



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Efecto de las mutaciones Y197C y A280V en las propiedades
farmacológicas y de señalización del receptor a histamina H₃
humano expresado en células CHO-K1**

T E S I S

Que presenta

CECILIA FLORES CLEMENTE

para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

Ciudad de México

Enero, 2017

Al autor de la vida.

A mis padres: Faustino y María Josefina.

A mis hermanas: Teresa y María de Lourdes.

A mis abuelos: Anselmo y Carolina, Miguel y Maximina.

A mis sobrinos: Francisco Javier, Mateo Genaro, María Guadalupe y Teresa Jaqueline.

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio 37 (Neurofarmacología) del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav-IPN, bajo la dirección de los Doctores José Antonio G. Arias Montaña (Cinvestav-IPN) y Juan Manuel Arias Montaña (Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM). Los recursos fueron otorgados por el propio Cinvestav y por el Conacyt (proyectos 128205 y 220448, J.A.A.M., y la beca número 244993, C.F.C.) y la UNAM (PAIIIT, proyecto IN216215, J.M.A.).

Agradecimientos

Gracias a Dios por todo.

Agradezco de manera especial al Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña por haberme aceptado en su laboratorio y por todas sus enseñanzas, correcciones, observaciones, motivaciones, consejos, tiempo y dedicación para el desarrollo del presente proyecto.

Agradezco al Dr. Juan Manuel Arias Montaña por su colaboración para la obtención de las mutaciones puntuales en el receptor a histamina H₃, por todas las enseñanzas, correcciones, motivaciones y su valioso tiempo dedicado a este proyecto.

Agradezco a los Doctores Daniel Martínez Fong y Benjamín Florán Garduño por su asesoría, el tiempo dedicado y las valiosas aportaciones a este proyecto de investigación.

Agradezco también de manera atenta a los Doctores Rafael Villalobos Molina y Jesús Alberto Olivares Reyes, por su tiempo y dedicación a la revisión de la tesis, así como por las valiosas aportaciones a la misma.

Por su puesto, agradezco de corazón a mi familia, a mis padres María Josefina y Faustino, a mis hermanas Teresa y María de Lourdes y a Camerino Amado, a mis sobrinos Francisco Javier, Mateo Genaro, María Guadalupe y Teresa Jaqueline por su cariño y apoyo incondicional.

Así también a mis amigos Darío García, Cristina Paniagua, Emmanuel, Jazmín Montserrat Flores, Angélica Osorio, María de los Angeles Andrade, Yazmin Debray, Clara Díaz, Alejandro Díaz, Erika Gonzalez y Juan Escamilla, por su amistad y apoyo. Agradezco al grupo de trabajo del Laboratorio 37 por su apoyo y amistad, al Arq. Raúl González, Angel Marrufo y José Carlos Ovando. Así también al Dr. Juan Escamilla por su apoyo en la amplificación de los vectores utilizados en este proyecto.

Índice

Resumen.....	6
<i>Abstract</i>	9
Abreviaturas.....	12
1. Introducción.....	15
1.1 El sistema histaminérgico del Sistema Nervioso Central (SNC).....	15
1.2 Receptores a histamina.....	16
1.3 Receptor a histamina H ₃ (H ₃ R).....	16
1.3.1 Estructura del H ₃ R.....	18
1.3.2 Distribución del H ₃ R.....	20
1.3.3 Vías de señalización.....	21
1.4 El H ₃ R y procesos patológicos del Sistema Nervioso (SN).....	21
1.4.1 Enfermedad de Parkinson.....	22
1.4.2 Enfermedad de Alzheimer.....	24
1.4.3 Enfermedad de Huntington.....	25
1.4.4 Depresión.....	25
1.4.5 Narcolepsia.....	26
1.4.6 Síndrome de Tourette.....	27
1.4.7 Migraña.....	27
1.4.8 Síndrome de Shy-Drager.....	28
2. Planteamiento del problema.....	29
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivos.....	33
4.1 Objetivo general.....	33
4.2 Objetivos particulares.....	33
5. Métodos.....	34
5.1 Obtención de las mutaciones puntuales Y197C y A280V en el hH ₃ R _{WT}	34
5.1.1 Obtención de la mutación puntual Y197C.....	34
5.1.1.1 Obtención de un fragmento del H ₃ R ₄₄₅ conteniendo la mutación Y197C.....	34
5.1.1.2 Clonación del fragmento F ₂ -R ₂ en el vector pJET1.2.....	37
5.1.1.3 Inserción del fragmento F ₂ -R ₂ en el plásmido pCI-Neo- hH ₃ R _{WT}	38
5.1.1.4 Confirmación de la mutación puntual Y197C en el vector pCI-Neo-hH ₃ R _{Y197C}	40
5.1.2 Obtención de la mutación puntual A280V.....	41
5.2 Cultivo celular.....	42
5.3 Expresión de los receptores hH ₃ R _{WT} , hH ₃ R _{Y197C} y hH ₃ R _{A280V} en células CHO-K1.....	42
5.3.1 Expresión del receptor hH ₃ R _{WT} o hH ₃ R _{Y197C}	42
5.3.1.1 Transfección transitoria de los receptores hH ₃ R _{WT} o hH ₃ R _{Y197C} ..	43
5.3.2 Expresión del receptor hH ₃ R _{WT} o hH ₃ R _{A280V}	43
5.3.2.1 Transfección y selección de células CHO-K1.....	43
5.3.2.2 Obtención de clonas celulares transfectadas con los receptores hH ₃ R _{WT} o hH ₃ R _{A280V}	44
5.4 Ensayos de unión de radioligando a membranas celulares.....	44
5.4.1 Ensayos con una concentración de radioligando.....	44
5.4.2 Ensayos con una concentración de radioligando en células intactas.....	45
5.4.3 Ensayos de saturación.....	46
5.4.4 Ensayos de inhibición.....	46

5.5	Determinación de la acumulación de AMPc en células intactas.....	46
5.6	Determinación de la unión de [³⁵ S]-GTPγS a membranas celulares.....	47
5.7	Inmunodetección de ERK-1/2 fosforiladas (p44/42-ERK).....	48
5.7.1	Obtención de los extractos protéicos.....	48
5.7.2	Detección de ERK-1/2 fosforiladas y totales.....	49
6.	Resultados.....	51
6.1	Mutación puntual Y197C en el receptor a histamina H ₃ humano (hH ₃ R).....	51
6.1.1	Obtención de la mutación puntual Y197C en el hH ₃ R.....	51
6.1.2	Expresión de los receptores hH ₃ R _{WT} y hH ₃ R _{Y197C} en la membrana citoplasmática de las células CHO-K1 transfectadas.....	52
6.1.3	Caracterización farmacológica de los receptores hH ₃ R _{WT} y hH ₃ R _{Y197C} expresados en células CHO-K1.....	54
6.1.3.1	Ensayos de saturación.....	54
6.1.3.2	Ensayos de inhibición.....	55
6.1.4	Funcionalidad de los receptores hH ₃ R _{WT} y hH ₃ R _{Y197C} expresados en células CHO-K1.....	57
6.1.4.1	Ensayos de unión de [³⁵ S]-GTPγS a membranas celulares.....	57
6.1.4.2	Ensayos de formación de AMPc.....	58
6.2	Mutación puntual A280V en el receptor hH ₃ R.....	60
6.2.1	Obtención de la mutación puntual A280V en el hH ₃ R.....	60
6.2.2	Expresión de los receptores hH ₃ R _{WT} y hH ₃ R _{A280V} en células CHO-K1...	62
6.2.3	Caracterización farmacológica de los receptores hH ₃ R _{WT} y hH ₃ R _{A280V} expresados en células CHO-K1.....	63
6.2.3.1	Ensayos de saturación.....	63
6.2.3.2	Ensayos de inhibición.....	64
6.2.4	Funcionalidad de los receptores hH ₃ R _{WT} y hH ₃ R _{A280V} expresados en células CHO-K1.....	65
6.2.4.1	Ensayos de unión de [³⁵ S]-GTPγS en membranas celulares.....	66
6.2.4.2	Ensayos de formación de AMPc.....	67
6.2.4.3	Inmunodetección de la fosforilación de ERK-1/2.....	69
6.2.5	Evaluación de la actividad constitutiva de los receptores hH ₃ R _{WT} y hH ₃ R _{A280V} expresados en células CHO-K1.....	71
6.2.5.1	Ensayos de unión de [³⁵ S]-GTPγS en membranas celulares.....	71
6.2.5.2	Ensayos de acumulación de AMPc.....	72
7.	Discusión.....	75
7.1	Mutación Y197C en el hH ₃ R ₄₄₅	76
7.1.1	La mutación Y197C no afecta la localización del hH ₃ R en la membrana citoplasmática de las células CHO-K1.....	76
7.1.2	La mutación Y197C no afecta la unión de ligandos al hH ₃ R.....	78
7.1.3	Efecto de la mutación Y197C en la funcionalidad del receptor hH ₃ R ₄₄₅ ..	80
7.2	Mutación A280V en el receptor a histamina H ₃ de 445 aa humano.....	82
7.2.1	Expresión del hH ₃ R _{A280V} en células CHO-K1.....	83
7.2.2	La mutación A280V no afecta la unión de ligandos al hH ₃ R.....	83
7.2.3	Efecto de la mutación A280V en la funcionalidad del receptor hH ₃ R ₄₄₅ ..	84
7.2.4	Actividad constitutiva de los receptores hH ₃ R _{WT} y hH ₃ R _{A280V}	88
7.2.5	Posibles consencuencias funcionales de la mutación A280V en el hH ₃ R _{WT}	90
8.	Conclusiones.....	92
9.	Referencias.....	93

Resumen

El receptor a histamina H₃ (H₃R) pertenece a la clase A de los receptores acoplados a proteínas G, ejerce sus efectos funcionales mediante la activación de proteínas G $\alpha_{i/o}$ y se encuentra como auto- y hetero-receptor pre-sináptico en el Sistema Nervioso Central, donde regula la liberación y la síntesis de histamina, así como la liberación de glutamato, noradrenalina, serotonina (5-hidroxitriptamina), GABA (ácido γ -aminobutírico), acetilcolina, dopamina y sustancia P.

Se han reportado cinco mutaciones que ocurren de manera natural en el H₃R humano de 445 amino ácidos (hH₃R₄₄₅): E19D, Y197C, A280V y dos polimorfismos de un solo nucleótido, rs3787429 y rs3787430. La mutación Y197C se encuentra en el extremo amino de la quinta región transmembranal del hH₃R₄₄₅, importante para la unión del ligando y la activación del receptor, y por lo tanto se hipotetizó que modificaría la interacción agonista-receptor o la señalización del mismo. La mutación A280V se ha asociado con predisposición a migraña y el síndrome de Shy-Drager, y se localiza en la tercera asa intracelular, crítica para el acople con proteínas G, por lo que se hipotetizó que alteraría la señalización del receptor.

Con base en lo anterior, el objetivo de esta tesis fue determinar el efecto de las mutaciones Y197C y A280V en las propiedades farmacológicas y de señalización del hH₃R₄₄₅ expresado en células CHO-K1. Para este propósito se generaron receptores con las mutaciones indicadas y la expresión, características farmacológicas y propiedades funcionales de los receptores nativo y mutados se analizaron mediante ensayos de unión del agonista marcado [³H]-N- α -metil-histamina en membranas celulares y/o células intactas, de unión de [³⁵S]-GTP γ S a membranas celulares (indicativo de la activación de proteínas G), de inhibición de la formación de AMPc en células intactas (debida a las

subunidades α de las proteínas $G\alpha_{i/o}$) y de estimulación de la fosforilación de las cinasas activadas por mitógenos ERK1/2 (mediada por los complejos $\beta\gamma$ de las proteínas $G\alpha_{i/o}$).

La mutación Y197C no modificó la expresión del hH₃R₄₄₅ en membranas celulares (761 ± 78 y 663 ± 66 fmol/mg de proteína para los receptores nativo y mutado, respectivamente), la localización en la membrana citoplasmática ($13,434 \pm 1,533$ y $15,894 \pm 2,054$ receptores/célula), o la afinidad por agonistas y antagonistas selectivos. En concordancia con lo anterior, la eficacia y la potencia del agonista selectivo RAMH para activar vías de señalización no se modificaron en el receptor mutado, de acuerdo a los ensayos de unión de [³⁵S]-GTP γ S a membranas celulares (estimulación máxima 192.5 ± 8.0 % y 175.8 ± 9.8 % de la unión basal, para los receptores nativo y mutado, respectivamente) y de inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina en células intactas (inhibición máxima 33.3 ± 3.9 % y 33.1 ± 4.7 %).

La mutación A280V no modificó las propiedades farmacológicas del receptor, ya que las afinidades de los receptores mutado y nativo por agonistas y antagonistas selectivos fueron semejantes. Sin embargo, el receptor mutado fue menos eficaz para estimular la unión de [³⁵S]-GTP γ S a membranas celulares (estimulación máxima 129.2 ± 2.6 % y 112.6 ± 2.7 % para los receptores nativo y mutado, respectivamente), para inhibir la formación de AMPc en células intactas (inhibición máxima 93.9 ± 2.6 % y 57.2 ± 8.4 %) y para estimular la fosforilación de las cinasas ERK-1/2 (359 ± 51 % y 214 ± 16 % de la fosforilación basal).

La mutación no modificó la potencia del agonista RAMH en ninguno de los ensayos funcionales. Tanto el receptor nativo como el receptor mutado mostraron actividad constitutiva modesta en los ensayos de unión de [³⁵S]-GTP γ S, con una menor eficacia del receptor mutado (inhibición máxima 12.03 ± 0.29 % y 5.85 ± 0.60 % para los receptores

nativo y mutado, respectivamente). Sin embargo, para ambos receptores no se observó actividad constitutiva en los ensayos de acumulación de AMPc.

En conjunto, los resultados de esta tesis indican que la mutación Y197C no modifica las propiedades farmacológicas o de señalización del hH₃R₄₄₅. En contraste, la mutación A280V no modifica las propiedades farmacológicas del hH₃R₄₄₅, pero disminuye su eficacia para activar las vías de señalización que involucran a las proteínas G $\alpha_{i/o}$. Estos efectos pueden ser relevantes en la fisiopatología de la migraña y del síndrome de Shy-Drager, al incidir en la regulación por la histamina de la liberación de neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central.

Abstract

The histamine H₃ receptor (H₃R) belongs to the class A of G protein-coupled receptors, couples to G $\alpha_{i/o}$ proteins and is expressed pre-synaptically as auto- and hetero-receptor in the Central Nervous System (CNS), where it regulates the synthesis and release of histamine, as well as the release of glutamate, noradrenaline, serotonin (5-hydroxytryptamine), GABA (γ -aminobutyric acid), acetylcholine, dopamine and substance P.

Five naturally occurring mutations have been reported for the human H₃R of 445 amino acids (hH₃R₄₄₅): E19D, Y197C, A280V, and two single-nucleotide polymorphisms, rs3787429 and rs3787430. The Y197C mutation is located at the N-terminal region of the fifth transmembrane domain, important for ligand binding and receptor activation, and it was therefore hypothesized that the mutation would modify the receptor-agonist interaction or the signaling of the receptor. The A280V mutation has been associated with migraine and the Shy-Drager syndrome and is located on the third intracellular loop of the hH₃R₄₄₅, critical for G protein coupling, and could thus alter the receptor signaling.

The aim of this work was therefore to determine the effect of the Y197C and A280V mutations on the pharmacological and signaling properties of the hH₃R₄₄₅ expressed in CHO-K1 cells. For this purpose, receptors bearing the indicated mutations were generated, and the expression, pharmacological characteristics and signaling properties of the native and mutant receptors were analyzed by [³H]-N- α -methyl-histamine binding to cell membranes or intact cells, [³⁵S]-GTP γ S binding to cell membranes (indicative of G protein activation), inhibition of cAMP accumulation in intact cells (due to the α subunits of G $\alpha_{i/o}$ proteins), and stimulation of the phosphorylation of the mitogen-activated kinases ERK1/2 (underlain by the $\beta\gamma$ dimers of G $\alpha_{i/o}$ proteins).

The Y197C mutation did not modify the hH₃R₄₄₅ levels in cell membranes (761 ± 78 and 663 ± 66 fmol/mg protein for the native and mutant receptors, respectively), its localization to the plasmatic membrane ($13,434 \pm 1,533$ and $15,894 \pm 2,054$ receptors/cell) or the affinity for selective agonists and antagonists. In agreement with the above, neither the efficacy nor the potency of the selective agonist RAMH to activate signaling pathways was affected by the Y197C mutation, as shown by [³⁵S]-GTP γ S binding to cell membranes (maximal stimulation 192.5 ± 8.0 % and 175.8 ± 9.8 % for the native and mutant receptors, respectively) and inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation in intact cells (maximal inhibition 33.3 ± 3.9 % and 33.1 ± 4.7 %).

The A280V mutation did not modify the receptor affinity for selective agonists and antagonists, but the mutant receptor showed reduced efficacy to stimulate [³⁵S]-GTP γ S binding to cell membranes (maximal stimulation 129.2 ± 2.6 % and 112.6 ± 2.7 % of basal binding for the native and mutant receptors, respectively), to inhibit forskolin-induced cAMP accumulation in intact cells (maximal inhibition 93.9 ± 2.6 % and 57.2 ± 8.4 %), and to stimulate the phosphorylation of ERK-1/2 kinases in intact cells (maximal stimulation 359 ± 51 % and 214 ± 16 %). No effect of the mutation was observed regarding the potency of the agonist RAMH. Both receptors showed modest constitutive activity for [³⁵S]-GTP γ S binding, with lower efficacy of the mutant receptor (maximal inhibition 12.03 ± 0.29 % and 5.85 ± 0.60 % for the native and mutant receptors, respectively). However, neither receptor showed constitutive activity in the cAMP accumulation assay.

In conclusion, the Y197C mutation on the hH₃R₄₄₅ does not modify the receptor affinity for selective agonists or antagonists or its efficacy to activate intracellular signaling pathways. In contrast, the A280V mutation decreases the hH₃R₄₄₅ efficacy to trigger

signaling pathways mediated by $G\alpha_{i/o}$ proteins with no effect on its pharmacological properties. These actions may bear relevance for the pathophysiology of migraine and the Shy-Drager syndrome, presumably by affecting the regulation by histamine of neurotransmitter release in the nervous system.

Abreviaturas

A280V	mutación Ala → Val en el amino ácido 280
aa	amino ácido
AC	adenilil ciclasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	3'-5'-monofostato cíclico de adenosina
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
B _{max}	unión máxima
CGRP	péptido relacionado con el gene de la calcitonina
CHO	células de ovario de hámster chino
CHO-K1	células de ovario de hámster chino subtipo K1
EA	enfermedad de Alzheimer
EC ₅₀	concentración efectiva media
E _{max}	efecto máximo
EP	enfermedad de Parkinson
ERK1/2	cinasas reguladas por señales extracelulares tipo 1 y 2
FSH	hormona estimuladora del folículo
FSK	forskolina
GABA	ácido γ -aminobutírico
GIRKs	canales de potasio de rectificación de entrada activados por proteínas G
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G (<i>G protein-coupled receptors</i>)
GSK3 β	3 β -sintasa de glicógeno
GTP γ S	5'-O-(γ -tio)-trifosfato de guanosina

[³ H]-AMPC	3'-5'-monofostato cíclico de adenosina tritiado
[³ H]-NMHA	<i>N</i> - α -metil-histamina tritiada
H ₂ R	receptor a histamina H ₂
H ₃ R	receptor a histamina H ₃
5-HT	5-hidroxitriptamina
HDC	descarboxilasa de L-histidina
HEK-293	células embrionarias de riñón humano 293
hH ₃ R _{A280V}	receptor a histamina H ₃ humano de 445 aa con la mutación A280V
hH ₃ R _{WT}	receptor a histamina H ₃ humano de 445 aa nativo
HNMT	<i>N</i> -metiltransferasa de histamina
IBMX	isobutil-metil-xantina
IC ₅₀	concentración inhibitoria media
I _{max}	inhibición máxima
K _d	constante de disociación
K _i	constante de inhibición
MAO-B	oxidasa de monoaminas B
MAPKs	quinasas de proteínas activadas por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
NTM	núcleo tuberomamilar del hipotálamo
OE-PCR	extensión por sobre-posición mediante PCR
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pEC ₅₀	logaritmo negativo de la concentración efectiva media
PEI	Polietiliminina
PI3K	3-cinasa de fosfatidil-inositol

pIC ₅₀	logaritmo negativo de la concentración inhibitoria media
PKA	cinasa A de proteínas
PKC	cinasa C de proteínas
pK _d	logaritmo negativo de la constante de disociación
pK _i	logaritmo negativo de la constante de inhibición
PLC	fosfolipasa C
RAMH	<i>R</i> - α -metil-histamina
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
<i>t</i> -MHA	tele-metil-histamina
VMAT-2	transportador vesicular de monoaminas tipo 2
Y197C	mutación Tyr → Cys en el aminoácido 197

1. Introducción

La histamina (4-imidazoil-2-etilamina) es un componente natural del tejido de los mamíferos y de los invertebrados; su presencia y actividad biológica fue descrita por primera vez por Sir Henry Dale y cols. al observar que la administración de la amina a animales de laboratorio inducía anafilaxia y dificultad para respirar [1]. La histamina es sintetizada en diferentes tipos celulares como mastocitos, células enterocromafines gástricas, basófilos y neuronas [2, 3]. Participa en una serie de procesos fisiológicos como la secreción del ácido gástrico, la regulación del sistema inmune, la contracción del músculo liso bronquial, la vasodilatación, el control de las barreras epitelial y endotelial, y la transmisión sináptica [4].

1.1 El sistema histaminérgico del Sistema Nervioso Central (SNC)

En el SNC la histamina funge como neuromodulador y regula diversos procesos fisiológicos, entre ellos los estados de sueño y vigilia, la actividad motora, la analgesia, la ingesta de agua y alimentos, la conducta sexual, las conductas de agresión y de defensa, la secreción hormonal, el control cardiovascular y el control central de la temperatura corporal [5]. Su síntesis ocurre en las neuronas histaminérgicas localizadas en el núcleo tuberomamilar (NTM) del hipotálamo posterior, mediante la descarboxilación oxidativa del aminoácido L-histidina, catalizada por la descarboxilasa de L-histidina (HDC). Es transportada al interior de las vesículas sinápticas por el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT-2), mediante el intercambio de dos protones, y es liberada por exocitosis en respuesta a potenciales de acción. En el espacio extracelular, la histamina es inactivada a tele-metil-histamina (*t*-MHA) por la enzima *N*-metiltransferasa de histamina

(HNMT) y finalmente la *t*-MHA es transformada a ácido tele-metil-imidazol acético por la enzima oxidasa de monoaminas B (MAO-B) [4].

Las neuronas histaminérgicas tienen un soma de 20-30 μm de diámetro con un aparato de Golgi bien definido y abundantes mitocondrias, dos o tres dendritas largas que se entremezclan con las dendritas de las neuronas vecinas, y varicosidades axonales con vesículas sinápticas [6]. Algunas subpoblaciones de estas neuronas expresan enzimas que sintetizan otros neurotransmisores como el GABA (ácido γ -aminobutírico), galanina, encefalinas, la hormona liberadora de tirotrópina y la sustancia P [7].

1.2 Receptores a histamina

Los diferentes efectos de la histamina se deben a la activación de cuatro diferentes receptores (H_1 , H_2 , H_3 y H_4), pertenecientes a la gran familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), y a la clase A de GPCRs semejantes a la rodopsina [8]. Los receptores a histamina presentan un dominio amino-terminal extracelular (N-terminal), un dominio carboxilo-terminal intracelular (C-terminal), y siete dominios transmembranales (TM1-TM7) conectados por tres asas extracelulares (e1-e3) y tres asas intracelulares (i1-i3). Las propiedades farmacológicas y de señalización varían entre ellos [8, 9], como se muestra en la Tabla 1.

1.3 Receptor a histamina H_3 (H_3R)

Fue identificado farmacológicamente en 1983 por Arrang y cols. [10], y clonado en 1999 por Lovenberg y cols. [11]. Se expresa abundantemente en el SNC y se localiza como auto- y hetero-receptor, lo que le confiere la función de neuromodulador en varios sistemas de transmisión química del Sistema Nervioso [9].

Tabla 1. Principales características de los receptores a histamina (H₁-H₄)

Características	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄
Isoformas	No determinado	No determinado	Más de 20	No determinado
Proteína G	G $\alpha_{q/11}$	G α_s /G $\alpha_{q/11}$	G α_i /G α_o	G α_i /G α_o
Estructuras	Homomérico y oligomérico		Homomérico y hetero-oligomérico	Dimérico y oligomérico
Principales vías de señalización	↑ PLC ↑ Ca ²⁺	↑ AMPc	↓ AMPc ↓ Canales de Ca ²⁺ N y P/Q ↑ MAPKs	↓ AMPc ↑ MAPKs
Afinidad por la histamina	Micromolar	Micromolar	Nanomolar	Nanomolar
Radioligandos	[³ H]-mepiramina	[³ H]-tiotidina	[³ H]-NMHA [³ H]-RMHA [¹²⁵ I]-yodoproxifán	[³ H]-histamina
Distribución en tejidos	Pulmón, cerebro, sistema cardiovascular, músculo liso, tracto gastrointestinal, células endoteliales y linfocitos	Corazón, estómago y cerebro	Neuronas (SNC y SNP)	Mastocitos, eosinófilos, células T. Baja densidad en el SNC
Agonistas	2-piridiletilamina metil-histaprodifen 2-fenil-histamina	dimaprit amtamina impromidina	immepip imetit RAMH	4-metilhistamina VUF-8430 clobenpropit
Antagonistas	mepiramina tripolidina clorfeniramina	tiotidina ranitidina cimetidina	tioperamida clobenpropit ciproxifán	VUF-2002 JNJ-7777120 tioperamida
Funciones	Contracción del músculo liso, ingesta de alimentos, regulación del ciclo sueño-vigilia	Secreción de ácido gástrico	Sueño, ingesta de alimento, conducta motora, termorregulación	Quimiotaxis

Modificado de Stark (2007) y Ramos-Jiménez y cols. (2009) [8, 9]. Los símbolos ↑ y ↓ indican activación e inhibición, respectivamente. RAMH, R- α -metil-histamina.

La activación de los H₃Rs pre-sinápticos inhibe la síntesis y la liberación de la propia histamina, y la liberación de acetilcolina, dopamina, noradrenalina, GABA, ácido glutámico, serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) y sustancia P [4].

