



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**La administración sistémica a ratas gestantes de  
clorfeniramina, antagonista del receptor a histamina H<sub>1</sub>,  
altera la diferenciación neuronal dopaminérgica**

**TESIS**

Que presenta

M. en C. Berenice Márquez Valadez

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de Neurobiología Celular y Molecular

Directores de Tesis

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

Dra. Anayansi Molina Hernández

Ciudad de México.

Septiembre, 2019

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) por el apoyo otorgado para el desarrollo de este proyecto (3230-21202-01-2015).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca (No. de becario: 255136) y los apoyos otorgados (CB-2015-254847 y CB-2013-220448) para la realización de este proyecto.

A mis tutores, el Dr. José Antonio Arias Montaña y la Dra. Anayansi Molina Hernández por todas sus enseñanzas, apoyo y cariño. Ambos son personas a las que respeto y admiro profundamente.

A los revisores de tesis el Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez, la Dra. Carolina López Rubalcava, la Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido y el Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño.

A mis amigos y compañeros de los Laboratorios de Células Troncales (INPer) y 37 (CINVESTAV), de quienes aprendí y compartí momentos increíbles.

Al MVZ. Carlos Giovanni Sam Miranda, al MVZ. Ricardo Gaxiola Centeno, al Téc. Jaime Cruz Rubio y al Prof. Jorge Fernández Hernández de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV.

## **Dedicatorias**

A mi papá Javier Aristeo Márquez por todo su amor, por ser mi ejemplo a seguir y porque me transmitió la fuerza que necesitaba para seguir sin él. Te extraño y te amo mucho.

A mi mamá Alejandra Valdez por sus cuidados, su amor, por ser una mujer a la que admiro y por enseñarme a ser una mujer aguerrida. Te amo mucho.

A mis hermanos Diego y Javier por su compañía, los quiero.

A Marbella Espinoza por todo el tiempo, historias y lágrimas compartidas, te quiero mucho.

A Rocío Valle por las pláticas interminables, por escucharme cada vez que lo necesitaba, por el crecimiento académico y personal que compartimos y en el que nos apoyamos, te quiero mucho.

A mis amigos que siempre me brindan momentos de alegría inigualables, los quiero mucho.

Finalmente me gustaría hacer una dedicatoria especial a mis tres sobrinos; Iván, Sofía y Emiliano Márquez; porque ellos son la semilla en desarrollo de esta familia, por ser personas increíbles, por siempre hacerme sonreír y enseñarme que lo más valioso de esta vida radica en una tarde de juegos con tus sobrinos. Los amo con todo mi corazón.

## Índice

I.	Abreviaturas.....	x
II.	Resumen.....	xi
III.	<i>Abstract</i> .....	xiii
1.	Introducción.....	1
1.1	El sistema histaminérgico del sistema nervioso central.....	1
1.2	Receptores a histamina.....	2
1.2.1	Receptor a histamina H <sub>1</sub> .....	2
1.2.2	Receptor a histamina H <sub>2</sub> .....	3
1.2.3	Receptor a histamina H <sub>3</sub> .....	4
1.2.4	Receptor a histamina H <sub>4</sub> .....	5
1.3	El sistema histaminérgico transitorio durante el desarrollo embrionario.....	5
1.4	Función de los receptores a histamina durante el desarrollo embrionario.....	8
1.4.1	Receptor a histamina H <sub>1</sub> .....	8
1.4.2	Receptor a histamina H <sub>2</sub> .....	10
1.4.3	Receptor a histamina H <sub>3</sub> .....	12
1.4.4	Receptor a histamina H <sub>4</sub> .....	13
1.5	Sistema dopaminérgico del mesencéfalo ventral.....	13
1.5.1	Familia de receptores a dopamina D <sub>1</sub> .....	16
1.5.2	Familia de receptores a dopamina D <sub>2</sub> .....	16
1.6	Desarrollo embrionario del sistema dopaminérgico.....	17
1.6.1	Establecimiento del dominio del mesencéfalo.....	17

- 1.6.2 Proliferación y diferenciación de los progenitores neurales.....20
- 1.6.3 Migración de neuroblastos y neuronas dopaminérgicas (nDAs) y establecimiento de las proyecciones dopaminérgicas.....21
- 2. Justificación.....24
- 3. Hipótesis.....25
- 4. Objetivos.....26
  - 4.1 Objetivo general.....26
  - 4.2 Objetivos específicos.....26
- 5. Métodos.....27
  - 5.1 Animales.....27
  - 5.2 Extracción de RNAm y RT-PCR de punto final.....28
  - 5.3 Inmunohistoquímica.....30
  - 5.4 *Western blot*.....32
  - 5.5 Ensayos de unión de radioligando.....33
    - 5.5.1 Unión de [<sup>3</sup>H]-mepiramina a membranas totales.....33
    - 5.5.2 Unión de [<sup>3</sup>H]-espiperona a membranas sinaptosomales del neocórtex.....34
  - 5.6 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección electroquímica (HPLC-EC).....35
  - 5.7 Liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina en rebanadas del neocórtex.....35
  - 5.8 Actividad locomotora.....37
  - 5.9 Análisis estadístico.....37
- 6. Resultados.....38
  - 6.1 Expresión del RH<sub>1</sub> en el mesencéfalo ventral (MescV) de embriones E12 y E14.....38

6.2 Efecto a corto plazo del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> (E12-E14) en la diferenciación dopaminérgica del MescV en E14 y E16.....	41
6.3 Efecto a largo plazo del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> (E12-E14) en la diferenciación dopaminérgica del MescV en ratas de 21 días de edad (P21).....	45
6.4 Efecto del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> (E12-E14) en la inervación dopaminérgica al neostriado de ratas P21.....	48
6.5 Efecto del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> (E12-E14) en el contenido y liberación de dopamina en el neostriado de ratas P21.....	50
6.6 Efecto del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> (E12-E14) en la densidad de RD <sub>2</sub> en el neostriado de ratas P21.....	52
6.7 Efecto del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> (E12-E14) en la actividad locomotora de ratas P21.....	53
7. Discusión.....	56
8. Conclusión.....	62
9. Perspectivas.....	63
10. Bibliografía.....	64

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Localización de las neuronas histaminérgicas y metabolismo de la histamina.....	1
<b>Figura 2.</b> Sistema histaminérgico transitorio.....	6
<b>Figura 3.</b> Nivel de histamina durante el desarrollo embrionario de la rata.....	7
<b>Figura 4.</b> Expresión del RH <sub>1</sub> durante el desarrollo embrionario de la rata.....	8
<b>Figura 5.</b> El bloqueo del RH <sub>1</sub> disminuye la diferenciación neuronal del neuroepitelio cortical <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	9
<b>Figura 6.</b> La inyección de histamina disminuye el fenotipo dopaminérgico en el mesencéfalo ventral (MescV) de embriones E14.....	11
<b>Figura 7.</b> Expresión del RH <sub>2</sub> durante el desarrollo embrionario de la rata.....	12
<b>Figura 8.</b> Expresión del RH <sub>3</sub> durante el desarrollo embrionario de la rata.....	13
<b>Figura 9.</b> Núcleos dopaminérgicos del MescV.....	14
<b>Figura 10.</b> Síntesis de dopamina.....	15
<b>Figura 11.</b> Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del MescV.....	18
<b>Figura 12.</b> Migración de neuronas dopaminérgicas.....	22
<b>Figura 13.</b> Expresión del RNAm del RH <sub>1</sub> en el MescV de embriones E12 y E14.....	38
<b>Figura 14.</b> Densidad del RH <sub>1</sub> en membranas del tejido de telencéfalo/mesencéfalo de embriones E12 y E14.....	39
<b>Figura 15.</b> Distribución de las células inmunorreactivas para el RH <sub>1</sub> y Nestina en cortes coronales del MescV de embriones E12 y E14.....	40
<b>Figura 16.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la expresión de LMX1b en el MescV de embriones E14 y E16.....	41

<b>Figura 17.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la expresión de PITX3 en el MescV de embriones E14 y E16.....	43
<b>Figura 18.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la expresión de TH en el MescV de embriones E14 y E16.....	44
<b>Figura 19.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la inmunorreactividad a TH en la SNpc de ratas P21.....	46
<b>Figura 20.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en el número de células TH <sup>+</sup> en la SNpc de ratas P21.....	47
<b>Figura 21.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la expresión de TH y PITX3 en la SNpc de ratas P21.....	48
<b>Figura 22.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la inervación nigro-estriatal de ratas P21.....	49
<b>Figura 23.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en el contenido de dopamina del neostriado de ratas P21.....	50
<b>Figura 24.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la liberación de [ <sup>3</sup> H]-dopamina en rebanadas de neostriado de ratas P21.....	51
<b>Figura 25.</b> Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la densidad de RD <sub>2</sub> en membranas sinaptosomales del neostriado de ratas P21.....	53

**Figura 26.** Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la actividad locomotora de las ratas P21.....54

## Abreviaturas

5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
AMPC	3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina
CTNs	Células troncales neurales
DAG	Diacilglicerol
E	Día embrionario
GR	Glia radial
IP <sub>3</sub>	1,4,5-trifosfato de inositol
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipasa C
HDC	Descarboxilasa de histidina
HNMT	N-metiltransferasa
MescV	Mesencéfalo ventral
Nda	Neuronas dopaminérgicas
NEM	Neuronas espinosas medianas
RH	Receptor a histamina
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	Sustancia negra parte compacta
TH	Tirosina hidroxilasa
TUJ1	βIII-tubulina
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas 2
VTA	Área tegmental ventral
ZM	Zona marginal
ZV	Zona ventricular

## Resumen

Los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico e histaminérgico son los primeros en aparecer durante el desarrollo del sistema nervioso. Mediante la activación del receptor H<sub>1</sub> (RH<sub>1</sub>), la histamina promueve la diferenciación neuronal de las capas profundas corticales, mientras que en el mesencéfalo ventral disminuye el fenotipo dopaminérgico (células inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa, TH<sup>+</sup>) durante el desarrollo embrionario. Aunque se ha estudiado la función de la histamina exógena en la diferenciación neuronal, se desconoce si la acción de la histamina endógena en el RH<sub>1</sub> es relevante para el desarrollo del mesencéfalo ventral.

Con el propósito de evaluar la función del RH<sub>1</sub> en la diferenciación, maduración y función de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta, se administró clorfeniramina (5 mg/kg, ip), un antagonista/agonista inverso del RH<sub>1</sub>, a ratas Wistar preñadas en los días gestacionales 12, 13 y 14. Para evaluar posibles cambios en el desarrollo del sistema nigro-estriatal a corto y largo plazo se obtuvieron embriones de los días embrionarios (E) 14 y 16 y del día postnatal 21 (P21).

La administración de clorfeniramina a las ratas preñadas disminuyó el marcador de progenitores neurales dopaminérgicos LMX1b en E14 y aumentó significativamente los marcadores de neuronas dopaminérgicas TH y PITX3 en el mesencéfalo ventral de embriones E16. Sin embargo, las ratas P21 expuestas a la clorfeniramina presentaron una disminución significativa en el número de células TH<sup>+</sup> en la sustancia negra parte compacta, así como aumento de las células TH<sup>+</sup> ectópicas. Acorde con lo anterior, el contenido y la liberación de dopamina en el neostriado disminuyeron significativamente, sin afectar la densidad de los receptores a dopamina D<sub>2</sub>. Al evaluar la actividad locomotora, en el grupo expuesto a la clorfeniramina disminuyó significativamente la actividad locomotora.

Estos resultados indican que el bloqueo del RH<sub>1</sub> en E12-E14 favorece la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas durante la etapa embrionaria, lo que altera su diferenciación, maduración y migración en la sustancia negra, afectando la inervación dopaminérgica nigro-estriatal postnatal. Esta información puede tener relevancia clínica ya que el consumo de antihistamínicos de primera generación durante el embarazo es una práctica médica prevalente.

## **Abstract**

The dopaminergic and histaminergic systems are the first neurotransmitter systems to appear during the development of the nervous system. Through the activation of H<sub>1</sub> receptors (H<sub>1</sub>R), histamine increases the neurogenesis of the cortical deep layers, while reducing the dopaminergic phenotype (cells immunoreactive to tyrosine hydroxylase, TH<sup>+</sup>) in the embryo ventral mesencephalon. Although the function of histamine in neuronal differentiation has been studied, the role of H<sub>1</sub>R in neurogenesis has not been addressed.

In order to study the effect of H<sub>1</sub>R on the differentiation and maturation of dopaminergic neurons, the H<sub>1</sub>R antagonist/inverse agonist chlorpheniramine was systemically administered (5 mg/kg, ip) to pregnant Wistar rats (gestational days, E12-14), and control and experimental embryos (E14 and E16) and pups (21-day old) were evaluated for changes in nigrostriatal development and function.

The administration of chlorpheniramine to the mothers significantly increased the protein levels of TH and the transcription factor PITX3 in E16 embryos. However, in 21-day old pups from chlorpheniramine-treated rats, quantitative immunohistochemistry showed a significant reduction in TH immunoreactivity in substantia nigra pars compacta and dorsal striatum, as well a significant reduction in the number of TH<sup>+</sup> cells in the substantia nigra of male and female rats.

In accordance with the reduction in TH<sup>+</sup> cells at P21, striatal dopamine content and depolarization-induced [<sup>3</sup>H]-dopamine release were reduced in 21-day old pups from chlorpheniramine-treated rats. Furthermore, total crosses, speed and total distance traveled induced by meta-amphetamine were reduced in pups from chlorpheniramine-treated rats.

These results indicate that H<sub>1</sub>R blockade at E12-14 favors the differentiation of dopaminergic neurons, but hampers their maturation and migration, leading to a decrease in striatal dopaminergic innervation in post-natal life. This

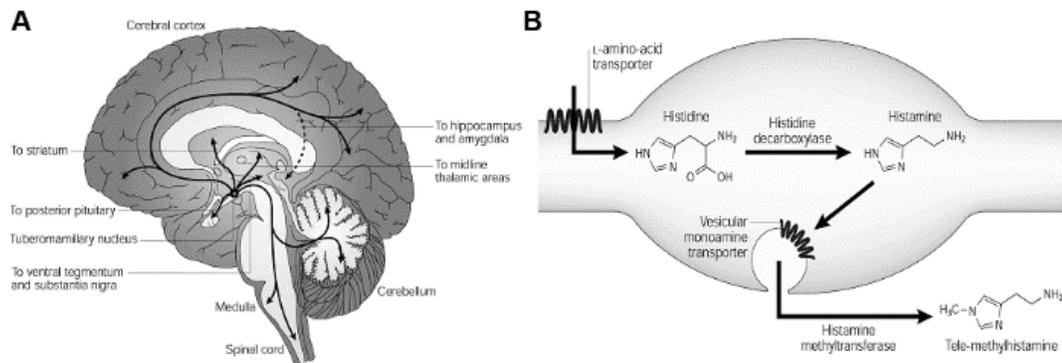
information may have clinical relevance since first-generation antihistamine drugs are still used during pregnancy.

## 1. Introducción

La histamina es una amina biogénica que en el sistema nervioso central (SNC) funciona como neuromodulador y neurotransmisor, regulando procesos fisiológicos como la ingesta de alimentos, el ciclo sueño/vigilia, la temperatura corporal, la actividad locomotora, la memoria y el aprendizaje (Brown et al., 2001; Hass et al., 2008).

### 1.1 El sistema histaminérgico del SNC

En el cerebro adulto, esta amina es producida por un grupo de neuronas localizadas en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo posterior, cuyos axones proyectan prácticamente a todo el SNC (Figura 1A; Panula et al., 1989), observándose una mayor densidad de fibras en la neocorteza, el neocóstriado, la amígdala, la sustancia negra y el hipocampo (Panula y Nuutinen, 2013).



**Figura 1. Localización de las neuronas histaminérgicas y metabolismo de la histamina.** A) Esquema de la localización de los cuerpos celulares de las neuronas histaminérgicas (círculo negro) en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo y sus eferencias (flechas negras) en el cerebro humano. B) Esquema del metabolismo de la histamina, mostrando la síntesis a partir del amino ácido L-histidina por acción de la descarboxilasa de L-histidina, su transporte a las vesículas de exocitosis, la liberación y la degradación por acción de la enzima N-metiltransferasa. Tomado de Hass et al., 2008.

La histamina es sintetizada a partir del aminoácido L-histidina por la acción de la enzima descarboxilasa de histidina (HDC, E.C. 4.1.1.22). La amina recién sintetizada es internalizada a las vesículas de liberación por el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2, del inglés *vesicular monoamine transporter 2*), para ser liberada de manera dependiente de calcio y posteriormente degradada por la enzima N-metiltransferasa de histamina (HNMT, E.C. 2.1.1.8) que la transforma a tele-metil-histamina (Figura 1B; Ramos-Jiménez et al., 2009).

## **1.2 Receptores a histamina**

La histamina ejerce sus efectos a través de la activación de cuatro diferentes receptores ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  y  $H_4$ ), pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G.

### **1.2.1 Receptor a histamina $H_1$**

El gen que codifica el receptor  $H_1$  ( $RH_1$ ) se localiza en el humano en el cromosoma 3p25 (gene ID: 3269) y en la rata en el cromosoma 4q42 (gene ID: 24448). En la rata, el  $RH_1$  es una proteína de 486 amino ácidos (aa) con un peso molecular de 56 kilodaltones (kDa); al ser un receptor acoplado a proteínas G presenta siete dominios transmembranales y un dominio amino extracelular, con una tercera asa intracelular larga y un dominio carboxilo terminal intracelular corto (Ramos-Jiménez et al., 2009).

El  $RH_1$  está acoplado a proteínas  $G_{\alpha q/11}$ , y la vía de señalización canónica asociada a la activación de este receptor es la hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidil-inositol ( $PIP_2$ ) por acción de la fosfolipasa C  $\beta$  ( $PLC\beta$ ), generando dos segundos mensajeros, el 1,4,5-trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) y el diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  se une a receptores localizados en la membrana de retículo endoplásmico promoviendo la salida de  $Ca^{2+}$ , mientras que el DAG activa a cinasas C de proteínas (PKCs).

La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo induce la apertura de canales activados por depósito (SOCs, *storage operated channels*), permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular (Hass et al., 2008; Molina-Hernández et al., 2012), lo que activa: a) al intercambiador sodio/calcio (NCX); b) la formación de óxido nítrico por estimulación de la sintasa del óxido nítrico; c) a las guanilil-ciclasas para la síntesis del monofosfato cíclico de guanosina (GMPc); d) a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) para la formación de ácido araquidónico y, e) la apertura de canales de K<sup>+</sup> activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Hass et al., 2008; Molina-Hernández et al., 2012).

La PKC fosforila en residuos de Serina y Treonina a numerosas proteínas, como receptores, enzimas y canales iónicos, lo que desencadena múltiples respuestas celulares (Moniri et al., 2006; Chen et al., 2014, Hass et al., 2008).

En el humano y primates no humanos, la mayor expresión del RH<sub>1</sub> se observa en la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo accumbens, el hipotálamo y la amígdala. Presenta una constante de afinidad ( $K_i$ ) de 1.26  $\mu\text{M}$  por la histamina y actividad constitutiva en sistemas heterólogos o en condiciones en las que se promueve una alta expresión, como por ejemplo la rinitis alérgica (Nijmeijer et al., 2010; Bakker et al., 2000; Murata et al., 2004).

### **1.2.2 Receptor a histamina H<sub>2</sub>**

El gen que codifica el receptor H<sub>2</sub> (RH<sub>2</sub>) se localiza en el cromosoma 5q35.2 (gene ID: 3274) y el 17p14 (gene ID: 25461) en humano y rata, respectivamente. El RH<sub>2</sub> de la rata es una proteína de 358 aa, 44 kDa, con una tercera asa intracelular corta y un extremo carboxilo terminal intracelular largo (Ramos-Jiménez et al., 2009).

El RH<sub>2</sub> se acopla a proteínas  $G\alpha_s$  y su activación estimula a la enzima adenilil ciclasa, lo cual promueve la síntesis de 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). El AMPc se une a las subunidades reguladoras de la cinasa A de proteínas (PKA), lo cual favorece la liberación de las subunidades catalíticas que fosforilan en residuos de Serina y Treonina proteínas como el factor de

transcripción CREB, canales catiónicos activados por hiperpolarización y canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (Hass et al., 2008; Pedarzani et al., 1995).

La distribución del  $RH_2$  en SNC es amplia, con alta expresión en la corteza cerebral, el neocórtex, la sustancia negra, los núcleos del rafe, el hipocampo, la amígdala y el cerebelo. Este receptor presenta una afinidad moderada por su ligando endógeno con una  $K_i$  de 1.99  $\mu M$  (Honrubia et al., 2000).

### **1.2.3 Receptor a histamina $H_3$**

El gen que codifica al receptor  $H_3$  ( $RH_3$ ) está localizado en los cromosomas 3q43 (gene ID: 85268) y 20q13.33 (gene ID: 11255) en la rata y el humano, respectivamente. Los genes del  $RH_3$  pueden dar origen por procesamiento alternativo a diferentes isoformas, entre ellas las de 445, 413 y 365 aa, que varían principalmente en el tamaño de la tercera asa intracelular. En la rata se han reportado siete isoformas mientras que en el humano se han reportado 20 (Nieto-Alamilla et al., 2016).

El  $RH_3$  está acoplado a proteínas  $G\alpha_{i/o}$ , cuya subunidad  $\alpha$  inhibe la actividad de las adenilil ciclasas, disminuyendo la síntesis de AMPc; por su parte, el complejo  $\beta\gamma$  inhibe canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo N y P/Q. Además, la activación del  $RH_3$  promueve la formación del ácido araquidónico por activación de la  $PLA_2$ , inhibe al intercambiador  $Na^+/H^+$  y activa las vías de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) y de la cinasa B de proteínas o Akt (Nieto-Alamilla et al., 2016; Hass et al., 2008).

La mayor expresión del  $RH_3$  en el SNC se encuentra en el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la amígdala, el núcleo accumbens, la sustancia negra, el globo pálido, el neocórtex, el tálamo y el hipotálamo. El  $RH_3$  presenta una mayor afinidad en relación a los receptores  $H_1$  y  $H_2$  con una  $K_i$  de 10 nM. Como autorreceptor, regula la liberación y la síntesis de la histamina, y como heterorreceptor inhibe la liberación de otros neurotransmisores como el

glutamato, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), la noradrenalina, la acetilcolina, la dopamina y la serotonina (Nieto-Alamilla et al., 2016).

#### **1.2.4 Receptor a histamina H<sub>4</sub>**

El gen que codifica el receptor H<sub>4</sub> (RH<sub>4</sub>) se localiza en el humano en el cromosoma 18q11.2 (gene ID: 59340) y en la rata en el cromosoma 18p13 (gene ID: 170704). En la rata el RH<sub>4</sub> es una proteína de 391 aa de 44 kDa con una homología del 40% con el RH<sub>3</sub> (Schneider et al., 2016).

