrión, previo a la formación del SNC, ocurre un proceso denominado gastrulación en el cual se forman las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo que, gracias a una compleja serie de señales extracelulares y eventos intracelulares, darán origen a todos los órganos, tejidos y tipos celulares específicos que conforman un embrión. El ectodermo, es la capa externa que cubre a la gástrula tardía, a partir de esta, se derivarán tres regiones principales:

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

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 (Gilbert, 2013).

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. 2**; Gilbert, 2013; Massarwa et al., 2014; Sadler, 2005; Smith y Schoenwolf, 1997). 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).

2.1. 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.

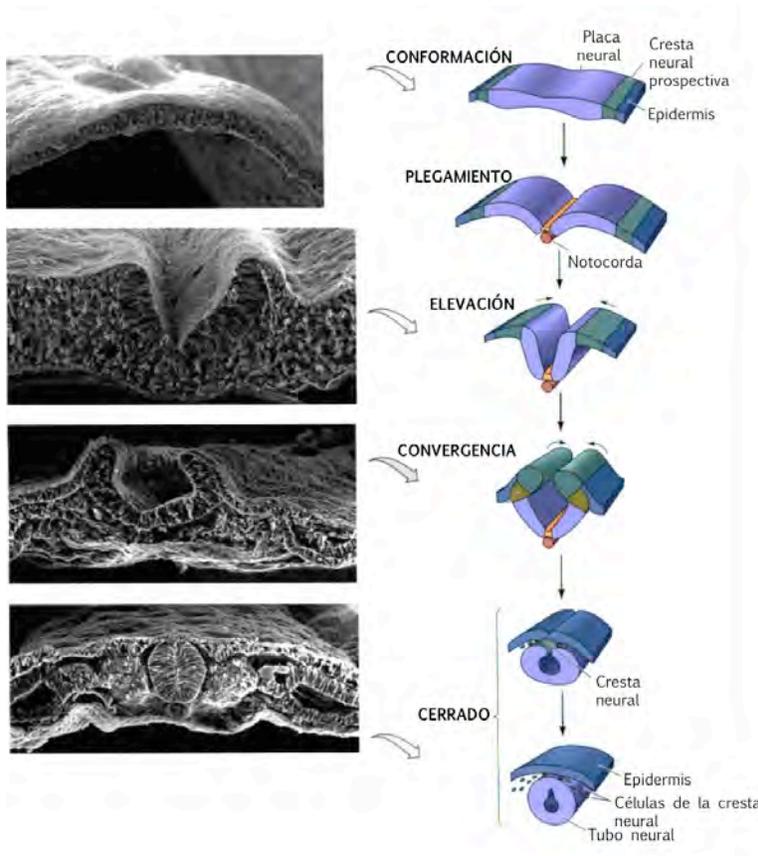


FIGURA 2. Proceso de neurulación y formación del tubo neural. El tubo neural se forma a partir de la placa neural, la cual a partir de la notocorda y las células aledañas de la misma, se invaginará formando así tres principales regiones: la epidermis, la cresta neural y el tubo neural. Modificado de Gilbert, 2013.

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 *substantia nigra*.
3. Rombencéfalo. Que dará lugar al cerebelo y a la médula oblongata.

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. Y el Mes no se subdividirá en otras vesículas y continuará su desarrollo en regiones más específicas (FIG. 3; Gilbert, 2013).



FIGURA 3. 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.

La regionalización del Mes (FIG. 4) 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; Martínez-Barbera et al., 2001).

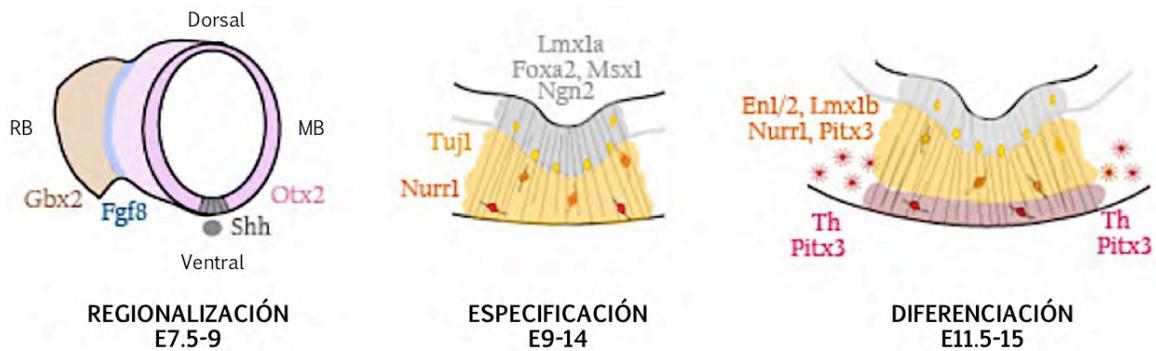


FIGURA 4. Etapas del proceso de la diferenciación de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas durante el desarrollo del ratón. El proceso de la diferenciación está limitado a tres principales etapas. La regionalización se identifica por la formación de dos centros de señalización, en donde se liberan 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).

2.1.1. 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 asociadas al movimiento, la adicción, el estrés, etcétera (Bertler and Rosengren, 1959; Carlsson, 1959; Carlsson et al., 1958). 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 (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 *substantia nigra pars compacta* (**SN**). Estas neuronas proyectan sus axones hacia el ST dorsal y formará la vía nigroestriatal (**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 emocionales y de recompensa (Luo, 2012; Sharples et al., 2014).

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 TH, 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).

2.1.1.1. ESPECIFICACIÓN A LINAJE DOPAMINÉRGICO

La formación de las neuronas mDA se da a partir de la regionalización y formación del 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 (Veenliet 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. Durante el desarrollo del ratón, 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., 2006b; Ang, 2006). Además de estos genes, se ha reportado la expresión de otros genes como *Foxa2* y *Ngn2*, los cuales también presentan una aparición temporal durante las primeras etapas de especificación (FIG. 4; Andersson et al., 2006b; Ferri et al., 2007; Gale y Li, 2008; Kele et al., 2006)

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.

2.1.1.2 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 β 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; Veenliet et al., 2013). Se sabe por ejemplo, que FOXA2 es necesario para la activación transcripcional de *Nurr1* durante E10.5 de ratón, justo después de que Shh finaliza su función en el mesencéfalo

ventral (**MV**; Ferri et al., 2007). 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; Gale y Li, 2008).

Conforme el proceso de desarrollo embrionario avanza, las células troncales/progenitoras neurales (**CTPN**) 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 de ratón (**FIG. 4**; 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 los niveles 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 (Hegarty et al., 2013).

2.1.1.3. FORMACIÓN DE LA VÍA NIGROESTRIATAL.

Al mismo tiempo que se da el proceso de 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, durante el desarrollo de la rata, 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. Posteriormente, 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 diencéfalo 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).

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 quimiorrepulsión secretadas por la corteza (Gates et al., 2004; Hegarty et al., 2013). Por lo tanto, estos axones en condiciones óptimas alcanzarán el ST hacia el día E18 de desarrollo embrionario de la rata. La inervación de estas fibras continuará hasta la primera semana de nacimiento, cuando se establecen todos los axones en las regiones correspondientes (FIG. 5; Hegarty et al., 2013).

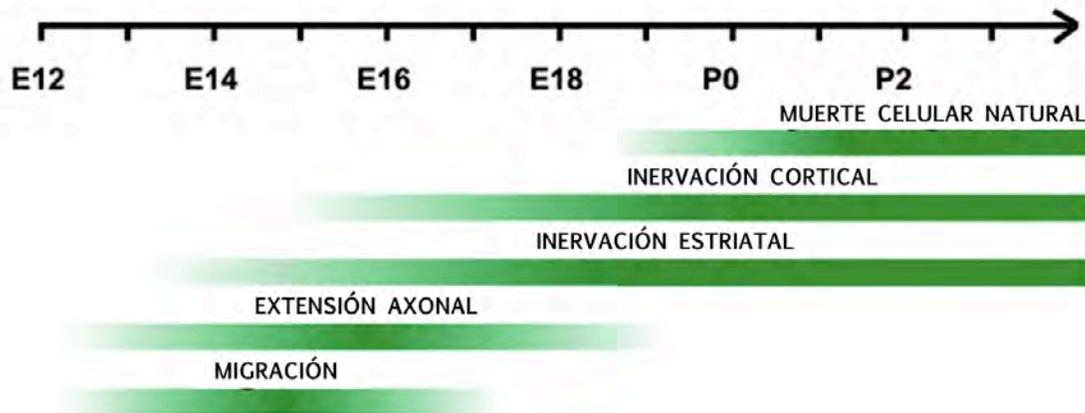


FIGURA 5. Representación gráfica de la evolución temporal de la formación de la vía nigroestriatal en rata. Las neuronas mDA comienzan a migrar y extender sus axones hacia el día E14. Estas fibras neuronales alcanzan el estriado hacia el día E18 y esta inervación continuará hasta la primera semana después 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 (Revisado en: 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. LA HISTAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ADULTO

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

3.1.1. DISTRIBUCIÓN DEL SISTEMA HISTAMINÉRGICO

Dentro del SNC ésta amina 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 (Eriksson et al., 1998). 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. 6). La densidad de fibras histaminérgicas en el hipocampo, tálamo, retina y la médula espinal varían entre especies (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).

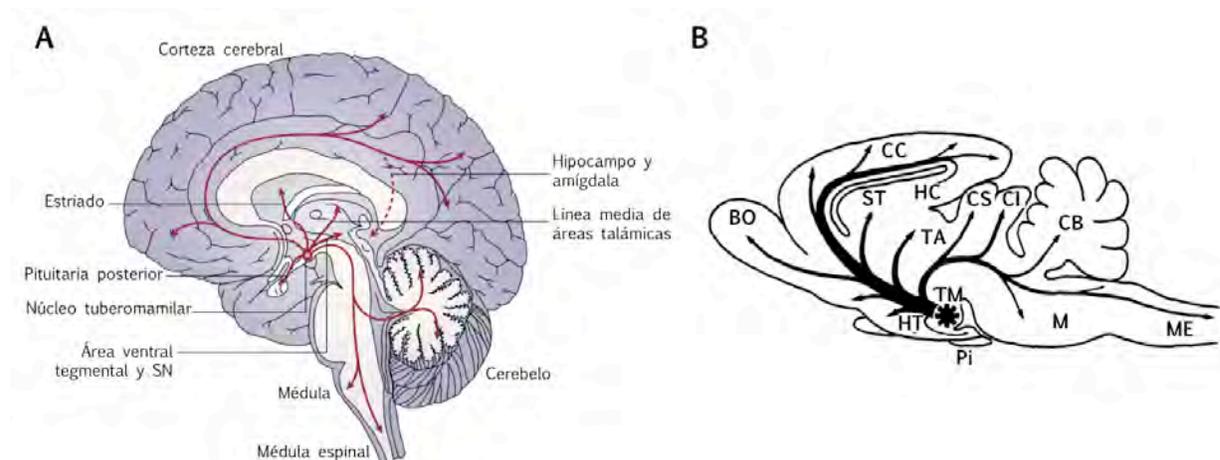


FIGURA 6. Inervación de las fibras de neuronas histaminérgicas a lo largo del cerebro en mamíferos. Vista sagital de las conexiones que genera el sistema histaminérgico en el cerebro de humano (A) y rata (B). Las flechas representan las conexiones que generan las fibras histaminérgicas desde el núcleo 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.

3.1.2. 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 histidina descarboxilasa (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_1 - RH_3) acoplados a proteínas G y reportados en cerebro, podrá ejercer sus funciones (FIG. 7). 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 (en orden de minutos) a otras aminas liberadas en el cerebro como la dopamina, norepinefrina o serotonina, las cuales tienen una vida media de entre 2-4 h (Dismukes y Snyder, 1974; Haas et al., 2008).

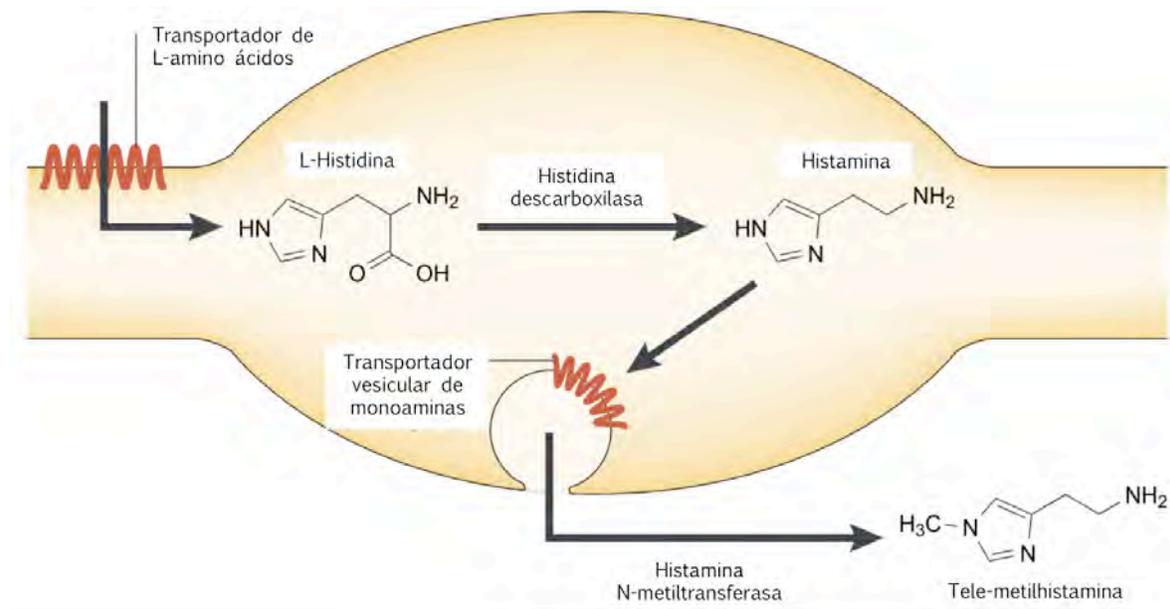


FIGURA 7. Síntesis y metabolismo de la HA en el cerebro. El transportador de L-aminoácidos introduce a la L-histidina al citosol de las neuronas en donde la HA es sintetizada, mediante la acción de la enzima HDC. La HA es almacenada por transportadores vesiculares de monoaminas y es liberada después 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_3 , 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. 7**). 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).