1.3.1 Estructura del H₃R

El receptor H₃R tiene una homología de 20.2, 20.7 y 37.0 % en su secuencia de amino ácidos (aa) con los receptores H₁, H₂ y H₄, respectivamente [12]. En el ser humano el procesamiento alternativo del ARNm correspondiente origina al menos 20 isoformas del H₃R (hH₃R), de las cuales cinco son funcionales (hH₃R₄₅₃, hH₃R₄₄₅, hH₃R₄₁₅, hH₃R₃₇₃ y hH₃R₃₆₅), difiriendo no sólo en el número de aa sino también en sus propiedades farmacológicas y de activación de vías de señalización [13-15]. La isoforma más estudiada es la de 445 aa, la primera clonada y la más abundante en el SNC de los mamíferos [15].

Como en otros GPCRs de la clase A, en el H₃R se observan aa conservados y secuencias motivo características (Fig. 1) [16], como el motivo DRY (DRF en el H₃R) entre TM3 e i2; residuos de Asp¹ en las posiciones 80 de TM2 y 114 de TM3; la secuencia NPXXY en TM7 (NPVLY en el H₃R); residuos de Cys en las posiciones 107 (e1) y 188 (e2), los cuales probablemente forman un enlace disulfuro entre ellos; residuos de Trp en las posiciones 174 y 371 en TM4 y TM6, respectivamente; residuos de Pro en las posiciones 210 y 373 en TM5 y TM6, respectivamente; un residuo de Asn (N404) en TM7; un sitio potencial de palmitoilación (C428, cerca del carboxilo terminal); un sitio potencial de N-glicosilación (N11); y sitios potenciales de fosforilación por cinasas de proteínas, que corresponden a los residuos de Ser S63, S64, S141, S310, S319, S341 y S343, y a los residuos de Thr T149 (i2), T314 (i3) y T345 (i3).

¹ Para referirse a amino ácidos individuales se utiliza la nomenclatura de tres letras, por ejemplo Ala para Alanina o Thr para Treonina; al referirse a secuencias de amino ácidos o a mutaciones se utiliza el código de una letra, por ejemplo DRY (Asp-Arg-Tyr) o A280V (substitución de un residuo de Ala por uno de Val).

```

Amino-terminal
MERAPPDGPL NASGALAGEA AAAGGARGFS AAWTAVLAAL MALLIVATVL GNALVMLAFV 60
i1 TM2 e1 TM3
ADSSLRTQNN FFLNLAISD FLVGAFCIPL YVPYVLTGRW TFGRGLCKLW LVVDYLLCTS 120
i2 TM4
SAFNIVLISY DRFLSVTRAV SYRAQQGDTR RAVRKMLLVW VLAFLLYGPA LSWEYLSGG 180
e2 TM5 i3
SSIPEGHCYA EFFYNWYFLI TASTLEFFTP FLSVTFFNLS IYLNIQRRTR LRLDGAREAA 240
GPEPPPEAQP SPPPPPGCWG CWQKGHGEAM PLHRYGVGEA AVGAEAGEAT LGGGGGGGSV 300
ASPTSSSGSS SRGTERPRSL KRGSKPSASS ASLEKRMKMV SQSFTQRFRL SRDRKVAKSL 360
TM6 e3 TM7
AVIVSIFGLC WAPYTLLMII RAACHGHCVP DYWYETSFWL LWANSAVNPV LYPLCHHSFR 420
Carboxilo-terminal
RAFTKLLCPQ KLKIQPHSSL EHCWK

```

Fig. 1. Secuencia de amino ácidos del receptor a histamina H₃ humano. Las regiones transmembranales (TM) del receptor se indican en color gris, los amino ácidos y los motivos conservados importantes para la unión de ligandos y/o la activación del receptor se indican en negritas. Tomado de la página <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/194018561>

El H₃R presenta actividad constitutiva, es decir, puede estar activo aún en ausencia de un agonista [4, 17-20]. La actividad constitutiva aumenta por mutaciones puntuales (v. gr. A357K en el H₃R del ratón) [21], o en isoformas del receptor con un número menor de aa en el asa i3 (v. gr. la isoforma de 365 aa) [22].

Se han reportado cinco polimorfismos en el hH₃R. Como se muestra en la Fig. 2, en el aa 19 puede encontrarse un residuo de Asp o de Glu [11, 23]. Un segundo polimorfismo es la sustitución de un residuo de Ala por uno de Val en la posición 280 (A280V), identificado en un paciente portador del síndrome de Shy-Drager que cursa con hipotensión ortostática neurológica [23]. Un tercer polimorfismo es la sustitución de un residuo de Tyr por uno de Cys en el aa 197 (Y197C) [11, 16, 23]. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), rs3787429 y rs3787430, identificados en el proyecto HapMap de la población china, son mutaciones silentes en los residuos Ser332 y Pro326, respectivamente [24].

1.3.2 Distribución del H₃R

El H₃R se localiza como auto-receptor en el cuerpo celular y las terminales axónicas de las neuronas histaminérgicas del NTM; estas células envían proyecciones a diferentes áreas del SNC observándose la mayor densidad de fibras en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, núcleos de los ganglios basales (neostriado, núcleo accumbens y globo pálido), el tálamo y el hipotálamo. Como hetero-receptor se expresa en diferentes tipos de neuronas del SNC, y en las terminales simpáticas y parasimpáticas del Sistema Nervioso Periférico (SNP), específicamente en el tracto gastrointestinal, las vías respiratorias y el sistema cardiovascular [4, 25].

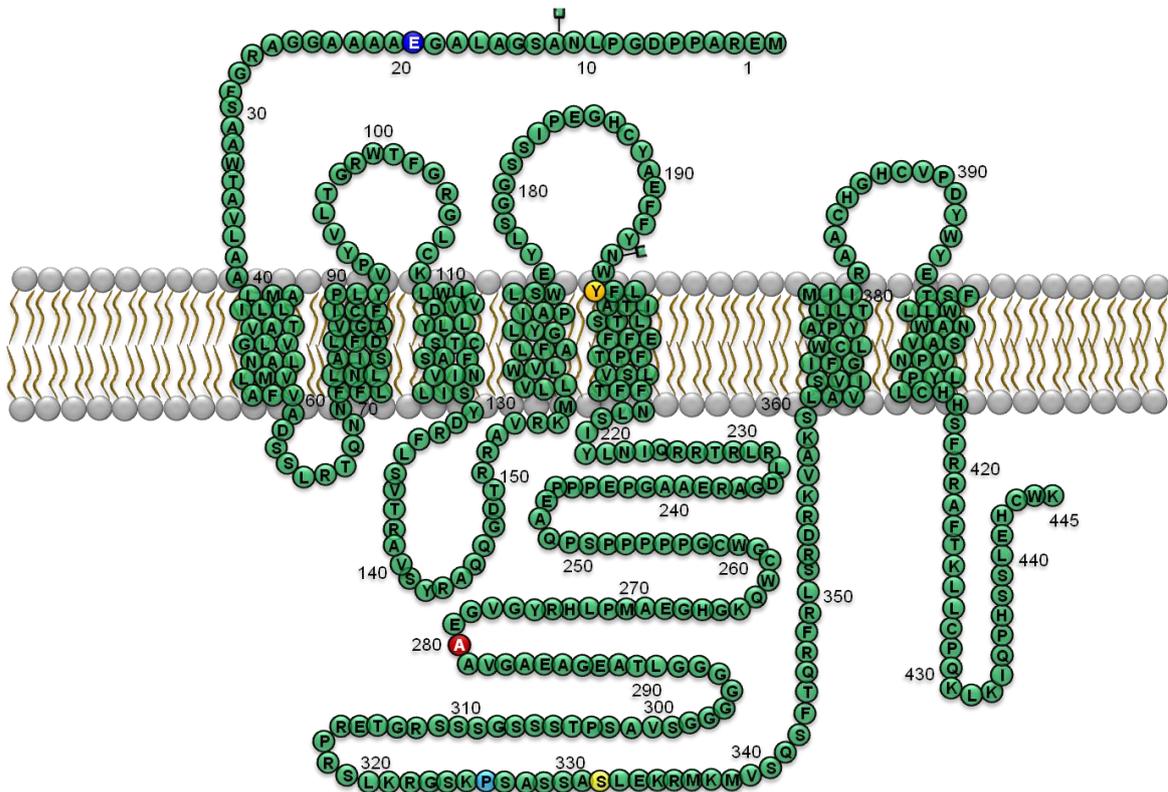


Fig. 2. Esquema del receptor a histamina H₃ humano de 445 aa indicando los polimorfismos reportados. Los residuos con mutaciones se indican en círculos azul, amarillo y rojo.

1.3.3 Vías de señalización

El H₃R se acopla a proteínas G $\alpha_{i/o}$ y su activación desencadena diferentes vías de señalización. Mediante las subunidades G $\alpha_{i/o}$ inhibe a las adenilil ciclasas (ACs) 1, 3, 5, 6 y 8, y por consiguiente la formación de AMPc y la actividad de la cinasa A de proteínas o PKA [4, 8, 9, 26, 27]. Dos efectos relevantes debidos a las subunidades G $\beta\gamma$ son la inhibición de canales de Ca²⁺ activados por voltaje tipo N y P/Q, y la activación de la fosfolipasa C con la subsecuente liberación de calcio desde depósitos intracelulares [28-30].

La señalización del receptor se amplía a otras vías (Fig. 3). Mediante las subunidades G $\alpha_{i/o}$ inhibe al intercambiador Na⁺/H⁺, y por medio de las subunidades G $\beta\gamma$ activa a la fosfolipasa A₂ (conduciendo a la formación de ácido araquidónico), estimula a las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs), induce la apertura de canales de potasio de rectificación entrante activados por proteínas G (GIRKs) y activa a la 3-cinasa de fosfatidil-inositol (PI3K), resultando en la activación de la cinasa Akt que a su vez inhibe a la enzima 3 β -sintasa de glicógeno (GSK3 β). Esta última tiene una función relevante en la apoptosis y la plasticidad axonal y sináptica, y ha sido asociada a las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, la resistencia a la insulina y la diabetes [8, 17, 31].

1.4 El H₃R y procesos patológicos del Sistema Nervioso (SN)

Como se mencionó anteriormente, mediante la activación de sus cuatro diferentes receptores (H₁-H₄), la histamina regula distintos procesos fisiológicos en el SN, entre ellos el ritmo circadiano, el metabolismo energético, el aprendizaje, la memoria, la locomoción y el estrés. Por otra parte, se ha reportado que el sistema histaminérgico se encuentra afectado en varios desórdenes cerebrales. Dado que el H₃R se expresa abundantemente en diferentes áreas del cerebro, y su activación regula la síntesis y la liberación de

neurotransmisores, se ha convertido en un blanco terapéutico de interés para el tratamiento de diferentes patologías del SNC [32].

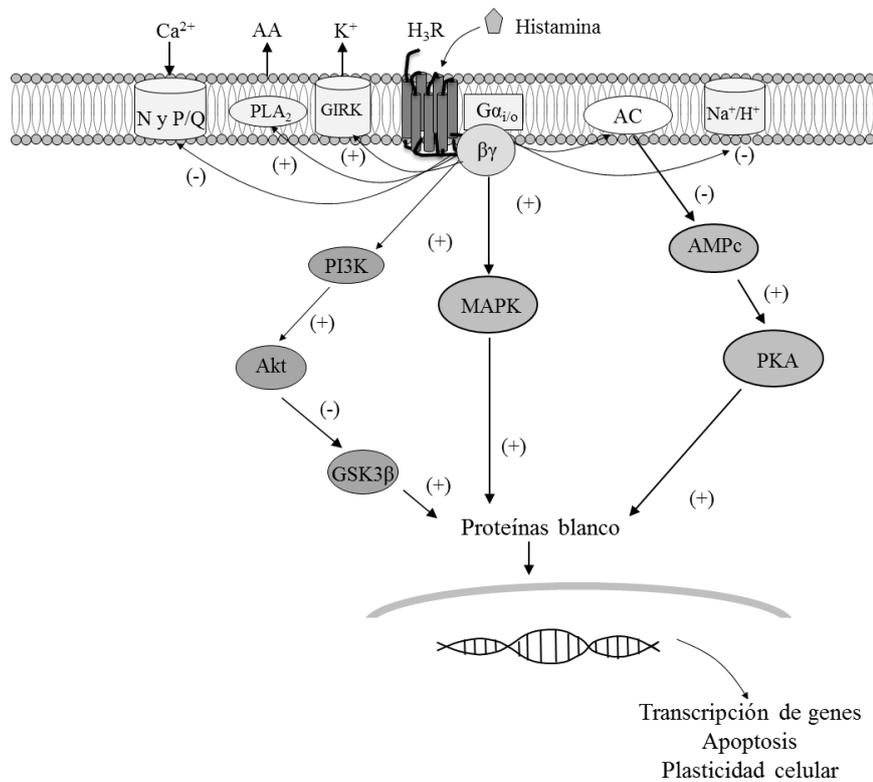


Fig. 3. Representación esquemática de las principales vías de señalización desencadenadas por la activación del receptor a histamina H₃. Los signos (+) y (-) indican activación e inhibición, respectivamente.

Entre las neuropatologías que se asocian con la expresión, la activación o mutaciones del H₃R se encuentran las enfermedades de Parkinson, de Alzheimer y de Huntington, la depresión, el síndrome de Tourett, la migraña y el síndrome de Shy-Drager.

1.4.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Sin embargo, esta patología también afecta otras neuronas como las histaminérgicas, serotoninérgicas, GABAérgicas y colinérgicas [33]. En

la EP aumentan los niveles de histamina plasmática, así como sus metabolitos en el líquido cefalorraquídeo [34, 35]. Además, la famotidina, un antagonista selectivo del H₂R, reduce la bradifrenia (lentitud en los procesos de pensamiento) y mejora la actividad motora en pacientes con EP [36]. En contraste, estudios *post-mortem* en pacientes con EP no mostraron alteraciones en los niveles de la HDC en la corteza frontal, el núcleo caudado, el hipotálamo y la SN, sugiriendo que no existe degeneración de las neuronas histaminérgicas en esta patología [37]. Por otra parte, se observa un incremento significativo de la inervación histaminérgica en la sustancia negra *pars compacta* con alteraciones en la morfología (fibras delgadas con varicosidades grandes) en áreas de degeneración dopaminérgica de pacientes con EP [38]. Además, la lesión de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la rata aumenta significativamente la expresión del H₃R en el neocórtex [39].

Estudios *post-mortem* de pacientes con EP muestran también un aumento en los niveles de histamina en estructuras cerebrales como el putamen, la sustancia negra *pars compacta* y el globo pálido interno y externo, que tienen una función importante en el control del movimiento [40]. También se observa una disminución del ARNm de la enzima HMT en la sustancia negra y el putamen, y del ARNm del H₃R en la sustancia negra [33]. Además, resultados obtenidos en modelos animales y el ser humano sugieren que los altos niveles de histamina en la sustancia negra contribuyen a la degeneración acelerada de las neuronas dopaminérgicas [41, 42]. Dado que la activación del H₃R inhibe la liberación de la histamina y de otros neurotransmisores, ha resultado de interés evaluar antagonistas/agonistas inversos del receptor en el tratamiento del exceso de sueño (hipersomnia) en pacientes con EP, y estos fármacos se encuentran en la fase III de ensayos clínicos [43].

1.4.2 Enfermedad de Alzheimer

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las formas de demencia más comunes, representando el 60-70 % de los casos. Algunos de los signos y síntomas característicos de la patología son la afectación de la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, la capacidad de cálculo y el aprendizaje, el lenguaje y el juicio. Hasta la fecha no se cuenta con un tratamiento que la elimine o revierta su progreso [44].

Existe controversia en relación a los hallazgos que relacionan al sistema histaminérgico con la EA. Se ha observado hiperactividad del sistema histaminérgico durante el envejecimiento y en la EA, aumento en los niveles de histamina en el líquido cefalorraquídeo y de sus metabolitos en la corteza frontal, los ganglios basales y el hipocampo [42, 45]. En contraste, otros estudios reportan disminución en los niveles de histamina en la EA en estructuras como el hipocampo y la corteza frontal y temporal [46, 47]. Además, estudios *post-mortem* muestran una pérdida significativa de neuronas histaminérgicas en el NTM de pacientes con EA, sin cambios en la expresión del ARNm de la HDC [48, 49], y en pacientes femeninos con EA se aprecia un aumento significativo en la expresión del ARNm del H₃R y de la HNMT [50].

De manera interesante, en un modelo murino de la EA el ciproxifán (antagonista/agonista inverso del H₃R) mejora el rendimiento cognitivo, y la administración del antagonista ABT-239 revierte la hiper-fosforilación de la proteína tau en la médula espinal y el hipocampo [51, 52]. Por lo anterior, se ha sugerido el uso de antagonistas del H₃R para mejorar la cognición en pacientes con EA. Sin embargo, la sobre-activación de las neuronas remanentes del NTM puede acelerar su degeneración [51], y estudios recientes

indican que los antagonistas/agonistas inversos del H₃R no mejoran la cognición en pacientes con EA [53].

1.4.3 Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es un desorden neurológico autosómico dominante y hereditario causado por la expansión de repetidos CAG en el gen de la proteína huntingtina. Estudios *post-mortem* indican disminución en la densidad de los receptores H₂ y H₃ en el estriado y un incremento del receptor H₁ en áreas corticales [54-56]. Además, se ha reportado un aumento en la expresión del ARNm de la HDC en el NTM, y de la HMT y de los receptores H₁ y H₃ en el giro frontal inferior de pacientes [57]. Por otra parte, los altos niveles de metabolitos de la histamina en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esta enfermedad sugieren hiper-actividad del sistema histaminérgico [35].

1.4.4 Depresión

La OMS define la depresión como una enfermedad neuropsiquiátrica caracterizada por episodios prolongados de tristeza, pérdida de interés y de la capacidad de disfrute, disminución en la realización de actividades cotidianas, alteraciones del sueño y del apetito, sentimientos de culpa y baja autoestima, y dificultad de concentración. Es resultado de interacciones complejas entre factores sociales, psicológicos y biológicos [58].

Los eventos estresantes pueden desencadenar depresión. A nivel del SNC el principal regulador de la respuesta al estrés es el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo y se ha observado mayor actividad de sus neuronas en eventos de depresión [59, 60]. Además, estudios realizados en ratas muestran aumento del ARNm de la hormona liberadora de corticotropina, vasopresina y oxitocina en el NPV, y de oxitocina en el núcleo supraóptico hipotalámico después de la infusión intracerebroventricular de histamina [61].

Por otra parte, ratas con estrés moderado muestran aumento en los niveles de histamina en el hipotálamo, la corteza cerebral, el núcleo accumbens y el diencéfalo [62-66]. Sin embargo, existe discrepancia entre los resultados de modelos animales y los obtenidos en pacientes con depresión, ya que la tomografía de emisión de positrones (PET) muestra disminución en la unión del receptor H₁ en la corteza prefrontal y el giro cingulado, lo que correlaciona con los síntomas de la enfermedad [67], pero no se observan alteraciones en los niveles de expresión del ARNm de la HDC en el NTM [68].

1.4.5 Narcolepsia

Es un desorden crónico de sueño caracterizado por somnolencia diurna, cataplexia, depresión y movimientos oculares rápidos, sueño anormal, alucinaciones hipnagógicas, parálisis del sueño y sueño nocturno perturbado. Estudios *post-mortem* indican una pérdida del 90 % de las neuronas productoras de hipocretina (Hcrt) en la narcolepsia con cataplexia [69, 70]. El sistema hipocretinérgico ayuda a mantener el estado de vigilia principalmente por activación de las neuronas del NTM, y tanto la hipocretina como el glutamato activan a las neuronas histaminérgicas [71-73]. Estudios de microdiálisis en la rata muestran que la aplicación de hipocretina en el NTM aumenta la liberación de histamina en la corteza prefrontal y en el área preóptica medial, y la perfusión de hipocretina en el NTM de ratas reduce el sueño de movimientos oculares rápidos (REM) y el sueño no-REM [74]. Sin embargo, en pacientes con narcolepsia no se observaron alteraciones en los niveles de histamina o de su metabolito *t*-MHA en el líquido cefalorraquídeo [75].

Estudios recientes en modelos animales y en pacientes con narcolepsia muestran que el pitolisant, un agonista inverso del H₃R, aumenta la actividad de los sistemas histaminérgico, colinérgico, noradrenérgico y dopaminérgico, promoviendo el estado de

vigilia [76-79]. En este año, la Unión Europea autorizó su uso en el tratamiento de la narcolepsia con o sin cataplexia en adultos [80].

1.4.6 Síndrome de Tourette

Se caracteriza por la presencia de tics vocales y motores, así como síntomas sensoriales y motores. En un análisis genético de dos generaciones se asoció la mutación W317X en uno de los alelos del gen de la HDC con la presencia del padecimiento [81]. En ratones *HDC-knockout* no se detecta histamina en el cerebro, y la exposición a estímulos estresantes y la administración de psicoestimulantes induce movimientos estereotípicos, comparables a los tics característicos del Síndrome de Tourette [82]. Por otra parte, la expresión del H₃R está aumentada en el NTM de ratones *HDC-knockout* [83].

1.4.7 Migraña

Es un desorden crónico neurológico episódico, caracterizado por dolores de cabeza intensos y recurrentes, con o sin aura [84]. No se conoce su etiología, pero se han identificado diversos factores predisponentes como mutaciones en canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo N y P/Q, la mutación A280V en el H₃R y factores ambientales, entre otros. La diversidad de cuadros clínicos de cada subtipo de migraña ha dificultado establecer su etiopatogenia, si bien se han propuesto tres teorías fisiopatológicas (vascular, neurógena y unificadora). La teoría neurógena sugiere que el aumento de transmisores como el glutamato, la serotonina y neuropéptidos vasoactivos como la sustancia P, causan inflamación neuronal, vasodilatación y extravasación de proteínas y otras sustancias plasmáticas que activan fibras del nervio trigémino responsables de la conducción de información nociceptiva [85, 86]. Sin embargo, este mecanismo no explica todos los síntomas de la migraña, por lo que esta patología sigue siendo estudiada ampliamente.

La prevalencia de la migraña en México es del 12.1 % en mujeres y 3.9 % en hombres [87], y la OMS la considera como la sexta causa mundial de incapacidad [88]. En la actualidad se utilizan como tratamientos de elección anti-inflamatorios no esteroides y analgésicos no opioides, antieméticos, ergóticos, triptanes y narcóticos; sin embargo, estos fármacos no son útiles en muchos pacientes, por lo que continúa la búsqueda de terapias farmacológicas más efectivas [89].

1.4.8 Síndrome de Shy-Drager

Con una prevalencia en Europa de 4.6 casos por 100,000 habitantes [90], afecta principalmente las vías estriado-nigral y olivo-ponto-cerebelosa, con abundantes inclusiones gliales citoplasmáticas. Su etiología es desconocida; los síntomas incluyen hipotensión postural, parkinsonismo, trastornos cerebelosos y disfunción autonómica y piramidal. Su progresión es rápida y generalmente es sub-estimado y sub-diagnosticado [91, 92]. Se observan alteraciones en los sistemas colinérgico y noradrenérgico, y disfunción de la proteína sinucleína α [93, 94]. En un paciente portador de la enfermedad se identificó la mutación A280V en el H₃R, la cual se asoció con una posible alteración en la liberación de noradrenalina [23]. No existe un tratamiento específico, y se emplean fármacos que disminuyen algunos de los síntomas como la hipotensión o el parkinsonismo.

2. Planteamiento del problema

Los auto-receptores y hetero-receptores H₃ modulan la liberación de neurotransmisores en neuronas histaminérgicas y no histaminérgicas, y se les ha asociado con diversas patologías del SN. Wiedemann y cols. [23] reportaron un polimorfismo del H₃R humano, identificando la mutación A280V (sustitución de un residuo de Ala por uno de Val en la posición 280) en un paciente con síndrome de Shy-Drager, e indicando que esta mutación podría estar relacionada con la fisiopatología de la enfermedad al alterar la liberación de noradrenalina en el Sistema Nervioso Periférico o Central. Esta mutación se encuentra en la tercera asa intracelular del receptor, la cual es importante para el acople con las proteínas G_{ai/o}.

En el año 2011 el grupo de investigación de Millán-Guerrero [86] realizó un estudio en el estado de Colima, mostrando que la presencia del polimorfismo A280V en el H₃R humano está asociada con la predisposición a padecer migraña, sugiriendo un aumento en la población de H₃Rs inactivos que resultaría en inhibición del mecanismo de retroalimentación negativo y aumento en la liberación de neurotransmisores (histamina, serotonina, sustancia P y glutamato).

En relación al efecto de mutaciones en la tercera asa intracelular del receptor, Takahashi y cols. [21] reportaron que la mutación puntual A357K en el H₃R del ratón, localizada en la región carboxilo terminal de la tercera asa intracelular, resulta en un aumento en la actividad constitutiva del receptor. Aunque la mutación A280V no es análoga a la mutación A357K, el efecto de ésta indica que una mutación en esta región puede modificar la funcionalidad del receptor.

Al estudiar la diversidad genética y farmacológica del hH₃R, Hancock y cols. [16] identificaron una segunda modificación en la secuencia de amino ácidos del receptor, la mutación Y197C (sustitución de un residuo de Tyr por uno de Cys en la posición 197), la cual se localiza en el extremo N-terminal de la quinta región transmembranal del receptor, que tiene una función crucial en la unión de ligando y por lo tanto en la activación del receptor [95]. Hasta el momento este polimorfismo no se ha asociado con alguna patología en el ser humano.

En 1992 Probst y cols. [96] mostraron que los GPCRs de la clase A presentan un residuo de Cys conservado en cada una de las asas extracelulares e1 y e2, formando entre ellas un enlace disulfuro que contribuye a estabilizar la conformación estructural del receptor. Este enlace es relevante ya que permite que el receptor adquiera un estado conformacional adecuado durante su síntesis, se exprese en la membrana citoplasmática y sea capaz de unir al ligando.

Las mutaciones en cualquiera de los residuos de Cys conservados pueden alterar significativamente la función del receptor, como se ha observado en la rodopsina y en los receptores muscarínicos y β -adrenérgicos. En el año 2016 Barington y cols. [97] mostraron que el receptor a quimocinas requiere la formación de los enlaces disulfuro Cys106-Cys183 y Cys25-Cys272 para la unión tanto del agonista CCL1 como del antagonista MC148. Este último fenómeno no se limita a los receptores a quimocinas, ya que la estructura cristalizada del receptor purinérgico P₂Y₁ reportada por Zhang y cols. [98] muestra la presencia de dichos enlaces disulfuro.