El RH<sub>4</sub> también se acopla a proteínas G $\alpha_{i/o}$ , por lo que su activación inhibe la actividad de las adenilil ciclasas reduciendo la formación del AMPc mediante la subunidad  $\alpha$ , y la activación de la vía de las MAPKs mediante las subunidades  $\beta\gamma$  (Ramos-Jiménez et al., 2009).

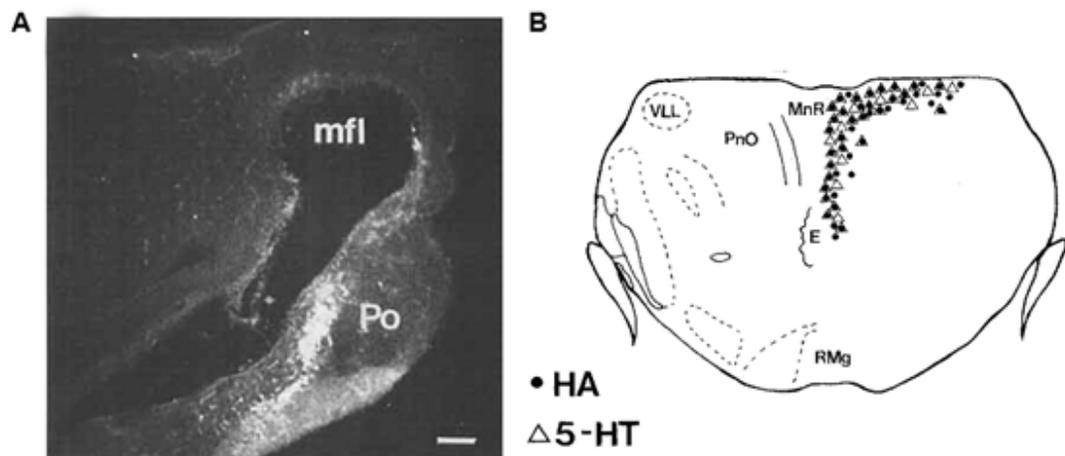
Este receptor tiene una alta afinidad por la histamina (K<sub>i</sub> 15 nM) y, aunque su expresión ha sido reportada tanto a nivel del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) en la amígdala, el hipocampo, el tálamo, la sustancia negra y el neostriado (Schneider et al., 2016) como de la proteína correspondiente en la corteza cerebral, el tálamo y el hipocampo (Conelly et al., 2009; Schneider et al., 2016), su presencia en el SNC aún está en controversia.

### **1.3 El sistema histaminérgico transitorio durante el desarrollo embrionario**

La histamina aparece temprano durante el desarrollo embrionario del SNC, lo cual sugiere una función importante durante este periodo. Auvinen y Panula (1988) reportaron la presencia de neuronas positivas para la histamina en el área del mesencéfalo/romboencéfalo de la rata desde el día embrionario 13 (E13) hasta el día E18 (Figura 2); sin embargo, la presencia de la HDC ha sido reportada a partir de E12 (Solís et al., 2017). Por otra parte, desde E15 las fibras histaminérgicas se observan en la flexura mesencefálica con dirección

rostral hacia el diencéfalo y el telencéfalo, así como en dirección caudal hacia la médula espinal (Auvinen & Panula, 1988; Vanhala et al., 1994).

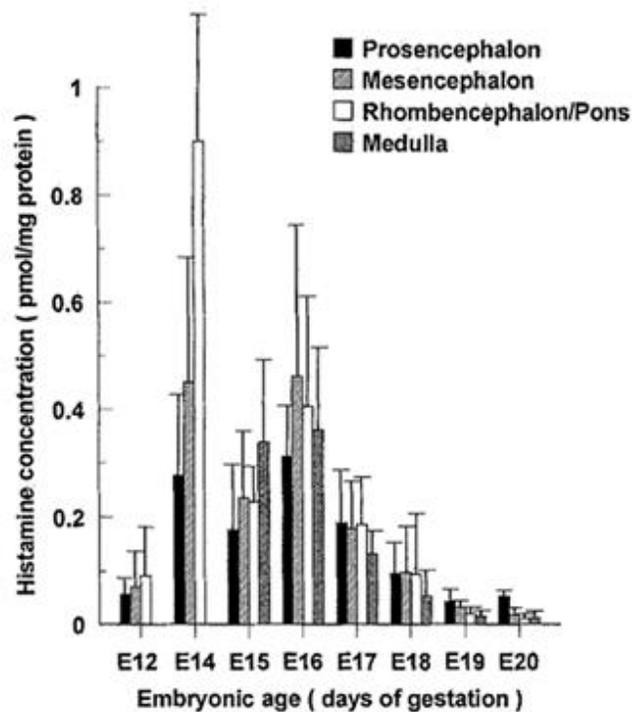
Dado que las neuronas productoras de histamina localizadas en el mesencéfalo/romboencéfalo durante el desarrollo fetal no son las mismas que sintetizarán a la amina en el SNC del adulto, se les ha denominado sistema histaminérgico transitorio (Auvinen & Panula, 1988; Vanhala et al., 1994), el cual corresponde a un grupo de neuronas que co-expresan serotonina (5-HT), y que conformarán a los núcleos del rafé en el cerebro adulto. Para el día E18, la inmunorreactividad a la histamina en este grupo de neuronas disminuye significativamente hasta desaparecer eventualmente, manteniéndose únicamente el fenotipo celular serotoninérgico (Figura 2, Vanhala et al., 1994; Molina-Hernández et al., 2012).



**Figura 2. Sistema histaminérgico transitorio.** A) Inmunodetección de las neuronas positivas a histamina en el área del mesencéfalo/romboencéfalo en cortes parasagitales de embriones de rata E14. B) Esquema de un corte coronal a nivel del núcleo medial del rafé E16 que muestra la localización de células positivas a la histamina (círculos) y serotonina (triángulos). Tomado de Vanhala et al., 1994.

En relación a la histamina misma, su presencia durante el desarrollo del tejido nervioso de la rata se ha reportado desde E12 hasta E20, con un pico en E14, a partir del cual disminuye paulatinamente hasta alcanzar la concentración reportada en el adulto (Figura 3; Vanhala et al., 1994; Karlstedt et al., 2001).

El sistema histaminérgico transitorio no es la única fuente de histamina durante el desarrollo embrionario, ya que la placenta y los mastocitos también la sintetizan (Kinnunen et al., 1991; Solís et al., 2017). Sin embargo, el aporte de esta amina biogénica por los mastocitos ocurre a partir de E17, cuando ocurre la infiltración de estas células hacia el SNC (Kinnunen et al., 1991).

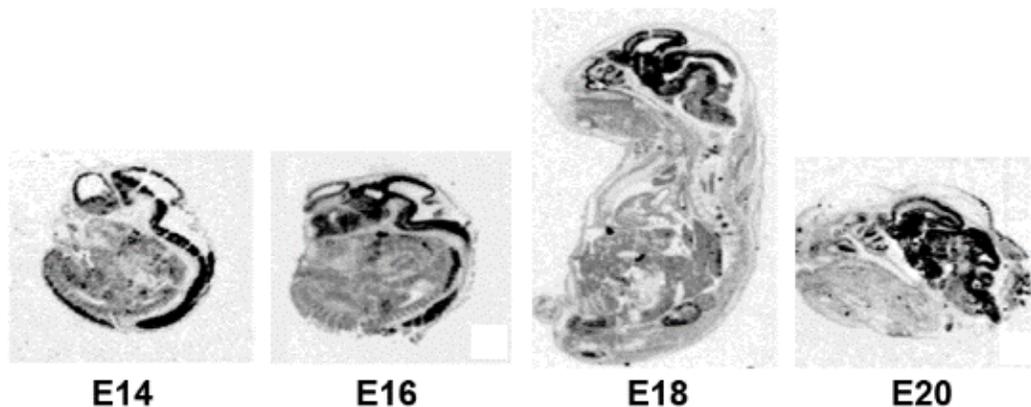


**Figura 3. Niveles de histamina durante el desarrollo embrionario de la rata.** La gráfica muestra el contenido de histamina del día E12 al día E20 en diferentes áreas del sistema nervioso en desarrollo. Tomado de Vanhala et al., 1994.

## 1.4 Función de los receptores a histamina durante el desarrollo embrionario.

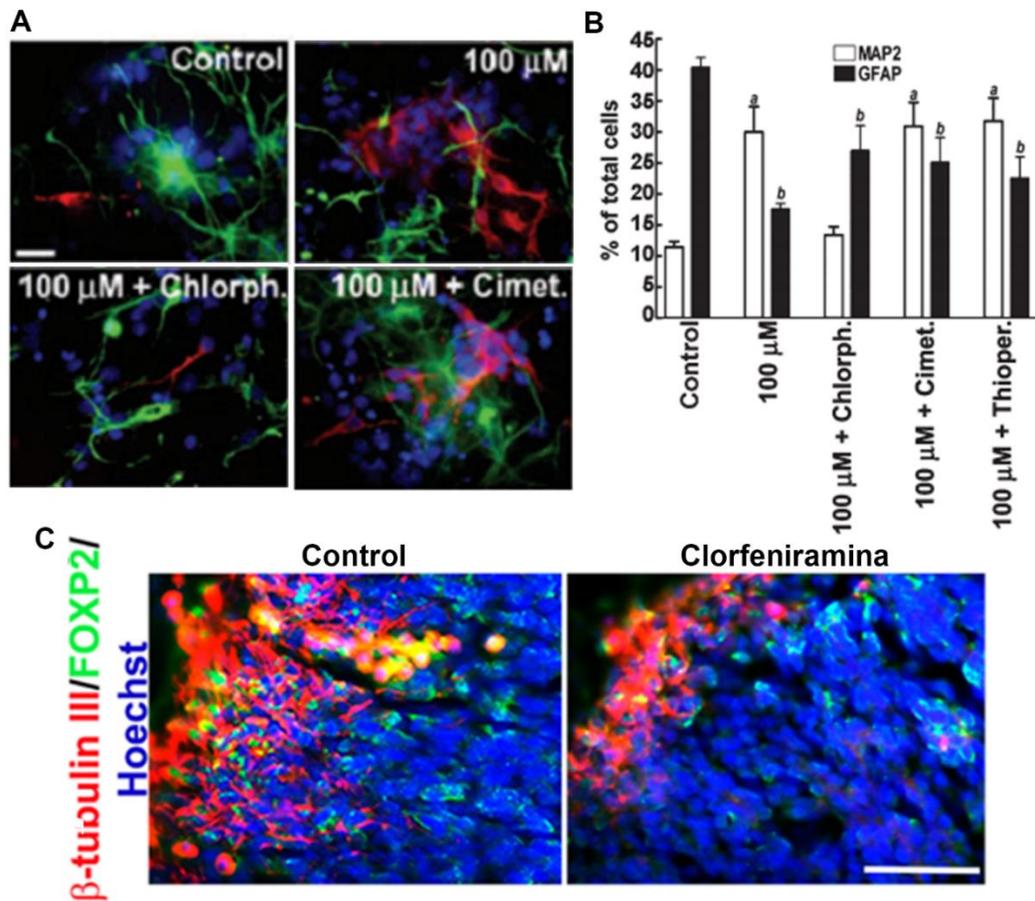
### 1.4.1 Receptor a histamina H<sub>1</sub>

El RNAm del RH<sub>1</sub> se ha reportado en el SNC en desarrollo desde E12 hasta E20 en la rata (Kinnunen et al., 1998; Solís et al., 2017). De manera interesante, en E14 se presenta en todo el tubo neural, y conforme avanza el desarrollo su expresión disminuye considerablemente en la médula espinal (Figura 4; Kinnunen et al., 1998).



**Figura 4. Expresión del RH<sub>1</sub> durante el desarrollo embrionario de la rata.** Imágenes de la hibridación *in situ* para el RNAm del RH<sub>1</sub> en cortes sagitales de embriones de 14, 16, 18 y 20 días. Tomado de Kinnunen et al., 1998.

A pesar de su alta expresión, la función del RH<sub>1</sub> durante el desarrollo no está del todo esclarecida. En células troncales neurales (CTNs) aisladas del neuroepitelio cortical de la rata en E14, y mediante la activación del RH<sub>1</sub> la histamina aumenta la diferenciación neuronal del fenotipo de capa profunda FOXP2 (*Forkhead box protein 2*; Molina-Hernández y Velasco, 2008, Rodríguez-Martínez et al., 2012), mientras que la inyección intrauterina de clorfeniramina (antagonista/agonista inverso del RH<sub>1</sub>) en el lumen ventricular de embriones E12 disminuye la diferenciación del fenotipo FOXP2 (Figura 5; Molina-Hernández et al., 2013).



**Figura 5. El bloqueo del RH<sub>1</sub> disminuye la diferenciación neuronal del neuroepitelio cortical *in vitro* e *in vivo*.** A) Imágenes representativas de las inmunorreactividad en CTNs de las proteínas MAP2 (*microtubule associated protein 2*, marcador de neuronas maduras, rojo), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, marcador de células gliales, verde) y la tinción de los núcleos con DAPI (azul). B) Análisis cuantitativo de las células MAP2<sup>+</sup> o GFAP<sup>+</sup> por grupo. C) Inmunodetección de FOXP2 (verde),  $\beta$ III-tubulina (rojo) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul) en el neuroepitelio cortical de embriones E14 control (inyección con agua) o que recibieron una inyección intrauterina de clorfeniramina (25  $\mu$ g) en lumen ventricular en E12. Tomado de Molina-Hernández y Velasco, 2008 y Molina-Hernández et al., 2013.

De manera relevante, los embriones sometidos a hiperglucemia presentan un aumento en la diferenciación y maduración neuronales (E14), lo que parece estar relacionado con una mayor expresión del RH<sub>1</sub> en E12, ya que la administración sistémica de clorfeniramina a ratas embarazadas en E12

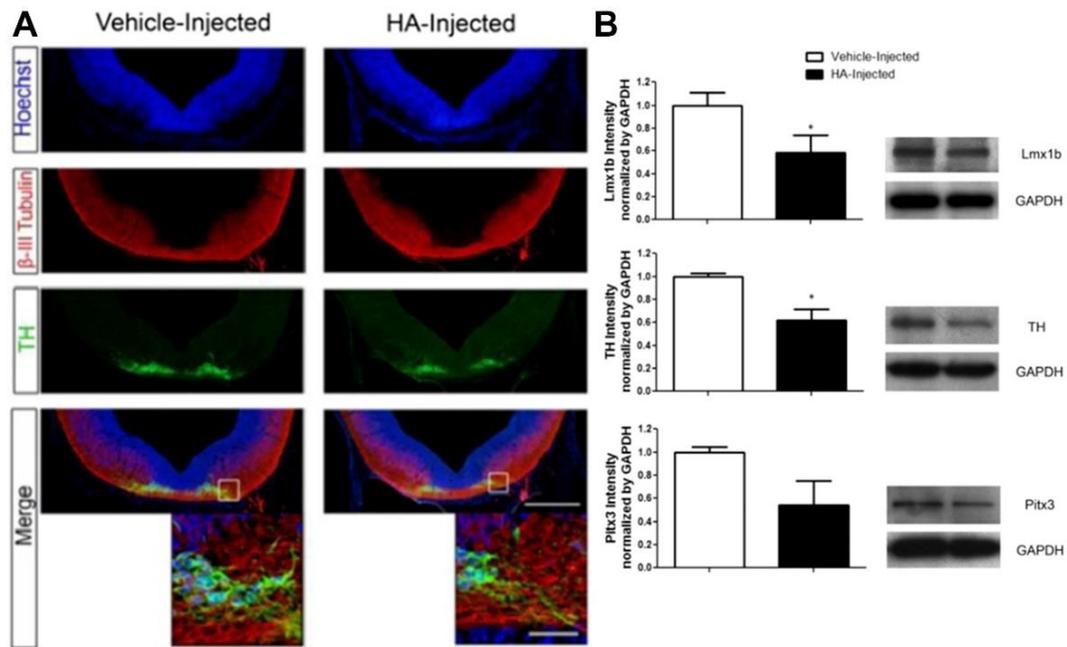
previene este efecto por un mecanismo aún no determinado (Solís et al., 2017).

En relación al desarrollo mesencefálico, Escobedo-Ávila y colaboradores (2014) reportaron que las CTNs aisladas del mesencéfalo ventral (MescV) de embriones de rata E12 expresan al RH<sub>1</sub>. La incubación de estas células con histamina paradójicamente aumenta la población de neuronas jóvenes a una concentración de 10 µM, mientras que a 1 mM disminuye el número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa (TH; E.C. 1.14.16.2). El efecto en la población TH<sup>+</sup> es prevenido por la clorfeniramina.

Experimentos *in vivo* muestran que la inyección de 50 µg de histamina en el lumen ventricular de embriones E12 promueve la disminución de marcadores dopaminérgicos como TH, LMX1a y LMX1b (*LIM homeobox transcription factor 1 alpha and beta*) y PITX3 (*Paired like homeodomain 3*), efecto prevenido por la clorfeniramina (Escobedo-Ávila et al., 2014). Lo anterior sugiere que tanto *in vitro* como *in vivo* el efecto de la histamina en el linaje dopaminérgico es mediado por la activación del RH<sub>1</sub> y que podría tener un papel importante durante el neurodesarrollo del MescV (Figura 6).

#### **1.4.2 Receptor a histamina H<sub>2</sub>**

Datos de nuestro grupo de trabajo muestran la expresión del RH<sub>2</sub> en el SNC en desarrollo desde E12 en embriones de rata (Solís-González, 2015). Karlstedt y colaboradores (2001) observaron por hibridación *in situ* que la mayor expresión del RH<sub>2</sub> en E15 se encuentra en el área rostral y caudal del núcleo del rafé, lo cual coincide con la localización de las neuronas del sistema histaminérgico transitorio, mientras que en E17 la mayor expresión se localiza en el hipotálamo ventral y en la placa cortical en desarrollo (Figura 7).



**Figura 6. La inyección de histamina disminuye el fenotipo dopaminérgico en el MescV de embriones E14.** A) Inmunotinción en cortes coronales del MescV de embriones controles e inyectados con histamina. Se muestra la marca para βIII-tubulina (rojo), TH (verde) y núcleos (azul) presentados en canales separados y el empalme (*merge*). B) Análisis de la expresión proteica en el tejido del MescV para LMX1b, TH y PITX3 del grupo control e inyectado con histamina. Tomado de Escobedo-Ávila et al., 2014.

La expresión del RH<sub>1</sub> también ha sido reportada en CTNs aisladas del neuroepitelio cortical y mesencefálico de embriones E14 y E12, respectivamente (Molina-Hernández y Velasco 2008, Escobedo-Ávila et al., 2014).

La posible participación del RH<sub>2</sub> durante el desarrollo ha sido menos estudiada; sin embargo, parece tener una función importante en la proliferación y migración celulares, ya que en CTNs aisladas del neuroepitelio cortical de embriones E14 el aumento en la proliferación inducido por la histamina es prevenido por la cimetidina (antagonista del RH<sub>2</sub>), mientras que el análisis clonal en CTNs indica que el bloqueo del RH<sub>2</sub> promueve colonias de menor tamaño (Molina-Hernández y Velasco, 2008).

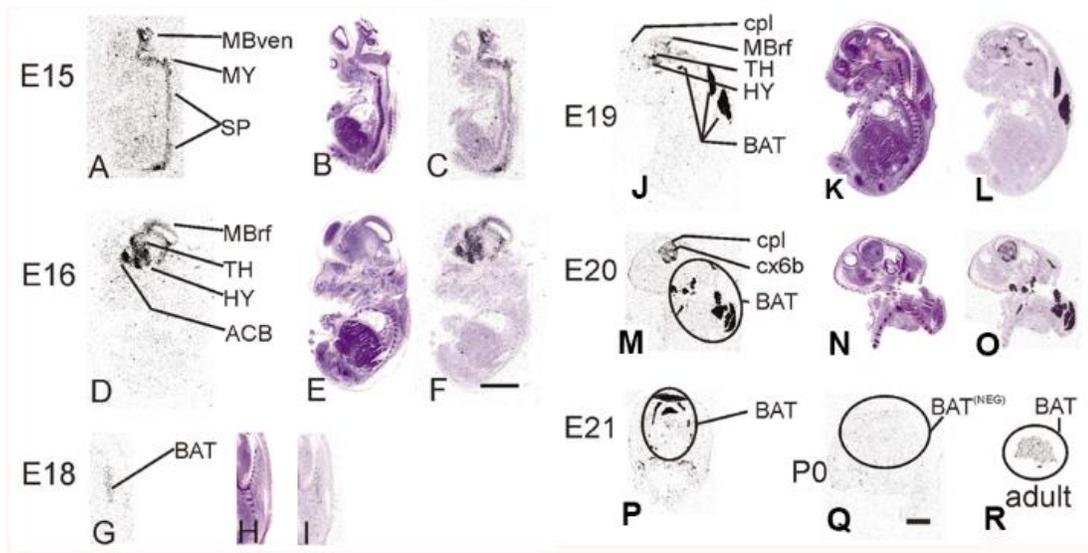


**Figura 7. Expresión del RH<sub>2</sub> durante el desarrollo embrionario de la rata.** Hibridación *in situ* para el RNAm del RH<sub>2</sub> en cortes sagitales de embriones de rata E17 y E15. Las flechas indican zonas de alta expresión del RH<sub>2</sub> en el SNC en desarrollo. Tomado de Karlstedt et al., 2001.

### 1.4.3 Receptor a histamina H<sub>3</sub>

El RH<sub>3</sub> se expresa desde E15 en el mesencéfalo, el tallo cerebral y la médula espinal; en E16 se observa en el tálamo, el hipotálamo y el núcleo *accumbens*; en E19 se detecta en la lámina 6 de la placa cortical y, para E20 y E21 la marca se observa distribuida en todas las láminas de la placa cortical, lo que sugiere una función importante en el neurodesarrollo tardío de estas estructuras (Figura 8; Karlstedt et al., 2003).

Hasta el momento no se conoce la función del RH<sub>3</sub> durante el desarrollo del SNC, y aunque no participa en la proliferación neural o la diferenciación neuronal, el RNAm correspondiente se expresa en CTNs del neuroepitelio cortical y mesencefálico de rata en E12 y E14, respectivamente (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Escobedo-Ávila et al., 2014).



