



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE HISTAMINA EN LA REGIÓN DEL
MESENCÉFALO VENTRAL DE RATA DURANTE LA NEUROGÉNESIS
DOPAMINÉRGICA *IN VIVO*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

ITZEL ESCOBEDO AVILA

TUTOR PRINCIPAL: Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Rosa Estela Navarro González
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia
Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

MÉXICO, D. F. Septiembre, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

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

El Comité Tutorial que asesoró esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Rosa Estela Navarro González	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia	Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El proyecto fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (Papiit IN208713) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 131281). Para realizar mis estudios de Doctorado, conté con una Beca Nacional para Estudios de Posgrado de Calidad, CONACyT con número de registro 215018.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Rosana Pelayo Camacho	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dra. Anayansi Molina Hernández	Instituto Nacional de Perinatología
Vocal	Dra. Angélica Zepeda Rivera	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretaria	Dra. Leticia Verdugo Díaz	Facultad de Medicina, UNAM

I. ÍNDICE

I.	Índice.....	3
II.	Abreviaturas.....	4
III.	Resumen y Abstract.....	6
IV.	Introducción.....	8
	La histamina en la modulación de la respuesta inmune.....	8
	Histamina en el sistema nervioso central adulto.....	9
	<i>Metabolismo</i>	9
	<i>Distribución</i>	10
	<i>Receptores histaminérgicos</i>	11
	La histamina durante la formación del sistema nervioso central.....	15
	<i>Expresión de Receptores histaminérgicos durante el desarrollo</i> ...	17
	Formación del Sistema Nervioso Central.....	20
	<i>Neurogénesis y gliogénesis</i>	22
	Formación del mesencéfalo.....	24
	Diferenciación dopaminérgica.....	29
	Efecto de la histamina en células troncales neurales corticales en cultivo..	31
	Efecto de la histamina en células troncales neurales de mesencéfalo ventral en cultivo.....	33
	Efecto de la histamina en células troncales neurales adultas.....	34
V.	Justificación.....	36
VI.	Hipótesis.....	38
VII.	Objetivo General.....	38
VIII.	Objetivos Específicos.....	38
IX.	Metodología.....	39
X.	Resultados.....	47
XI.	Discusión.....	67
XII.	Conclusiones.....	75
XIII.	Referencias.....	76
XIV.	Anexo.....	81

II. ABREVIATURAS

ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	adenosin-monofosfato cíclico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BMPs	proteínas morfogénicas de hueso (del inglés “bone morphogenic proteins”)
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
Ca ²⁺	calcio
CRE	elemento de respuesta a AMPc (del inglés “cAMP responsive element”)
CREBP	proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CTPN	células troncales/progenitoras neurales
DA	dopamina
dUTP	desoxiuridina-trifosfatada
FGF	factor de crecimiento fibroblástico (del inglés “fibroblast growth factor”)
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	proteína ácida glial fibrilar
GMPc	guanosín-monofosfato cíclico
HA	histamina
HDC	L-histidina descarboxilasa
Ins(1,4,5)P3	inositol-1,4,5-trifosfato
MAO-B	monoamina oxidasa B
MAPK	quinasas activadas por mitógenos (del inglés “mitogen activated protein kinase”)
MesV	mesencéfalo ventral
NDA	neuronas dopaminérgicas
NO	óxido nítrico
PBS	solución salina amortiguada por fosfatos (del inglés “phosphate buffered saline”)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polymerase chain reaction”)
PFA	paraformaldehído

PKA	proteína cinasa A
PLC	fosfolipasa C
PLO	poli-L-ornitina
Shh	sonic hedgehog
SNC	sistema nervioso central
SNCa	suero normal de cabra
TdT	transferasa de desoxinucleótidos terminales
TGF- β	factor de crecimiento transformante β (del inglés “transforming growth factor β “)
TH	tirosina hidroxilasa
t-MeHA	tele-metilhistamina
TUNEL	marcaje de residuos de desoxiuridina trifosfato mediante la desoxittransferasa (del inglés “terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling“)

III. RESUMEN

Antecedentes: La histamina (HA) es un neurotransmisor/neuromodulador que regula funciones esenciales en el organismo como el ciclo de sueño y vigilia, la plasticidad sináptica, actividad motora y la memoria en mamíferos adultos. Durante el desarrollo embrionario, se ha reportado la existencia de un sistema histaminérgico transitorio cuya función se desconoce. Este sistema correlaciona temporalmente con periodos de neurogénesis, así como con la especificación y diferenciación dopaminérgica en la región del mesencéfalo ventral (MesV).

Resultados: Para estudiar el efecto de la estimulación de receptores histaminérgicos sobre la generación de neuronas dopaminérgicas, administramos HA a precursores dopaminérgicos *in vitro* e *in vivo*. Mostramos que los cultivos de progenitores neurales de MesV de día embrionario (E) 12 se diferencian hacia neuronas y macroglía. Estos cultivos expresan los receptores histaminérgicos RH₁, RH₂ y RH₃. Al evaluar la muerte celular, observamos que la HA, mediante la activación del RH₁, incrementa la apoptosis en comparación con los cultivos control. La HA incrementó de manera significativa la diferenciación neuronal, pero disminuyó la proporción de neuronas dopaminérgicas debido a la activación del RH₁. Posteriormente, evaluamos si los efectos de la HA también se observaban *in vivo* durante el desarrollo del MesV, mediante inyecciones intrauterinas guiadas por ultrasonido en embriones de 12 días. La administración de HA disminuyó la proporción de neuronas dopaminérgicas generadas en el MesV, a través de la activación del RH₁. Los niveles de transcritos y proteína de diversos marcadores involucrados en la diferenciación dopaminérgica, disminuyeron significativamente en el grupo inyectado con HA. También disminuyó la proliferación celular en el grupo que fue tratado con HA. No encontramos efectos sobre la diferenciación GABAérgica y serotoninérgica.

Conclusión: En conjunto, estos resultados revelan nuevas funciones de la HA inhibiendo la especificación/diferenciación de las neuronas dopaminérgicas en el MesV.

ABSTRACT

Background: Histamine (HA) is a neurotransmitter/neuromodulator that regulates the sleep-wake cycle, synaptic plasticity, motor activity and memory in adult mammals. During embryonic development, it has been reported the existence of a transitory histaminergic system which function has not been addressed. Neurogenesis and dopaminergic specification/differentiation in the embryonic ventral midbrain (VM) coincides with increased HA brain levels.

Results: To study the effect of HA receptor stimulation on dopamine (DA) neuron generation, we administered HA to DA progenitors, both *in vitro* and *in vivo*. Cultured embryonic day 12 (E12) VM neural stem/progenitor cells differentiate into neurons and macroglia. These cultures expressed HA receptors H₁R, H₂R and H₃R. These undifferentiated progenitors increased intracellular calcium upon HA addition. In HA-treated cultures, dopamine neurons significantly decreased after activation of H₁R. We performed intrauterine injections in the developing VM to investigate HA effects *in vivo*. HA administration to E12 rat embryos notably reduced VM Tyrosine Hydroxylase (TH) staining 2 days later and this effect was mediated by activation of H₁R. qRT-PCR and Western blot analyses confirmed that several markers important for the generation and maintenance of dopaminergic lineage such as TH, Lmx1a and Lmx1b were significantly diminished. Proliferation was significantly diminished, whereas neuronal death was not increased in the VM after HA administration. GABA neurons in the midbrain, nor serotonin neurons in the mid-hindbrain boundary were affected.

Conclusion: These results reveal a novel action of HA inhibiting dopaminergic lineage during VM development.

IV. INTRODUCCIÓN

La histamina (HA) es una molécula que ha sido estudiada desde hace más de un siglo. Su nombre incluye la raíz griega *histos*, que significa “tejido”, ya que desde que comenzó a estudiarse, se observó que se distribuye a lo largo de todo el cuerpo humano y se encuentra presente en la mayoría de los tejidos. Es por esto que también presenta diversas funciones en el organismo.

LA HISTAMINA EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

La HA tiene un papel fundamental tanto en el sistema inmune, como en diversos procesos fisiológicos como la secreción de ácidos gástricos, contracción muscular y vasodilatación. También participa en procesos patológicos como alergias, enfermedades autoinmunes y reacciones inflamatorias, así como en las funciones de las células cebadas, la inmunomodulación por las células T (Ramos-Jiménez *et al.*, 2009). Las células cebadas regulan la comunicación entre los sistemas nervioso e inmune. En tejidos conectivos, cerca de los vasos sanguíneos, estas células almacenan y liberan HA y otras moléculas que señalizan en respuesta a la exposición a antígenos, así como a condiciones patológicas asociadas con la lesión de algún tejido, inflamación y autoinmunidad. Las células cebadas son capaces de entrar al cerebro en condiciones de daño (Ennis *et al.*, 1981; Metcalfe *et al.*, 1997).

La síntesis, señalización y función de la HA está controlada por una variedad de señales inmunes denominadas citocinas. En animales deficientes de HA en los que se ha suprimido la expresión de la enzima histidina descarboxilasa se observan niveles elevados de citocinas proinflamatorias como el interferón, el factor necrótico tumoral y la hormona leptina. Los receptores histaminérgicos participan en la inflamación y otras respuestas del sistema inmune; por lo tanto, la HA puede modificar la respuesta inmune dependiendo de su concentración y del receptor activado. Por ejemplo, la estimulación de los receptores H₁ (RH₁) aumenta la adhesión y quimiotaxis de los eosinófilos y los neutrófilos (Tanaka y Ichikawa, 2006). Asimismo, se ha observado que la activación de los RH₁ favorece la proliferación de los linfocitos T y B. Las células endoteliales también expresan RH₁ y su activación incrementa la expresión de moléculas de adhesión (Banu y Watanabe, 1999). Por otro lado, los leucocitos expresan RH₂ y la estimulación de estos receptores reduce la activación, quimiotaxis y desgranulación de los neutrófilos y eosinófilos. Asimismo, se ha observado que la activación de los RH₂ inhiben la síntesis de anticuerpos en los linfocitos B,

la proliferación de linfocitos T y la inmunidad celular (Jutel *et al.*, 2001). Debido a que los RH₃ son expresados principalmente en el sistema nervioso central (SNC), no se ha reportado una participación importante en la función del sistema inmune. Sin embargo, se ha descrito que la activación del receptor inhibe la liberación de citocinas por macrófagos alveolares, células cebadas y células dendríticas (Bissonnette, 1996). La activación de los RH₄ promueve la quimiotaxis de las células cebadas, eosinófilos y células dendríticas por movilización de Ca²⁺ intracelular, así como la polimerización de la actina, cambios en la morfología celular y en la expresión de moléculas de adhesión, eventos requeridos para la migración celular (Idzko *et al.*, 2002). La activación de los RH₄ induce también cambios en la localización tisular de las células cebadas (Godot *et al.*, 2007). En conjunto, estos datos permiten considerar a la HA como un agente relevante en el funcionamiento normal del sistema inmunológico y como un blanco terapéutico en patologías del mismo.

HISTAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ADULTO

Metabolismo

Esta amina se sintetiza a partir del aminoácido L-histidina; su síntesis involucra 2 pasos: el transporte de L-histidina al interior de la célula, que se lleva a cabo por el transportador de L-aminoácidos, y su posterior descarboxilación intracelular por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC). La HDC es la única enzima encargada de la síntesis de HA y se encuentra activa en una amplia variedad de tejidos, en particular durante el desarrollo embrionario (Karlstedt *et al.*, 2001). En el cerebro, la HDC se localiza tanto en neuronas como en células cebadas (Brown *et al.*, 2001). Una vez que la HA se sintetiza en neuronas, el transportador vesicular de monoaminas concentra a la HA en vesículas sinápticas. En presencia de un estímulo despolarizante, la HA se libera al espacio sináptico y es reconocida de manera específica por sus receptores. A diferencia de la mayoría de los neurotransmisores, la HA se inactiva por la acción de enzimas catabólicas como la histamina-N-metiltransferasa (HNMT) y la monoamina oxidasa B (MAO-B). No se ha descrito un mecanismo de inactivación por recaptura neuronal, sin embargo, se han sugerido mecanismos de inactivación por astrocitos (Husztí *et al.*, 1990; Husztí, 2003). La metilación es la principal vía del catabolismo de la HA de manera extraneuronal, mediante la enzima telemetilhistamina (t-MeHA). Posterior a esta metilación, se da una desaminación oxidativa hacia ácido tele-metilimidazolacético, reacción que es catalizada por la MAO-B. Esta reacción representa el producto final del metabolismo de la HA en el cerebro (Schwartz *et al.*,

1979; Schwartz *et al.*, 1991; Nissinen *et al.*, 1995; Nissinen y Panula, 1995; Huszti, 1998; Haas y Panula, 2003) (Fig. 1).

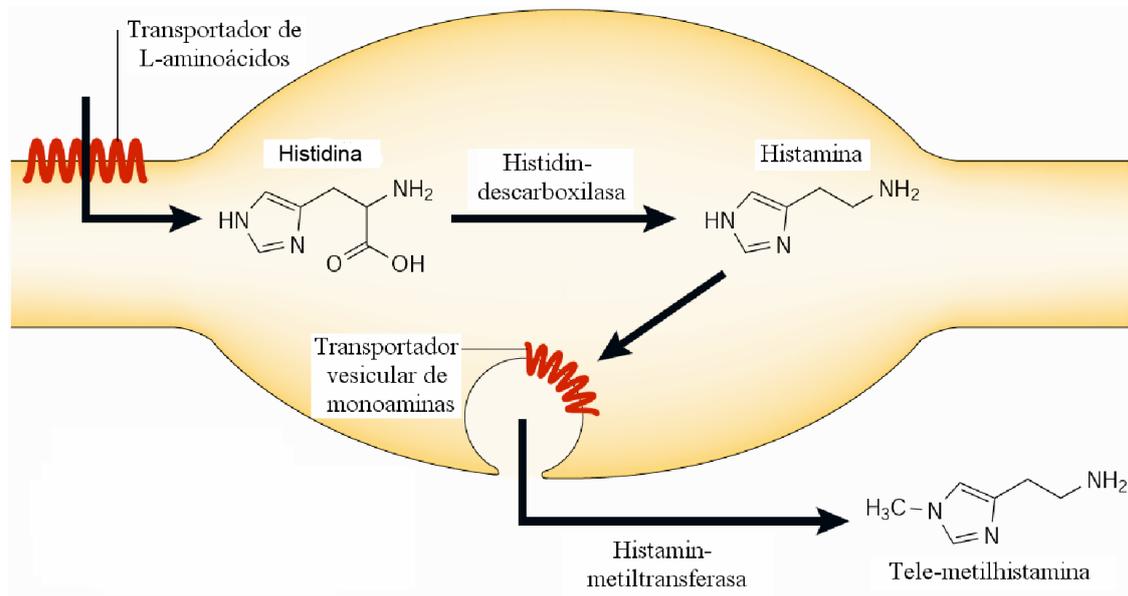


Figura 1. Síntesis, transporte y metabolismo neuronal de la histamina (HA). La HA se sintetiza a partir del aminoácido precursor L-histidina, el cual entra a la célula por un transportador específico de L-aminoácidos. La enzima HDC se encarga de sintetizar la HA, que posteriormente será transportada para su almacenamiento en vesículas sinápticas, mediante el transportador vesicular de monoaminas. Al ser liberada por algún estímulo despolarizante, es inactivada extracelularmente por enzimas catabólicas como la histamina-N-metiltransferasa (Tomado de Haas y Panula, 2003).

Distribución

En el SNC adulto de mamíferos, las neuronas productoras de HA se localizan en el núcleo tuberomamilar, que se encuentra en la parte posterior del hipotálamo. Las principales áreas de proyección histaminérgica varían de acuerdo a la especie, pero típicamente abarcan la mayor parte del SNC, desde el bulbo olfatorio hasta la médula espinal, pasando por toda la corteza cerebral (Fig. 2). La HA está involucrada en la regulación de numerosas funciones en el organismo como el sueño y la vigilia, la actividad motora así como la regulación térmica y endocrina (Schwartz *et al.*, 1979; Martínez-Mir *et al.*, 1990; Wada *et al.*, 1991; Onodera *et al.*, 1994).

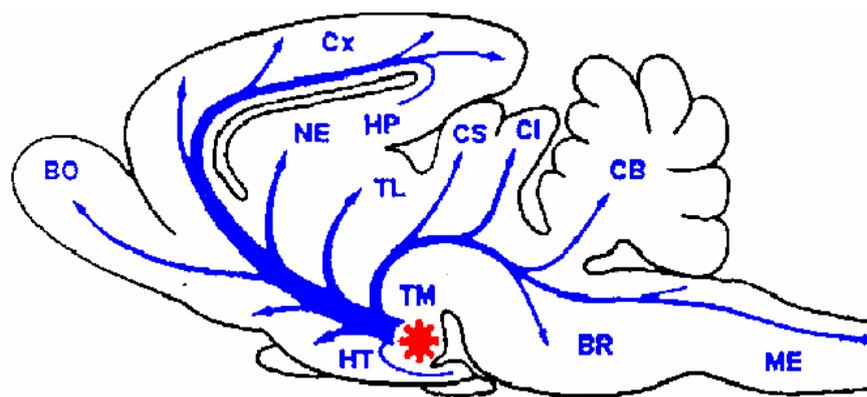


Figura 2. Vista sagital del sistema histaminérgico en el cerebro adulto de la rata. Las flechas representan las fibras de proyección histaminérgica a partir de los cuerpos celulares que se encuentran en el núcleo tuberomamilar (asterisco). Abreviaturas: ME, médula espinal; BR, médula oblonga; CB, cerebelo; TM, núcleo tuberomamilar; HT, hipotálamo; CI, colículo inferior; CS, colículo superior; TL, tálamo; HP, hipocampo; NE, estriado; Cx, corteza; BO, bulbo olfatorio (Tomado de Wada *et. al.*, 1991).

Receptores histaminérgicos

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

Receptor H₁: Este receptor se caracterizó en 1966. Es una proteína de 56 kDa constituida por 487 aminoácidos (Hill *et al.*, 1997). Estos receptores fueron los primeros en ser identificados, al estudiarse la participación de la HA en respuestas alérgicas. Son el blanco de acción de los llamados antihistamínicos clásicos, antagonistas de los RH₁. En el SNC, está ampliamente distribuido en las regiones del tálamo, hipotálamo posterior, hipocampo, corteza cerebral, amígdala y en la parte basal del cerebro anterior, y en menor medida en el cerebelo. Se distribuye en las células principalmente de manera postsináptica. Este receptor es una proteína de siete dominios transmembranales y se acopla a la proteína Gq/11. Promueve acciones excitadoras en la actividad neuronal, produciendo despolarización y aumento de la frecuencia de disparo de algunas poblaciones neuronales (Brown *et al.*, 2001). Su función principal es la activación de la fosfolipasa C (PLC), que lleva a la formación de los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P₃). La activación de receptores a Ins(1,4,5)P₃ induce la liberación de calcio (Ca²⁺) de almacenes intracelulares en el retículo endoplásmico. Al aumentar la concentración intracelular de Ca²⁺, los RH₁ pueden activar otras vías de señalización como la producción de óxido nítrico (NO) y GMP cíclico (GMPc), la apertura de canales K⁺ activados por Ca²⁺

causando despolarización (SOCs) (Fig. 3) y la activación neuronal del intercambiador de Na^+ - Ca^{2+} , que también causa despolarización.

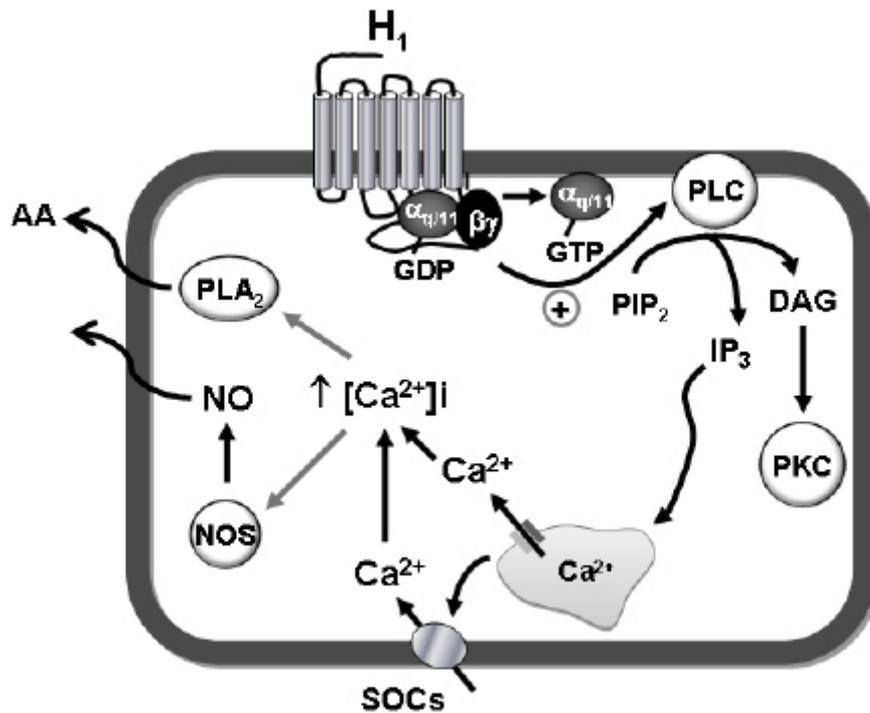


Figura 3. Señalización intracelular debida a la activación del receptor de histamina H_1 . Los RH_1 se acoplan a proteínas $\text{G}\alpha\text{q}/11$ que al ser activadas estimulan la acción de la fosfolipasa C (PLC) sobre el 4,5-bifosfato de fosfatidil-inositol (PIP_2) para generar 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 induce la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, y el vaciamiento de éstos el influjo de Ca^{2+} , mientras que el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC), dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. El aumento en la concentración de Ca^{2+} debido a la activación de los RH_1 puede inducir la formación de ácido araquidónico (AA) por activación de la fosfolipasa A2 (PLA_2), así como de óxido nítrico (NO) por estimulación de la sintasa de óxido nítrico. SOC: canales de calcio operados por vaciamiento de los depósitos (Ramos-Jiménez *et al.*, 2009).

Receptor H_2 : Este receptor fue descrito en 1972 y es una proteína de 359 aminoácidos que pesa 59 kDa (Black *et al.*, 1972). Los RH_2 fueron identificados al estudiar el efecto de la HA en la secreción ácida del estómago. En SNC, este tipo de receptores se expresa ampliamente en los ganglios basales, el hipocampo y la amígdala. También se expresa en células piramidales, núcleo raphe y *substantia nigra*. Son receptores postsinápticos. Este receptor se acopla a proteínas Gs y activa a la enzima adenilil-ciclasa produciendo un incremento en la formación de AMP cíclico (AMPc). Éste a su vez inicia la vía de la proteína cinasa A (PKA), que fosforila la proteína que activa al elemento de unión al ADN, CREB mediando la activación transcripcional de genes dependientes de AMPc. Regula el potencial de membrana neuronal favoreciendo la despolarización, generado por un efecto bloqueador sobre los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Fig. 4) (Haas y Panula, 2003).

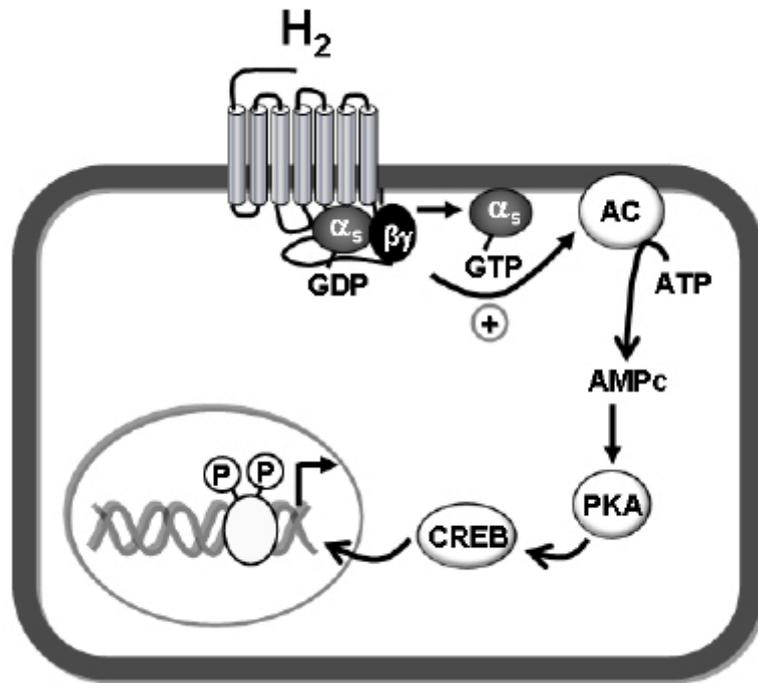


Figura 4. Señalización intracelular acoplada a la activación del receptor de histamina H₂. La activación de los RH₂ induce la interacción de proteínas G_{αs} con adenilato ciclasa (AC), que catalizan la conversión de ATP a AMPc. El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA), que fosforila a otras proteínas como la proteína nuclear de unión a CRE (CREB), que se une al elemento de respuesta al AMPc (CRE) dentro del promotor de genes que responden al AMPc activando la transcripción. ATP, trifosfato de adenosina; AMPc, 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (Ramos-Jiménez *et al.*, 2009).

Receptor H₃: Se caracterizó en 1983 (Arrang *et al.*, 1983). El gen de este receptor puede dar origen a diferentes isoformas del receptor por procesamiento alternativo, las cuales varían en el tamaño de su tercera asa intracelular. Las isoformas funcionales identificadas en la rata van de 326 a 445 aminoácidos y tienen un peso que va de 28 kDa a 70 kDa. Este receptor cumple una función de autoreceptor, ya que su activación ocasiona una inhibición en la liberación de HA, es decir, controla la síntesis y liberación endógena de HA en el cerebro, principalmente en neuronas del núcleo tuberomamilar (Maeda *et al.*, 2008). En el SNC, los receptores H₃ se expresan ampliamente en neuronas presinápticas en el núcleo tuberomamilar, así como en neuronas no histaminérgicas en el núcleo acumbens, el estriado, el bulbo olfatorio, la *substantia nigra* y la amígdala y en menor medida en el hipotálamo. Este receptor se acopla a proteínas Gi/o y a canales de Ca²⁺ de alto umbral activados por voltaje. Inhibe la producción de AMPc y activa la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). La señalización a través de este receptor, también afecta la liberación de otros neurotransmisores además de la HA, como dopamina (DA), serotonina, norepinefrina y diversos péptidos (Fig. 5) (Haas y Panula, 2003; Raber, 2007). Se ha reportado que estos receptores se encuentran activos aún en ausencia de HA. Esta actividad constitutiva fue

demostrada al observar que en células transfectadas con el RH₃, se inhibe la formación de AMPc inducida por forskolina (Wieland *et al.*, 2001).

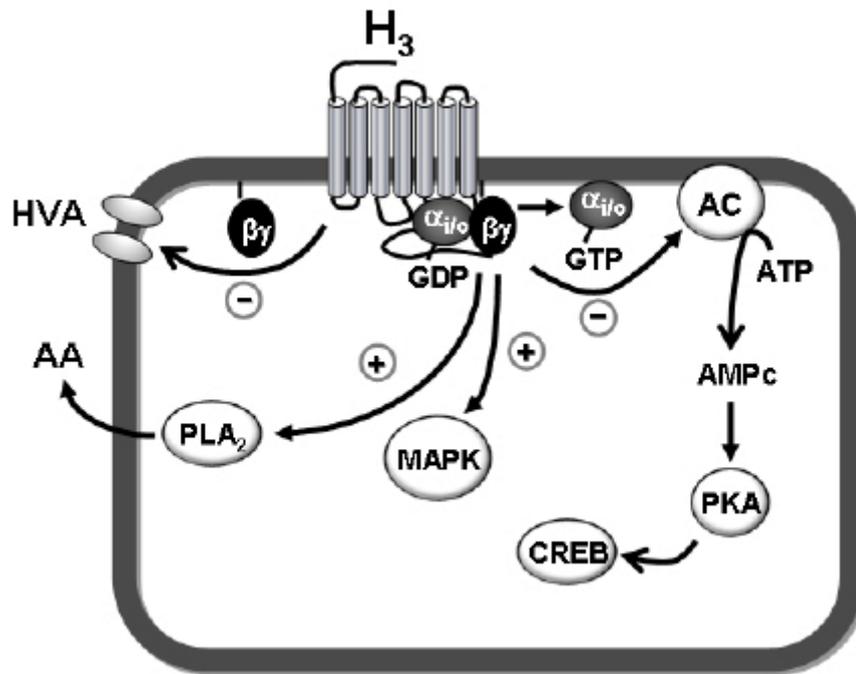


Figura 5. Señalización intracelular acoplada a la activación del receptor de histamina H₃. Los RH₃ activan a proteínas G $\alpha_{i/o}$, cuyas subunidades $\alpha_{i/o}$ inhiben a la adenilato ciclasa (AC) disminuyendo la concentración intracelular de AMPc. La activación del receptor induce también la formación de ácido araquidónico (AA) por activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), la inhibición de la apertura de canales de Ca²⁺ activados por voltaje de alto umbral (HVA), y la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). ATP, trifosfato de adenosina; AMPc, 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina; PKA, cinasa dependiente de AMPc; CREB, proteína de unión a CRE (Ramos-Jiménez *et al.*, 2009).