En relación a la mutación de un residuo de Cys en los GPCRs, Tarnow y cols. [99] reportaron que la mutación C271R (localizada en el asa e3), identificada en el receptor tipo 4 a melanocortina de dos hermanos con obesidad, disminuye la afinidad del receptor por

agonistas así como su expresión en la membrana citoplasmática. Lo anterior se debe a la interrupción del enlace disulfuro entre las Cys 271 y 277 y a la formación de un enlace disulfuro anómalo entre las Cys 277 y 279.

Los mecanismos involucrados en la asociación entre el polimorfismo A280V del hH₃R y el síndrome de Shy-Drager o la migraña no han sido establecidos, por lo que se requieren estudios que analicen la repercusión de la mutación en las características farmacológicas y funcionales del receptor.

El efecto de la mutación Y197C en el hH₃R tampoco ha sido estudiado. Como se mencionó, la presencia de un nuevo residuo de Cys puede inducir la formación de un enlace disulfuro anómalo y por tanto afectar la estabilidad, la expresión, la unión de ligando y la función de la proteína, por lo que resulta importante su evaluación. Esto permitirá un mayor conocimiento de la estructura y/o activación del receptor, lo que puede también contribuir al diseño de nuevos ligandos con mayor selectividad y potencia.

Por lo antes mencionado, en este trabajo abordamos el efecto de las mutaciones puntuales A280V y Y197C en las características farmacológicas y de señalización intracelular del receptor a histamina H₃ humano de 445 amino ácidos, expresado en células CHO-K1.

3. Hipótesis

La hipótesis para el desarrollo de este proyecto fue:

Las mutaciones puntuales Y197C y A280V en el receptor a histamina H₃ humano de 445 amino ácidos modifican sus características farmacológicas y/o de señalización.

4. Objetivos

Para evaluar la hipótesis propuesta se plantearon los siguientes objetivos:

4.1 Objetivo general

Determinar si las mutaciones Y197C y A280V modifican las propiedades farmacológicas y de señalización del receptor a histamina H₃ humano de 445 amino ácidos (hH₃R₄₄₅)

4.2 Objetivos particulares

1. Generar receptores a histamina H₃ humanos con las mutaciones Y197C o A280V, mediante técnicas de mutagénesis dirigida.
2. Expresar en células CHO-K1, de manera transitoria o estable, a los receptores nativo (hH₃R_{WT}), con la mutación Y197C (hH₃R_{Y197C}) o con la mutación A280V (hH₃R_{A280V}).
3. Determinar si las mutaciones Y197C y A280V modifican las propiedades farmacológicas del receptor hH₃R₄₄₅, mediante ensayos de unión de radioligando.
4. Establecer si las mutaciones Y197C y A280V modifican la señalización del receptor hH₃R₄₄₅, mediante ensayos funcionales como la inhibición de la formación de AMPc, unión de [³⁵S]-GTPγS y fosforilación de las cinasas ERK-1/2.

5. Métodos

5.1 Obtención de las mutaciones puntuales Y197C y A280V en el hH₃R_{WT}

5.1.1 Obtención de la mutación puntual Y197C

5.1.1.1 Obtención de un fragmento del hH₃R₄₄₅ conteniendo la mutación Y197C

Utilizando la secuencia del ADNc que codifica al hH₃R₄₄₅, reportada en la base de datos GenBank (número de acceso NM-007232), se diseñaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2 mediante el programa *Alignment Technologies* (www.genomics.agilent.com) y el programa *Clone Manager 9 Professional* (Scientific & Educational Software, Denver, CO, USA).

Los oligonucleótidos diseñados fueron: dos en sentido (F₂ y F₇) y dos en antisentido (R₂ y R₅). Los oligonucleótidos F₇ y R₅ contienen el cambio de una adenina o timina por una guanina o citosina, respectivamente, en el nucleótido 590 (la posición 1 del ADNc es la primera base del codón de inicio), para obtener la mutación deseada, ya que el triplete TAC codifica el aa Tyr mientras que el triplete TGC codifica el aa Cys. Además, en estos mismos oligonucleótidos se cambió una citosina o una guanina por una timina o una adenina, respectivamente, en la posición 585, originando una mutación silente en el receptor (no se altera la traducción del aa, ya que ambos tripletes, AAC y AAT, codifican el aa Asn). La mutación introdujo un sitio de restricción para la endonucleasa MfeI, que sirvió para evaluar en una primera instancia la mutación Y197C en la proteína. El oligonucleótido F₂ hibrida con una secuencia cercana al sitio de restricción para la enzima BstEII, mientras que el oligonucleótido R₂ contiene en su extremo 5' un sitio de restricción para la enzima NotI (ambos sitios únicos en toda la secuencia del plásmido

pCI-Neo-hH₃R_{WT}), lo que permitió sustituir de manera dirigida el fragmento conteniendo la mutación Y197C en el resto del plásmido pCI-Neo-hH₃R_{WT} (ver Fig. 4).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para obtener las diferentes mutaciones en el hH₃R_{WT}.

Mutación	Oligonucleótidos	Secuencia	Reconocimiento en la secuencia del hH ₃ R _{WT}
Y197C	Sentido	F ₂ 5'-TGTGCACCTCCTCTGCCTTC-3'	350 → 369 ^a
		F ₇ 5'-CGAGTTCTTCTACAA TTGGT GCTTCCTCAT-3'	570 → 599
	Anti-sentido	R ₂ 5'-GCGGCCGCTCACTTCCAGCAGTGCTCCAGG-3'	1317 ← 1338
		R ₆ 5'-GTGATGAGGAAG CACCA ATTGTAGAAGAAC-3'	573 ← 602
A280V	Sentido	F ₁ 5'-GGTGGGTGAGG T GGCCGTAGGCG-3'	828 → 850
		F ₂ 5'-TGTGCACCTCCTCTGCCTTC-3'	350 → 369
	Anti-sentido	R ₁ 5'-CGCCTACGGCC A CCTCACCCACC-3'	828 ← 850
		R ₂ 5'-GCGGCCGCTCACTTCCAGCAGTGCTCCAGG-3'	1317 ← 1338

Los nucleótidos modificados para obtener cada una de las mutaciones se indican en color rojo.
^a, Posición en la secuencia del receptor nativo (numeración de la secuencia de nucleótidos del ADNc a partir del inicio del marco de lectura).

Con la técnica de la amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) y utilizando como molde la secuencia codificante para el hH₃R_{WT} clonado en el vector pCI-Neo, se amplificaron dos fragmentos, el primero con los oligonucleótidos F₂ y R₅ y el segundo con los oligonucleótidos F₇ y R₂ (Fig. 5A). Las reacciones (25 µl) contuvieron: amortiguador para

Pfu 1X (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA), 2 mM MgSO₄; dNTPs (0.2 mM de cada uno), oligonucleótidos en sentido y anti-sentido (0.4 μM cada uno; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), polimerasa de ADN *Pfu* (0.5 U) y 200 ng del molde (pCI-Neo-hH₃R_{WT}). Las condiciones de la amplificación fueron: 1) desnaturalización a 95 °C por 2 min; 2) desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 55 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 60 s (20 ciclos); y 3) extensión a 72 °C por 5 min. Los amplicones resultantes se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % con amortiguador TBE (Tris/Borato/EDTA; 0.5X) teñidos con bromuro de etidio (0.25 μg/ml), incluido al momento de formar el gel, utilizando la solución amortiguadora TBE 0.5X.

Los productos de estas dos amplificaciones se purificaron del gel (*kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega, Madison, WI, USA) para extenderse en una tercera reacción por la técnica de extensión del empalme (OE-PCR, *Overlap extension PCR*) [100], obteniéndose un fragmento de 998 pb (F₂-R₂). La reacción (25 μl) consistió en: regulador para *Pfu* 1X, 2 mM MgSO₄, dNTPs (0.2 mM de cada uno), oligonucleótido en sentido F₂ (0.4 μM), oligonucleótido anti-sentido R₂ (0.4 μM), 10 μl del purificado de la PCR F₂-R₅ (7.5 ng/μl), 10 μl del purificado de la PCR F₇-R₂ (7.8 ng/μl) y polimerasa de ADN *Pfu* (0.5 U). Las condiciones de la amplificación fueron las mencionadas anteriormente, y el amplicón se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % con regulador TBE 0.5X teñido con bromuro de etidio. Finalmente, el fragmento F₂-R₂ se purificó utilizando el kit comercial indicado anteriormente.

5.1.1.2 Clonación del fragmento F₂-R₂ en el vector pJET1.2

Con el fin de amplificar el fragmento F₂-R₂, éste se clonó en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA; Fig. 5B). La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía regulador para la ligasa 1X; 1 µl de vector (50 ng/µl); 5 µl del inserto (F₂-R₂, 10 ng/µl), y 2.5 U de la ligasa del fago T4 (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA).

La reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 min para, a continuación, transformar bacterias *E. coli* competentes (cepa DH5α) [101] con 4 µl del producto de ligación, inocular las bacterias en placas de agar LB (Agar Luria-Bertani) con 100 µg/ml de ampicilina e incubarlas a 37 °C por 16 h. El vector contiene un gen que codifica la enzima β-lactamasa dando resistencia a las bacterias que lo incorporaron, además del gen letal Eco47IR para la selección negativa de aquellos plásmidos en los que no se incorporó ningún fragmento de ADN.

Se seleccionaron 10 colonias bacterianas, y cada una fue inoculada en 3 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina. Después de 16 h a 37 °C se obtuvo el ADN plasmídico por columna (*Pure Yield™ Plasmid Midiprep System*; Promega, Madison, USA). El ADN de cada extracto fue sometido a digestión independiente con las enzimas de restricción BglII o XhoI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) para comprobar la inserción del fragmento en el vector. Cada digestión (6 h, 37 °C) se efectuó en un volumen final de 10 µl con el regulador apropiado para cada enzima (1X), albúmina sérica bovina (BSA, 0.1mg/ml; provista por el fabricante de las enzimas) y 3 U de la enzima (BglII o XhoI). El producto de digestión se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y uno de los ADN plasmídicos fue seleccionado para ser insertado en el hH₃R_{WT} clonado en el vector de expresión pCI-Neo (pCI-Neo-hH₃R_{WT}).

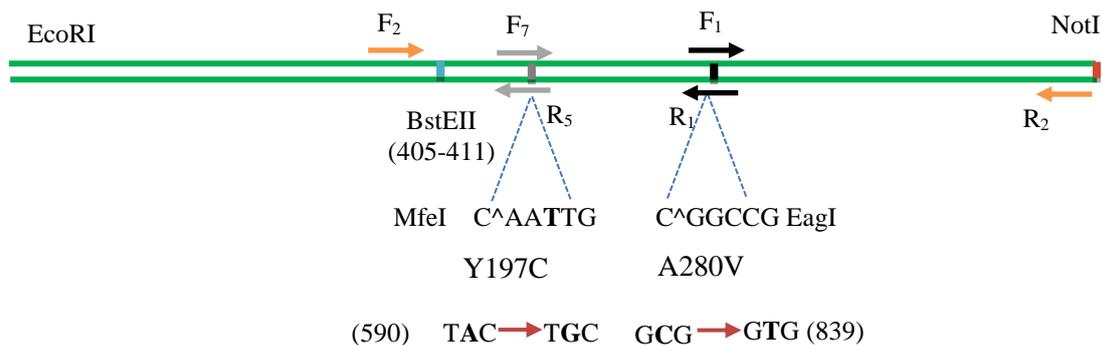


Fig. 4. Esquema del ADNc para el hH₃R_{WT} mostrando los sitios de hibridación de los oligonucleótidos empleados para obtener las mutaciones Y197C y A280V. En color azul se indica el sitio único de restricción para la enzima BstEII en la secuencia del hH₃R_{WT}. Las flechas grises indican los oligonucleótidos sentido y anti-sentido (F₇ y R₅) empleados para la obtención de la mutación Y197C; las flechas negras indican los oligonucleótidos sentido y anti-sentido (F₁ y R₁) utilizados para la obtención de la mutación A280V; y las de color naranja indican los oligonucleótidos empleados en ambos casos para obtener los fragmentos de interés. El sitio de restricción para la enzima MfeI introducido en la secuencia se indica con la barra gris y el sitio de restricción para la endonucleasa EagI, interrumpido por la mutación A280V, se indica con la barra negra. La barra roja muestra el sitio de restricción adicional para la endonucleasa NotI.

5.1.1.3 Inserción del fragmento F₂-R₂ en el plásmido pCI-Neo-hH₃R_{WT}

Para subclonar en el vector pCI-Neo al hH₃R con la mutación Y197C (hH₃R_{Y197C}), se realizó la digestión del fragmento F₂-R₂ en el vector pJET1.2, y el fragmento correspondiente localizado en el plásmido pCI-Neo-hH₃R, con las endonucleasas BstEII y NotI (Fig. 5C). El fragmento que contenía la mutación Y197C fue ligado al complemento en el receptor nativo que carecía de esa región del ADNc. Las reacciones de 50 µl contuvieron: amortiguador REACT® 3 1X (Promega), BSA 0.1 mg/ml, endonucleasa NotI 10 U, endonucleasa BstEII 10 U, 3.2 µl de plásmido pJET1.2 (270 ng/µl) o 4.2 µl del plásmido pCI-Neo-h H₃R₄₄₅ (400) ng/µl). Las reacciones se incubaron ≥ 6 h a 37 °C.

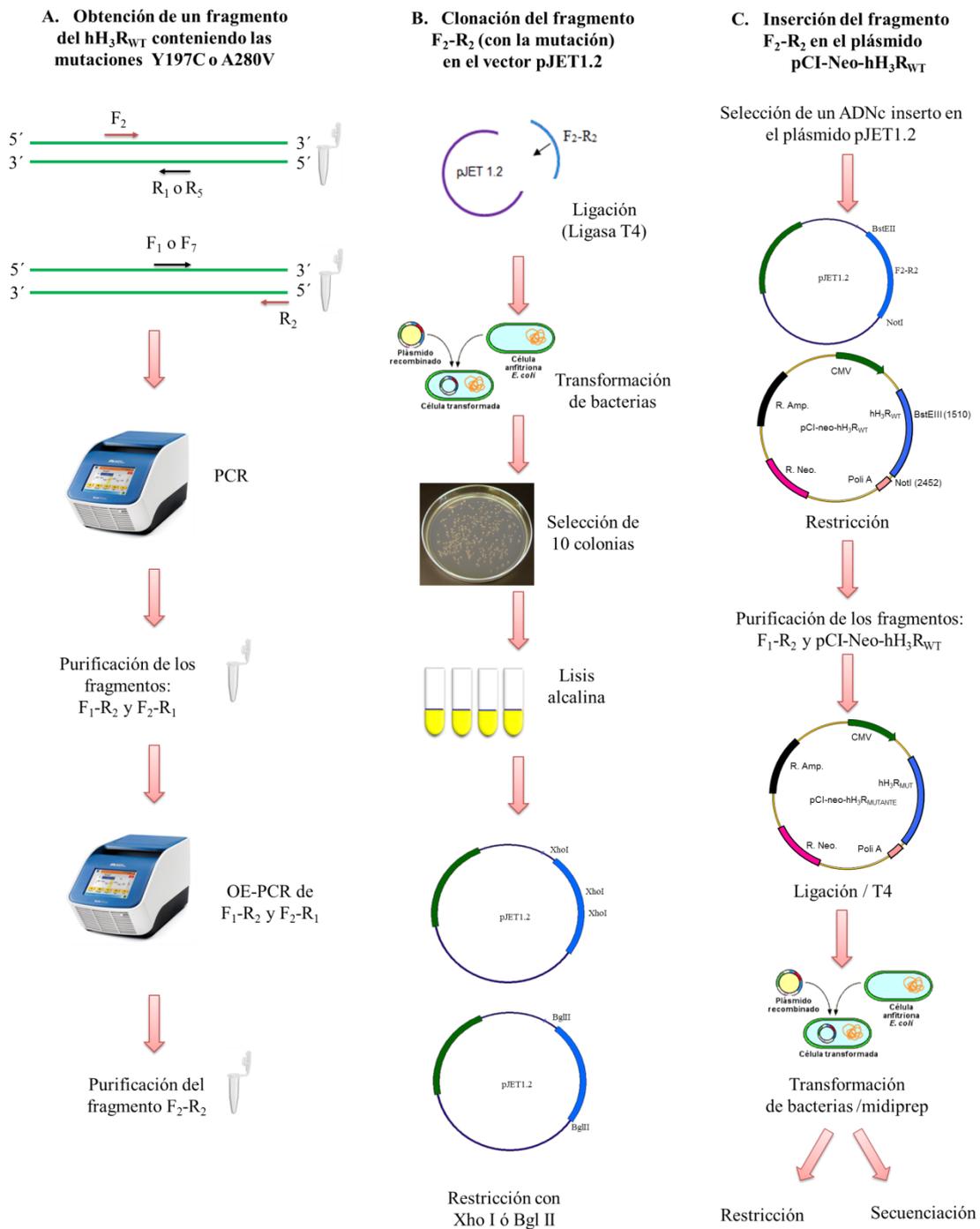


Fig. 5. Esquema de la metodología experimental para la obtención de las mutaciones Y197C y A280V en el hH₃R_{WT}. A, B y C indican las principales etapas del diseño experimental.

Los fragmentos obtenidos de la digestión de los plásmidos pCI-Neo-hH₃R_{WT} y pJET2.1-F₂-R₂ se purificaron con el kit comercial indicado, y se verificó el proceso por

electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con bromuro de etidio. Los fragmentos purificados se ligaron (Fig. 5C) en reacciones de 20 μ l que contenían: regulador para ligasa 1X; 4 μ l (4 ng/ μ l) de vector pCI-Neo-hH₃R_{WT} purificado (sin el fragmento BstEII-NotI); 2 μ l (20 ng/ μ l) de inserto BstEII-NotI purificado (recuperado de pJET2.1- F₂-R₂); y 2.5 U de ligasa del fago T4. Se incluyó un control negativo en el que se omitió el inserto y las reacciones se incubaron a 25 °C por 30 min.

Se transformaron bacterias *E. coli* competentes [101] con 3 μ l del producto de las ligaciones anteriores y se inocularon en placas con LB-agar-ampicilina (100 μ g/ml). Después de 16 h a 37 °C se seleccionaron 10 colonias y cada una de estas fue sembrada en medio LB, incubándose a 37 °C por 16 h antes de obtener el ADN plasmídico (pCI-Neo-hH₃R_{Y197C}) por lisis alcalina (miniprep).

5.1.1.4 Confirmación de la mutación puntual Y197C en el vector pCI-Neo-hH₃R_{Y197C}

El ADN plasmídico obtenido se digirió con la enzima MfeI (BioLabs, Ipswich, MA, USA), para la cual existe sólo un sitio de restricción en el vector pCI-Neo-hH₃R_{WT}. Al introducirse la mutación silente en la tercera posición del codón AAC (cambio por AAT) cercana a la mutación Y197C en el vector, se generó un sitio de restricción adicional como se ilustra en la Fig. 6. La digestión (37 °C, \geq 3 h) se realizó en un volumen final de 10 μ l con regulador CutSmart 1X, 4 U de la enzima MfeI y 500 ng del vector (pCI-Neo-hH₃R₄₄₅ o pCI-Neo-hH₃R_{Y197C}). Los productos se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio.

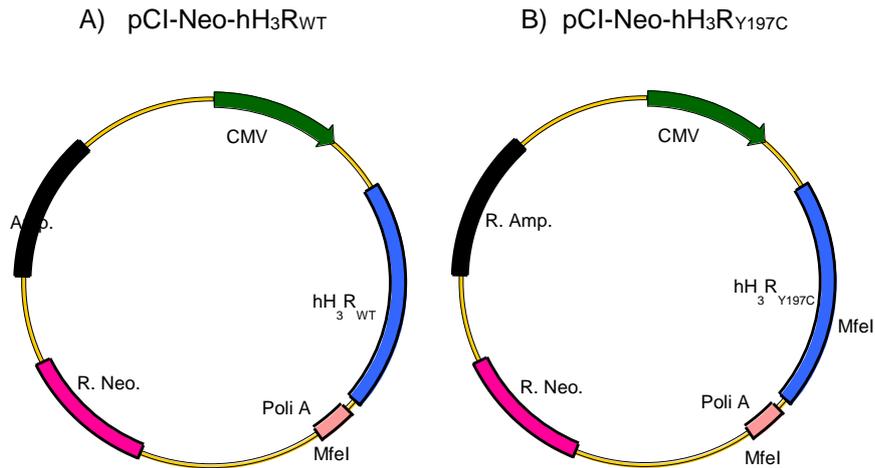


Fig. 6. Esquema de los vectores pCI-Neo-hH₃R_{WT} (A) y pCI-Neo-hH₃R_{Y197C} (B). Los sitios de restricción para la endonucleasa MfeI se indican en cada vector.

Una vez seleccionado el ADN plasmídico, se transformaron bacterias competentes *E. coli* (cepa DH5 α) con pCI-Neo-hH₃R_{Y197C} para amplificar y extraer el plásmido por columna (midiprep), y se solicitó la secuenciación del fragmento de interés en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (Universidad Nacional Autónoma de México), para confirmar la presencia de la mutación y la ausencia de cambios no deseados.

5.1.2 Obtención de la mutación puntual A280V

Se empleó la misma estrategia experimental utilizada para la obtención de la mutación Y197C, pero empleando los oligonucleótidos en sentido F₁ y F₂ y anti-sentido R₁ y R₂ (Tabla 2). Los oligonucleótidos F₁ y R₁ contienen el cambio en el nucleótido 839 de una citosina o guanina por una timina o adenina, respectivamente, para obtener la mutación deseada, ya que el triplete GCG codifica el aa Ala mientras que el triplete GTG codifica el

aa Val (Fig. 4). El oligonucleótido F₂ se hibrida con una secuencia cercana al sitio de restricción para la enzima BstEII y el oligonucleótido R₂ contiene un sitio de restricción para la enzima NotI (sitios únicos en toda la secuencia del plásmido pCI-Neo-hH₃R_{WT}), lo que permitió sub-clonar de manera dirigida el fragmento conteniendo la mutación A280V en el resto del pCI-Neo-hH₃R_{WT}.

Al presentarse la mutación A280V se interrumpe un sitio de restricción para la endonucleasa EagI (existen 4 sitios de restricción en el vector pCI-Neo-hH₃R_{WT}), por lo que un patrón de restricción con esta enzima diferente al tipo nativo indicó la presencia de la mutación como estrategia de selección inicial. Como se realizó para la mutante Y197C, las clonas fueron secuenciadas para verificar la presencia de la mutación y la ausencia de cambios no deseados.

5.2 Cultivo celular

Las células CHO-K1 se cultivaron en medio DMEM/F12 conteniendo 10 % de suero fetal bovino (SFB; Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) y 1 % de una mezcla de penicilina/estreptomicina/Fungizone (10,000 U/ml, 10 mg/ml y 25 µg/ml; Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA), incubándolas a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ en aire.

5.3 Expresión de los receptores hH₃R_{WT}, hH₃R_{Y197C} y hH₃R_{A280V} en células CHO-K1

5.3.1 Expresión del receptor hH₃R_{WT} o hH₃R_{Y197C}

Inicialmente se obtuvieron clonas celulares con los receptores hH₃R_{WT} o hH₃R_{Y197C} aislando las células por citometría de flujo. Sin embargo, la expresión de los receptores disminuyó rápidamente en los subcultivos, obstaculizando la realización de ensayos

funcionales. Por lo anterior, se optó por realizar transfecciones transitorias con polietiliminina (PEI).

5.3.1.1 Transfección transitoria de los receptores hH₃R_{WT} o hH₃R_{Y197C}

Se sembraron células CHO-K1 parentales (3×10^6 células) en placas Petri de 10 cm de diámetro y se cultivaron durante 24 h. El día de la transfección se preparó el complejo ADN-PEI empleando 20 μ l de PEI (1 mg/ml en solución salina amortiguada con fosfatos, PBS) y 4 μ g del ADN plasmídico de cada receptor en un volumen final de 2 ml de DMEM/F12 base (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). La mezcla se incubó por 30 min a 37 °C. Antes de adicionar los complejos, el medio de cultivo se sustituyó por 2 ml de medio DMEM/F12. Los complejos fueron añadidos a las células y se incubó a 37°C por 1 h. Finalmente, se agregaron 4 ml de medio DMEM/F12 conteniendo 20 % de SFB y 2 % de solución de antibióticos. Las células se incubaron por 48 h antes de realizar los ensayos.

5.3.2 Expresión del receptor hH₃R_{WT} o hH₃R_{A280V}

5.3.2.1 Transfección y selección de células CHO-K1

La transfección se realizó con los plásmidos pCI-Neo-hH₃R_{WT} o pCI-Neo-hH₃R_{A280V} utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (relación 1:2.5, ADN:Lipofectamina). Después de la transfección las células fueron cultivadas por 24 h en el medio de crecimiento y posteriormente en medio de selección (DMEM/F12, 10 % de SFB, 500 μ g/ml de geneticina (G418, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), renovado cada 48 h por 4 semanas. Después de este tiempo las células se cultivaron en medio DMEM/F12 con 10 % de SFB y 250 μ g/ml de geneticina.

5.3.2.2 Obtención de clonas celulares transfectadas con los receptores hH₃R_{WT} o hH₃R_{A280V}

Se sembraron 5×10^4 células CHO-K1, transfectadas y seleccionadas como se indicó anteriormente, en cajas Petri de 10 cm de diámetro conteniendo medio de selección (DMEM/F12 con 10 % de SFB y 250 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina). Mediante anillos de clonación se aislaron colonias celulares las cuales se disociaron con tripsina, se diluyeron en medio de cultivo (1:1,000, suspensión celular: medio de selección) y se depositaron alícuotas de 100 μl en los pozos de placas de 96 pozos. El crecimiento celular fue revisado cada 12 h y el medio de cultivo fue cambiado cada 48 h. Los pozos en los que se observaron colonias formadas a partir de una sola célula fueron marcados, y una vez llenos las células fueron disociadas con tripsina y transferidas a una placa de 6 pozos, y finalmente a placas Petri de 10 cm de diámetro.

5.4 Ensayos de unión de radioligando a membranas celulares

5.4.1 Ensayos con una concentración de radioligando

Para determinar la expresión de los receptores hH₃R_{WT}, hH₃R_{Y197C} y hH₃R_{A280V} se realizaron ensayos de unión de [³H]-*N*- α -metil-histamina ([³H]-NMHA) en membranas celulares. Las células CHO-K1-hH₃R_{WT}, CHO-K1-hH₃R_{A197C} y CHO-K1-hH₃R_{A280V}, cultivadas en cajas Petri de 10 cm por 48 h, se lavaron con solución PBS antes de ser expuestas a una solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4; 4 °C). La suspensión celular se centrifugó a 42,000 x *g* por 20 min a 4°C y la pastilla resultante (preparación membranal) se resuspendió en la solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7.4).