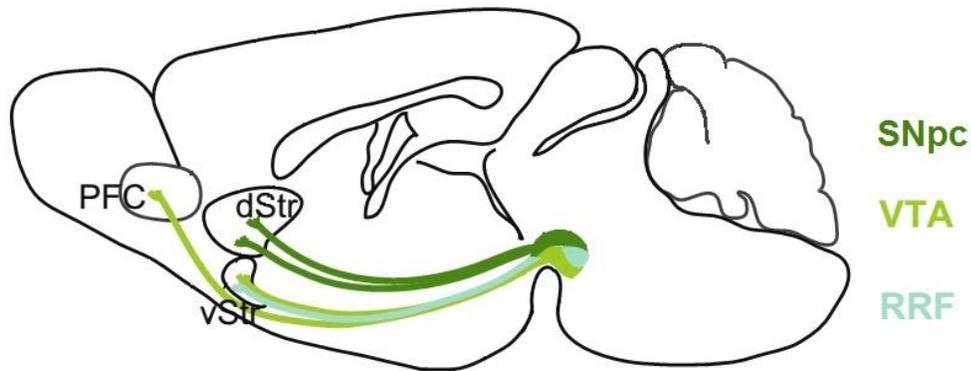
**Figura 8. Expresión del RH<sub>3</sub> durante el desarrollo embrionario de la rata.** Cortes sagitales de embriones que muestran en los paneles A, D, G, J, M, y P la hibridación *in situ* del RNAm del RH<sub>3</sub>. Los paneles B, E, H, K, N, y Q corresponden a la tinción con hematoxilina-eosina. Los paneles C, F, I, L, O, y R muestran el empalme de las imágenes. MBven, mesencéfalo ventral; MY, bulbo raquídeo; SP, médula espinal; MBrf, mesencéfalo dorsal; TH, tálamo; HY, hipotálamo; ACB, núcleo accumbens; BAT, tejido adiposo; cpl; placa cortical; cx6b; lámina 6b de la corteza cerebral. Modificado de Karlstedt et al., 2003.

#### 1.4.4 Receptor a histamina H<sub>4</sub>

Hasta el momento no existen reportes de la expresión o función del RH<sub>4</sub> en el SNC en desarrollo.

#### 1.5 Sistema dopaminérgico del mesencéfalo ventral

En el SNC adulto, aproximadamente 75% de las neuronas dopaminérgicas (nDAs) se localizan en el MescV, con un total de 400,000-600,000 y 30,000-40,000 neuronas en el humano y la rata, respectivamente (German et al., 1983; Pakkenberg et al., 1991).

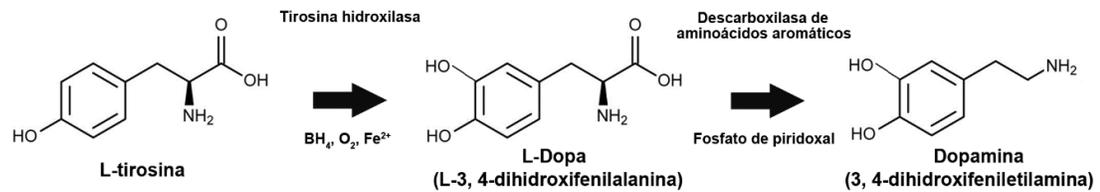


**Figura 9. Núcleos dopaminérgicos del MescV.** Esquema de los tres núcleos dopaminérgicos y sus proyecciones: la sustancia negra parte compacta (SNpc), que inerva el neostriado dorsal (dStr); el área ventral tegmental (VTA), que proyecta al neostriado ventral (vStr) y corteza prefrontal (PFC); y el área retrorrubral (RRF) que inerva al vStr. Modificado de Bodea et al., 2015.

A partir del MescV se originan tres núcleos de nDAs, denominados A9, A10 y A8. El núcleo A9 o sustancia negra parte compacta (SNpc) inerva al neostriado originando la vía nigro-estriatal, parte del circuito de los ganglios basales que controlan el movimiento voluntario. El núcleo A10 o área tegmental ventral (VTA, *ventral tegmental area*) inerva el núcleo accumbens, la corteza prefrontal y estructuras límbicas formando la vía meso-corticolímbica que participa en los mecanismos de recompensa. El núcleo A8 o retrorrubral participa en la regulación de las vías nigro-estriatal y meso-corticolímbica (Figura 9; Bahena-Trujillo et al., 2000; Abeliovich et al., 2007; Bodea et al., 2015).

La síntesis de dopamina requiere dos reacciones químicas secuenciales; en la primera el aa L-tirosina es hidroxilado por la enzima TH formando L-DOPA, la cual es descarboxilada en una segunda reacción por la enzima descarboxilasa de amino ácidos aromáticos para generar a la dopamina (Figura 10; Bahena-Trujillo et al., 2000). La TH es la enzima limitante de la síntesis de las catecolaminas, y su actividad es regulada por la fosforilación en las Serinas 8, 19, 31 y 40, con el último residuo considerado el de mayor

importancia funcional ya que su fosforilación aumenta significativamente la actividad de la enzima (Bobrovskaya et al., 2004).



**Figura 10. Síntesis de dopamina.** Esquema de la síntesis de dopamina por la acción secuencial de dos enzimas que convierten al amino ácido L-tirosina en dopamina.

Una vez sintetizada, la dopamina es introducida a las vesículas sinápticas por el VMAT2, y el arribo de potenciales de acción a la terminal sináptica promueve su liberación por exocitosis inducida por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, la dopamina puede ser liberada de manera independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , por interacción de fármacos con el transportador de dopamina (DAT, *dopamine transporter*), y un ejemplo es la meta-anfetamina, que invierte la función de DAT induciendo la liberación del neurotransmisor al medio extracelular (Calipari et al., 2013; Rivière et al., 1999).

La acción de la dopamina es finalizada por la captura por el DAT, ingresando la dopamina a la terminal sináptica para ser degradada o vesiculada nuevamente (Reith et al., 1997).

La dopamina ejerce sus efectos a través de la activación de dos familias de receptores denominadas  $\text{D}_1$  y  $\text{D}_2$ . Ambas familias pertenecen a los receptores acoplados a proteínas G, presentando siete dominios transmembranales interconectados por tres asas citoplasmáticas y tres asas extracelulares. La región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glucosilado, mientras que el carboxilo terminal es intracelular. La interacción con la proteína

G de este receptor ocurre en el carboxilo terminal y la tercera asa intracelular (Bahena-Trujillo et al., 2000).

### **1.5.1 Familia de receptores D<sub>1</sub>**

Los miembros de la familia D<sub>1</sub> de receptores a dopamina (RD<sub>1</sub> y RD<sub>5</sub>) presentan una región carboxilo terminal larga con múltiples residuos de Serina y Treonina susceptibles de ser fosforilados por la PKA y la PKC (Beaulieu et al., 2015).

Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas G $\alpha_s$ , por lo que promueven la activación de la adenilil ciclasa y la formación de AMPc, induciendo la activación de la PKA y de otras proteínas reguladas por el nucleótido cíclico. Entre los blancos de la PKA se encuentra la fosfoproteína DARPP-32 (*dopamine-regulated neuronal phosphoprotein 32*; Beaulieu et al., 2015), importante para la señalización dopaminérgica.

Aunque las vías de señalización activadas por los RD<sub>1</sub> y RD<sub>5</sub> son similares, su distribución y afinidad por la dopamina son diferentes. El RD<sub>1</sub> ha sido detectado con una alta expresión en el neostriado, el núcleo accumbens y la sustancia negra; y el RD<sub>5</sub> en el hipocampo y núcleos talámicos. En cuanto a su afinidad por la dopamina, el RD<sub>1</sub> presenta una K<sub>i</sub> de 2  $\mu$ M, mientras que el RD<sub>5</sub> tiene una K<sub>i</sub> de 50 nM (Bahena-Trujillo et al., 2000).

### **1.5.2 Familia de receptores D<sub>2</sub>**

La familia de receptores D<sub>2</sub> (RD<sub>2</sub>, RD<sub>3</sub> y RD<sub>4</sub>) tienen una tercera asa intracelular larga, rica en residuos de Serina y Treonina que pueden ser fosforilados por diversas cinasas regulando de esta manera el acople a la proteína G (Bahena-Trujillo et al., 2000).

Los receptores de esta familia se acoplan a proteínas G $\alpha_{i/o}$ , por lo que su activación inhibe a las adenilil ciclasas disminuyendo la síntesis de AMPc. Por otra parte, el heterodímero G $\beta\gamma$  inhibe canales de Ca<sup>2+</sup>, disminuyendo la entrada de este catión y consecuentemente la liberación por exocitosis de

diversos neurotransmisores, incluyendo a la dopamina (Beaulieu et al., 2015; Rice et al., 2011). El neostriado, el núcleo accumbens y VTA son áreas con alta expresión del RNAm del RD<sub>2</sub>; el hipotálamo, los núcleos del tálamo y el cerebelo presentan altos niveles del RNAm del RD<sub>3</sub>; y el RD<sub>4</sub> presenta alta expresión en la corteza frontal, el bulbo olfatorio, el mesencéfalo y la retina. La afinidad por la dopamina de los RD<sub>2</sub>, RD<sub>3</sub> y RD<sub>4</sub> es 2  $\mu$ M, 30 nM y 450 nM, respectivamente (Bahena-Trujillo et al., 2000).

## **1.6 Desarrollo embrionario del sistema dopaminérgico**

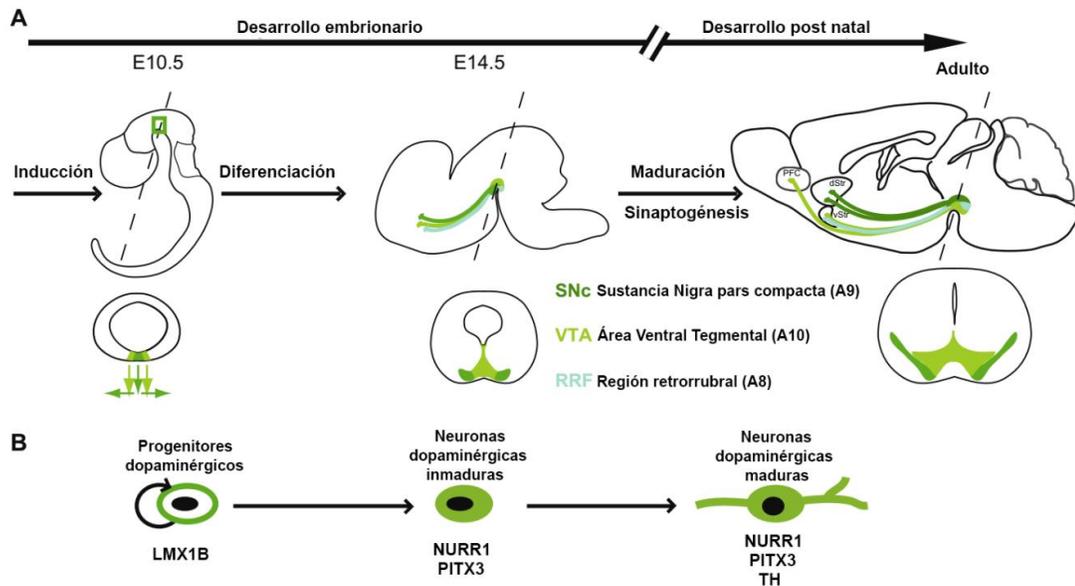
Durante el desarrollo embrionario el sistema dopaminérgico es uno de los primeros sistemas neurotransmisores en aparecer. En el cerebro humano se han reportado células TH<sup>+</sup> en el MescV desde la 5<sup>a</sup> semana post-concepción (spc), presentando un aumento importante entre la 6<sup>a</sup> y la 8<sup>a</sup> spc. Se ha estimado que la diferenciación dopaminérgica finaliza entre las spc 10 y 11, y es hasta el final del primer trimestre (12 spc) que el neostriado presenta fibras TH<sup>+</sup> (Freeman et al., 1991; Almqvist et al., 1996; Nelander et al., 2009). Este período del desarrollo dopaminérgico en el cerebro humano corresponde en la rata al período embrionario E12 a E15, detectándose las primeras células TH<sup>+</sup> en el MescV y el arribo de las fibras dopaminérgicas al neostriado, respectivamente (Abeliovich et al., 2007; Bodea et al., 2015).

En la rata el desarrollo dopaminérgico puede dividirse en 3 etapas: 1) Establecimiento del dominio del mesencéfalo (E8); 2) Proliferación y diferenciación de los progenitores dopaminérgicos (E10-12); y 3) Migración de las nDAs y establecimiento de las proyecciones dopaminérgicas (E12-E14; Figura 11).

### **1.6.1 Establecimiento del dominio del mesencéfalo**

El establecimiento de los diferentes dominios del SNC depende de una interacción compleja entre las cascadas de señalización, los morfógenos, los factores de crecimiento y los factores de transcripción. El establecimiento del

dominio mesencefálico inicia alrededor del día E8 en la rata, momento en el que se encuentran las primeras CTNs, también llamadas glia radial (GR), células con alta capacidad de autorrenovación y que por acción de diferentes moléculas señaladoras darán origen a las nDAs.



**Figura 11. Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del MescV.** A) Esquema del desarrollo del sistema dopaminérgico en vistas sagital y coronal, desde el día E10.5 posterior a la inducción del fenotipo dopaminérgico se da paso a la proliferación seguida de la diferenciación neuronal que inicia en E12, el envío de los axones hacia sus diferentes blancos en el telencéfalo para el día E14.5 y la formación de los tres núcleos dopaminérgicos en el cerebro adulto (la RRF no es visible debido a que se encuentra en un corte más caudal). B) Factores importantes para las etapas de autorrenovación de progenitores neurales, de neuronas dopaminérgicas inmaduras y de neuronas dopaminérgicas maduras. Modificado de Bodea et al., 2015.

Los cuerpos celulares de las CTNs del MescV se localizan en la zona ventricular (ZV) del neuroepitelio desde donde envían un proceso apical hacia la zona marginal (ZM), también llamada área de diferenciación, lo que favorecerá la migración radial de los neuroblastos en etapas posteriores del desarrollo. Las CTNs o GR puede ser identificadas por la expresión de vimentina, nestina, LMX1a, SOX2 y SOX6 (*sex determining región Y-box 2 and*

6), GLAST (*glutamate astrocyte transporter*) y BLBP (*brain lipid-binding protein*; Bonilla et al., 2008; Hebsgaard; 2009; Panman et al., 2014). De manera interesante, tanto en los roedores como en el humano se han reportado subpoblaciones de CTNs que presentan perfiles de expresión específicos a los que se les ha relacionado con el origen de las neuronas de los diferentes núcleos dopaminérgicos (La Manno et al., 2016).

Para el establecimiento del dominio mesencefálico, una de las primeras señales de inducción es el gradiente espacio-temporal del morfógeno *sonic hedgehog* (SHH), secretado por las células de la línea media de la placa del piso del tubo neural (Hegarty et al., 2013), y esencial para determinar las subpoblaciones de progenitores dopaminérgicos mesencefálicos (Joksimovic et al., 2009).

Otra molécula importante para el establecimiento del mesencéfalo es el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8), secretado por el istmo, estructura considerada un centro organizador secundario para delimitar el mesencéfalo del romboencéfalo. La importancia de la señalización activada por FGF8 es evidenciada por la formación de tejido mesencefálico ectópico en el diencéfalo expuesto a este factor, y la carencia de mesencéfalo posterior y cerebelo en embriones de ratón que presentan alelos hipomorfos para FGF8 (Crossley et al., 1996; Meyers et al., 1998).

El FGF8 determina el dominio mesencéfalo/romboencéfalo mediante la inducción de la expresión anterior-caudal de los factores de transcripción OTX2 (*orthodenticle homologue 2*) y GBX2 (*gastrulation brain homeobox 2*). Estos factores tienen la característica de reprimirse mutuamente por lo que los dominios de expresión de OTX2 (mesencéfalo) carecen de la expresión de GBX2 (romboencéfalo anterior). Otros factores importantes para el establecimiento del mesencéfalo son WNT1 y WNT5a (*wingless-related MMTV integration site 1 and 5a*; Prakash et al., 2006), EN1/2 (*Engrailed-1/2*; Liu y Joyner et al., 2001), PAX2 (*Paired box2*; Bouchard et al., 2005; Schwarz et al., 1999) FOXA 1/2 (*Forkhead A1/A2*; Lin et al., 2009), LMX1a y LMX1b

(Guo et al., 2007, Matsunaga et al., 2002), ya que la ausencia o disminución de alguno de estos factores promueven alteraciones en el desarrollo del MescV.

### **1.6.2 Proliferación y diferenciación de los progenitores neurales dopaminérgicos**

Conforme el desarrollo avanza en el ratón, la proliferación de las CTNs del MescV se mantiene para dar origen de E9.5 a E11.5 a la población de progenitores dopaminérgicos neurales positivos a LMX1a, LMX1b, SOX2, MSH 1/2 (*Msh Homeobox 1 and 2*) y Ki67 (*Proliferation-Related Ki-67 Antigen*) para adquirir el compromiso hacia el fenotipo dopaminérgico del E10.5 al E12.5 (Yan et al., 2011; Ang et al., 2006; Guerrero-Flores et al., 2017).

Cabe señalar que la población de progenitores neurales del MescV no es homogénea dadas sus diferencias en su localización anatómica, así como en la expresión diferencial de factores que dirigen su diferenciación hacia las nDAs que conformarán los diferentes núcleos, de manera que los progenitores mediales darán origen a las neuronas de la SNpc y los laterales a las neuronas del VTA (Bodea et al., 2014; Poulin et al., 2014; La Manoo et al., 2016).

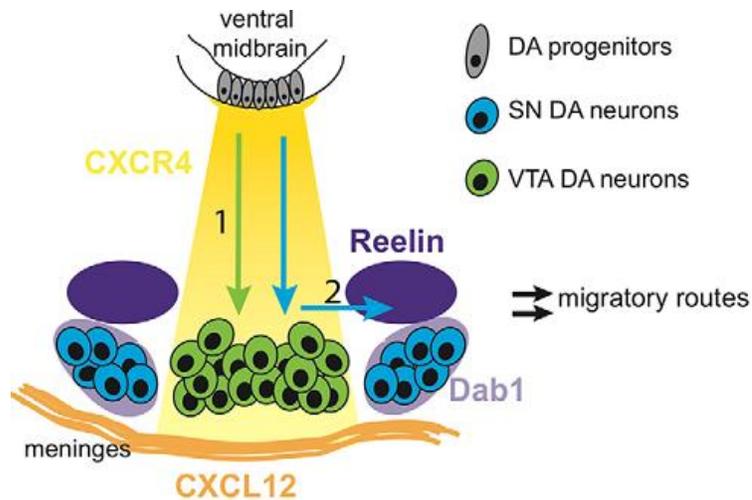
Durante la etapa proliferativa, LMX1a y 1b regulan la expresión de WNT1, lo que promueve la disminución de la expresión de la ciclina D2 (proteína activadora del ciclo celular); así como el aumento en la expresión del inhibidor de cinasas dependiente de ciclina p27<sup>Kip1</sup>, que en conjunto promueven la salida del ciclo celular de los progenitores y el inicio de la diferenciación neuronal (Yan et al., 2011). En la rata, el pico neurogénico de las nDAs que darán origen a la SNpc ocurre entre los días E11.5 y E12.5 (Gates et al., 2006), y las neuronas recién nacidas expresan los marcadores neuronales NGN2 (*neurogenin-2*),  $\beta$ III-tubulina (también conocido como Tuj1) y Nurr1 (*nuclear receptor related 1 protein*), mientras que los neuroblastos comprometidos hacia nDAs de la SNpc se pueden distinguir por la expresión adicional de NeuroD 1/2 (*neuronal differentiation 1/2*) y EBF2 (*early B cell factor*, Blaess y Ang, 2015; La Manoo et al., 2016).

La maduración inicial de las neuronas está mediada por la expresión de PITX3, TH, aldehído deshidrogenasa A1 (ALDH1A1), el transportador de dopamina (DAT, SLC6A3), sinaptotagmina 17 (SYT17), LMO3 (*LIM domain only 3*) y BNC2 (*basonuclin 2*; La Manno et al., 2016).

### **1.6.3 Migración de neuroblastos y nDAs y establecimiento de las proyecciones dopaminérgicas**

En la rata el proceso de migración inicia en E12 (Kawano et al., 1995). La formación de los diferentes núcleos que componen al sistema dopaminérgico del MescV ocurre a partir de la adecuada migración radial y tangencial de los neuroblastos y de las nDAs, respectivamente. Se ha sugerido que la migración radial es mediada por la quimiocina CXCL12 secretada por las meninges, mientras que la tangencial por la glicoproteína reelina, secretada por las células que conformarán al núcleo rojo (Bodea et al., 2014). Además de reelina, la migración tangencial de las neuronas que conformarán a la SNpc está mediada por la expresión de receptores a reelina, APOER2 (*APOE receptor 2*) y VLDLR (*very low density lipoprotein receptor*) (Figura 12; Bodea et al., 2014; Vaswani et al., 2019).

En apoyo a lo anterior, los ratones deficientes de reelina (*Reeler*) son incapaces de formar el núcleo dopaminérgico de la SNpc, indicando que la vía de señalización activada por reelina es necesaria para el establecimiento de este núcleo (Kang et al., 2010; Nishikawa et al., 2003).



**Figura 12. Migración de neuronas dopaminérgicas.** Las neuronas que conformarán la SNpc migrarán radialmente dirigidas por el gradiente de CXCL12 y posteriormente migrarán tangencialmente guiadas por el gradiente de reelina, mientras que las neuronas que formarán la VTA migrarán únicamente por migración radial dirigida por CXCL12. Tomado de Bodea et al., 2014.

Una vez que las nDAs arriban a su posición final en el MescV inicia el crecimiento axonal, de tal manera que los primeros axones con orientación rostral son evidentes alrededor de E12.5 en la rata. El direccionamiento axonal hacia el telencéfalo está regulado por la expresión espacio-temporal de moléculas quimiorrepelentes como Semaforina 3F y 3A, Netrina 1, y SLIT 3 y 1 (Prestoz et al., 2012). En E13.5, se observan dos fascículos ipsilaterales que conforman el haz medial del cerebro anterior. Estos axones pasan a través del diencefalo y se alejan de esta zona gracias a la expresión de Netrina 1, Semaforina 3A, y SLIT 1 y 2, que dirigen a los axones a la zona dorsal del telencéfalo hacia sus blancos (Prestoz et al., 2012; Brignani et al., 2017). En E14 se observan las primeras terminales axónicas en el neoestriado dorsal –provenientes de la SNpc y del VTA dorsolateral–, y neoestriado dorsomedial –originadas en la SNpc– para formar la vía nigro-estriatal. En el neoestriado de la rata, las terminales de las nDAs de la SNpc generan una extensa arborización axónica, de tal manera que una nDA puede establecer contacto sináptico hasta con 75,000 neuronas posicionadas en las regiones de matriz y

parche del neostriado (Matsuda et al., 2009). Por otro lado, las nDAs del VTA proyectan hacia la corteza prefrontal, la amígdala y el núcleo *accumbens* formando la vía mesocorticolímbica (Björklund et al., 2007).