Receptor H₄: estos receptores fueron identificados por varios grupos mediante el análisis bioinformático del genoma humano y de la secuencia del RH₃ (Nakamura *et al.*, 2000; Oda *et al.*, 2000). El RH₄ es una proteína de 390 aminoácidos y muestran una homología aproximada del 40% con el RH₃. Este receptor se encuentra principalmente en células de origen hematopoyético, como las células dendríticas, las células cebadas, los eosinófilos, los monocitos, los basófilos y las células T (Liu *et al.*, 2001), lo que indica que el receptor tiene una función importante en el sistema inmune. En el SNC se ha identificado la presencia de estos receptores en el cerebelo y a muy baja densidad, en el hipocampo (Coge *et al.*, 2001). Los RH₄ se acoplan a proteínas G $\alpha_{i/o}$, inhibiendo la formación de AMPc. También se han descrito otras vías de señalización para los RH₄ como la activación de MAPKs en células HEK transfectadas con el receptor y movilización de Ca²⁺ en células cebadas y eosinófilos, atribuida esta última a la acción sobre la fosfolipasa C de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Fig. 6).

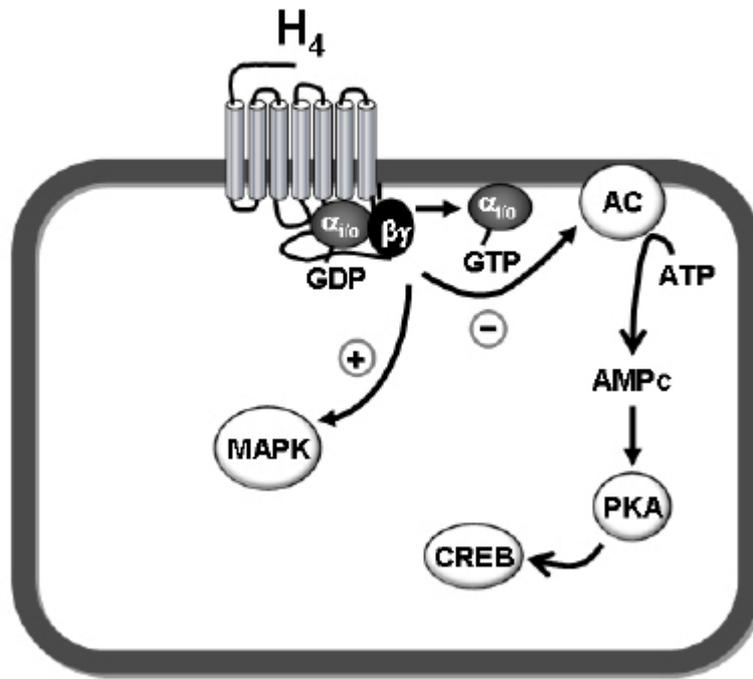


Figura 6. Señalización intracelular acoplada a la activación del receptor de histamina H₄. Los RH₃ activan a proteínas G_{α_{i/o}}, cuyas subunidades α_{i/o} inhiben a la adenilato ciclasa (AC) disminuyendo la concentración intracelular de AMPc. La activación del receptor resulta también en la estimulación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). AMPc, 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina; PKA, cinasa dependiente de AMPc; CREB, proteína de unión a CRE (Ramos-Jiménez *et al.*, 2009).

LA HISTAMINA DURANTE LA FORMACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La HA se encuentra ampliamente distribuida en diversos tejidos del embrión, principalmente durante la segunda mitad del desarrollo, tanto en la rata como en el ratón (Nissinen *et al.*, 1995; Nissinen y Panula, 1995). Durante la formación del SNC de vertebrados, la HA es uno de los primeros neurotransmisores en aparecer, presentando en este periodo concentraciones mayores en comparación con el SNC adulto (Auvinen y Panula, 1988; Nissinen *et al.*, 1995). Por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se ha podido determinar el contenido de HA en diversas regiones del cerebro durante el desarrollo embrionario. En particular, en el mesencéfalo se detectan bajas concentraciones de HA hasta el día embrionario (E) 12, posteriormente sus niveles incrementan en los días E14 y E16, seguido por un decremento en los días E17 y E18, hasta alcanzar las concentraciones detectadas en el adulto a partir del día E20 (Auvinen y Panula, 1988). Por otro lado, la enzima HDC también se encuentra presente, de manera transitoria, durante el desarrollo embrionario en la región de mesencéfalo, sugiriendo que la HA se sintetiza en esta región durante la embriogénesis (Fig. 7) (Karlstedt *et al.*, 2001).

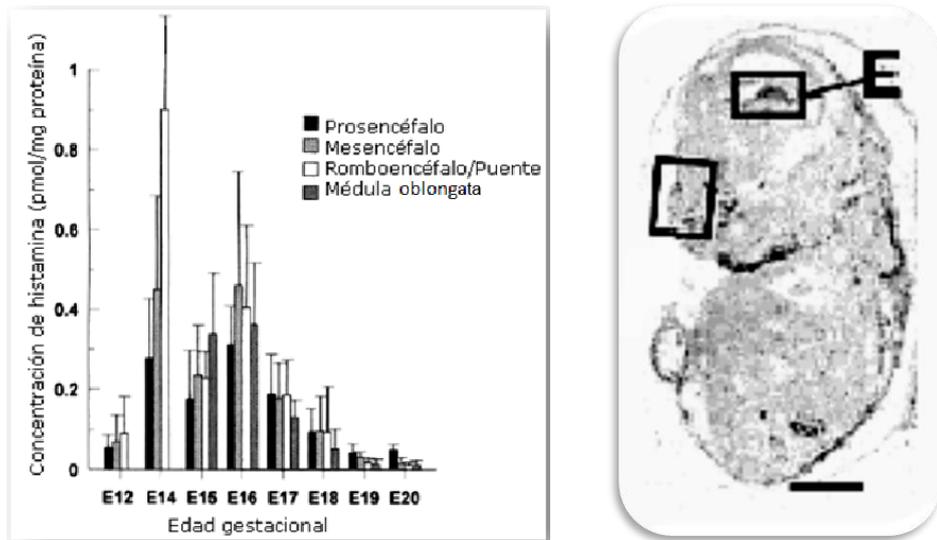


Figura 7. Concentraciones de HA y presencia de histidina descarboxilasa durante el desarrollo embrionario. De lado izquierdo se muestra una gráfica en donde se midieron mediante HPLC las concentraciones de HA en el cerebro embrionario. En particular, en la región del mesencéfalo se detectan bajas concentraciones al día E12, posteriormente se incrementa la concentración al día 14 y 16 de desarrollo, disminuyendo en estados perinatales (modificado de Vanhala *et. al.*, 1994). De lado derecho se muestra una vista sagital de un embrión de ratón de 15 días de desarrollo en donde se realizó una hibridación *in situ* para la enzima histidina descarboxilasa. El recuadro E muestra hibridación para la HDC en la región ventral del mesencéfalo (tomado de Nissinen, et al., 1995).

Se han identificado células que producen HA en el SNC embrionario, las cuales presentan proyecciones a diversas regiones del cerebro (Auvinen y Panula, 1988). Algunas de estas células se localizan en el mesencéfalo entre los días E14 a E18, mientras que a finales del desarrollo embrionario así como en edades peri y postnatales, desaparecen del mesencéfalo y se localizan en la región del núcleo tuberomamilar (Nissinen y Panula, 1995) (Tabla 1). Es interesante señalar que la población de células que sintetizan HA aparece transitoriamente durante el desarrollo embrionario, y esta población es distinta a la que se observa en el organismo adulto; la primera corresponde a las neuronas serotoninérgicas en el núcleo rafé que sintetizan ambos neurotransmisores, mientras que la segunda corresponde a las células del núcleo tuberomamilar que se encuentran en el sistema histaminérgico adulto y sólo sintetizan HA (Kinnunen *et al.*, 1998; Karlstedt *et al.*, 2003).

CÉLULAS INMUNOREACTIVAS A HISTAMINA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE RATA								
Región	E10	E12	E14	E16	E18	E20	Po	Adulto
Mesencéfalo	-	-	+	+	±	-	-	-
Núcleo Tuberomamilar	-	-	-	-	-	+	+	++

Tabla 1. Células inmunorreactivas para histamina durante el desarrollo embrionario. Detección de células inmunorreactivas para histamina en diversos días del desarrollo embrionario (E) de rata, así como al nacimiento y en el cerebro adulto. De lado izquierdo se muestran las regiones analizadas. ++ Presencia abundante, + Presencia, ± Presencia moderada, - Ausencia.

Expresión de receptores histaminérgicos durante el desarrollo

Receptor H₁. Durante el desarrollo embrionario, la expresión del RNAm del RH₁ se detecta al día E14 en la médula espinal, en el romboencéfalo, el mesencéfalo y el neuroepitelio ventricular del prosencéfalo, así como en tejidos periféricos (Fig. 8a). El patrón de expresión se vuelve más extenso hacia el día E16, cuando la expresión se observa en el puente, neuroepitelio superior del tectum, ventricular y talámico, así como en el funículo ventral de la médula espinal y el diencéfalo (Fig. 8b). Para el día E18, se expresa en la corteza cerebral, en el neuroepitelio ventricular y el área tegmental ventral (Fig. 8c). Posteriormente, en E20 disminuye su expresión en la corteza cerebral (Fig. 8d), lo que se mantiene hasta el nacimiento (Kinnunen *et al.*, 1998).

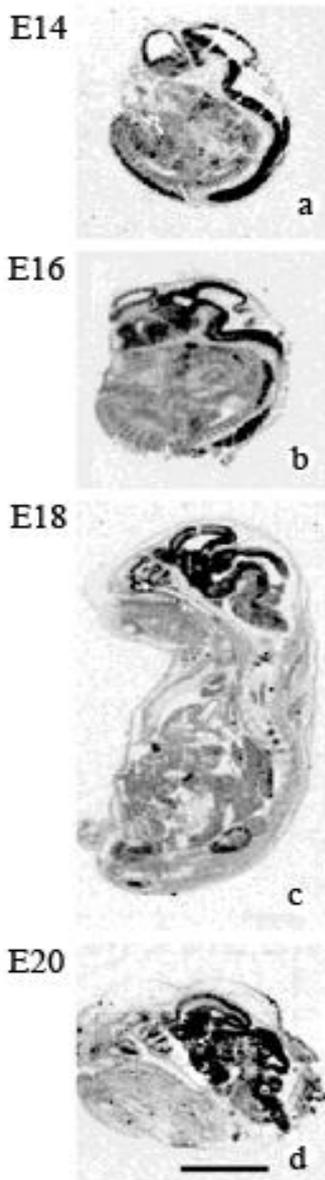


Figura 8. Expresión del RH₁ durante el desarrollo embrionario. Hibridación *in situ* donde se muestra la expresión del ARNm del receptor H₁ en fetos de rata de diferentes edades. En E14 (a), su expresión se concentra en la médula espinal y todo el tubo neural. En E16 (b), se expresa en la corteza cerebral, en el neurepitelio ventricular, tálamo y médula espinal. En E18 (c), se observa en el cerebro, el epitelio olfativo, así como en riñón. Finalmente, en E20 (d), se muestra una vista sagital de la cabeza del embrión, con expresión del receptor en la región del tálamo, hipotálamo, tegmentum y puente (modificado de Kinnunen *et. al.*, 1998).

Receptor H₂. En el desarrollo embrionario, este receptor se encuentra ampliamente distribuido en diversas áreas del SNC. No se ha analizado su expresión en estadios previos a E15, sin embargo se sabe que a partir de esta edad en adelante, este receptor se expresa en las partes frontal y caudal del núcleo rafé. A lo largo del desarrollo y hasta el nacimiento, la expresión de este receptor se encuentra en el área del núcleo tuberomamilar, la parte ventral del hipotálamo y la parte más externa de la corteza cerebral (Karlstedt *et al.*, 2001). En general, los patrones de expresión de este receptor en el núcleo rafé y tuberomamilar, correlacionan temporalmente con la localización del sistema histaminérgico en el cerebro adulto (Fig. 9).



Figura 9. Expresión del ARNm del receptor H₂ durante el desarrollo embrionario. Hibridación *in situ* en E15. Las puntas de flecha señalan el área rostral y caudal del núcleo rafé, en donde la expresión es mayor, mientras que en E17, la expresión se concentra en el área del núcleo tuberomamilar y la capa más externa de la corteza cerebral (flecha) (modificado de Karlstedt, 2001).

Receptor H₃: Se ha detectado la expresión de este receptor en el SNC a partir del día E15. En este estadio se expresa en la parte ventral del mesencéfalo, así como en la médula oblongata y en la médula espinal. En E16, la expresión se detecta en la parte dorsal del mesencéfalo, el tálamo, el hipotálamo y el núcleo accumbens. En E18 se observa el mismo patrón de expresión. Posteriormente, en E19, el RH₃ se expresa en la parte dorsal del mesencéfalo, el tálamo y el hipotálamo. A partir de este estadio y hasta el nacimiento, este receptor se localiza en la placa cortical (Heron *et al.*, 2001; Karlstedt *et al.*, 2003) (Fig. 10).

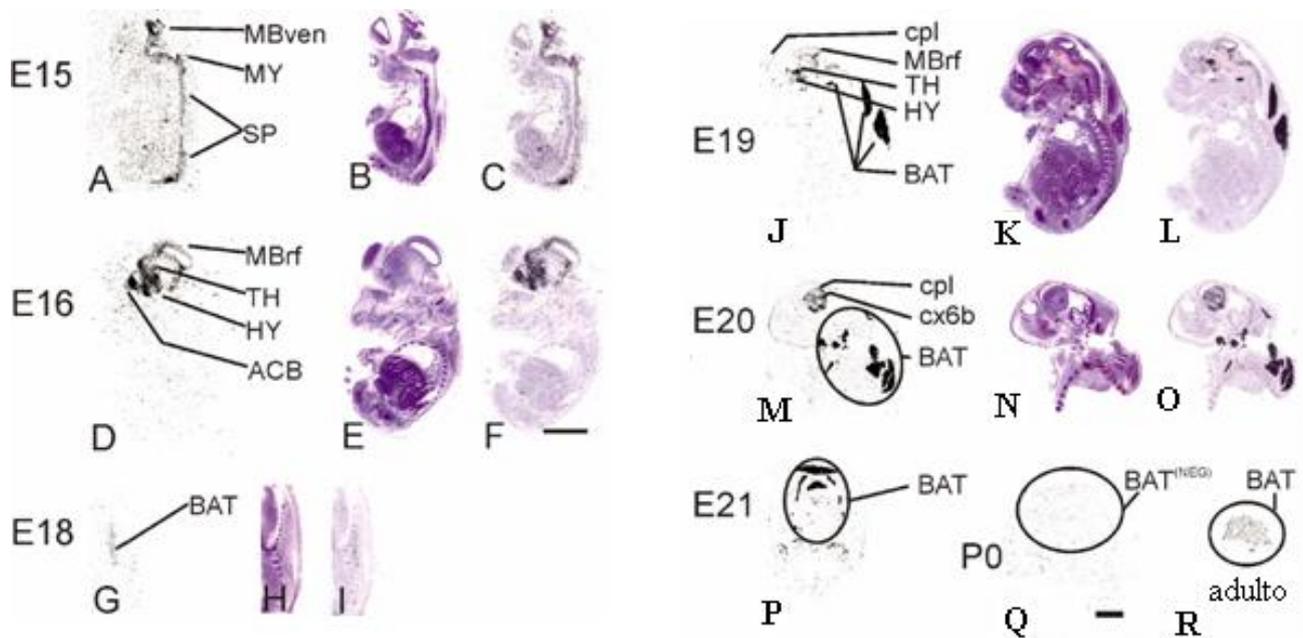


Figura 10. Expresión del receptor H₃ durante el desarrollo embrionario de rata. Las figuras de lado izquierdo (A, D, G, J, M y P) muestran la expresión del receptor H₃, mientras que las de lado derecho (B, E, H, K, N y Q) corresponden a tinciones control con hematoxilina-eosina. La composición de ambas imágenes para cada caso, corresponde a las figuras C, F, I, L, O y R. Las estructuras señaladas son: epitelio ventricular del mesencéfalo (MBven), médula oblongata (MY), médula espinal (SP), techo del mesencéfalo (MBrf), tálamo (TH), hipotálamo (HY), núcleo accumbens (ACB), tejido adiposo (BAT) y placa cortical (cpl) (modificado de Karlstedt, 2001).

En conjunto, estos datos apoyan la existencia de un sistema histaminérgico transitorio durante el desarrollo del SNC, cuya función se desconoce. Se ha propuesto que la HA podría tener alguna función en el desarrollo del SNC, aunque todavía no se conoce ésta ni su mecanismo de acción (Nissinen *et al.*, 1995; Nissinen y Panula, 1995; Fioretti *et al.*, 2004; Molina-Hernandez *et al.*, 2012; Panula *et al.*, 2014).

FORMACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Durante el desarrollo embrionario, previo a la formación del SNC, ocurre un proceso denominado gastrulación en el cual se forman las 3 capas embrionarias 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 a un embrión: ectodermo, mesodermo y endodermo (Fig. 11). El sistema nervioso se desarrolla a partir del ectodermo, estructura de donde se origina la placa neural, que es una capa de células epiteliales indiferenciadas que poseen un alto grado de plasticidad y que, a lo largo del desarrollo, proliferan, adquieren identidades regionales y producen un gran número y variedad de tipos neuronales y gliales requeridos para la formación del SNC (Gilbert, 2003).

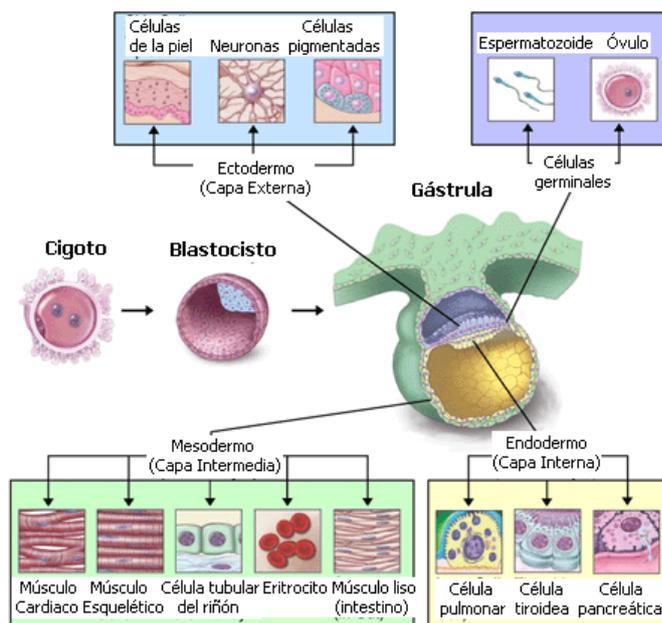


Figura 11. Formación de tipos celulares especializados a partir de la gástrula. Durante la gastrulación se originan las 3 capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. A partir de estas tres capas se diferencian los diversos tipos celulares especializados que conforman a un organismo adulto (modificado de Winslow, 2001).

Una vez que se ha formado la placa neural ocurre un proceso denominado neurulación, mediante el cual la notocorda envía señales inductoras a la placa neural produciendo una invaginación por la línea media de la misma a lo largo del eje antero-posterior, elevando así los bordes laterales y dando origen a los pliegues neurales. De la fusión de la región dorsal de los pliegues neurales se forma el tubo neural, el cual es el

rudimento embrionario del SNC. Durante la fusión del tubo neural, un grupo de células del neuroectodermo más dorsal se separan y forman las crestas neurales, que darán origen al sistema nervioso periférico. Por otro lado, las células ectodérmicas que no siguen el programa neural, darán origen a la epidermis (Fig. 12) (Smith y Schoenwolf, 1997; Sadler, 2005).

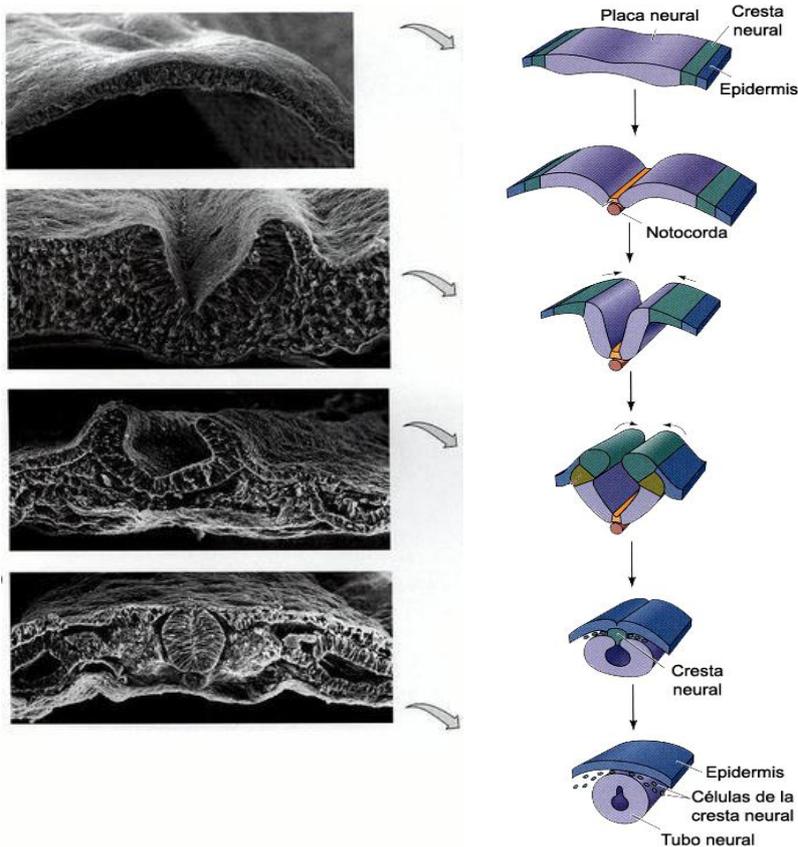


Figura 12. Proceso de neurulación. A partir de la placa neural, por inducción de la notocorda, se produce una invaginación y la unión de sus pliegues para dar origen al tubo neural, las células de la cresta neural y la epidermis (modificada de Gilbert, 2003).

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

1. Anatómico: el tubo neural y su cavidad aumentan de tamaño para formar las vesículas cerebrales a partir de la región rostral, y la médula espinal a partir de la región caudal del tubo neural.
2. Tisular: las poblaciones celulares dentro de la pared del tubo neural se reacomodan entre sí para formar las diferentes regiones funcionales del cerebro y de la médula espinal.
3. Celular: las células del neuroepitelio se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Neurogénesis y gliogénesis

Para la formación del SNC, se requiere de la producción de diversos tipos celulares. La capa celular del tubo neural llamada neuroepitelio germinal es el primordio del SNC y consiste en células multipotentes que tienen la capacidad de autorrenovarse y de producir progenitores intermedios comprometidos a diferenciarse a un destino neuronal o glial, denominadas células troncales/progenitoras neurales (CTPN). Durante el desarrollo del mamíferos, las neuronas se generan principalmente durante el desarrollo embrionario temprano, mientras que la glía se produce en etapas más tardías del desarrollo y posterior al nacimiento (Fig. 13) (Bertrand *et al.*, 2002). La neurogénesis se lleva a cabo en 3 etapas:

- **Proliferación:** El número de células que se encuentran en el tejido adulto es mucho mayor que en etapas embrionarias, por lo que las células se dividen simétricamente, de manera que en un tiempo relativamente corto su número incrementa en forma exponencial. Posteriormente, mediante divisiones asimétricas, cada célula genera una célula post-mitótica que sale del ciclo celular para generar una neurona o una célula glial, y otra célula que continuará dividiéndose. Las células en proliferación se localizan normalmente cerca de las áreas ventriculares.
- **Migración:** Una de las características típicas del sistema nervioso es que las células no permanecen en el lugar de generación, sino que una vez que salen del ciclo celular se desplazan hacia las regiones en las que residirán en el adulto mediante un proceso conocido como migración celular.
- **Diferenciación:** La última etapa para la generación de una célula nerviosa es su diferenciación en uno de los tipos celulares presentes en el sistema nervioso adulto. Esta transición implica un cambio intracelular que está regulado por activadores transcripcionales conocidos como genes proneurales (Fig. 13) (Ma *et al.*, 1996; Farah *et al.*, 2000; Mizuguchi *et al.*, 2001) y otras moléculas que actúan como represores transcripcionales (Ballas *et al.*, 2005). Sin embargo, el control de estos genes está dado no sólo por la identidad molecular de la célula, sino que también se ve afectado por el ambiente en el que ésta se diferencia.

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

Cuando estas proteínas se encuentran en altas concentraciones en los progenitores neurales, activan la vía de diferenciación neuronal e inhiben la diferenciación glial. Al mismo tiempo, por medio de un proceso denominado inhibición lateral, la vía de señalización de Notch regula y/o inhibe la expresión de genes proneurales en otras células, bloqueando su diferenciación neuronal. Así, la regulación de genes proneurales es un mecanismo clave que mantiene un balance entre los progenitores que se dirigen a la diferenciación neuronal, los progenitores que se mantienen indiferenciados y los que producen otros tipos celulares gliales (Fig. 13) (Gage, 2000; Morrison, 2001). Posteriormente, la gliogénesis se inicia por la inducción de señales como las del factor neurotrófico ciliar y las BMPs. Estas señales activan la diferenciación glial y, en paralelo, inhiben la neurogénesis a través de la activación de inhibidores proneurales como el Id (inhibidor de diferenciación) y los pertenecientes a la familia Hes. Por otro lado, se ha demostrado que la señalización de Notch presenta una actividad gliogénica y actúa inhibiendo la actividad de genes proneurales promoviendo así, la entrada a la vía de diferenciación glial (Fig. 13) (Morrison, 2001; Bertrand *et al.*, 2002).