Muestras de la suspensión membranal (20 μg de proteína; método de BCA) se incubaron por 60 min a 30 °C con una solución de [³H]-NMHA (~2 nM, 82.9 Ci/mmol; Perkin

Elmer, Boston, MA, USA). Las incubaciones se filtraron utilizando un colector automático Brandel a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B; GE Healthcare Bio Sciences, Pittsburgh, PA, USA) expuestos a polietilenimina (0.3 %) por al menos 2 h. Los filtros se lavaron tres veces con 1 ml de la solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7.4; 4 °C) y se transfirieron a viales a los que se les adicionaron 3 ml de líquido de centelleo. La radiactividad se cuantificó por centelleometría después de 5 h. La unión inespecífica se determinó en presencia de histamina (10 µM) y la unión específica se obtuvo al restar la unión inespecífica de la unión total.

5.4.2 Ensayos con una concentración de radioligando en células intactas

Para determinar la expresión de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C} en la membrana citoplasmática se realizaron ensayos de unión de [³H]-NMHA en células vivas. Las células CHO-K1-hH₃R_{WT} y CHO-K1-hH₃R_{A197C} se sembraron en cajas de 24 pozos y después de 24 h se lavaron dos veces con 250 µl de solución Krebs-Ringer-Hepes a 37 °C (KRH, en mM: NaCl 113, NaHCO₃ 25, Hepes 20, glucosa 15, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2 y KH₂PO₄ 1.2; pH 7.4 con NaOH) y una vez con 250 µl de solución de PBS a 4 °C conteniendo CaCl₂ 1.8 mM y MgCl₂ 1.2 mM, para ser incubadas con 180 µl de solución KRH y 10 µl de agua para la unión total o tioperamida (200 µM) para la unión no específica, durante 5 h sobre hielo en presencia de [³H]-NMHA (10 µl de una solución 80 nM). La reacción se detuvo lavando dos veces con 250 µl y dos veces con 500 µl de PBS/Ca²⁺Mg²⁺.

La radiactividad unida a los receptores de membrana se disoció por lavado con solución ácida (NaCl 150 mM, ácido acético 50 mM, pH 2.9). La solución de lavado se colocó en viales para ser cuantificado mediante centelleometría. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado por condición, y para cada sub-línea celular se determinó el número de

células por cuadruplicado. Las células se disociaron con tripsina y una vez recuperadas en un volumen final de 500 μ l de DMEM-F12 se contaron en una cámara de Neubauer. La unión específica se obtuvo restando la unión no específica de la unión total y los resultados se reportan como número de receptores por célula.

5.4.3 Ensayos de saturación

Alícuotas de la suspensión membranal se incubaron (60 min, 30 °C) con concentraciones crecientes (0.01-10 nM) de [3 H]-NMHA. La unión inespecífica se determinó en presencia de histamina (10 μ M) y la unión específica se determinó como se describió anteriormente. Los valores de la constante de disociación (K_d) y de la unión máxima (B_{max}) se determinaron por regresión no lineal con el programa Prism® versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.4.4 Ensayos de inhibición

Muestras de la suspensión membranal se incubaron (60 min, 30 °C) con \sim 2 nM de [3 H]-NMHA y concentraciones crecientes de ligandos del H₃R. La unión inespecífica se determinó con histamina como se describió previamente. Las constantes de inhibición (K_i) se determinaron por regresión no lineal utilizando la ecuación de Cheng y Prussoff [102] empleando el programa Prism 5.0.

5.5 Determinación de la acumulación de AMPc en células intactas

Las células CHO-K1-hH₃R_{WT}, CHO-K1-hH₃R_{A280V} y CHO-K1-hH₃R_{Y197C} se sembraron en cajas de 24 pozos por 48 h. El día del ensayo cada pozo se lavó con 250 μ l de solución KRH, se agregaron 250 μ l de la misma solución conteniendo un inhibidor de fosfodiesterasas (isobutil-metil-xantina, IBMX, 1 mM; Sigma Aldrich) y se incubó durante 10 min a 37 °C. Se agregaron 11 μ l de agua (basal) u 11 μ l de los fármacos en estudio;

5 min después se adicionaron 11 μ l de una solución de forskolina (250 μ M o 75 μ M, para una concentración final de 10 o 3 μ M, respectivamente), y se continuó la incubación por 15 min. La reacción se detuvo retirando el medio y adicionando 250 μ l de HCl (0.1 N) a 4 $^{\circ}$ C, y las cajas se colocaron sobre hielo durante 15 min para permitir la extracción del AMPc endógeno. Los extractos se neutralizaron con 25 μ l de NaOH (1 M) y 100 μ l de solución amortiguadora Tris-HCl (1 M, pH 7.0 a 4 $^{\circ}$ C).

Para la determinación de AMPc se colocaron en tubos de plástico: 50 μ l de [3 H]-AMPc (~10 nM, concentración final; Sigma Aldrich) en solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, 5 mg/ml de BSA; pH 7.0), 25 μ l de la subunidad reguladora de la PKA (Sigma Aldrich) en solución de incubación (~0.5 U/muestra) y 50 μ l de los extractos celulares. En tubos en paralelo se determinó la unión total e inespecífica de [3 H]-AMPc en ausencia y presencia de AMPc no marcado (10 μ M), respectivamente. Después de 2.5 h a ~2 $^{\circ}$ C las incubaciones se filtraron (filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B, expuestos a polietilenimina, 0.3%, por al menos 2 h) utilizando un colector automático Brandel. Los filtros se lavaron tres veces con 1 ml de agua destilada a 4 $^{\circ}$ C, y se colocaron en viales conteniendo 3 ml de líquido de centelleo. Se cuantificó la radioactividad presente después de 5 h y los resultados se analizaron con los programas Microsoft Excel y Prism 5.0. Los valores de AMPc endógeno se determinaron con una curva estándar de AMPc (10^{-12} - 10^{-5} M).

5.6 Determinación de la unión de [35 S]-GTP γ S a membranas celulares

Las células se sembraron en placas Petri de 10 cm y se cultivaron por 24 h. El día del ensayo las células se lisaron incubándolas sobre hielo durante 10 min en una solución de Hepes (20 mM, pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C) y EDTA (200 μ M), conteniendo una mezcla de inhibidores

de proteasas (1:200; AEBSF 4 mM, aprotinina 80 μ M, bestatina 4 mM, E-64 1.4 mM, leupeptina 2 mM, pepstatina A 1.5 mM; Sigma Aldrich). La suspensión se centrifugó a 42,000 x g (4 °C, 20 min) y las pastillas resultantes (membranas celulares) se re-suspendieron en 1.5 ml de solución Hepes conteniendo 1 U/ml de desaminasa de adenosina a fin de metabolizar la adenosina presente y evitar la activación de sus receptores endógenos. Después de 30 min a 30 °C, se adicionaron 7 μ l de una solución de saponina (5 mg/ml).

Las muestras membranales (~20 μ g de proteína) se incubaron durante 60 min a 30 °C en solución de incubación (Hepes 20 mM, MgCl₂ 10 mM, BSA 1 %, GDP 10 μ M y DTT 1 mM) conteniendo [³⁵S]-GTP γ S (~0.05 nM; Perkin Elmer, Boston, MA, USA) y ligandos selectivos del H₃R (histamina, R- α -metil-histamina [RAMH], immepip, imetit, A331440, ciproxifán, clobenpropit, tioperamida; Sigma Aldrich). La unión basal y la no específica se determinaron reemplazando al ligando por agua o GTP γ S (10 μ M), respectivamente. Las incubaciones se filtraron sobre filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B, previamente empapados en solución Hepes (Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM, a 4 °C) y los filtros se lavaron tres veces con 1 ml de la misma solución. La formación del complejo [³⁵S]-GTP γ S-proteína G se determinó por centelleometría después de 5 h y los datos se analizaron con regresión no lineal utilizando Prism 5.0.

5.7 Inmunodetección de ERK-1/2 fosforiladas (p44/42-ERK)

5.7.1 Obtención de los extractos protéicos

En una placa de seis pozos se sembraron 5 x 10⁵ células/pozo en medio DMEM-F12 conteniendo 10 % de SFB y 200 μ g/ml de G418. Una vez que las células se adhirieron a la

superficie de la placa, se redujo la concentración de suero (medio DMEM-F12 con 0.1 % de SFB y antibiótico de selección) y se cultivaron durante 14-19 h.

El día del ensayo las células fueron lavadas con PBS estéril (37 °C) e incubadas con medio DMEM/F12 durante 15 min a 37 °C, antes de adicionar un agonista selectivo del H₃R (RAMH). Una vez transcurrido el tiempo requerido, se realizaron tres lavados con PBS (dos a 37 °C y uno a 4 °C) para detener la reacción. Posteriormente las células se lisaron con solución de lisis (Tris-HCl 40 mM, pH 7.6, EDTA 0.2 mM, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio 0.5 %, SDS 0.2 %, Tritón X-100 0.1 %, glicerol 0.1 %; inhibidor de proteasas y fosfatasas 1:200), para extraer las proteínas totales. Las muestras proteicas se homogenizaron pasándolas siete veces por una jeringa de insulina, se centrifugaron (13,000xg a 4 °C) y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de BCA. Finalmente a cada muestra se le adicionó una sexta parte de solución de carga (Tris 0.35 M, pH 6.8, glicerol 30% (v:v), SDS 10 % (m:v), DTT 0.6 M, azul de bromofenol 12 % (m:v)), se hirvieron durante 5 min en baño maría y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.7.2 Detección de ERK-1/2 fosforiladas y totales

Las muestras proteicas (15 µg de proteína total) se resolvieron en geles de poli-acrilamida (12 %) a 30 mA por 90 min con regulador de corrida (Tris base 25 mM, pH 8.3, glicina 250 mM, SDS 0.1 %) y mediante transferencia húmeda con regulador (Tris base 25 mM, metanol 20 %, glicina 200 mM) se transfirieron a membranas de polivinildenedifloruro (PVDF; Biorad, Hercules, California, USA) a 300 mA durante 180 min, sobre hielo. Las membranas fueron bloqueadas con 5 % de leche libre de grasa durante 50 min y lavadas 3 veces por 5 min con TBS-Tween (Tris base 10 mM, pH 8.3, NaCl 150 mM, Tween 0.1 % v/v)). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario

(anti fosfo-ERK1/2 o anti ERK1/2 total, generados en conejo; Cell Signalling, Danvers, MA, USA) en una dilución 1:1,000 en TBS-T con 1.5 % de BSA y posteriormente lavadas tres veces por 5 min con TBS-Tween.

El anticuerpo primario se detectó incubando las membranas con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo generado en ratón y acoplado a peroxidasa (Cell Signalling) en una dilución 1:5,000 en TBS-T con 1.5 % de BSA, durante 1 h a temperatura ambiente. Las bandas se detectaron por quimio-luminiscencia (*Enhanced Chem iLuminscent Substrate*; Biorad, Hercules, CA, USA) utilizando el equipo Kodak Image Station 4000R (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). El análisis densitométrico se realizó con el programa ImageJ (National Institutes of Health, USA). Los valores de ERK-1/2 fosforiladas se normalizaron con respecto al valor de ERK-1/2 total y se expresaron como porcentaje de los niveles basales. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal empleando los programas Microsoft Excel y Prism 5.0.

6. Resultados

6.1 Mutación puntual Y197C en el receptor a histamina H₃ humano (hH₃R)

6.1.1 Obtención de la mutación puntual Y197C en el hH₃R

La digestión de los plásmidos pCI-Neo-hH₃R_{WT} y pCI-Neo-hH₃R_{Y197C} con la endonucleasa MfeI generó una sola banda de 6,782 pb para el primero, y dos bandas para el segundo, de 5,849 y 933 pb (Fig. 7), debido que el plásmido pCI-Neo-hH₃R_{WT} presenta un solo sitio de restricción para dicha enzima, mientras que en el plásmido pCI-Neo-hH₃R_{Y197C} se insertó un sitio adicional en una región cercana a la mutación Y197C, con el objeto de identificar en primera instancia la presencia de esta mutación (ver Métodos).

Este análisis indicaba la presencia de la mutación. La secuencia de nucleótidos del fragmento de interés (fragmento del hH₃R que contiene la mutación Y197C) fue determinada, y con el programa bio-informático *ClustalW2 Multiple Sequence Alignment*, se le comparó con la del receptor nativo reportada en el banco de datos GenBank. La Fig. 8 muestra la sustitución de la citosina por timina en el nucleótido 585 (inserción de un sitio adicional de restricción por la endonucleasa MfeI) y la sustitución de la adenina por guanina en el nucleótido 590 (mutación Y197C). Las secuencias de nucleótidos se tradujeron a amino ácidos empleando la aplicación *Translate tool (Bioinformatics Resource Portal, ExPASy, SIB Swiss Institute of Bioinformatics)* y el alineamiento de estas secuencias indicó que la mutación originó el cambio deseado de un solo aa, Tyr → Cys (Fig. 9).

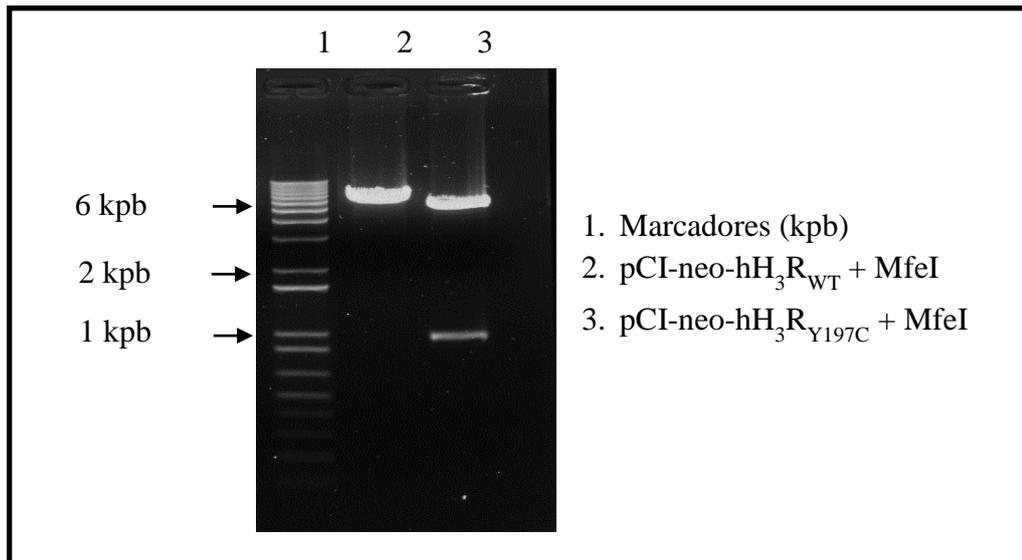


Fig. 7. Evaluación de la mutación Y197C en el hH₃R mediante restricción con la endonucleasa MfeI. Los plásmidos pCI-Neo-hH₃R_{WT} y pCI-Neo-hH₃R_{Y197C} se digirieron con la enzima MfeI y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. kpb, kilopares de bases.

6.1.2 Expresión de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C} en la membrana citoplasmática de las células CHO-K1 transfectadas

La Fig. 10 muestra un ensayo de unión de [³H]-NMHA en células vivas. A partir de cuatro experimentos se obtuvieron valores de $13,434 \pm 1,533$ y $15,894 \pm 2,054$ receptores/célula para los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C}, respectivamente. A pesar de la tendencia a una mayor expresión del receptor mutado, los valores no fueron estadísticamente diferentes.

hH ₃ R _{WT}	GTACCTGTCCGGGGCAGCTCCATCCCCGAGGGCCACTGCTATGCCGAGTTCTTCTACAA
hH ₃ R _{Y197C}	GTACCTGTCCGGGGCAGCTCCATCCCCGAGGGCCACTGCTATGCCGAGTTCTTCTACAA *****
hH ₃ R _{WT}	CTGGTACTTCCTCATCACGGCTTCCACCCTGGAGTTCTTTACGCCCTTCCTCAGCGTCAC
hH ₃ R _{Y197C}	T GGT C CTTCCTCATCACGGCTTCCACCCTGGAGTTCTTTACGCCCTTCCTCAGCGTCAC **** *
hH ₃ R _{WT}	CTTCTTTAACCTCAGCATCTACCTGAACATCCAGAGGGCGACCCGCTCCGGCTGGATGG
hH ₃ R _{Y197C}	CTTCTTTAACCTCAGCATCTACCTGAACATCCAGAGGGCGACCCGCTCCGGCTGGATGG *****
hH ₃ R _{WT}	GGCTCGAGAGGCAGCCGGCCCCGAGCCCCCTCCCGAGGCCAGCCCTCACCACCCACC
hH ₃ R _{Y197C}	GGCTCGAGAGGCAGCCGGCCCCGAGCCCCCTCCCGAGGCCAGCCCTCACCACCCACC *****
hH ₃ R _{WT}	GCCTGGCTGCTGGGGCTGCTGGCAGAAGGGGCACGGGGAGGCCATGCCGCTGCACAGGTA
hH ₃ R _{Y197C}	GCCTGGCTGCTGGGGCTGCTGGCAGAAGGGGCACGGGGAGGCCATGCCGCTGCACAGGTA *****
hH ₃ R _{WT}	TGGGGTGGGTGAGGCGGCCGTAGGCGCTGAGGCCGGGGAGGCGACCCTCGGGGTGGCGG
hH ₃ R _{Y197C}	TGGGGTGGGTGAGGCGGCCGTAGGCGCTGAGGCCGGGGAGGCGACCCTCGGGGTGGCGG *****
hH ₃ R _{WT}	TGGGGCGGCTCCGTGGCTTACCCACCTCCAGCTCCGGCAGCTCCTCGAGGGGCACTGA
hH ₃ R _{Y197C}	TGGGGCGGCTCCGTGGCTTACCCACCTCCAGCTCCGGCAGCTCCTCGAGGGGCACTGA *****

Fig. 8. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos que codifican al hH₃R_{WT} y del fragmento que contiene la mutación Y197C. En rojo se indica el cambio del nucleótido en el receptor mutado. Las secuencias corresponden al fragmento de interés (nucleótidos 525-945).

hH ₃ R _{WT}	MLLVWVLAFLLYGPAILSWEYLSGGSS IPEGHCYAEFFYNWYFLITASTLEFFTPFLSVT
hH ₃ R _{Y197C}	MLLVWVLAFLLYGPAILSWEYLSGGSS IPEGHCYAEFFYNW C FLITASTLEFFTPFLSVT *****
hH ₃ R _{WT}	FFNLSIYLN IQRRTRLRLDGAREAAGPEPPPEAQSPPPPPGCWGCWQKGHG EAMPLHRY
hH ₃ R _{Y197C}	FFNLSIYLN IQRRTRLRLDGAREAAGPEPPPEAQSPPPPPGCWGCWQKGHG EAMPLHRY *****
hH ₃ R _{WT}	GVGEAAVGAEAGEATLGGGGGGSVASPTSSSGSSSRGTERPRSLKRGSKPSASSASLEK
hH ₃ R _{Y197C}	GVGEAAVGAEAGEATLGGGGGGSVASPTSSSGSSSRGTERPRSLKRGSKPSASSASLEK *****
hH ₃ R _{WT}	RMKMVSQSFTQRFRLSRDRKVAKSLAVIVSIFGLCWAPYTLMIIRAACHGHCVPDYWYE
hH ₃ R _{Y197C}	RMKMVSQSFTQRFRLSRDRKVAKSLAVIVSIFGLCWAPYTLMIIRAACHGHCVPDYWYE *****
hH ₃ R _{WT}	TSFWLLWANS AVNPVLYPLCHHSFRRAFTKLLCPQK LKI QPHSSLEHCWK
hH ₃ R _{Y197C}	TSFWLLWANS AVNPVLYPLCHHSFRRAFTKLLCPQK LKI QPHSSLEHCWK *****

Fig. 9. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos del hH₃R_{WT} y el fragmento de interés. La región comparada corresponde al fragmento de interés (aa 156-445). En rojo se indica el cambio del amino ácido Tyr por Cys.

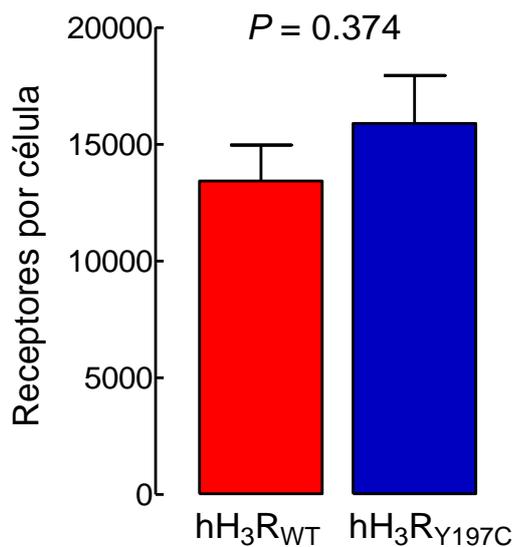


Fig. 10. Unión específica de [³H]-NMHA a células intactas CHO-K1-hH₃R_{WT} y CHO-K1-hH₃R_{Y197C}. Los valores son el promedio ± s.e.m. de 4 experimentos con determinaciones por triplicado. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.1.3 Caracterización farmacológica de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C} expresados en células CHO-K1

Para este abordaje se realizaron ensayos de saturación de la unión de [³H]-NMHA y ensayos de inhibición por ligandos selectivos del H₃R (histamina, impropip, RAMH, ciproxifán y clobenpropit).

6.1.3.1 Ensayos de saturación

La Fig. 11 muestra un experimento representativo. La unión específica del radioligando fue saturable para ambos receptores, y el análisis de 5 experimentos indicó que no existió diferencia significativa en los valores de unión máxima (B_{max}) o de la constante de disociación (K_d) del agonista marcado radiactivamente (Tabla 3).

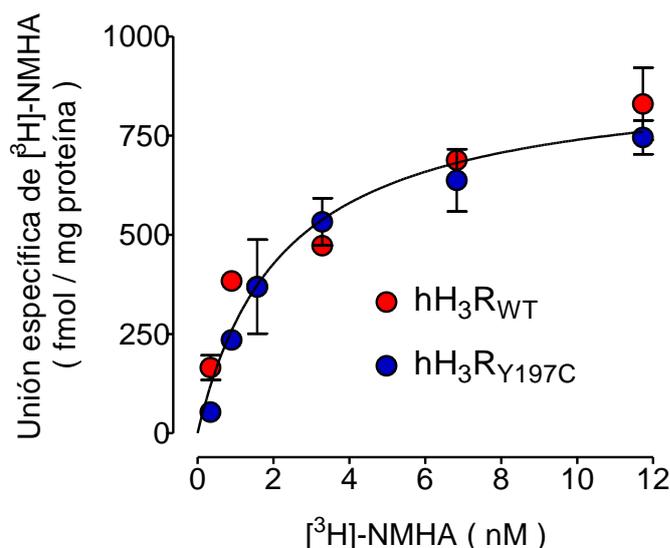


Fig. 11. Saturación de la unión específica de [³H]-NMHA a membranas de células CHO-K1-hH₃R_{WT} y CHO-K1-hH₃R_{Y197C}. Se muestra un experimento representativo de 5 realizados. Los valores son el promedio \pm s.e.m. de determinaciones por triplicado. El análisis estadístico de la unión máxima (B_{\max}) y de la constante de disociación (K_d) se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Unión máxima (B_{\max}) y constante de disociación (K_d) de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C} expresados en células CHO-K1.

	hH ₃ R _{WT}	hH ₃ R _{Y197C}	<i>P</i>
B_{\max} (fmol / mg prot.)	761 \pm 78	663 \pm 66	0.369
pK_d	8.81 \pm 0.04	8.64 \pm 0.06	0.063
K_d (nM)	1.55	2.29	

Los valores son promedios \pm s.e.m. de 5 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.1.3.2 Ensayos de inhibición

Los 5 ligandos analizados, el agonista endógeno histamina, los agonistas sintéticos imnepip y RAMH, y los antagonistas ciproxifán y clobenpropit, inhibieron la unión de [³H]-NMHA de manera dependiente de la concentración para ambos receptores (Fig. 12).

Al comparar los valores de pK_i (logaritmo negativo de la constante de inhibición, K_i) no se advirtió diferencia significativa para ninguno de los ligandos (Tabla 5).

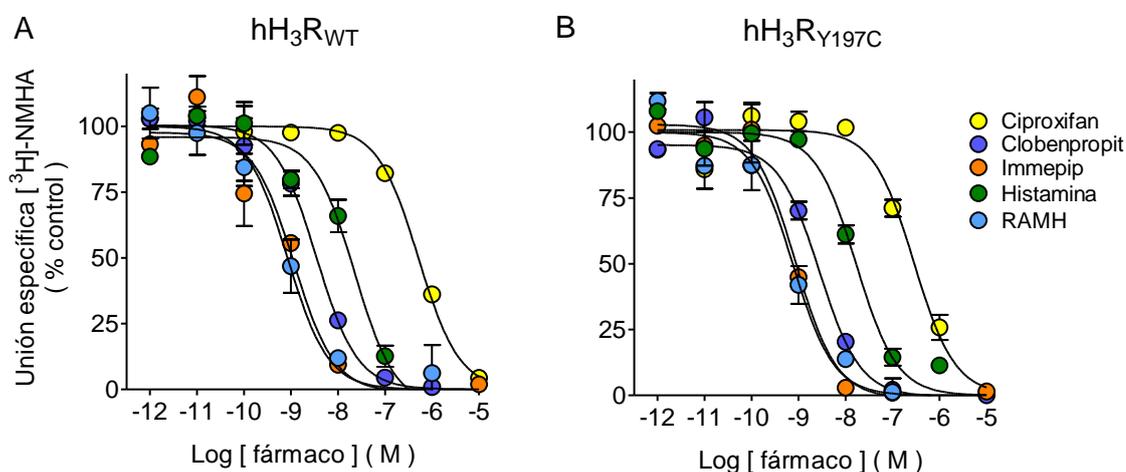


Fig. 12. Inhibición de la unión de $[^3\text{H}]$ -NMHA por ligandos selectivos del H_3R en membranas de células $\text{CHO-K1-hH}_3\text{R}_{\text{WT}}$ y $\text{CHO-K1-H}_3\text{R}_{\text{Y197C}}$. La unión de radioligando se expresa como porcentaje de la unión control. Los valores son de un experimento representativo y corresponden al promedio \pm s.e.m. de determinaciones por triplicado. A) $\text{hH}_3\text{R}_{\text{WT}}$; B) $\text{hH}_3\text{R}_{\text{Y197C}}$. El análisis estadístico se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Afinidades de los receptores $\text{hH}_3\text{R}_{\text{WT}}$ o $\text{hH}_3\text{R}_{\text{Y197C}}$ por ligandos selectivos.

		pK_i ($-\text{Log } K_i$)				
		Ligando	$\text{hH}_3\text{R}_{\text{WT}}$	$\text{hH}_3\text{R}_{\text{Y197C}}$	P	n
Agonistas	histamina		8.09 ± 0.11	7.94 ± 0.09	0.407	6, 3
	immepip		9.53 ± 0.07	9.47 ± 0.11	0.632	8, 6
	RAMH		8.99 ± 0.11	9.15 ± 0.15	0.403	8, 5
Antagonistas/ Agonistas inversos	ciproxifán		6.75 ± 0.07	7.03 ± 0.13	0.066	7, 5
	clobenpropit		8.40 ± 0.22	8.32 ± 0.26	0.825	7, 5

Los valores se expresan como pK_i (logaritmo negativo de la constante de inhibición, K_i) y corresponden al promedio \pm s.e.m. del número indicado de experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student. Los valores de n corresponden al receptor nativo y receptor con la mutación en ese orden.