3.1.3. 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 (**RH₁-RH₄**), de los cuales los receptores RH₁-RH₃ se encuentran distribuidos a lo largo del SNC y en el caso del RH₄, se ha detectado predominantemente en tejidos periféricos, sin embargo su existencia en cerebro aún es controversial (Haas et al., 2008). Cada receptor está acoplado a una proteína G diferente y por lo tanto ejerce una función diferente en la célula que lo expresa:

Receptor H₁. 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)P₃ (**IP₃**) el cual a su vez promoverá la liberación de Ca²⁺ intracelular y 2) diacilglicerol (**DAG**). El Ca²⁺ liberado es capaz de activar procesos diferentes como: la apertura de canales catiónicos, los cuales causan despolarización, la activación de transportadores intercambiadores de Na⁺-Ca²⁺ lo cual también causa despolarización, la producción de ácido araquidónico, óxido nítrico (**NO**), GMP cíclico (**GMPc**) y la apertura de canales de K⁺, 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⁺ (**FIG. 8**; Haas et al., 2008; Haas y Panula, 2003). 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- κ 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 RH₁ disminuye su expresión, lo cual refuerza la importancia de este receptor en el SNC (Haas et al., 2008).

Receptor H₂. Este receptor está compuesto de 358-359 aminoácidos y se encuentra acoplado a la proteína G α_5 y por lo tanto es capaz de activar a la adenilato ciclasa e inducir la formación de AMP cíclico (**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⁺ dependientes de voltaje y de Ca²⁺ (**FIG. 8**; Haas y Panula, 2003; Haas et al., 2008; Hill et al., 1997; Molina-Hernández et al., 2012). El RH₂, al igual que el RH₁, 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 H₃. 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 Ca²⁺ activados por voltaje y a la proteína cinasa activada por mitógenos (**MAPK**) (**FIG. 8**). Además, está acoplado de manera negativa a la síntesis de AMPc. Este receptor se ha denominado autoreceptor, ya que a diferencia del RH₁ y RH₂, 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 H₁ y H₂ tienen acciones principalmente sobre neuronas excitatorias y por el contrario, la activación del receptor H₃ causa la autoinhibición de neuronas histaminérgicas al inhibir la liberación de HA y otros neurotransmisores (Haas y Panula, 2003).

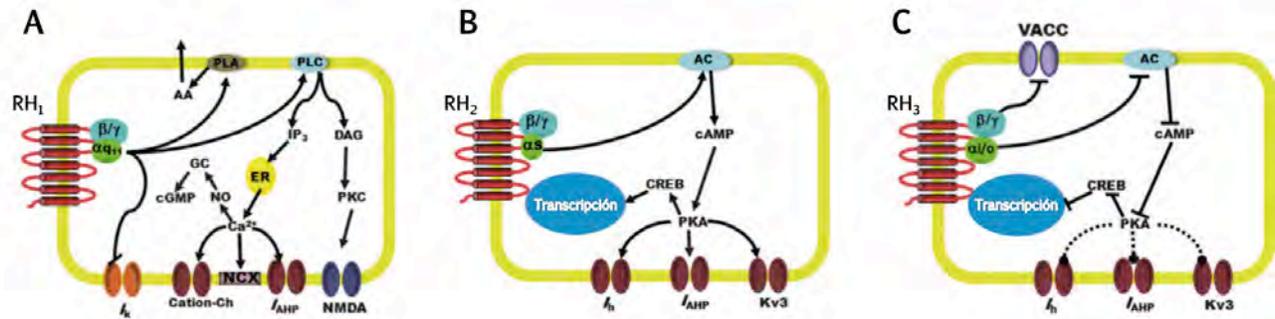


FIGURA 8. Vías de señalización activadas por los receptores histaminérgicos en el sistema nervioso central. Se pueden observar las vías de señalización activadas por los tres diferentes receptores histaminérgicos: RH₁ (A), RH₂ (B) y RH₃ (C), acomplados a sus respectivas proteínas G. Abreviaturas: (PLA) fosfolipasa A; (AA) ácido araquidónico; (PLC) fosfolipasa C; (IP₃) 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 Ca²⁺; (NCX) intercambiador de Na⁺/Ca²⁺; (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 Ca²⁺ activados por voltaje. Modificado de Molina-Hernández et al., 2012.

3.2. LA HISTAMINA DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Durante el desarrollo embrionario de la rata, 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 rombencéfalo. 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 rombencéfalo 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. 9; 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)

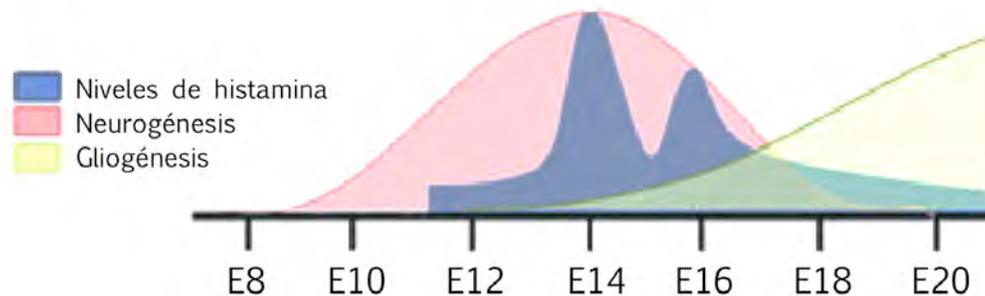


FIGURA 9. Representación de las curva de neurogénesis, gliogénesis y concentración de histamina a lo largo del desarrollo del cerebro de la rata. Se puede observar que los picos de mayor concentración de HA (azul) coinciden con el pico de mayor producción de neuronas (rosa). Modificado de Molina-Hernández et al., 2012.

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

Hasta ahora se ha probado que las 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 estas células a través de la activación del RH₂ y también es capaz de incrementar la muerte celular. Por otro lado, a través de la activación del RH₁ la HA puede aumentar el número de neuronas maduras positivas a la proteína asociada a microtúbulos 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).

Por otro lado, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, recientemente se demostró que la HA era capaz de tener un efecto distinto sobre el proceso de neurogénesis en Mes. 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 β III-Tubulina (Escobedo-Avila et al., 2014). Este efecto se dio tras la activación del RH_1 (descubrimiento obtenido al inyectar los diferentes antagonistas para el RH_1 o RH_2). Adicionalmente, ésta amina también era capaz de disminuir los niveles de factores transcripcionales específicos de linaje dopaminérgico como: LMX1A, LMX1B y PITX3, proteínas analizadas por Western Blot. Asimismo, 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 (Escobedo-Avila et al., 2014).

En conjunto, estos datos sugieren 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 los 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 (van Heesbeen et al., 2013).

La epigenética se ha definido formalmente como el estudio en los cambios en la función génica que son mitóticamente y/o meióticamente heredables y que no implican un cambio en la secuencia del DNA (Wu and Morris, 2001). Adicionalmente, 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). Éstas definiciones enfatizan 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 epigenéticas asociadas a histonas y DNA a lo largo del genoma, para

cumplir de manera coordinada la formación de un cerebro funcional (van Heesbeen et al., 2013).

4.1. METILACIÓN DEL DNA

La metilación en el DNA ocurre en la posición C5 de las citosinas (**5mC**) en el dinucleótido CpG. 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 enriquecidos 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 DNA de las enzimas DNA 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. 10 y FIG. 11**) (Cheng et al., 2011; Hermann et al., 2004). La metilación del DNA puede ser regulada directamente por la vía del tetrahidrofolato la cual tiene como derivados la producción de metionina y SAM (Wilde et al., 2014), esta vía a su vez puede ser regulada de manera metabólica o a través de la activación de diferentes vías de señalización. Por ejemplo, se sabe que el NO es capaz de inhibir directamente a la vitamina B12, la cual al mismo tiempo es cofactor de la enzima metionina sintetasa. Además, el NO promueve la reducción de ATP el cual también regula la vía del tetrahidrofolato al activar a la enzima metionina adenosiltransferasa y así la síntesis de SAM (Danishpajoo et al., 2001; Haas et al., 2008).

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 DNA 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 catalítico. Sin embargo, se sabe que la DNMT3L interactúa directamente con las DNMT3a/b y es capaz de estimular la metilación del DNA *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 estimulatorio. 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 DNA *de novo* (Bestor, 2000; Cheng et al., 2011; Hata et al., 2002; Suetake et al., 2004).

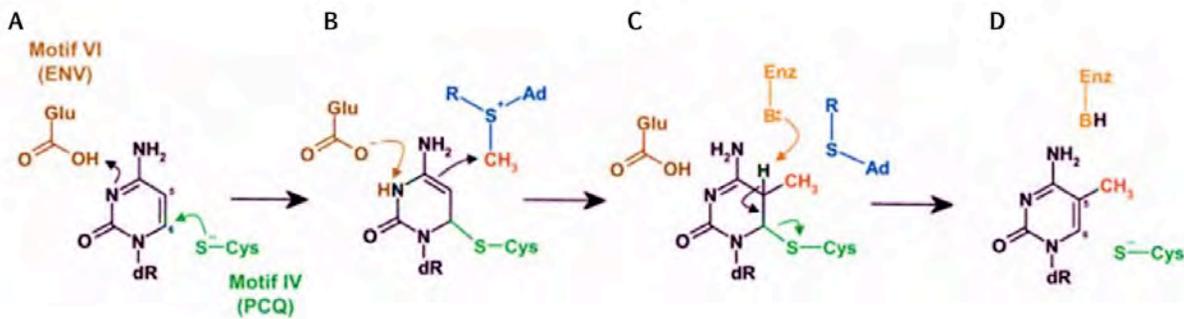


FIGURA 10. Mecanismo químico de la metilación en citosinas. La reacción de metilación es catalizada por las DNA metil transferasas (DNMT) e involucra (A) la interacción de dos motivos de esta misma enzima con la citosina (Motif VI; café y Motif IV; verde), la interacción principal se da en el C6 en donde 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 (CH₃) 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 DNA. 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 DNA se encuentran: el control de la impronta génica, el silenciamiento de genes, la inactivación del cromosoma X 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 reforzar a

través de la unión de proteínas de unión a DNA metilado (**MBP**), las cuales pueden reclutar co-represores para silenciar a un gen determinado (Klose y Bird, 2006).

A pesar de que la metilación de DNA ha sido asociada con represión transcripcional; recientemente existen evidencias que demuestran que también es capaz de regular el *splicing* alternativo. Se ha observado que tanto los exones y especialmente los sitios de *splicing* tienen mayores niveles de metilación del DNA que los intrones flanqueantes, y que el *splicing* de aproximadamente el 22% de los exones alternativos está regulado por la metilación del DNA. Este proceso se ha sugerido que es regulado por dos principales mecanismos; la primera implica la modulación de la velocidad de elongación de la RNA polimerasa II (**Pol II**) por el factor de unión a CCCTC (**CTCF**) y la proteína de unión a metil-CpG 2 (**MeCP2**); el segundo implica la formación de un puente proteico por la proteína de heterocromatina 1 (**HP1**) que recluta factores de *splicing* en exones alternativos transcritos. Estos dos mecanismos, sin embargo, regulan sólo una fracción de estos eventos, lo que implica que aún se encuentran más mecanismos subyacentes (Lev Maor et al., 2015).

4.2. DESMETILACIÓN DEL DNA

Recientemente, en el 2009, se descubrió que la marca de 5mC también pasa por un proceso de oxidación, generando 5-hidroximetilcitosina (**5hmC**), la cual se encuentra 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 expresan en distintos tipos celulares y los patrones de expresión de cada una son diferentes durante las distintas etapas de desarrollo. Estas enzimas usan el Fe^{2+} y α -cetoglutarato (**α -KG**) para realizar su mecanismo de 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). Adicionalmente, a través de su actividad catalítica, las enzimas TET pueden desmetilar mediante dos vías (**FIG. 11**):

- 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).

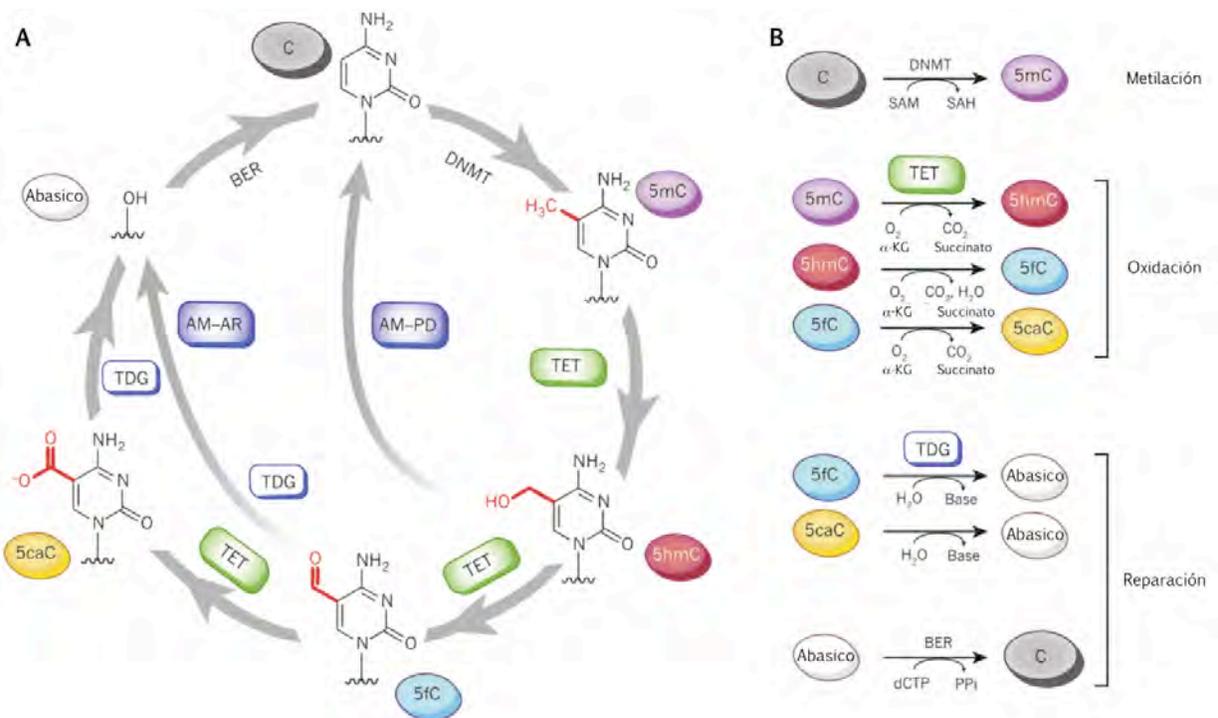


FIGURA 11. Vía completa de la dinámica de modificaciones que existen en citosinas. A) Representación integrada de los cambios que sufren las citosinas no modificadas. A través de las DNMT éstas pueden convertirse a 5mC y posteriormente pueden ser oxidadas a través de la acción de enzimas TET por medio 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 DNA y por lo tanto puede ser removida con facilidad por enzimas glicosilasas 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 (**5hmU**), 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 DNA 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 DNA 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 DNA, RNA 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 proteicos 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 aminas en amidas y reduciendo así la capacidad de las histonas para unirse al DNA (Gregory et al., 2001).