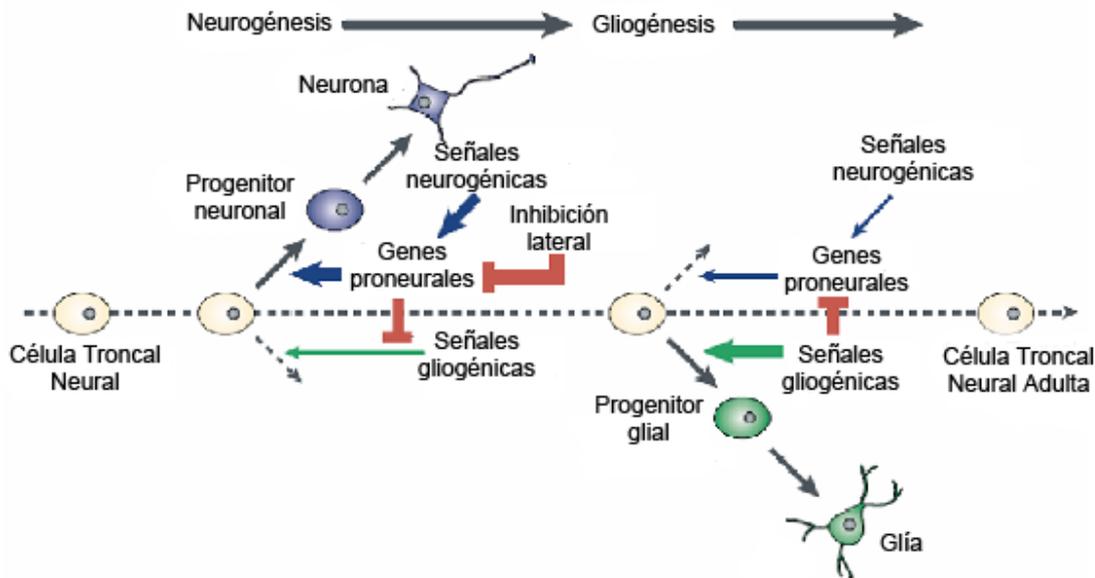


Figura 13. Modelo de neurogénesis y gliogénesis durante la formación del sistema nervioso central. En el curso temporal del desarrollo neural, ocurre primero la diferenciación neuronal y posteriormente se genera la glía. La activación de ambos procesos depende de factores intrínsecos y extrínsecos que regulan las propiedades de los precursores neurales. Las señales neurogénicas, son factores extrínsecos que regulan la activación de genes proneurales, promoviendo el arresto del ciclo celular, la diferenciación neuronal y a su vez, inhibiendo la diferenciación glial. También hay un evento de inhibición lateral sobre genes proneurales, dado por la señalización de Notch, evitando la entrada a la vía de diferenciación neuronal. Por otro lado, las señales gliogénicas son factores que inhiben a los genes proneurales, y actúan sobre los precursores neurales para inducir la diferenciación glial (modificado de Bertrand *et al.*, 2002).

FORMACIÓN DEL MESENCÉFALO

Durante la embriogénesis, la placa neural se va delimitando progresivamente mediante una gran variedad de mecanismos que llevan al establecimiento de las subregiones que finalmente, darán origen a poblaciones celulares específicas de cada región del cerebro en el organismo adulto. El establecimiento de estas regiones está regulado por la acción espacio-temporal de un conjunto de factores transcripcionales, cuya expresión depende de señales organizadoras. En vertebrados, la formación de mesencéfalo se da en dos pasos: primero ocurre la regionalización de la placa neural, poco después de la inducción del neuroectodermo a partir del epiblasto dorsal de la gástrula; posteriormente se da la especificación del mesencéfalo.

La regionalización del mesencéfalo comienza durante el desarrollo de la placa neural, la cual está definida en ejes antero-posterior y dorso-ventral. Una vez que ocurre la neurulación y se ha formado el tubo neural, ocurre una regionalización que se da como resultado de una serie de movimientos morfogénicos que doblan, pliegan y contraen el tubo neural. El tubo neural está regionalizado en dos ejes neurales primarios:

- Eje antero-posterior: la polaridad anterior del SNC en vertebrados se vuelve aparente con la división morfológica del tubo neural; esta regionalización se da incluso antes de que la porción posterior del tubo se ha formado (Twyman, 2001). En la región anterior, el tubo neural da origen a las tres vesículas cerebrales primarias: prosencéfalo (encéfalo anterior), mesencéfalo (encéfalo medio) y romboencéfalo (encéfalo posterior); en la parte posterior se formará la médula espinal. Cuando la porción posterior del tubo neural se ha cerrado, las vesículas primarias se subdividen para dar origen a las vesículas secundarias: el prosencéfalo se divide en telencéfalo y diencéfalo, el mesencéfalo se mantiene y, el romboencéfalo da origen al metencéfalo y mielencéfalo. Todas estas regiones a su vez, producen regiones encefálicas adicionales en el adulto (Fig. 14) (Gilbert, 2003).

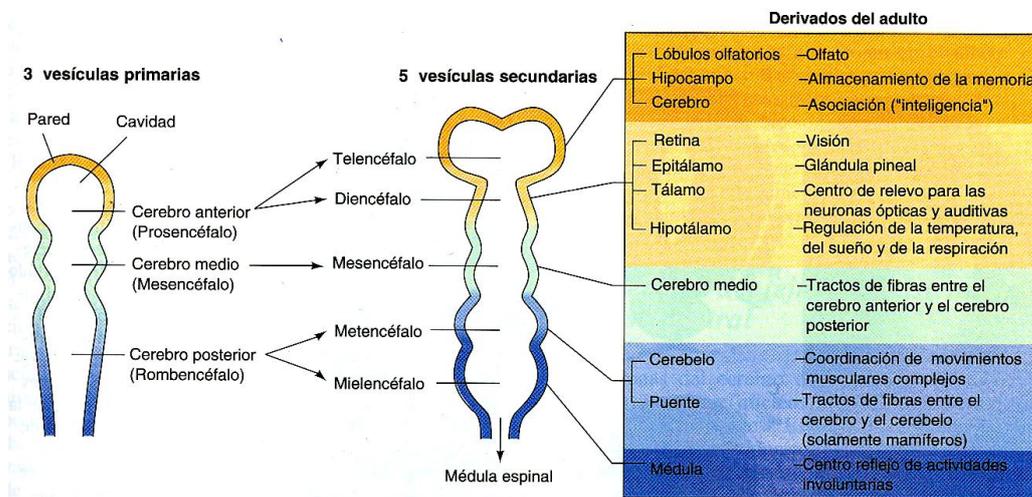


Figura 14. Regionalización antero-posterior del tubo neural. De izquierda a derecha, se muestra la regionalización inicial del tubo neural en tres vesículas cerebrales primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo. Posteriormente se subdividen en 5 vesículas cerebrales, mientras que en el estado adulto, se derivan estructuras específicas que se derivan de cada región del tubo neural en el embrión (Figura tomada de Gilbert, 2003).

- Eje dorso-ventral: el tubo neural de vertebrados muestra una polaridad dorso-ventral, la cual se establece desde el estadio de placa neural. Una vez que el tubo neural se ha cerrado, el extremo más dorsal del tubo neural (línea media dorsal), se forma por una estructura denominada la placa del techo, la cual emite señales que pertenecen a la familia del factor de crecimiento transformante (TGF- β) como las BMPs, dorsalina y activina que permiten mantener la polaridad dorsal del tubo neural. Por otro lado, en la línea media ventral, se forma otra estructura denominada la placa del piso, que establece el patrón del eje ventral inducido por señales como Sonic Hedgehog (Shh), que se libera por la notocorda, así como por la placa del piso (Twyman, 2001) (Fig. 15).

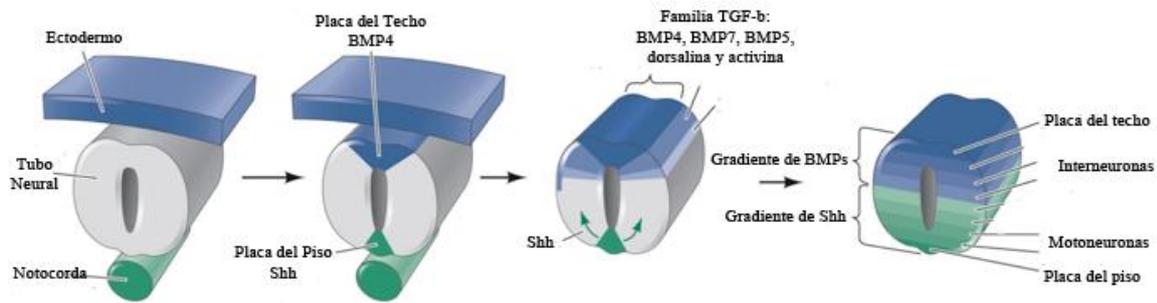


Figura 15. Regionalización dorso-ventral del tubo neural. La polaridad dorso-ventral se establece por proteínas denominadas proteínas morfogénicas de hueso (BMPs por sus iniciales en inglés) y Sonic Hedgehog (Shh). La notocorda y la placa del piso secretan Shh, que induce la formación de la parte ventral del tubo neural y a partir de aquí, se establece un gradiente de concentración hacia la parte dorsal del tubo neural. Por otro lado, las BMPs establecen un gradiente que comienza en la parte dorsal del tubo neural, denominada placa del techo (Figura tomada de Gilbert, 2003).

Como resultado de la regionalización dorso-ventral del mesencéfalo, se han definido subdivisiones denominadas m1-m7, las cuales se caracterizan por un código específico de dominios de expresión de diversos factores de transcripción, los cuales dan lugar a diferentes subtipos neuronales (Fig. 16). El dominio m7 es el más ventral y es en donde se generan las neuronas dopaminérgicas (NDA), que se caracteriza por la expresión de *Lmx1a*, mientras que el dominio adyacente m6 produce las neuronas glutamatérgicas del núcleo rojo. *Helt* es un factor de transcripción que se expresa de manera selectiva en los dominios m2 a m5 en E11.5, y a partir de estos dominios se generan las neuronas GABAérgicas. En el dominio m2, se expresa *Nkx2.2*, el cual se requiere para la diferenciación tanto en neuronas GABAérgicas como glutamatérgicas. Sin embargo, *Nkx2.2* es un marcador específico de neuronas GABAérgicas en el dominio m2. El dominio más dorsal es el m1 y aquí se expresa *Pax7* en E11.5, característico de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (Nakatani *et al.*, 2007; Kala *et al.*, 2009; Lahti *et al.*, 2013).

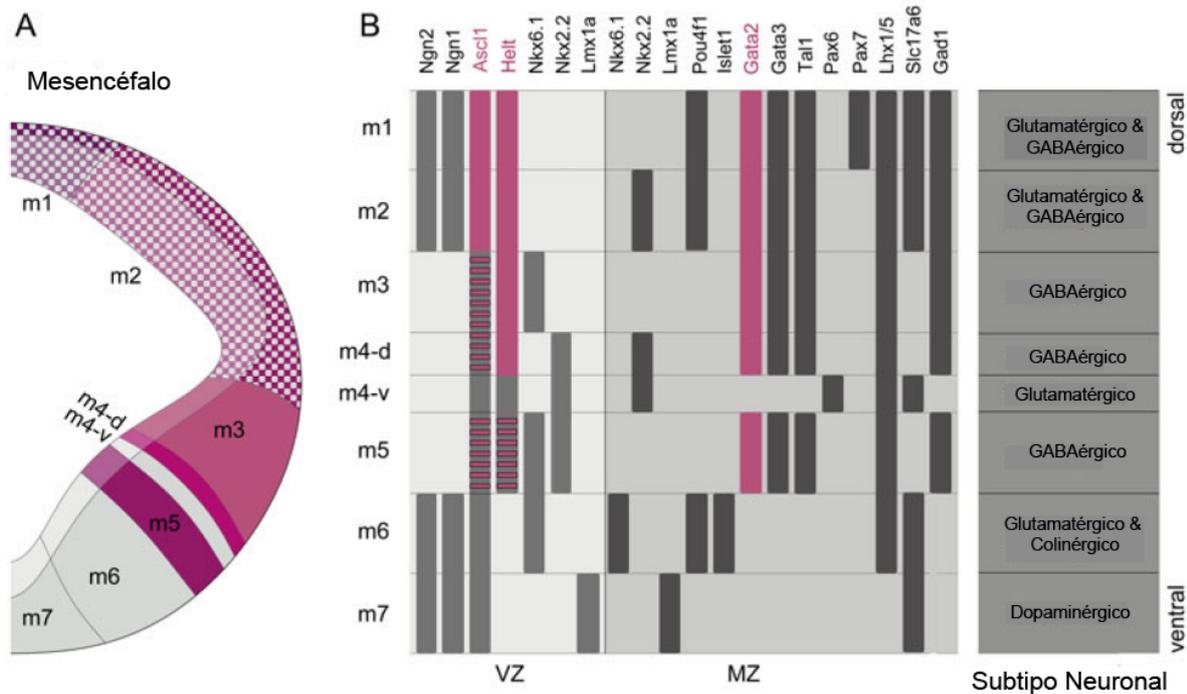


Figura 16. Dominios dorso-ventrales del mesencéfalo. A) Vista coronal de los dominios m1-m7 del mesencéfalo en estadio E12.5. B) Dominios dorso-ventrales de expresión génica en la zona ventricular (VZ) y del manto (MZ). Estos dominios se caracterizan por una combinación en la expresión de diversos factores de transcripción. Esta combinación determina los subtipos neuronales que se producen en cada dominio (Tomada de Lahti, 2013).

La especificación de los linajes celulares para la formación del SNC durante el desarrollo está dada por una compleja interacción entre las cascadas de señalización de moléculas proteicas denominadas morfógenos, cuya acción se da de manera dependiente de su concentración. Entre estas moléculas se encuentran: los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), la familia de proteínas wingless/Wnt (Wnt), la superfamilia de factores TGF- β , el Shh, las BMPs y sus antagonistas como Nogina, Cordina y Folistatina (Wessely y De Robertis, 2002). Morfológicamente, el mesencéfalo se encuentra delimitado en su parte anterior, por la vesícula diencefálica y en su parte posterior por el istmo, que lo separa del cerebro posterior (Fig. 14). El desarrollo del mesencéfalo es altamente dependiente de las señales organizadoras provenientes del istmo, principalmente FGF8 (Prakash y Wurst, 2004). El mesencéfalo se establece molecularmente incluso antes de que la división morfológica aparezca. Esta especificación se debe a los patrones de expresión específicos de los factores de transcripción “Orthodenticle homologue 2” (Otx2), “Paired box 2” (Pax2) y “Engrailed 1/2” (En1/2) en el neuroectodermo anterior, que posteriormente se delimitan por el establecimiento de centros de señalización en el límite del mesencéfalo y romboencéfalo y en la porción anterior del surco neural (Fig. 17) (Nakamura *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2008).

Otx2 es un factor de transcripción que se expresa en el prosencéfalo y mesencéfalo, el cual tiene una función muy importante en mantener el dominio de expresión ventral de Shh. “Gastrulation brain homeobox” (Gbx2) es un factor de transcripción que se expresa en el romboencéfalo en estadios más tempranos del desarrollo. En fases tempranas, los dominios de expresión de Otx2 y Gbx2 se sobrelapan en la región del istmo. Se ha observado que el límite caudal del dominio de expresión de Otx2 corresponde con el límite caudal del mesencéfalo, por lo que Otx2 resulta esencial para definir la identidad del mesencéfalo, mientras que el límite entre el mesencéfalo y el romboencéfalo se define por una interacción de señales de represión entre Otx2 y Gbx2 (Nakamura y Watanabe, 2005).

Por otro lado, Wnt1 y En1/2 son genes que se requieren para la proliferación y sobrevivencia celular en el mesencéfalo ventral (MesV), mientras que el FGF8 es una señal instructora que induce el código transcripcional que se requiere para la determinación de NDA mesencefálicas (Nakamura *et al.*, 2005). Se cree que la región del istmo funciona como un organizador para definir estas dos regiones, siendo FGF8 la molécula organizadora (Fig. 17). El MesV es altamente dependiente de la señal de Shh. Esta molécula define el destino ventral en el cerebro y la médula espinal. Sin embargo, sólo las células que han adquirido identidad regional de mesencéfalo, son capaces de responder a Shh y adquirir el destino de NDA. La señalización de Shh a partir de la placa del piso genera una cascada de eventos de diferenciación celular que no requieren señales extrínsecas adicionales para definir los tipos neuronales presentes en el MesV.

En conjunto, FGF8, Shh y Otx2, son genes que se deben expresar para la especificación regional temprana del mesencéfalo y son capaces de promover el fenotipo dopaminérgico.

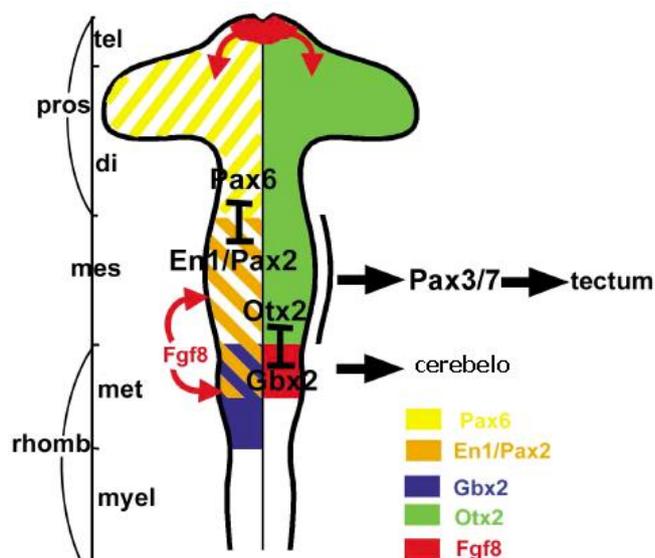


Figura 17. Especificación del mesencéfalo. El esquema muestra las vesículas cerebrales y la interacción de diversos factores de transcripción que determinan el destino de cada región. El solapamiento en la expresión de Otx2, Pax2 y En1, definen el territorio del mesencéfalo (mes), mientras que la señal de FGF8 en el mesencéfalo, reprime la expresión de Otx2 e induce la expresión de Gbx2 y así, el cambio en el destino del mesencéfalo hacia metencéfalo (met); di, diencéfalo; myel, mielencéfalo; pros, prosencefalo; rhomb, romboencéfalo; tel, telencéfalo (modificado de Nakamura y Watanabe, 2005).

DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA

En vertebrados, existen diversos grupos de NDA ubicados en diferentes regiones del cerebro, tales como el bulbo olfatorio, la retina, el hipotálamo y el mesencéfalo. La formación más grande de NDA se ubica en el MesV. Se han definido tres grupos de NDA que se originan a partir de esta región. El grupo denominado A9 da origen a la *sustantia nigra pars compacta* que proyecta al estriado dorsal, formando la vía nigro-estriatal y su función principal es el control de movimientos. Los grupos A10 (medial) y A8 (lateral) darán origen a las NDA del área tegmental ventral y retrorubral, respectivamente. Éstas proyectan al estriado ventromedial (A10) y a estructuras límbicas (A8) y se requieren para regular procesos de comportamiento emocional y mecanismos de recompensa (Ang, 2006).

La generación de NDA mesencefálicas involucra tres procesos principales: la regionalización de la placa neural, la determinación o especificación celular en el mesencéfalo y la diferenciación terminal hacia NDA. Diversos marcadores moleculares permiten la identificación de tres poblaciones principales a lo largo de la diferenciación hacia el linaje dopaminérgico mesencefálico: progenitores, neuronas inmaduras y neuronas maduras (Fig. 18). La especificación regional del mesencéfalo establece una identidad molecular que potencia a las células del neuroepitelio del MesV a responder a señales determinantes del destino dopaminérgico. Mientras el neuroepitelio del mesencéfalo se desarrolla, se va engrosando al mismo tiempo que las células proliferan y éste comienza a estratificarse.

El curso temporal para el desarrollo de las NDA del mesencéfalo puede dividirse de manera general en 4 etapas: primero, al día embrionario 7.5 (E7.5), surgen los progenitores

de la superficie ventricular del mesencéfalo que mantienen su capacidad de autorrenovación. La inducción/especificación del fenotipo dopaminérgico previo al día E9.5 depende de la interacción de factores como Shh, derivado de la línea media ventral de la placa del piso, y FGF8, proveniente del istmo. Estas señales especifican la identidad anteroposterior y dorsoventral, activando la expresión de FoxA2, Otx2, Lmx1a/b, Msx1/2, Ngn2, Mash1 y Shh en los precursores neurales (Abeliovich y Hammond, 2007; Gale y Li, 2008; Roybon *et al.*, 2008). Posteriormente, los precursores dopaminérgicos que salen del ciclo celular, migran lateral y ventralmente, generan NDA inmaduras post-mitóticas entre el día E9 y E14 y comienzan a expresar marcadores tempranos de NDA mesencefálicas como Nurr1, En1/2 y Pitx3, los cuales son necesarios para la sobrevivencia y el mantenimiento de las NDA. En esta etapa, las células dejan de expresar Sox2 y comienzan a expresar marcadores neuronales como β -tubulina III (Simon *et al.*, 2001).

La transición de una célula de la zona proliferativa ventricular hacia la zona intermedia, está regulada por Ngn2. Finalmente, a partir de E11.5, las NDA inmaduras continúan migrando radialmente hacia la zona del manto y una vez que las células llegan a la zona más ventral del neuroepitelio, se da la diferenciación terminal y maduración funcional. En esta etapa, las NDA maduras expresan marcadores como como tirosina hidroxilasa (TH), la cual es la enzima limitante en la síntesis de dopamina, y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (Smidt y Burbach, 2007). En conjunto, este proceso refleja la disminución en la plasticidad del tejido nervioso en desarrollo, conforme va progresando la determinación de algún linaje.

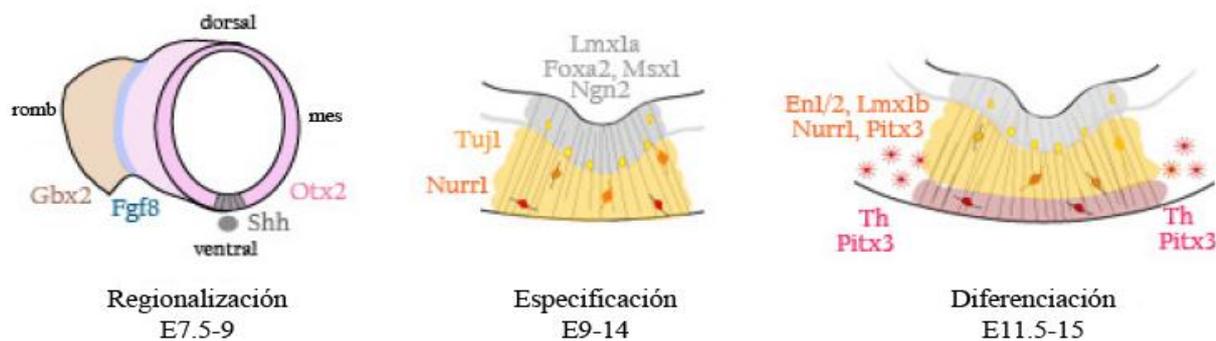


Figura 18. Generación de neuronas dopaminérgicas. Curso temporal en la generación de neuronas dopaminérgicas: primero ocurre la regionalización de la placa neural, la determinación o especificación celular en el mesencéfalo y la diferenciación terminal hacia neuronas dopaminérgicas. Cada etapa depende de la activación de diversos factores de transcripción en progenitores dopaminérgicos mesencefálicos, neuronas dopaminérgicas inmaduras y neuronas dopaminérgicas maduras (tomado de Ang, 2006). La expresión de Shh en el neuroepitelio ventral del mesencéfalo *regionaliza* la población de progenitores dopaminérgicos mesencefálicos. Posteriormente, la *especificación* ocurre debido a la activación de genes como Lmx1a y FoxA2. Finalmente ocurre la *diferenciación* terminal de neuronas dopaminérgicas, expresando Pitx3 y TH (tomado de Li y Gale, 2008).

EFECTO DE LA HA EN CÉLULAS TRONCALES NEURALES CORTICALES EN CULTIVO

Las CTPN han sido hasta ahora un modelo muy útil para el estudio de factores intrínsecos y extrínsecos que regulan procesos de proliferación, migración, diferenciación y muerte celular relacionados con el desarrollo del SNC. Existen pocos artículos describiendo los efectos de la HA en CTPN.

En nuestro grupo de trabajo, se analizó el efecto *in vitro* de la HA sobre CTPN provenientes de la corteza cerebral de rata (Molina-Hernandez y Velasco, 2008; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2012; Molina-Hernandez *et al.*, 2013). En estos trabajos se observó que cultivos de células provenientes de corteza cerebral de rata de 14 días de desarrollo embrionario expresan los 3 receptores histaminérgicos. Se demostró que el tratamiento con diversas concentraciones de HA favorece la proliferación celular mediante la activación del receptor H₂, mientras que la muerte celular apoptótica disminuyó en células en proliferación. Por otro lado, al inducir la diferenciación en estos cultivos, la HA incrementó la diferenciación neuronal debido a la activación del receptor H₁, disminuyendo la producción de astrocitos. Además, la HA incrementó la muerte celular apoptótica de manera dependiente de la concentración en células diferenciadas (Fig. 19) (Molina-Hernandez y Velasco, 2008).

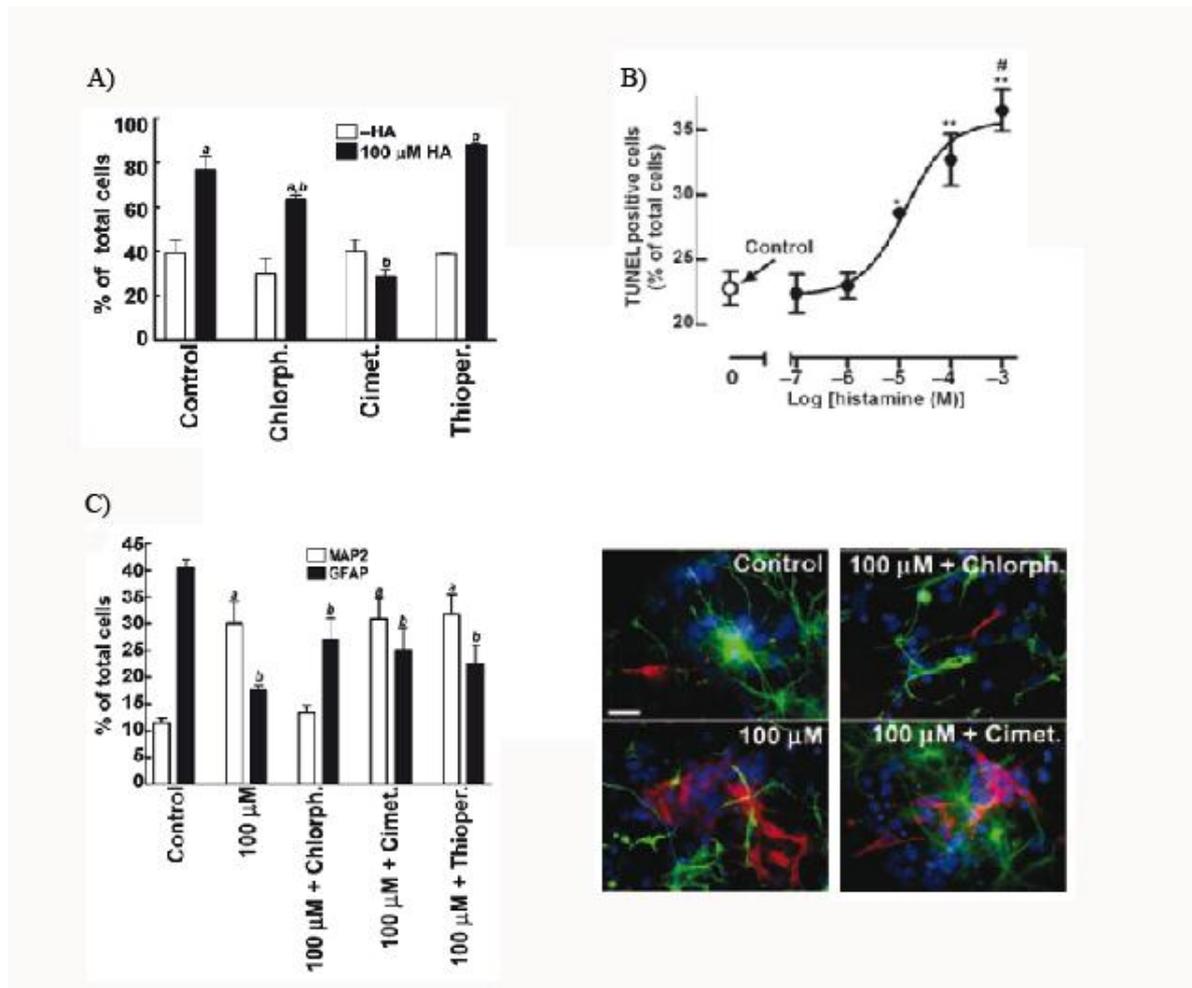


Figura 19. Efecto de la HA sobre la proliferación y diferenciación *in vitro* de células troncales neurales de la corteza cerebral de rata. A) Experimentos de incorporación de BrdU donde se observa el efecto antagónico de cimetidina en el incremento en la proliferación inducido por el tratamiento con 100 μ M de HA. B) Ensayos de TUNEL donde se observa que la HA incrementa la apoptosis de manera dependiente de la concentración en células diferenciadas. C) Análisis farmacológicos e imágenes representativas del efecto de la HA sobre la diferenciación de CTPN, donde se observa que la clorfeniramina, antagonista del receptor H₁, es capaz de revertir el aumento en la diferenciación neuronal (MAP2, rojo) y la disminución en la diferenciación glial (GFAP, verde) promovida por el tratamiento con 100 μ M de HA (Molina-Hernández *et al.*, 2008).