Durante el crecimiento axónico desde el MscV hasta sus diferentes blancos, los axones dopaminérgicos expresan diferentes receptores de moléculas que participan en la guía axónica, algunos de estos receptores son Neuropilina 1 y 2, DCC (*deleted in colorectal carcinoma*) y ROBO 1 y 2 (*roundabout guidance receptor 1 and 2*). Se ha reportado que la ausencia de alguna de estas proteínas promueve la formación de fascículos aberrantes y la falta de conectividad con sus blancos en el telencéfalo (Bagri et al., 2002; Dugan et al., 2011; Li et al., 2014; Xu et al., 2010).

## 2. Justificación

Los sistemas histaminérgico y dopaminérgico aparecen en etapas tempranas del desarrollo embrionario. El RNAm del RH<sub>1</sub> se expresa en el área del MescV en embriones de rata desde E14 hasta E20, aunque datos previos muestran la expresión del receptor en CTNs del MescV desde E12. Asimismo, se ha reportado la presencia de histamina durante el desarrollo embrionario de la rata desde E12 hasta E20, con la mayor cantidad en el tejido nervioso en E14, sugiriendo un sistema histaminérgico central activo durante el desarrollo embrionario, al que se ha denominado sistema histaminérgico transitorio.

Lo anterior es corroborado por la inyección de histamina en el lumen ventricular de embriones E12, que promueve la disminución de la diferenciación dopaminérgica en E14, efecto prevenido por la clorfeniramina, antagonista/agonista inverso del RH<sub>1</sub>, indicando que el efecto de la histamina es mediado por activación de dicho receptor y sugiriendo su participación en la diferenciación y la maduración dopaminérgicas (Escobedo-Ávila et al., 2014).

El desarrollo del sistema dopaminérgico coincide con el sistema histaminérgico transitorio, por lo que se puede considerar que el bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> en una etapa crítica del desarrollo dopaminérgico provocará alteraciones en la diferenciación, migración y/o maduración de las neuronas dopaminérgicas, lo cual podría generar afectaciones en la función dopaminérgica en la vida postnatal.

Por lo anterior, el propósito de la presente tesis fue evaluar en la rata el efecto a corto (E14 y E16) y a largo plazo (P21) del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> durante la diferenciación e inicio de la maduración de las neuronas dopaminérgicas (E12-E14), en el sistema dopaminérgico nigro-estriatal.

### **3. Hipótesis**

El receptor H<sub>1</sub> participa en la neurogénesis mesencéfala fetal *in vivo*, por lo que su bloqueo farmacológico alterará la inervación dopaminérgica al neoestriado, provocando cambios funcionales y citoarquitectónicos postnatales.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar si el bloqueo del receptor  $H_1$  en la etapa prenatal modifica la diferenciación neuronal dopaminérgica y la innervación nigro-estriatal.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la expresión del  $RH_1$  en tejido embrionario E12 y E14.
2. Establecer el efecto del bloqueo del  $RH_1$  (E12 a E14) en la diferenciación dopaminérgica mesencefálica en E14 y E16.
3. Determinar el efecto del bloqueo del  $RH_1$  (E12 a E14) en la diferenciación dopaminérgica a largo plazo (día postnatal 21, P21).
4. Establecer si bloqueo del  $RH_1$  (E12 a E14) altera la innervación dopaminérgica al neostriado en ratas P21.
5. Determinar si el bloqueo del  $RH_1$  (E12 a E14) modifica el contenido de dopamina en el neostriado de ratas P21.
6. Evaluar si el bloqueo del  $RH_1$  (E12 a E14) altera la liberación de dopamina en el neostriado de ratas P21.
7. Determinar si el bloqueo del  $RH_1$  (E12 a E14) altera la actividad locomotora inducida por meta-anfetamina de las ratas P21.

## 5. Métodos

### 5.1 Animales

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (NIH No. 80-23, revisado 1978) y la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo fue aprobado por los Comités de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio del Cinvestav y del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), así como por los Comités de Investigación, Bioseguridad y Ética del INPer (Número de Registro 3230-21202-01-2015).

Se utilizaron ratas hembra Wistar (230-300 g) en la fase de estro (determinado por el valor de impedancia eléctrica), las cuales se colocaron con un macho sexualmente maduro durante la fase oscura (19:00-7:00 hrs.) en las instalaciones del Cinvestav, y la mañana siguiente se definió como E0.5. Las ratas gestantes fueron transportadas 24 h después al bioterio del INPer, donde fueron colocadas en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum* y mantenidas en condiciones de temperatura constante ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo luz:oscuridad de 12:12 h y humedad relativa de 40%.

En el día E12 las ratas preñadas fueron asignadas de manera aleatoria a uno de los dos grupos experimentales (control o clorfeniramina). El grupo control recibió por vía intraperitoneal el vehículo (agua inyectable, Laboratorios PiSA, S.A. de C.V., Guadalajara, Jal., México), mientras que el grupo clorfeniramina recibió 5 mg/kg del fármaco (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) en los días E12, E13 y E14.

Los embriones de los días E14 y E16 fueron obtenidos por cesárea después de la decapitación de la rata gestante, y se colocaron en solución Krebs (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 12 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 7 mM glucosa, 0.1% rojo fenol, 0.3% albúmina de suero bovino (BSA), and 3% de sulfato de magnesio; pH 7.4 a  $4^\circ\text{C}$ ), o en solución amortiguadora de fosfatos (PBS; pH 7.4, a  $4^\circ\text{C}$ ). Para la técnica de inmunohistoquímica, los embriones fueron

fijados por inmersión en solución fijadora de Bouin (9.25% formaldehído, 5% ácido acético glacial, 0.9% ácido pícrico) durante 48 h a 4°C seguido de un gradiente de sacarosa al 15% y 30% por 24 h en cada solución para su crioprotección, mientras que para el análisis por RT-PCR y *Western blot* fueron lavados con PBS frío, y el MescV se disecó usando un microscopio estereoscópico (Olympus SZX16, Shinjuku, Tokio, Japón).

Las crías de 21 días de edad de ambos sexos fueron sacrificadas por decapitación para la obtención del neostriado o la SNpc para los ensayos de liberación y contenido de dopamina. En otra serie de experimentos, las crías fueron inyectadas con una sobredosis de pentobarbital (50 mg/kg, ip) y sometidas a perfusión transcardiaca con 60 ml de PBS a temperatura ambiente, seguido de 60 ml de solución de Bouin, a un flujo constante de 0.6 ml/min (Masterflex, Barrington, IL). Los cerebros fueron removidos del cráneo y colocados en solución de Bouin durante 48 h a 4°C y posteriormente en una solución de sacarosa al 30% por toda la noche.

## **5.2 Extracción de RNA y RT-PCR en punto final**

Para evaluar la expresión del RH<sub>1</sub> se utilizó el tejido de 4-6 mesencéfalos ventrales de embriones E12 y E14 de una misma rata, para un total de 5 ratas preñadas. El RNA total se extrajo utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las indicaciones del proveedor. La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó mediante reacciones de retrotranscripción (RT) con 1 µg de RNA total incubando a 70°C por 10 min, para después agregar la mezcla de reacción: 2 µl de solución amortiguadora de retrotranscripción (10×), 1 mM de la mezcla de dinucleótidos trifosfatados (dNTPs), 0.5 µg de hexámeros aleatorios, 0.5 µL de inhibidor de ribonucleasas (40 U/µL), 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) y 5 U de la enzima AMV Retrotranscriptasa (Promega, Madison, WI) para un volumen final de 20 µL. La mezcla fue incubada a 42°C por 60 min y la reacción se inactivó a 95°C durante 5 min.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a 800 ng de cDNA se les agregó la mezcla de reacción que contenía 5 µL de solución amortiguadora de PCR (5x), 0.4 mM de la mezcla de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de oligonucleótido sentido (S), 20 pmol de oligonucleótido antisentido (AS), 1.25 U de la enzima Taq DNA Polimerasa (Promega, Madison, WI) y agua libre de nucleasas para un volumen final de 25 µL. Las secuencias de los oligonucleótidos (en orientación 5´-3´) y el tamaño de fragmentos esperados fueron los siguientes: RH<sub>1</sub>, sentido: CTTCTACCTCCCCACTTTGCT, antisentido: TTCCCTTTCCCCCTCTTG (292 pb); GAPDH, sentido: GGACCTCATGGCCTACATGG, antisentido: CCCCTCCTGTTGTTATGGGG (180 pb; Integrated DNA Technologies, Skokie, IL; Solís et al, 2017).

La mezcla fue sometida a una desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineación a 56°C para el RH<sub>1</sub> o 58°C para GAPDH durante 30 s y de extensión a 72°C por 30 s, con un período de extensión final a 74°C durante 10 min. Los productos y el marcador de pares de bases (Axygen, Union City, CA) fueron mezclados con GelRed (Biotium, Hayward, CA) y cargados en un gel de agarosa al 2%. Las bandas correspondientes fueron observadas usando luz UV y digitalizadas en un fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio-imaging systems, Neve Yamin, Israel).

Como control positivo de la expresión del receptor se utilizó tejido de la corteza cerebral de rata adulta y como control negativo en la reacción se sustituyó el cDNA por RNA. El análisis cuantitativo se realizó con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012).

Para verificar que las secuencias de los productos amplificados correspondían a fragmentos del RH<sub>1</sub> y de GAPDH, se seleccionaron bandas representativas que fueron purificadas del gel usando el *kit* Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, Irvine, CA) y secuenciadas en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

### 5.3 Inmunohistoquímica

Para la obtención de cortes, el tejido previamente fijado fue congelado y montado en Tissue-Tek® (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA), y con un criostato (Leica CM1850 UV, Wetzlar, Alemania) se obtuvieron cortes de 10 µm (E14 y E16) o de 30 µm (P21) de grosor a nivel del MescV, la SNpc o el neostriado, que fueron recuperadas en laminillas silanizadas (Polysciences, Warrington, PA). La inmunohistoquímica del tejido embrionario se realizó en cuatro cortes consecutivos de dos embriones por rata, para un total de cinco ratas gestantes por grupo experimental. Para las crías P21 se utilizaron cuatro cortes consecutivos de una rata de cada sexo por camada, para un total de cuatro camadas por grupo.

Las rebanadas fueron lavadas en PBS-0.1% BSA, se bloquearon y permeabilizaron con una solución de PBS que contenía 10% suero normal de cabra y 0.3% de Triton-X100 durante 45 min. Se incubaron por toda la noche con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con 10% suero normal de cabra (Tabla 1). Al día siguiente las rebanadas fueron lavadas con PBS para eliminar el anticuerpo no unido, y se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes durante 1 h (Tabla 1). Al término de la incubación, se tiñeron los núcleos con DAPI (5 ng/mL, Sigma–Aldrich) o DRAQ5 (5 µM; Abcam, Cambridge, MA), como control interno para la fluorescencia cuantitativa. Finalmente, las rebanadas fueron lavadas con PBS y montadas con Aqua PolyMount (Polysciences). Para los controles negativos se omitió el anticuerpo primario.

<b>Tabla 1. Anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) y Western blot (WB)</b>			
<b>Anticuerpos primarios</b>			
	<b>Marca y código</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>
anti-RH <sub>1</sub> policlonal	Santa Cruz Biotechnology; RRID: AB_2277328	Conejo	1:250 (IHQ)
anti-NESTINA monoclonal	GeneTex; RRID: AB_370407	Ratón	1:200 (IHQ)
anti-LMX1b policlonal	Abcam; RRID: AB_1269316	Conejo	1:200 (IHQ) 1:500 (WB)
anti-PITX3 policlonal	Abcam; RRID: AB_2165300	Conejo	1:200 (IHQ) 1:500 (WB)
anti-TH policlonal	Abcam; RRID: AB_297840	Conejo	1:200 (IHQ) 1:500 (WB)
anti-TUJ1 monoclonal	Merck Millipore; RRID: AB_2210524	Ratón	1:2000 (IHQ)
anti-MAP2 monoclonal	GeneTex; RRID: AB_369978	Ratón	1:500 (IHQ)
anti-GADPH monoclonal	GeneTex; RRID: AB_11164142	Ratón	1:2000 (WB)
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
Alexa-Fluor 488 anti-conejo IgG	Thermo Fisher Scientific; RRID: AB_143165	Cabra	1:1000 (IHQ)
Alexa-Fluor 568 anti-ratón IgG	Thermo Fisher Scientific; RRID: AB_2534072	Cabra	1:1000 (IHQ)
IRDye 800CW anti-conejo	LI-COR Bioscience; RRID: AB_621848	Burro	1:1000 (IHQ); 1:10000 (WB)
IRDye 800CW anti-ratón	LI-COR Bioscience; RRID: AB_621847	Burro	1:10000 (WB)
IRDye 680RD anti-ratón	LI-COR Bioscience; RRID: AB_10953628	Burro	1:10000 (WB)
IRDye 680RD anti-conejo	LI-COR Bioscience; RRID: AB_10954442	Burro	1:10000 (WB)

Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81, Japón) acoplado a una cámara (Hamamatsu, ORCA-Flash 2.8, Hamamatsu, Japón). Para la evaluación de los cambios cuantitativos en la señal de TH en P21, las imágenes fueron obtenidas escaneando las

laminillas en el sistema Odyssey CLx, y la fluorescencia se evaluó con el programa Image Studiover.4.0 software (LI-COR Bioscience). Las imágenes se procesaron con el programa Adobe Photoshop CS6 (San Jose, CA). La fluorescencia para TH en cada rebanada fue normalizada con la fluorescencia obtenida para el control interno (DRAQ5).

#### **5.4 Western blot**

Para la cuantificación de proteína, se obtuvieron extractos totales del tejido del MescV de los embriones obtenidos de dos camadas (E14), o del MescV de los embriones de una camada (E16), para un total de cuatro experimentos por edad embrionaria. Para el análisis en P21 se usó la SNpc bilateral de una cría de cada sexo por camada (P21) para un total de cuatro experimentos.

El tejido se homogenizó en solución de lisis (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% IGEPAL, 100 mM NaCl) con inhibidores de proteasas (Amresco, Radnor, PA). El lisado fue centrifugado a 13,000×g durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y la proteína fue cuantificada por el método de Bradford (Sigma-Aldrich; Bradford, 1976).

Para la electroforesis se utilizaron 30 µg de proteína por muestra y 4 µL del marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific) que fueron cargados en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10%, y corridos usando el sistema MiniProtean II (Bio-Rad, Hercules, CA). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Santa Cruz Biotechnology), utilizando el sistema de transferencia semihúmeda Trans-Blot® (Bio-Rad; Villanueva, 2008).

La unión inespecífica de los anticuerpos fue bloqueada al incubar las membranas con leche libre de ácidos grasos (Leche Svelty) en solución amortiguadora TBS (20 mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7.5). Las bandas correspondientes a las proteínas de interés fueron detectadas al incubar toda la noche con los anticuerpos primarios diluidos en TBS (Tabla 1). Al día

siguiente las membranas fueron lavadas con TBS-T (TBS conteniendo 0.1% de Tween-20) por tres veces durante 10 min cada uno e incubadas con los anticuerpos secundarios. La señal obtenida para GAPDH fue utilizada como control de carga de cada muestra (control interno).

## **5.5 Ensayos de unión de radioligando**

### **5.5.1 Unión de [<sup>3</sup>H]-mepiramina a membranas totales**

Para determinar la densidad de RH<sub>1</sub> se obtuvo el tejido del mesencéfalo/telencéfalo de tres embriones (E12) o una camada (E14) en cada uno de 5 experimentos. Como controles positivos se utilizaron la corteza cerebral de rata adulta y la línea celular U373MG de astrocitoma humano.

Para la obtención de membranas, el tejido se homogenizó en una solución hipotónica (10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, pH 7.4) y se centrifugó a 20,000×g durante 20 min a 4°C. La pastilla fue resuspendida en 450 µL de solución de incubación (50 mM Tris-HCl, pH 7.4), seguido de tres períodos de sonicación de 5 s cada uno. Alícuotas de las membranas fueron incubadas durante 60 min a 30°C con 10 nM de [<sup>3</sup>H]-mepiramina, y para determinar la unión no específica muestras se incubaron en paralelo en presencia de 10 µM de mepiramina. La incubación se terminó por filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B (GE Healthcare Life Science), previamente remojados (2 h) en 0.3% de polietilenimina. El contenido de [<sup>3</sup>H]-mepiramina en los filtros se determinó por centellometría, y los valores de unión se normalizaron a la cantidad de proteína presente en cada muestra, determinada por el método del ácido bicinconínico, BCA (Garduño-Torres et al., 2007).

### **5.5.2 Unión de [<sup>3</sup>H]-espiperona a membranas sinaptosomales del neoestriado**

Para determinar la densidad del RD<sub>2</sub> se obtuvo el tejido del neoestriado de cuatro ratas macho y cuatro ratas hembra P21 provenientes de ratas control o

tratadas con clorfeniramina para un total de tres experimentos. El tejido se homogenizó en 10 mL de solución de sacarosa 0.32 M, 10 mM Hepes, 1 mg/mL BSA y 1 mM EDTA, pH 7.4 (10 golpes, 400 rpm, Glas-Col, Terre Haute, IN). El homogenado se centrifugó a 1000×g durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se recuperó y centrifugó a 14000×g durante 12 min a 4°C. La pastilla resultante fue resuspendida en 5 mL de solución Krebs-Henseleit-Ringer (140 mM NaCl, 10 mM Hepes, 5 mM D-Glucosa, 5 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) con Percoll al 45% y se centrifugó a 14000×g durante 3 min a 4°C. Se recuperó la fase superior y se le adicionaron 20 mL de solución Krebs-Ringer-Hepes (113 mM NaCl, 20 mM Hepes, 15 mM D-Glucosa, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4 a 4°C). La suspensión se centrifugó a 20000×g durante 20 min a 4°C, la pastilla resultante (sinaptosomas) se resuspendió en 20 ml de solución de lisis (10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, pH7.4), se incubó por 20 min a 4°C y el lisado fue centrifugado a 20000×g durante 20 min a 4°C para la obtención de una pastilla de membranas sinaptosomales (Márquez-Gómez et al., 2018).

Las membranas sinaptosomales fueron resuspendidas en 0.5 mL de solución de incubación (50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 100 µM ketanserina, pH 7.4), y alícuotas de 50 µL fueron incubadas durante 90 min a 25°C con 2 nM de [<sup>3</sup>H]-espiperona en presencia o ausencia de 100 nM de (±)-butaclamol para determinar la unión inespecífica y total, respectivamente. La unión se detuvo por filtración usando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B (GE Healthcare Life Science), previamente remojados (2 h) en 0.3% de polietilenimina y la [<sup>3</sup>H]-espiperona unida se determinó por centellometría. Los valores de unión se normalizaron a la cantidad de proteína de cada muestra determinada por el método del ácido bicinconínico (Smith et al., 1985).

## **5.6 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección electroquímica (HPLC-EC)**

Para determinar el contenido de dopamina se utilizó el tejido del neostriado de ambos hemisferios de una hembra y un macho P21 por camada para un

total de cuatro experimentos por grupo. El tejido se homogenizó en 0.4 M HClO<sub>4</sub>, 5 mM EGTA y 2.5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, y se centrifugó a 15000xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado en filtros Acrodisc con tamaño de poro de 0.22 µm (VWR Pall Laboratory, Radnor, PA). El contenido de dopamina fue determinado en alícuotas de 50 µL mediante cromatografía líquida de alta resolución (Alltech, bomba HPLC, modelo 626, Grace Discovery Sciences, Deerfield, IL) acoplada a un detector electroquímico (ESA, Coulochem III, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA).

Se utilizó una columna analítica de 100x2 mm y de 3 µm de tamaño de partícula (Microbore, BASi. West Lafayette, IN). La fase móvil consistió en una solución de fosfato monosódico (29 mM pH 3.0) conteniendo 3.5 mM octil-sulfato de sodio, 0.43 mM EDTA, 0.6 mM tetrahidrofurano y metanol (16.5% v/v). El flujo fue de 0.3 mL/min.

Los parámetros utilizados para la detección fueron: celda guardia +350 mV (ESA 5020) y celda analítica (ESA 5911A) con potenciales *E1* +200 mV y *E2* -200 mV. Los picos obtenidos fueron analizados con el programa EZCrom SI (versión 3.2.1, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El contenido de dopamina se determinó por interpolación de los datos obtenidos a una curva estándar de 5- 80 nM de dopamina. Los datos se normalizaron a la cantidad de proteína contenida en cada muestra, cuantificada por el método del ácido bicinconínico.

### **5.7 Liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina en rebanadas del neoestriado**

Se obtuvieron rebanadas del neoestriado (250x250 µm) de cuatro crías P21 de cada sexo de ambos grupos experimentales (6-4) y se colocaron en solución Krebs-Henseleit (KH) fría sin CaCl<sub>2</sub> para reducir la excitotoxicidad (composición: 126 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM D-glucosa; pH 7.4 después de saturar con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 95:5% v:v). Posteriormente el tejido fue estabilizado en solución KH (1.8 mM

CaCl<sub>2</sub>) durante 30 min a 37°C, con cambio de solución cada 10 min. Las rebanadas fueron transferidas a 1 mL de solución KH conteniendo 50 nM de [<sup>3</sup>H]-dopamina (Perkin Elmer, Boston, MA) e incubadas a 37°C por 30 min en presencia de 10 μM de pargilina y 200 μM ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) para prevenir la degradación y oxidación de la [<sup>3</sup>H]-dopamina, y para prevenir su captura por terminales noradrenérgicas y serotoninérgicas se agregaron desipramina y fluoxetina (1 μM de cada una).

Las rebanadas fueron lavadas con solución KH para eliminar la [<sup>3</sup>H]-dopamina no capturada, se permitió la decantación y se colocaron muestras (30 μL) en las cámaras de liberación de un equipo de perfusión (Brandel 2500, Gaithersburg, MD). El tejido fue perfundido a un flujo de 1 mL/min con solución KH suplementada con 1 μM de GBR-12909 (Sigma-Aldrich), para prevenir la recaptura de la [<sup>3</sup>H]-dopamina liberada por las terminales dopaminérgicas. Después de 20 min de perfusión, se colectaron 10 fracciones de 1 mL cada una y la liberación de la [<sup>3</sup>H]-dopamina fue inducida al cambiar la solución de perfusión a una solución KH con 30 mM de K<sup>+</sup> (sustitución equimolar por NaCl) durante el minuto 3.