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 DNA 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., 2014a; 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. Además, 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). Adicionalmente, 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).

Por otro lado y de manera general, se ha sugerido que la desmetilación del DNA 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.

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 (Hahn et al., 2013), lo que sugiere que la 5hmC, al no presentar un patrón inverso a la 5mC, actúa de manera independiente a la metilación del DNA y que además es una marca lo suficientemente estable para participar en la regulación epigenética. Durante este proceso, para promover la actividad transcripcional de genes tejido específico, la 5hmC se encuentra de manera abundante en regiones intragénicas, es decir, dentro del cuerpo del gen (Hahn et al., 2013; Kim et al., 2014).

Por otro lado, esta marca se ha asociado en conjunto con marcas de histonas como la H3K27me3, ya que se ha observado 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 y migración de estas CTN (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 DNA, 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. Asimismo, 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 (Wheldon et al., 2014).

De manera interesante, en el caso particular del proceso de diferenciación dopaminérgica, se ha reportado 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). Asimismo, la exposición de las CPN de MV al neuropéptido urocortina, es capaz de incrementar la diferenciación dopaminérgica debido a una hiperacetilación de la histona H3 y una inhibición de la desacetilasa de histona 1 (**HDAC1**) a los sitios de unión de NURR1 del promotor de *Th* (Huang et al., 2015).

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* de humano (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 acarrear 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 de las señales extrínsecas cruciales para el proceso de diferenciación neuronal dopaminérgica sobre el

establecimiento de la 5hmC, además de que no se ha estudiado este proceso de manera detallada sobre la expresión de genes limitantes en la diferenciación mDA.

Estos reportes en conjunto, destacan la importancia de la regulación de las marcas de histonas y de DNA, y su intercomunicación con señales extrínsecas (e.g. neuromoduladores, moléculas morfogénicas, etc.) 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 primordial durante la diferenciación dopaminérgica. Se sabe que la HA al ser administrada intrauterinamente a altas concentraciones en etapas tempranas de la neurogénesis, es capaz de disminuir el número de neuronas mDA sin afectar el número total de neuronas; sugiriendo que la HA ejerce un efecto específico sobre el linaje dopaminérgico. Sin embargo se desconoce a que nivel de la diferenciación hacia linaje dopaminérgico tiene efecto esta amina y por lo tanto aun no se puede concluir cual es el papel específico que desarrolla durante éste proceso.

Asimismo, dentro de los mecanismos más importantes que regulan la diferenciación dopaminérgica, está la regulación de las marcas de histonas y DNA, las cuales interaccionan entre sí para regular la expresión de diferentes genes de manera temporal y espacial. De manera importante, se ha observado que la marca de 5hmC podría ser crucial para regular y desencadenar el proceso de neurogénesis. Por lo tanto, sería interesante profundizar mas sobre las señales extrínsecas que regulan el establecimiento de esta marca y por lo tanto el desencadenamiento del proceso de neurogénesis en diferentes regiones del cerebro como por ejemplo el Mes.

Por otro lado, a pesar de saberse del posible papel de la HA durante la neurogénesis en Mes o en corteza, no existen reportes que demuestren por completo 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 DNA) durante el proceso de diferenciación dopaminérgica y consecuentemente podría tener implicaciones a largo plazo sobre la formación de la vía SN-ST.

V. HIPÓTESIS

La histamina actúa sobre los progenitores neurales dopaminérgicos, alterando el enriquecimiento de 5mC y 5hmC en genes de diferenciación dopaminérgica. Como consecuencia, se desencadena un efecto a largo plazo en la formación de la vía nigroestriatal.

VI. OBJETIVO

1. OBJETIVO GENERAL

Explorar si la histamina es capaz de modificar el porcentaje de enriquecimiento de 5mC y 5hmC en genes específicos de diferenciación dopaminérgica; modulando su expresión y por lo tanto alterando la formación de la vía nigroestriatal.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar si el efecto de la histamina se da sobre la población progenitora neural dopaminérgica mesencefálica.
2. Evaluar si después de una inyección con histamina, existe un cambio en la expresión de genes de factores transcripcionales importantes para la diferenciación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas
3. Analizar si existe un cambio en los patrones de metilación e hidroximetilación en exones de genes asociados a diferenciación dopaminérgica, después de haber un estímulo con histamina en el mesencéfalo.
4. Observar si los embriones inyectados con histamina durante el desarrollo presentan alteraciones a largo plazo sobre la vía nigroestriatal.

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 E12.

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 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 colocó en una base de manipulación y se conecto a una manguera por la que se le suministra la anestesia inhalatoria durante toda la cirugía (1%) por medio de un vaporizador. Se corroboró 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 rasuró el pelo de la región donde se hizo la incisión, la piel se limpió con antiséptico y se realizó una laparotomía abdominal para exponer los cuernos uterinos. Una vez expuestos, se registró el número de embriones que hay en cada cuerno uterino, para llevar un control de aquellos embriones que fueron inyectados. Posteriormente, se aisló un embrión a través de una caja de Petri con una base de silicón, la cual se llenó 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 colocó la sonda de ultrasonido por encima del embrión aislado para registrar una imagen en tiempo real a través de la pared uterina. Se localizó la estructura del cerebro en la pantalla y el sitio donde se realizará la inyección. Las agujas de microinyección se construyeron con microcapilares pulidos (capilares de vidrio de borosilicato, 1 x 0.58 mm, Sutter Instruments). La aguja se colocó en el sujetador de un inyector automático y la inyección del fármaco se realizó controlando la velocidad y el volumen de la inyección (**FIG. 12**). Para este estudio se inyectaron 50 µg en 2 µl (25 µg/µl) de HA en los ventrículos laterales y como control se inyectó H₂O estéril en la misma región.

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

3. HISTOLOGÍA

Los embriones de día E12 y E18 se fijaron a 4°C por inmersión con paraformaldehído al 4% en PBS por 24 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 criostato para cortarlo. Se realizaron cortes sagitales y coronales seriados de 20 µm de espesor, los

cuales fueron recuperados en laminillas cargadas electrostáticamente (con carga positiva; VWR Micro Slides, 25 x 75 x 1 mm).

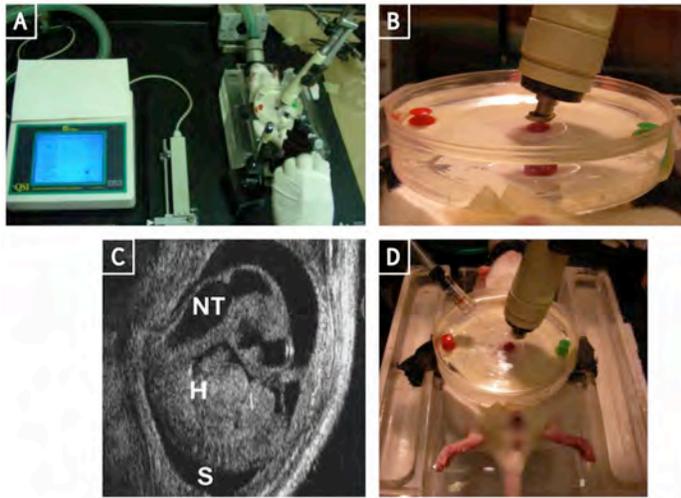


FIGURA 12. Proceso de inyección cerebral intrauterina. (A) Sistema de inyección y ultrasonido que se usa durante la cirugía. Después de que se realiza la laparotomía abdominal y que se cuenta el número de engrosamientos, los cuales corresponden cada uno a un embrión, se aísla un embrión en una caja de 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 ventrículos (D).

4. INMUNOHISTOQUÍMICAS

Para hacer inmunotinciones en los cortes histológicos obtenidos mediante la técnica de criostato, primero se lavó el tejido con PBS 1x durante 5 min. Posteriormente, se incubaron los cortes en recuperador de antígenos a 65°C por 30 min y se equilibraron por 15 min a temperatura ambiente. En seguida el tejido fue permeabilizado con triton X-100 al 0.3% y se bloquearon posibles uniones inespecíficas del anticuerpo con suero de caballo (**SC**) al 5% en PBS. Posteriormente se incubaron con anticuerpo primario (**TABLA 1**) diluidos en PBS con SC al 5%, a 4°C por 16 h.

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 (**TABLA 1**) diluido en PBS con SC al 5% y BSA al 0.1% durante 2 h. Los anticuerpos secundarios usados fueron los mostrados en la **TABLA 1**.

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).

TABLA 1. Anticuerpos usados para inmunohistoquímicas.

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Anticuerpo	Origen	Marca	Dilución	Temperatura de incubación
Lmx1a	Conejo	Millipore	1:1500	4°C
β III-Tubulina	Ratón	Covance	1:1000	25°C ó 4°C

ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Anticuerpo	Origen	Marca	Dilución	Temperatura de incubación
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Conejo hecho en cabra	Molecular Probes	1:500	25°C
Alexa Fluor 568 anti-IgG	Ratón hecho en cabra	Molecular Probes	1:500	25°C

5. ACLARAMIENTO DE CEREBROS ACOPLADO A TINCIÓN CONTRA TIROSINA HIDROXILASA

Se obtuvieron los embriones en E18 y se disecaron los cerebros de cada uno de ellos. Posteriormente, después de lavarlos con PBS 1x, los cerebros se fijaron a 4°C en 20% dimetilsulfoxido (**DMSO**) y 80% de metanol (solución fijadora). Después de 24 h, los cerebros se transfirieron a una solución al 10% de H₂O₂ diluido en la solución fijadora y se incubaron por 16 h a temperatura ambiente, para blanquear el tejido y eliminar la actividad endógena de la peroxidasa. Después del blanqueamiento, los cerebros se transfirieron a una solución al 100% de metanol y se incubaron por 16 h a -20°C.

Para la tinción de los cerebros, estos se rehidrataron a temperatura ambiente en 50% de metanol y posteriormente en PBS 1x. Posterior a este paso, los cerebros se lavaron dos veces en 2% de leche sin grasa y 0.5% de triton X-100 diluido en PBS 1x (**PBSMT**). Los cerebros se incubaron toda la noche en agitación a 4°C con el anticuerpo primario diluidos en PBSMT; el anticuerpo usado fue policlonal de conejo, anti-Tirosina Hidroxilasa (dilución 1:1000, Pel-freez). Después de esta incubación, los cerebros se lavaron siete veces en PBSMT, con una duración cada uno de 1 h. A continuación, los cerebros se incubaron toda la noche en agitación a 4°C con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa diluidos en PBSMT (1:500). Los embriones se lavaron como previamente se mencionó y en seguida se visualizó la inmunotinción con diaminobencidina (**DAB**), se usaron las indicaciones del kit (DAB Substrate Kit for Peroxidase, VECTOR laboratories; SK-4100) y se incubó de 10 a 20 min, hasta que los

cerebros tornaran a un color gris. Los cerebros se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 24 h a 4°C.

Para el aclaramiento de los cerebros, estos se lavaron en 0.2% de BSA y 0.5% de Triton X-100 diluido en PBS 1x durante media hora. Posteriormente se realizaron lavados con 50% de metanol, 80% de metanol y 100% de metanol por 1 h cada uno a temperatura ambiente. Finalmente los cerebros se sumergieron en una solución 1:2 de ácido benzoico y benzil benzoato respectivamente. Los cerebros fueron visualizados en un microscopio de disección Nikon smz 1500 y fotografiados en con una cámara Nikon coolpix s10 vr.

6. EXTRACCIÓN DE DNA

Se obtuvo DNA a partir del MV de embriones de E14 inyectados dos días antes con H₂O estéril o con HA, de acuerdo al siguiente protocolo:

Se realizó una disección del Mes ventral, se resuspendieron y disgregaron en buffer de lisis con 200 ng/mL de Proteínasa K a 37°C por 16 h. Posteriormente se agregó una solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (en una relación 25:24:1) y se homogeneizó la muestra. Se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto (**rpm**) por 5 min a 4°C y posteriormente se tomó la primer fase superior de la solución. Se agregó isopropanol con el fin de precipitar el DNA y hacerlo visible, y se incubó durante toda la noche a -20°C. Se centrifugó a la misma velocidad por el mismo tiempo que en el paso anterior y el DNA se lavó con etanol al 70%. Finalmente, después de este último lavado se tiró el sobrenadante y el DNA adherido a la pared del tubo se dejó secar para quitar residuos de alcohol. El DNA se resuspendió a 37°C en H₂O estéril. Se cuantificaron las muestras con la ayuda de un NanoDrop 2000c y determinando la relación A₂₆₀/A₂₈₀ se comprobó la pureza de la extracción. Finalmente las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE DNA METILADO E HIDROXIMETILADO Y ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVO.

Se extrajo el DNA del Mes de embriones de E14 y cada muestra se trató con 2 µl de GenDNA RNase (*DNAse-free*) por 1 ml de muestra de DNA y se incubaron 1 h a 37°C.

Posteriormente se realizó de nuevo una purificación de DNA a cada muestra. Cada muestra debe quedar a una concentración de 0.06 µg/µl.

El DNA se sonico 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 realizó de 2 a 3 veces. Se utilizó un sonicador Ultrasonic Processor (GENEQ, GEX500 Cat. SOVC505-00). Para verificar la formación de fragmentos de DNA del rango de tamaño deseado, se corrió un gel de agarosa al 1% con las muestras deseadas (**FIG. SUPL. 1**).

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

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

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

TABLA 2. Diseño experimental para realizar la mezcla de inmunoprecipitación.