Posteriormente, al analizar un posible mecanismo de acción, observamos que la HA se requiere en la etapa de proliferación, ya que incrementa el número de divisiones asimétricas en células progenitoras neurales, sugiriendo que la HA es capaz de incrementar la diferenciación neuronal, afectando el patrón de división celular e incrementando la proporción de divisiones asimétricas de los progenitores neurales, favoreciendo así la generación de neuronas. Diversos factores transcripcionales como *prospero1* y *neurogenina 1*, los cuales son importantes para el compromiso neuronal, se vieron incrementados por el tratamiento con HA (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2012). Al analizar el tipo de neuronas que se favorecía por el tratamiento con HA, se demostró que ésta incrementa la producción de poblaciones neuronales corticales de capas profundas y disminuye las de la subplaca, evaluado mediante la detección de los marcadores FOXP2 y Calretinina, respectivamente.

Este efecto está mediado por la activación del receptor H_1 y la sobre-regulación del receptor del factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGFR1). Se realizaron ensayos *in vivo* en donde se vio el mismo efecto (Fig. 20) (Molina-Hernandez *et al.*, 2013).

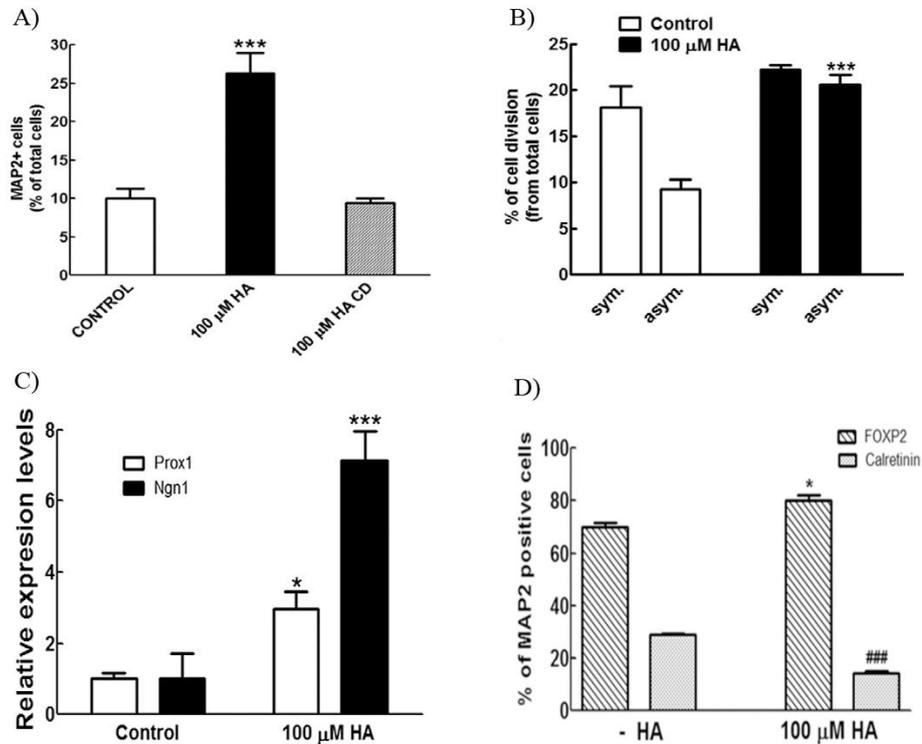


Figura 20. Acción de la HA sobre la diferenciación *in vitro* de células de corteza cerebral de rata. **A)** La HA en etapa de proliferación (barra negra) incrementa la generación de neuronas (MAP2+). **B)** El tratamiento con 100 μM de HA incrementa el número de divisiones asimétricas de precursores neurales en la etapa de proliferación. **C)** La HA promueve significativamente la expresión de *Prox1* y *Ngn1*, involucrados en el compromiso hacia linaje neuronal. **D)** Las neuronas presentes en etapa de diferenciación, son positivas para el marcador de capas corticales profundas, FoxP2 (Molina-Hernández y Velasco, 2013).

EFFECTO DE LA HA EN CÉLULAS TRONCALES NEURALES DE MESENCÉFALO VENTRAL EN CULTIVO

Previamente, durante mis estudios de maestría, realicé ensayos con CTPN provenientes de la región del MesV de embriones de rata de 12 días de desarrollo. El objetivo de este trabajo fue comenzar a estudiar el efecto del tratamiento con diversas concentraciones de HA en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte de CTPN del MesV de rata *in vitro*. Observamos que estos cultivos expresan los 3 receptores histaminérgicos a nivel de ARN mensajero. La HA favoreció significativamente la diferenciación neuronal; sin embargo, disminuyó la proporción de NDA. Este efecto se vio regulado por la activación del

receptor H_1 . Por otro lado, observamos que la HA incrementó la muerte celular apoptótica. En conjunto, estos resultados indican que la HA pudiera estar actuando como una señal que regula la diferenciación neuronal así como el establecimiento de poblaciones neuronales específicas como el linaje dopaminérgico durante el desarrollo del Sistema Nervioso.

EFEECTO DE LA HA EN CÉLULAS TRONCALES NEURALES ADULTAS

En el cerebro adulto, existen dos nichos de células troncales neurales. Uno reside en la zona subventricular (ZSV) y el otro en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Los neuroblastos que se originan en la ZSV migran a través de la corriente rostral migratoria hacia el bulbo olfatorio, en donde se diferencian terminalmente hacia interneuronas. Recientemente, se estudió el efecto de la HA sobre la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de CTN de la ZSV (Agasse *et al.*, 2008; Bernardino *et al.*, 2012). Se reportó que la HA actúa como un factor proneurogénico en células provenientes de la ZSV sin afectar la proliferación ni la sobrevivencia celular. Estos investigadores realizaron ensayos epigenéticos para elucidar un posible mecanismo de acción de la HA y observaron que al estimular las células con HA, se promueve la asociación de los promotores de *Mash1* y *Dlx2* con la forma trimetilada de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4m3), la cual es una marca que favorece la transcripción de estos genes proneurales. Este efecto proneurogénico se debió a la activación del RH_1 . También se analizaron diversos fenotipos neuronales y se observó que las neuronas GABAérgicas se veían favorecidas por el tratamiento con HA. En este trabajo, al igual que lo reportado en nuestro grupo para las CTN embrionarias, mostraron que la HA promueve la neurogénesis incrementando el número de divisiones simétricas, que dan origen a dos células diferenciadas *Sox2* $-/-$, reduciendo así la capacidad de autorrenovación hacia un destino neurogénico (Fig. 21). Finalmente, sugieren que la HA actúa promoviendo la axogénesis y maduración neuronal y posiblemente el compromiso neuronal, mediante la activación de la vía de MAP cinasas (Bernardino *et al.*, 2012).

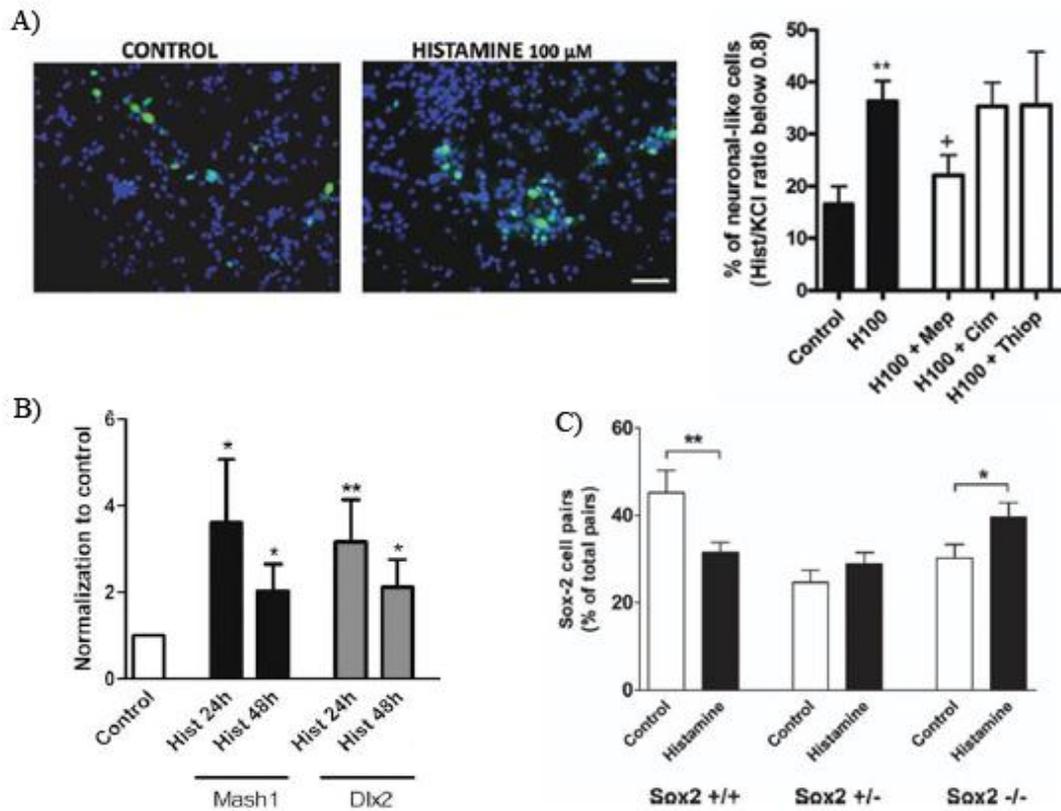


Figura 21. Efecto de la HA en células troncales neurales adultas en cultivo. **A)** La aplicación de 100 μ M de HA incrementa la proporción de neuronas (NeuN+, verde) mediante la activación del RH₁, ya que al bloquear su acción con el antagonista mepiramina se revierte este efecto. **B)** El tratamiento con 100 μ M de HA promueve la modificación de los promotores de Mash1 y Dlx2 a la forma trimetilada de la lisina 4 en la histona H3. **C)** La HA incrementa el número de divisiones asimétricas, dando origen a un precursor neural Sox2 + y a una célula diferenciada Sox2- (Sox2 +/-) y disminuye las divisiones simétricas (Sox2 +/+) que generan dos precursores neurales de la zona subventricular (Bernardino et al., 2012).

V. JUSTIFICACIÓN

La HA es un neurotransmisor que participa en funciones esenciales como la regulación del ciclo del sueño-vigilia, la actividad motora, la plasticidad sináptica y la memoria. Durante el desarrollo embrionario, la HA está presente en concentraciones más altas que las que se encuentran en el cerebro adulto. La histidina descarboxilasa (HDC) es la enzima que se encarga de la síntesis de HA y también se encuentra presente durante el desarrollo embrionario. La expresión transitoria de la HDC, así como los niveles elevados de HA y la expresión de los receptores histaminérgicos durante la gestación, muestran la existencia de un sistema transitorio histaminérgico cuya función aún no ha sido estudiada. Por otro lado, las células troncales/progenitoras neurales (CTPN) presentan propiedades de autorrenovación y diferenciación que las hacen un modelo de estudio muy eficiente para el diseño de estrategias experimentales que permitan la identificación de posibles factores proneurogénicos. En este sentido, hemos reportado que en cultivos primarios de CTN de corteza cerebral de rata, la HA incrementa la proliferación celular mediante la activación del receptor H_2 , mientras que la activación del RH_1 promueve la diferenciación neuronal. Este efecto proneurogénico se debe probablemente a la activación de los factores neuronales *prospero 1* y *neurogenina 1*, y la HA favoreció la generación de neuronas positivas para el marcador FoxP2, que pertenecen a capas profundas de la corteza cerebral. Otro grupo de trabajo ha reportado que la HA estimula la diferenciación neuronal en CTN adultas, provenientes de la zona subventricular.

Previamente, en mis estudios de maestría, realicé ensayos en CTPN provenientes de la región del MesV de rata y analizamos el efecto que tiene la HA *in vitro*. A partir de embriones de rata de 12 días de desarrollo, realizamos cultivos primarios de la región del mesencéfalo, dando tratamientos con diversas concentraciones de HA. Estos cultivos expresan los 3 receptores histaminérgicos. Los receptores se activan al tratar las células con HA, generando una respuesta de liberación de calcio intracelular. La HA favoreció significativamente la diferenciación neuronal; sin embargo, disminuyó la proporción de NDA, regulado mediante la activación del receptor H_1 . Por otro lado, observamos que la HA incrementa la muerte celular apoptótica.

Los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* tanto en cultivos corticales como de mesencéfalo, así como la función proneurogénica de la HA en CTN adultas, nos han llevado a proponer a la HA como una señal que podría participar en la neurogénesis en diversas regiones del SNC, regulando procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Por

ello, resulta interesante llevar a cabo estudios del sistema histaminérgico en un modelo *in vivo*, así como complementar los resultados que se obtuvieron *in vitro*. En este trabajo nos propusimos como objetivo hacer un análisis más completo del modelo *in vitro* así como estudiar el efecto de la administración de HA en el desarrollo de la región del mesencéfalo, empleando como modelo embriones de rata inyectados intrauterinamente.

Durante el desarrollo embrionario, se requieren de señales locales específicas que dirijan los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular de una región en particular del SNC. Actualmente, el sistema mesencéfalo es ampliamente estudiado debido a su implicación en desórdenes neurológicos y la generación de NDA. Por ello, el estudio de los mecanismos que permiten su eficiente generación, poseen un potencial valor clínico elevado, por su posible aplicación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson. Por lo cual, el alcance de este trabajo, está dirigido a evaluar si la HA es una señal que se modifica en el proceso de neurogénesis dopaminérgica durante la formación del MesV.

VI. HIPÓTESIS

Debido a la existencia de un sistema histaminérgico transitorio durante el desarrollo embrionario, el cual coexiste de manera espacial y temporal con el periodo neurogénico en la región del mesencéfalo, la HA podrá incrementar *in vivo* la diferenciación de progenitores neurales en la región del MesV de rata.

VII. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inyección de HA, durante el desarrollo embrionario *in vivo*, sobre la diferenciación neuronal dopaminérgica en la región del MesV de rata.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar los efectos de la HA en CTPN de MesV *in vitro*.
- Establecer un modelo de inyección intrauterina de embriones de rata mediante el uso de un equipo de ultrasonido.
- Realizar inyecciones intrauterinas de HA y antagonistas de los receptores histaminérgicos en embriones de rata.
- Analizar diversos marcadores de proliferación, diferenciación y muerte celular para evaluar los efectos a corto plazo de la HA sobre la neurogénesis dopaminérgica.

IX. METODOLOGÍA

Animales

En este estudio se usaron ratas de la cepa Wistar en distintos días de gestación. Estas ratas se aparean durante 24 horas para controlar la edad de los embriones y se mantienen en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular en cajas individuales con la temperatura controlada a 23° C y ciclos de luz-obscuridad de 12 horas. 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”.

Cultivo primario de células troncales/progenitoras neurales de mesencéfalo ventral de rata

Para la obtención de células troncales/progenitoras neurales (CTPN) de mesencéfalo ventral (MesV) se utilizan embriones de rata de 12 días de desarrollo. Primero se extrae el embrión del útero, se remueve el saco vitelino y se aísla el tubo neural del resto del embrión. Posteriormente, se identifica la región del mesencéfalo al centro del tubo neural y se separa del resto del tejido neural. Una vez que se aísla el mesencéfalo, éste se abre por su parte dorsal para dejar expuesta el área ventral y se remueve el tejido de la periferia que corresponde a la región dorsal. Las porciones de tejido obtenidas por disección se centrifugan y se disocian mecánicamente. Se cuantifica la cantidad de células obtenidas y se siembran a una densidad de 1 a 1.5 millones de células por caja de cultivo de 10 cm de diámetro, previamente tratadas con poli-L-ornitina (PLO, 15 µg/ml) y fibronectina (Fn, 1 µg/ml) en 7 ml de medio N2 y 10 ng/ml de factor de crecimiento FGF2. Se agrega FGF2 diariamente y se cambia el medio cada 2 días. A estos cultivos se les denomina en pasaje 0 (P0). Una vez que los cultivos de P0 alcanzan una confluencia del 80%, se pasan a cajas de 24 pozos previamente tratadas con PLO (15 µg/ml) y Fn (1 µg/ml) a una densidad de 15,000 células por pozo. A estos cultivos se les denomina pasaje 1 (P1). En esta etapa se dieron tratamientos con histamina (HA) diariamente. Se usaron antagonistas a los receptores histaminérgicos (RH₁, RH₂ y RH₃). Para el receptor H₁, se usó clorfeniramina (1 µM); para el receptor H₂, se usó cimetidina (30 µM) y para el receptor H₃ se usó tioperamida (1 µM). Los cultivos

celulares fueron tratados con estas concentraciones de antagonistas durante las etapas de proliferación y diferenciación diariamente. Los cultivos se mantuvieron durante 4 días en condiciones de proliferación (medio N2+FGFb), cambiando el medio cada 2 días y agregando 10 ng/ml de FGFb y tratamientos con HA y/o antagonistas diariamente. Posterior a este periodo se comenzó la diferenciación, retirando el FGFb y agregando ácido ascórbico (Ác. A) como antioxidante a una concentración de 200 μM en cada cambio de medio. En esta etapa, también se dan tratamientos con HA y/o antagonistas diariamente, durante 6 días.

Imagen de Calcio (Ca^{2+}) Intracelular

Las CTPN en etapa de proliferación se mantienen en suspensión y se incuban con el indicador fluorescente sensible a Ca^{2+} Fura-2 AM (Invitrogen) a una concentración de 5 μM a 37°C por 45 minutos (Molina-Hernandez *et al.*, 2013). Las células incubadas se centrifugaron y se sembraron a una densidad de 1×10^5 células en cajas de cultivo de 3.5 cm con fondo de vidrio (MatTek Corp), previamente tratadas con 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PLO (Sigma) y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fn humana (Invitrogen) en medio N2. Después de 2 horas, las células adheridas se incuban en solución Hank's (137 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 0.3 mM de NaH_2PO_4 , 0.8 mM de MgSO_4 , 1 mM de MgCl_2 , 5 mM de glucosa, 2 mM de glutamina, 10 mM de Tris-HCl con o sin 5 mM de CaCl_2 ; pH 7.4) a 37°C por 10 minutos. Posteriormente, se retira la solución Hank's y se agrega solución nueva con o sin 5 mM de Ca^{2+} . Se excitan las células con luz UV alternando entre 340 y 380 nm y se monitorea la emisión a 510 nm en un microscopio Carl Zeiss. Las imágenes y la proporción de emisión entre ambas longitudes de onda ($R = E_{340}/E_{380}$) se obtienen y se analizan usando el software AxioVision.

Ensayo de BrdU

El análisis de proliferación celular se lleva a cabo por medio del ensayo de incorporación de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU). Este ensayo consiste en incubar con BrdU a una concentración de 10 μM durante 3 horas los cultivos celulares tratados al tercer día de proliferación y después se cambia el medio para retirar el BrdU no incorporado. Al día siguiente se fijan los cultivos con una solución de PFA al 4%. Posteriormente, las células se incuban con HCl 1N por 30 minutos, y se neutraliza lavando con una solución de borato de sodio 0.1 M, pH=8.0. Se bloquea con 0.3 % de Tritón X-100 y 10% de suero normal de cabra (SNCa) en PBS. Las células se incuban con anticuerpo primario anti-BrdU de rata a una dilución 1:100 en solución de bloqueo sin Tritón X-100. Posteriormente se usa anticuerpo

secundario Alexa Fluor 488 anti-IgG de rata hecho en cabra a una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo sin Tritón X-100. Los núcleos se tiñen con Hoechst 33258 a 1 ng/mL.

Inyecciones intrauterinas

Para esta metodología, usamos un sistema de microinyección guiado por una sonda de ultrasonido, la cual es una eficaz herramienta para la manipulación de embriones *in utero*, permitiendo que el embrión continúe su proceso de desarrollo dentro del útero materno, para analizar en días posteriores el efecto de la inyección. Este procedimiento ya se ha detallado previamente por otros grupos de investigación (Pierfelice y Gaiano, ; Slevin *et al.*, 2006; Garcia-Moreno *et al.*, 2010). El protocolo se describe brevemente a continuación.

La sonda que usamos es MHF-1 Ultraview (E-Technologies) que cuenta con una distancia focal de 7 mm y una frecuencia de 35 ó 50 MHz. Previo a la cirugía, es necesario esterilizar el material que se va a usar, por lo que un día antes del procedimiento, colocamos el material necesario en una solución de cloruro de benzalconio. Para comenzar la cirugía, primero se introduce a la rata gestante en una cámara de inducción para anestésicarla por medio de inhalación de sevoflurano. Después, se coloca la rata en una base de manipulación y se conecta a una manguera por la que se le suministra la anestesia inhalatoria durante toda la cirugía por medio de un vaporizador. Se corrobora que la rata se encuentre completamente anestesiada observando una postura relajada y falta de acto reflejo al presionar firmemente la pata y la cola. Ya que la rata se encuentra anestesiada, se rasura el pelo de la región donde se hará la incisión, la piel se limpia con antiséptico para evitar futuras infecciones y se realiza una laparotomía abdominal para exponer los cuernos uterinos. Una vez expuestos, se registra el número de embriones que hay en cada cuerno uterino, para llevar un control de los que se inyecten. Posteriormente, se aísla un embrión a través de una caja Petri con la base de silicón, la cual se llena con PBS estéril a 37°C para cubrir completamente. Se coloca la sonda de ultrasonido por encima del embrión aislado para registrar una imagen en tiempo real a través de la pared uterina; la imagen más nítida se obtiene cuando la sonda se encuentra a 7 mm del embrión. Se localiza la estructura del tubo neural en la pantalla y el sitio donde se quiere realizar la inyección (Fig. 22). Las agujas de microinyección se construyen con capilares de vidrio de borosilicato usando un estirador que calienta el vidrio con un filamento y produce dos mitades simétricas. La aguja se coloca en el sujetador de un inyector automático y la inyección de los fármacos se realiza controlando la velocidad y el volumen de inyección. Al terminar de inyectar los embriones deseados, ambos cuernos uterinos se regresan al interior de la madre a su posición anatómica original y se cierra la cavidad suturando la pared

abdominal y la piel. La rata gestante se mantiene en recuperación el tiempo deseado en el Vivario del Instituto de Fisiología Celular.

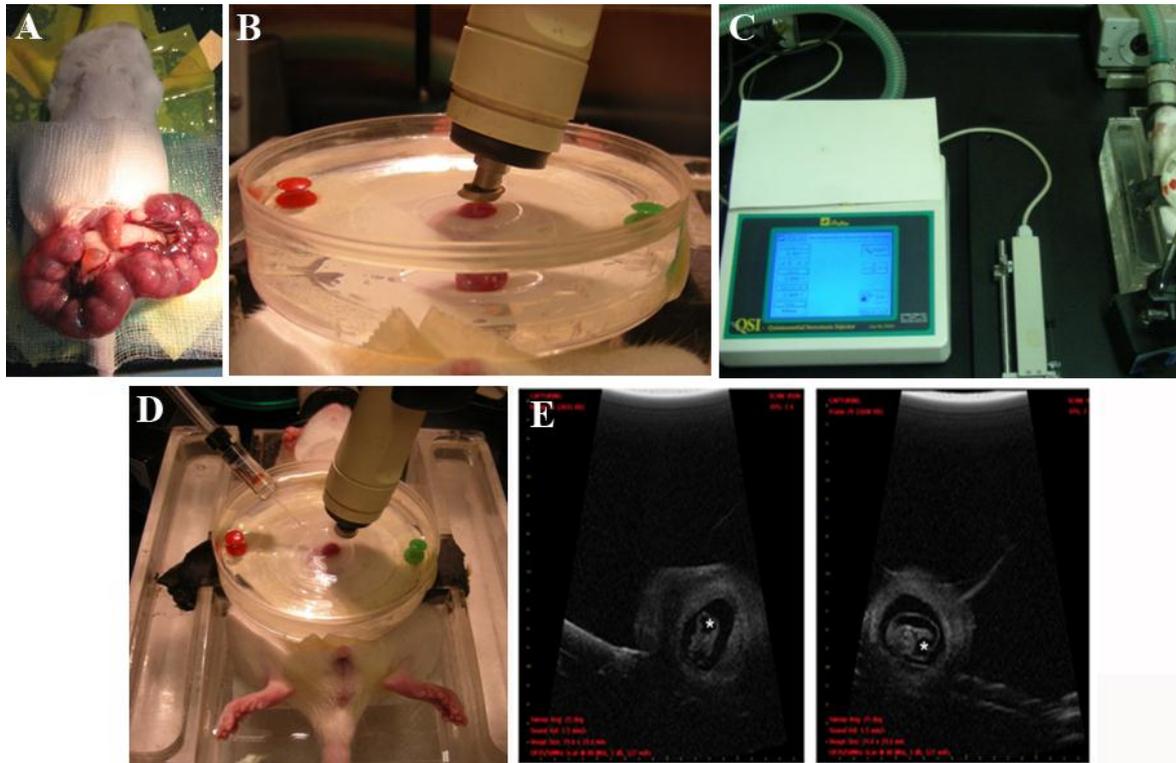


Figura 22. Inyección cerebral intrauterina. A) Laparotomía abdominal y exposición de ambos cuernos uterinos. Cada engrosamiento del útero corresponde a un embrión. B) Sonda de ultrasonido que permite detectar un embrión aislado en una caja Petri con PBS. C) Inyector automático conectado al equipo de ultrasonido, donde podemos controlar la velocidad y el volumen de la inyección. D) Vista global del embrión aislado en la caja Petri, la sonda de ultrasonido y el capilar de borosilicato que está conectado al inyector y a través del cual se realizará la inyección de manera automática. E) Imágenes coronal (izquierda) y sagital (derecha) de los embriones vistos por ultrasonido. Los asteriscos señalan el sitio de inyección.

Fijación y corte de embriones

Una vez que se cumplieron los días de desarrollo embrionario deseados posteriores a la inyección, la rata gestante recibió una sobredosis de anestésico pentobarbital administrado de manera intraperitoneal. Se obtuvieron los embriones y se fijaron por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% durante toda la noche. Para evitar alteraciones en el tejido debidas al proceso de congelación que requiere el método de corte, se mantiene a los embriones una noche en una solución de sacarosa al 30%. Posterior a este tratamiento, el tejido se embebe en Tissue-Tek, se congela a -20°C y se coloca en el criostato para cortarlo. Las secciones obtenidas fueron de $20\ \mu\text{m}$ de grosor, las cuales se montaron directamente en laminillas.

Inmunohistoquímica

Para hacer inmunotinciones en los cortes, primero se da un lavado al tejido en PBS durante 5 min. Posteriormente se permeabiliza la membrana con 0.3 % de Tritón X-100 y se bloquean posibles uniones inespecíficas del anticuerpo con 10% de SNCa en PBS. Posteriormente se incuba con anticuerpo primario en PBS con 10% de SNCa toda la noche a 4° C. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios:

- Anticuerpos primarios:

Anti-nestina	Conejo	Covance	1:500
Anti-TH	Conejo	Pel-Freez	1:1000
Anti-GAD65/67	Conejo	Millipore	1:500
Anti- β III-Tubulina	Ratón	Covance	1:1000
Anti-serotonina	Conejo	Sigma	1:500
Anti-BrdU	Rata	Millipore	1:100

Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario y se lava el tejido 3 veces con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1 % en PBS. Después se incuba el tejido con anticuerpo secundario en PBS con 10% de SNCa durante dos horas. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes:

- Anticuerpos secundarios:

Alexa Fluor 568 anti-IgG de conejo hecho en cabra

Alexa Fluor 568 anti-IgG de ratón hecho en cabra

Alexa Fluor 488 anti-IgG de rata hecho en cabra

Alexa Fluor 488 anti-IgG de ratón hecho en cabra

Todos se usan en una dilución 1:1000

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

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de epifluorescencia Nikon, Eclipse TE2000-U y fotografiadas con una cámara digital Nikon DMX1200 F. Algunas imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Olympus FV1000.