La dependencia del Ca<sup>2+</sup> extracelular de la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina fue evaluada omitiendo el CaCl<sub>2</sub> de la solución de perfusión. La [<sup>3</sup>H]-dopamina liberada se determinó por centellometría y el neurotransmisor remanente en el tejido de cada cámara se determinó después de adicionar 0.5 mL de 1 N HCl. Los valores de cada muestra fueron normalizados con respecto al contenido de [<sup>3</sup>H]-dopamina remanente en el tejido, y el valor de la fracción basal previa a la estimulación con alto K<sup>+</sup> (fracción 2). Para evaluar los cambios en la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina entre grupos, se obtuvo el área bajo la curva y los datos se expresaron como porcentaje de la liberación obtenida en el grupo control.

## **5.8 Actividad locomotora**

El análisis de la actividad locomotora se realizó en las ratas macho y hembra P21 de ambos grupos (cuatro animales). Las ratas fueron inyectadas 30 min

antes del análisis con agua inyectable o meta-anfetamina (1 mg/Kg, ip) para determinar la actividad basal y la inducida por la liberación de dopamina, respectivamente (Riviere et al., 1999; Calipari et al., 2013).

Cada rata fue colocada en un campo abierto (actímetro; Leticamodel LE 8811<sup>®</sup>, Panlab, Barcelona, España) con base de Perspex negro de 44 x 45 cm, rodeada de cuatro paredes de Perspex transparente de 36 cm de altura, y por dos marcos con 32 rayos infrarrojos conectados a una interfase que detecta el movimiento del animal (LE 8811<sup>®</sup>, IR motor activity monitor, LSI Letic Scientific Instrument, Barcelona, España). Los parámetros analizados fueron: (i) cruces totales, (ii) velocidad, y (iii) distancia total recorrida.

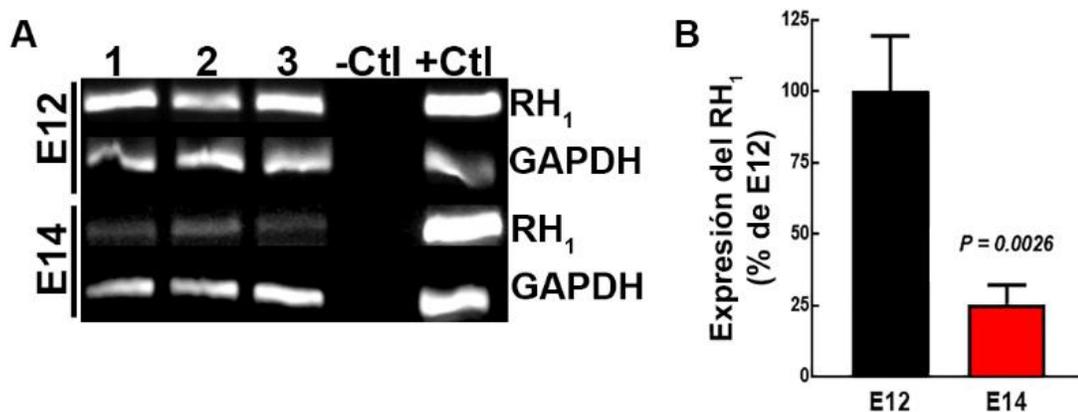
### **5.9 Análisis estadístico**

Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar (EEM). Para la comparación entre grupos se realizó la prueba *t* de Student pareada o no pareada. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a un valor de  $P < 0.05$ . El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, La Joya, CA).

## 6. Resultados

### 6.1 Expresión del RH<sub>1</sub> en el MescV de embriones E12 y E14

Los ensayos de RT-PCR generaron un producto amplificado con el tamaño esperado para el RH<sub>1</sub> (292 pb) en ambas edades analizadas (Figura 13A). El análisis de la secuenciación de los productos amplificados mostró una identidad del 100% con los nucleótidos 594 al 885 de la secuencia reportada para este receptor (NM\_017018; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). El análisis semicuantitativo de la expresión del RH<sub>1</sub> mostró una expresión 3.9 veces mayor en el MescV de embriones E12 en comparación con E14 (Figura 13B).

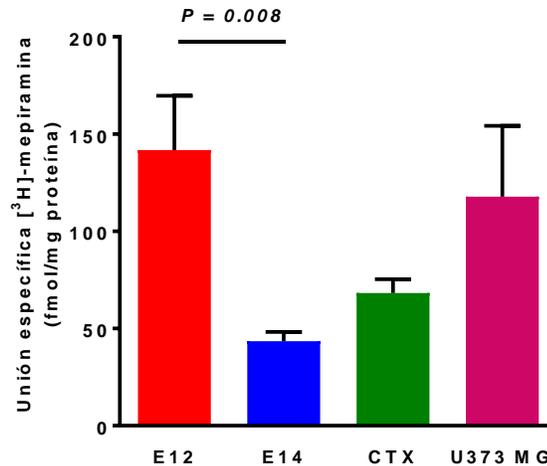


**Figura 13. Expresión del RNAm del RH<sub>1</sub> en el MescV de embriones E12 y E14.**

A) Los geles de agarosa (2%) muestran los productos de PCR obtenidos para el RNAm del RH<sub>1</sub> (292 pb) y de GAPDH (180 pb; control interno) en el tejido E12 y E14. -Ctl, Control negativo (800 ng de RNA total); +Ctl, Control positivo (500 ng de DNac de corteza cerebral de rata adulta). B) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas por PCR de 8 experimentos independientes. Los resultados son el promedio  $\pm$  EEM de la densidad óptica expresada como porcentaje de la expresión en E12. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

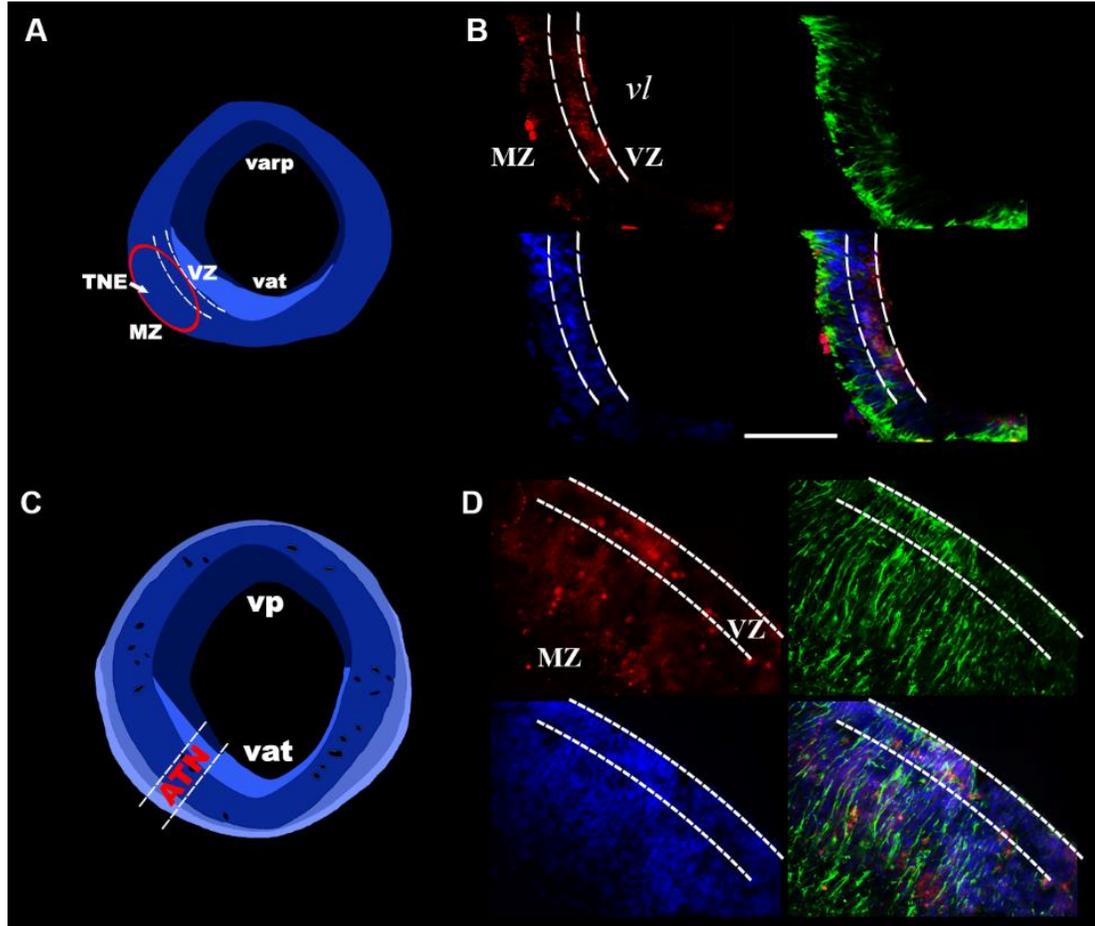
Los ensayos de unión con el radioligando [<sup>3</sup>H]-mepiramina también mostraron una mayor densidad de receptores en el tejido proveniente de embriones E12 en relación al tejido de E14, con densidades de  $142 \pm 28$  y  $43 \pm 5$  fmol/mg de

proteína, respectivamente (Figura 14); mientras que en la corteza cerebral de rata adulta y en la línea celular U373 MG, utilizados como controles positivos, se observó una densidad de  $68 \pm 7$  y  $118 \pm 36$  fmol/mg de proteína, respectivamente (Figura 14).



**Figura 14. Densidad del RH<sub>1</sub> en membranas del tejido de telencéfalo/mesencéfalo de embriones E12 y E14.** La gráfica muestra el promedio  $\pm$  EEM de la unión específica de [<sup>3</sup>H]-mepiramina expresada como fmol/mg de proteína (6 experimentos independientes). La corteza cerebral de rata adulta (CTX) y la línea celular de astrocitoma (U373 MG) se utilizaron como controles positivos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

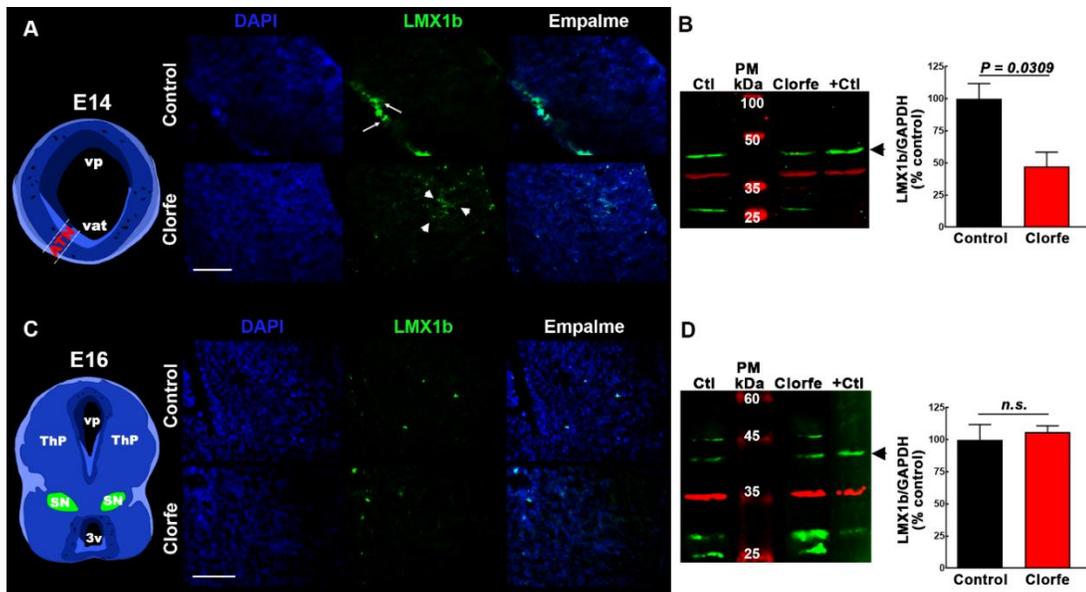
La distribución de la expresión del RH<sub>1</sub> en el neuroepitelio del MescV, en E12 y E14, fue determinada por inmunohistoquímica en rebanadas coronales del tejido de ambas edades. Para el día E12, se observaron células inmunorreactivas al RH<sub>1</sub> en la ZV del neuroepitelio mesencefálico, zona en la que se encuentran los cuerpos celulares de las CTNs y de la GR, y cuyos procesos son positivos a nestina (Figura 15A y B). En el MescV de embriones E14, las células inmunorreactivas a RH<sub>1</sub> se observan en la ZV y distribuidas a lo largo del neuroepitelio mesencefálico. A esta edad, la marca para nestina también se observa en los procesos de las CTNs y la GR, indicando la presencia de estas células en la ZV (Figura 15C y D).



**Figura 15. Distribución de células inmunorreactivas para el RH<sub>1</sub> y nestina en cortes coronales del MescV de embriones E12 y E14.** A y C) Esquemas de las vistas coronales del mesencéfalo en E12 y E14. El área señalada en el círculo rojo en A y entre las líneas blancas punteadas en C corresponde a la zona de la que se obtuvieron las microfotografías de epifluorescencia. B y D) Microfotografías representativas (20x) de canales independientes y el empalme para el RH<sub>1</sub> (rojo), nestina (verde) y DAPI (azul). MZ, zona marginal; VZ, zona ventricular; TNE, neuroepitelio tegmental; ATN, neuroepitelio tegmental anterior; *varp*, acueducto pretectal; *vat*, acueducto tegmental; *vp*, acueducto pretectal; y *vl*, lumen ventricular. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

## 6.2 Efecto a corto plazo del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> (E12-14) en la diferenciación dopaminérgica del MescV en E14 y E16.

La inmunofluorescencia para el marcador de compromiso dopaminérgico LMX1b sugiere una mayor cantidad de células positivas para este factor en E14 que en E16 en el grupo control (Figura 16A y C).

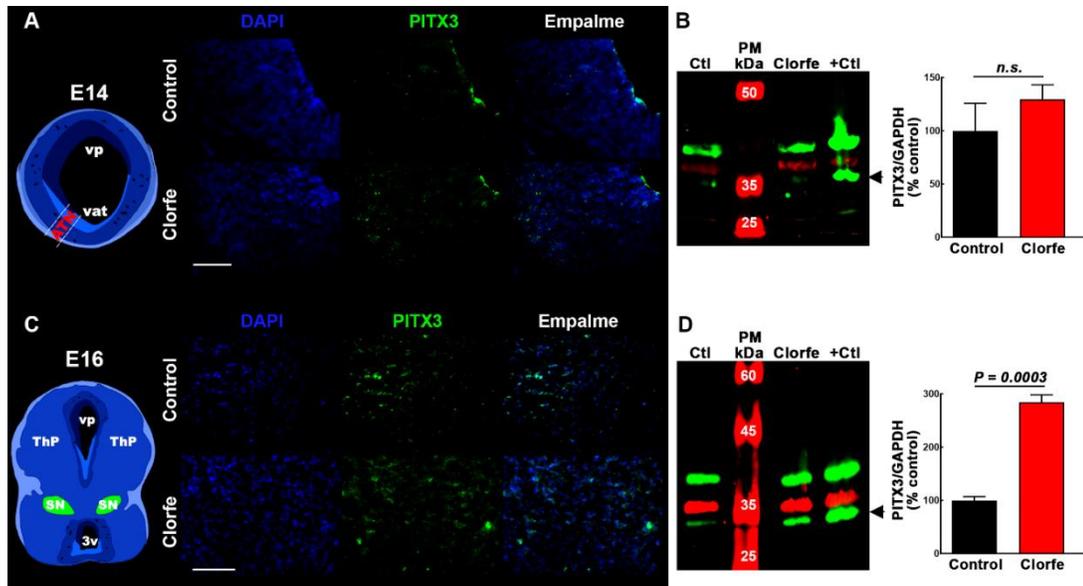


**Figura 16. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la expresión de LMX1b en el MescV de embriones E14 y E16.** A y C) Izquierda, esquemas de las vistas coronales del mesencéfalo en E14 y E16. El área dentro de las líneas blancas indica la zona de la que se obtuvieron las microfotografías de epifluorescencia. Derecha, microfotografías representativas (20x) de la inmunorreactividad a LMX1b (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) en cortes coronales de embriones del grupo control y clorfeniramina (Clorfe). Las flechas y las cabezas de flecha indican la marca de LMX1b en la zona de diferenciación y en la zona subventricular, respectivamente. vp, acueducto pretectal; vat, acueducto tegmental; ATN, neuroepitelio tegmental anterior; ThP, tálamo posterior; SN, sustancia negra; 3v, tercer ventrículo. Escala, 100  $\mu$ m. B y D) Izquierda, *Western blots* representativos que muestran la banda correspondiente para LMX1b (verde, 41 kDa; flecha) y GAPDH (rojo, 37 kDa) en embriones E14 y E16 del grupo control (Ctl), tratado con clorfeniramina (Clorfe) y del control positivo (Ctl+; tejido del MescV E12). Derecha, análisis cuantitativo de la fluorescencia de LMX1b/GAPDH de 4 experimentos. Los valores se expresan porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

El tratamiento con clorfeniramina promovió cambios en la distribución de las células LMX1b<sup>+</sup> únicamente en E14, observándose predominantemente en la zona de diferenciación en el grupo control mientras que en el grupo clorfeniramina la marca se localiza en la ZSV (Figura 16A). De manera interesante, la expresión de este marcador de compromiso neuronal dopaminérgico mostró una disminución significativa ( $-53 \pm 11\%$ ) en el MescV de embriones E14 (Figura 16B y C), sin cambios estadísticamente significativos en E16 (Figura 16C y D).

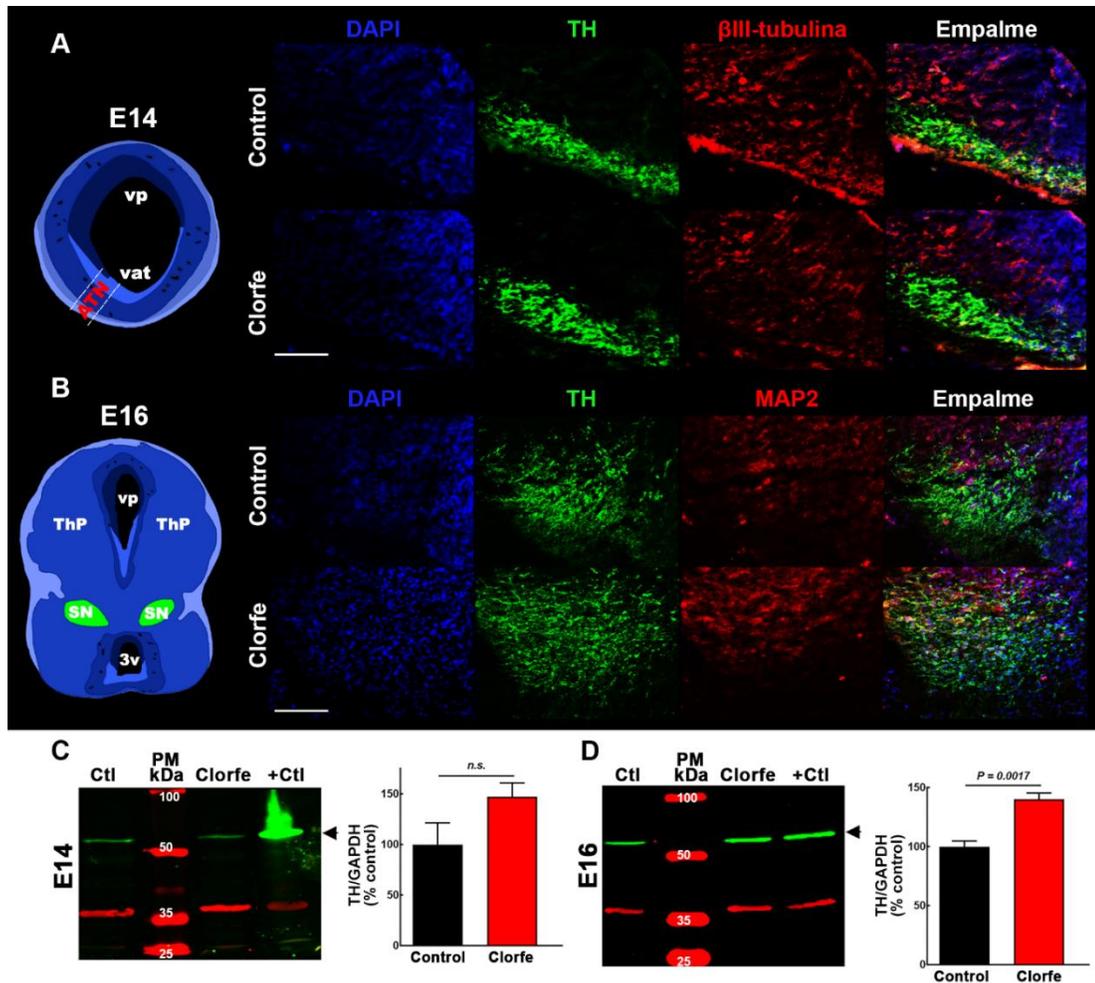
En cuanto a los marcadores dopaminérgicos, en el grupo control la inmunorreactividad a PITX3 muestra una marca tenue en E14 (Figura 17A), mientras que en E16 la marca es evidente a lo largo del neuroepitelio y en la zona que corresponde al núcleo de la SNpc (Figura 17C). La señal para TH en el grupo control se encuentra en la zona de diferenciación y en el núcleo de la SNpc en E14 y E16, respectivamente (Figura 18A y B). Los embriones de ratas tratadas con clorfeniramina mostraron cambios en la distribución de PITX3, observándose a lo largo del neuroepitelio mesencefálico y en la zona de diferenciación en E14, mientras que en E16 se observó un aparente aumento en la marca para este factor de transcripción en la SNpc (Figura 17A y B). En relación a la inmunorreactividad a TH, el tratamiento con clorfeniramina en E14 resultó en un aparente aumento, efecto más evidente en la SNpc en E16 (Figura 18A y B).

El análisis cuantitativo de los marcadores dopaminérgicos no mostró cambios significativos en E14 (Figuras 17B y 18C). Sin embargo, ambos marcadores mostraron un aumento significativo en el MescV de embriones E16 del grupo clorfeniramina,  $284 \pm 8$  y  $140 \pm 7\%$  del grupo control para PITX3 y TH, respectivamente (Figuras 17D y 18D).



**Figura 17. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la expresión de PITX3 en el MescV de embriones E14 y E16.** A y C) Izquierda, esquemas de las vistas coronales del mesencéfalo en E14 y E16. El área dentro de las líneas blancas indica la zona de obtención de las microfotografías de epifluorescencia. Derecha, microfotografías representativas (20x) de la inmunohistoquímica para PITX3 (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) en cortes coronales de embriones del grupo control y clorfeniramina (Clorfe). vp, acueducto pretectal; vat, acueducto tegmental; ATN, neuroepitelio tegmental anterior; ThP, tálamo posterior; SN, sustancia negra; 3v, tercer ventrículo. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m. B y D) Izquierda, *blots* representativos que muestran la banda correspondiente a PITX3 (verde, 32 kDa; flecha) y GAPDH (rojo, 37 kDa) en embriones E14 y E16 de los grupos control (Ctl), tratado con clorfeniramina (Clorfe) y control positivo (Ctl+; SNpc de rata adulta). Derecha, análisis de la fluorescencia de PITX3/GAPDH. Los valores se expresan como porcentaje del control y son el promedio  $\pm$  EEM de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

La inmunodetección de los marcadores de neuronas jóvenes ( $\beta$ III-tubulina) y maduras (MAP2), mostró una aparente disminución de la inmunorreactividad a  $\beta$ III-tubulina en E14 y un aumento de la inmunorreactividad a MAP2 en E16 (Figura 18A y B).