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

El control de DNA metilado (**meDNA**) y el control de DNA no metilado (**unDNA**) que se agregaron a todas las muestras sirvieron como controles internos, los cuales indican la eficiencia de los anticuerpos (**FIG. SUPL. 2**). Se necesitan 1.2 µg de DNA sonicado por IP.

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

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

Preparación de anticuerpo. Los anticuerpos usados para la IP y su preparación se enlistan en la siguiente tabla:

TABLA 3. Anticuerpos usados para el inmunoprecipitación de DNA metilado e hidroximetilado.

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

Preparación de anticuerpos para la inmunoprecipitación

Reactivo	Cantidad
Anticuerpo	0.30 μ l
Magbuffer A	0.60 μ l
H ₂ O estéril	2.10 μ l
MagBuffer C	2.00 μ l
Volumen final	5.00 μ l

Mezcla final de IP. Se mezclaron los 75 μ l de la mezcla de IP, 5 μ l de la mezcla con el anticuerpo y 20 μ l de perlas lavadas previamente. Se dejaron en incubación por 16 h a 4°C en rotación constante.

MeDIP/hMeDIP. Se colocaron los tubos con la mezcla final de IP en una gradilla magnética y se espero 1 min hasta que las perlas se concentraran en un punto. Se descarto el sobrenadante y se realizaron 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 DNA. Las muestras inmunoprecipitadas y lavadas junto con los INPUTs de cada muestra se trataron con 100 μ l de Buffer para aislar DNA (DIBuffer) y 1 μ l de proteinasa K (incluida en el kit). Se incubó por 15 min a 55°C y posteriormente por 15 min a 100°C. Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm por 5 min a 4°C y se

transfirieron los sobrenadantes a un tubo nuevo. Finalmente se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

Para poder analizar la cantidad de DNA inmunoprecipitado en nuestros genes de interés, se realizó una PCR cuantitativa (**qPCR**). Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de las secuencias obtenidas en la base de datos de UCSC Genome Browse database de *Rattus norvegicus* (Gibbs et al., 2004; Havlak et al., 2004). Para los genes de diferenciación neuronal dopaminérgica, los oligonucleótidos fueron diseñados en exones, los cuales, de acuerdo a la literatura representan regiones de regulación para el proceso de neurogenesis. Los exones se escogieron en base a su alto porcentaje en contenido CpG o dentro de una CGI. Para los controles, los oligonucleótidos se diseñaron dentro de las regiones regulatorias de cada gen no neural mediado por metilación del DNA y con alto contenido en CpG o dentro de una CGI (**FIG. SUPL. 3**). Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

TABLA 4. Oligonucleótidos usados para analizar las inmunoprecipitaciones de DNA metilado e hidroximetilado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Gen	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido	Tamaño	Región
Lmx1a	F: 5' GGGTCATCTCGGATAGGTTT 3'	R: 5' CAGGCACTTACTTCTCGTAG 3'	156 pb	Exón 2
Msx1	F: 5' CGAAACCCATGATCCAGGG 3'	R: 5' GTCCTCCACTTTGACACCG 3'	112 pb	Exón 1
Foxa2	F: 5' CGCTCATCACCATGGCCAT 3'	R: 5' GCCGGTAGAAAGGAAGAG 3'	96 pb	Exón 3
Nurr1	F: 5' CAGTCCGAGGAGATGATGC 3'	R: 5' GGAAGTTGTGAAGGGAGCC 3'	133 pb	Exón 2
Pitx3	F: 5' CTTAGTCCCTGCCAGTACG 3'	R: 5' GCACCCCTTTTCAGACCCT 3'	149 pb	Exón 4
Th	F: 5' GAGACAGAACTCGGGACC 3'	R: 5' CGGGTGACAGCATATCCTC 3'	145 pb	Exón 1
Oct4	F: 5' CGTCCCCAACCTCAGTCTT 3'	R: 5' TCCCCAATCCCACCCTCTA 3'	132 pb	Promotor Proximal
Gapdh	F: 5' CTCATCCGGTCACTTCCTC 3'	R: 5' GTAGCTGGGCTCTCTCAT 3'	143 pb	Promotor

Previo a la realización de la qPCR se estandarizó la T_m óptima para cada par oligonucleótidos de cada gen, mediante una PCR punto final y posteriormente se corroboró por PCR cuantitativo.

Para cada reacción de qPCR se realizó la siguiente mezcla:

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

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

La reacción de polimerización se realizó a 57°C para los genes *Foxa2*, *Nurr1* y *Pitx3*, a 60°C para los genes *Lmx1a* y *Msx1* y a 61°C para los genes *Th*, *Oct4* y *Gapdh*.

Una vez terminada la reacción, se graficaron los umbrales de ciclo (*threshold cycle* por sus siglas en ingles; 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. 13).

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

Donde:

m: pendiente de la recta

EA: eficiencia de amplificación

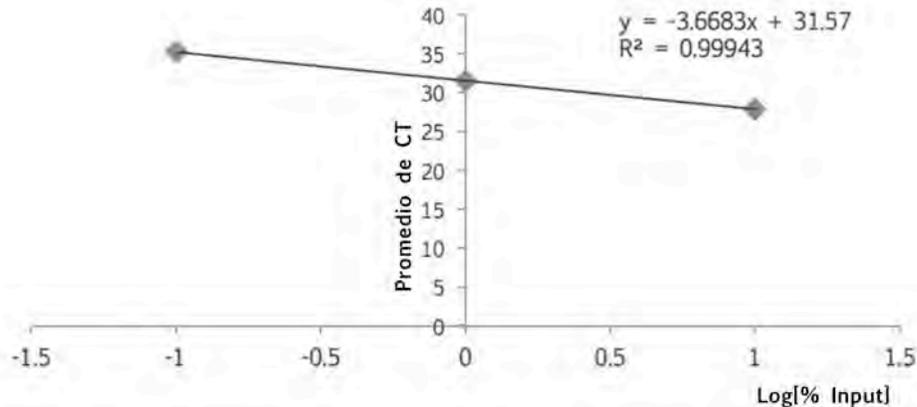


FIGURA 13. Ejemplo de una gráfica obtenida a partir de una curva estándar de INPUT. Las concentraciones usadas fueron 0.1%, 1% y 10%. Una relación (R^2) cercana a 1 permitirá que la eficiencia de amplificación (EA) sea a su vez cercana a 2 y por lo tanto se obtendrán datos confiables de las reacciones 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.

8. EXTRACCIÓN DE RNA

Se obtuvo RNA a partir del MV de embriones de E14 inyectados dos días antes con H₂O estéril o con HA, de acuerdo al método de Trizol® (Invitrogen cat. 1559602). Por cada tratamiento se agregó 500 µl de Trizol, se disgregó el tejido de manera mecánica y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se agregaron 100 µl de Cloroformo y se agitó vigorosamente cada tubo, con la finalidad de limpiar el RNA. Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 45 min a 4°C, esta centrifugación generará 3 fases, de la cual se obtuvo la primera de manera cuidadosa. Se agregó 500 µl de isopropanol a cada tubo y se dejó precipitando el RNA toda la noche a -80°C. Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 30 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y el pellet de RNA se lavó con etanol al 80% en agua libre de RNAsas, se centrifugó a la misma velocidad por 10 min y finalmente, después de este último lavado se tiró el sobrenadante y el RNA adherido a la pared del tubo se dejó secar para quitar residuos de alcohol. El RNA se resuspendió a 37°C en H₂O libre de RNAsas. Se cuantificaron las muestras con la ayuda de un NanoDrop 2000c y determinando la relación A260/A280 se comprobó la pureza de la extracción y por medio de un gel de agarosa se determinó la integridad del RNA. Finalmente las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

9. FORMACIÓN DE cDNA: REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVO

Se obtuvo cDNA de las muestras de RNA obtenido, con el Kit GeneAmp® RNA PCR KIT, usando un microgramo de RNA y siguiendo las siguientes especificaciones. Por reacción se puso:

TABLA 6. Diseño experimental para realizar la reacción de transcriptasa reversa.

Reactivo	Cantidad
MgCl ₂ (5mM)	4 µl
10x Buffer II para PCR	2 µl
dATP (1µM)	2 µl
dCTP (1µM)	2 µl
dTTP (1µM)	2 µl
dGTP (1µM)	2 µl
Inhibidores de RNAsas (1U/µL)	1 µl
Transcriptasa reversa (2.5U/µL)	1 µl
Hexámeros aleatorios (2.5µM)	1 µl
RNA (1µg)	1 µl
H ₂ O estéril	2 µl
Volumen final	20 µl

La reacción se dejó corriendo en el termociclador a 42°C por 30 min (temperatura óptima de la enzima), 99°C por 5 min (inactivación de la enzima) y 5°C por 5 min. Finalmente las muestras se diluyeron en H₂O para dejarlas a una concentración final de 33.33 ng/µl.

Para poder analizar la expresión de nuestros genes de interés, se realizó una PCR cuantitativa (**qPCR**). Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de las secuencias de mRNA obtenidas en la base de datos de UCSC Genome Browse database de *Rattus norvegicus* (Gibbs et al., 2004; Havlak et al., 2004). Estos se diseñaron sobre las intersecciones que existían entre exones para amplificar únicamente un producto representativo del mRNA canónico de cada gen, sin tener amplificación de DNA. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

TABLA 7. Oligonucleótidos usados para analizar la expresión de diferentes genes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Gen	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido	Tamaño
Lmx1a	F: 5' GCACGGAAGCTAGACTCAA 3'	R: 5' GCTCTGCCCAGCAAAGAG 3'	143 pb
Msx1	F: 5' CTGTTGGGGGACTCCTCAA 3'	R: 5' GCCGCCTGGCTGGGGG 3'	119 pb
Foxa2	F: 5' CAGAAAAGGCCTGAGGTG 3'	R: 5' CAGCATACTTTAACTCGCTG 3'	137 pb
Nurr1	F: 5' GTCACAGAGAGACACGGG 3'	R: 5' GGTAGTTGGGTCGGTTCAA 3'	121 pb
Pitx3	F: 5' CTCGAAGCCCTGCCTGT 3'	R: 5' GCCTTCTCCGAGTCACTGT 3'	100 pb
Th	F: 5' CCACTGGAGGCTGTGGTATT 3'	R: 5' CCGGGTCTCTAAGTGGTGAA 3'	145 pb
Oct4	F: 5' GAACATGTTTCTGCAGTGCC 3'	R: 5' CCACATCCCTCTCCAGCC 3'	95 pb
Gapdh	F: 5' GTGGACCTCATGGCCTACAT 3'	R: 5' GGATGGAATTGTGAGGGAGA 3'	160 pb

Previo a la realización de la qPCR se estandarizó la T_m óptima para cada par oligonucleótidos de cada gen, mediante una PCR punto final y posteriormente se corroboró por PCR cuantitativo en donde se analizaron las curvas de disociación óptimas donde solo encuentro un pico, representativo de cada producto de amplificación de interés.

Para cada reacción de qPCR se realizó la siguiente mezcla:

TABLA 8. Diseño experimental para realizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Reactivo	Cantidad
SYBR-GREEN 2X	10 µl
Oligonucleótido Sentido (10 µM)	1 µl
Oligonucleótido Antisentido (10 µM)	1 µl
cDNA	3 µl
H ₂ O estéril	2 µl
Volumen final	20 µl

La reacción de polimerización se realizó a 59°C para todos los genes. Una vez terminada la reacción, los resultados se analizaron con el método de $\Delta\Delta CT$ (Livak y Schmittgen, 2001); se empleó a GAPDH como gen de expresión constitutivo y los datos se normalizaron con respecto a los embriones inyectados con vehículo.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron de cuatro a seis 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 (vehículo). Las gráficas fueron generadas usando el software de GraphPad Prism.

VIII. RESULTADOS

1. LA ADMINISTRACION INTRAUTERINA DE HISTAMINA DISMINUYE LOS NIVELES DE LMX1A EN PROGENITORES DOPAMINERGICOS EN EL MV.

Dado que recientemente se demostró que una inyección intrauterina de HA disminuye el número de neuronas dopaminérgicas en E14, y que probablemente su efecto se restringe a etapas tempranas en la neurogénesis dopaminérgica (Escobedo-Avila et al., 2014); estos estudios no muestran sobre que población dopaminérgica tiene efecto la HA. Por lo tanto, para este trabajo, era importante comprobar si la HA era capaz de ejercer su efecto principalmente sobre progenitores dopaminérgicos. Por tal motivo, se inyectaron intrauterinamente 2 μ l de HA (25 μ g/ μ l) en los ventrículos de embriones de rata en E12 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 los niveles de Lmx1a, un factor transcripcional representativo de progenitores neurales especificados a linaje dopaminérgico (Nakatani et al., 2010; Yan et al., 2011).

Los resultados mostraron que la HA era capaz de disminuir la expresión de Lmx1a sin alterar el área de expresión de este factor (**FIG. 14**). Adicionalmente, la expresión de β III-Tubulina (un marcador de neuronas tempranas), no cambio en los embriones inyectados con HA comparados con los inyectados con vehículo (**FIG. 14A**). Estos datos comprueban que el efecto de la HA en etapas tempranas de diferenciación dopaminérgica, se da sobre progenitores neuronales dopaminérgicos.

2. LA ADMINISTRACIÓN TEMPRANA DE HISTAMINA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE GENES TEMPRANOS Y TARDIOS DE DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA.

Con el fin de dilucidar el posible mecanismo de acción por el cual la HA ejerce su función, evaluamos el efecto de la HA a un nivel transcripcional y epigenético. Para evaluar esto, se inyectaron intrauterinamente 2 μ l de HA (25 μ g/ μ l) en los ventrículos de embriones de rata de E12 y 48 h. Para evaluar la expresión de varios genes asociados a la diferenciación mDA y basados en la presencia del marcador de progenitores neurales dopaminérgicos, analizado por inmunohistoquímica, se realizaron disecciones de MV de embriones tratados, dos días después de la inyección (**FIG. 14C-D**). Finalmente mediante

qRT-PCR se analizó la expresión de algunos genes involucrados en la especificación (*Lmx1a*, *Msx1*, *Foxa2*) y diferenciación (*Nurr1*, *Pitx3* y *Th*) dopaminérgica.