Western-Blot

Para evaluar la presencia de proteínas en el tejido mesencefálico, se realizaron ensayos de Western-blot. Para ello, el tejido se homogenizó en buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas (Roche, Alemania). La proteína total se obtiene por centrifugación a 13,000 rpm a 4°C durante 15 min y se cuantifica por el método de Bradford

(BioRad, Alemania). Las proteínas se separan mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% en buffer con SDS. Posteriormente, se transfieren las proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF; Millipore, USA). Se bloquea la membrana con 5% de leche descremada en buffer TBS-Tween y se incuba toda la noche con anticuerpo primario para detectar la proteína de interés. Al día siguiente, se lava el anticuerpo primario que no se ha unido a la membrana con TBS-Tween y se incuba con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa diluído 1:10 000 (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se lava el anticuerpo secundario con TBS-Tween. Finalmente, las bandas inmunorreactivas se detectan mediante quimioluminiscencia (Amersham) y exposición en una placa de revelado (Kodak). El control de carga fue GAPDH, el cual se detectó en la misma membrana.

Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real

A partir del tejido de mesencéfalo de los embriones inyectados por ultrasonido, se realizó extracción de ARN por el método de Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Una vez obtenido el ARN, se usó 1 µg para retrotranscribirlo y obtener ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc). Para ello, se usan dNTPs, 100 U de Transcriptasa Reversa Superscript III, 50 µM de hexámeros aleatorios y 40 U de Inhibidor de RNAsas recombinante (Invitrogen). Posteriormente, se realizaron las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se utilizaron 500 ng de ADNc, 2 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 20 pmol de cada oligonucleótido, 500 µM de dNTPs (Sigma) y 1.5 mM de MgCl₂. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y el tamaño de los productos de la reacción se determinó mediante la comparación con un estándar de peso molecular después de teñir el gel con bromuro de etidio. Se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Gen	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido
H ₁ R	F: 5'-CTTCTACCTCCCCACTTTgCT-3'	R: 5'-TTCCCTTTCCCCCTCTTg-3'
H ₂ R	F: 5'-TTCTTggACTCCTggTgCTgC-3'	R: 5'-CATgCCCCCTCTggTCCC-3'
H ₃ R	F: 5'-CCAgAACCCCCACCAgATg-3'	R: 5'-CCAgCAgAgCCCAAATg-3'
GAPDH	F: 5'-ATCACCATCTTCCAggAgCg-3'	R: 5'-CCTgCTTCACCACCTTCTTg-3'

Para el caso de la PCR en tiempo real, se usaron 100 ng de ADNc, 2.5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 0.4 mM de cada oligonucleótido y de dNTPs (Sigma), 1.5 mM de MgCl₂ y 5 µM de Syto 9 (Invitrogen). El análisis cuantitativo de la amplificación del ADNc

se llevó a cabo usando el Sistema Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science). La cuantificación de los niveles de expresión se llevó a cabo normalizando los valores de cada reacción con respecto a GAPDH. También se realizaron curvas de disociación por cada reacción para verificar que sólo un producto de PCR fuera amplificado. El método $2^{\text{exp}(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ se utilizó para determinar la expresión relativa de cada gen comparando cada condición experimental con respecto a la condición control. Se usaron los siguientes oligonucleótidos.

Gen	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido
β -III Tubulina	F: 5'-ggCCTTTggACACCTATTCA-3'	R: 5'-TgCAggCAgTCACAATTCTC-3'
TH	F: 5'-CCACTggAggCTgTggTATT-3'	R: 5'-CCgggTCTCTAAgTggTgAA-3'
GAPDH	F: 5'-gTggACCTCATggCCTACAT-3'	R: 5'-ggATggAATTgTgAgggAgA-3'

TUNEL

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

FluoroJade

Fluoro Jade es un derivado aniónico de la fluoresceína. Se usa como marcador fluorescente específico para neuronas que están en proceso de degeneración (Schmued *et al.*, 1997; Schmued y Hopkins, 2000). Antes de comenzar la tinción, se dejan secar las laminillas en una incubadora a 50 °C durante 30 minutos. Una vez que las laminillas están secas, se limpian sumergiéndolas en etanol al 96%. El protocolo de tinción inicia cubriendo las laminillas con etanol al 80% durante 5 minutos. Se desecha el etanol y se cubren las laminillas con etanol al 70% por 2 minutos. Se lava con agua desionizada y se cubre la preparación con permanganato de potasio (KMnO₄) al 0.06% dejándolo actuar durante 10 minutos. Se elimina el KMnO₄ con agua desionizada. Posteriormente, se cubre la preparación con FluoroJade al 0.0004% y se deja actuar durante 25 minutos. A partir de este paso, se mantienen las preparaciones en oscuridad. Se enjuaga la preparación varias veces con agua desionizada para eliminar el FluoroJade remanente. Se dejan secar en el horno a 50 °C por un

par de minutos. Transcurrido este tiempo, las preparaciones se sumergen en xilol por un minuto. Finalmente, se colocan sobre la laminilla 3 o 4 gotas de Permout y se coloca un cubreobjetos para montar la preparación, procurando no formar burbujas. El secado de esta resina toma 4 días.

Conteo celular

El conteo celular de los ensayos de BrdU, inmunocitoquímica, TUNEL, histona H3 fosforilada y Fluoro Jade se realizó a partir de imágenes digitales. La cuantificación celular se realizó usando el software ImageJ considerando el número total de núcleos teñidos con Hoechst (número total de células), en al menos 10 campos aleatorios de un mínimo de 3 experimentos independientes.

Análisis Estadísticos

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

X. RESULTADOS

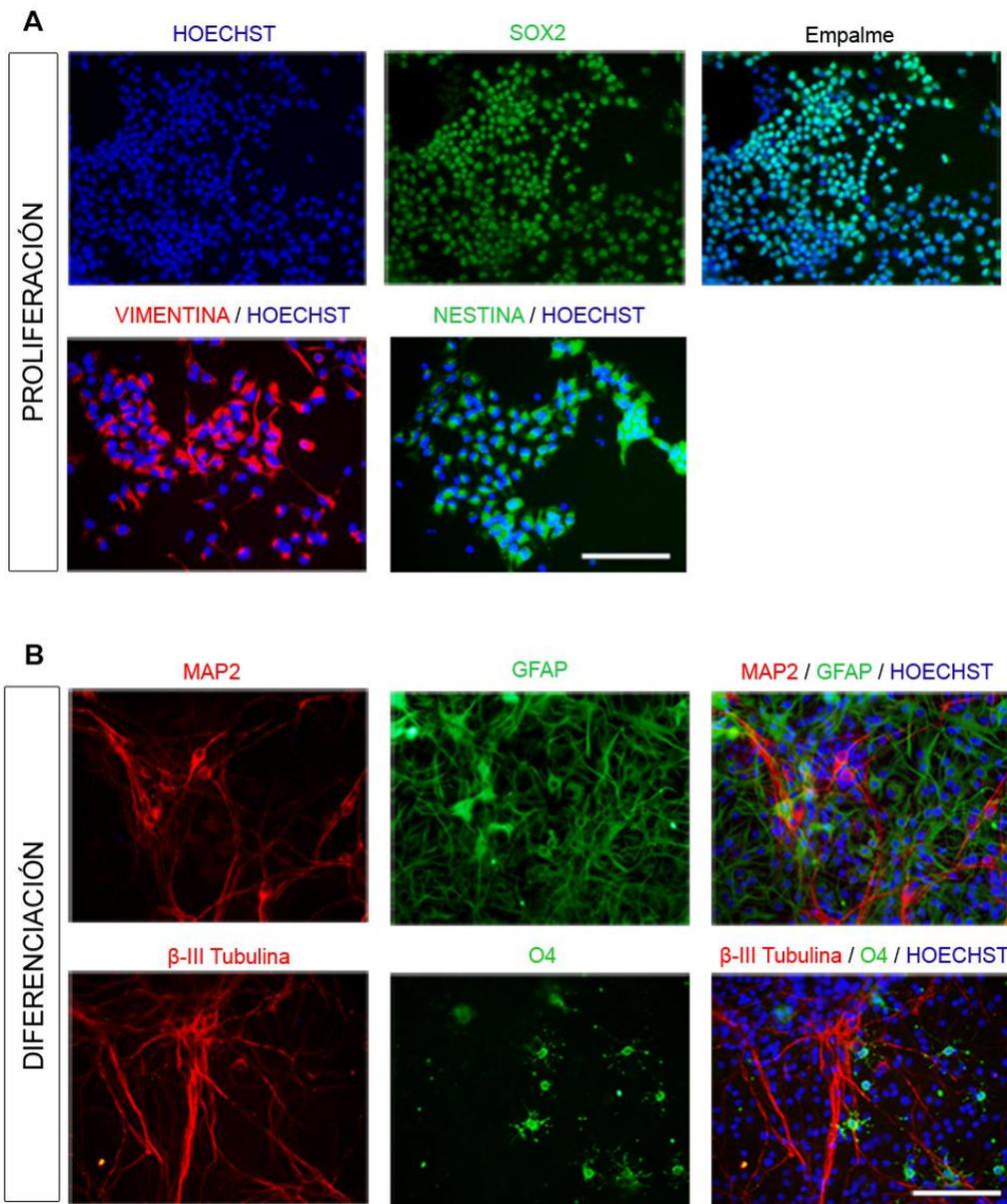
EFFECTOS DE LA HA EN CULTIVOS DE MESV

Con el propósito de hacer un análisis más completo de los experimentos que realicé *in vitro* durante mi maestría, se realizaron ensayos en donde se evaluó el efecto de la HA en cultivos de MesV.

Las CTPN tienen la capacidad de autorrenovarse, así como el potencial de diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Realizamos cultivos de CTPN aisladas de MesV de embriones de 12 días de desarrollo para caracterizar la expresión de marcadores de CTPN, así como su capacidad de diferenciarse hacia neuronas y glía. Los cultivos en proliferación se mantuvieron durante 4 días en presencia de FGF2 y posteriormente se indujo la diferenciación durante 6 días, retirando el FGF2. En la etapa de proliferación, observamos que una gran proporción de células expresa Sox2, Vimentina y Nestina, que son marcadores ampliamente usados para identificar CTPN no diferenciadas (Fig. 23A). Al final de la etapa de diferenciación, al retirar el FGF2 del cultivo, las CTPN se diferencian hacia neuronas positivas para los marcadores MAP2 y β -III Tubulina, astrocitos positivos para la proteína acídica glial fibrilar (GFAP) y oligodendrocitos positivos para el marcador O4 (Fig. 23B). Estos resultados confirman la multipotencialidad de nuestros cultivos.

Fig. 23 Las CTPN de MesV aisladas de embriones de 12 días son multipotenciales. A) Las CTPN de MesV cultivadas en presencia de FGF2 expresan los marcadores de células indiferenciadas Sox2, Vimentina y Nestina en etapa de proliferación. B) Después de 6 días de diferenciación, sin FGF2, las CTPN de MesV son capaces de diferenciarse hacia los tres linajes del sistema nervioso central (SNC): neuronas (β -III Tubulina + y MAP2+), astrocitos (GFAP+) y oligodendrocitos (O4+), confirmando la multipotencialidad de estos cultivos. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. Escala: 100 μ m.

Figura en la siguiente página



En trabajos previos se ha reportado que los RNAm para los receptores histaminérgicos se encuentran presentes en embriones de roedores a partir del estadio E14, pero no se tiene información acerca de la presencia de estos receptores en estadios embrionarios previos. Realizamos ensayos de Western Blot y observamos que el RH₁ y el RH₂ se encuentran presentes en CTPN de MesV de embriones de 12 días de desarrollo tanto en etapa de proliferación como en etapa de diferenciación (Fig. 24).

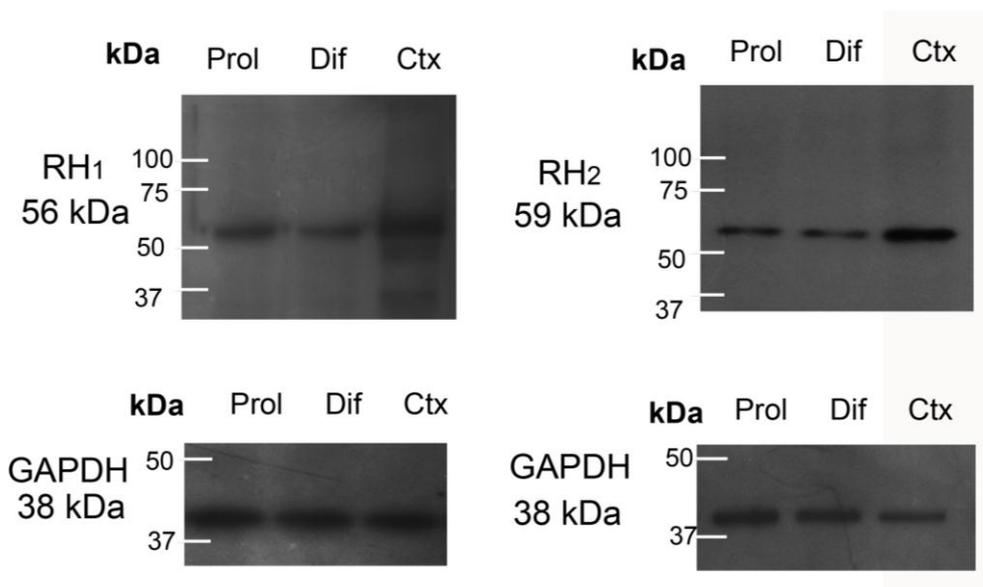
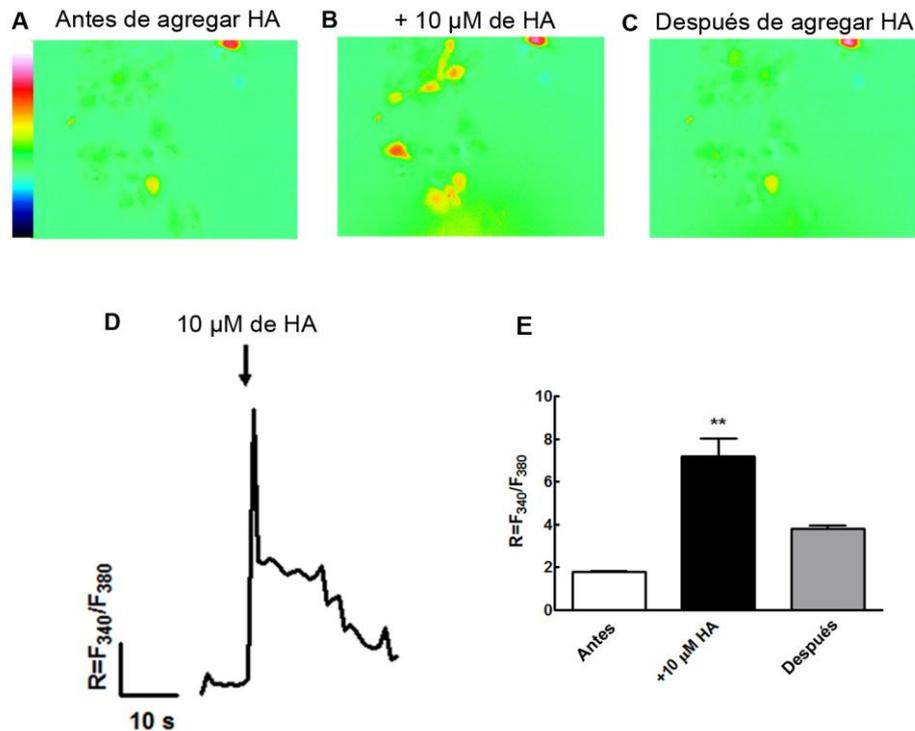


Fig. 24 Los receptores histaminérgicos H₁ y H₂ están presentes en cultivos de CTPN de MesV. Ensayos de Western Blot para detectar RH₁ y RH₂ en cultivos en proliferación (Prol) y diferenciación (Dif) de CTPN de MesV E12. Como control positivo se usó corteza cerebral de rata adulta (Ctx). Se usaron 30 µg de proteína y las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia. GAPDH se usó como control. Se indican los pesos moleculares de cada receptor (kDa).

El calcio (Ca²⁺) es un importante regulador de diversas funciones neurales como la proliferación o diferenciación neuronal. Debido a que la activación del RH₁ lleva a la acumulación de Ca²⁺ como segundo mensajero, evaluamos si las CTPN de MesV no diferenciadas respondían a la estimulación con HA, elevando la concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i). Incubamos CTPN de MesV no diferenciadas con el sensor de calcio Fura-2, el cual es un compuesto fluorescente que permite estimar la concentración intracelular de Ca²⁺ al medir el cociente (R, por *ratio*) de la fluorescencia al excitar las células a 340 nm y 380 nm (R = F340/F380). Observamos que al estimular las CTNP con 10 µM de HA, la [Ca²⁺]_i incrementa 3 veces en comparación con los niveles basales observados en la condición control (Fig. 25). Esto nos indica que las CTPN de MesV son capaces de responder a un estímulo con HA a través de la activación del RH₁.

Fig. 25 La estimulación con HA incrementa el Ca²⁺ intracelular en CTPN de MesV no diferenciadas. Imágenes de cocientes de fluorescencia en CTPN de MesV en donde se muestran variaciones en los niveles de [Ca²⁺]_i antes (A), durante (B) y después de la estimulación con 10 µM de HA (C). D) Promedio del cociente (R) entre los valores de fluorescencia que resultan de la excitación del Fura-2 entre 340 nm y 380 nm (R = F340/F380). (E) La estimulación con 10 µM de HA incrementa 3 veces la [Ca²⁺]_i en CTPN de MesV no diferenciadas. ** p < 0.01.

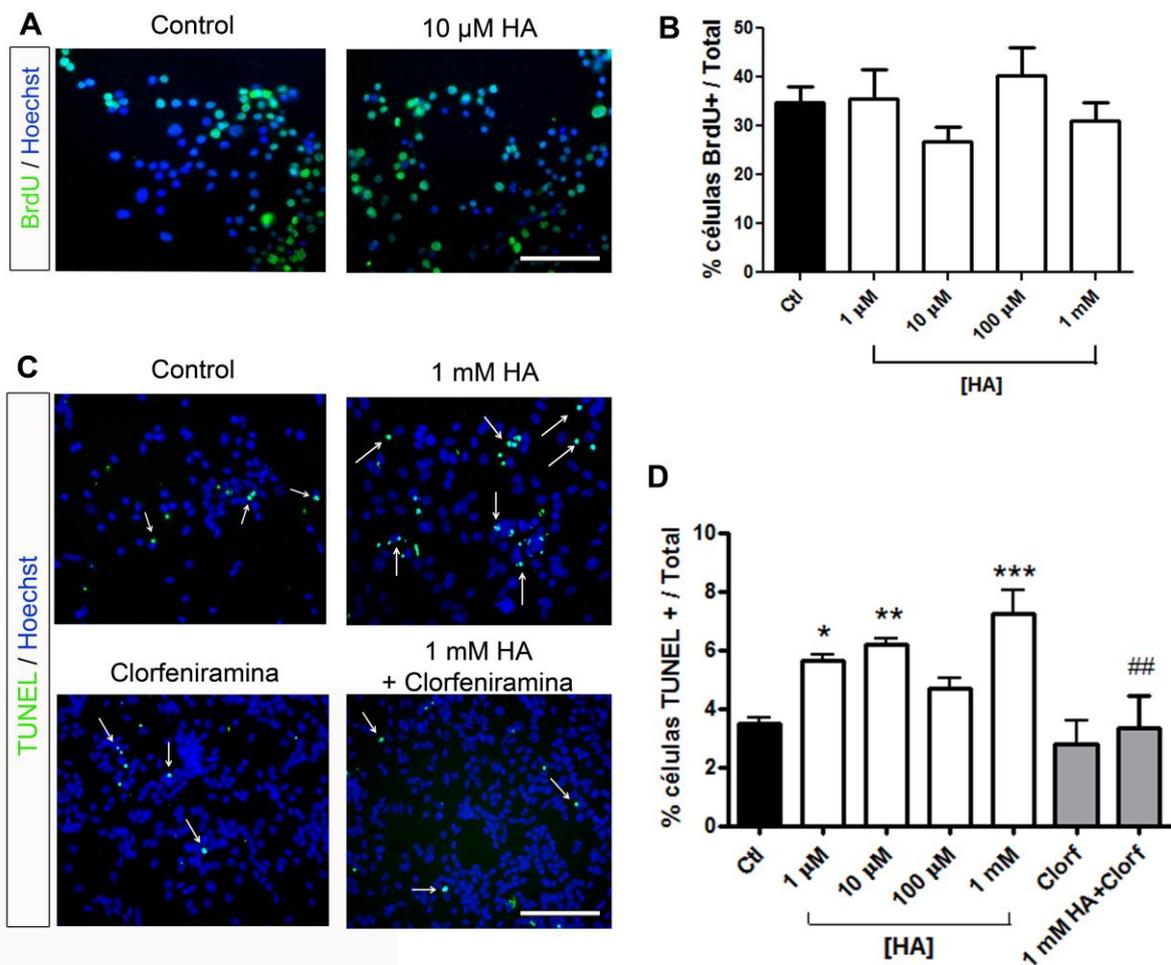
Figura en la siguiente página



Para evaluar el efecto de la HA en la proliferación y muerte de CTPN de MesV, tratamos las células no diferenciadas con concentraciones crecientes de HA (de 1 μM a 1 mM) en presencia de FGF2 por 4 días. Realizamos ensayos de incorporación de BrdU para analizar la proliferación y ensayos de TUNEL para analizar la muerte apoptótica. Calculamos el porcentaje de células positivas para cada marcador en condiciones control y tratadas con HA. Observamos que la HA no afectó la incorporación de BrdU (Fig. 26 A y B). En contraste, 1 mM de HA incrementó de manera significativa la proporción de células positivas para TUNEL y este efecto se revirtió al co-incubar las células con el antagonista al RH_1 , clorfeniramina (Fig. 26 C y D).

Fig. 26 La HA no altera la incorporación de BrdU pero incrementa la muerte celular apoptótica de CTPN no diferenciadas mediante la activación del RH_1 . El efecto de la HA en la proliferación y muerte celular apoptótica fue evaluado por ensayos de incorporación de BrdU y TUNEL, respectivamente. **A)** Microfotografías que muestran inmunotinciones para detectar células positivas a BrdU. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. **B)** Porcentaje de células positivas a BrdU. **C)** Microfotografías que muestran células positivas para TUNEL (flechas blancas) y los núcleos teñidos con Hoechst en condiciones control, tratadas con HA y con el antagonista al RH_1 , clorfeniramina. **D)** Porcentaje de células positivas para TUNEL. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ## $p < 0.01$ en comparación con 1 mM de HA. Escala: 100 μm.

Figura en la siguiente página



Para analizar de qué manera afecta la HA la diferenciación dopaminérgica de CTPN de MesV, se trataron los cultivos con concentraciones crecientes de HA (de 1 μ M a 1 mM) durante 6 días en ausencia de FGF2. Evaluamos mediante inmunocitoquímica la expresión del marcador neuronal β -III Tubulina y de la enzima limitante en la síntesis de DA, tirosina hidroxilasa (TH) como marcador para neuronas dopaminérgicas (NDA). Observamos que la concentración de 1 mM de HA redujo significativamente la proporción de NDA en comparación con la condición control (Fig. 27 A y B). Posteriormente, analizamos mediante el uso de antagonistas si el RH₁ estaba involucrado en la diferenciación dopaminérgica. Para ello, se dieron tratamientos diarios con 1 μ M de clorfeniramina (antagonista del receptor H₁) sólo o bien, en combinación con 1 mM de HA. Observamos una recuperación significativa en la proporción de NDA al tratar los cultivos con HA y el antagonista al RH₁ en comparación con la condición control (Fig. 27 C y D).

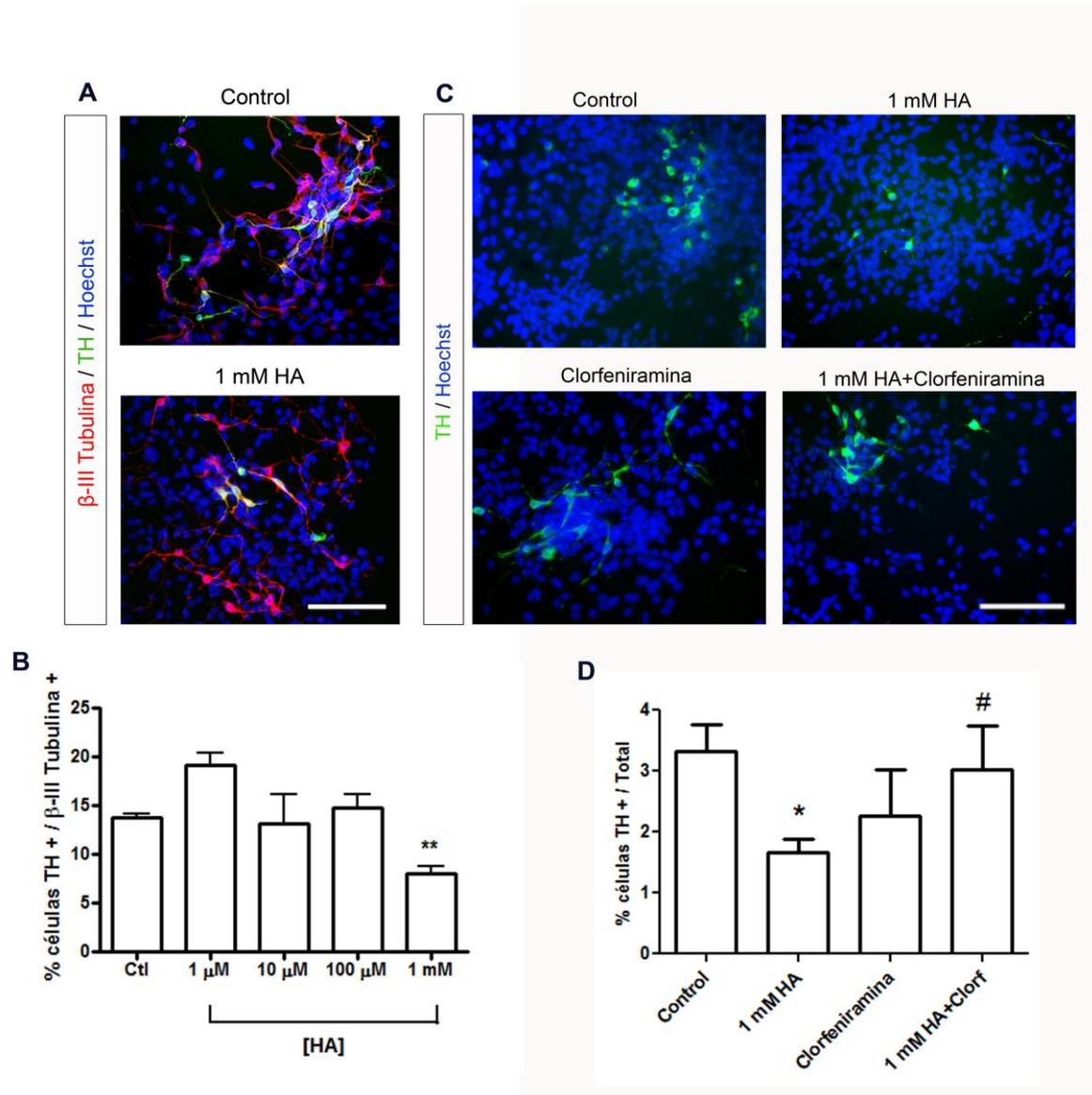


Fig. 27 La HA disminuye la diferenciación dopaminérgica de CTPN de MesV. Después de la etapa de proliferación, las células se dejan en condiciones de diferenciación durante 6 días (medio N2 sin FGF) y se tratan diariamente con diferentes concentraciones de HA (de 1 μ M a 1 mM). Las CTPN se analizaron mediante inmunocitoquímicas. **A)** doble inmunocitoquímica para detectar el marcador neuronal β -III Tubulina y el marcador de neuronas dopaminérgicas tirosina hidroxilasa (TH) en condiciones control y tratada con 1 mM de HA. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Escala: 100 μ m. **B)** Cuantificación de células positivas para TH con respecto al total de neuronas positivas para β -III Tubulina. ** $p < 0.01$. **C)** Microfotografías mostrando el marcador de células dopaminérgicas, TH, en condiciones control, tratadas con 1 mM de HA y/o el antagonista del receptor H_1 , clorfeniramina. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Escala: 100 μ m. **D)** Cuantificación del porcentaje de células positivas para TH con respecto al total de células. * $p < 0.05$ con respecto al control; ## $p < 0.01$ comparado con 1 mM de HA.