6.1.4 Funcionalidad de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C} expresados en células CHO-K1

Para evaluar posibles diferencias en la función de los receptores expresados, se realizaron ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS en membranas celulares y ensayos de acumulación de AMPc en células intactas.

6.1.4.1 Ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS a membranas celulares

La unión de [³⁵S]-GTPγS refleja la activación de proteínas G en las membranas celulares. La Fig. 13 muestra que el agonista RAMH estimuló la unión de [³⁵S]-GTPγS de forma dependiente de la concentración para ambos receptores. El análisis estadístico (Tabla 5) mostró que no existieron diferencias en el efecto máximo (eficacia) o en la potencia del agonista RAMH (pEC₅₀; logaritmo negativo de la concentración efectiva media, EC₅₀) entre los receptores nativo y con la mutación Y197C.

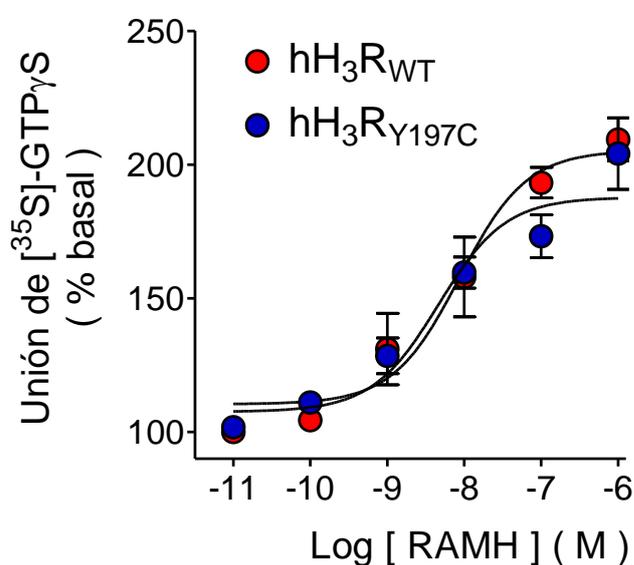


Fig. 13. Estimulación por el agonista RAMH de la unión de [³⁵S]-GTPγS en membranas de células CHO-K1-hH₃R_{WT} o CHO-K1-hH₃R_{Y197C}. Se ilustra un experimento representativo de 8 realizados. Los valores se expresan como porcentaje de la unión basal y corresponden a los promedios ± s.e.m. de determinaciones por triplicado. El análisis del efecto máximo (E_{max}) y de la concentración efectiva media (EC₅₀) se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Estimulación por el agonista RAMH de la unión de [³⁵S]-GTPγS en membranas de células CHO-K1- hH₃R_{WT} o CHO-K1-hH₃R_{Y197C}.

	hH ₃ R _{WT}	hH ₃ R _{Y197C}	<i>P</i>
E _{max}	192.5 ± 8.0 %	175.8 ± 9.8 %	0.236
pEC ₅₀	8.40 ± 0.16	8.52 ± 0.15	0.596
EC ₅₀ (nM)	3.97	3.01	

Los valores son los promedios ± s.e.m. de 8 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.1.4.2 Ensayos de formación de AMPc

La Fig. 14 muestra que tanto en células CHO-K1-hH₃R_{WT} como CHO-K1-hH₃R_{Y197C} la activación del H₃R con el agonista RAMH inhibió la formación de AMPc inducida por forskolina de manera dependiente de la concentración. No existió diferencia significativa en los valores de inhibición máxima (I_{max}) o pIC₅₀ (logaritmo negativo de la concentración inhibitoria media, IC₅₀), como se observa en la Tabla 6. Estos resultados son similares a los obtenidos en los ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS y reflejan el efecto funcional de la activación de las proteínas Gα_{i/o}.

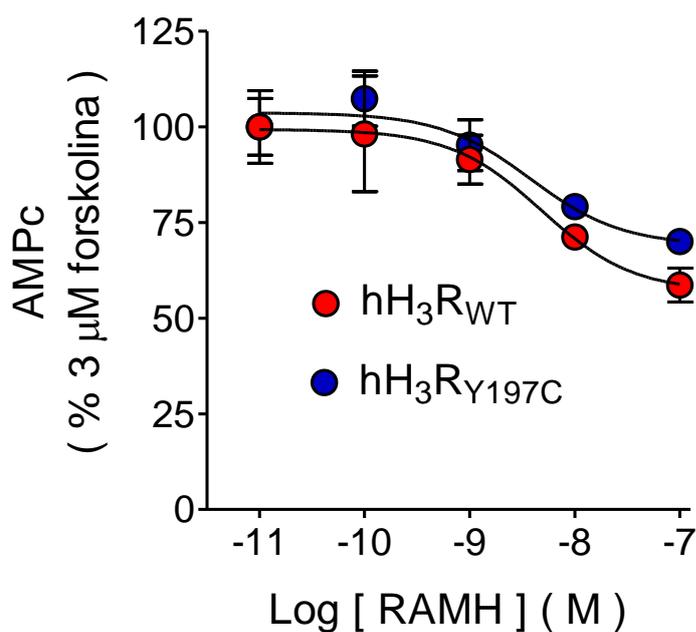


Fig. 14. Inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina por activación de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C} con el agonista RAMH. Se muestra un experimento representativo, repetido 3 veces más con resultados similares. Los valores se expresan como porcentaje de la formación de AMPc inducida por 3 μM de forskolina, después de sustraer el valor de la formación basal, y son el promedio ± s.e.m. de 3-4 replicados. El análisis de la inhibición máxima (I_{max}) y de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Inhibición máxima (I_{max}) y concentración inhibitoria media (IC_{50}) de la inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina, por activación de los receptores hH₃R_{WT} o hH₃R_{Y197C} expresados en células CHO-K1.

	hH ₃ R _{WT}	hH ₃ R _{Y197C}	<i>P</i>
I_{max}	33.3 ± 3.9 %	33.1 ± 4.7 %	0.982
p IC_{50}	8.69 ± 0.21	8.87 ± 0.19	0.543
IC_{50} (nM)	2.04	1.35	

Los valores de I_{max} y p IC_{50} (logaritmo negativo de la IC_{50}) son el promedio ± s.e.m. de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.2 Mutación puntual A280V en el receptor hH₃R

6.2.1 Obtención de la mutación puntual A280V en el hH₃R

La Fig. 15 muestra el resultado de la digestión con la enzima EagI de los plásmidos pCI-Neo-hH₃R_{WT} y pCI-Neo-hH₃R_{A280V}. Aparentemente se observan tres bandas tanto para el receptor nativo como para el receptor con la mutación A280V. Sin embargo, en el caso del plásmido con el receptor nativo existe una pequeña diferencia en el tamaño de dos fragmentos (508 y 533 pb), por lo que éstos no pueden resolverse bajo las condiciones de la electroforesis, y por ello se observa una banda única con un tamaño de ~550 pb. En contraste, para el plásmido con el receptor mutante se observa una banda de ~1100 pb, que corresponde a la suma de los fragmentos de 508 y 533 pb, y que no aparece en el receptor nativo ya que en la secuencia de éste existe un sitio de restricción para la endonucleasa (C[^]GGCCG) que se interrumpe en el receptor mutante (TGGCCG; ver Métodos).

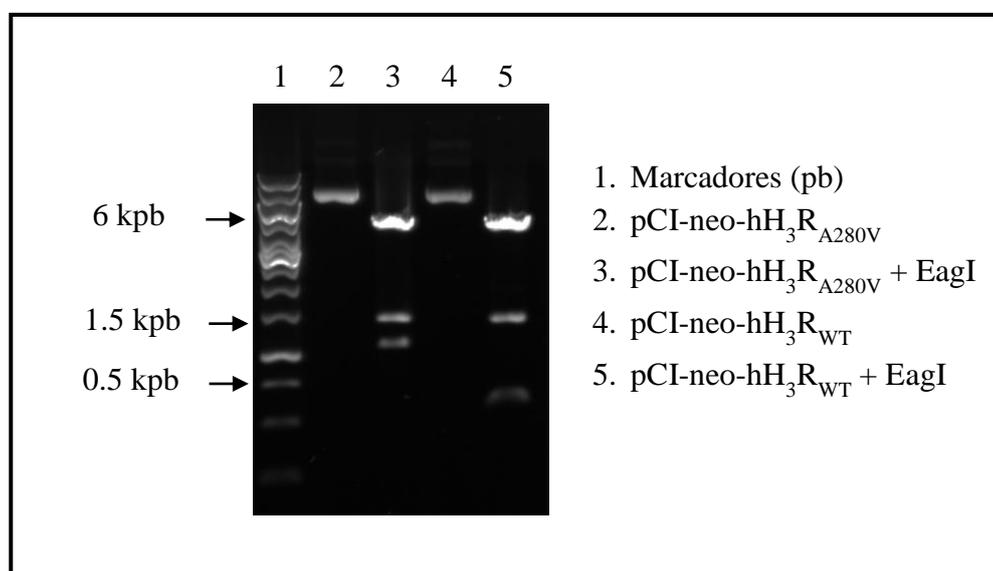


Fig. 15. Electroforesis de los productos de la digestión de los plásmidos pCI-Neo-hH₃R_{WT} y pCI-Neo-hH₃R_{A280V} con la enzima EagI. Carril 1, marcadores de pares de bases (pb); carriles 2 y 4, plásmidos sin digerir; carriles 3 y 5, pCI-Neo-hH₃R_{A280V} y pCI-Neo-hH₃R_{WT} digeridos con EagI, kpb, kilopares de bases.

El análisis de restricción indicaba la presencia de la mutación A280V. La secuenciación del fragmento de interés (secuencia del hH₃R que contiene la mutación) permitió compararlo con el fragmento correspondiente del receptor nativo reportada en el base de datos GenBank (Fig. 16), utilizando el programa bio-informático *ClustalW2 Multiple Sequence Alignment*.

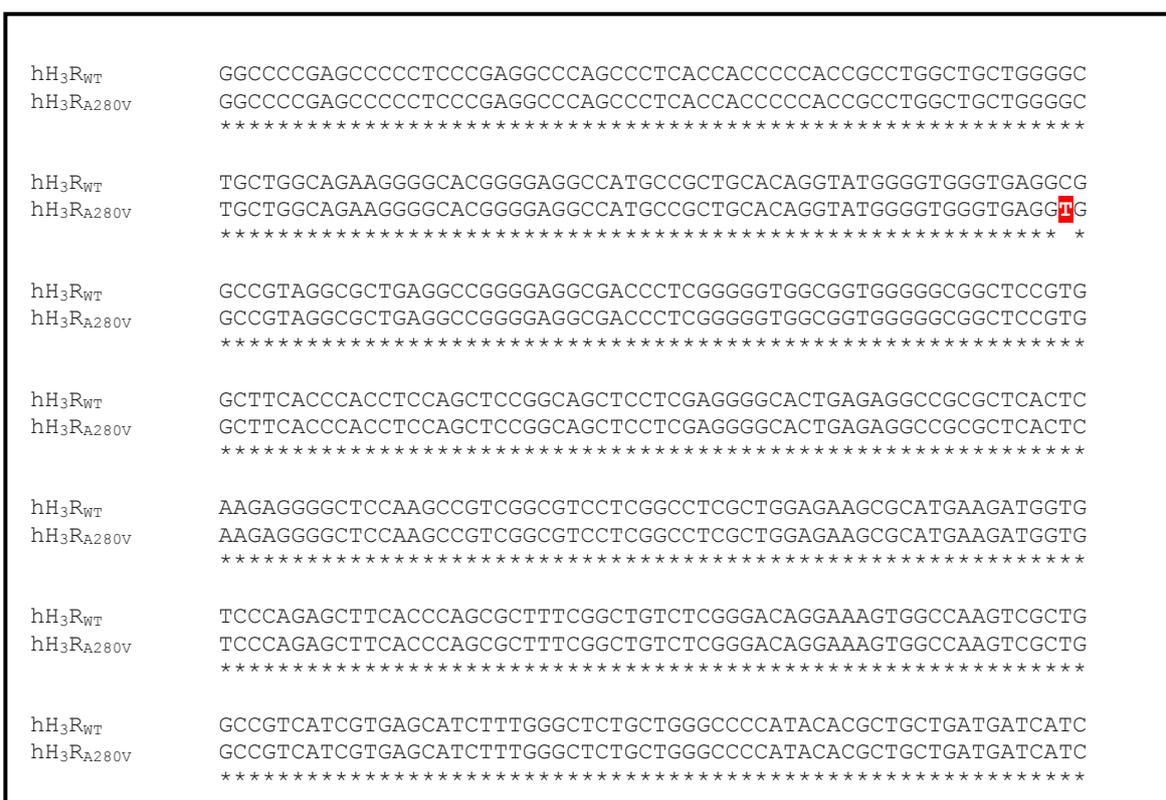


Fig. 16. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos que codifican al receptor hH₃R_{WT} y del fragmento que contiene la mutación A280V. El color rojo indica el cambio del nucleótido en el receptor mutado.

Las secuencias de nucleótidos se tradujeron a amino ácidos empleando la aplicación *Translate tool* (*Bioinformatics Resource Portal, ExPASy, SIB Swiss Institute of Bioinformatics*), y las traducciones se compararon con el programa bio-informático *ClustalW2 Multiple Sequence Alignment* (Fig. 17), verificándose que la mutación obtenida resulta en el cambio de un solo aa (Ala → Val).

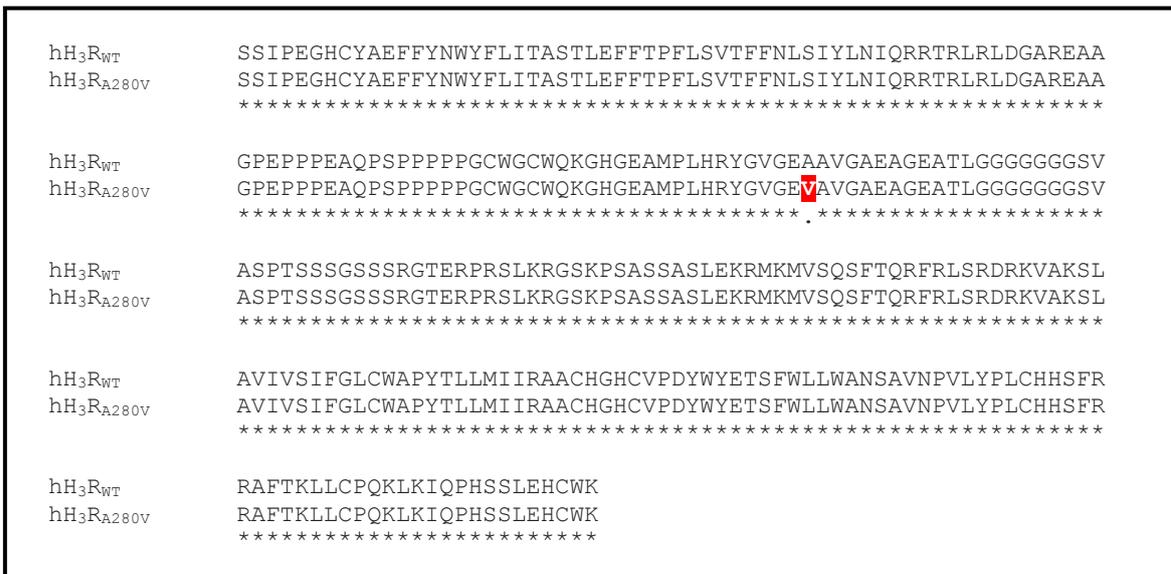


Fig. 17. Alineamiento de las secuencias de amino ácidos de los receptores hH₃R_{WT} y el fragmento de interés de la mutante A280V. La región comparada corresponde a los aminoácidos 181-445. En rojo se indica el cambio del amino ácido Ala por Val.

6.2.2 Expresión de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} en células CHO-K1

La Fig. 18 muestra los niveles de cada receptor al ser expresados de manera estable en las células CHO-K1 transfectadas con los respectivos plásmidos y seleccionadas con geneticina. Los datos ilustran la unión específica de [³H]-NMHA correspondientes a dos transfecciones para cada receptor. La segunda transfección del hH₃R_{WT} y la primera del hH₃R_{A280V} presentaron valores de 163 ± 8 y 153 ± 2 fmol/mg de proteína, respectivamente, sin diferencia significativa entre ellas ($P = 0.33$, prueba *t* de Student). En consecuencia, estas sub-líneas celulares se seleccionaron para los ensayos posteriores.

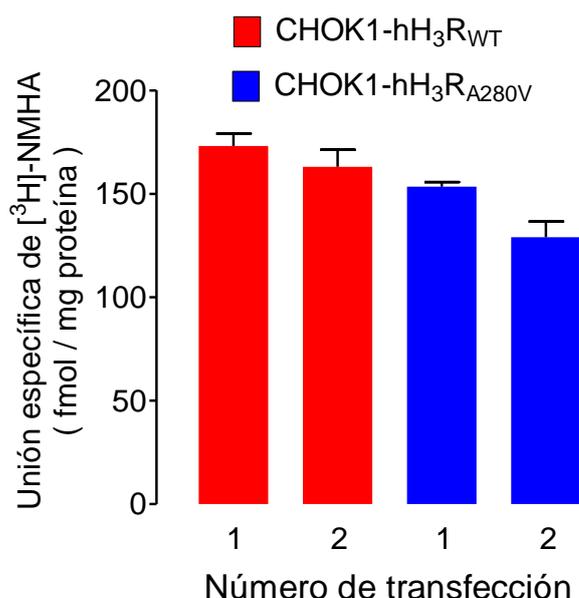


Fig. 18. Unión específica de [³H]-NMHA a membranas de células CHOK1-hH₃R_{WT} y CHOK1-hH₃R_{A280V}. Los valores corresponden a las medias \pm el error estándar (s.e.m.) de 4 replicados. La concentración de [³H]-NMHA fue \sim 5 nM.

6.2.3 Caracterización farmacológica de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} expresados en células CHO-K1

Para la caracterización farmacológica se realizaron ensayos de saturación de la unión de [³H]-NMHA y ensayos de inhibición de dicha unión por ligandos selectivos del H₃R, los agonistas histamina, impropip, imetit y RAMH y los antagonistas/agonistas inversos A331440, ciproxifán, clobenpropit y tioperamida.

6.2.3.1 Ensayos de saturación

La Fig. 19 muestra un experimento representativo de 5 realizados, a partir de los cuales se determinó la unión máxima (B_{max}) y la afinidad (K_d) de los receptores por el radioligando. El análisis de estos experimentos indicó que no existió diferencia significativa en los valores de la B_{max} o de la K_d (Tabla 7).

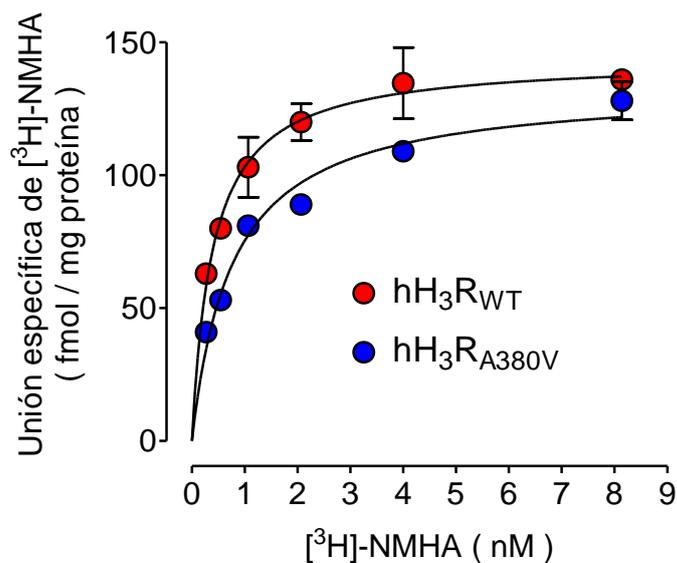


Fig. 19. Saturación de la unión específica de [3H]-NMHA a membranas de células CHO-K1-hH3R_{WT} y CHO-K1-hH3R_{A280V}. Se muestra un experimento representativo de 5 realizados. Los valores son el promedio \pm s.e.m. de determinaciones por triplicado. El análisis estadístico de la unión máxima (B_{max}) y de la constante de disociación (K_d) se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Unión máxima (B_{max}) y constante de disociación (K_d) de los receptores hH3R_{WT} y hH3R_{A280V} expresados en células CHO-K1.

	hH3R _{WT}	hH3R _{A280V}	<i>P</i>
B_{max} (fmol / mg prot.)	203.3 \pm 34.2	173.0 \pm 26.6	0.504
pK_d	9.07 \pm 0.13	9.08 \pm 0.13	0.958
K_d (nM)	0.86	0.83	

Los valores son el promedio \pm s.e.m. de 5 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.2.3.2 Ensayos de inhibición

La Fig. 20 muestra un experimento representativo. Los 8 ligandos analizados, el agonista endógeno histamina, los agonistas sintéticos immapip, imetit y RAMH, y los antagonistas/agonistas inversos A331440, ciproxifán, clobenpropit y tioperamida,

inhibieron la unión de [³H]-NMHA de manera dependiente de la concentración en ambos receptores. La comparación de los valores de p*K*_i indicó que no existen diferencias entre los receptores en su afinidad por los ligandos analizados (Tabla 8).

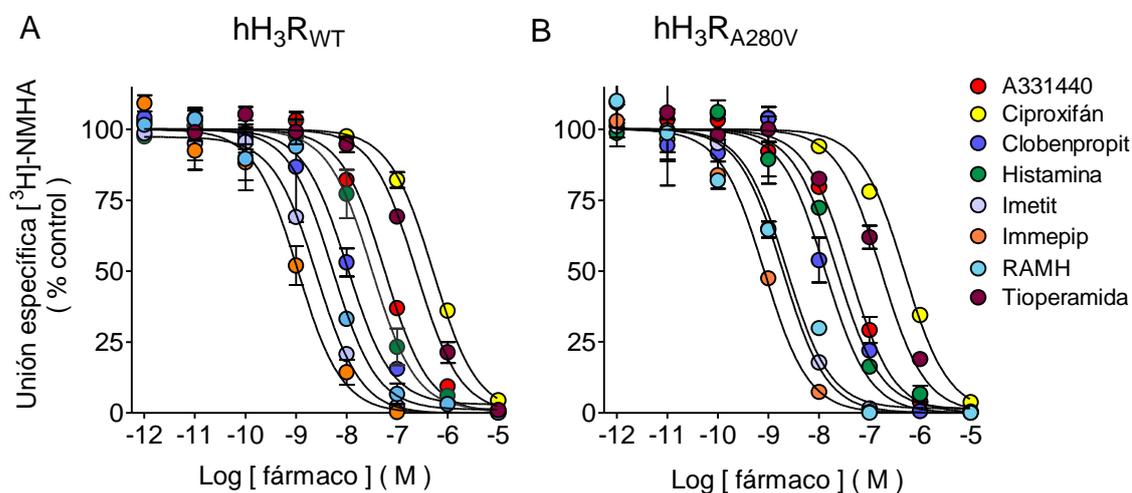


Fig. 20. Inhibición de la unión de [³H]-NMHA por ligandos selectivos del H₃R en membranas de células CHO-K1-hH₃R_{WT} y CHO-K1-H₃R_{A280V}. La unión del radioligando se expresa como porcentaje de la unión control. Los valores son de un experimento representativo y corresponden al promedio ± s.e.m. de determinaciones por triplicado. A) Receptor nativo; B) receptor mutado.

6.2.4 Funcionalidad de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} expresados en células CHO-K1

Para evaluar posibles diferencias en la función de los receptores expresados en las células CHO-K1, se realizaron ensayos de formación de AMPc en células intactas, ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS en membranas celulares y de fosforilación de las cinasas ERK1/2 en extractos celulares.

Tabla 8. Afinidades de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} por ligandos selectivos.

		pK_i				
		Ligando	hH ₃ R _{WT}	hH ₃ R _{A280V}	<i>P</i>	n
Agonistas		histamina	8.30 ± 0.10	8.38 ± 0.12	0.623	4
		immepip	9.51 ± 0.03	9.58 ± 0.01	0.091	3
		imetit	9.23 ± 0.19	9.29 ± 0.05	0.775	3
		RAMH	8.92 ± 0.11	9.05 ± 0.10	0.431	3
Antagonistas/ agonistas inversos		A-331440	7.75 ± 0.04	7.77 ± 0.08	0.834	3
		ciproxifán	7.17 ± 0.04	7.21 ± 0.01	0.729	3
		clobenpropit	8.79 ± 0.08	8.64 ± 0.12	0.329	5
		tioperamida	7.34 ± 0.13	7.37 ± 0.05	0.840	3

Los valores se expresan como pK_i (logaritmo negativo de la constante de inhibición, K_i) y corresponden al promedio ± s.e.m. del número indicado de experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.2.4.1 Ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS en membranas celulares

La Fig. 21 muestra un ensayo representativo de 9 realizados en la que se aprecia que para ambos receptores el agonista RAMH estimuló la unión de [³⁵S]-GTPγS de forma dependiente de la concentración. Sin embargo, el efecto máximo fue menor para el receptor mutado (112.6 ± 2.7 % y 129.2 ± 2.6 % de la basal para los receptores mutado y nativo, respectivamente), con diferencia estadísticamente significativa. En contraste, los valores de la pEC₅₀ (logaritmo negativo de la concentración efectiva media, EC₅₀) no fueron significativamente diferentes, como se indica en la Tabla 9.