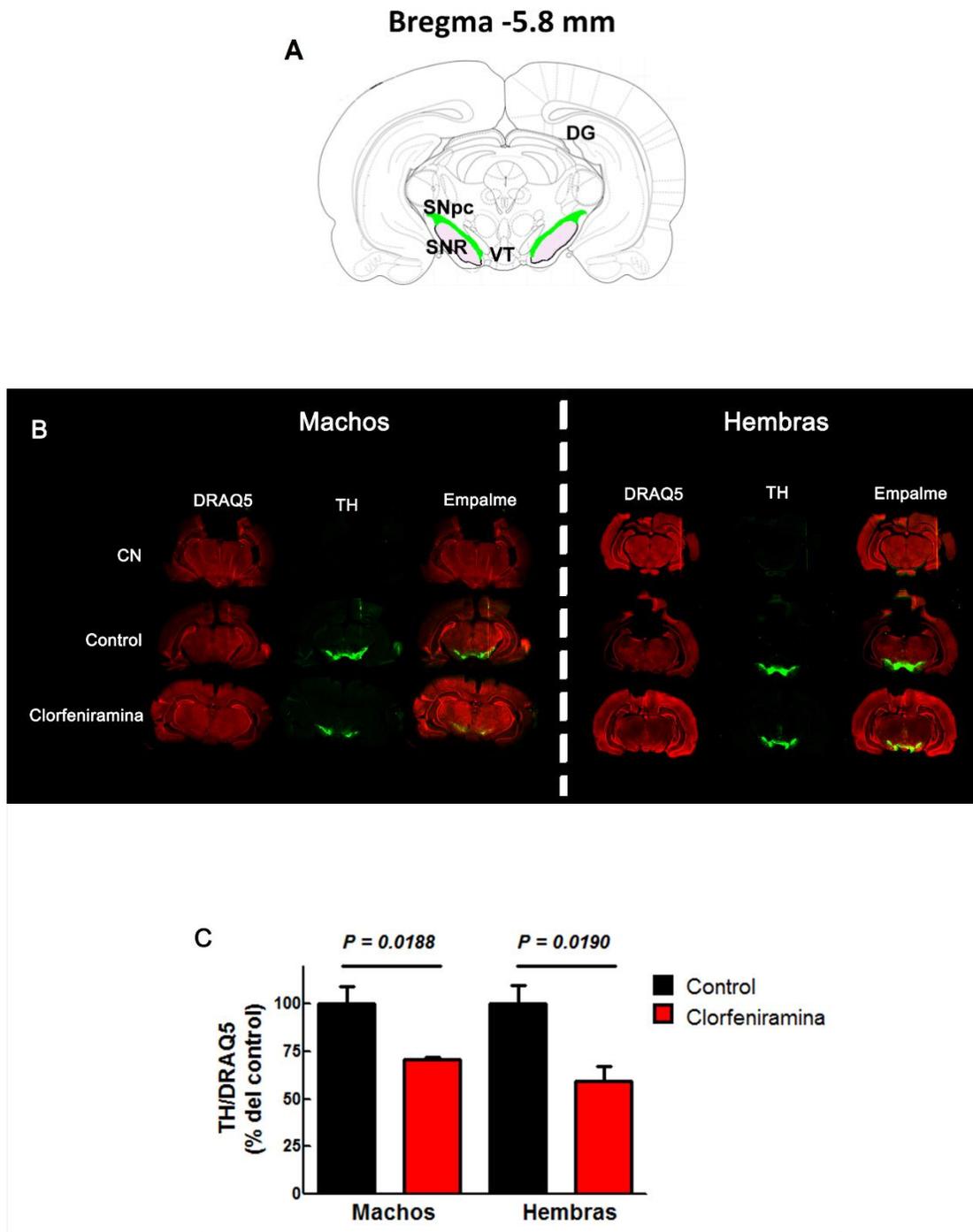


**Figura 18. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la expresión de TH en el MescV de embriones E14 y E16.** A y B) Izquierda, esquemas de vistas coronales del mesencéfalo en E14 y E16. El área dentro de las líneas blancas corresponde a la zona de las microfotografías de epifluorescencia. Derecha, microfotografías representativas (20x) de la inmunohistoquímica para  $\beta$ III-tubulina (A, rojo), MAP2 (B, rojo), TH (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) en cortes coronales de embriones del grupo control y clorfeniramina (Clorfe). vp, acueducto pretectal; vat, acueducto tegmental; ATN, neuroepitelio tegmental anterior; ThP, tálamo posterior; SN, sustancia negra; 3v, tercer ventrículo. La escala corresponde a 100  $\mu$ m. C y D) Izquierda, *blots* representativos que muestran las bandas correspondientes a TH (verde, 56 kDa; flecha) y GAPDH (rojo, 37 kDa) en embriones E14 y E16 del grupo control (Ctl), tratado con clorfeniramina (Clorfe) y del control positivo (Ctl+; SNpc de rata adulta). Derecha, análisis de la fluorescencia de TH/GAPDH. Los valores se expresan como porcentaje del control y son el promedio  $\pm$  EEM de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

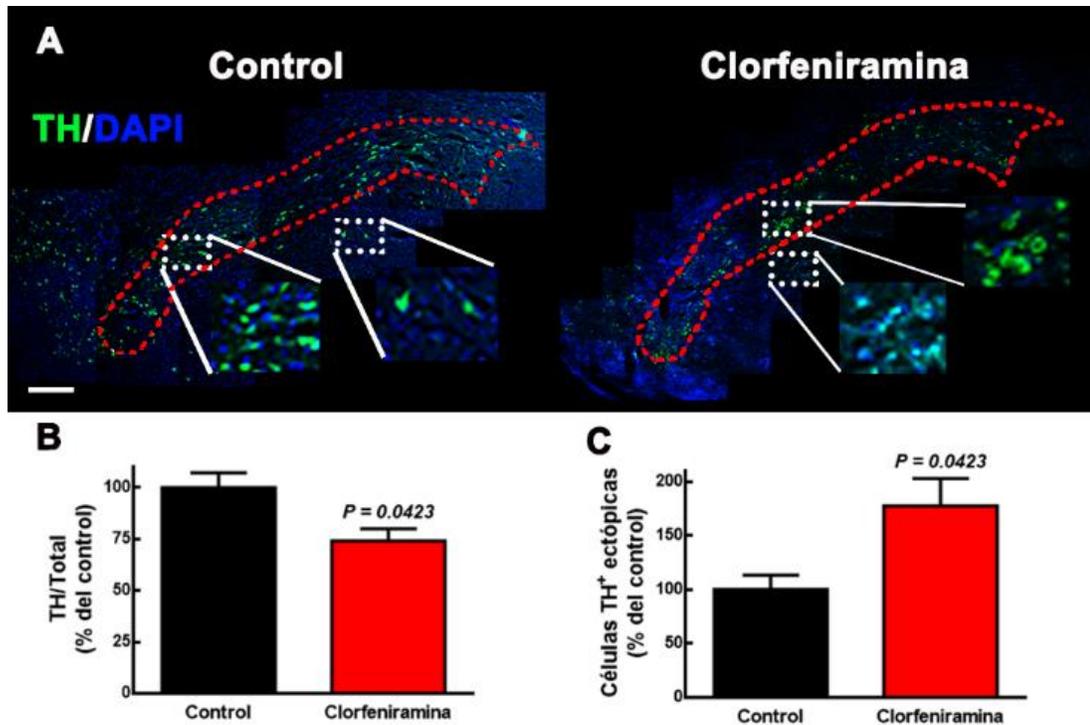
### **6.3 Efecto a largo plazo del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> (E12-14) en la diferenciación dopaminérgica de ratas postnatales 21 (P21)**

Para determinar si el tratamiento prenatal con clorfeniramina promovía cambios a largo plazo en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, se analizó la inmunorreactividad a la enzima TH en secciones coronales de animales P21. El análisis de la fluorescencia reveló una disminución significativa del  $29 \pm 1\%$  (machos) y  $41 \pm 7\%$  (hembras) en el grupo proveniente de ratas tratadas con clorfeniramina con respecto al grupo control (Figura 19A y B).

Con la finalidad de explorar si la disminución en la inmunorreactividad a TH observada en el grupo de clorfeniramina se debía a disminución del número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, se cuantificó el número de células TH<sup>+</sup> localizadas en la SNpc y fuera de ella. El análisis mostró que el grupo tratado con clorfeniramina el número de células TH<sup>+</sup> en la SNpc disminuyó a  $74 \pm 6\%$  del control (Figura 20A y B). De manera interesante, en el grupo clorfeniramina el número de células TH<sup>+</sup> fuera de la SNpc aumentó significativamente a  $177 \pm 25\%$  en comparación con el grupo control (Figura 20A y C).

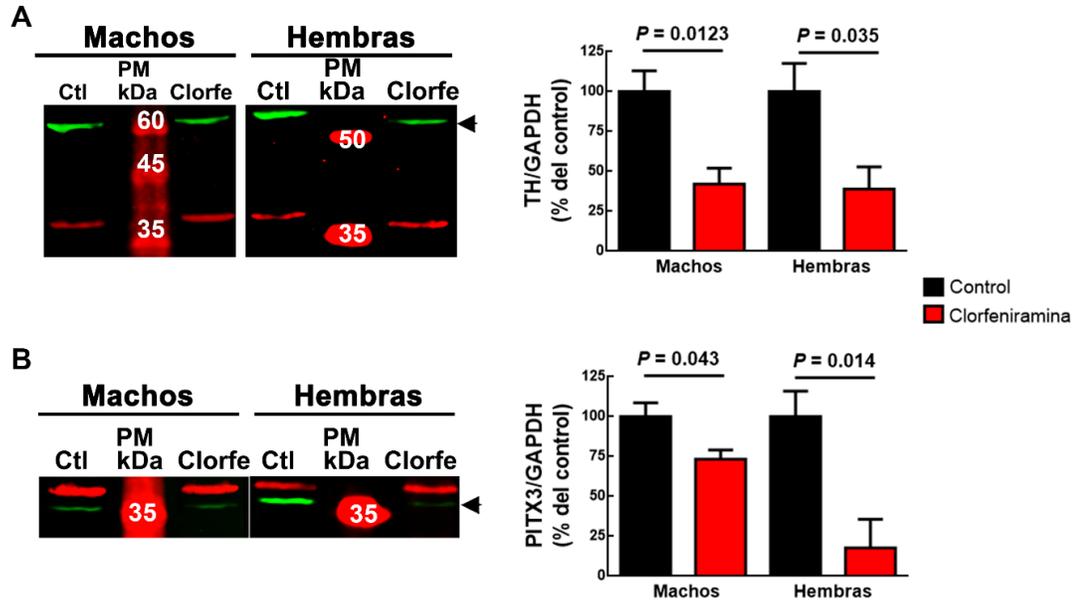


**Figura 19. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la inmunorreactividad a TH en la SNpc de las crías P21.** A) Imágenes representativas de cortes coronales a nivel de la SNpc de machos y hembras de los grupos control y clorfeniramina. CN, control negativo. B) Análisis de la fluorescencia en la SNpc. Los valores se expresan como la razón TH/DRAQ5 y como porcentaje del control, y son el promedio  $\pm$  EEM de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.



**Figura 20. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en el número de células TH<sup>+</sup> en crías P21.** A) Imágenes representativas de la inmunorreactividad a TH en cortes coronales a nivel de la SNpc de machos de los grupos control y clorfeniramina. La línea roja punteada delimita el área de la SNpc. Los recuadros blancos muestran células TH<sup>+</sup> localizadas en la SNpc y fuera de la misma (ectópicas). B) Análisis cuantitativo del número de células TH<sup>+</sup> en la SNpc. C) Análisis cuantitativo del número de células TH<sup>+</sup> ectópicas. Los valores se expresan como porcentaje de los valores control y son el promedio  $\pm$  EEM de 3-4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

Para confirmar la disminución del fenotipo dopaminérgico postnatal por el bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> durante el desarrollo fetal, se realizaron ensayos de *Western blot* de TH y PITX3 en la SNpc de crías hembra y macho, provenientes de ratas control y tratadas con clorfeniramina. Los resultados confirmaron la disminución de la TH ( $-58 \pm 10$  y  $-61 \pm 14\%$  en crías machos y hembras, respectivamente), en los animales del grupo clorfeniramina (Figura 21A). De manera similar, el nivel de PITX3 disminuyó en  $27 \pm 6$  y  $82 \pm 18\%$  en las crías machos y hembras, respectivamente, de ratas tratadas con clorfeniramina con respecto al grupo control (Figura 21B).

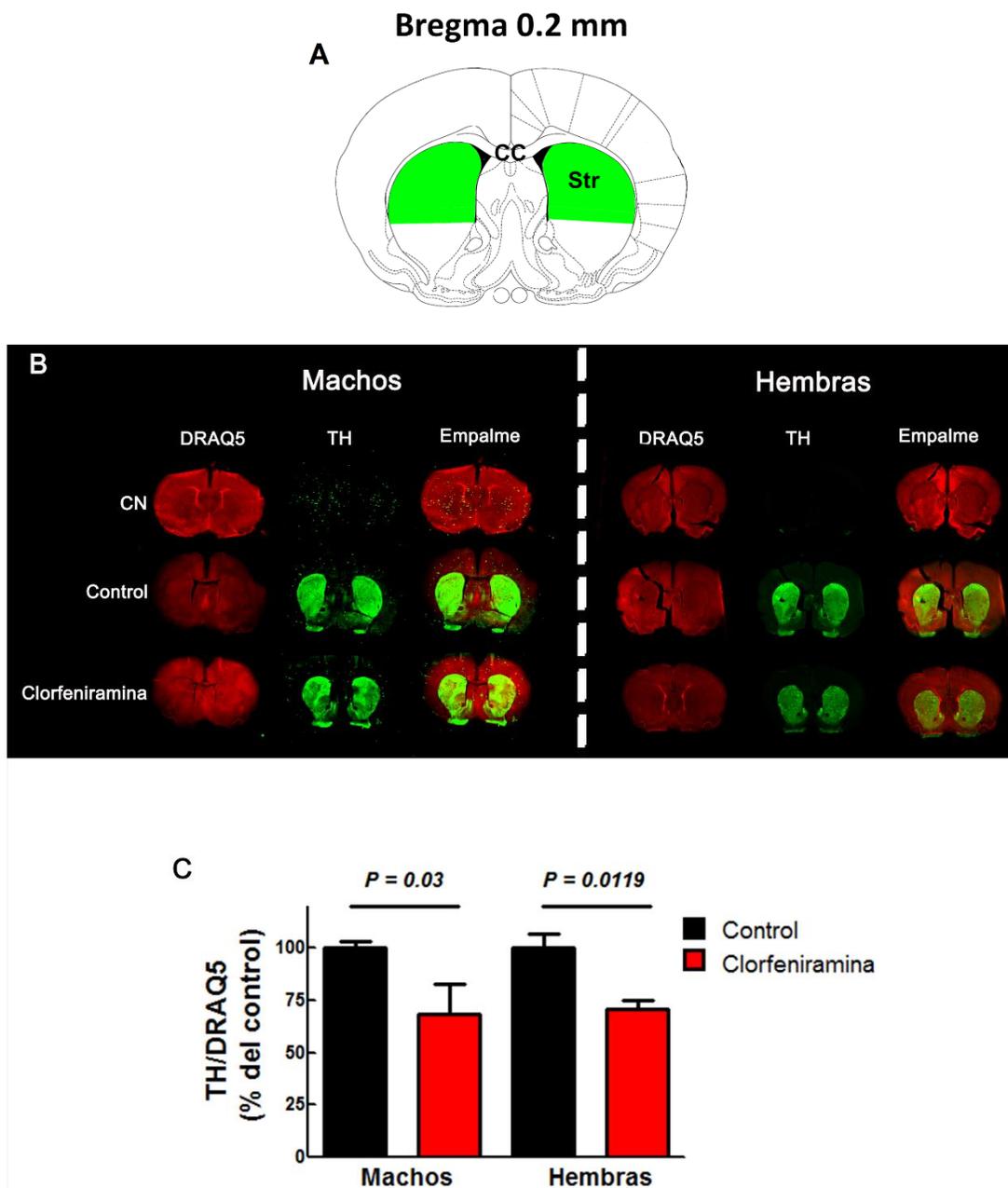


**Figura 21. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la expresión de TH y PITX3 en la SNpc de crías P21.** A y B) Izquierda, *blots* representativos que muestran bandas correspondientes a TH (A, verde, 56 kDa; flecha), PITX3 (B, verde, 32 kDa; flecha) y GAPDH (rojo, 37 kDa) en ratas P21 del grupo control (Ctl) y el grupo tratado con clorfeniramina (Clorfe). Derecha, análisis cuantitativo de la fluorescencia de TH/GAPDH y PITX3/GAPDH expresada como porcentaje del control. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EEM. de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

#### 6.4 Efecto del tratamiento con clorfeniramina a ratas gestantes (E12-E14) en la inervación dopaminérgica al neostriado de ratas P21

Con la finalidad de determinar si la disminución en el número de neuronas TH<sup>+</sup> en la SNpc estaba relacionada con alteraciones en la inervación dopaminérgica nigro-estriatal, se analizó la inmunorreactividad a TH<sup>+</sup> en el neostriado de las ratas P21 de los grupos control y clorfeniramina, como índice de la densidad de fibras dopaminérgicas.

El análisis de la fluorescencia mostró una disminución significativa ( $-31 \pm 14\%$  y  $-29 \pm 4\%$ ) en la inmunorreactividad a TH en el neostriado de machos y hembras, respectivamente, del grupo clorfeniramina (Figura 22A y B).

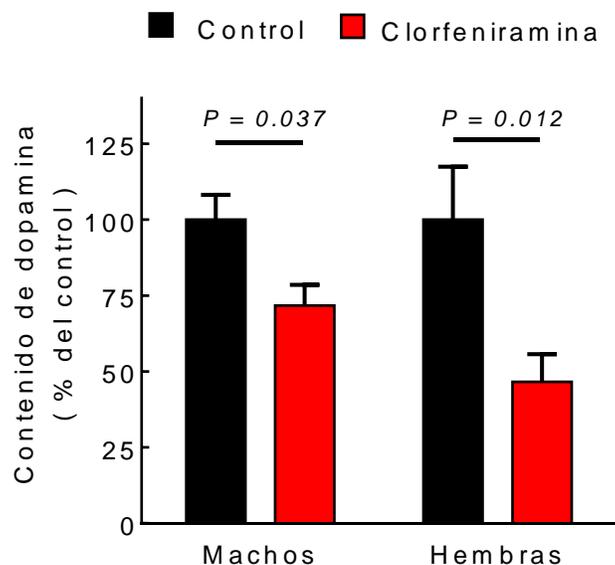


**Figura 22. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la innervación nigro-estriatal en crías P21.** A) Nivel (Bregma) seleccionado para el análisis de la innervación dopaminérgica. CC, cuerpo calloso; Str, neostriado. B) Imágenes representativas de la inmunorreactividad a TH en cortes coronales del neostriado de machos y hembras de los grupos control y clorfeniramina. CN, control negativo. C) Análisis cuantitativo de la fluorescencia de TH expresada como el cociente TH/DRAQ5. Los valores se expresan como porcentaje del control y son el promedio  $\pm$  EEM de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

## 6.5 Efecto del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> (E12-14) en el contenido y liberación de dopamina en el neostriado de ratas P21

Para determinar si el aumento en los marcadores dopaminérgicos durante el desarrollo embrionario (E14 y E16) promueve cambios neuroquímicos en la transmisión dopaminérgica en las crías P21, se analizó el contenido y la liberación de dopamina en el neostriado de ambos grupos y sexos.

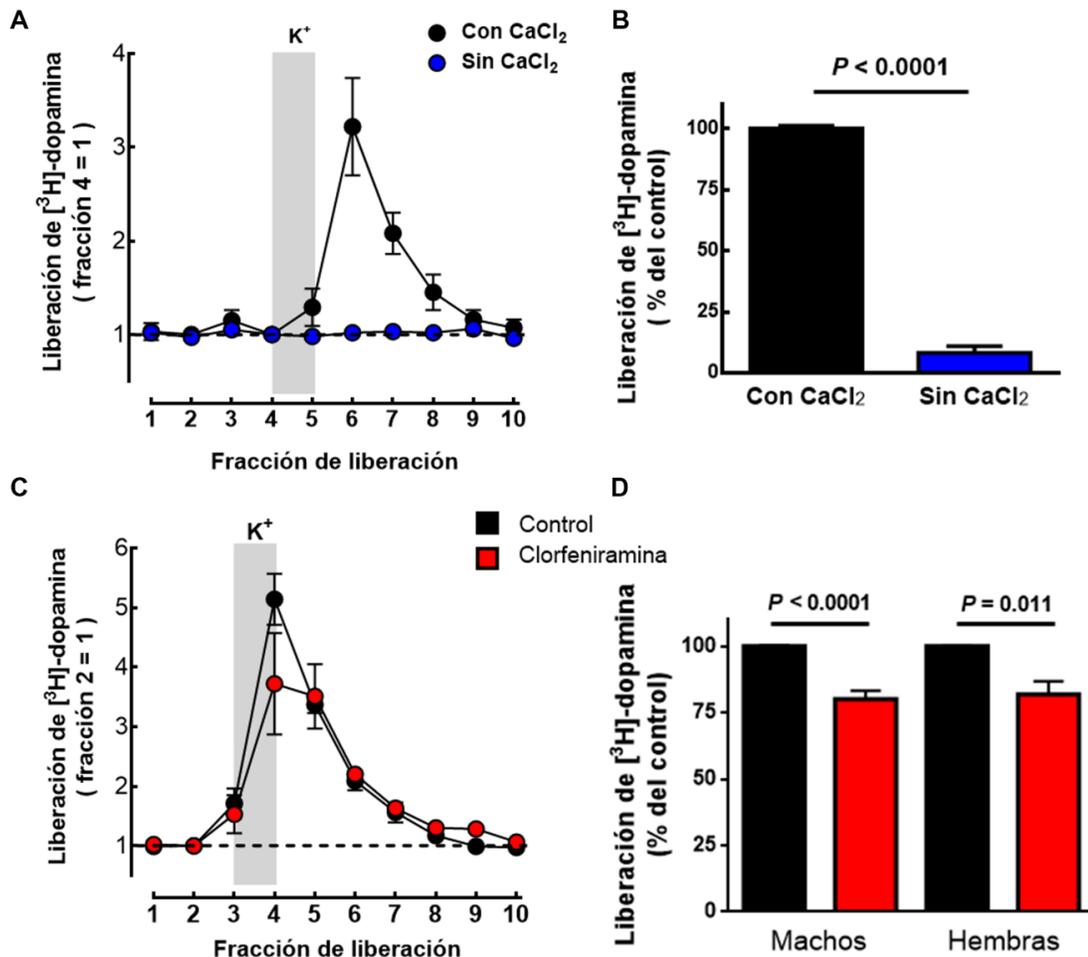
El análisis por HPLC mostró una disminución significativa en el contenido estriatal de dopamina en los machos y hembras del grupo clorfeniramina de  $28 \pm 6\%$  y  $53 \pm 9\%$ , respectivamente (Figura 23).