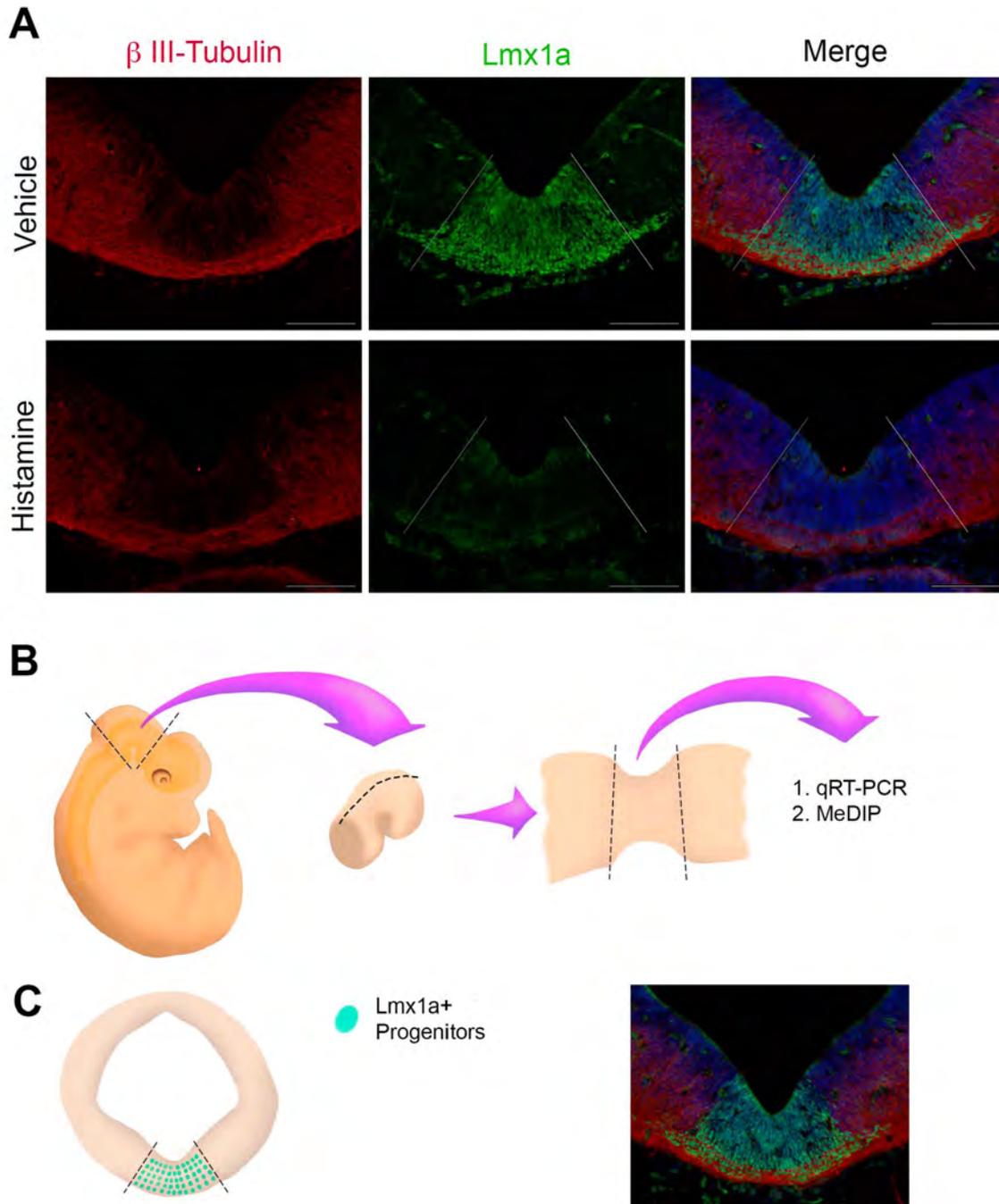


FIGURA 14. Expresión de LMX1A en el mesencéfalo al inyectar intrauterinamente histamina. Los embriones se analizaron dos días después de la inyección. Se puede observar que la adición intrauterina de HA durante y E12 es capaz de disminuir la expresión de LMX1A (precursoras neurales dopaminérgicas; verde; **A**). Para los análisis de qRT-PCR y MeDIP se realizó una disección del mesencéfalo ventral (**B**) para conservar únicamente el área donde se encuentran los progenitores neurales positivos a LMX1A (**C**), Barra de escala de 200 μ m.

Nuestros datos indicaron que la HA es capaz de disminuir de manera significativa, la expresión de genes de especificación dopaminérgica como *Lmx1a* (0.7360 ± 0.09789 $N_{\text{BIOLÓGICA}}=5$), *Msx1a* (0.7240 ± 0.04192 $N_{\text{BIOLÓGICA}}=5$) y *Foxa2* (0.6210 ± 0.1443 $N_{\text{BIOLÓGICA}}=5$) en comparación con los embriones inyectados con vehículo (FIG. 15). Además, se observó también una disminución en la expresión de genes tardíos de diferenciación dopaminérgica como *Pitx3* (0.6320 ± 0.1602 $N_{\text{BIOLÓGICA}}=5$) y *Th* (0.6940 ± 0.1028 $N_{\text{BIOLÓGICA}}=5$). Por otro lado cuando se analizó el control negativo *Oct4*, un gen de pluripotencia, no se observaron cambios significativos en la expresión de este. Éstos datos sugieren que la HA podría ejercer su efecto al inducir factores que influyen sobre la diferenciación dopaminérgica y que a su vez, que regulan la expresión de genes encargados de la especificación y diferenciación hacia linaje dopaminérgico.

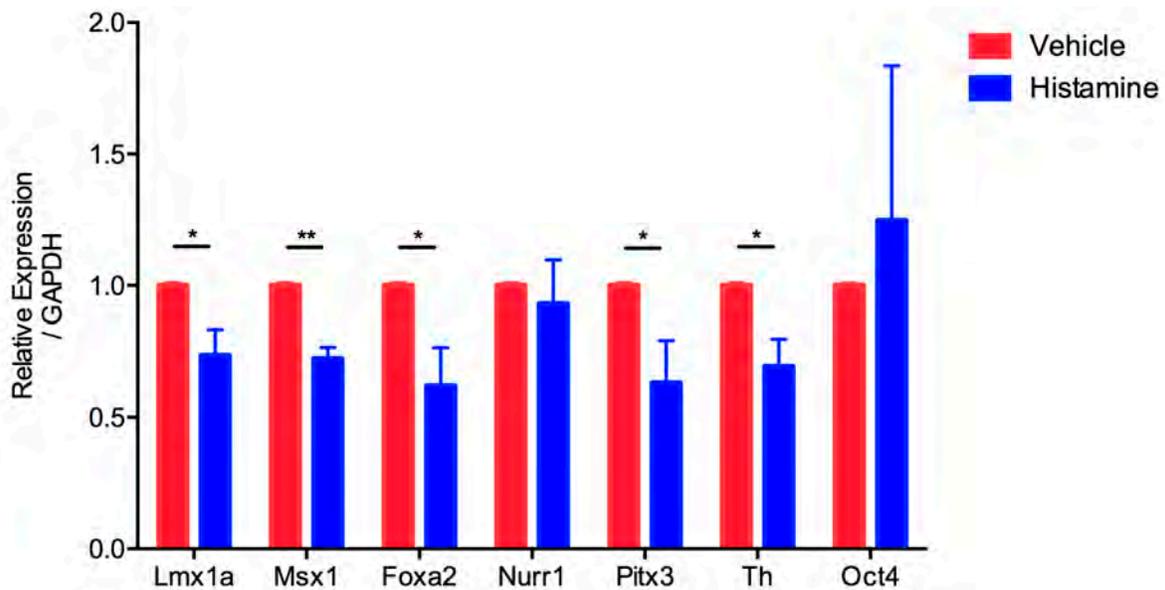


FIGURA 15. Análisis de expresión de diferentes genes encargados de la diferenciación dopaminérgica después de una inyección intrauterina con histamina. Después de una inyección con HA, ésta disminuye significativamente la expresión de los genes de especificación dopaminérgica *Lmx1a*, *Msx1a* y *Foxa2*; así como los genes de diferenciación dopaminérgica tardíos como *Pitx3* y *Th*. Por otro lado el gen de *Oct4* no cambio significativamente su expresión después del estímulo con HA (C). $N=5$, embriones analizados por triplicado. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

3. LA HISTAMINA DISMINUYE EL ENRIQUECIMIENTO DE 5mC EN EXONES DE GENES TARDÍOS ASOCIADOS A DIFERENCIACION DOPAMINÉRGICA.

En los últimos años, el estudio del papel de la HA sobre el desarrollo del SNC, se ha dado principalmente de manera descriptiva sobre las diferentes poblaciones neuronales

afectadas en corteza y Mes (Escobedo-Avila et al., 2014; Molina-Hernández y Velasco, 2008; Molina-Hernández et al., 2013; Rodríguez-Martínez et al., 2012). Sin embargo, se desconoce el posible mecanismo de acción molecular por el cual esta amina podría tener un papel sobre la neurogénesis dopaminérgica. Por otro lado, en los últimos años se ha observado que las señales extrínsecas que se encuentran en el ambiente celular son cruciales para un buen desarrollo del SNC, el cual de manera interesante, es capaz de actuar a nivel epigenético y promover la expresión de diferentes factores de transcripción específicos para el linaje neuronal (He et al., 2011a; Huang et al., 2015).

Recientemente se ha demostrado que la marca de 5hmC se encuentra de manera abundante en el cerebro y que durante su desarrollo se asocia al proceso de diferenciación neuronal de CTN corticales, ya que existe una correlación entre el incremento de esta marca en regiones intragénicas (como exones) y el proceso de diferenciación de CTN corticales hacia neuronas (Hahn et al., 2013).

Por esta razón y dados los efectos de la HA sobre la diferenciación de neuronas dopaminérgicas, el siguiente objetivo era investigar si ésta amina era capaz de actuar a nivel epigenético, regulando la marca de 5hmC en el cuerpo de genes de diferenciación dopaminérgica, así como el enriquecimiento de la marca de 5mC, el cual también podría hablarnos del proceso de desmetilación u otras funciones que lleva a cabo dentro del cuerpo del gen como la regulación del *splicing* (Guo et al., 2014b; Shukla et al., 2011).

Para cumplir este objetivo, se inyectaron intrauterinamente 2 μ l de HA (25 μ g/ μ l) en los ventrículos de embriones de rata de E12 y 48 h. Después, se realizó una extracción de DNA del MV de los embriones inyectados de cada rata (**FIG. 14C y D**) para evitar contaminación con el perfil epigenético de otros tipos celulares. Por medio de la técnica de MeDIP y hMeDIP, se usaron anticuerpos específicos para la marca de 5mC y 5hmC, para saber si estas marcas estaban variando en los exones con alto contenido en CpG o dentro de CGI de genes de especificación (*Lmx1a*, *Msx1* y *Foxa2*) y diferenciación (*Nurr1*, *Pitx3* y *Th*) dopaminérgica en los embriones inyectados con HA.

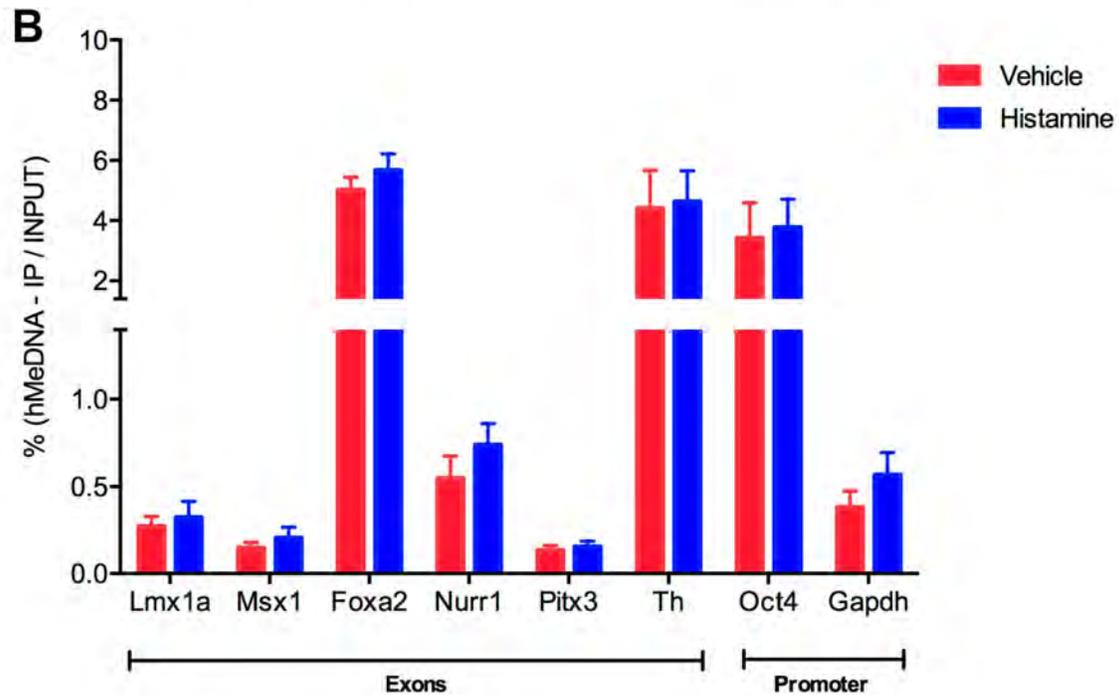
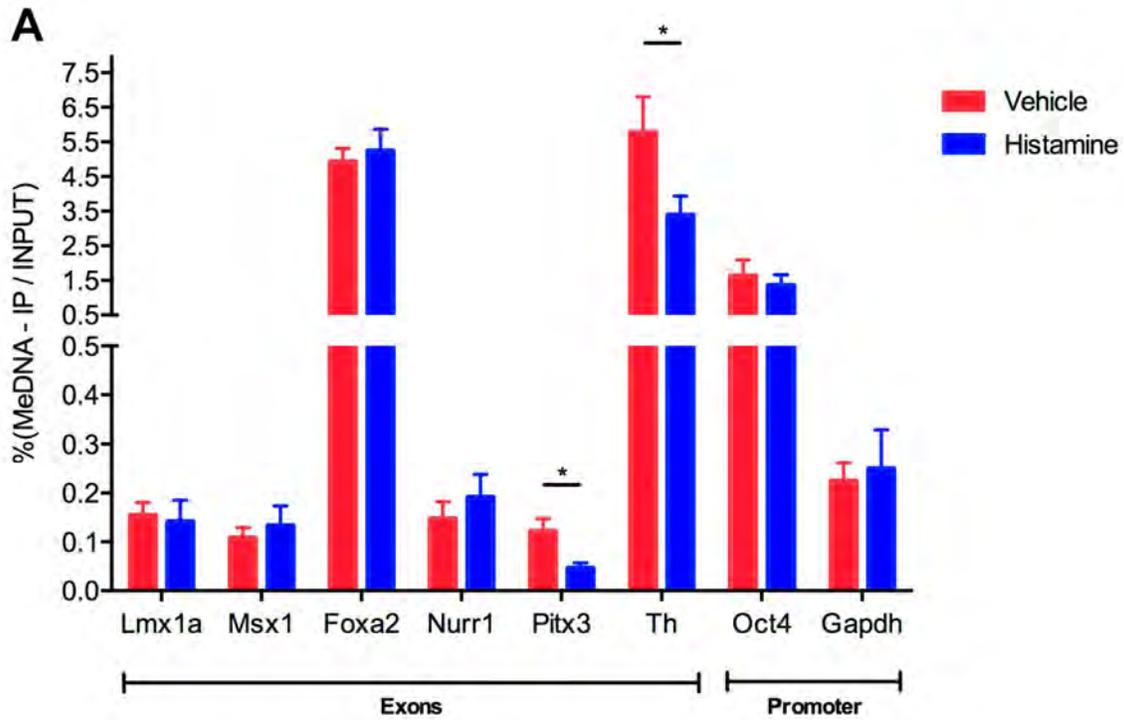