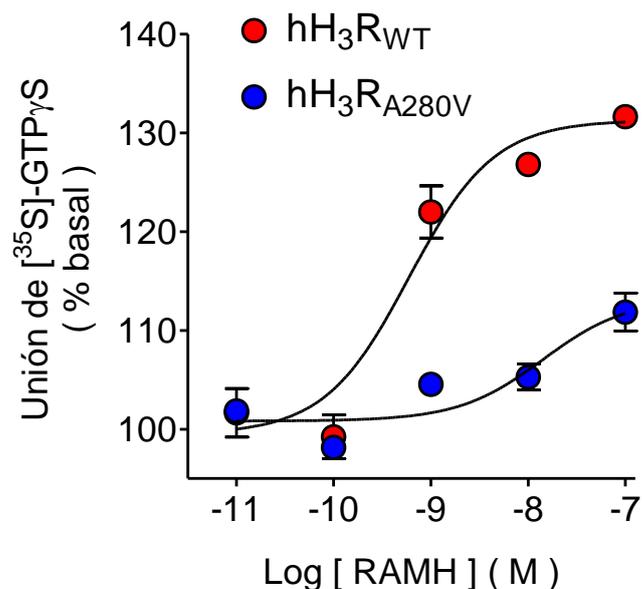


Fig. 21. Estimulación por el agonista RAMH de la unión de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ en membranas de células CHO-K1-hH₃R_{WT} o CHO-K1-hH₃R_{A280V}. Se ilustra un experimento representativo de 9 realizados. Los valores se expresan como porcentaje de la unión basal y corresponden a los promedios \pm s.e.m. de determinaciones por triplicado. El análisis del efecto máximo (E_{max}) y de la concentración efectiva media (EC_{50}) se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis del efecto del agonista RAMH en la unión de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ en membranas de células CHO-K1- hH₃R_{WT} o CHO-K1-hH₃R_{A280V}.

	hH ₃ R _{WT}	hH ₃ R _{A280V}	<i>P</i>
E_{max}	129.2 \pm 2.6 %	112.6 \pm 2.7 %	0.001
pEC ₅₀	8.50 \pm 0.14	9.00 \pm 0.32	0.174
EC ₅₀ (nM)	3.16	1.00	

Los valores son los promedios \pm s.e.m. de 9 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.2.4.2 Ensayos de formación de AMPc

La Fig. 22 muestra un experimento representativo de 4 realizados. Al ser activados por el agonista RAMH, tanto el receptor nativo como el mutado inhibieron la formación de

AMPC inducida por la forskolina, y en ambos casos el efecto dependió de la concentración del fármaco. Sin embargo, para el hH₃R_{A280V} la inhibición máxima (I_{max}) fue menor en comparación con el hH₃R_{WT} ($57.2 \pm 8.4 \%$ y $93.9 \pm 2.6 \%$, respectivamente). En contraste, no existió diferencia significativa en la concentración inhibitoria media, expresada como logaritmo negativo de la misma (pIC_{50}), como se muestra en la Tabla 10.

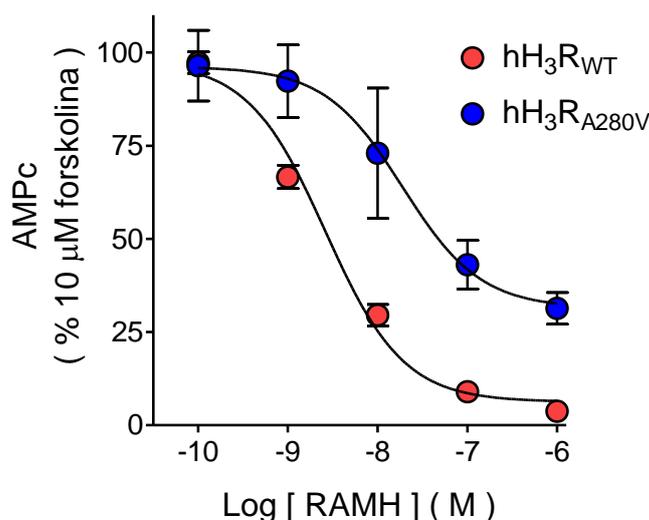


Fig. 22. Inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina por activación de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} con el agonista RAMH. Se muestra un experimento representativo, repetido tres veces más con resultados similares. Los valores se expresan como porcentaje de la formación de AMPc inducida por 10 μ M de forskolina, después de sustraer el valor de la formación basal, y son el promedio \pm s.e.m. de 3-4 replicados. El análisis de la inhibición máxima (I_{max}) y de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Inhibición máxima (I_{max}) y concentración inhibitoria media (IC_{50}) para la inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina por activación de los receptores hH₃R_{WT} o hH₃R_{A280V} expresados en células CHO-K1.

	hH ₃ R _{WT}	hH ₃ R _{A280V}	<i>P</i>
I_{max}	$93.9 \pm 2.6 \%$	$57.2 \pm 8.4 \%$	0.006
pIC_{50}	8.22 ± 0.35	7.77 ± 0.05	0.232
IC_{50} (nM)	6.03	17.78	

Los valores de I_{max} y pIC_{50} (logaritmo negativo de la concentración inhibitoria media, pIC_{50}) son el promedio \pm s.e.m. de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.2.4.3 Inmunodetección de la fosforilación de ERK-1/2

La Fig. 23 muestra el curso temporal de la fosforilación de ERK-1/2. La activación de los receptores nativo y hH₃R_{A280V} con el agonista RAMH (100 nM) indujo la fosforilación de ERK-1/2, con un patrón temporal similar. Para las curvas concentración-respuesta se seleccionó un tiempo de 5 min. La Fig. 24 muestra que el efecto máximo del receptor mutado es menor con respecto al receptor nativo. En contraste los valores de pEC₅₀ no fueron estadísticamente diferentes (Tabla 11).

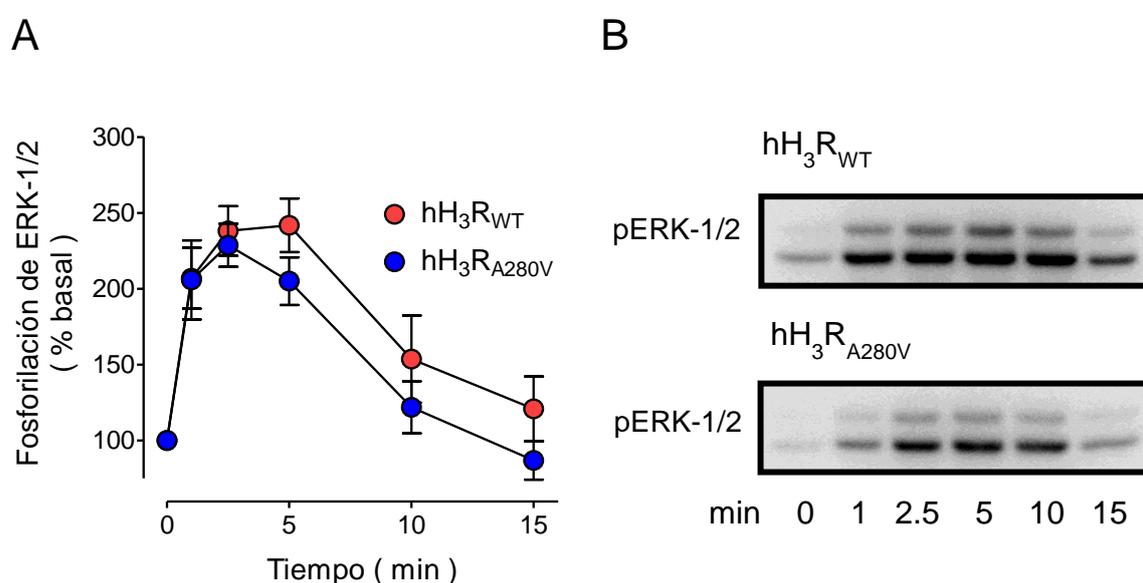


Fig. 23. Curso temporal de la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V}. A. Curso temporal de la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación de los receptores nativo y mutado con el agonista RAMH. Los valores se expresan como porcentaje de la fosforilación basal y son el promedio \pm desviación de 2 experimentos. B. Imágenes representativas de la inmunodetección. Las cinasas ERK-1/2 fosforiladas se indican como pERK-1/2.

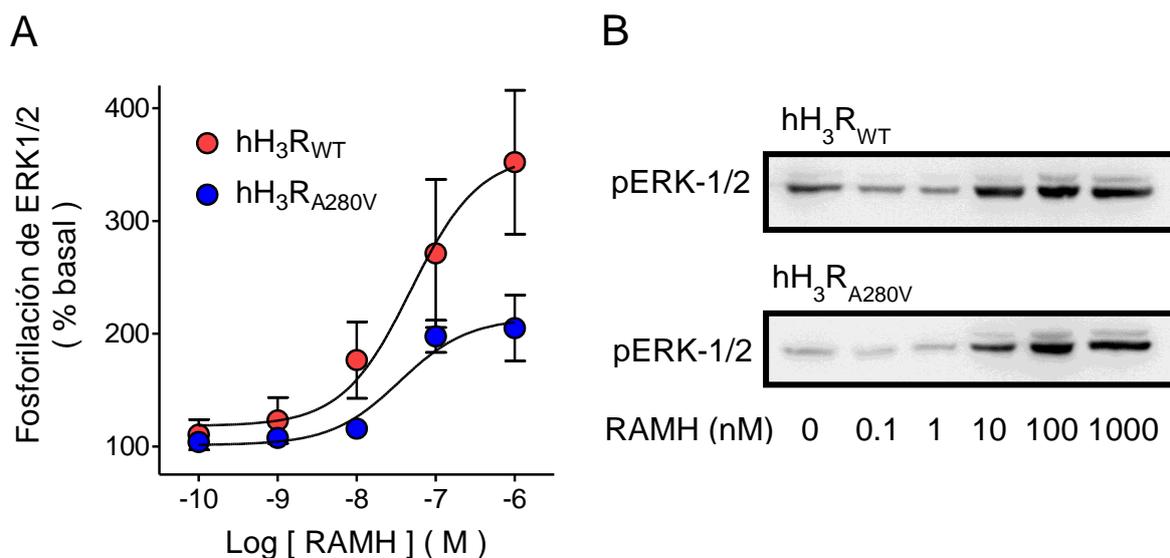


Fig. 24. Curva concentración-respuesta de la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V}. **A.** Curva concentración-respuesta del efecto del agonista RAMH. Los valores se expresan como porcentaje de la fosforilación basal y son el promedio \pm s.e.m de 4 determinaciones independientes. **B.** Imágenes representativas de la inmunodetección. Las cinasas ERK-1/2 fosforiladas se indican como pERK-1/2. El análisis estadístico del efecto máximo (E_{max}) y de la concentración efectiva media (EC_{50}) se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis de la fosforilación de las cinasas ERK-1/2 inducida por la activación de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V}.

	hH ₃ R _{WT}	hH ₃ R _{A280V}	<i>P</i>
E_{max}	359 \pm 51 %	214 \pm 16 %	0.034
pEC ₅₀	7.31 \pm 0.46	7.46 \pm 0.34	0.802
EC ₅₀ (nM)	48.9	34.6	

Los valores corresponden a los promedios \pm s.e.m. de 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba *t* de Student.

6.2.5 Evaluación de la actividad constitutiva de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} expresados en células CHO-K1

El término actividad constitutiva se refiere a la activación del receptor en ausencia de un agonista, debido a la adopción espontánea de una conformación activa. El H₃R puede exhibir actividad espontánea, indicada por la reducción de la unión basal de [³⁵S]-GTPγS inducida por agonistas inversos [20, 103, 104].

Para evaluar la actividad constitutiva de los receptores nativo y mutado expresados en las células CHO-K1 se realizaron ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS y de acumulación de AMPc, empleando agonistas inversos selectivos del hH₃R (ciproxifán, A-331440, clobenpropit y tioperamida).

6.2.5.1 Ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS a membranas celulares

La Fig. 25 muestra que para ambas sub-líneas celulares la unión de [³⁵S]-GTPγS fue inhibida de manera dependiente de la concentración por el agonista inverso ciproxifán. El efecto fue modesto, pero se puede apreciar una menor inhibición con el hH₃R_{A280V} con respecto al receptor nativo (Tabla 12).

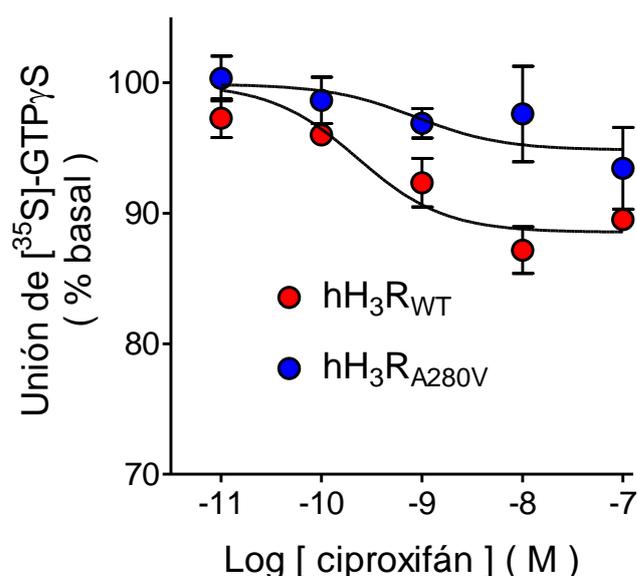


Fig. 25. Inhibición por el agonista inverso ciproxifán de la unión basal de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ en membranas de células CHO-K1-hH₃R_{WT} y CHO-K1-hH₃R_{A280V}. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados. El análisis de la inhibición máximo (I_{max}) y de la concentración inhibitoria media (pIC_{50}) se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis del efecto del agonista inverso ciproxifán en la unión de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ a membranas de células CHO-K1-hH₃R_{WT} y CHO-K1-hH₃R_{A280V}.

	hH ₃ R _{WT}	hH ₃ R _{A280V}	<i>P</i>
I_{max}	12.0 ± 0.3 %	5.9 ± 0.6 %	0.001
pIC_{50}	9.06 ± 0.45	9.09 ± 0.73	0.978
IC_{50} (nM)	0.87	0.81	

Los valores corresponden a las medias ± s.e.m. de 4 experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

6.2.5.2 Ensayos de acumulación de AMPc

Para estos ensayos se determinó la concentración de forskolina que permitiera determinar la posible actividad constitutiva de los receptores. La Fig. 26 corresponde a un ensayo representativo, advirtiéndose que tanto en células CHO-K1 parentales como las

transfectadas con el hH₃R_{WT} la acumulación del segundo mensajero es lineal en el rango de las concentraciones de forskolina analizado (1-30 μ M). Con base en este resultado se decidió utilizar una concentración de 3 μ M de forskolina en las determinaciones posteriores.

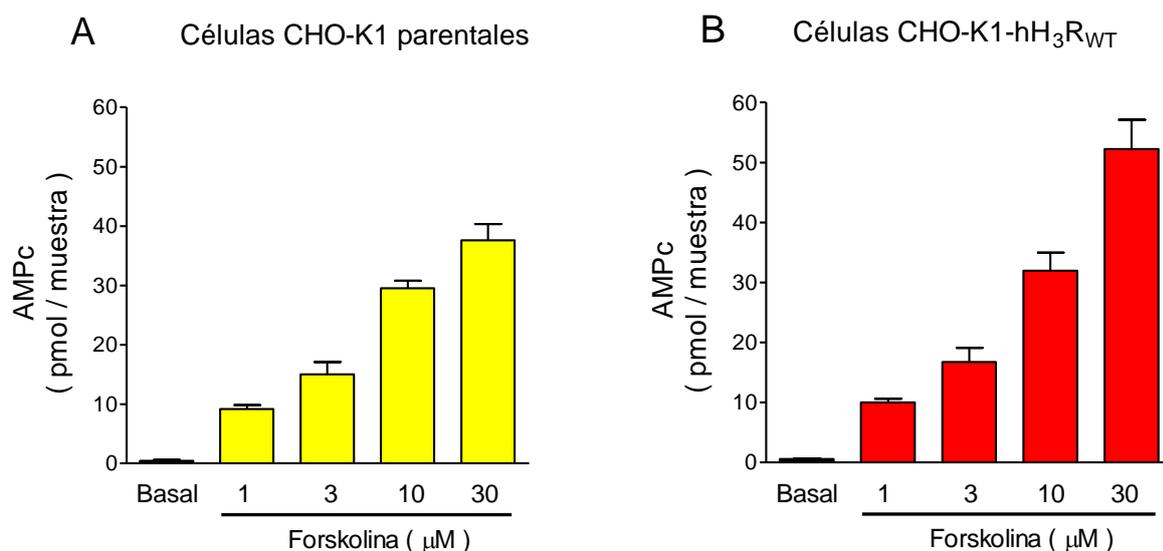


Fig. 26. Acumulación de AMPc inducida por concentraciones crecientes de forskolina en células CHO-K1 parentales y transfectadas con el hH₃R_{WT}. A) Células parentales; B) Células transfectadas. Los valores son los promedios \pm s.e.m. de determinaciones por cuadruplicado de un experimento representativo, repetido 3 veces con resultados similares.

La Fig. 27 muestra el efecto de agonistas inversos selectivos del hH₃R en la acumulación de AMPc inducida por forskolina (3 μ M), en células CHO-K1-hH₃R_{WT} o CHOK1-hH₃R_{A280V}. Se utilizaron concentraciones de 0.1 y 1 μ M de los agonistas inversos A331440, clobenpropit y tioperamida. Se observó efecto de agonismo inverso con 1 μ M de A331440, clobenpropit y tioperamida. Se observó efecto de agonismo inverso con 1 μ M de A331440 para el receptor nativo; sin embargo, este efecto no se observó con ninguno de los otros ligandos evaluados, y tampoco se advirtió un efecto significativo para el receptor mutado, como lo indica el análisis estadístico presentado en la Tabla 13.

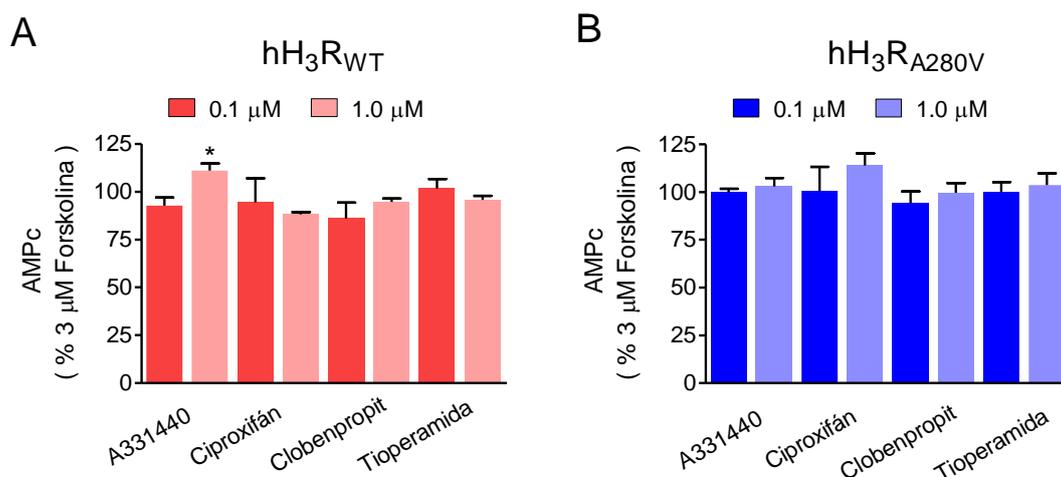


Fig. 27. Efecto de agonistas inversos en la acumulación de AMPc inducida por forskolina en células CHO-K1-hH₃R_{WT} y CHO-K1-hH₃R_{A280V}. Efecto de 0.1 y 1.0 μM de agonistas inversos en la acumulación de AMPc para el receptor nativo y mutado (A y B, respectivamente). Se muestran los promedios ± s.e.m. de 3-4 ensayos realizados con 3 μM de forskolina. El análisis estadístico se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Análisis del efecto de agonistas inversos selectivos en la formación de AMPc inducida por forskolina en células CHOK1-hH₃R_{WT} o CHOK1-hH₃R_{A280V}.

	hH ₃ R _{WT}	<i>P</i>	hH ₃ R _{A280V}	<i>P</i>
Forskolina	100 %		100 %	
A-331440	111.2 ± 3.7 %	< 0.05	103.1 ± 4.4 %	> 0.05
ciproxifán	88.2 ± 1.4 %	< 0.05	113.9 ± 6.3 %	> 0.05
clobenpropit	94.7 ± 1.8 %	> 0.05	99.8 ± 5.1 %	> 0.05
tioperamida	95.8 ± 2.0 %	> 0.05	103.7 ± 6.2 %	> 0.05

La concentración de los fármacos fue 1 μM. Los valores se expresan como porcentaje de la formación de AMPc inducida por forskolina (3 μM) y son los promedios ± s.e.m. de 3-4 experimentos. La comparación estadística se realizó con análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Dunnett.

7. Discusión

Los H₃Rs se encuentran involucrados en diferentes procesos fisiológicos y patológicos del Sistema Nervioso de los mamíferos, modulando la liberación de la propia histamina y de varios neurotransmisores, específicamente acetilcolina, noradrenalina, serotonina, dopamina, GABA, glutamato y neuropéptidos.

La conjunción de técnicas de Biología Molecular y de Farmacología ha permitido estudiar con detalle las características farmacológicas del H₃R, determinar las variantes expresadas y establecer sus propiedades funcionales [13-15, 18], además de identificar la presencia de cinco mutaciones puntuales que ocurren de manera natural en el receptor humano de 445 aa (E19D, Y197C, A280V, rs3787429 y rs3787430) [11, 16, 23, 24]. El polimorfismo A280V ha sido asociado con el síndrome de Shy-Drager y la predisposición a migraña, y la presencia de los SNPs rs3787429 y rs3787430 mejora la respuesta al tratamiento con risperidona en pacientes chinos con esquizofrenia [23, 24, 86].

En este trabajo se evaluó el efecto de las mutaciones Y197C y A280V en las propiedades farmacológicas y funcionales del H₃R humano de 445 aa (hH₃R₄₄₅). Los hallazgos más importantes fueron que la mutación Y197C no modifica la expresión celular o la localización en la membrana citoplasmática, como tampoco la afinidad por ligandos selectivos o la eficacia del receptor para activar vías de señalización. En contraste, la mutación A280V no modifica la expresión del receptor, pero disminuye significativamente la eficacia de señalización, sin modificar la afinidad por ligandos selectivos.

7.1 Mutación Y197C en el hH₃R₄₄₅

Mutaciones puntuales en los GPCRs pueden inducir ganancia o pérdida significativas de la función del receptor, que a su vez pueden asociarse a patologías, como se ha descrito por ejemplo para la rodopsina, los adrenoceptores α y β , el receptor a melanocortina tipo 4, y el receptor a vasopresina tipo 2. Las mutaciones se presentan en diferentes regiones del receptor y su impacto depende de la localización y de la naturaleza de los aa involucrados. El cambio de un residuo de aa en la secuencia de un receptor puede modificar su expresión o distribución en la membrana celular, la conformación de la proteína y su interacción con el ligando, teniendo como consecuencia alteraciones en la señalización del receptor [105].

7.1.1 La mutación Y197C no afecta la localización del hH₃R en la membrana citoplasmática de las células CHO-K1

En más del 90 % de los GPCRs se encuentran residuos de Cys altamente conservados en las asas extracelulares que forman enlaces disulfuro entre ellos, como e1-e2, e1-e3 y e2-e3, o entre e2 y la región amino terminal de TM3. En algunos casos se forma más de un enlace disulfuro e incluso se establecen enlaces entre los residuos de Cys de una misma asa extracelular, como se ha observado en los receptores para el factor de liberación de corticotropina tipo 1, angiotensina tipo 1 y adenosina A_{2A} [106-109]. En los GPCRs tipo rodopsina o de la clase A, se conserva un enlace disulfuro entre las asas e1 y e2 que es crítico para el plegamiento correcto de los receptores, el tráfico a la membrana citoplasmática y su funcionalidad [110].

En el H₃R de diferentes especies se encuentran dos residuos de Cys conservados, uno en el asa e1 y un segundo en el asa e2. Aunque es probable que establezcan un enlace disulfuro, esto no ha sido probado. En el caso particular del hH₃R₄₄₅, sería factible que el enlace

disulfuro se formara entre las Cys 107 y 188, localizadas en las asas e1 y e2, respectivamente.

Mutaciones en los residuos de Cys presentes en las regiones transmembranales o en las asas extracelulares pueden modificar significativamente la expresión del receptor o el tráfico a la membrana celular, como se ha mostrado para el receptor muscarínico M₃, en el que la mutación Y166C en la región C-terminal del TM3 disminuye significativamente la expresión del receptor [111], así como para el receptor a melanocortina tipo 4, en el que la mutación C241R en el asa e3 disminuye la expresión membranar del receptor [99].

Al presentarse la mutación Y197C en la región N-terminal del TM5 del hH₃R₄₄₅ (Fig. 2) podría prevenirse la formación del enlace disulfuro entre los residuos conservados Cys107 y Cys188 y formarse enlaces disulfuro anómalos entre estos residuos y el nuevo residuo de Cys, como ocurre en el receptor a melanocortina tipo 4, en el que la mutación C241R previene la formación del enlace disulfuro entre las Cys241 y Cys277 y origina un enlace disulfuro anómalo entre los residuos Cys277 y Cys279, conduciendo a la disminución en la expresión de la proteína y de su transporte a la membrana plasmática. Sin embargo, los ensayos de unión de radioligando en membranas totales y en célula intacta mostraron niveles de expresión semejantes para los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C} (Fig. 3 y Tabla 3). Resultados similares se han reportado para el receptor opioide μ humano, en el que la interrupción del enlace disulfuro entre los residuos Cys142 y Cys219, localizados en las asas e2 y e3, respectivamente, no previno el transporte del receptor a la membrana citoplasmática [112].

En este sentido, los resultados de esta tesis indican que la mutación Y197C no modifica la expresión del hH₃R ni su localización en la membrana citoplasmática.

7.1.2 La mutación Y197C no afecta la unión de ligandos al hH₃R

La formación del enlace disulfuro entre las asas e1 y e2 es crítica para mantener a los GPCRs en un estado conformacional de alta afinidad, ya que induce rigidez y evita que el receptor fluctúe entre varios estados conformacionales. En consecuencia, la interrupción del enlace disulfuro puede afectar la afinidad de los GPCRs por ligandos selectivos [112, 113].