**Figura 23. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en el contenido de dopamina del neostriado de crías P21.** La gráfica muestra el análisis del contenido de dopamina en el neostriado de ratas machos y hembras P21 del grupo control y clorfeniramina. Los valores se presentan como porcentaje del contenido de dopamina del grupo control y son el promedio  $\pm$  EEM de 4-7 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

Adicionalmente al análisis del contenido de dopamina, se realizaron ensayos de liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina en rebanadas del neostriado de ratas P21 de ambos grupos. En un medio sin CaCl<sub>2</sub>, la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina inducida por despolarización con alto K<sup>+</sup> (30 mM) se redujo en 92 ± 3% (Figura 24A y B), indicando que la liberación se debe primordialmente a exocitosis.

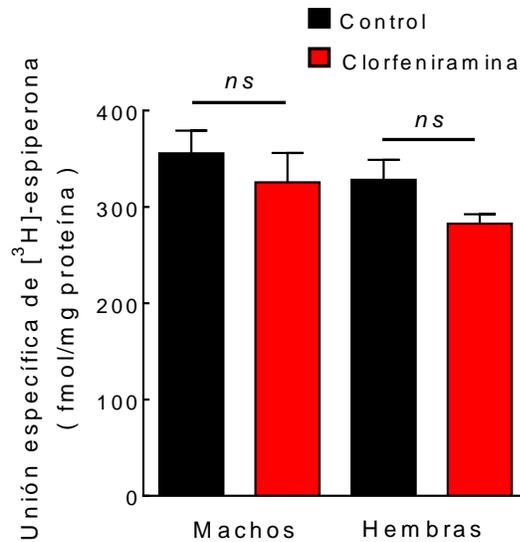
En rebanadas del neostriado de las crías P21 provenientes de ratas tratadas con clorfeniramina se observó una disminución en la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina tanto en machos como hembras (-20 y -18%, respectivamente; Figura 24C y D).



**Figura 24. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina en rebanadas de neoestriado de crías P21.** A) Experimento representativo de la dependencia de Ca<sup>2+</sup> de la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina inducida por despolarización, La barra gris indica el cambio de la solución de perfusión de 4 mM a 30 mM de K<sup>+</sup>, en presencia (círculos negros) o ausencia (círculos azules) de CaCl<sub>2</sub>. B) Análisis del área bajo la curva de la liberación ilustrada en A. Los valores son el promedio ± EEM de 4 experimentos, expresados como porcentaje de la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina en presencia de Ca<sup>2+</sup>. C) Gráfica representativa de la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina en rebanadas de los grupos control (círculos negros) y clorfeniramina (círculos rojos). D) Análisis cuantitativo de la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina en rebanadas de los grupos control y clorfeniramina. Los valores son el promedio ± EEM de 6 y 4 experimentos, respectivamente expresados como porcentaje de la liberación del grupo control en machos y hembras, respectivamente. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

#### **6.6 Efecto del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> (E12-14) en la densidad de RD<sub>2</sub> en el neoestriado de crías P21**

Como autorreceptores, los RD<sub>2</sub> inhiben la síntesis y la liberación de dopamina, por lo que la disminución en el contenido y liberación de dopamina observado en las crías de ratas gestantes tratadas con clorfeniramina (Figuras 23 y 24) podría explicarse por un aumento en la densidad del RD<sub>2</sub>. Para evaluar esta posibilidad, se determinó la densidad del RD<sub>2</sub> por ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]-espiperona en membranas de sinaptosomas del neoestriado. Los resultados no mostraron cambios en la densidad del RD<sub>2</sub> entre ambos grupos, encontrándose en el grupo control densidades de 355 ± 23 y 328 ± 20 fmol/mg de proteína en machos y hembras, respectivamente, mientras en el grupo de clorfeniramina la densidad de RD<sub>2</sub> por sexo fue 325 ± 30 y 282 ± 9 fmol/mg de proteína (Figura 25).

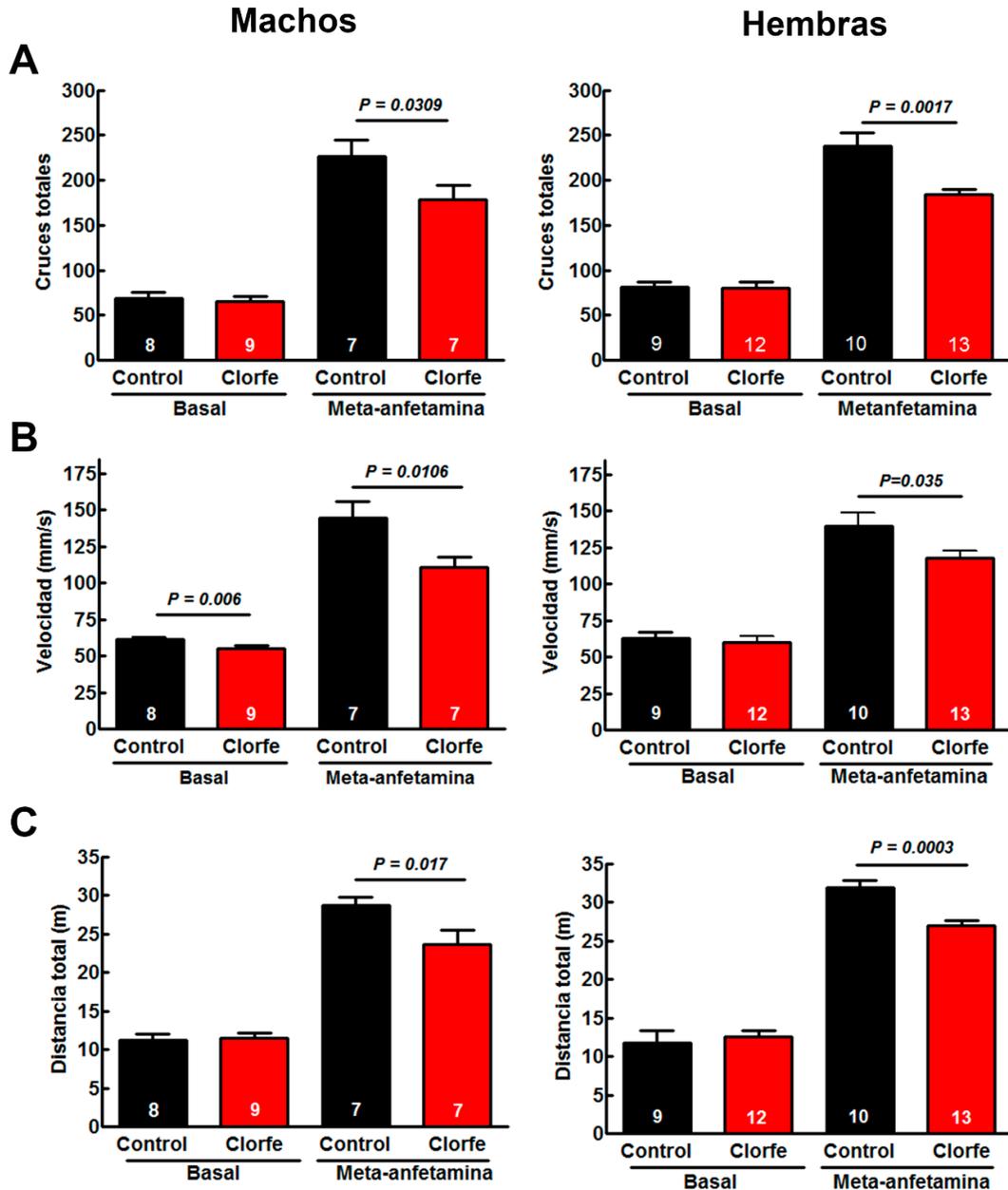


**Figura 25. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la densidad de RD<sub>2</sub> en membranas sinaptosomales del neostriado de crías P21.** La unión específica de [<sup>3</sup>H]-espiperona se expresa en fmol/mg proteína para las membranas provenientes de crías de los grupos control y clorfeniramina. Los valores son el promedio ± EEM de 3 experimentos. *ns*, sin diferencia significativa, prueba *t* de Student no pareada.

### 6.7 Efecto del tratamiento con clorfeniramina a ratas gestantes (E12-E14) en la actividad locomotora de crías P21

Dado que la transmisión dopaminérgica estriatal está relacionada con el inicio y mantenimiento del movimiento voluntario, se analizó la actividad locomotora de las ratas de los grupos control y clorfeniramina en condiciones basales y en respuesta a la administración de meta-anfetamina, que induce la liberación de dopamina.

El análisis de los parámetros de actividad locomotora en condiciones basales no mostró cambios significativos entre grupos o entre hembras y machos, excepto en la velocidad, con disminución en los machos del grupo clorfeniramina (Figura 26B).



**Figura 26. Efecto de la administración de clorfeniramina a ratas gestantes (E12 a E14) en la actividad locomotora en las ratas P21 en condiciones basal y después de la administración de meta-anfetamina.** Gráficas del análisis de cruces totales (A), velocidad (B) y distancia total recorrida (C) durante 5 min en un campo abierto de las crías P21 machos y hembras del grupo control y tratado con clorfeniramina (Clorfe) en condiciones basal y de estimulación por meta-anfetamina (1 mg/Kg/ip.). Los valores son el promedio  $\pm$  E.E.M. del número de animales indicado en la barra de 3-4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

En respuesta a la administración de meta-anfetamina, las ratas machos y hembras provenientes del grupo clorfeniramina presentaron una disminución significativa en todos los parámetros analizados, cruces totales (control machos:  $226 \pm 17$ ; clorfeniramina machos:  $178 \pm 15$ ; control hembras:  $237 \pm 15$ ; clorfeniramina hembras:  $184 \pm 5$ ), velocidad (control machos:  $144 \pm 10$ ; clorfeniramina machos:  $110 \pm 7$ ; control hembras:  $139 \pm 9$ ; clorfeniramina hembras:  $117 \pm 5$ ; milímetros/segundos) y distancia total recorrida (control machos:  $28 \pm 1$ ; clorfeniramina machos:  $23 \pm 1$ ; control hembras:  $31 \pm 0.8$ ; clorfeniramina hembras:  $26 \pm 0.7$ ; metros; Figura 26A, B y C).

## 7. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican una función importante del RH<sub>1</sub> durante el desarrollo embrionario del sistema dopaminérgico de la SNpc, ya que su bloqueo farmacológico durante un periodo crítico del desarrollo de este núcleo induce alteraciones del sistema nigro-estriatal con consecuencias en la conducta motora de la rata en una etapa postnatal (P21).

Además de ser un antagonista/agonista inverso selectivo del RH<sub>1</sub>, la clorfeniramina es un antagonista de los receptores muscarínicos; sin embargo, los valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición de la unión de [<sup>3</sup>H]-N-metil-escopolamina a los receptores muscarínicos (17-78 μM) indican una baja afinidad (Yasuda y Yasuda, 1999), en contraste con la alta afinidad de la clorfeniramina por el RH<sub>1</sub>, con una constante de inhibición (K<sub>i</sub>) de 1-3 nM (Arias-Montaña y Young, 1993; Hishinuma et al., 2017). Asimismo, la expresión de los receptores muscarínicos durante el desarrollo del MescV, a partir de E16 en la rata (Schlumpf et al., 1991), es posterior al periodo del tratamiento en el presente trabajo (E12 a E14). En conjunto, la información anterior apoya que los efectos reportados se deben al bloqueo del RH<sub>1</sub>.

La alta densidad del receptor RH<sub>1</sub>, así como el bajo contenido de histamina (~0.08 pmol/mg de proteína) en E12, y las afinidades por la clorfeniramina (K<sub>d</sub> 2.5 nM) e histamina (K<sub>d</sub> 1.26 μM) del RH<sub>1</sub> (Taylor et al., 1982; Vanhala et al., 1994; Ramos-Jiménez et al., 2009) indican que el efecto de la clorfeniramina se debe a la inhibición de la función de la histamina endógena, y/o a agonismo inverso del fármaco en receptores constitutivamente activos (Bakker et al., 2000; Nijmeijer et al., 2010).

La activación del RH<sub>1</sub> promueve la liberación de calcio de reservorios intracelulares, aumentando la concentración intracelular del catión ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) y la entrada capacitativa del ion (Hill et al., 1997; Panula et al., 2015). El calcio es un segundo mensajero que durante el desarrollo del sistema nervioso induce procesos de diferenciación neuronal, maduración, arborización

dendrítica y regulación del crecimiento axónico (Rosenberg et al., 2011; Toth et al., 2016). De esta forma, el calcio podría ser un segundo mensajero importante para los efectos encontrados en este estudio.

Los experimentos de RT-PCR y unión de radioligando para el RH<sub>1</sub> indicaron una mayor expresión y densidad del receptor en E12 con respecto a E14, lo cual coincide con el pico neurogénico de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Gates et al., 2006). Otros procesos, como la migración y la maduración neuronales, concurren durante este período, lo que sugiere que el bloqueo del RH<sub>1</sub> también podría afectarlos. Así mismo, la presencia del receptor en la ZV del neuroepitelio en E12 sugiere la expresión del receptor por las CTNs y progenitores neurales a esta edad, mientras que en E14 la inmunorreactividad se observa a lo largo del neuroepitelio mesencefálico, indicando su expresión por otros tipos celulares, como los neuroblastos y las neuronas dopaminérgicas recién originadas (LaManno et al., 2016).

Reportes previos de nuestro grupo indican que la inyección intrauterina de clorfeniramina (en el lumen ventricular de embriones E12) disminuye la diferenciación neuronal del fenotipo de láminas profundas FOXP2<sup>+</sup> en el neuroepitelio cortical de embriones de rata E14 (Molina-Hernández et al., 2013), lo que indica la participación del RH<sub>1</sub> en los procesos diferenciación neuronal en otras áreas del SNC en desarrollo. En contraste, el bloqueo del RH<sub>1</sub> a corto plazo indujo un aumento en la diferenciación neuronal dopaminérgica durante la etapa embrionaria, disminución del marcador de compromiso dopaminérgico (LMX1b) en E14 y aumento de los marcadores dopaminérgicos (PITX3 y TH) en E16, sugiriendo un mayor compromiso neuronal, seguido de un aumento en la diferenciación y maduración dopaminérgicas durante el periodo de tratamiento. Para confirmar lo anterior, se requiere el estudio del efecto del tratamiento en tiempos más cortos, para determinar los cambios en las poblaciones celulares de E12 a E14.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con el reporte reciente de Vargas-Romero y colaboradores (2019), en el cual la inyección de

histamina en embriones E12 promueve la disminución del fenotipo dopaminérgico en E14, así como una disminución en la innervación dopaminérgica al neocórtex en E18, efecto mediado por la regulación de marcas epigenéticas represoras como son la histona H3K9 trimetilada (H3K9me3), la histona H3K27 trimetilada (H3K27) y la 5-metilcitosina (5-mc), indicando que la regulación epigenética es un factor importante en la diferenciación dopaminérgica inducida por la histamina.

El bloqueo del  $RH_1$  por la clorfeniramina promueve efectos contrarios en las CTNs corticales y mesencefálicas, lo cual podría ser explicado por el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la expresión diferencial de canales de  $Ca^{2+}$  activados por depósito (SOCE) y por  $Ca^{2+}$ , y de proteínas de unión a  $Ca^{2+}$ . Esta hipótesis es reforzada por las diferencias reportadas en los transitorios de  $Ca^{2+}$  en CTNs aisladas del neuroepitelio cortical y mesencefálico cuando son estimuladas con histamina. Las CTNs corticales expuestas a 100  $\mu M$  de histamina presentan un aumento de 2.2 veces en la  $[Ca^{2+}]_i$ , mientras que las CTNs responden a 10  $\mu M$  de histamina con un aumento de 4 veces en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Molina-Hernández et al., 2013; Escobedo-Ávila et al., 2014). Estos datos sugieren que ambos tipos de CTNs poseen diferentes mecanismos de homeostasis del  $Ca^{2+}$ , lo cual podría generar diferencias importantes en los procesos de proliferación y diferenciación de las CTNs. Sin embargo, aún no se han reportado cambios en la expresión diferencial de la maquinaria celular que controla la homeostasis intracelular del  $Ca^{2+}$  en subtipos de CTNs.

En embriones de *Xenopus laevis* se ha reportado que la especificación hacia el fenotipo dopaminérgico depende de la actividad de las espigas de  $Ca^{2+}$  (Velázquez-Ulloa et al., 2011), y en el mismo modelo se ha observado que el aumento en la frecuencia de las espigas de  $Ca^{2+}$  por sobre-expresión de canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) promueve la reducción del número de células LMX1b<sup>+</sup>, mientras que la disminución en las espigas de  $Ca^{2+}$  por sobre-expresión de canales de potasio rectificadores de entrada (Kir) promueve un aumento en el número de células de este linaje, concluyéndose

que la actividad espontánea de  $Ca^{2+}$  modula la especificación hacia neuronas serotoninérgicas al regular la expresión del factor de transcripción LMX1b (Demarque et al., 2010).

El factor de transcripción LMX1b es también expresado por los progenitores neurales dopaminérgicos del MescV (Doucet-Beaupré et al., 2015), sugiriendo que la especificación dopaminérgica podría ser regulada por cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ , y se ha reportado que LMX1b participa en la diferenciación dopaminérgica regulando la salida del ciclo celular de los progenitores neurales (Yan et al., 2011). En este sentido, es probable que los efectos observados en el grupo de clorfeniramina en este estudio se deban a una regulación en la expresión de LMX1b por cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  de E12 a E14, que promuevan la salida prematura del ciclo celular de los progenitores neurales, y consecuentemente un aumento en la diferenciación neuronal, lo que es apoyado por la disminución de LMX1b (E14) y el incremento en los marcadores de diferenciación PITX3 y TH (E16) aquí mostrados.

Un resultado inesperado en relación al incremento en los marcadores de diferenciación neuronal durante la etapa embrionaria (E14 y E16) en el grupo de clorfeniramina, fue que las crías P21 mostraron una disminución en la inmunorreactividad a TH a nivel de la SNpc. Lo anterior puede ser explicado por el menor número de neuronas dopaminérgicas encontradas en este núcleo, o bien por una mayor localización ectópica de neuronas TH<sup>+</sup>, lo que sugiere alteraciones en el proceso de migración de las neuronas generadas en la etapa embrionaria, una hipótesis que merece ser estudiada.

La migración de las nDA de la SNpc ocurre en dos etapas; la primera se basa en la migración de los neuroblastos mediante los procesos celulares de la GR (migración radial), mientras que la segunda etapa corresponde a la migración tangencial. En la migración radial participa la molécula quimio-atrayente CXCL12 secretada por las meninges en formación, y al activar al receptor CXCR4 en los neuroblastos se promueve la migración hacia el área de diferenciación. La migración tangencial es regulada principalmente

por la glicoproteína reelina, sintetizada por las neuronas del núcleo rojo, y cuya función quimio-repelente posicionará a las nDAs en la SNpc (Bodea et al., 2014; Vaswani et al., 2019). Datos preliminares de nuestro laboratorio muestran que la administración de clorfeniramina en el mismo periodo induce disminución en la inmunorreactividad a la reelina en la zona marginal de la corteza cerebral de ratas neonatas P0 (datos no publicados), lo que sugiere alteraciones en la migración de los neuroblastos corticales. Así, lo encontrado en el presente estudio y en la corteza cerebral indica que el bloqueo del RH<sub>1</sub> con clorfeniramina promueve cambios en la expresión de reelina lo que a su vez, conlleva a alteraciones en la migración tangencial para la adecuada formación de la SNpc; en apoyo a esta hipótesis se observó un incremento en las células TH<sup>+</sup> ectópicas dispersas en un área que no les corresponde.

Otra posible explicación para el menor número de neuronas en la SNpc en el grupo tratado con clorfeniramina, podría ser que durante el proceso de selección y maduración del sistema ocurra una mayor muerte por apoptosis de las neuronas que no maduraron adecuadamente y/o que no se incorporaron al circuito neuronal en los días en los que normalmente ocurre este proceso (P2 y P14) en la rata (Burke, 2004), tal como propone la teoría neurotrófica clásica (Clarke, 1985). Sin embargo, son necesarios más estudios para poder determinar los mecanismos que subyacen la disminución en el número de neuronas en la SNpc y la localización ectópica de neuronas TH<sup>+</sup> que conllevan a alteraciones en la invasión nigro-estriatal y que finalmente promoverán afectaciones en la actividad locomotora.

La disminución en el contenido y liberación de dopamina reportadas en este estudio podría ser explicada por una reducción en la densidad de receptores D<sub>2</sub> expresados en las terminales dopaminérgicas; sin embargo, el ensayo de unión con [<sup>3</sup>H]-espiperona en la preparación membranal de sinaptosomas no mostró diferencias significativas entre los grupos, indicando que este componente del sistema dopaminérgico no participa en los cambios observados en el neostriado de animales provenientes del grupo

clorfeniramina. No se analizaron otros componentes de la transmisión dopaminérgica, como la actividad enzimática de la TH, la captura de dopamina por el DAT o el transporte vesicular por el VMAT2, y por lo tanto no puede descartarse que cambios en alguno de estos componentes participen en las alteraciones observadas en el contenido y liberación de dopamina en el neocórtex.

Es importante mencionar que los datos obtenidos en esta investigación muestran la importancia de continuar estudiando los efectos de los antihistamínicos durante la gestación y sus efectos en la progenie. Entre los antihistamínicos de primera generación, con capacidad de atravesar las barreras hematoencefálica y placentaria, se encuentra la clorfeniramina como uno de los más consumidos (Simons et al., 2008; So et al., 2010). Este fármaco es catalogado por la FDA (*Food and Drug Administration*) en la clasificación B, por lo que es prescrito para el tratamiento de náuseas, vómito, rinitis, asma y alergias, entre otras alteraciones, durante el embarazo.