FIGURA 16. Efecto de la histamina sobre los porcentajes de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en genes de especificación y diferenciación dopaminérgica. El estímulo de HA en embriones de E12 es capaz de provocar una disminución en las marcas de 5mC (A) en regiones exónicas del gen *Pitx3* y *Th*. Este efecto es específico únicamente para esta marca, ya que los análisis con la marca 5hmC no mostró una diferencia en los embriones inyectados con HA, en comparación con el vehículo. N=4, embriones analizados por triplicado o duplicado. * $p < 0.05$

En el caso de la metilación de DNA (**FIG. 16A**), se observó que en los embriones inyectados con HA, los genes *Pitx3* y *Th* mostraron una disminución significativa de la marca de 5mC (0.04603 ± 0.01105 $N_{\text{EXPERIMENTAL}}=3$, $N_{\text{BIOLÓGICA}}=4$, $N_{\text{TOTAL}}=12$ y 3.389 ± 0.5461 $N_{\text{EXPERIMENTAL}}=3$, $N_{\text{BIOLÓGICA}}=4$, $N_{\text{TOTAL}}=12$) en comparación con los embriones control (0.1214 ± 0.02635 $N_{\text{EXPERIMENTAL}}=3$, $N_{\text{BIOLÓGICA}}=4$, $N_{\text{TOTAL}}=12$ y 5.775 ± 1.029 $N_{\text{EXPERIMENTAL}}=2$, $N_{\text{BIOLÓGICA}}=4$, $N_{\text{TOTAL}}=8$). Por otro lado, cuando se analizó un fragmento del promotor proximal del gen de pluripotencia *Oct4*, y un fragmento del promotor de *Gapdh*, principales regiones reguladas por metilación del DNA en estos genes y controles negativos para este modelo, no se observó una diferencia significativa en el enriquecimiento de esta marca.

Para el enriquecimiento de 5hmC en el DNA (**FIG. 16B**), no se observó ningún cambio significativo en los genes de diferenciación dopaminérgica en los embriones inyectados con histamina comparados con los embriones inyectados con vehículo.

Estos datos sugieren una especificidad del efecto de la HA sobre los patrones de metilación en lo exones de genes tardíos de diferenciación dopaminérgica.

4. 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 NIGROESTRIATAL.

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 2 μl de HA (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). 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 y aclaramiento de cerebros acoplado a tinción contra TH, se evaluó 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 marca de TH en la SN así como 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. 17**). 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.

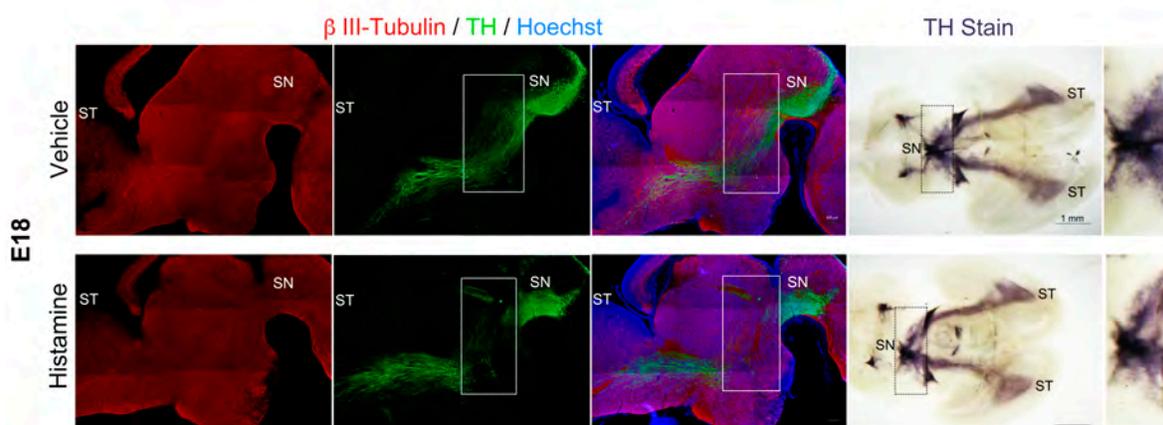


FIGURA 17. Análisis de la formación de la vía nigroestriatal al inyectar histamina en etapas tempranas de la neurogénesis dopaminérgica. Al administrar HA en el cerebro de embriones de E12 de rata y permitir el desarrollo del cerebro por 6 días más, se puede observar que la formación de la vía SN-ST 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 en líneas continuas 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). Cuando se analiza la vía mediante aclaramiento de cerebro acoplado a la tinción con TH. Se puede confirmar que la HA no restablece en su totalidad a la población dopaminérgica (recuadro punteado negro). Barra de escala: 500 μ m y 1mm.

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).

Adicionalmente, se ha observado que las señales extracelulares mediadas por morfógenos, neuromoduladores, etc., influyen de manera importante en el destino que llevarán las CTN. Una de las moléculas con impacto sobre la diferenciación de neuronas mDA es la HA. Sin embargo, 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 indica realmente los estadios en los que se encuentran las células *in vivo*.

Por otro lado, durante la diferenciación de neuronas mDA, se ha reportado que la HA a concentraciones altas (50 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$) es capaz de ejercer su efecto en etapas tempranas del proceso de neurogénesis, disminuyendo el número de neuronas mDA positivas a TH, así como otros factores transcripcionales específicos del linaje (Escobedo-Avila et al., 2014). Además, el estudio de la HA sobre la diferenciación neuronal 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 tal motivo, para poder investigar el papel de la HA sobre la diferenciación de neuronas dopaminérgicas sin interferir con otros parámetros fisiológicos 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 mecanismo de acción de la HA sobre la diferenciación de neuronas mDA, se realizaron inyecciones de 2 μl de HA (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sobre una etapa previa a la mayor producción de

neuronas dopaminérgicas en Mes (E12), momento en que se encuentra una mayor proporción de progenitores dopaminérgicos.

A pesar de que previamente se demostró que la HA únicamente ejerce su función en etapas tempranas de la neurogénesis (E10 y E12; Escobedo-Avila et al., 2014), hasta la fecha no se ha demostrado sobre que población dopaminérgica tiene efecto la HA. Por tal motivo, en este trabajo se demostró que una inyección de HA en E12, es capaz de disminuir la expresión del factor transcripcional *Lmx1a*, lo que nos permite concluir que ésta amina podría actuar a nivel de especificación sobre las CTPN dopaminérgicas durante la neurogénesis mDA.

En los últimos años se han estudiado los procesos limitantes para la regulación de la expresión génica 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 a activar otros genes específicos de este linaje. En el caso de la diferenciación dopaminérgica, existen pocos reportes en los cuales se relaciona la importancia de algunos factores extracelulares y su función en el remodelamiento de la cromatina así como 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).

Otro estudio reciente, demostró que otra molécula señal: la urocortina, también puede fungir como un determinante en el ambiente extracelular durante la diferenciación dopaminérgica, y que de manera interesante, ejerce sus efectos tras la inhibición de la HDAC1 y la liberación de proteínas represoras de la transcripción como Co-REST, permitiendo así, la unión de factores transcripcionales como NURR1 y FOXA2 en las regiones activadoras de la transcripción del gen de *Th* (Huang et al., 2015).

Por otro lado, otra 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 deposición de esta marca en regiones intragénicas durante el paso de células troncales embrionarias a CTN es crucial para el desarrollo de neuronas mDA (Kim et al., 2014).

Reforzando la importancia de la metilación y la desmetilación durante la diferenciación neuronal, específicamente hacia linaje dopaminérgico, se sabe que la metilación en al menos un sitio CpG en el primer exón del gen de *TH* en humano (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 acarrear complejos Nco-R y desacetilasas de histonas (Arányi et al., 2005; van Heesbeen et al., 2013).

A pesar del estudio de la metilación y desmetilación sobre estos modelos de diferenciación, no se ha estudiado de manera detallada la importancia de las señales extrínsecas sobre el establecimiento de la 5hmC o 5mC durante la diferenciación neuronal dopaminérgica, además de que no se ha estudiado este proceso de manera específica sobre la expresión de genes limitantes en la diferenciación mDA.

Considerando los datos publicados recientemente sobre el posible papel de la HA como señal extrínseca 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). En este trabajo, se estudió si esta amina era capaz de modificar el enriquecimiento de 5mC y 5hmC en los genes de especificación dopaminérgica, *Lmx1a*, *Msx1* y *Foxa2*, y los genes de diferenciación dopaminérgica, *Nurr1*, *Pitx3* y *Th*. Mediante MeDIP y hMeDIP, se identificó la proporción de 5mC y 5hmC en los exones que contenían un mayor porcentaje de sitios CpG o inclusive una isla CpG, regiones localizadas en la base de datos de UCSC Genome Browser de la especie *Rattus norvegicus* (Gibbs et al., 2004; Havlak et al., 2004). Nuestro datos indicaron que una inyección de HA en etapas tempranas de la diferenciación dopaminérgica, era capaz de solo disminuir la proporción de 5mC únicamente en los genes *Pitx3* y *Th*. La función tanto de la 5mC como de la 5hmC dentro de las regiones exónicas, se ha asociado a una regulación positiva de la expresión génica, debido a diferentes mecanismos. En el caso de la metilación del DNA, si bien siempre ha sido asociado a represión transcripcional, en los últimos años, se ha demostrado que dentro del cuerpo del gen, específicamente en exones, se asocia a la regulación del pre-mRNA (Guo et al., 2014b; Shukla et al., 2011). En este sentido, dado que el *splicing* es un proceso co-transcripcional (Iannone y Valcárcel, 2013), las modificaciones epigenéticas como la metilación de DNA pueden afectar la tasa de elongación de la RNA polimerasa II y como consecuencia al mismo tiempo afectar el proceso de *splicing* alternativo (Lev Maor et al.,

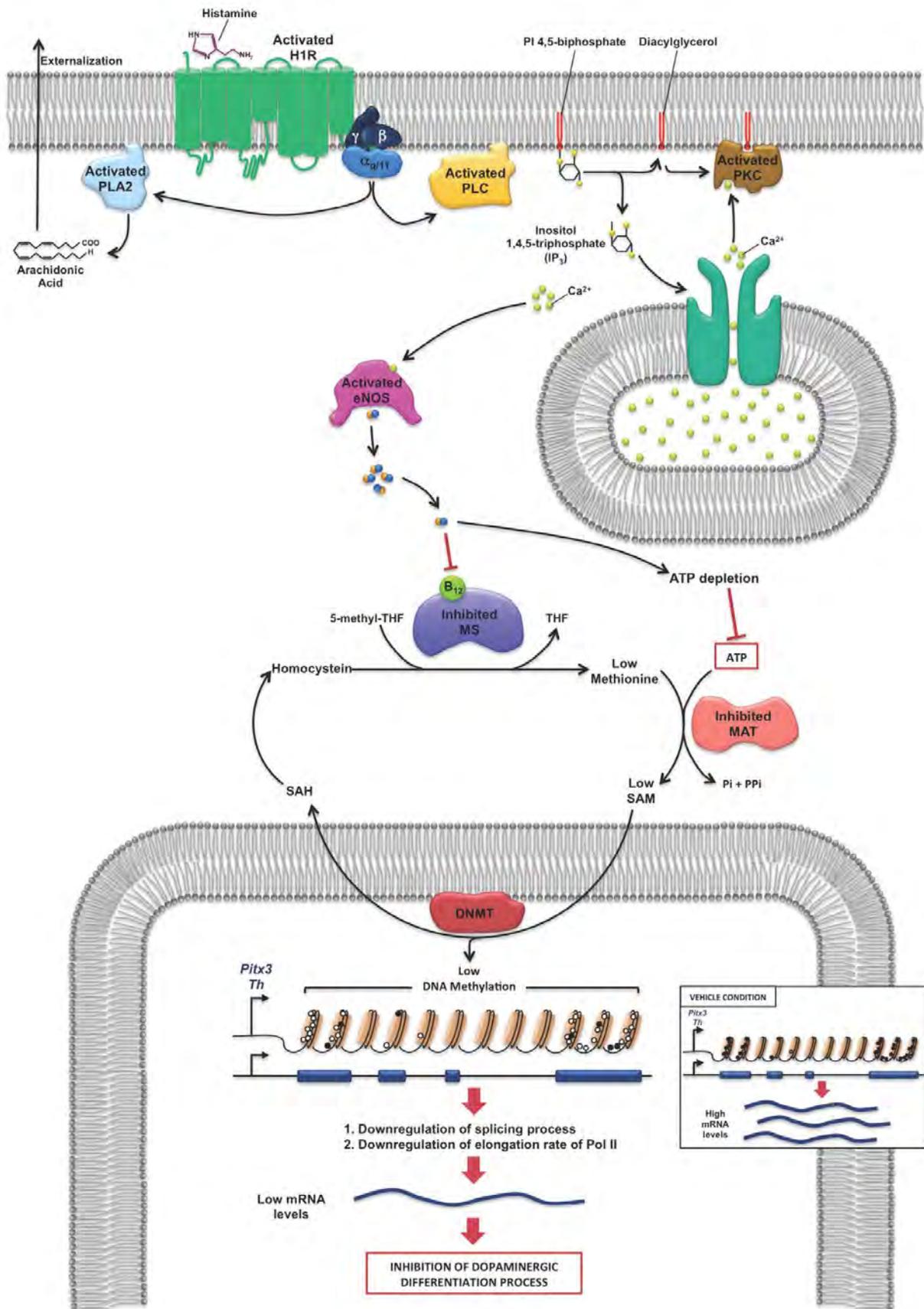
2015; Shukla et al., 2011; Yearim et al., 2015). Sin embargo, tanto el gen *Pitx3* (Ensembl: ENSRNOG00000019194; Uniprot: P81062, PITX3_RAT) como *Th* (Ensembl: ENSRNOG00000020410; Uniprot: P04177, TY3H_RAT) no mostraron isoformas en la base de datos que pudieran darnos algún indicio de *splicing* alternativo en la especie estudiada (*Rattus norvegicus*). Sin embargo, estos datos no descartan la posibilidad de que altas concentraciones de HA inyectada, sea capaz de generar isoformas no reportadas en la literatura, por lo que sería interesante profundizar en un análisis de isoformas dadas a un estímulo con HA. Por otro lado, a pesar de que la metilación del DNA ha sido fuertemente asociada con el *splicing* alternativo, la marca de 5mC también podría tener una influencia en la regulación de *splicing* de exones constitutivos (Lev Maor et al., 2015). En este trabajo sugerimos como posibles escenarios que la función negativa de HA en la regulación de la diferenciación mDA podría deberse gracias a una disminución en la 5mC en exones de genes tardíos de diferenciación dopaminérgica que como consecuencia podría tener: 1) un incremento en la formación de isoformas de *Pitx3* y *Th*, que a su vez provoquen proteínas no funcionales para el proceso de diferenciación dopaminérgica o 2) una desregulación en el procesamiento del pre-mRNA de los genes *Pitx3* y *Th*. Sin embargo son necesarios mas estudios a nivel de transcripción (procesividad de la Pol II), *splicing* e isoformas para discernir de manera puntual sobre el proceso de regulación de estos genes mediado por factores regulados por la HA.