Los dominios TM3, TM5-TM7 forman la cesta de unión (*binding pocket*) del ligando en diversos GPCRs, y por lo tanto mutaciones en los aa conservados de estas regiones afectan significativamente la interacción con ligandos selectivos [114, 115]. En el hH₃R la cesta de unión del ligando se forma entre cinco regiones transmembranales (TM1, TM3, TM5-TM7). Los residuos Asp114 en TM3, Tyr115 en TM3, Glu206 en TM5, Tyr374 en TM6 y Phe394 en TM7, son cruciales para la unión con el ligando [95, 116]. El residuo Glu206 se encuentra conservado en los receptores H₃ y H₄, y es el responsable de la alta afinidad (K_i 10-20 nM) por la histamina, el ligando endógeno, en comparación con los receptores H₁ y H₂ (K_i 0.1-1 μ M). De manera interesante, existen diferencias farmacológicas importantes entre los receptores del humano y de la rata, debidas a un doble cambio en los residuos 119 y 122 localizados en la proximidad del residuo Asp114, crítico para la unión de la histamina. El H₃R humano posee los residuos Thr119 y Val122, mientras que los receptores de los roedores, con excepción del cobayo, poseen los residuos Ala119 y Val122 [117].

La interacción del ligando con el TM5 del receptor es crítica, y los residuos Tyr197 y Leu199 se conservan en los receptores a histamina H₂-H₄, y los amino ácidos Phe207, Pro210 e Ile221 se encuentran conservados en los cuatro tipos de receptores a histamina [95]. En este trabajo se evaluó el efecto de la mutación Y197C en las propiedades

farmacológicas del hH₃R bajo la hipótesis que la sustitución del residuo de Tyr por uno de Cys en la región límite entre el asa e2 y el TM5 podría inducir la formación de nuevos enlaces disulfuro entre la Cys107 y la Cys188, localizadas en las asas e1 y e2, con el nuevo residuo Cys197, afectando la afinidad del receptor por ligandos selectivos al modificar su estado conformacional.

Las mutaciones W196A, A202Q, T204A, E206A y F208A disminuyen significativamente la afinidad del hH₃R por agonistas, incluyendo a la histamina. En particular, la mutación E206A reduce la afinidad por histamina, RAMH, imetit e impentamina hasta por tres órdenes de magnitud [95]. Sin embargo, en nuestro estudio los ensayos de inhibición de unión de radioligando mostraron afinidades similares de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C} por el agonista [³H]-NMHA, el agonista endógeno histamina, los agonistas sintéticos immepip y RAMH y los antagonistas/agonistas inversos ciproxifán y clobenpropit (Tabla 4). Además, los valores de afinidad de ambos receptores son semejantes a las reportadas en la literatura para el hH₃R nativo [14, 22, 118].

En conjunto, estos resultados indican que el aminoácido Y197 no participa en la interacción del hH₃R con el ligando y que la aparición de un residuo de Cys no modifica el estado conformacional que el receptor adquiere, antes o después de la unión con el ligando selectivo. También indican que el residuo Y197 no es crítico para el plegamiento del receptor durante su síntesis y que el residuo de Cys introducido por la mutación Y197C en esta región no interacciona con los residuos de Cys conservados presentes en las asas e1 y e2, o bien con otros residuos de Cys presentes en las regiones transmembranales del receptor.

7.1.3 Efecto de la mutación Y197C en la funcionalidad del receptor hH₃R₄₄₅

Como se ha mencionado, la interrupción de un enlace disulfuro puede modificar la expresión del receptor y/o su afinidad por ligandos selectivos, y por consecuencia la función del receptor [99, 111, 112]. Por ejemplo, en el receptor a melanocortina 4 humano la aparición de un enlace disulfuro anómalo reduce la eficacia para desencadenar las vías de señalización a las que se encuentra acoplado el receptor [99].

Las siete regiones transmembranales constituyen el núcleo de los GPCRs, y los cambios conformacionales en este núcleo modifican la interacción del receptor con la proteína G. La transición de un estado inactivo a un estado activo del receptor está asociada con los cambios en la orientación de TM1, TM3 y TM5-TM7 y en consecuencia en la interacción molecular con otros TMs, por lo que una mutación puntual en cualquiera de estas regiones puede afectar la función de la proteína receptora [119]. En este contexto, estudios previos han mostrado que mutaciones en el residuo Asp114 (localizado en TM3) conducen a la pérdida de la función del hH₃R, mientras que las mutaciones L199A, I200A y E206A (localizadas en el TM5) reducen su eficacia de señalización [95, 120].

La mutación Y197C podría haber modificado la señalización del receptor debido a la formación de enlaces disulfuro anómalos con los residuos de Cys localizados en las asas e1 y e2 o bien en las regiones transmembranales, induciendo así cambios conformacionales en el núcleo de la proteína. En este caso, la mutación no necesariamente modificaría la expresión del receptor o la afinidad del mismo por ligandos, ya que el efecto podría ejercerse en la dinámica de las regiones transmembranales para activar a las proteínas G. En este sentido, la mutación Y197A no disminuyó la eficacia del hH₃R para inhibir la formación de AMPc (95 % del efecto del receptor nativo), pero aumentó 2.5 veces la potencia de la histamina. La mutación W196A, en el residuo adjunto a Tyr197, disminuye

de manera modesta la eficacia del receptor para inhibir la formación de AMPc (90 % del efecto del receptor nativo) pero aumenta en 4.6 veces la potencia de la histamina [95].

Por lo anterior, se evaluó también el efecto funcional de la mutación Y197C en el hH₃R. Como se ha mencionado, una de las principales vías de señalización desencadenadas por la activación del H₃R, mediada por la subunidad G_{αi/o}, es la inhibición en la formación de AMPc. Los resultados obtenidos muestran que el hH₃R_{Y197C} inhibe la formación de AMPc de manera similar al hH₃R_{WT} (Tabla 6 y Fig. 10). A pesar de la tendencia a una mayor potencia del agonista RAMH en el receptor mutado, la diferencia no fue significativa, en concordancia con la similitud de las afinidades determinadas para este ligando en los ensayos de unión de radioligando (Tabla 4).

El efecto observado en la formación de AMPc se confirmó en los ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS a membranas celulares, los cuales permitieron evaluar de manera más directa la activación de las proteínas G_{αi/o} acopladas a los receptores. Los resultados de estos ensayos mostraron que la eficacia del hH₃R_{Y197C} para activar a las proteínas G_{αi/o} es similar a la del receptor nativo (Tabla 5). Además, la potencia del agonista RAMH para activar a los receptores nativo y mutado es semejante, en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la unión de radioligando y de formación de AMPc.

A pesar de los altos niveles de expresión para los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{Y197C} (761 ± 78 y 663 ± 66 fmol/mg proteína, respectivamente; Tabla 6), su eficacia para inhibir la formación de AMPc fue relativamente baja (-33.3 ± 3.9 % y -33.1 ± 4.7 % del control, respectivamente), con condiciones experimentales similares a las utilizadas en los experimentos con la mutación A280V del receptor en la segunda parte de la tesis. Una explicación factible sería que dados los niveles de expresión de los receptores, sólo una

sub-población de los mismos se exprese en la membrana celular y que incluso sólo una fracción de estos receptores se acople a las proteínas $G\alpha_{i/o}$.

En conjunto, nuestros resultados indican que la mutación Y197C en el receptor hH_3R_{445} no modifica la eficacia de señalización del receptor ni afecta la potencia del agonista, y sugieren también que el residuo Tyr197 no participa en el acople y/o activación de la proteína G. Lo anterior puede deberse a que la mutación se encuentra en la región amino del TM5, con una función importante en la unión del ligando pero no en el acople con la proteína G. Por otra parte, la similitud en la potencia del agonista para activar ambos receptores sugiere que el residuo Tyr197 no participa directamente en la unión de ligando y que la sustitución por un residuo de Cys no altera la conformación del TM5 del receptor a pesar de la diferencia en tamaño de los grupos laterales ($C_9H_{11}NO_3$ y $C_3H_7NO_2S$ para Tyr y Cys, respectivamente).

7.2 Mutación A280V en el receptor a histamina H_3 de 445 aa humano

En la segunda parte de este trabajo se estudió el efecto de la mutación A280V en la función y las propiedades farmacológicas del hH_3R .

La unión de un agonista a un GPCR induce cambios conformacionales en las asas i2 e i3, regiones que junto con el dominio C-terminal del receptor son los principales sitios de interacción y reconocimiento de la proteína G [121, 122]. Además, mutaciones en las asas i1-i3 y el extremo carboxilo de los GPCRs pueden modificar el tráfico a la membrana citoplasmática, la afinidad por ligando o el acople a proteínas G [123-125]. De manera relevante, los polimorfismos en esas regiones se han asociado a alteraciones neurológicas o psiquiátricas como la esquizofrenia, el alcoholismo, la migraña, el síndrome de Shy- Drager, el hipogonadismo y el síndrome de Kallmann, entre otras [23, 86, 126, 127].

En particular, la mutación A280V en el hH₃R se ha relacionado con predisposición a la migraña y el síndrome de Shy Drager [23, 86].

7.2.1 Expresión del hH₃R_{A280V} en células CHO-K1

Las mutaciones en el asa i3 pueden alterar el tráfico a la membrana celular de algunos GPCRs, como el receptor a prokenitina tipo 2 (PROKR2) [123], o modificar la afinidad por el ligando, como se ha reportado para el receptor a dopamina D₂ [128]. En el H₃R del ratón la mutación A357K, localizada en el asa i3, reduce la expresión del receptor [21]. Sin embargo, en otro receptor acoplado a proteínas G $\alpha_{i/o}$, el receptor GABA_B tipo 2, la mutación L686P no alteró su expresión [129].

La hipótesis de esta parte de la tesis fue que dada su localización en el asa i3, el efecto de la mutación A280V se ejercería en la señalización del receptor y no en su expresión o en la unión de ligandos. Por ello, se obtuvieron células CHO-K1 con expresión estable de los receptores nativo y mutante, y se seleccionaron sub-líneas con niveles de expresión similares (Tabla 7), con el propósito de analizar las posibles diferencias funcionales sin influencia de los niveles de expresión de las proteínas receptoras.

7.2.2 La mutación A280V no afecta la unión de ligandos al hH₃R

Cambios en la secuencia de aminoácidos en el asa i3 pueden modificar la afinidad del receptor por ligandos selectivos, como se ha observado en los receptores humanos GABA_B y a tirotrina [129, 130]. Además, en un mismo receptor los efectos en la afinidad inducidos por mutaciones en residuos cercanos pueden ser diferentes como ocurre en el receptor D₂, en el que la mutación S311C disminuye la afinidad por dopamina pero la mutación P310S no la modifica [128, 131].

Por lo anterior, fue importante determinar si la mutación A280V en el hH₃R alteraba la afinidad del receptor por ligandos selectivos. Los ensayos de inhibición de la unión de radioligando mostraron que las afinidades de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} por una serie relativamente amplia de agonistas y antagonistas/agonistas inversos fueron similares (Tablas 7 y 8). Además, las afinidades de ambos receptores son semejantes a las reportadas en la literatura para el hH₃R₄₄₅ [14, 22, 118]. En concordancia con estos resultados, la mutación A357K en el asa i3 del receptor H₃R del ratón no modifica la afinidad por los agonistas histamina, *N*- α -metil-histamina, imetit y proxifan [21]. Resultados semejantes se han observado para los receptores humanos D₂ y a la hormona estimuladora del folículo (FSH) [128, 132].

Nuestros datos mostraron que la mutación A280V no modifica la afinidad del hH₃R por sus ligandos selectivos. Lo anterior indica que el amino ácido A280 no participa críticamente en la interacción con el ligando al localizarse en la parte central del asa i3 y no en las regiones donde se une el ligando con el receptor (dominios transmembranales TM1, TM3, TM5-TM7), en las que una mutación puntual genera especificidad de especie o cambios marcados en la afinidad por ligandos [95, 116, 117].

7.2.3 Efecto de la mutación A280V en la funcionalidad del receptor hH₃R₄₄₅

La eficacia de un GPCR para activar vías de señalización se afecta sustancialmente cuando ocurren mutaciones en las asas i2 e i3 y en el dominio C-terminal del receptor [123-125, 129-132].

El dominio BBXXB o BXXBB, donde B indica un residuo básico y X cualquier aminoácido, tiene una función crítica en la unión del receptor con la proteína G. Este dominio puede encontrarse en las asas intracelulares o el dominio C-terminal de los

GPCRs, y mutaciones puntuales en este dominio localizado en el dominio C-terminal del asa i3 modifican la expresión del receptor y reducen la eficacia de activación de las proteínas G, como se ha reportado para los receptores humanos PROKR2 y a FSH [123, 132].

En el PROKR2 la mutación de 2 grupos de residuos básicos originó diferentes efectos. La eliminación de la secuencia RRK (residuos 270-272) resultó en la expresión nula del receptor en la superficie celular, mientras que la eliminación de la secuencia RKR (residuos 264-266) no afectó la expresión del receptor en la superficie celular, pero abolió la funcionalidad del mismo por desacople con la proteína G [123]. En el receptor a FSH humano la mutación por Ala de los tres aa básicos de un dominio BXXBB localizado en el dominio C-terminal previno la unión del agonista, pero las mutaciones individuales R552A o R556A disminuyeron de manera importante la señalización del receptor sin afectar la unión del ligando [132].

El receptor hH₃R₄₄₅ contiene 2 motivos BBXXB, el primero corresponde a la secuencia KRGSK (en la región intermedia del asa i3, aa 321-325) y el segundo a la secuencia RRVAK (C-terminal del i3, aa 354-358). Sin embargo, las mutaciones en el asa i3 o en la región C-terminal de los GPCRs que modifican la función del receptor no necesariamente se localizan en dominios BXXBB, como se ha observado para los receptores humanos D₂ y D₅ [128, 133]. La forma prevalente del receptor D₂ contiene los residuos Pro310 y Ser311, y las variantes Cys311 y Ser310 fueron menos eficaces para inhibir la formación de AMPc, mientras que una disminución modesta (dos veces) en la afinidad se observó para la variante Cys311 pero no para la variante Ser310 [128].

Los antecedentes llevaron a postular que dado que la mutación A280V se encuentra en el asa i3 del hH₃R, podría modificar la interacción del receptor con las proteínas G y por tanto su señalización.

Al evaluar el efecto de la mutación A280V en una de las principales vías de señalización del H₃R, se observó que el hH₃R_{A280V} fue menos eficaz que el hH₃R_{WT} para inhibir la formación de AMPc (Tabla 10), efecto debido a la interacción de las subunidades con las isoformas 1, 3, 5, 6 y 8 de las adenilil ciclasas [27]. Los ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS a membranas celulares, que evalúan la activación de proteínas G, indicaron también una menor eficacia del hH₃R_{A280V} para activar proteínas G_{αi/o} en comparación con el receptor nativo (Tabla 9). Por otra parte, no se observaron diferencias en la potencia de la RAMH para ambos receptores, en concordancia con los ensayos de formación de AMPc y los de inhibición de la unión de radioligando (Tablas 8 y 9).

Los ensayos de inmunodetección de la fosforilación de las cinasas ERK-1/2 permitieron evaluar una vía de activación alterna a la desencadenada por la subunidad G_{αi/o} de las proteínas G, mediada por los dímeros Gβγ, y en concordancia con los otros resultados funcionales el hH₃R_{A280V} estimuló con menor eficacia la fosforilación de las ERK-1/2 en comparación con el receptor nativo, sin diferencia significativa en la potencia del agonista RAMH para desencadenar la respuesta (Tabla 11).

En el curso temporal para ambos receptores se observó una rápida activación de la fosforilación de las cinasas ERK-1/2, con un pico máximo a los 5 min y una desactivación rápida, regresando a los niveles basales en ~10 min. Este patrón es característico de la activación mediada por proteínas G, ya sea por los complejos Gβγ o por estimulación de las cinasas PKC y PKA. En contraste, la fosforilación de ERK-1/2 debida a las proteínas β-arrestinas muestra un pico máximo después de 10 min y se desactiva después de 30 min

[134, 135]. De manera relevante, se ha mostrado que las cinasas ERK-1/2 fosforiladas mediante la activación de proteínas G se traslocan al núcleo, mientras que las cinasas fosforiladas en respuesta a la unión de β -arrestinas a receptores activos permanecen en el citosol [135].

Los ensayos funcionales mostraron que la mutación A280V disminuye la eficacia del receptor para activar vías de señalización, lo que sugiere que el residuo Ala280 se encuentra en una región crítica para el acople del receptor con proteínas $G\alpha_{i/o}$ y la activación de éstas. Una menor eficacia de señalización se reportó para la isoforma del receptor de 365 aa (80 residuos menos en el asa i3) [22], en el que de manera relevante el residuo Ala280 se encuentra en la región que se excluye de dicha isoforma, lo que apoya que la mutación A280V se localiza en una región crítica para la unión y activación de las proteínas $G\alpha_{i/o}$.

Una explicación a los efectos funcionales observados por la mutación A280V en el hH₃R es que la sustitución del residuo de Ala por uno de Val si bien no modifica la carga eléctrica del residuo sí introduce un grupo lateral de mayor peso molecular (71.1 y 99.1 Da para Ala y Val, respectivamente) y de mayor volumen (0.067 y 0.105 nm³, respectivamente), lo que podría generar un impedimento estérico para la activación de la proteína G.

Un evento parecido se reporta para las mutaciones S311C en el receptor D₂ y L686P y L686S en el receptor GABA_B, presentes en el asa i3, y que disminuyen la eficacia del receptor para activar vías de señalización sin cambios en la potencia del agonista [128, 129, 131]. Estas mutaciones no modifican la carga eléctrica, pero sí el tamaño del aa (a excepción de la mutación S311C). En relación a este aspecto, el modelo molecular del receptor D₂ indica que el aa Ser311 no interactúa directamente con la proteína G aunque el

residuo Cys311 sí lo hace, disminuyendo la eficacia en la señalización del receptor, lo que es consistente con la hipótesis de que la carga del residuo no es indispensable para modificar la interacción con las proteínas G, pero que la diferencia en la reactividad del grupo lateral puede alterar su activación [131].

7.2.4 Actividad constitutiva de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V}

Como se mencionó en la introducción, el término actividad constitutiva se refiere a la transición espontánea de un GPCR, en ausencia de un agonista, de un estado inactivo a un estado activo, fenómeno descrito tanto para receptores nativos como recombinantes [103]. Modificaciones en la secuencia de aminoácidos o la longitud del asa i3 pueden alterar la actividad constitutiva de estos receptores, como ocurre para el receptor D₅ humano, en el que la mutación I288F disminuye un 50% la actividad constitutiva. Un efecto similar se ha observado en el receptor D₁ humano en el que la mutación A229T reduce su actividad constitutiva en células HEK-293, aunque de manera interesante no en células neuronales GT1. Sin embargo, la mutación D550A en el receptor humano a FSH induce actividad constitutiva del receptor, y la ausencia de 80 aa en el asa i3 del hH₃R aumenta la actividad constitutiva [22, 132, 136, 137].

De acuerdo con el punto anterior, los resultados funcionales mostraron menor eficacia del receptor hH₃R_{A280V} para activar vías de señalización en comparación con el receptor hH₃R_{WT}. Una posible explicación es una mayor actividad constitutiva del receptor mutado que se reflejaría en una menor eficacia de los agonistas para desencadenar vías de señalización. En este supuesto, el receptor mutado tendría una actividad basal mayor y al ser activado con el agonista RAMH se observaría un efecto menor.

Por lo anterior, se evaluó la actividad constitutiva de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} expresados en las células CHO-K1. Los ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS en membranas celulares con el agonista inverso ciproxifán mostraron actividad constitutiva, aunque modesta para ambos receptores ($12.0 \pm 0.3 \%$ y $5.9 \pm 0.6 \%$ para los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V}, respectivamente), siendo el efecto estadísticamente menor para el receptor mutado (Tabla 12), lo que puede interpretarse como una menor actividad constitutiva del mismo. Estos datos confirman que la mutación A280V disminuye la señalización del receptor, presumiblemente por una menor capacidad de activación de las proteínas Gα_{i/o} a las que se encuentra acoplado, al alterar la eficiencia de interacción con dichas proteínas por impedimento estérico. En contraste con nuestros resultados, se ha reportado mayor actividad constitutiva de la isoforma de 365 aa del hH₃R [22] y de la mutante A357K del H₃R del ratón [21]. Por otra parte, la potencia del ciproxifán fue semejante para ambos receptores, confirmando que la mutación no modifica la afinidad del hH₃R por sus ligandos selectivos (Tablas 8 y 12).

En contraste con los ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS, no se detectó actividad constitutiva de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} en los ensayos de acumulación de AMPc en células intactas con ninguno de los 4 agonistas inversos probados (Tabla 13). La curva concentración-respuesta de la estimulación por la forskolina de la acumulación de AMPc mostró que con la concentración utilizada (3 μM) los agonistas inversos podrían aún aumentar la formación de AMPc, por que la ausencia de efecto de los agonistas inversos no se debe a la saturación de la formación del segundo mensajero (Fig. 25).

La actividad constitutiva modesta en los ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS puede reflejar los niveles de expresión de los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} en el sistema estudiado (203 ± 34 y 173 ± 26 fmol/mg de proteína, respectivamente), ya que en las células CHO

(de las cuales derivan las células CHO-K1) se observa actividad constitutiva significativa del H₃R con densidades mayores a 250 fmol/mg de proteína [103]. Así, una explicación para nuestros resultados sería que la concentración de proteínas G_{ai/o} activadas en estado basal no es suficiente para inhibir significativamente a las adenilil ciclasas cuando éstas son estimuladas por la forskolina.

7.2.5 Posibles consecuencias funcionales de la mutación A280V en el hH₃R_{WT}

En conjunto, nuestros datos indican que los receptores hH₃R_{WT} y hH₃R_{A280V} se encuentran en estados conformacionales diferentes, de acuerdo al modelo del complejo cúbico ternario [138], y que estos estados inciden en la interacción entre el receptor y las proteínas G_{ai/o} repercutiendo en una menor eficacia de señalización del receptor mutado. Este efecto podría afectar la regulación por el H₃R de la liberación de neurotransmisores, ya que la menor activación de proteínas G_{ai/o} disminuiría la inhibición de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, tipo N y P/Q, como consecuencia de un número menor de dímeros Gβγ disponibles, conduciendo al menor control inhibitorio de la liberación de los neurotransmisores.

Con base en la hipótesis anterior, resulta atractivo asociar la menor eficacia de señalización del hH₃R_{A280V} con las patologías a las que se le ha relacionado. Si bien no se conoce con certeza la etiología de la migraña, de acuerdo a la teoría neurógena el cuadro clínico se origina por una mayor liberación de glutamato, serotonina y neuropéptidos vasoactivos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), los cuales causan inflamación en los nervios craneales, vasodilatación y extravasación de proteínas y otras sustancias plasmáticas que activan fibras del nervio trigémino, responsables de la conducción de información nociceptiva [85, 89, 139].

De acuerdo con los resultados de esta tesis se puede plantear que la disminución de la retro-alimentación negativa por la presencia de H₃Rs mutados aumentaría la liberación de los neurotransmisores implicados en la patología. El efecto benéfico de la administración de bajas dosis de histamina reportado por Millán-Guerrero y cols. [140], podría explicarse por mayor activación de los hetero-receptores H₃ en las terminales serotoninérgicas, glutamatérgicas o peptidérgicas, que resulta en menor liberación de los neurotransmisores correspondientes.

En el síndrome de Shy-Drager la hipotensión neurológica sugiere menor actividad de las neuronas noradrenérgicas a nivel central y periférico, lo que podría asociarse con la disminución de la eficacia de auto-receptores H₃ mutados para inhibir la liberación de histamina. La mayor liberación de la histamina correspondería con mayor activación de los hetero-receptores H₃ presentes en las terminales post-sinápticas disminuyendo así la liberación de noradrenalina y/o acetilcolina y causando una caída en la frecuencia cardíaca. Sin embargo, es claro que se requieren estudios adicionales que permitan evaluar el efecto de la mutación A280V en la liberación de diferentes neurotransmisores.

8. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos, se plantean las siguientes conclusiones:

1. La mutación Y197C no modifica la expresión, la localización en la membrana citoplasmática, la afinidad por agonistas y antagonistas, o la señalización intracelular del receptor a histamina H₃ humano de 445 aa.
2. La mutación A280V no modifica la afinidad por agonistas y antagonistas selectivos, pero disminuye la eficacia del receptor a histamina H₃ humano de 445 aa, para activar vías de señalización intracelular mediadas por proteínas G $\alpha_{i/o}$.

9. Referencias

- [1] Fernández-Novoa L, Cacabelos R (2001). Histamine function in brain disorders. *Behav. Brain Res.* 124: 213-233.
- [2] Tiligada E, Kyriakidis K, Chazot PL, Passani MB (2011). Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS Neurosci. Ther.* 17: 620-628.
- [3] Falcone FH, Zillikens D, Gibbs BF (2006). The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Exp. Dermatol.* 15: 855-864.
- [4] Hass HL, Sergeeva OA, Selbach O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol. Rev.* 88: 1183-1241.
- [5] Nuutinen S, Panula P. (2010). Histamine in neurotransmission and brain diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 709: 95-107.
- [6] Diewald L, Heimrich B, Büsselberg D, Watanabe T, Hass HL (1997). Histaminergic system in co-cultures of hippocampus and posterior hypothalamus: a morphological and electrophysiological study in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 9: 2406-2413.
- [7] Vincent SR, Hökfelt T, Skirboll LR, Wu JY (1983). Hypothalamic γ -aminobutyric acid neurons project to the neocortex. *Science* 220: 1309-1311.
- [8] Stark H (2007). Histamine receptors. *Biotrend Rev.* 1: 1-10.
- [9] Ramos-Jiménez J, Garduño-Torres B, Arias-Montaña JA (2009). Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev. Biomed.* 20: 100-126.
- [10] Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H_3) of histamine receptor. *Nature* 302: 832-837.

- [11] Loverberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jianq X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG (1999). Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol. Pharmacol.* 55: 1101-1107.
- [12] Micallef S, Stark H, Sasse A (2013). Polymorphisms and genetic linkage of histamine receptors. *Life Sci.* 93: 487-94.
- [13] Leurs R, Remko A, Henk T, Iwan J (2005). Histamine H₃ receptor: From gene cloning to H₃ receptors drugs. *Nature Rev. Drug Discov.* 4: 107-120.
- [14] Cogé F, Guénin SP, Audinot V, Renouard-Try A, Beauverger P, Macia C, Ouvry C, Ouvry C, Nagel N, Rique H, Boutin JA, Galizzi JP (2001). Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H₃ receptor. *J. Biochem.* 355: 279-288.
- [15] Wellendorph P, Goodman MW, Burstein ES, Nash NR, Brann MR, Weiner DM (2002). Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H₃ receptor. *Neuropharmacology* 42: 929-940.
- [16] Hancock AA, Esbenshade TA, Krueger KM, Yao BB (2003). Genetic and pharmacological aspects of histamine H₃ receptor heterogeneity. *Life Sci.* 73: 3043-3072.
- [17] Bongers G, Bakker RA, Leurs R (2007). Molecular aspects of the histamine H₃ receptor. *Biochem. Pharmacol.* 73: 1195-1204.
- [18] Gbahou F, Rouleau A, Morisset S, Parmentier R, Crochet S, Lin JS, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Sark H, Shunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM (2003). Protean agonism at histamine H₃ receptors in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11086-11091.