SOBREVIVENCIA DE LOS EMBRIONES A LA INYECCIÓN

Para estudiar la participación de la HA en la neurogénesis durante el desarrollo del SNC *in vivo*, realizamos inyecciones intrauterinas mediante el uso de un sistema de ultrasonido Ultraview MHF-1. A pesar de que esta técnica resulta muy útil para la manipulación de embriones *intra utero* y darle seguimiento a poblaciones celulares específicas durante el desarrollo embrionario, sin duda es una técnica muy invasiva y la sobrevivencia de los embriones no está garantizada. En este trabajo se llevó un registro de la sobrevivencia de los embriones inyectados y se observó que aproximadamente el 71% de los embriones sobreviven a la inyección y continúan desarrollándose mientras que el 29% muere (Fig. 28), por lo que consideramos que es un buen porcentaje de sobrevivencia y esta técnica nos resulta de gran utilidad para llevar a cabo los objetivos de este proyecto. Observamos que al inyectar los embriones en E12 y analizarlos en E14, no se detectan cambios morfológicos aparentes entre los embriones control y los que fueron inyectados con vehículo o HA, por lo que la inyección no afecta el desarrollo normal del embrión hasta el estadio E14 (Fig. 28).

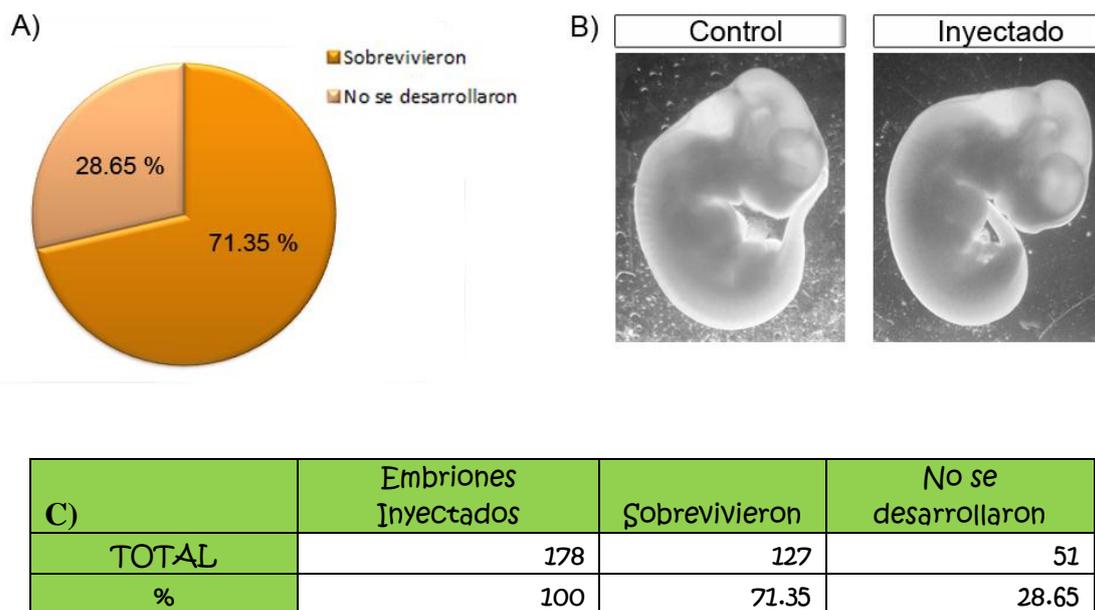


Fig. 28 Sobrevivencia de los embriones inyectados. A) Diagrama donde se muestran los porcentajes de embriones que sobreviven a la inyección y que mueren. B) Vista sagital de embriones de 14 días de desarrollo. De lado izquierdo se muestra un embrión control (no inyectado) y de lado derecho un embrión que fue inyectado a los 12 días de desarrollo. C) La tabla muestra el número total de embriones que fue inyectado, así como el número de embriones que sobrevivieron a la inyección y los que no se desarrollaron.

LA ADMINISTRACIÓN INTRAUTERINA DE HISTAMINA NO MODIFICA LA MORFOLOGÍA DEL MESENCÉFALO

Las inyecciones intrauterinas inicialmente se realizaron en embriones de rata de 12 días de desarrollo; se eligió esta edad debido a que precede el pico de neurogénesis en la región del mesencéfalo, el cual coincide de manera espacial y temporal con el incremento en los niveles de HA al día gestacional 14. Se inyectó un volumen total de 2 μ l que consistió en una solución de HA junto con un trazador celular (Cell Tracker). Las condiciones control consistieron en la inyección de vehículo (agua inyectable). La región de inyección fue el lumen ventricular, con el propósito de que la solución difundiera a lo largo del tubo neural. El número de embriones inyectados por rata varió de acuerdo al experimento, al número total de embriones, al estado del embrión y de salud de la rata. Inyectamos 50 μ g de HA en embriones E12 y analizamos el efecto de la inyección en E14. Para evaluar si la inyección con HA alcanzó la región del MesV, detectamos la presencia del trazador celular fluorescente Cell Tracker. Observamos que el volumen inyectado fue suficiente para cubrir homogéneamente todo el neuroepitelio del mesencéfalo (Fig. 29A). Realizamos tinciones con hematoxilina-eosina en secciones sagitales (Fig. 29B) y coronales (Fig. 29C) del MesV y no observamos diferencias en los patrones de tinción entre los embriones inyectados con HA y los embriones inyectados con vehículo. Para evaluar una posible alteración en la morfología del MesV, región en donde se originan las NDA, medimos el grosor del neuroepitelio del MesV. No encontramos diferencias significativas en el promedio del grosor del MesV entre los embriones inyectados con vehículo y con HA (Fig. 29D).

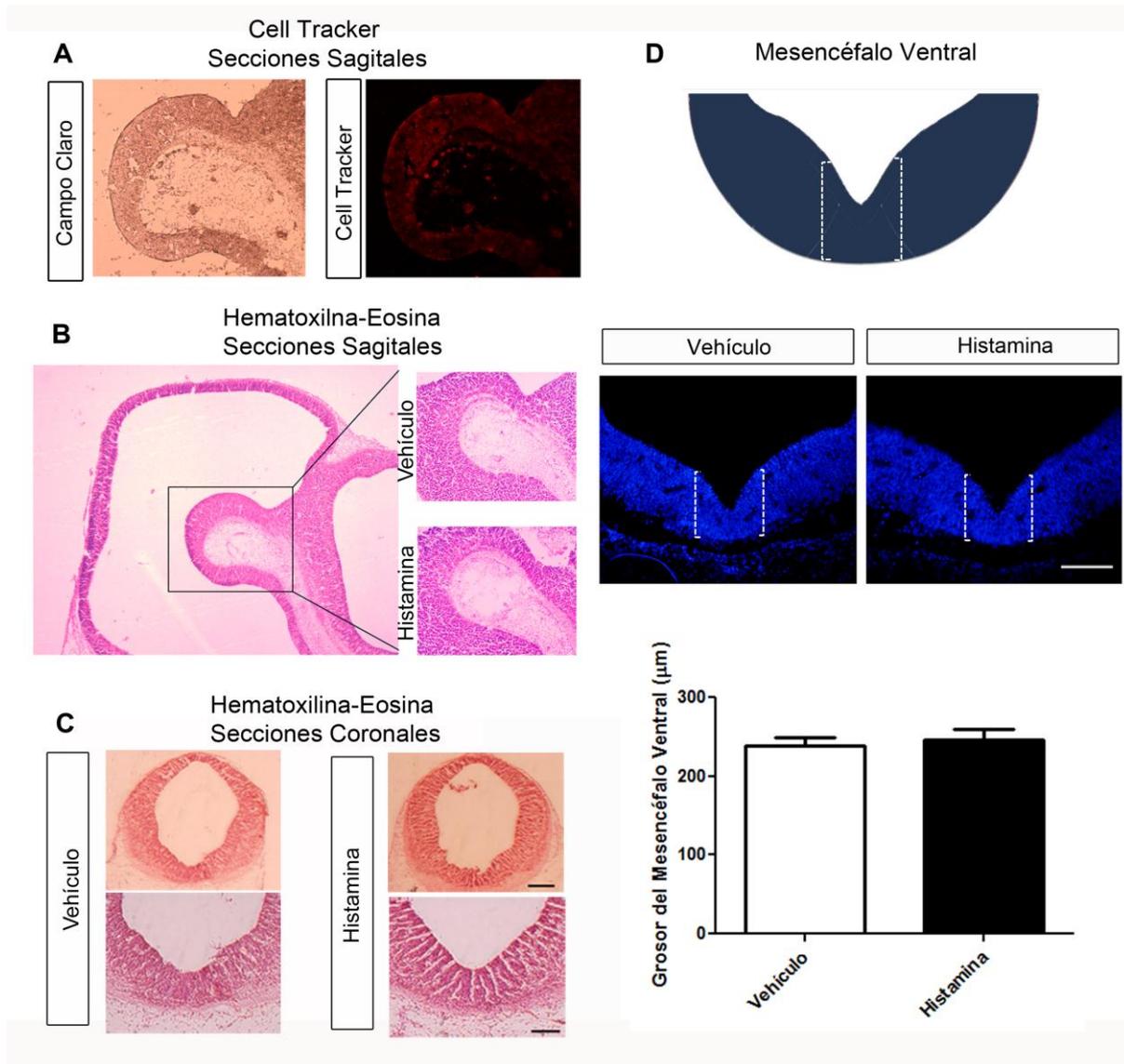


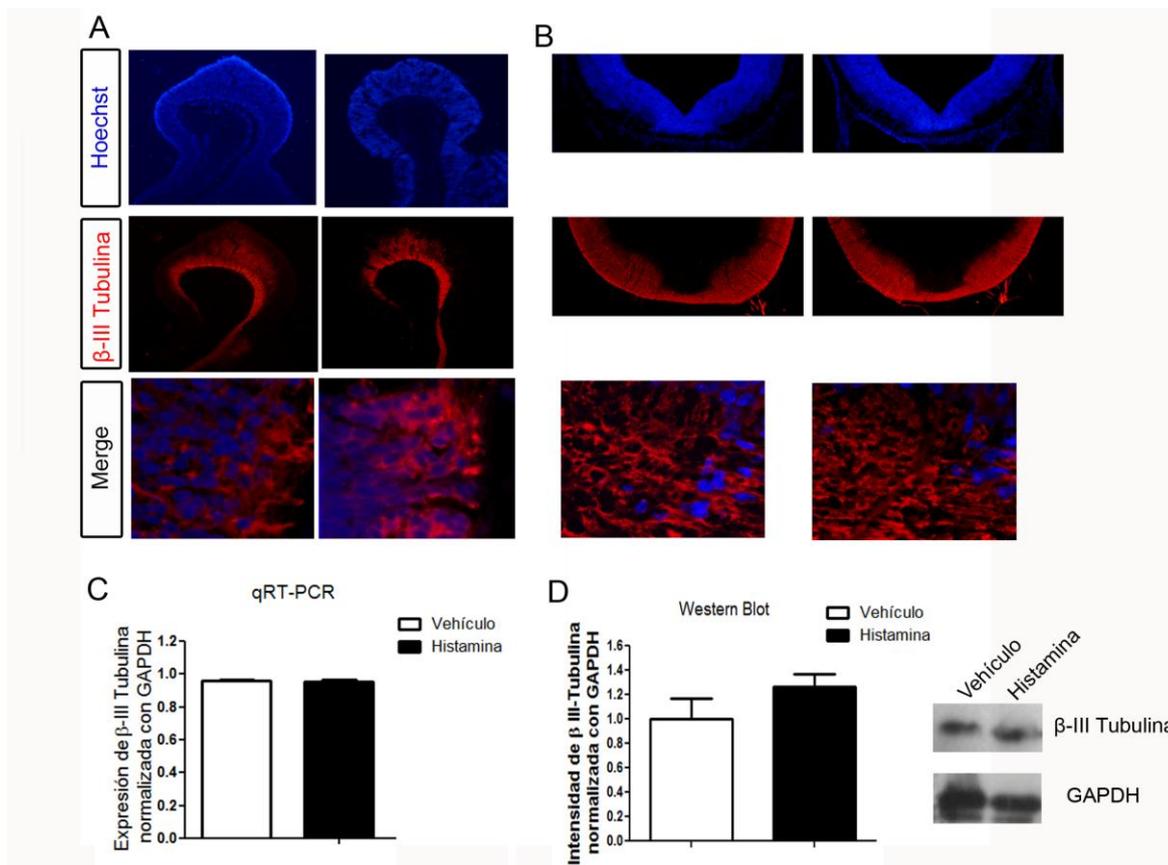
Fig. 29 La inyección intrauterina alcanza al mesencéfalo ventral y no altera su morfología. **A)** Vista sagital del MesV de un embrión E14 inyectado en E12. De lado izquierdo se muestra el tejido en campo claro y de lado derecho se muestra la fluorescencia en rojo del trazador celular, lo cual indica que la inyección abarcó toda la región del MesV. **B)** Tinciones con hematoxilina-eosina. Vista sagital del tubo neural de embriones E14. El recuadro indica la zona que corresponde al MesV y de lado derecho se muestra la amplificación de esta región en embriones que fueron inyectados con vehículo y con histamina. **C)** Cortes coronales del MesV (paneles superiores) y amplificación de la región m7 (paneles inferiores) donde se originan las neuronas dopaminérgicas. Escala: 500 μm . **D)** Grosor del neuroepitelio del MesV. En la parte superior se muestra un esquema donde se delimita con corchetes el área que corresponde a la región m7 en el MesV. En la parte inferior se muestran secciones coronales de tejido mesencefálico con los núcleos teñidos con Hoechst. Los corchetes marcan la región del neuroepitelio de la cual se midió el grosor. La gráfica representa el promedio del grosor de la región m7 del MesV en embriones inyectados con vehículo comparados con embriones inyectados con HA. Escala: 150 μm . Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con barras de error estándar.

LA HISTAMINA NO ALTERA LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN EL MESV

Una vez que establecimos las condiciones de administración de HA, evaluamos el efecto de la inyección de HA en E12 sobre la diferenciación neuronal. Para ello, se analizaron los embriones 2 días después de la inyección, es decir, en E14, que es el estadio en el cual se da la mayor producción de neuronas durante el desarrollo mesencefálico. Realizamos inmunohistoquímicas en cortes sagitales y coronales del MesV para detectar el marcador β -III Tubulina, que es una proteína de microtúbulos que permite identificar neuronas en etapa temprana de diferenciación. El patrón de expresión de este marcador es muy específico y se restringe a la zona del manto del neuroepitelio. No observamos diferencias en los patrones de tinción de este marcador entre los embriones inyectados con vehículo y los que fueron inyectados con HA (Fig. 30 A y B). Para analizar de manera cuantitativa la diferenciación neuronal, realizamos ensayos de retrotranscripción seguidos de amplificación por PCR en tiempo real (Fig. 30C), o bien de Western Blot (Fig. 30D), para evaluar los niveles de ARNm, así como la proteína presente en la región del MesV, respectivamente. Estos ensayos corroboraron que no hay diferencias en la generación de neuronas entre los embriones inyectados con vehículo con respecto a los que fueron inyectados con HA. Entonces, la administración de HA no ejerce un efecto sobre la diferenciación neuronal en la región del MesV *in vivo*.

Fig. 30 La histamina no altera la generación de neuronas en el MesV. Inmunohistoquímicas en cortes sagitales (A) y coronales (B) del MesV para detectar el marcador neuronal β -III tubulina (rojo). Se muestran cortes de embriones que fueron inyectados con vehículo comparados con los que fueron inyectados con HA. En la parte inferior se muestran los empalmes amplificados. Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). C) RT-PCR en tiempo real para detectar el RNAm de β -III tubulina. D) Western Blot para detectar la proteína β -III tubulina. La gráfica representa la intensidad de las bandas obtenidas. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con barras de error estándar.

Figura en la siguiente página



LA ADMINISTRACIÓN DE HISTAMINA AFECTA LA DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA

Debido a que la región de MesV es de gran importancia para la generación de neuronas dopaminérgicas que residen en un organismo adulto, así como la causa de patologías como la Enfermedad de Parkinson, es interesante analizar factores que pudieran estar regulando la generación de esta población neuronal durante el desarrollo embrionario. Para ello, realizamos inmunohistoquímicas en embriones E14 que fueron inyectados en E12. Para detectar las neuronas dopaminérgicas, utilizamos como marcador TH, que es la enzima limitante en el proceso de síntesis de DA. En las inmunotinciones corroboramos que la expresión de esta proteína se restringe a la región m7, que corresponde a la parte más ventral del mesencéfalo. Observamos que en los embriones inyectados con HA hay una clara disminución en la marca de TH en comparación con los niveles de expresión encontrados en embriones inyectados con vehículo (Fig. 31). Este efecto lo pudimos corroborar tanto en cortes sagitales (Fig. 31A) como en cortes coronales (Fig. 31B) del MesV. Para validar los datos encontrados mediante inmunohistoquímica hicimos ensayos cuantitativos. Realizamos RT-PCR en tiempo real, en donde observamos una reducción significativa en los niveles del mensajero obtenido de TH, disminuyendo en un 60% con respecto al control (Fig. 31C). También realizamos ensayos de

Western Blot para detectar la proteína de dos marcadores característicos de NDA maduras: la enzima TH y el factor transcripcional Pitx3. Observamos que los niveles de ambas proteínas disminuyen en los embriones inyectados con HA con respecto a los embriones que fueron inyectados con vehículo (Fig. 31D). En conjunto, estos datos indican que la HA interfiere con la generación de neuronas dopaminérgicas, sin modificar la proporción total de neuronas en el MesV, ya que el marcador neuronal β -III Tubulina no se vio afectado por la inyección con HA (Fig. 30).

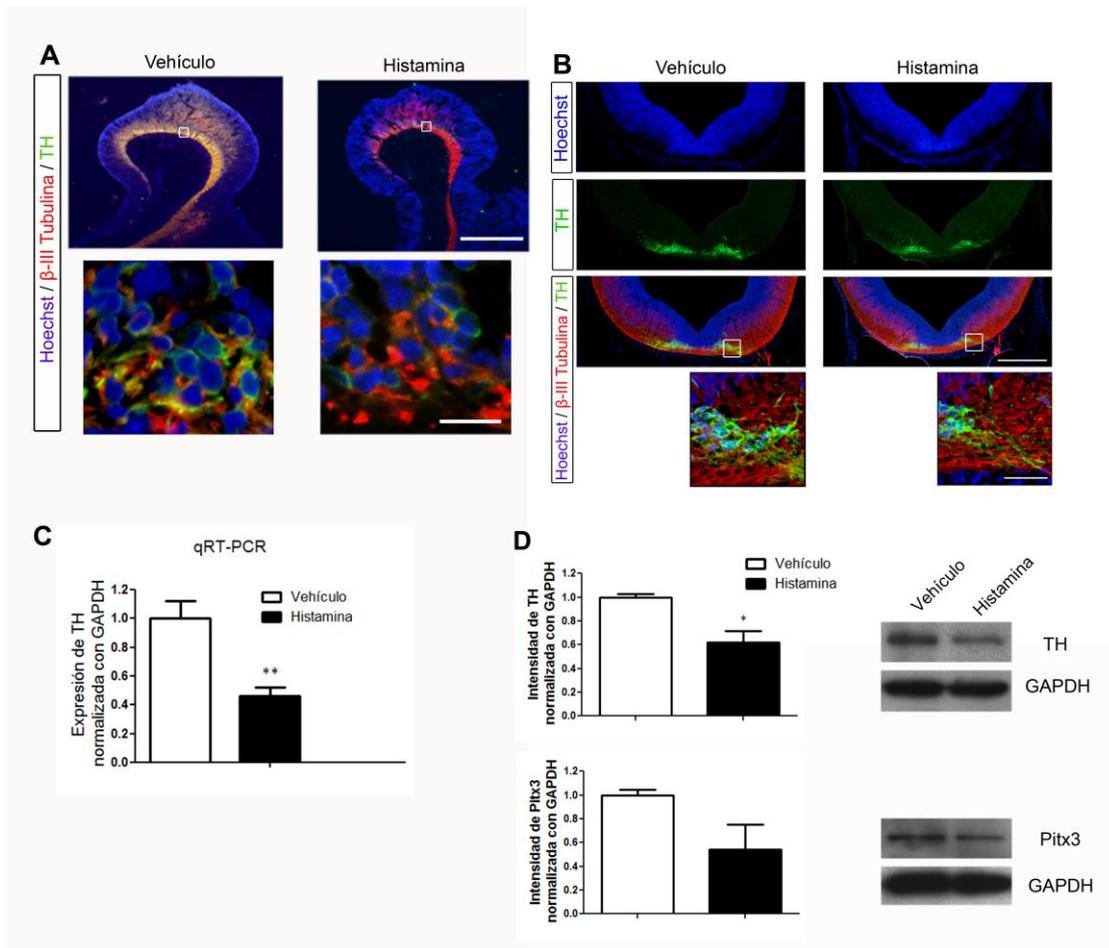


Fig. 31 La histamina afecta la generación de neuronas dopaminérgicas. Detección inmunohistoquímica de neuronas dopaminérgicas (TH +, verde) en cortes sagitales (**A**) y coronales (**B**) del MesV. Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). Escala: 150 μ m. **C**) RT-PCR cuantitativa para detectar los transcritos de TH en tejido de mesencéfalo proveniente de embriones control e inyectados con HA. **D**) Ensayo de Western Blot para detectar a nivel proteico de la enzima TH así como el marcador de neuronas dopaminérgicas maduras, Pitx3 en tejido de mesencéfalo proveniente de embriones control e inyectados con HA. Las gráficas representan la intensidad de las bandas obtenidas. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con barras de error estándar, $p < 0.05$.

LA ADMINISTRACIÓN DE HISTAMINA NO ALTERA LA GENERACIÓN DE NEURONAS GABAÉRGICAS NI SEROTONINÉRGICAS

Durante la formación del MesV, la neurogénesis dopaminérgica ocurre de manera simultánea con la neurogénesis GABAérgica, ésta última en las regiones dorsal y ventral del mesencéfalo. Con el objetivo de evaluar si el efecto de la administración de HA era específico para las NDA, decidimos evaluar si las neuronas GABAérgicas se estaban viendo afectadas por la inyección de HA. Estas neuronas expresan GAD 65 y/o GAD67, que son enzimas encargadas de la síntesis de GABA a partir de la descarboxilación de glutamato. Al evaluar este marcador mediante inmunohistoquímica, no observamos diferencias en los patrones de expresión en el MesV posterior a la administración de HA (Fig. 32A). El patrón de expresión de GAD 65/67 se restringe a las regiones dorso-laterales del mesencéfalo, m3 a m5, a diferencia de la localización de las NDA que se encuentran en la parte más ventral del mesencéfalo, en la región denominada m7. Para corroborar que no hubiera cambios, realizamos ensayos de Western Blot para detectar los niveles proteicos de la enzima GAD65/67. En estos experimentos tampoco observamos diferencias entre los embriones inyectados vehículo y con HA (Fig. 32B), sugiriendo un efecto específico de la HA sobre el fenotipo dopaminérgico.

Adicionalmente, quisimos evaluar si algún otro fenotipo neuronal presente en la región ventral del encéfalo, aunque en posición más caudal al mesencéfalo estaba siendo modificado a consecuencia de la inyección de HA. Para ello, realizamos inmunohistoquímicas para detectar neuronas serotoninérgicas. La distribución de estas neuronas se da en la parte posterior del mesencéfalo, cerca del romboencéfalo, región donde se origina la mayor parte de las neuronas que producen serotonina. El patrón de tinción de serotonina no se vio afectado debido a la inyección con HA (Fig. 32C). Nuevamente, estos resultados sugieren un efecto específico de la HA sobre el fenotipo dopaminérgico.

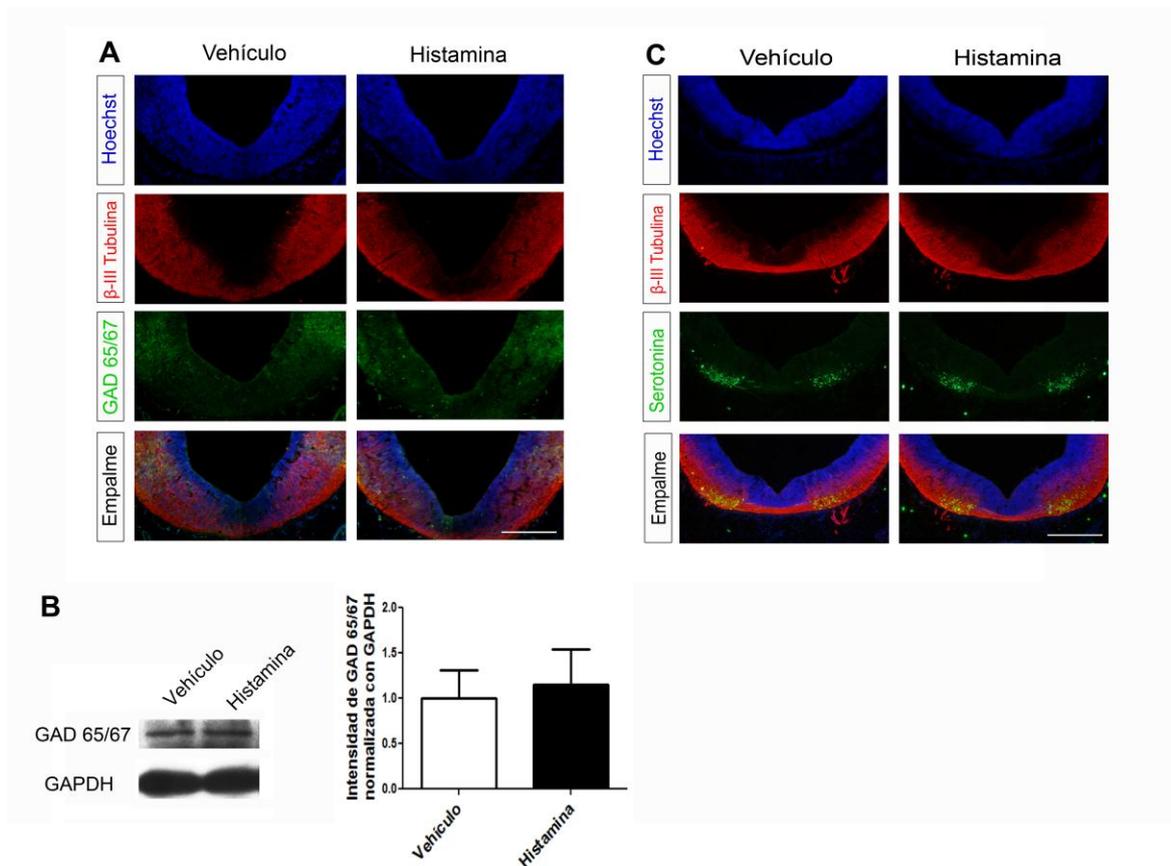


Fig. 32 La histamina no altera la generación de neuronas GABAérgicas ni serotoninérgicas en el MesV. A) Inmunohistoquímicas en cortes coronales del MesV para detectar el marcador GAD65/67, característico de neuronas GABAérgicas (verde). Se muestra la colocalización con el marcador neuronal β -III tubulina (rojo). Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). **B)** Western Blot para detectar la proteína GAD 65/67 a partir del mesencéfalo de embriones que fueron inyectados con vehículo o con HA. La gráfica muestra la intensidad de las bandas obtenidas. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con barras de error estándar. **C)** Inmunohistoquímicas en cortes coronales del MesV para detectar neuronas serotoninérgicas (verde). Se muestra la colocalización con el marcador neuronal β -III tubulina (rojo). Los núcleos se están teñidos en azul con Hoechst. Escalas: 150 μ m.