Se calcula que el consumo de antihistamínicos durante el embarazo es de 4-10% durante el primer trimestre y de 8-15% durante el resto de la gestación (Shawky et al., 2015; Gilboa et al., 2014). Se ha reportado que durante el primer trimestre de gestación en humanos ocurre el pico de diferenciación y el inicio de la maduración dopaminérgica (Freeman et al., 1991; Almqvist et al., 1996; Nelander et al., 2009), y en este sentido el presente estudio es pionero en la generación de evidencia de efectos adversos de este fármaco en el desarrollo del SNC intrauterino, por lo que los resultados podrían tener importancia clínica para el embarazo. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar los mecanismos implicados en las alteraciones del sistema nigro-estriatal aquí reportadas, y su posible implicación en la programación fetal como factor de riesgo para patologías relacionadas con el SNC que actualmente se consideran idiopáticas.

## 8. Conclusión

Los resultados de esta tesis indican que:

1. El receptor a histamina H<sub>1</sub> presenta una mayor expresión y densidad en el tejido embrionario E12 con respecto al tejido E14.
2. El bloqueo del receptor a histamina H<sub>1</sub> en el periodo de E12 a E14:
  - a) Aumenta la diferenciación neuronal dopaminérgica en E16.
  - b) Disminuye el número de células TH<sup>+</sup> en la sustancia negra y aumenta el número de células TH<sup>+</sup> ectópicas en ratas P21.
  - c) Disminuye la inmunorreactividad de TH en el neocórtex de ratas P21.
  - d) Disminuye el contenido y la liberación de dopamina sin modificar la densidad de receptores D<sub>2</sub> en el neocórtex de ratas P21.
  - e) Afecta la actividad locomotora de las ratas P21 inducida por meta-anfetamina.

Con base en estos resultados, se concluye que el receptor a histamina H<sub>1</sub> tiene una función importante en el desarrollo de la vía nigro-estriatal, afectando la maduración y migración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta, y conduciendo a alteraciones en la transmisión dopaminérgica y motoras en la vida postnatal.

## 9. Perspectivas

Las perspectivas que generó este proyecto son las siguientes:

1. Estudiar el mecanismo de acción corriente abajo de la activación o inhibición del  $RH_1$  durante el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas.
2. Evaluar si cambios en los transitorios de  $[Ca^{2+}]_i$  y/o en la actividad de la PKC están implicados en la diferenciación y migración de las neuronas dopaminérgica del MescV.
3. Evaluar si el tratamiento con clorfeniramina promueve cambios a corto plazo en la expresión de quimiocinas y sus receptores, que expliquen el menor número de nDAs en la SNpc y el mayor número de neuronas ectópicas.
4. Determinar si la apoptosis en los días P2 y P14 participa en la disminución de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc de ratas P21 provenientes de ratas gestantes expuestas a clorfeniramina.
5. Estudiar si el tratamiento con clorfeniramina promueve cambios en la conexión dopaminérgica con las neuronas espinosas medianas del neocórtex.
6. Evaluar si el tratamiento prenatal temprano con clorfeniramina promueve afectaciones en otros núcleos dopaminérgicos, como el VTA.

## 10. Referencias

- Abeliovich A., Hammond R. (2007) Midbrain dopamine neuron differentiation: Factors and fates. *Dev Biol.* 304, 447-454.
- Almqvist P.M., Akesson E., Wahlberg L.U., Pschera H., Seiger A., Sundstrom E. (1996) First trimester development of the human nigrostriatal dopamine system. *Exp Neurol.* 139, 227-237.
- Ang S.L. (2006) Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development.* 133, 3499-506.
- Arias-Montaña J.A., Young J.M. (1993) Characteristics of histamine H<sub>1</sub> receptors on HeLa cells. *Eur J Pharmacol.* 245, 291-5.
- Auvinen S., Panula P. (1988) Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain. *J Comp Neurol.* 276, 289-303.
- Bagri A., Marín O., Plump A.S., Mark J., Pleasure S.J., Rubenstein J.L., Tessier-Lavigne M. (2002) Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron.* 332, 233-48.
- Bahena-Trujillo R., Flores G., Arias-Montaña J.A. (2000) Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed.* 11, 39-60.
- Bakker R.A., Wieland K., Timmerman H., Leurs R. (2000) Constitutive activity of the histamine H<sub>1</sub> receptor reveals inverse agonism of histamine H<sub>1</sub> receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 387, 5-7.
- Beaulieu J.M., Espinoza S., Gainetdinov R.R. (2015) Dopamine receptors – IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol.* 172, 1-23.
- Björklund A., Dunnett S.B. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194-202.
- Blaess S., Ang S.L. (2015) Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Wires Dev Biol.* 4, 113-34.
- Bobrovskaya L., Dunkley P.R., Dickson P.W. (2004) Phosphorylation of Ser19 increases both Ser40 phosphorylation and enzyme activity of tyrosine hydroxylase in intact cells. *J Neurochem.* 90, 857-864.
- Bodea G.O., Spille J.H., Abe P., Andersson A.S., Acker-Palmer A., Stumm R., Kubitscheck U., Blaess S. (2014) Reelin and CXCL12 regulate distinct migratory behaviors during the development of the dopaminergic system. *Development.* 141, 661-73.

- Bodea G.O., Blaess S. (2015) Establishing diversity in the dopaminergic system. *FEBS Lett.* 589, 3773-3785.
- Bonilla S., Hall A.C., Pinto L., Attardo A., Götz M., Huttner W.B., Arenas E. (2008) Identification of midbrain floor plate radial glia-like cells as dopaminergic progenitors. *Glia.* 56; 809-820.
- Bouchard M., Grote D., Craven S.E., Sun Q., Steinlein P., Busslinger M. (2005) Identification of Pax2-regulated genes by expression profiling of the mid-hindbrain organizer region. *Development.* 132, 2633-2643
- Brignani S., Pasterkamp R.J. (2017) Neuronal subset-specific migration and axonal wiring mechanisms in developing midbrain dopamine system. *Front Neuroanat.* 11:55, 1-18.
- Brown R.E., Stevens D.R., Haas H.L. (2001) The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol.* 63, 637-672.
- Burke R.E. (2004) Ontogenic cell death in the nigrostriatal system. *Cell Tissue Res.* 318, 63-72.
- Calipari E.S., Ferris M.J. (2013) Amphetamine mechanisms and actions at the dopamine terminal revisited. *J Neurosci.* 33, 8923-25.
- Chen X., Egly C., Riley A.M., Li W., Tewson P., Hughes T.E. Quinn A.M. Obukhov A.G. (2014) PKC-dependent phosphorylation of the H<sub>1</sub> histamine receptor modulates TRPC6 activity. *Cells.* 3, 247-57.
- Clarke P.G.H. (1985) Neuronal death in the development of the vertebrate nervous system. *Trends Neurosci.* 8, 345-49.
- Connelly W.M., Shenton F.C., Lethbridge N., Leurs R., Waldvogel H.J., Faull R.L., Lees G., Chazot P.L. (2009) The histamine H<sub>4</sub> receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br J Pharmacol.* 157, 55-63.
- Crossley P.H., Martinez S., Martin G.R. (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature.* 380, 66-68.
- Demarque M., Spitzer N.C. (2010) Activity-dependent expression of Lmx1b regulates specification of serotonergic neurons modulating swimming behavior. *Neuron.* 67, 321-34.
- Doucet-Beaupré H., Ang S.L., Lévesque M. (2015) Cell fate determination, neuronal maintenance and disease state: The emerging role of transcription factors Lmx1a and Lmx1b. *FEBS Lett.* 589, 3727-38.

- Dugan J.P., Stratton A., Riley H.P., Farmer W.T., Mastick G.S. (2011) Midbrain dopaminergic axons are guided longitudinally through the diencephalon by Slit/Robo signals. *Mol Cell Neurosci.* 46, 347-56.
- Escobedo-Ávila I., Vargas-Romero F., Molina-Hernández A., López-González R., Cortés D., De Carlos J.A., Velasco I. (2014) Histamine impairs midbrain dopaminergic development in vivo by activating histamine type 1 receptors. *Mol Brain.* 7, 58.
- Freeman T.B., Spence M.S., Boss B.D., Spector D.H., Strecker R.E., Olanow C.W., Kordower J.H. (1991) Development of dopaminergic neurons in the human substantia nigra. *Exp Neurol.* 3, 344-353.
- Garduño-Torres B., Treviño M., Gutiérrez R., Arias-Montaña J.A. (2007) Pre-synaptic histamine H<sub>3</sub> receptors regulate glutamate, but not GABA release in rat thalamus. *Neuropharmacology.* 52, 527-35.
- Gates M.A., Torres E.M., White A., Fricker-Gates R.A., Dunnett S.B. (2006) Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. *Eur J Neurosci.* 23, 1384-90.
- German D.C., Schlüsselberg D.S., Woodward D.J. (1983) Three-Dimensional Computer reconstruction of midbrain dopaminergic neuronal populations: from mouse to man. *J Neural Transm.* 4, 243-254.
- Gilboa S.M., Ailes E.C., Rai R.P., Anderson J.A., Honei M.A. (2014) Antihistamines and birth defects: a systemic review of the literature. *Expert Opin Drug Saf.* 13, 1667-98.
- Guerrero-Flores G., Bastidas-Ponce A., Collazo-Navarrete O., Guerra-Crespo M., Covarrubias L. (2017) Functional determination of the differentiation potential of ventral mesencephalic neural precursor cells during dopaminergic neurogenesis. *Dev Biol.* 429, 56-70.
- Guo C., Qiu H.Y., Huang Y., Chen H., Yang R.Q., Chen S.D., Johnson R.L., Chen Z.F., Ding Y.Q. (2007) *Lmx1b* is essential for *Fgf8* and *Wnt1* expression in the isthmus organizer during tectum and cerebellum development in mice. *Development.* 134, 317-325.
- Haas H.L., Sergeeva O.A., Selbach O. (2008) Histamine in the nervous system. *Physiol Rev.* 88, 1183-1241.

- Hebsgaard J.B., Nelander J., Sabelström H., Jönsson M.E., Stott S., Parmar M. (2009) Dopamine neuron precursors within the developing human mesencephalon show radial glial characteristics. *Glia*. 57, 1648-1658.
- Hegarty S.V., Sullivan A.M., O'Keefe G.W. (2013) Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev Biol*. 379, 123-38.
- Hill S.J., Ganellin C.R., Timmerman H., Schwartz J.C., Shankley N.P., Young J.M. Schunack W., Levi R., Haas H.L. (1997) International union of pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev*. 49, 253-78.
- Hishinuma S., Kosaka K., Akatsu C., Uesawa Y., Fukui H., Shoji M. (2017) Asp73-dependent and -independent regulation of the affinity of ligands for human histamine H<sub>1</sub> receptors by Na. *Biochem Pharmacol*. 128, 46–54.
- Honrubia M.A., Vilaró M.T., Palacios J.M., Mengod G. (2000) Distribution of the histamine H<sub>2</sub> receptor in monkey brain and its mRNA localization in monkey and human brain. *Synapse*. 38, 343-354.
- Joksimovic M., Anderegg A., Roy A., Campochiaro L., Yun B., Kittappa R., McKay R., Awatramani R. (2009) Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106, 19185-19190.
- Kang W.Y., Kim S.S., Cho S.K. Kim S., Suh-Kim H., Lee Y.D. (2010) Migratory defect of mesencephalic dopaminergic neurons in developing reeler mice. *Anat Cell Biol*. 43, 241-51.
- Karlstedt K., Senkas A., Ahman M., Panula P. (2001) Regional expression of the histamine H<sub>2</sub> receptor in adult and developing rat brain. *Neuroscience*. 102, 201-208.
- Karlstedt K., Ahman M.J., Anichtchik O.V., Soinila S., Panula P. (2003) Expression of the H<sub>3</sub> receptor in the developing CNS and brown fat. *Mol Cell Neurosci*. 3, 614-622.
- Kawano H., Ohyama K., Kawamura K., Nagatsu I. (1995) Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res Dev Brain Res*. 86, 101-13.
- Kinnunen A., Panula P. (1991) Histamine and tyrosine hydroxylase in developing rat brain. *Agents Actions*. 33, 108-111.

- Kinnunen A., Lintunen M., Karlstedt K., Fukui H., Panula P. (1998) In situ detection of H<sub>1</sub>-receptor mRNA and absence of apoptosis in the transient histamine system of the embryonic rat brain. *J Comp Neurol.* 394, 127-137.
- La Manno G., Gyllborg D., Codeluppi S., Nishimura K., Salto C., Zeisel A., Borm L.E., Stott S.R.W., Toledo E.M., Villaescusa J.C., Lonnerberg P., Ryge J., Barker R.A., Arenas E., Linnarsson S. (2016) Molecular diversity of midbrain development in mouse, human, and Stem Cells. *Cell.* 167, 566-80.
- Li J., Duarte T., Kocabas A., Works M., McConell S.K., Hynes M.A. (2014) Evidence for topographic guidance of dopaminergic axons by differential Netrin-1 expression in the striatum. *Mol Cell Neurosci.* 61, 85-96.
- Lin W., Metzakopian E., Mavromatakis Y.E., Gao N., Balaskas N., Sasaki H., Briscoe J., Whitsett J.A., Goulding M., Kaestner K.H., Ang S.L. (2009) Foxa1 and Foxa2 function both upstream of and cooperatively with Lmx1a and Lmx1b in a feedforward loop promoting mesodiencephalic dopaminergic neuron development. *Dev Biol.* 333, 386-96.
- Liu A., Joyner A.L. (2001) EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development.* 128, 181-91.
- Márquez-Gómez R., Robins M.T., Gutiérrez.Rodelo C., Arias J.M., Olivares-Reyes J.A., van Rijn R.M. Arias-Montaña J.A. (2018) Functional histamine H<sub>3</sub> and adenosine A<sub>2</sub>A-receptor heteromers in recombinant cells and rat striatum. *Pharmacol Res.* 129, 515-25.
- Matsuda W., Furuta T., Nakamura K.C., Hioki H., Fujiyama F., Arai R., Kaneko T. (2009) Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci.* 29, 444-53.
- Matsunaga E., Katahira T., Nakamura H. (2002) Role of Lmx1b and Wnt1 in mesencephalon and metencephalon development. *Development.* 129, 5269-5277.
- Meyers E.N., Lewandoski M., Martin G.R. (1998) An FGF8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp- mediated recombination. *Nat Genet.* 18, 136-141.
- Molina-Hernández A. Díaz N.F., Arias-Montaña J.A. (2012) Histamine in brain development. *J Neurochem.* 122, 872-882.

- Molina-Hernández A., Rodríguez-Martínez G., Escobedo-Ávila I., Velasco I. (2013) Histamine up-regulates fibroblast growth factor receptor 1 and increases FOXP2 neurons in cultured neural precursors by histamine type 1 receptor activation: conceivable role of histamine in neurogenesis during cortical development in vivo. *Neural Dev.* 8, 4.
- Molina-Hernández A., Velasco I. (2008) Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *J Neurochem.* 106, 706-717.
- Morini N.H., Booth R.G. (2006) Role of PKA and PKC in histamine H<sub>1</sub> receptor-mediated activation of catecholamine neurotransmitter synthesis. *Neurosci Lett.* 407, 249-53.
- Murata Y., Miyoshi A., Kitamura Y., Takeda N., Fukui H. (2004) Up-regulation of histamine H<sub>1</sub> receptors in an allergic rat nasal mucosa model. *Inflamm Res.* 53, Suppl 1:S 11-2.
- Nelander J., Hebsgaard J.B., Parmar M. (2009) Organization of the human embryonic ventral mesencephalon. *Gene Expr Patterns.* 9, 555-561.
- Nieto-Alamilla G., Márquez-Gómez R., García-Gálvez A.M., Morales-Figueroa G.E., Arias-Montaña J.A. (2016) The histamine H<sub>3</sub> receptor: structure, pharmacology and function. *Mol Pharmacol.* 90, 649-673.
- Nijmeijer S., Leurs R., Vischer H.F. (2010) Constitutive activity of the histamine H<sub>1</sub> receptor. *Meth. Enzymol.* 484, 127-47.
- Nishikawa S., Goto S., Yamada K., Hamasaki T., Ushio Y. (2003) Lack of Reelin causes malpositioning of nigral dopaminergic neurons: evidence from comparison of normal and *Reln*(rl) mutant mice. *J Comp Neurol.* 461, 166-73.
- Pakkenberg B., Møller A., Gundersen H.J., Mouritzen Dam A., Pakkenberg H. (1991) The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1, 30-33.
- Panman L., Papanthou M., Laguna A., Osterveen T., Volakakis N., Acampora D., Kurtsdotter I., Yoshitake T., Kehr J., Joodmardi E., Muhr J., Simeone A., Ericson J., Perlmann T. (2014) Sox6 and Otx2 control the specification of substantia nigra and ventral tegmental area dopamine neurons. *Cell Rep.* 8: 1018-25.

- Panula P., Chazot P.L., Cowart M., Gutzmer R., Leurs R., Liu W.L., Stark H., Thurmond R.L., Haas H.L. (2015) International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacol Rev.* 67, 601-55.
- Panula P., Nuutinen S. (2013) The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci.* 14, 427-87.
- Panula P., Pirvola U., Auvinen S., Airaksinen M.S. (1989) Histamine immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience.* 28, 585-610.
- Pedarzani P., Storm J.F. (1995) Protein kinase A-independent modulation of ion channels in the brain by cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 11716–11720.
- Poulin J.F. Zou J., Drouin-Ouellet J., Kim K.Y., Cicchetti F., Awatramani R.B. (2014) Defining midbrain dopaminergic neuron diversity by single-cell gene expression profiling. *Cell Rep.* 9, 930-43.
- Prakash N., Brodski C., Naserke T., Puelles E., Gogoi R., Hall A., Panhuysen M., Echevarria D., Sussel L., Weisenhorn D.M., Martinez S., Arenas E., Simeone A., Wurst W. (2006) A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development.* 133, 89-98.
- Prestoz L., Jaber M., Gaillard A. (2012) Dopaminergic axon guidance: which makes what? *Front Cell Neurosci.* 6, 1-13.
- Ramos-Jiménez J., Garduño-Torres B., Arias-Montaña J.A. (2009) Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed.* 20, 100-126.
- Reith M.E., Xu C., Chen N.H. (1997) Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol.* 324, 1-10.
- Rice, M.E., Patel, J.C., Cragg, S.J. (2011) Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198,112-137.
- Rivière G.J., Byrnes K.A., Gentry W.B., Owens S.M. (1999) Spontaneous locomotor activity and pharmacokinetics of intravenous methamphetamine and its metabolite amphetamine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 291, 1220-6.
- Rodríguez-Martínez G., Velasco I., García-López G., Solís K.H., Flores-Herrera H., Díaz N.F., Molina-Hernández A. (2012) Histamine is required during neural stem cell proliferation to increase neuron differentiation. *Neuroscience.* 216, 10-17.

- Shawky R.M., Seifeldi N.S. (2015) The relation between antihistamine medication during early pregnancy & birth defects. *Egypt J Med Hum Genet* 16, 287-90.
- Schlumpf M., Palacios J.M., Cortes R., Lichtensteiger W. (1991) Regional development of muscarinic cholinergic binding sites in the prenatal rat brain. *Neuroscience*. 45, 347-57.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 7, 671-75.
- Schneider E.H., Seifert R. (2016) The histamine H<sub>4</sub>-receptor and the central and peripheral nervous system: A critical analysis of the literature *Neuropharmacology*. 106, 116-28.
- Schwarz M., Alvarez-Bolado G., Dressler G., Urbánek P., Busslinger M., Gruss P. (1999) Pax2/5 and Pax6 subdivide the early neural tube into three domains. *Mech Dev*. 82, 29-39.
- Simons F.E., Simons K.J. (2008) H<sub>1</sub> antihistamines: current status and future directions. *World Allergy Organ J*. 1, 145-55.
- Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson B., Klenk D. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- So M., Bozz P., Inoue M., Einarson A. (2010) Safety of antihistamines during pregnancy and lactation. *Can Fam Physician*. 56, 427-9.
- Solís González K.H. (2015) Diferencias ontogénicas del sistema histaminérgico en embriones de ratas sanas y diabéticas. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN. México, D.F.
- Solís K.H., Méndez L.I., García-López G., Díaz N.F., Portillo W., De Nova-Ocampo M., Molina-Hernández A. (2017) The histamine H<sub>1</sub> receptor participates in the increased dorsal telencephalic neurogenesis in embryos from diabetic rats. *Front Neurosci*. 11, 676.
- Taylor J.E., Richelson E. (1982) High-affinity binding of [<sup>3</sup>H]-doxepin to histamine H<sub>1</sub> receptors in rat brain: possible identification of a subclass of histamine H<sub>1</sub>-receptors. *Eur J Pharmacol*. 78, 279-85.
- Toth A.B., Shum A.K., Prakriya M. (2016) Regulation of neurogenesis by calcium signaling. *Cell calcium*. 59, 124-34.

- Vanhala A., Yamatodani A., Panula P. (1994) Distribution of histamine-, 5-hydroxytryptamine-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and nerve fibers in developing rat brain. *J Comp Neurol.* 347, 101-14.
- Vaswani A.R., Weykopf B., Hagemann C., Fried H.U., Brustle O., Blaess S. (2019) Correct setup of the substantia nigra requires Reelin-mediated fast, laterally-directed migration of dopaminergic neurons. *Elife.* 8, pii: e41623.
- Velázquez-Ulloa N.A., Spitzer N.C., Dulcis D. (2011) Contexts for dopamine specification by calcium spike activity in the CNS. *J Neurosci.* 31, 78-88.
- Villanueva M.A. (2008) Electrotransfer of proteins in an environmentally friendly methanol-free transfer buffer. *Anal Biochem.* 373, 377-79.
- Wallén A., Perlmann T. (2003) Transcriptional control of dopamine neuron development. *Ann N Y Acad Sci.* 991, 48-60.
- Xu B., Goldman J.S., Rymar V.V., Forget C., Lo P.S., Bull S.J., Vereker E., Barker P.A., Trudeau L.E., Sadikot A.F., Kennedy T.E. (2010) Critical roles for the netrin receptor deleted in colorectal cancer in dopaminergic neuronal precursor migration, axon guidance, and axon arborization. *Neuroscience.* 169, 932-49.
- Yan C.H., Levesque M., Claxton S., Johnson R.L., Ang S.L. (2011) Lmx1a and Lmx1b function cooperatively to regulate proliferation, specification, and differentiation of midbrain dopaminergic progenitors. *J Neurosci.* 31, 12413-25.
- Yasuda S.U., Yasuda R.P. (1999) Affinities of brompheniramine, chlorpheniramine, and terfenadine at the five human muscarinic cholinergic receptor subtypes. *Pharmacotherapy.* 18, 447-51.