En contraste, al analizar el efecto de la HA en el enriquecimiento de la 5hmC, no encontramos ninguna diferencia significativa en los genes analizados, en comparación con los embriones inyectados con vehículo. A pesar de asociarse comúnmente el aumento de 5hmC con respecto a una disminución de 5mC, la pérdida únicamente de la metilación del DNA en los exones de *Pitx3* y *Th*, podría deberse a otros mecanismos en los cuales la maquinaria de desmetilación mediada por oxidación no este involucrada. Previamente reportamos que el efecto negativo de la HA sobre la población dopaminérgica, se da a través de la activación del RH₁, el cual es un receptor acoplado a la proteína G_{q/11}. Este receptor promueve la síntesis de IP₃ y DAG, además de la liberación de Ca²⁺ (Escobedo-Avila et al., 2014). El Ca²⁺ liberado es capaz de activar diferentes procesos entre los que esta la producción de ácido araquidónico, GMPc y NO (Haas et al., 2008; Haas y Panula, 2003). De manera interesante, se ha demostrado que uno de los efectos del NO se da sobre la vía del tetrahidrofolato, al inhibir de manera directa a la vitamina B₁₂, la cual es

cofactor de la enzima metionina sintetasa y por lo tanto, disminuyendo la concentración de metionina. Además, el NO también promueve la disminución de ATP lo cual desfavorece la síntesis de SAM por medio de la enzima metionina adenosiltransferasa (Danishpajoo et al., 2001; Haas et al., 2008). Este proceso de inhibición representa una desventaja para la metilación del DNA ya que ambos puntos de control, son cruciales para la donación de grupos metilo por parte de SAM. Por lo tanto, en base a estos antecedentes, nosotros sugerimos como mecanismo de acción, que al activarse el receptor RH₁ después de un estímulo con HA en las CTPN dopaminérgicas, se liberará Ca²⁺ el cual provocará la activación de la oxido nítrico sintetasa dependiente de Ca²⁺ (**eNOS**) y la disminución en la síntesis de metionina y SAM, teniendo como consecuencia una baja metilación en el DNA en los exones de genes tardíos de diferenciación dopaminérgica (**FIG. 18**)

Por otro lado, para poder asociar el efecto de la HA encontrado a nivel de metilación del DNA, se realizaron análisis de expresión génica, los cuales mostraron que una inyección de HA era capaz de disminuir significativamente la expresión de los genes canónicos tardíos de la diferenciación dopaminérgica: *Pitx3* y *Th*. Además, los análisis de expresión de los genes tempranos de la especificación dopaminérgica: *Lmx1a*, *Msx1* y *Foxa2*, mostraron también un decremento en la expresión de estos genes. Estos datos sugieren que la HA también podría actuar en etapas tempranas sobre la especificación a linaje DA. Sin embargo el mecanismo de acción por la cual regula su expresión aun se desconoce. Es probable que este sea mediante la regulación de otras marcas epigenéticas; algunos reportes han mostrado que uno de los mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de genes específicos de precursores neurales es el reclutamiento de enzimas tipo acetiltransferasas de histonas, las cuales son reclutadas a regiones regulatorias dentro de estos genes y de esta manera pueden desencadenar el proceso de diferenciación celular (Sun et al., 2001).

Además, de manera interesante encontramos que la expresión del mRNA de *Lmx1a* era mayor en comparación con los niveles de su proteína, analizada por inmunohistoquímica. Estos datos nos permiten pensar que el efecto negativo de la HA en la regulación de la expresión del factor transcripcional LMX1A podría estar siendo regulado a nivel postraduccional, por lo cual sería interesante analizar a este nivel si la HA también tiene un efecto sobre factores transcripcionales tempranos.



Finalmente, 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 neurogénesis 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 2 μ l de HA (25 μ g/ μ l) 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 vio 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 neonatas 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

FIGURA 18. Mecanismo de acción propuesto de la HA sobre la regulación de genes tardíos de diferenciación dopaminérgica mesencefálica. La activación del RH₁ después de una inyección con HA activa a la proteína G_{q/11}. Esto provoca la síntesis de los segundos mensajeros IP₃, DAG y la liberación de Ca²⁺ intracelular. Este último activa a eNOS y consecuentemente la síntesis de NO, que inhibirá a dos niveles la síntesis de SAM: 1) por medio de la inhibición de la MS y asimismo la síntesis de metionina y 2) por la disminución de ATP y así la inhibición de MAT. Esto tiene como resultado una reducción en la donación de grupos metilo por parte de SAM y por lo tanto una disminución en la metilación del DNA en los exones de *Pitx3* y *Th*. Como resultado los procesos de splicing y/o de elongación de la Pol II se estarán desregulando y por lo tanto se reflejara en una disminución en los niveles de mRNA mensajero de dichos genes, teniendo así un retardo en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas. Abreviaturas: (PLC) fosfolipasa C; (IP₃) inositol-1,4,5-trifosfato; (DAG) diacil glicerol; (PKC) proteína cinasa C; (ER) retículo endoplásmico; (eNOS) óxido nítrico sintetasa dependiente de Ca²⁺; (NO) óxido nítrico; (MS) metionina sintetasa; (MAT) metionina adenosiltransferasa; (DNMT) DNA metiltransferasa; (ATP) adenosin trifosfato.

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 conclusión, estos datos en conjunto sugieren un nuevo papel de la HA en la regulación de marcas de metilación sobre genes de diferenciación dopaminérgica. 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. 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. PERSPECTIVAS

1. Estudiar la cascada de activación que desencadena una disminución en la metilación del DNA.
 - 1.1. Analizar si la HA induce la activación de eNOS y consecuentemente la inhibición de MS y MAT
 - 1.2. Evaluar si la HA es capaz de incrementar la concentración de NO y de disminuir la concentración de SAM *in vivo*.
2. Investigar el mecanismo de acción por el cual se regulan los genes tempranos de especificación dopaminérgica mediado por la HA.
 - 2.1. Evaluar si la histamina regula a nivel postraducciona los niveles de LMX1A en etapas tempranas de especificación dopaminérgica.
3. Analizar a profundidad el mecanismo de regulación de los genes *Pitx3* y *Th*.
 - 3.1. Investigar si la HA estimula el *splicing* alternativo de estos genes o una desregulación en la tasa de elongación de la RNA Pol II.
4. Evaluar si el efecto a largo plazo de la HA se mantiene en etapas postnatales
 - 4.1. Estudiar mediante análisis conductuales la actividad motriz de ratas neonatas inyectadas en E12 con HA.

XI. REFERENCIAS

- Abeliovich, A., and Hammond, R. (2007). Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev. Biol.* 304, 447–54. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.032.
- Andersson, E., Jensen, J. B., Parmar, M., Guillemot, F., and Björklund, a (2006a). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development* 133, 507–16. doi:10.1242/dev.02224.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., et al. (2006b). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124, 393–405. doi:10.1016/j.cell.2005.10.037.
- Ang, S.-L. (2006). Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* 133, 3499–506. doi:10.1242/dev.02501.
- 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. doi:10.1006/exnr.2000.7362.
- Auvinen, S., and Panula, P. (1988). Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 276, 289–303. doi:10.1002/cne.902760211.
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H. F., John, R. M., et al. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* 8, 532–8. doi:10.1038/ncb1403.
- 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. doi:10.1007/s12640-011-9305-4.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–95. doi:10.1038/cr.2011.22.
- Bannister, A. J., Schneider, R., and Kouzarides, T. (2002). Histone Methylation : Dynamic or Static? *Cell* 109, 801–806. doi:10.1016/S0092-8674(02)00798-5.
- Bayly, R. D., Ngo, M., Aglyamova, G. V., and Agarwala, S. (2007). Regulation of ventral midbrain patterning by Hedgehog signaling. *Development* 134, 2115–24. doi:10.1242/dev.02850.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells.

- Cell* 125, 315–26. doi:10.1016/j.cell.2006.02.041.
- Bertler, A., and Rosengren, E. (1959). Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 15, 1958–1959. doi:10.1007/BF02157069.
- Best, C. H., Dale, H. H., Dudley, H., and Thorpe, W. V. (1927). The nature of the vasodilator 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. doi:10.1093/hmg/9.16.2395.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21. doi:10.1101/gad.947102.6.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–8. doi:10.1038/nature05913.
- 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, 1799–809. doi:10.1242/dev.02339.
- 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. doi:10.1126/science.127.3296.471.
- 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), 9–24. doi:10.1016/B978-0-12-375709-8.00002-2.
- 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. doi:10.1242/dev.00487.
- Coskun, V., Tsoa, R., and Sun, Y. E. (2012). Epigenetic regulation of stem cells differentiating along the neural lineage. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 762–7. doi:10.1016/j.conb.2012.07.001.
- Dale, H. H., and Laidlaw, P. P. (1910). The physiological action of β -iminazolyethylamine. *J. Physiol.* 41, 318–344. doi:10.1113/jphysiol.1910.sp001406.
- Danishpajoo, I. O., Gudi, T., Chen, Y., Kharitonov, V. G., Sharma, V. S., and Boss, G. R. (2001). Nitric oxide inhibits methionine synthase activity in vivo and disrupts carbon flow through the folate pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 27296–303.

doi:10.1074/jbc.M104043200.

- Delatte, B., Deplus, R., and Fuks, F. (2014). Playing TETris with DNA modifications. *EMBO J.* 33, 1198–1211. doi:10.15252/embj.201488290.
- Dismukes, K., and Snyder, S. H. (1974). Histamine turnover in rat brain. *Brain Res.* 78, 467–481. doi:10.1016/0006-8993(74)90929-9.
- 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. doi:10.1016/0891-0618(94)00030-W.
- 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. doi:10.1046/j.1460-9568.1998.00394.x.
- Escobedo-Avila, I., Vargas-Romero, F., Molina-Hernández, A., López-González, R., Cortés, D., De Carlos, J. A., et al. (2014). Histamine impairs midbrain dopaminergic development in vivo by activating histamine type 1 receptors. *Mol. Brain* 7, 58. doi:10.1186/s13041-014-0058-x.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453. doi:10.1038/nature01410.
- Ferri, A. L. M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. a, et al. (2007). *Foxa1* and *Foxa2* regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* 134, 2761–9. doi:10.1242/dev.000141.
- Fuxe, K. (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. *Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat.* 65, 573–596. doi:10.1007/BF00337069.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science* (80-.). 287, 1433–1438. doi:10.1126/science.287.5457.1433.
- Gale, E., and Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Mol. Brain* 1, 1–10. doi:10.1186/1756-6606-1-8.
- 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. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03213.x.
- Gibbs, R. a, Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., et al. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428, 493–521. doi:10.1038/nature02426.
- Gilbert, S. F. (2013). *Developmental Biology*. Tenth edit. , ed. A. Aquadro 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, 777–88. doi:10.1038/nrm1739.
- Gregory, P. D., Wagner, K., and Hörz, W. (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp. Cell Res.* 265, 195–202. doi:10.1006/excr.2001.5187.
- Guo, H., Zhu, P., Yan, L., Li, R., Hu, B., Lian, Y., et al. (2014a). The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* 511, 606–610. doi:10.1038/nature13544.
- 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, 423–34. doi:10.1016/j.cell.2011.03.022.
- Guo, J. U., Szulwach, K. E., Su, Y., Li, Y., Yao, B., Xu, Z., et al. (2014b). Genome-wide antagonism between 5-hydroxymethylcytosine and DNA methylation in the adult mouse brain. *Front. Biol.* 9, 66–74. doi:10.1016/j.surg.2006.10.010.Use.
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A., and Selbach, O. (2008). Histamine in the Nervous System. *Physiol. Rev.* 88, 1183–1241. doi:10.1152/physrev.00043.2007.
- Haas, H., and Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 121–30. doi:10.1038/nrn1034.
- Hackett, J. A., Sengupta, R., Zylicz, J. J., Murakami, K., Lee, C., Down, T. A., et al. (2013). Germline DNA Demethylation Dynamics and Imprint Erasure Through 5-Hydroxymethylcytosine. *Science* 339, 448–452. doi:10.1126/science.1229277.
- Hahn, M. A., Qiu, R., Wu, X., Li, A. X., Zhang, H., Wang, J., et al. (2013). Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell Rep.* 3, 291–300. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.011.
- 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.