- [19]Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel- Lacombe J, Sark H, Shunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM (2000). High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 408: 860-864.
- [20]Wieland K, Bongers G, Yamamoto Y, Hashimoto T, Yamatodani A, Menge WM, Timmerman H, Lovenberg TW, Leurs R (2001). Constitutive activity of histamine H₃ receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H₃ antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299: 908-914.
- [21]Takahashi K, Tokita S, Kotani H (2003). Generation and characterization of highly constitutive active histamine H₃ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 213-218.
- [22]Bongers G, Krueger KM, Miller TR, Baranowski JL, Estvander BR, Witte DG, Strakhova MI, van Meer P, Bakker RA, Cowart MD, Hancock AA, Esbenshade TA, Leurs R (2007). An 80-amino acid deletion in the third intracellular loop of a naturally occurring human histamine H₃ isoform confers pharmacological differences and constitutive activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323: 888-898.
- [23]Wiedemann P, Bönisch H, Oerters F, Brüss M (2002). Structure of the human histamine H₃ receptor gene (HRH₃) and identification of naturally occurring variations. *J. Neural Transm.* 109: 443-453.
- [24]Wei Z, Wang L, Zhang M, Xuan J, Wang Y, Liu B, Shao L, Li J, Zeng Z, Li T, Liu J, Wng T, Zhang M, Qin S, Xu Y, Feng G, He L, Xing Q (2012). A pharmacogenetic study of risperidone on histamine H₃ receptor gene (HRH₃) in Chinese Han schizophrenia patients. *J. Psychopharmacol.* 26: 814-818.
- [25]Pillot C, Ortiz J, Héron A, Ridray S, Schwartz JC, Arrang JM (2002). Ciproxifan, a histamine H₃-receptor antagonist/inverse agonist, potentiates neurochemical and behavioral effects of haloperidol in the rat. *J. Neurosci.* 22: 7272-7280.

- [26] Molina-Hernández A, Díaz NF, Arias-Montaña JA (2012). Histamine in brain development. *J. Neurochem.* 122: 872-882.
- [27] Cooper DM, Crossthwaite AJ (2006). Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol. Sci.* 27: 426-431.
- [28] Silver RB, Poonwasi KS, Seyedi N, Wilson SJ, Lonvenberg TW, Levi R (2002). Decreased intracellular calcium mediates the histamine H₃-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 501-506.
- [29] Morrey C, Estephan R, Abbott GW, Levi R (2008). Cardioprotective effect of histamine H₃-receptor activation: pivotal role of G beta gamma-dependent inhibition of voltage-operated Ca²⁺ channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326: 871-878.
- [30] Chen Y, Paavola J, Stegajev V, Stark H, Chazot PL, Wen JG y Kontinen YT. (2015). Activation of histamine H₃ receptor decreased cytoplasmatic Ca²⁺ imaging during electrical stimulation in the skeletal myotubes. *Eur. J. Pharmacol.* 754: 173-178.
- [31] Bünemann M, Bücheler MM, Philipp M, Lohse MJ, Hein L (2001). Activation and deactivation kinetics of α_{2A} - and α_{2C} -adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel currents. *J. Biol. Chem.* 276:47512-7.
- [32] Sadek B, Saad A, Sadeq A, Jalal F, Stark H (2016). Histamine H₃ receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. *Behav. Brain Res.* 312: 415-430.
- [33] Shan L, Bossers K, Luchetti S, Balesar R, Lethbridge N, Chazot PL, Bao AM, Swaab DF (2012). Alterations in the histaminergic system in the substantia nigra and striatum of Parkinson's patients: a postmortem study. *Neurobiol. Aging* 33: 1488.e1-1488e13.
- [34] Coelho MH, Silva IJ, Azevedo MS, Manso CF (1991). Decrease in blood histamine in drug-treated parkinsonian patients. *Mol. Chem. Neuropathol.* 14: 77-85.

- [35] Prell GD, Green JP (1991). Histamine metabolites and pros-methylimidazoleacetic acid in human cerebrospinal fluid. *Agents Actions Suppl.* 33: 343-63.
- [36] Molinari SP, Kaminski R, Di Rocco A, Yahr MD (1995). The use of famotidine in the treatment of Parkinson's disease: a pilot study. *J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 9: 243-247.
- [37] Garbarg M, Javoy-Agid F, Schwartz JC, Agid Y (1983). Brain histidina decarboxylase activity in Parkinson's disease. *Lancet* 8314-8315: 74-75.
- [38] Anichtchik OV, Rinne JO, Kalimo H, Panula P (2000). An altered histaminergic innervations of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 163: 20-30.
- [39] Ryu, J. H., K. Yanai, X. L. Zhao y T. Watanabe. (1996). The effect of dopamine D₁ receptor stimulation on the upregulation of histamine H₃ receptors following destruction of the ascending dopaminergic neurons. *Br. J. Pharmacol.* 118: 585-592
- [40] Rinne JO, Anichtchik OV, Eriksson KS, Kaslin J, Tuomisto L, Kalimo H, Røyttä M, Panula P (2002). Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *J. Neurochem.* 81: 954-960.
- [41] Liu CQ, Chen Z, Liu FX, Hu DN, Luo JH (2007). Involvement of brain endogenous histamine in the degeneration of dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuropharmacology* 53: 832-841.
- [42] Prell GD, Khandelwal JK, Burns RS, LeWitt PA, Green JP (1988). Elevated levels of histamine metabolites in cerebrospinal fluid of aging, healthy humans. *Compr. Gerontol. A.* 2: 114-119.
- [43] Passani MB, Blandina P (2011). Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol. Sci.* 32: 242-249.
- [44] Organización Mundial de la Salud. (2016). Demencia. Recuperado el 27 de junio de 2016 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>

- [45] Cacabelos R, Yamatodani A, Niigawa H, Hariguchi S, Tada K, Nishimura T, Wada H, Brandeis L, Pearson J (1989). Brain histamine in Alzheimer's disease. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 11: 353-360.
- [46] Mazurkiewicz-Kwilecki IM, Nsonwah S (1989). Changes in the regional brain histamine and histidina levels in postmortem brains of Alzheimer patients. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 75-78.
- [47] Panula P, Rinne J, Kuokkanen K, Eriksson KS, Sallmen T, Kalimo H, Relja M (1998). Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 82: 993-997.
- [48] Nakamura S, Takemura M, Ohnishi K, Suenaga T, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Kimura T (1993). Loss of large neurons and occurrence of neurofibrillary tangles in the tuberomammillary nucleus of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 151: 196-199.
- [49] Shan L, Hofman MA, van Wamelen DJ, Van Someren EJ, Bao AM, Swaab Dick F (2012). Diurnal fluctuation in histidine decarboxylase expression, the rate limiting enzyme for histamine production, and its disorder in neurodegenerative. *Sleep* 35: 713-715.
- [50] Shan L, Bossers K, Unmehopa U, Bao AM, Swaab DF (2012). Alterations in the histaminergic system in Alzheimer's disease: a postmortem study. *Neurobiol. Aging* 33: 2585-2598.
- [51] Bardgett ME, Davis NN, Schultheis PJ, Griffith MS (2011). Ciproxifan, an H₃ receptor antagonist, alleviates hyperactivity and cognitive deficits in the APP Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* 95: 64-72.
- [52] Bitner RS, Markosyan S, Nikkel AL, Brioni JD (2011). In-vivo histamine H₃ receptor antagonism activates cellular signaling suggestive of symptomatic and disease modifying efficacy in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 60: 460-466.

- [53] Haig, GM, Pritchett Y, Meier A, Othmann AA, Hall C, Gault LM, Lenz RA (2014). A randomized study of H₃ antagonist ABT-288 in mild-to-moderate Alzheimer's dementia. *J. Alzheimers Dis.* 42: 959-971.
- [54] Martinez-Mir MI, Pollard H, Moreau J, Traiffort E, Ruat M, Schwartz JC, Palacios JM. (1993). Loss of striatal histamine H₂ receptors in Huntington's chorea but not in Parkinson's disease: comparison with animal models. *Synapse* 15: 209-220.
- [55] Goodchild RE, Court JA, Hobson I, Piggott MA, Perry RH, Ince P, Jaros E, Perry EK (1999). Distribution of histamine H₃-receptor binding in the normal human basal ganglia: comparison with Huntington's and Parkinson's disease cases. *Eur. J. Neurosci.* 11: 449-456.
- [56] Whitehouse PJ, Trifiletti RR, Jones BE, Folstein S, Price DL, Snyder SH, Kuhar MJ (1985). Neurotransmitter receptor alterations in Huntington's disease: autoradiographic and homogenate studies with special reference to benzodiazepine receptor complexes. *Ann. Neurol.* 18: 202-210.
- [57] van Wamelen DJ, Shan L, Aziz NA, Anink JJ, Bao AM, Roos RA, Swaab DF (2011). Functional increase of brain histaminergic signaling in Huntington's disease. *Brain Pathol.* 21: 419-427.
- [58] Organización Mundial de la Salud. (2016). Depresión. Recuperado el 28 de junio de 2016 de <http://www.who.int/topics/depression/es/>.
- [59] Wang SS, Kamphuis W, Huitinga I, Zhou JN, Swaab DF (2008). Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances. *Mol. Psychiatry* 13: 786-799.
- [60] Bao AM, Swaab DF (2010). Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in depression focus on the human postmortem hypothalamus. *Vitam. Horm.* 82: 339-365.

- [61] Knigge U, Soe-Jensen P, Jorgensen H, Kjaer A, Moller M, Warberg J (1999). Stress-induced release of anterior pituitary hormones: effect of H₃ receptor mediated inhibition of histaminergic activity or posterior hypothalamic lesion. *Neuroendocrinology* 69: 44-53.
- [62] Ito C (2000). The role of brain histamine in acute and chronic stresses. *Biomed. Pharmacother.* 54: 263-267.
- [63] Mazurkiewicz-Kwilecki IM, Prell GD (1986). Brain histamine response to stress in 12 month old rats. *Life Sci.* 38: 2339-2345.
- [64] Mazurkiewicz-Kwilecki IM (1980). Single and repeat air blast stress and brain histamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12: 35-39.
- [65] Taylor KM, Snyder SH (1971). Brain histamine: rapid apparent turnover altered by restraint and cold stress. *Science* 172: 1037-1039.
- [66] Ito C, Shen H, Toyota H, Kubota Y, Sakurai E, Watanabe T, Sato M (1999). Effects of the acute and chronic restraint stresses on the central histaminergic neuron system of Fischer rat. *Neurosci. Lett.* 262: 143-145.
- [67] Kano M, Fukudo S, Tashiro A, Utsumi A, Tamura D, Itoh M, Iwata R, Tashiro M, Mochizuki H, Funaki Y, Kato M, Hongo M, Yanai K (2004). Decreased histamine H₁ receptor binding in the brain of depressed patients. *Eur. J. Neurosci.* 20: 803-810.
- [68] Shan L, Qi XR, Balesar R, Swaab DF, Bao AM (2013). Unaltered histaminergic system in depression: a postmortem study. *J. Affect. Disord.* 146: 220-223.
- [69] Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27: 469-474.
- [70] Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M,

- Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat. Med.* 6: 991-997.
- [71] Torrealba F, Yanagisawa M, Saper CB (2003). Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience* 119: 1033-1044.
- [72] Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE, Haas HL (2001). Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J. Neurosci.* 21: 9273-9279.
- [73] Schöne C, Cao ZF, Apergis-Schoute J, Adamantidis A, Sakurai T, Burdakov D (2012). Optogenetic probing of fast glutamatergic transmission from hypocretin/orexin to histamine neurons in situ. *J. Neurosci.* 32: 12437-12443.
- [74] Huang ZL, Qu WM, Li WD, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O (2001). Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9965-9970.
- [75] Dauvilliers Y, Delalée N, Jaussent I, Scholz S, Bayard S, Croyal M, Schwartz JC, Robert P (2012). Normal cerebrospinal fluid histamine and tele-methylhistamine levels in hypersomnia conditions. *Sleep* 35: 1359-1366.
- [76] Inocente C, Arnulf I, Bastuji H, Thibault-Stoll A, Raoux A, Reimão R, Lin JS, Franco P (2012). Pitolisant, an inverse agonist of the histamine H₃ receptor: an alternative stimulant for narcolepsy-cataplexy in teenagers with refractory sleepiness. *Clin. Neuropharmacol.* 35: 55-60
- [77] Lin JS, Dauvilliers Y, Arnulf I, Bastuji H, Anaclet C, Parmentier R, Kocher L, Yanagisawa M, Lehert P, Ligneau X, Perrin D, Robert P, Roux M, Lecomte JM, Schwartz JC (2008). An inverse agonist of the histamine H₃ receptor improves

wakefulness in narcolepsy: studies in orexin-/-mice and patients. *Neurobiol. Dis.* 30: 74-83.

- [78] Ligneau X, Perrin D, Landais L (2007). Pitolisant [1-{3-[3-(4-Chlorophenyl) propoxy] propyl} piperidine, hydrochloride], a non-imidazole inverse agonist/antagonist at the human histamine H₃ receptor: Preclinical pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320: 365-375.
- [79] Dauvilliers Y, Bassetti C, Lammers GJ, Arnulf I, Mayer G, Rodenbeck A, Lehert P, Ding CL, Lecomte JM, Schwartz JC; Harmony I study group (2013). Pitolisant versus placebo or modafinil in patients with narcolepsy: a double-blind, randomised trial. *Lancet Neurol.* 12: 1068-1075.
- [80] Syed YY. (2016). Pitolisant: First Global Approval. *Drugs* 76: 1313-1318.
- [81] Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Ghosh AK, Bilguvar K, O'Roak BJ, Mason CE, Abbott T, Gupta A, King RA, Pauls DL, Tischfield JA, Heiman GA, Singer HS, Gilbert DL, Hoekstra PJ, Morgan TM, Loring E, Yasuno K, Fernandez T, Sanders S, Louvi A, Cho JH, Mane S, Colangelo CM, Biederer T, Lifton RP, Gunel M, State MW (2010). L-histidine decarboxylase and Tourette's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 362: 1901-1908.
- [82] Castellani Balzan L, Williams KA, Gallezot JD, Pogorelov V, Rapenelli M, Crowley M, Anderson GM, Loring E, Gorczyca R, Billingslea E, Wasyluk S, Panza KE, Ercan-Sencicek AG, Krusong K, Leventhal BL, Ohtsu H, Bloch MH, Hughes ZA, Krystal JH, Mayes L, de Arujo I, Ding YS, State MW, Pittenger C (2014). Histidine decarboxylase deficiency causes Tourette syndrome: parallel findings in humans and mice. *Neuron* 81: 77-90.

- [83] Chepkova A, Yanovsky E, Parmentier R, Ohtsu H, Hass HL, Lin JS, Sergeeva OA. (2012). Histamine receptor expression, hippocampal plasticity and ammonia in histidine decarboxylase knockout mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32: 17-25.
- [84] Deza-Bringas L (2010). La migraña. Servicios de salud de la Pontificia Universidad Católica del Perú. *Acta Med Per.* 27: 129-136. Recuperado el 12 de mayo 2011 de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/acta_medica/2010_n2/pdf/a09v27n2.pdf
- [85] Gardner K (199). The genetic basis of migraine: how much do we know? *Can J. Neurol. Sci.* 26: S37-S43.
- [86] Millán-Guerrero RO, Baltazar-Rodríguez LM, Cárdenas-Rojas MI, Ramírez-Flores M, Isais-Millán S, Delgado-Enciso I, Caballero-Hoyos R, Trujillo-Hernández B (2011). A280V polymorphism in the histamine H₃ receptor as a risk factor for migraine. *Arch. Med. Res.* 42: 44-47.
- [87] Volcy-Gómez M (2006). The impact of migraine and other primary headaches on the health system and in social and economic terms. *Rev. Neurol.* 43: 228-235.
- [88] Organización Mundial de la Salud (2016). Cefaleas. Recuperado el 29 de junio de 2016 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs277/es/>
- [89] Rufo-Campos M (2001). Fisiopatología de la migraña. *Rev. Neurol. Clin.* 2: 263-271.
- [90] Orphanet Report Series (2012). Prevalence rare diseases collection. Recuperado el 29 de junio de 2016 de http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf
- [91] Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, Trojanowski JQ, Wood NW, Colosimo C, Dürr A, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lees A, Poewe W, Quinn N, Revesz T, Robertson D, Sandroni P, Seppi K, Vidailhet M (2008).

Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71: 670-676.

- [92] Soto-Lavastida A, Fernández GL, Esteban EM, Llibre JC (2011). Multisystem atrophy and diagnostic criteria updating: A clinical case presentation. *Instituto de Neurología y Neurocirugía "Dr. José Rafael Estrada"*. La Habana, Cuba. Recuperado el 7 de mayo de 2012 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232011000300010
- [93] Khurana RK, Nelson E, Azzarelli B, Garcia JH (1980). Shy-Drager Syndrome Diagnosis and treatment of cholinergic dysfunction. *Neurology* 30: 805-809.
- [94] Kaufmann H, Biaggioni I (2003). Autonomic failure in neurodegenerative disorders. *Semin. Neurol.* 23: 351-363.
- [95] Uveges AJ, Kowal D, Zhang Y, Spangler TB, Dunlop J, Semus S, Jones PG (2002). The role of transmembrane helix 5 in agonist binding to the human H₃ receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 451-458.
- [96] Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC (1992). Sequence alignment of the G-protein couple receptor superfamily. *DNA Cell. Biol.* 11: 1-20.
- [97] Barington L, Rummel PC, Lückmann M, Pihl H, Larsen O, Daugvilaite V, Johnsen AH, Frimurer TM, Karlshoj S, Rosenkilde MM (2016). Role of conserved disulfide bridges and aromatic residues in extracellular loop 2 of chemokine receptor CCR8 for chemokine and small molecule binding. *J. Biol. Chem.* 291: 16208-16220.
- [98] Zhang K, Zhang J, Gao ZG, Zhang D, Zhu L, Han GW, Moss SM, Paoletta S, Kiselev E, Lu W, Fenalti G, Zhang W, Müller CE, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Katritch V, Jacobson KA, Stevens RC, Wu B, Zhao Q (2014). Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* 509: 115-118.

- [99] Tarnow P, Schoneberg T, Krude H, Gruters A y Biebermann H. (2003). Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity. *J. Biol. Chem.* 278: 48666-48673.
- [100] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59.
- [101] Molholt B, Dosekocil J (1978). Increased transformation frequency in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82:477-483.
- [102] Cheng Y, Prusoff WH. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108.
- [103] Rouleau A, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Morisset S, Gbahou F, Schwartz JC, Arrang JM (2002). Histamine H₃-receptor-mediated [³⁵S]GTP γ [S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H₃ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 135: 385-392.
- [104] Arrang JM, Morisset S, Gbahou F (2007). Constitutive activity of the histamine H₃ receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 28:350-357.
- [105] Zalewska M, Siara M, Sajewicz W (2014). G protein-coupled receptors: abnormalities in signal transmission, disease states and pharmacotherapy. *Acta. Pol. Pharm.* 71: 229-243.
- [106] Karnik SS, Gogonea C, Patil S, Saad Y, Takezako T (2003). Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol. Metab.* 14: 431-437.

- [107] Gkountelias K, Papadokostaki M, Javitch JA, Liapakis G (2010). Exploring the binding site crevice of a family B G protein-coupled receptor, the type 1 corticotropin releasing factor receptor. *Mol. Pharmacol.* 78: 785-793.
- [108] Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322: 1211-1217.
- [109] Boucard AA, Roy M, Beaulieu ME, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, Leduc R (2003). Constitutive activation of the angiotensin II type 1 receptor alters the spatial proximity of transmembrane 7 to the ligand-binding pocket. *J. Biol. Chem.* 278: 36628-36636.
- [110] Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 494: 185-194.
- [111] Hu J, Wang Y, Zhang X, Lloyd JR, Li JH, Karpiak J, Costanzi S, Wees J (2010). Structural basis of G protein-coupled receptor/G protein interactions. *Nat. Chem. Biol.* 6: 541-548
- [112] Zhang P, Johnson PS, Zöllner C, Wang W, Wang Z, Montes AE, Seidleck BK, Blaschak CJ, Surratt CK (1999). Mutation of human mu opioid receptor extracellular "disulfide cysteine" residues alters ligand binding but does not prevent receptor targeting to the cell plasma membrane. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 72: 195-204.
- [113] Perlman JH, Wang W, Nussenzveig DR, Gershengorn MC (1995). A disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the thyrotropin-releasing hormone receptor is critical for binding. *J. Biol. Chem.* 270: 24682-24685.
- [114] Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273: 17299-17302.

- [115] Page KM, Curtis CA, Jones PG, Hulme EC (1995). The functional role of the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors, probed by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Pharmacol.* 289: 429-437.
- [116] Ishikawa M, Watanabe T, Kudo T, Yokoyama F, Yamauchi M, Kato K, Kakui N, Sato Y (2010). Investigation of the histamine H₃ receptor binding site. Design and synthesis of hybrid agonists with a lipophilic side chain. *J. Med. Chem.* 53: 6445-6456.
- [117] Yao BB, Hutchins CW, Carr TL, Cassar S, Masters JN, Bennani YL, Esbenshade TA, Hancock AA (2003). Molecular modeling and pharmacological analysis of species-related histamine H₃ receptor heterogeneity. *Neuropharmacology* 44: 773-486.
- [118] Ligneau X, Morisset S, Tardivel-Lacome J, Gbahou F, Ganellin CR, Stark H, Schunack W, Schwartz JC, Arrang JM (2000). Distinct pharmacology of rat and human histamine H₃ receptors: role of two amino acids in the third transmembrane domain. *Br. Pharmacol.* 131:1247-1250.
- [119] Tehan BG, Bortolato A, Blaney FE, Weir MP, Mason JS (2014). Unifying family A GPCR theories of activation. *Pharmacol. Ther.* 143: 51-60.
- [120] Uveges AJ, Jones PG (2001). Site directed mutagenesis of the human histamine H₃ receptor. *FASEB J.* 15: A220.
- [121] Bockaert J, Pin JP (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18: 1723-1729.
- [122] Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995). The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* 9: 745-754.

- [123] Zho XT, Chen DN, Xie ZQ, Peng Z, Xia KD, Liu W, Su B, Li JD (2013). Functional analysis of the distal region of the third intracellular loop of PROKR2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439: 12-17.
- [124] Peng Z, Tang Y, Luo H, Jiang F, Yang J, Sun L, Li JD (2011). Disease-causing mutation in PKR2 receptor reveals a critical role of positive charges in the second intracellular loop for G-protein coupling and receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* 286: 16615-16622.
- [125] Abreu AP, Noel SD, Xu S, Carroll RS, Latronico AC, Kaiser UB (2012). Evidence of the importance of the first intracellular loop of prokineticin receptor 2 in receptor function. *Mol. Endocrinol.* 26: 1417-1427.
- [126] Kaiser R, Tremblay PB, Klufmüller F, Roots I, Brockmüller J (2002). Relationship between adverse effects of antipsychotic treatment and dopamine D₂ receptor polymorphisms in patients with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 7: 695-705.
- [127] Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF Jr. (2007). Loss of function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 17447-17452.
- [128] Cravchik A, Sibley DR, Gejman PV (1996). Functional Analysis of the human D₂ dopamine receptor missense variants. *J. Biol. Chem.* 271: 26013-26017.
- [129] Duthey B, Caudron S, Perroy J, Bettler B, Fagni L, Pin JP, Prézeau L (2002). A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA_B receptor. *J. Biol. Chem.* 277: 3236-3241.

- [130] Chazenbalk GD, Nagayama Y, Russo D, Wadsworth HL, Rapoport B (1990). Functional analysis of the cytoplasmic domains of the human thyrotropin receptor by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 265: 20970-20975.
- [131] Podder A, Pandey D, Latha N (2016). Investigating the structural impact of S311C mutation in DRD₂ receptor by molecular dynamics and docking studies. *Biochimie* 123: 52-64.
- [132] Ulloa-Aguirre A, Urube A, Zariñán T, Bustos-Jaimes I, Pérez-Solis MA, Dias JA (2007). Role of the intracellular domains of the human FSH receptor in G α _s protein coupling and receptor expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260-262: 153-162.
- [133] Charpentier S, Jarvie KR, Severynse DM, Caron MG, Tiberi M (1996). Silencing of the constitutive activity of the dopamine D1B receptor. Reciprocal mutations between D1 receptor subtypes delineate residues underlying activation properties. *J. Biol. Chem.* 271: 28071-28076.
- [134] Rosethorne EM, Charlton SJ (2011). Agonist-biased signaling at the histamine H₄ receptor: JNJ7777120 recruits β -arrestin without activating G proteins. *Mol. Pharmacol.* 79: 749-757.
- [135] Perez-Aso M, Segura V, Montó F, Baretino D, Noguera MA, Milligan G, D'Ocon P (2013). The three α 1-adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 2322-2333.
- [136] Zhang B, Albaker A, Plouffe B, Lefebvre C, Tiberi M (2014). Constitutive activities and inverse agonism in dopamine receptors. *Adv. Pharmacol.* 70: 175-214.
- [137] Al-Fulaij MA, Ren Y, Beinborn M, Kopin AS (2008). Pharmacological analysis of human D₁ and D₂ dopamine receptor missense variants. *J. Mol. Neurosci.* 34: 211-223.

- [138] Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW, Kenakin TP (1996). The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. Resurrecting efficacy. *J. Theor. Biol.* 181: 381-397.
- [139] Tajti J, Párdutz A, Vámos E, Tuka B, Kuris A, Bohár Z, Fejes A, Toldi J, Vécsei L (2011). Migraine is a neuronal disease. *J. Neural. Transm.* 118: 511-524.
- [140] Millán-Guerrero RO, Isais-Millán R, Barreto-Vizcaíno S, Gutiérrez I, Rivera-Castaño L, Trujillo-Hernández B, Baltazar LM (2008). Subcutaneous histamine versus topiramate in migraine prophylaxis: a double-blind study. *Eur. Neurol.* 59: 237-242.