LA HISTAMINA DISMINUYE LA PROLIFERACIÓN SIN ALTERAR LA MUERTE CELULAR

Debido a la disminución observada en la expresión de TH en embriones inyectados con HA, quisimos analizar las causas de este decremento, para lo cual realizamos ensayos de proliferación y de muerte celular. Para evaluar la proliferación celular, realizamos inmunotinciones para detectar la forma fosforilada de la histona H3 (pHH3), característica de células que se encuentra en fase M del ciclo celular. El patrón de expresión de este marcador en el MesV se localiza en la periferia de la zona ventricular del neuroepitelio. Cuantificamos el total de células positivas para este marcador en cortes coronales del MesV y observamos que la administración de HA produce una disminución significativa en el número de células positivas para pHH3 (Fig. 33A).

Para evaluar la muerte celular, realizamos ensayos de TUNEL y FluoroJade. El primer ensayo es específico para analizar muerte celular apoptótica, mientras que el segundo es indistinto para cualquier tipo de muerte celular. En ambos casos, cuantificamos el número de células positivas para ambos marcadores y no encontramos diferencias significativas causadas por la administración de HA en ninguna condición (Fig. 33 B y C).

En conjunto, estos datos indican que la HA está afectando la proliferación celular en el MesV sin afectar la muerte celular.

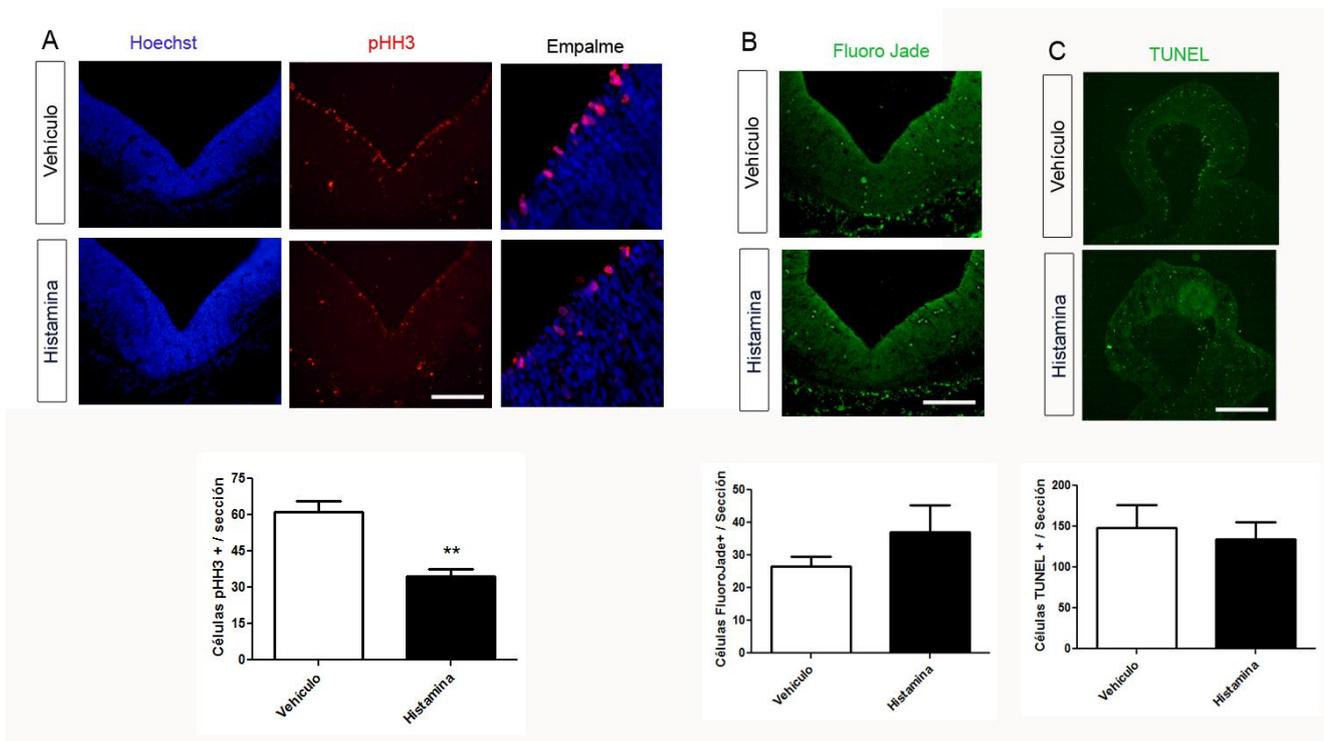


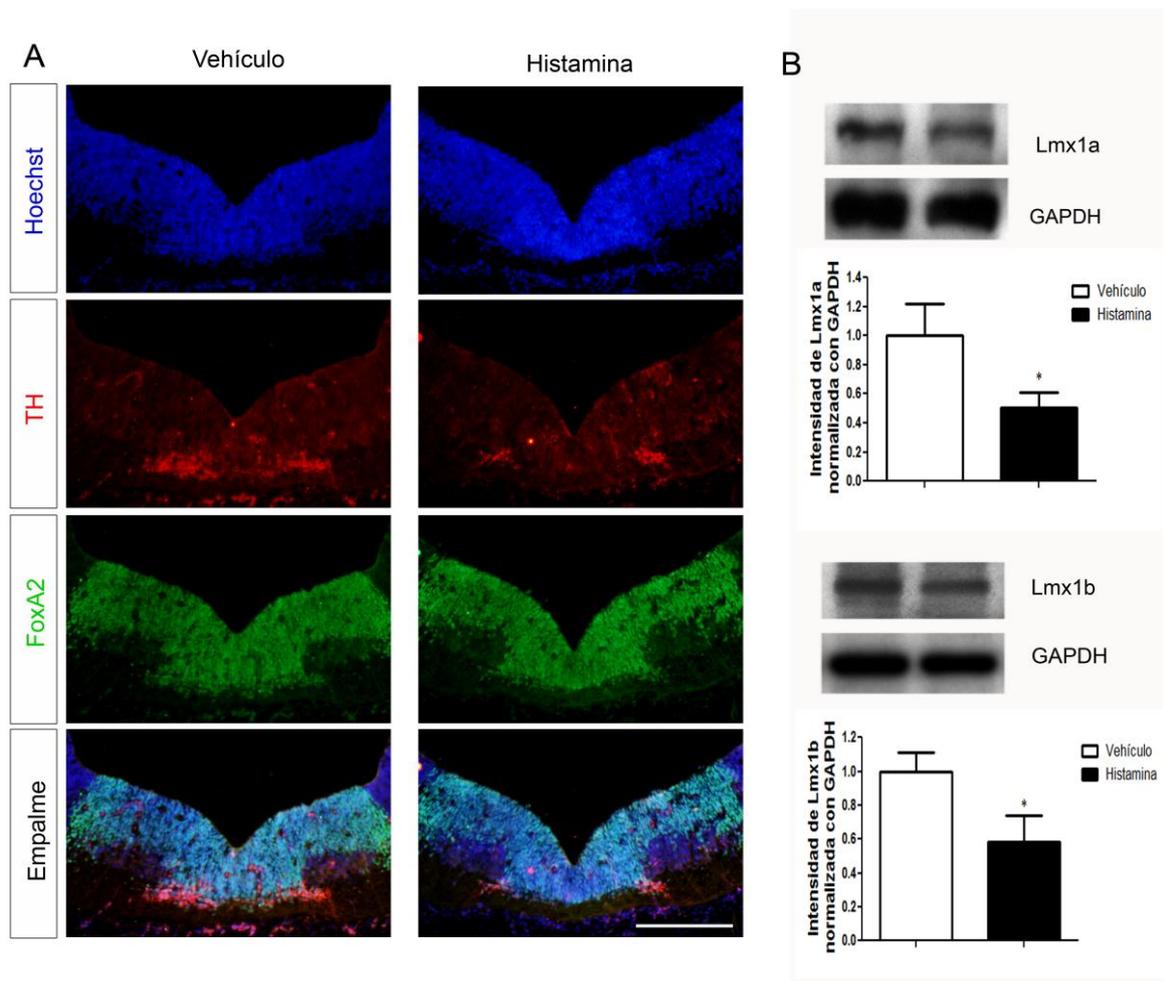
Fig. 33 La histamina disminuye la proliferación sin afectar la muerte celular. **A)** Cortes coronales del MesV de embriones inyectados con vehículo o con HA. Inmunohistoquímicas para detectar el marcador pHH3, característico de células en fase M del ciclo celular (rojo). Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). La gráfica en la parte inferior muestra la cuantificación de células positivas para pHH3 en la región del MesV para ambas condiciones. **B)** Tinción de FluoroJade en cortes coronales del MesV para detectar células muertas (verde). La gráfica en la parte inferior muestra la cuantificación de células positivas para FluoroJade en la región del MesV. **C)** Ensayos de TUNEL en cortes coronales del MesV para detectar células apoptóticas (verde). La gráfica en la parte inferior muestra la cuantificación de células positivas para pHH3 en la región del MesV. Las tres gráficas representan el promedio de 3 experimentos independientes con barras de error estándar, $p < 0.01$. Escalas: 150 μ m.

LA HISTAMINA ACTÚA SOBRE PRECURSORES DOPAMINÉRGICOS

Debido a la disminución que observamos en la proliferación celular al administrar HA, pensamos que ésta podría estar actuando en los precursores neuronales dopaminérgicos que aún no se diferencian terminalmente hacia NDA y esto verse reflejado en la disminución de NDA maduras. Para evaluar esto, realizamos inmunohistoquímica para FoxA2, el cual es un marcador de precursores dopaminérgicos. También realizamos ensayos de Western Blot para detectar dos marcadores característicos de células dopaminérgicas no diferenciadas, Lmx1a y Lmx1b. En el caso de las inmunotinciones, observamos que FoxA2 se expresa tanto en la placa del piso como en la placa basal del mesencéfalo. No encontramos diferencias aparentes en la marca de FoxA2 en los embriones que fueron inyectados con HA en comparación con los que fueron inyectados con vehículo (Fig. 34A). Al realizar los ensayos de Western Blot, observamos que la HA indujo una disminución marcada en los niveles proteicos de Lmx1a y Lmx1b con respecto a los embriones que fueron inyectados con vehículo (Fig. 34B). Estos resultados sugieren que el efecto de la HA en la diferenciación dopaminérgica, se da a nivel de las células precursoras que están especificadas a diferenciarse hacia linaje dopaminérgico.

Fig. 34 La histamina disminuye la expresión de marcadores de precursores dopaminérgicos. A) Cortes coronales del MesV de embriones inyectados con vehículo y con HA. Inmunohistoquímicas para detectar el marcador FoxA2, característico de precursores dopaminérgicos (verde). En rojo se muestra la tinción para tirosina hidroxilasa. Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). Escala: 150 μ m. B) Western Blot para detectar Lmx1a y Lmx1b a partir del mesencéfalo de embriones que fueron inyectados con vehículo o con HA. La gráfica muestra la intensidad de las bandas obtenidas. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con barras de error estándar, $p < 0.01$.

Figura en la siguiente página



EL EFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA ESTÁ MEDIADO POR EL RECEPTOR H_1

Para explicar de qué manera estaba actuando la HA sobre la diferenciación dopaminérgica, realizamos ensayos farmacológicos para evaluar qué receptor histaminérgico estaba regulando esta respuesta. Realizamos inyecciones con el antagonista del receptor histaminérgico RH_1 , clorfeniramina. Evaluamos 2 condiciones: una en la que co-inyectamos HA con el antagonista y otra en la que inyectamos solamente el antagonista. Se inyectó una dosis inicial de 50 μg de clorfeniramina en el lumen ventricular al día E12 y se obtuvieron los embriones al día E14. Cuando inyectamos solamente el antagonista, observamos que los embriones mueren y son incapaces de continuar de manera normal con su desarrollo. Pensando que la dosis usada de clorfeniramina fuera letal para los embriones, inyectamos la mitad de la dosis, 25 μg . En este caso, observamos que el embrión es más pequeño y las estructuras no se definen de manera normal en comparación con un embrión control (Fig. 35). Finalmente, la dosis a la cual los embriones no presentaron anomalías en el desarrollo fue de 15 μg .



Fig. 35 Embriones inyectados con clorfeniramina. Imágenes de embriones inyectados con 15 µg, 25 µg y 50 µg de clorfeniramina, en donde se observa que con las 2 dosis más elevadas hay un desarrollo anormal del embrión.

Posteriormente, analizamos mediante inmunohistoquímicas la diferenciación dopaminérgica evaluando la presencia del marcador TH y el marcador de diferenciación neuronal β -III Tubulina. En los embriones que fueron inyectados solamente con clorfeniramina se mantiene el patrón de expresión de la población de células TH+, definiéndose las regiones de *substantia nigra* y el área ventral tegmental, y no observamos diferencias notorias en la tinción de TH con respecto a los embriones que se inyectaron con vehículo (Fig. 36D). Cuando co-inyectamos HA con 15 µg de clorfeniramina, los embriones sobrevivieron de manera normal y a nivel morfológico no se observaron diferencias aparentes con respecto a los embriones inyectados con vehículo. Sin embargo, al analizar los embriones por inmunotinciones, encontramos que la disminución sobre la población TH+ al inyectar HA (Fig. 36 A y B) se ve revertida al co-inyectar HA con el antagonista para el receptor H₁, observándose un patrón indistinguible de los controles inyectados con vehículo (Fig. 36C), sugiriendo que esta respuesta fue mediada por este receptor. Cuantificamos el número de células TH+ en cada condición (Fig. 36E) y observamos que al inyectar HA, disminuye significativamente el número de células TH+ con respecto al control. Al co-inyectar HA con clorfeniramina, observamos que se recupera el número de células TH+ a niveles similares al control. Cuando se inyectó sólo clorfeniramina, no se alteró significativamente el número de neuronas TH+.

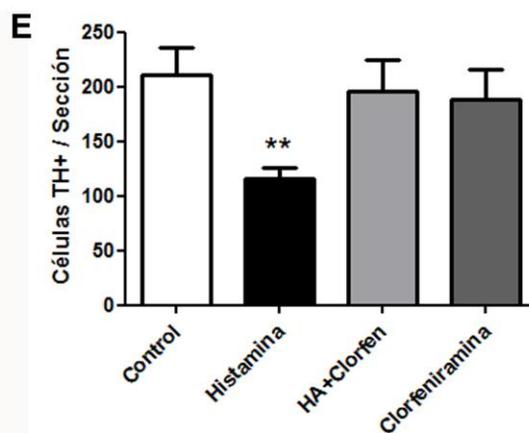
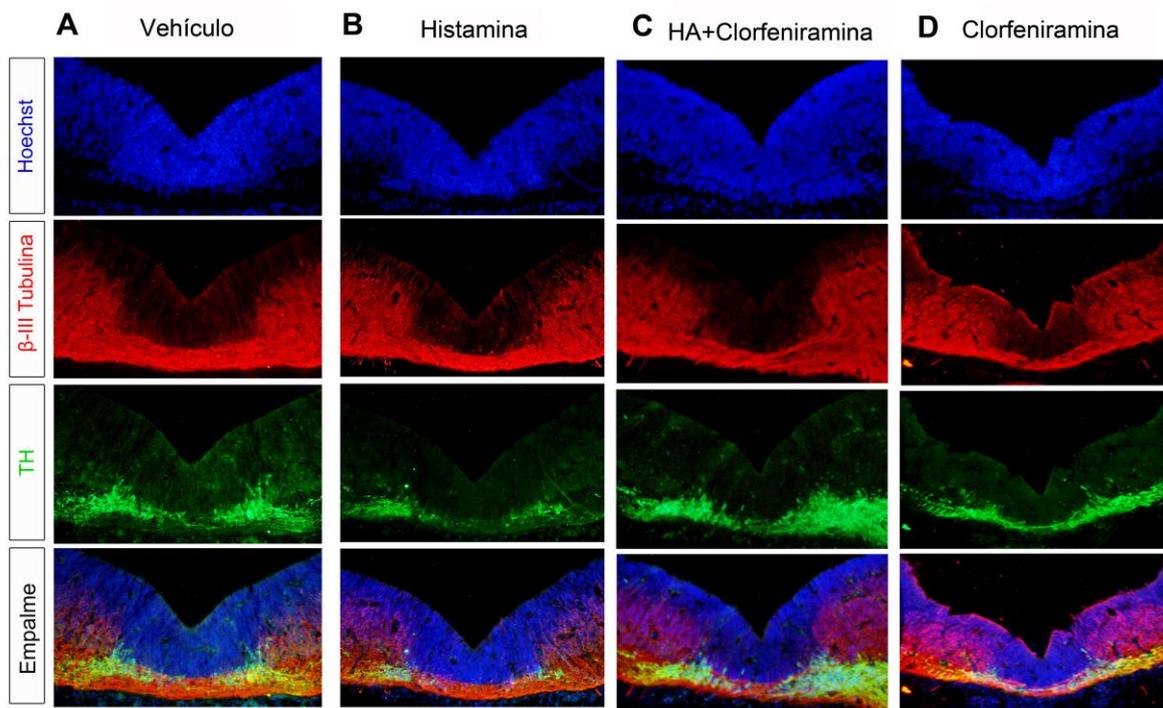


Fig. 36 La clorfeniramina previene la disminución inducida por HA en células dopaminérgicas. Detección inmunohistoquímica de neuronas dopaminérgicas (TH +, verde) y su colocalización con el marcador neuronal temprano (β -III Tubulina, rojo). Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). Secciones coronales del MesV de embriones E14 inyectados con vehículo (A), HA (B), co-inyectados con HA y el antagonista del receptor H_1 , clorfeniramina (C) e inyectados con sólo clorfeniramina (D). (E) Cuantificación del número de células TH+ en cada condición. La gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes con barras de error estándar, ** $p < 0.01$.

Para evaluar si el efecto observado sobre las neuronas TH positivas también pudiera estar mediado por el receptor histaminérgico RH_2 , se realizaron inyecciones con un antagonista específico para este receptor, cimetidina. Se inyectó una dosis de 50 μ g de cimetidina en el lumen ventricular al día E12 y se obtuvieron los embriones al día E14. En este caso, los embriones que fueron inyectados con cimetidina se desarrollaron de manera normal y a nivel morfológico no se observan diferencias con respecto a los embriones control

debido a la dosis usada del antagonista. Realizamos inmunohistoquímicas para evaluar la diferenciación dopaminérgica. Cuando se inyectó solamente el antagonista, no observamos diferencias notorias en la marca de TH en comparación con los embriones que fueron inyectados con vehículo (Fig. 37D). Al analizar los embriones que fueron co-inyectados con HA y cimetidina, encontramos que la disminución en la población TH+ observada al inyectar HA se mantiene (Fig. 37 B y C). Esto fue corroborado al cuantificar el número de células TH+ (Fig. 37E), lo cual indica que la cimetidina no antagoniza la respuesta causada en las NDA por la inyección de HA.

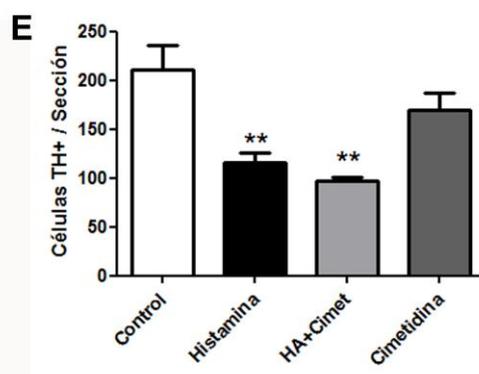
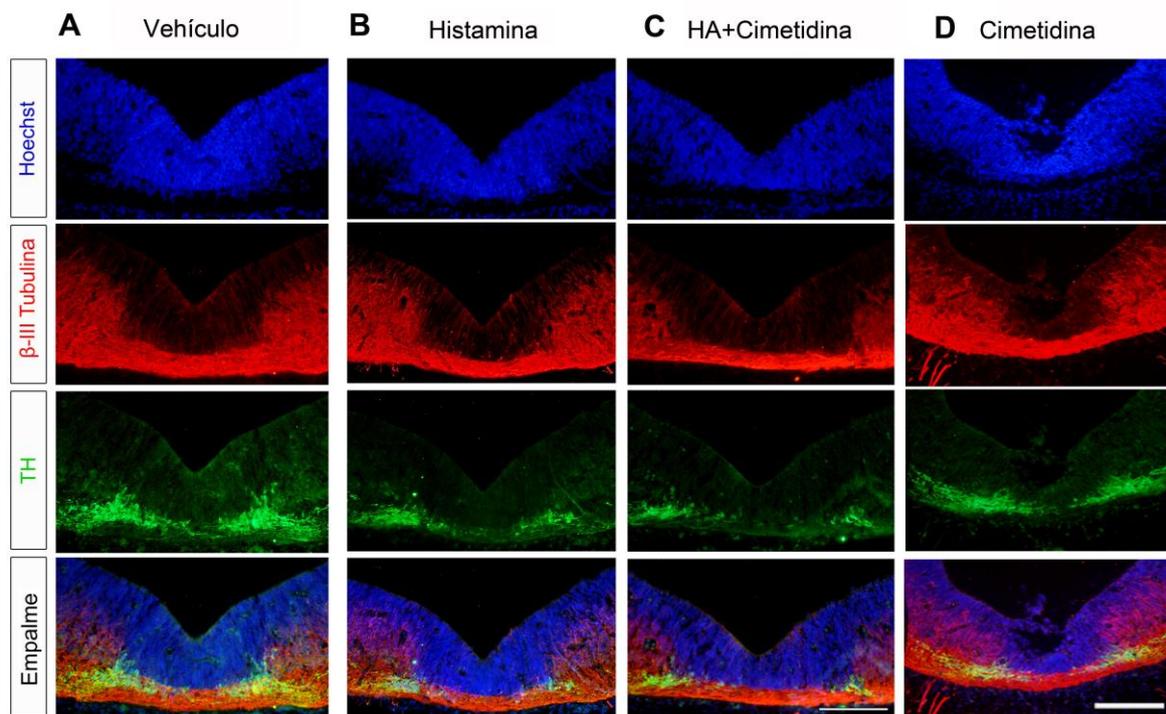


Fig. 37 La cimetidina no previene la disminución en TH causada por HA. Detección inmunohistoquímica de neuronas dopaminérgicas (TH +, verde) y su colocalización con el marcador neuronal temprano (β -III Tubulina, rojo). Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). Secciones coronales del MesV de embriones E14 inyectados con vehículo (A), histamina (B), co-inyectados con HA y el antagonista del receptor H_2 , cimetidina (C) e inyectados con sólo cimetidina (D). Escala: 150 μ m. (E) Cuantificación del número de células TH+ en cada condición. La gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes con barras de error estándar, ** $p < 0.01$.

XI. DISCUSIÓN

En esta tesis reportamos que *in vitro*: 1) la HA eleva los niveles de calcio intracelular en CTPN; 2) el tratamiento con concentraciones elevadas de HA en CTPN de MesV reduce la proporción de neuronas dopaminérgicas diferenciadas mediante la activación del RH₁; 3) la muerte celular apoptótica incrementa con el tratamiento con HA y este efecto depende de la activación del RH₁. Por otro lado, *in vivo* observamos que: 1) la inyección de HA en embriones E12 disminuye la diferenciación dopaminérgica en MesV sin alterar la diferenciación hacia neuronas GABAérgicas o serotoninérgicas; 2) la HA actúa sobre la diferenciación dopaminérgica a nivel de precursores no diferenciados; 3) la HA disminuye la proliferación sin afectar la muerte celular; 4) el efecto de la HA sobre la diferenciación dopaminérgica está regulado por la activación del receptor H₁.

En este trabajo mostramos, mediante Western Blot, la presencia de los receptores H₁ y H₂ en CTPN de MesV en E12. En otros trabajos se han reportado los patrones de expresión de neuronas inmunorreactivas a HA y de los RHs en diferentes estadios del desarrollo embrionario en roedores (Auvinen y Panula, 1988). Las neuronas inmunorreactivas a HA se detectan inicialmente en E13 en las regiones del mesencéfalo y metencéfalo, este patrón de expresión permanece hasta E17 y disminuye gradualmente hacia el nacimiento (Auvinen y Panula, 1988). Los patrones de expresión de los RHs se han reportado en estadios posteriores del desarrollo (a partir de E14 en adelante) mediante hibridación *in situ* (Kinnunen *et al.*, 1998; Heron *et al.*, 2001; Karlstedt *et al.*, 2003).

La capacidad de las CTPN para generar diferentes tipos de neuronas y glía, depende de la acción de determinantes intrínsecos y de señales extracelulares, así como de la regulación precisa de los procesos de proliferación, migración, diferenciación y muerte celular.

En cultivos de CTPN de MesV tratados con HA observamos que la HA no afecta la proliferación celular en comparación con la condición control. Sin embargo, el tratamiento con HA aumentó significativamente la muerte celular apoptótica en la etapa de proliferación y este efecto se bloqueó al co-incubar las células con el antagonista para el RH₁, clorfeniramina. En la etapa de diferenciación, la concentración de 1 mM de HA produjo una disminución en la proporción de células dopaminérgicas obtenidas en CTPN de MesV *in vitro*. Esto sugiere que los altos niveles de esta amina observados durante el desarrollo embrionario en la región del mesencéfalo están relacionados con el proceso de neurogénesis dopaminérgica. Para analizar el mecanismo celular de acción de la HA, se realizaron análisis farmacológicos mediante el uso de antagonistas, en donde encontramos que la activación del receptor H₁ regula la diferenciación neuronal dopaminérgica. Un posible mecanismo de acción mediante el cual la HA podría estar ejerciendo su función por activación del receptor H₁, podría ser por la modulación de niveles de Ca²⁺ intracelular. En algunos trabajos se ha reportado que variaciones en la concentración de Ca²⁺ intracelular, es un mecanismo mediante el cual diversos receptores regulan la actividad de conos de crecimiento variando la neuritogénesis, el crecimiento neuronal y de esta manera, regulando el proceso de neurogénesis (Meier et.al., 1991), lo cual pudiera estar ocurriendo en nuestros cultivos.

En estudios previos hemos reportado que la HA, mediante la activación del RH₁, incrementa la diferenciación neuronal de CTPN de corteza cerebral de rata E14; particularmente, hacia neuronas positivas para el marcador FOXP2, característico de neuronas de capas profundas de la corteza cerebral (Molina-Hernandez y Velasco, 2008; Molina-Hernandez *et al.*, 2013). En contraste, en este trabajo mostramos que la HA afectó la generación de NDA. Estos resultados revelan que los efectos de la HA varían dependiendo de la región cerebral estudiada, así como de la concentración de HA utilizada.

Por otro lado, la inyección intrauterina guiada por ultrasonido es una técnica muy compleja pero que permite visualizar los embriones en estadios del desarrollo específicos (Slevin *et al.*, 2006; Garcia-Moreno *et al.*, 2010; Pierfelice y Gaiano, 2010). En este trabajo, no encontramos diferencias morfológicas entre los embriones control y los que fueron inyectados con HA, lo cual nos permitió usar esa técnica como modelo para analizar el efecto de la administración de HA durante el desarrollo del mesencéfalo. Corroboramos mediante la inyección de un trazador celular (Cell Tracker) que la HA inyectada cubre toda la región del mesencéfalo.

Al evaluar la diferenciación neuronal mediante inmunotinciones, RT-PCR en tiempo real y Western Blot, observamos que la HA no modificó la expresión de β -III Tubulina, sugiriendo que la HA no interfiere con la diferenciación neuronal. Sin embargo, cuando evaluamos TH, la enzima limitante en la síntesis de DA, encontramos que la inyección de HA en E12 disminuye de manera significativa su expresión, consistente con lo que encontramos *in vitro* en cultivos de CTPN de MesV E12. Estos datos sugieren que la HA pudiera estar afectando la especificación y/o la diferenciación dopaminérgica.