- Havlak, P., Chen, R., Durbin, K. J., Egan, A., Ren, Y., Song, X.-Z., et al. (2004). The Atlas Genome Assembly System. *Genome Res.* 14, 721–732. doi:10.1101/gr.2264004.
- He, X.-B., Yi, S.-H., Rhee, Y.-H., Kim, H., Han, Y.-M., Lee, S.-H., et al. (2011a). Prolonged membrane depolarization enhances midbrain dopamine neuron differentiation via epigenetic histone modifications. *Stem Cells* 29, 1861–73. doi:10.1002/stem.739.
- He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., et al. (2011b). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303–7. doi:10.1126/science.1210944.
- 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. doi:10.1242/dev.089359.
- 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, 123–38. doi:10.1016/j.ydbio.2013.04.014.
- Hermann, a., Gowher, H., and Jeltsch, a. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2571–2587. doi:10.1007/s00018-004-4201-1.
- 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., et al. (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. doi:10.1371/journal.pone.0053122.
- Huang, H.-Y., Chiu, T.-L., Chang, H.-F., Hsu, H.-R., Pang, C.-Y., Liew, H.-K., et al. (2015). Epigenetic Regulation Contributes to Urocortin-Enhanced Midbrain Dopaminergic Neuron Differentiation. *Stem Cells* 33, 1601–1617. doi:10.1002/stem.1949.
- Huszti, Z. (1998). Carrier-Mediated High Affinity Uptake System for Histamine in Astroglial and Cerebral Endothelial Cells. *J. Neurosci. Res.* 51, 551–558. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19980301)51:5<551::AID-JNR1>3.0.CO;2-E.

- Huszti, Z. (2003). Histamine uptake into non-neuronal brain cells. *Inflamm. Res.* 52, S03–S06. doi:10.1007/s000110300028.
- Iannone, C., and Valcárcel, J. (2013). Chromatin's thread to alternative splicing regulation. *Chromosoma* 122, 465–474. doi:10.1007/s00412-013-0425-x.
- Illingworth, R. S., and Bird, A. P. (2009). CpG islands - “A rough guide.” *FEBS Lett.* 583, 1713–1720. doi:10.1016/j.febslet.2009.04.012.
- Inoue, A., and Zhang, Y. (2011). Replication-Dependent Loss of 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse Preimplantation Embryos. *Science* (80-.). 334, 194–194. doi:10.1126/science.1212483.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. a, et al. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–3. doi:10.1126/science.1210597.
- 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, 5015–24. doi:10.1093/nar/gkr120.
- Karlstedt, K., Senkas, A., Ahman, M., and Panula, P. (2001). Regional expression of the histamine H(2) receptor in adult and developing rat brain. *Neuroscience* 102, 201–8. doi:10.1016/S0306-4522(00)00464-4.
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L. M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., et al. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133, 495–505. doi:10.1242/dev.02223.
- Kim, M., Park, Y.-K., Kang, T.-W., Lee, S.-H., Rhee, Y.-H., Park, J.-L., et al. (2014). Dynamic changes in DNA methylation and hydroxymethylation when hES cells undergo differentiation toward a neuronal lineage. *Hum. Mol. Genet.* 23, 657–67. doi:10.1093/hmg/ddt453.
- 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, 127–37. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19980427)394:1<127::AID-CNE10>3.0.CO;2-L.
- Klose, R. J., and Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31, 89–97. doi:10.1016/j.tibs.2005.12.008.
- Kohli, R. M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA

- demethylation. *Nature* 502, 472–9. doi:10.1038/nature12750.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929–30. doi:10.1126/science.1169786.
- Lahti, L., Achim, K., and Partanen, J. (2013). Molecular regulation of GABAergic neuron differentiation and diversity in the developing midbrain. *Acta Physiol. (Oxf)*. 207, 616–27. doi:10.1111/apha.12062.
- Lev Maor, G., Yearim, A., and Ast, G. (2015). The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet.* 31, 274–280. doi:10.1016/j.tig.2015.03.002.
- Li, E., Bestor, T. H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926. doi:10.1016/0092-8674(92)90611-F.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- 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. doi:10.1016/B978-0-12-386986-9.00001-6.
- 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. doi:10.1371/journal.pbio.1000506.
- Maintz, L., and Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1185–96. doi:http://dx.doi.org/10.1036/1097-8542.BR10229141.
- Martinez-Barbera, J. P., Signore, M., Boyle, P. P., Puellas, E., Acampora, D., Gogoi, R., et al. (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. doi:10.1002/wdev.120.

- Molina-Hernández, A., Díaz, N. F., and Arias-Montaño, J.-A. (2012). Histamine in brain development. *J. Neurochem.* 122, 872–82. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07863.x.
- 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. doi:10.1186/1749-8104-8-4.
- 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, 706–17. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05424.x.
- 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.
- Nakatani, T., Kumai, M., Mizuhara, E., Minaki, Y., and Ono, Y. (2010). Lmx1a and Lmx1b cooperate with Foxa2 to coordinate the specification of dopaminergic neurons and control of floor plate cell differentiation in the developing mesencephalon. *Dev. Biol.* 339, 101–113. doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.017.
- 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. doi:10.1177/43.12.8537641.
- Nissinen, M. J., and Panula, P. (1995). Developmental patterns of histamine-like immunoreactivity in the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 211–227. doi:10.1177/43.2.7822777.
- 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. doi:10.1016/S0092-8674(00)81656-6.
- Panula, P., and Nuutinen, S. (2013). The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 472–87. doi:10.1038/nrn3526.
- Panula, P., Sundvik, M., and Karlstedt, K. (2014). Developmental roles of brain histamine. *Trends Neurosci.* 37, 159–68. doi:10.1016/j.tins.2014.01.001.
- Pelayo, R., Santa-Olalla, J., and Velasco, I. (2011). *Células troncales y medicina regenerativa*. Primera ed. UNAM, PUIS.

- Peserico, A., and Simone, C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 371832. doi:10.1155/2011/371832.
- Petazzi, P., Akizu, N., García, A., Estarás, C., Martínez de Paz, A., Rodríguez-Paredes, M., et al. (2014). An increase in MECP2 dosage impairs neural tube formation. *Neurobiol. Dis.* 67, 49–56. doi:10.1016/j.nbd.2014.03.009.
- Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puelles, E., Gogoi, R., Hall, A., et al. (2006). A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* 133, 89–98. doi:10.1242/dev.02181.
- Ramos-Jiménez, J., Garduño-Torres, B., and Arias-Montaña, 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., et al. (2002). Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. 3, 954–960. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00871.x.
- Rodríguez-Martínez, G., Velasco, I., García-López, G., Solís, K. H., Flores-Herrera, H., Díaz, N. F., et al. (2012). Histamine is required during neural stem cell proliferation to increase neuron differentiation. *Neuroscience* 216, 10–7. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.04.049.
- Sadler, T. W. (2005). Embryology of neural tube development. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 135C, 2–8. doi:10.1002/ajmg.c.30049.
- Sauvageot, C., and Stiles, C. D. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 244–249. doi:10.1016/S0959-4388(02)00322-7.
- 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. doi:10.3389/fncir.2014.00055.
- Shen, L., and Zhang, Y. (2013). 5-Hydroxymethylcytosine: generation, fate, and genomic distribution. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 289–96. doi:10.1016/j.ceb.2013.02.017.
- Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., et al. (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479, 74–9. doi:10.1038/nature10442.
- 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. doi:10.1007/s00441-004-0973-8.
- 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. doi:10.1016/j.ejphar.2003.08.094.
- Smith, J. L., and Schoenwolf, G. C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.* 20, 510–517. doi:10.1016/S0166-2236(97)01121-1.
- Smith, Z. D., Chan, M. M., Humm, K. C., Karnik, R., Mekhoubad, S., Regev, A., et al. (2014). DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* 511, 611–628. doi:10.1038/nature13581.
- 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, 27816–23. doi:10.1074/jbc.M400181200.
- Sun, Y., Nadal-vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X., et al. (2001). Neurogenin Promotes Neurogenesis and Inhibits Glial Differentiation by Independent Mechanisms. *Cell* 104, 365–376. doi:10.1016/S0092-8674(01)00224-0.
- Suzuki, M. M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9, 465–76. doi:10.1038/nrg2341.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. a, Bandukwala, H., Brudno, Y., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930–5. doi:10.1126/science.1170116.
- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–7. doi:10.1038/35102174.
- 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. *Biothechnology Lett.* 34, 1167–1174. doi:10.1007/s10529-012-0888-5.
- 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. doi:10.1002/cne.903470108.
- Veenvliet, J. V., Alves Dos Santos, M. T. M., Kouwenhoven, W. M., von Oerthel, L., Lim, J. L.,

- van der Linden, A. J. A., et al. (2013). Specification of dopaminergic subsets involves interplay of En1 and Pitx3. *Development* 140, 3373–84. doi:10.1242/dev.094565.
- 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. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(91)90034-R.
- 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., et al. (2014). Transient accumulation of 5-carboxylcytosine indicates involvement of active demethylation in lineage specification of neural stem cells. *Cell Rep.* 7, 1353–61. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.003.
- Wilde, J. J., Petersen, J. R., and Niswander, L. (2014). Genetic, Epigenetic, and Environmental Contributions to Neural Tube Closure. *Annu. Rev. Genet.*, 583–611. doi:10.1146/annurev-genet-120213-092208.
- Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C. J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., et al. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.* 2, 241. doi:10.1038/ncomms1240.
- Wu, C., and Morris, J. R. (2001). Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science (80-)*. 293, 1103–5. doi:10.1126/science.293.5532.1103.
- Yamaguchi, S., Hong, K., Liu, R., Inoue, A., Shen, L., Zhang, K., et al. (2013). Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell Res.* 23, 329–39. doi:10.1038/cr.2013.22.
- 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, 12413–25. doi:10.1523/JNEUROSCI.1077-11.2011.
- Yearim, A., Gelfman, S., Shayevitch, R., Melcer, S., Glaich, O., Mallm, J. P., et al. (2015). HP1 Is Involved in Regulating the Global Impact of DNA Methylation on Alternative Splicing. *Cell Rep.* 10, 1122–1134. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.038.

XII. ANEXO I

1. IMÁGENES SUPLEMENTARIAS CORRESPONDIENTE AL DISEÑO EXPERIMENTAL

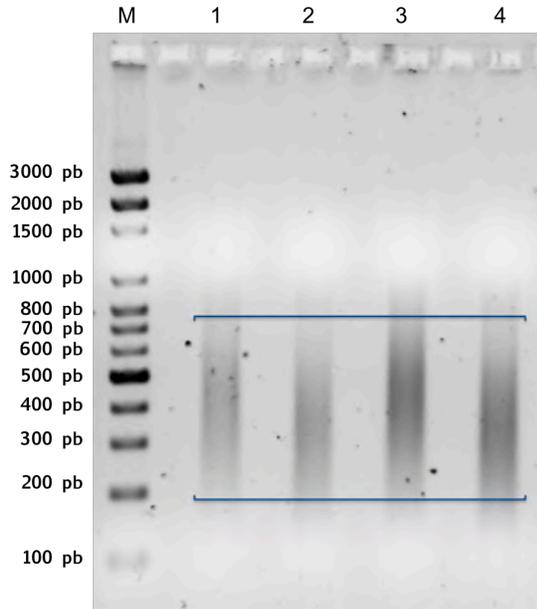


FIGURA SUPLEMENTARIA 1. Control de calidad de 4 muestras sonicadas para realizar MeDIP/hMeDIP. Los números (1, 2, 3, y 4) representan muestras sonicadas al mismo tiempo de embriones control (sin inyectar), en donde se encuentran fragmentos de entre 200 y 700 pb. (M) marcador de peso molecular.

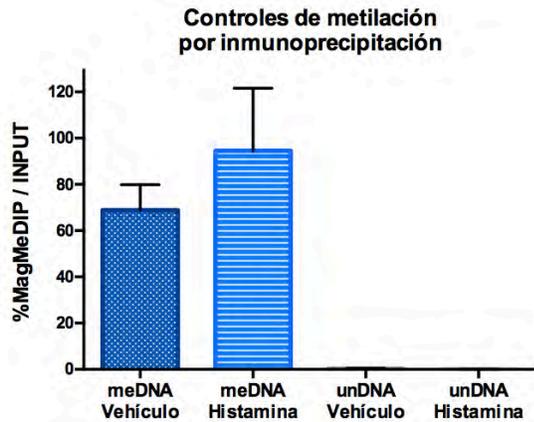


FIGURA SUPLEMENTARIA 2. Eficiencia de anticuerpo por inmunoprecipitación con respecto a los controles internos. En la gráfica se muestra el porcentaje de amplificación con respecto al INPUT de las muestras (vehículo o histamina) adicionadas con los controles internos meDNA y unDNA. Se puede apreciar 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. Datos obtenidos mediante la técnica de qPCR. N=3, embriones analizados por triplicado.



FIGURA SUPLEMENTARIA 3. Mapa representativo de cada gen utilizado para los análisis de metilación e hidroximetilación. Para los genes tempranos de especificación *Lmx1a*, *Msx1* y *Foxa2* (A, B y C respectivamente) y los genes tardíos de diferenciación *Nr4a2* (*Nurr1*), *Pitx3* y *Th* (D, E y F respectivamente) dopaminérgica, se diseñaron oligonucleótidos para obtener un producto de amplificación (1; por qPCR) dentro de exónes (2) con alto contenido en CpG o dentro de una CGI (3). En el caso de los controles no neuronales *Pou5f1* (*Oct4*) y *Gapdh* (H, los oligonucleótidos se diseñaron dentro de sus respectivos promotores los cuales son regulados por metilación del DNA. Información obtenida de la base de datos de UCSC Genome Browse database de *Rattus norvegicus* (Gibbs et al., 2004; Havlak et al., 2004).

XIII. ANEXO II

Como parte de esta tesis y durante la estancia en el laboratorio del Dr. Iván Velasco Velázquez, se escribió el siguiente manuscrito, el cual se encuentra en revisión para someterlo a publicación en una revista indexada.

Histamine Modulates Midbrain Dopamine Neuron Differentiation Through the Regulation of Epigenetic Marks Associated to DNA.

Vargas-Romero E., González-Barrios R., Guerra-Calderas L., Cortes-Pérez D., Escobedo-Avila I., Soto-Reyes E., Velasco I.