Para estudiar si la HA estaba afectando la especificación dopaminérgica, analizamos la expresión de los factores transcripcionales Lmx1a y Lmx1b, los cuales son marcadores específicos de precursores dopaminérgicos de MesV. Lmx1a es un marcador de precursores mesencefálicos de células de la placa del piso que se encuentran en división en estadios tempranos del desarrollo, el cual instruye su diferenciación hacia el fenotipo dopaminérgico mesencefálico. Lmx1b es esencial para la generación de NDA diferenciadas y su especificación regional (Abeliovich y Hammond, 2007; Smidt y Burbach, 2007). La HA disminuyó de manera significativa los niveles proteicos de estos marcadores. Por otro lado, Pitx3 es un factor transcripcional importante para el mantenimiento de la identidad dopaminérgica, el cual también se vio afectado por la inyección de HA. Estos resultados

apoyan la hipótesis de que la HA está actuando sobre precursores dopaminérgicos y no sobre las NDA ya diferenciadas.

También observamos que la HA no modificó la incorporación de BrdU en cultivos de CTPN de MesV, mientras que *in vivo* disminuyó la proporción de células positivas para pHH3, el cual es un marcador específico para células que se encuentran en fase M del ciclo celular. Estos efectos opuestos de la HA en la proliferación podrían explicarse por el hecho de que el BrdU se adicionó a los cultivos durante 3 horas, y es incorporado por las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular, mientras que pHH3 está presente en células que están en la fase M del ciclo celular.

Otro factor a considerar, es que en los cultivos de CTPN de MesV, agregamos diariamente 10 ng/ml de FGF2, el cual es un potente agente mitogénico que incrementa la proliferación celular *in vitro*. En células humanas de músculo liso de tráquea incubadas con 10 ng/ml del factor de crecimiento epidermal y 10 μ M de HA se ha observado una potenciación en la incorporación de timidina, en comparación con la condición en que sólo se incubó con el factor de crecimiento. Este incremento en la proliferación se asoció con la activación de Akt debida a la activación de receptores acoplados a proteínas $G_{q/11}$ (Kong *et al.*, 2006).

Es posible que en cultivos de CTPN de MesV existan subpoblaciones que respondan de manera distinta a un estímulo con HA: algunas podrían disminuir (precursores dopaminérgicos) mientras que otras podrían incrementar (células no dopaminérgicas) la incorporación de BrdU, lo cual resultaría en que no observemos cambios globales en la proliferación al adicionar HA. Esta posibilidad se basa en el hecho de que la HA causó una disminución significativa en el número de NDA diferenciadas *in vitro* e *in vivo*.

Analizamos la diferenciación de otros fenotipos neuronales presentes en regiones adyacentes al mesencéfalo. Las neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas surgen de la

parte ventral del mesencéfalo, sólo que a diferentes niveles rostro-caudales (Goridis y Rohrer, 2002). Las células GABAérgicas residen en la *substantia nigra pars reticulata*, en *substantia nigra pars compacta* y en area tegmental ventral (Lahti *et al.*, 2013). En este trabajo, reportamos que el efecto de la HA sobre el desarrollo del mesencéfalo, fue selectivo para las neuronas dopaminérgicas, sin afectar la generación de neuronas GABAérgicas o serotoninérgicas.

Para identificar un mecanismo celular mediante el cual la HA estaba actuando al disminuir las neuronas positivas para TH, co-inyectamos HA con antagonistas para los receptores H₁ y H₂. Observamos que sólo la clorfeniramina, antagonista selectivo para el receptor H₁, previno la acción de la HA sobre las NDA. Estos datos apoyan la hipótesis de que la acción de la HA se da sobre los precursores dopaminérgicos mediante la activación del RH₁. Esto nos permite sugerir que la HA pudiera estar actuando como una señal negativa en estadios tempranos de especificación dopaminérgica.

En este trabajo observamos que la HA promueve la elevación de los niveles de Ca²⁺ en CTPN provenientes de MesV *in vitro*, lo cual sugiere que el mecanismo que subyace la acción de la HA sobre las células precursoras neurales, afectando de manera específica a la población dopaminérgica, involucra el Ca²⁺ intracelular. Se ha reportado que la señalización celular mediada por Ca²⁺, controla la proliferación de células precursoras neurales, regulando el paso de la proliferación hacia la diferenciación neuronal (Weissman *et al.*, 2004). Por ejemplo, incrementando la duración del ciclo celular y el número de precursores neurales intermedios (Leclerc *et al.*, 2012). En este modelo, el Ca²⁺ controla la duración del ciclo celular, incrementando el nivel de la proteína p53, que es un importante regulador del inhibidor dependiente de ciclinas p21 (Garcia-Garcia *et al.*, 2012).

Previamente en nuestro grupo de investigación, se ha reportado la acción de la HA en cultivos de precursores neurales provenientes de corteza cerebral de rata, en donde la HA

regula los patrones de división celular simétrica y asimétrica (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2012). Durante el desarrollo del MesV, las células en proliferación se encuentran cerca de la zona ventricular (Andersson *et al.*, 2013); en este trabajo mostramos que el número de células mitóticas se reduce debido a la inyección de HA, lo cual pudiera estar contribuyendo al mecanismo mediante el cual se disminuye la proporción de NDA. De acuerdo a los resultados observados en este estudio, proponemos un modelo de acción de la HA durante el desarrollo del mesencéfalo ventral para la generación de las NDA, el cual se explica en la figura 38.

Los efectos de la administración de HA exógena durante el desarrollo del MesV fueron evidentes; sin embargo, en este trabajo no evaluamos de manera directa la participación de la HA endógena en el desarrollo de las NDA por ejemplo, disminuyendo los niveles de HA mediante la inhibición de la histidina descarboxilasa. Sin embargo, la inyección de los antagonistas a los RH₁ y RH₂, no modificaron el patrón de tinción de TH, sugiriendo que los niveles endógenos de HA no son suficientes para afectar la generación de las NDA.

Este dato es muy interesante ya que en varios trabajos se ha reportado la participación de la HA en patologías como la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, se ha visto que en las regiones de putamen y *substantia nigra* de cerebros *post mortem* de pacientes con enfermedad de Parkinson incrementan los niveles de HA (Rinne *et al.*, 2002), así como los niveles de HA en sangre (Coelho *et al.*, 1991). También se ha visto que las fibras histaminérgicas que inervan hacia la *substantia nigra* incrementan en individuos con enfermedad de Parkinson (Anichtchik *et al.*, 2000; Rinne *et al.*, 2002). Adicional a estos datos, hay evidencia experimental que muestra que la HA puede afectar a las NDA ya diferenciadas en el cerebro adulto. La infusión directa de HA en la *substantia nigra* en roedores lleva a un daño selectivo de las NDA (Vizueté *et al.*, 2000). Uno de los modelos animales más utilizados para estudiar la enfermedad de Parkinson es la inyección intracerebral de la neurotoxina 6-hidroxidopamina en un hemisferio, la cual daña de manera selectiva a las NDA. Cuando se

alteran los niveles endógenos de HA, el daño inducido por 6-hidroxidopamina se potencia, evaluado mediante inmunotinciones para TH y mediante pruebas de rotaciones después de la administración de apomorfina. También se ha reportado que un antagonista del RH₁, pirlamina, disminuye la degeneración de NDA en el modelo de 6-hidroxidopamina, mientras que el antagonista del RH₂, cimetidina, no modifica el daño inducido por 6-hidroxidopamina (Liu *et al.*, 2007), lo cual apoya la participación de la HA en el daño a las NDA en el cerebro adulto.

Mecanismos alternativos que pudieran explicar el efecto deletéreo de la HA sobre las NDA puede ser la activación de células microgliales. Se ha reportado que cuando se inyecta HA en *substantia nigra*, se genera una reacción microglial, lo cual promueve la muerte celular dopaminérgica en adulto (Vizueté *et al.*, 2000). Se sabe que las células microgliales están presentes en los estadios del desarrollo que evaluamos en este trabajo (Chan *et al.*, 2007), y que la activación de células microgliales reducen el número de precursores neurales mediante un mecanismo de fagocitosis en la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario (Cunningham *et al.*, 2013).

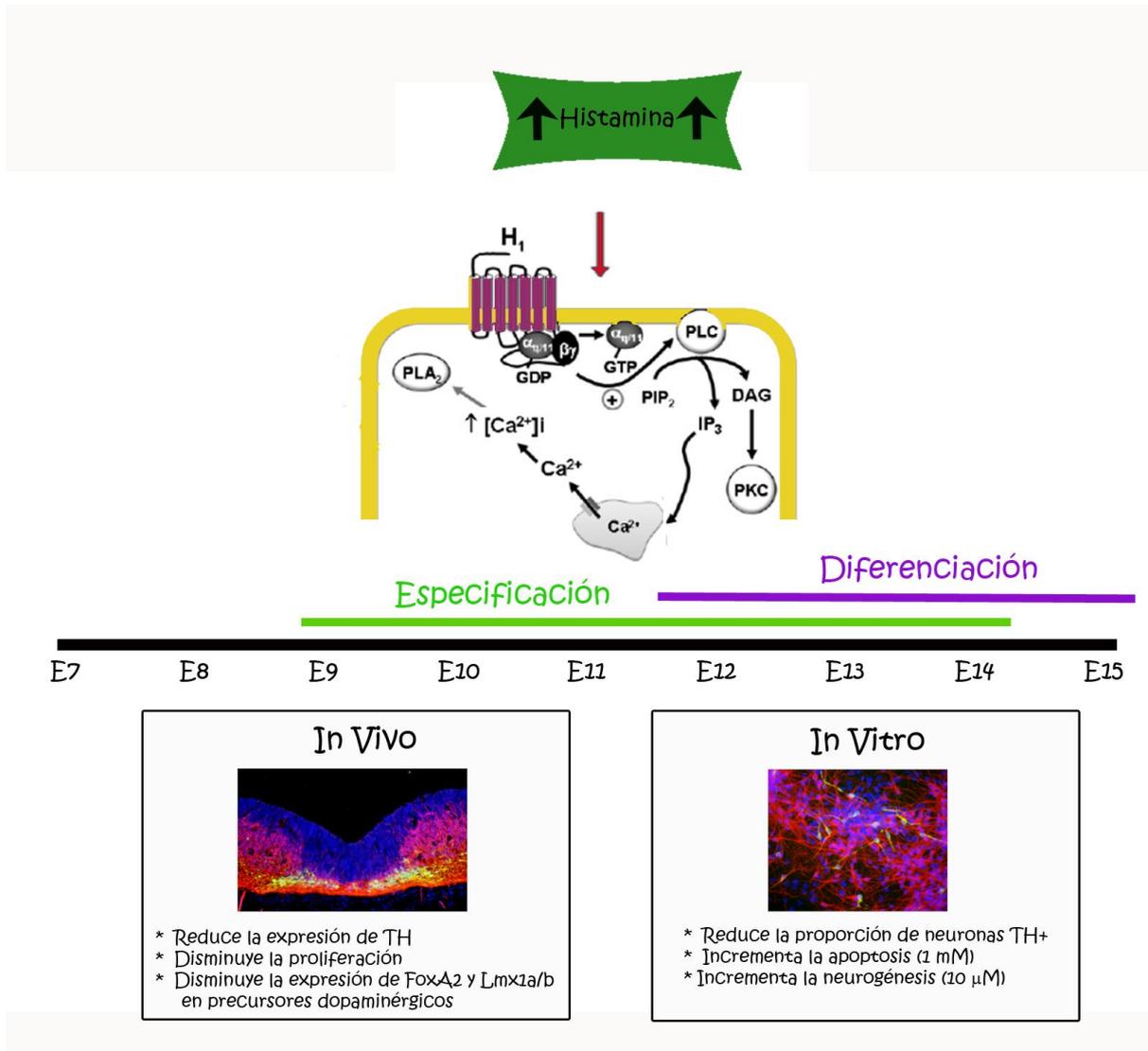


Fig. 38 Modelo de acción de la HA durante el desarrollo embrionario en el MesV. En este trabajo proponemos que un incremento en el nivel de HA en el mesencéfalo de embriones de 12 días de desarrollo, activa la señalización del RH₁, elevando los niveles de calcio intracelular y actuando de manera diferencial *in vitro* e *in vivo*. *In vivo* actúa sobre la especificación de precursores dopaminérgicos, reduciendo la proliferación y disminuyendo la expresión de marcadores asociados a linaje dopaminérgico; esto se ve reflejado en un menor número de neuronas dopaminérgicas diferenciadas. Mientras que *in vitro* la HA promueve la diferenciación neuronal y a su vez reduce la proporción de neuronas dopaminérgicas diferenciadas, incrementando la muerte celular apoptótica.

XII. CONCLUSIONES

- Los cultivos de CTPN de MesV son multipotenciales y expresan los receptores histaminérgicos.
- El tratamiento con HA disminuyó la proporción de células apoptóticas y este efecto se previno al tratar las células con el antagonista al RH₁, clorfeniramina.
- La HA afecta la diferenciación dopaminérgica de CTPN *in vitro* e *in vivo* dependiendo de la activación del RH₁ y elevando los niveles de [Ca²⁺]_i.
- Durante la embriogénesis, hay una interacción entre los sistemas dopaminérgico e histaminérgico durante el desarrollo del mesencéfalo ventral para la generación de las neuronas dopaminérgicas.
- Este estudio establece una relación inhibitoria de la HA para la generación de las neuronas dopaminérgicas y contribuye al conocimiento de los factores que participan en la generación y degeneración de las neuronas dopaminérgicas, revelando nuevas acciones de la HA durante el desarrollo del MesV.

XIII. REFERENCIAS

- Abeliovich, A. y R. Hammond (2007). "Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates." Dev Biol **304**(2): 447-454.
- Agasse, F., L. Bernardino, B. Silva, *et al.* (2008). "Response to histamine allows the functional identification of neuronal progenitors, neurons, astrocytes, and immature cells in subventricular zone cell cultures." Rejuvenation Res **11**(1): 187-200.
- Andersson, E. R., C. Salto, J. C. Villaescusa, *et al.* (2013). "Wnt5a cooperates with canonical Wnts to generate midbrain dopaminergic neurons in vivo and in stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(7): E602-610.
- Ang, S. L. (2006). "Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development." Development **133**(18): 3499-3506.
- Anichtchik, O. V., J. O. Rinne, H. Kalimo, *et al.* (2000). "An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in Parkinson's disease." Exp Neurol **163**(1): 20-30.
- Arrang, J. M., M. Garbarg y J. C. Schwartz (1983). "Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor." Nature **302**(5911): 832-837.
- Auvinen, S. y P. Panula (1988). "Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain." J Comp Neurol **276**(2): 289-303.
- Ballas, N., C. Grunseich, D. D. Lu, *et al.* (2005). "REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis." Cell **121**(4): 645-657.
- Banu, Y. y T. Watanabe (1999). "Augmentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H1 receptor signaling." J Exp Med **189**(4): 673-682.
- Bernardino, L., M. F. Eiriz, T. Santos, *et al.* (2012). "Histamine stimulates neurogenesis in the rodent subventricular zone." Stem Cells **30**(4): 773-784.
- Bertrand, N., D. S. Castro y F. Guillemot (2002). "Proneural genes and the specification of neural cell types." Nat Rev Neurosci **3**(7): 517-530.
- Bissonnette, E. Y. (1996). "Histamine inhibits tumor necrosis factor alpha release by mast cells through H2 and H3 receptors." Am J Respir Cell Mol Biol **14**(6): 620-626.
- Black, J. W., W. A. Duncan, C. J. Durant, *et al.* (1972). "Definition and antagonism of histamine H2-receptors." Nature **236**(5347): 385-390.
- Brown, R. E., D. R. Stevens y H. L. Haas (2001). "The physiology of brain histamine." Prog Neurobiol **63**(6): 637-672.
- Coelho, M. H., I. J. Silva, M. S. Azevedo, *et al.* (1991). "Decrease in blood histamine in drug-treated parkinsonian patients." Mol Chem Neuropathol **14**(2): 77-85.
- Coge, F., S. P. Guenin, H. Rique, *et al.* (2001). "Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene." Biochem Biophys Res Commun **284**(2): 301-309.
- Cunningham, C. L., V. Martinez-Cerdeno y S. C. Noctor (2013). "Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex." J Neurosci **33**(10): 4216-4233.
- Chan, W. Y., S. Kohsaka y P. Rezaie (2007). "The origin and cell lineage of microglia: new concepts." Brain Res Rev **53**(2): 344-354.
- Ennis, M., A. Truneh, J. R. White, *et al.* (1981). "Inhibition of histamine secretion from mast cells." Nature **289**(5794): 186-187.
- Farah, M. H., J. M. Olson, H. B. Sucic, *et al.* (2000). "Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells." Development **127**(4): 693-702.

- Fioretti, B., L. Catacuzzeno, A. M. Tata, *et al.* (2004). "Histamine activates a background, arachidonic acid-sensitive K channel in embryonic chick dorsal root ganglion neurons." Neuroscience **125**(1): 119-127.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-1438.
- Gale, E. y M. Li (2008). "Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells." Mol Brain **1**: 8.
- Garcia-Garcia, E., M. J. Pino-Barrio, L. Lopez-Medina, *et al.* (2012). "Intermediate progenitors are increased by lengthening of the cell cycle through calcium signaling and p53 expression in human neural progenitors." Mol Biol Cell **23**(7): 1167-1180.
- Garcia-Moreno, F., M. Pedraza, L. G. Di Giovannantonio, *et al.* (2010). "A neuronal migratory pathway crossing from diencephalon to telencephalon populates amygdala nuclei." Nat Neurosci **13**(6): 680-689.
- Gilbert, S. (2003). Developmental Biology. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.
- Godot, V., M. Arock, G. Garcia, *et al.* (2007). "H4 histamine receptor mediates optimal migration of mast cell precursors to CXCL12." J Allergy Clin Immunol **120**(4): 827-834.
- Goridis, C. y H. Rohrer (2002). "Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons." Nat Rev Neurosci **3**(7): 531-541.
- Haas, H. y P. Panula (2003). "The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system." Nat Rev Neurosci **4**(2): 121-130.
- Heron, A., A. Rouleau, V. Cochois, *et al.* (2001). "Expression analysis of the histamine H(3) receptor in developing rat tissues." Mech Dev **105**(1-2): 167-173.
- Hill, S. J., C. R. Ganellin, H. Timmerman, *et al.* (1997). "International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors." Pharmacol Rev **49**(3): 253-278.
- Huszti, Z. (1998). "Carrier-mediated high affinity uptake system for histamine in astroglial and cerebral endothelial cells." J Neurosci Res **51**(5): 551-558.
- Huszti, Z. (2003). "Histamine uptake into non-neuronal brain cells." Inflamm Res **52 Suppl 1**: S03-06.
- Huszti, Z., K. Magyar y M. Kalman (1990). "Contribution of glial cells to histamine inactivation." Agents Actions **30**(1-2): 237-239.
- Idzko, M., A. la Sala, D. Ferrari, *et al.* (2002). "Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells." J Allergy Clin Immunol **109**(5): 839-846.
- Jutel, M., T. Watanabe, S. Klunker, *et al.* (2001). "Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors." Nature **413**(6854): 420-425.
- Kala, K., M. Haugas, K. Lillevali, *et al.* (2009). "Gata2 is a tissue-specific post-mitotic selector gene for midbrain GABAergic neurons." Development **136**(2): 253-262.
- Karlstedt, K., M. J. Ahman, O. V. Anichtchik, *et al.* (2003). "Expression of the H3 receptor in the developing CNS and brown fat suggests novel roles for histamine." Mol Cell Neurosci **24**(3): 614-622.
- Karlstedt, K., M. Nissinen, K. A. Michelsen, *et al.* (2001). "Multiple sites of L-histidine decarboxylase expression in mouse suggest novel developmental functions for histamine." Dev Dyn **221**(1): 81-91.
- Kinnunen, A., M. Lintunen, K. Karlstedt, *et al.* (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**(1): 127-137.

- Kong, K. C., C. K. Billington, U. Gandhi, *et al.* (2006). "Cooperative mitogenic signaling by G protein-coupled receptors and growth factors is dependent on G(q/11)." FASEB J **20**(9): 1558-1560.
- Lahti, L., K. Achim y J. Partanen (2013). "Molecular regulation of GABAergic neuron differentiation and diversity in the developing midbrain." Acta Physiol (Oxf) **207**(4): 616-627.
- Leclerc, C., I. Neant y M. Moreau (2012). "The calcium: an early signal that initiates the formation of the nervous system during embryogenesis." Front Mol Neurosci **5**: 3.
- Liu, C., X. Ma, X. Jiang, *et al.* (2001). "Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow." Mol Pharmacol **59**(3): 420-426.
- Liu, C. Q., Z. Chen, F. X. Liu, *et al.* (2007). "Involvement of brain endogenous histamine in the degeneration of dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesioned rats." Neuropharmacology **53**(7): 832-841.
- Ma, Q., C. Kintner y D. J. Anderson (1996). "Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene." Cell **87**(1): 43-52.
- Maeda, K., M. Haraguchi, A. Kuramasu, *et al.* (2008). "CLIC4 interacts with histamine H3 receptor and enhances the receptor cell surface expression." Biochem Biophys Res Commun **369**(2): 603-608.
- Martinez-Mir, M. I., H. Pollard, J. Moreau, *et al.* (1990). "Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in the brain of human and non-human primates." Brain Res **526**(2): 322-327.
- Metcalf, D. D., D. Baram y Y. A. Mekori (1997). "Mast cells." Physiol Rev **77**(4): 1033-1079.
- Mizuguchi, R., M. Sugimori, H. Takebayashi, *et al.* (2001). "Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons." Neuron **31**(5): 757-771.
- Molina-Hernandez, A., N. F. Diaz y J. A. Arias-Montano (2012). "Histamine in Brain Development." J Neurochem **122**(122): 872-882.
- Molina-Hernandez, A., G. Rodriguez-Martinez, I. Escobedo-Avila, *et al.* (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.
- Molina-Hernandez, A. y I. Velasco (2008). "Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors." J Neurochem **106**(2): 706-717.
- Morrison, S. J. (2001). "Neuronal differentiation: proneural genes inhibit gliogenesis." Curr Biol **11**(9): R349-351.
- Morrison, S. J. (2001). "Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells." Curr Opin Cell Biol **13**(6): 666-672.
- Nakamura, H., T. Katahira, E. Matsunaga, *et al.* (2005). "Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development." Brain Res Brain Res Rev **49**(2): 120-126.
- Nakamura, H., T. Sato y A. Suzuki-Hirano (2008). "Isthmus organizer for mesencephalon and metencephalon." Dev Growth Differ **50 Suppl 1**: S113-118.
- Nakamura, H. y Y. Watanabe (2005). "Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon." Int J Dev Biol **49**(2-3): 231-235.
- Nakamura, T., H. Itadani, Y. Hidaka, *et al.* (2000). "Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R." Biochem Biophys Res Commun **279**(2): 615-620.

- Nakatani, T., Y. Minaki, M. Kumai, *et al.* (2007). "Helt determines GABAergic over glutamatergic neuronal fate by repressing Ngn genes in the developing mesencephalon." Development **134**(15): 2783-2793.
- Nissinen, M. J., K. Karlstedt, E. Castren, *et al.* (1995). "Expression of histidine decarboxylase and cellular histamine-like immunoreactivity in rat embryogenesis." J Histochem Cytochem **43**(12): 1241-1252.
- Nissinen, M. J. y P. Panula (1995). "Developmental patterns of histamine-like immunoreactivity in the mouse." J Histochem Cytochem **43**(2): 211-227.
- Oda, T., N. Morikawa, Y. Saito, *et al.* (2000). "Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes." J Biol Chem **275**(47): 36781-36786.
- Onodera, K., A. Yamatodani, T. Watanabe, *et al.* (1994). "Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders." Prog Neurobiol **42**(6): 685-702.
- Panula, P., M. Sundvik y K. Karlstedt (2014). "Developmental roles of brain histamine." Trends Neurosci **37**(3): 159-168.
- Pierfelice, T. J. y N. Gaiano "Ultrasound-guided microinjection into the mouse forebrain in utero at E9.5." J Vis Exp(45).
- Pierfelice, T. J. y N. Gaiano (2010). "Ultrasound-guided microinjection into the mouse forebrain in utero at E9.5." J Vis Exp(45).
- Prakash, N. y W. Wurst (2004). "Specification of midbrain territory." Cell Tissue Res **318**(1): 5-14.
- Raber, J. (2007). "Histamine receptor-mediated signaling during development and brain function in adulthood." Cell Mol Life Sci **64**(6): 735-741.
- Ramos-Jiménez, J., B. Garduño-Torres y Arias-Montaña J. (2009). "Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia." Rev Biomed **20**(2): 100-126.
- Rinne, J. O., O. V. Anichtchik, K. S. Eriksson, *et al.* (2002). "Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy." J Neurochem **81**(5): 954-960.
- Rodriguez-Martinez, G., I. Velasco, G. Garcia-Lopez, *et al.* (2012). "Histamine is required during neural stem cell proliferation to increase neuron differentiation." Neuroscience **216**: 10-17.
- Roybon, L., T. Hjalt, N. S. Christophersen, *et al.* (2008). "Effects on differentiation of embryonic ventral midbrain progenitors by Lmx1a, Msx1, Ngn2, and Pitx3." J Neurosci **28**(14): 3644-3656.
- Sadler, T. W. (2005). "Embryology of neural tube development." Am J Med Genet C Semin Med Genet **135C**(1): 2-8.
- Schmued, L. C., C. Albertson y W. Slikker, Jr. (1997). "Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration." Brain Res **751**(1): 37-46.
- Schmued, L. C. y K. J. Hopkins (2000). "Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration." Toxicol Pathol **28**(1): 91-99.
- Schwartz, J. C., J. M. Arrang, M. Garbarg, *et al.* (1991). "Histaminergic transmission in the mammalian brain." Physiol Rev **71**(1): 1-51.
- Schwartz, J. C., G. Barbin, M. Baudry, *et al.* (1979). "Metabolism and functions of histamine in the brain." Curr Dev Psychopharmacol **5**: 173-261.
- Simon, H. H., H. Saueressig, W. Wurst, *et al.* (2001). "Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes." J Neurosci **21**(9): 3126-3134.

- Slevin, J. C., L. Byers, M. Gertsenstein, *et al.* (2006). "High resolution ultrasound-guided microinjection for interventional studies of early embryonic and placental development in vivo in mice." BMC Dev Biol **6**: 10.
- Smidt, M. P. y J. P. Burbach (2007). "How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron." Nat Rev Neurosci **8**(1): 21-32.
- Smith, J. L. y G. C. Schoenwolf (1997). "Neurulation: coming to closure." Trends Neurosci **20**(11): 510-517.
- Tanaka, S. y A. Ichikawa (2006). "Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: immune regulatory roles of histamine produced by leukocytes." J Pharmacol Sci **101**(1): 19-23.
- Twyman, R. M. (2001). Instant notes, Developmental Biology. EUA, Taylor & Francis.
- Vizuete, M. L., M. Merino, J. L. Venero, *et al.* (2000). "Histamine infusion induces a selective dopaminergic neuronal death along with an inflammatory reaction in rat substantia nigra." J Neurochem **75**(2): 540-552.
- Wada, H., N. Inagaki, A. Yamatodani, *et al.* (1991). "Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity?" Trends Neurosci **14**(9): 415-418.
- Weissman, T. A., P. A. Riquelme, L. Ivic, *et al.* (2004). "Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex." Neuron **43**(5): 647-661.
- Wessely, O. y E. M. De Robertis (2002). "Neural plate patterning by secreted signals." Neuron **33**(4): 489-491.
- Wieland, K., G. Bongers, Y. Yamamoto, *et al.* (2001). "Constitutive activity of histamine h(3) receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H(3) antagonists." J Pharmacol Exp Ther **299**(3): 908-914.

XIV. ANEXO

Como parte de esta tesis y para la obtención del grado de Doctora en Ciencias, se publicó el siguiente artículo.

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

Escobedo-Avila I, Vargas-Romero F, Molina-Hernández A, López-González R, Cortés D, De Carlos JA and Velasco I

Molecular Brain 2014, 7:58 (12 August 2014)

También se encuentra en proceso de escritura una revisión acerca de la interacción de los sistemas histaminérgico y dopaminérgico en el sistema nervioso central adulto con título:

" Histaminergic and dopaminergic systems: interaction in normal brain and disease".