

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Desensibilización homóloga diferencial de las
isoformas de 365 y 445 amino ácidos del
receptor a histamina H₃ humano**

TESIS

Que presenta

M. en C. Ana Maricela García Gálvez

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la Tesis

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

Ciudad de México

Marzo, 2018

El presente trabajo de tesis se realizó en el laboratorio 37 de Neurofarmacología del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav-IPN, bajo la dirección del Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña, con los recursos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) mediante la beca 262838

Agradecimientos

Al Dr. José Antonio Arias Montaña quien me aceptó como parte de su equipo de trabajo durante estos casi 6 años, depositó su confianza en mí, dirigió de manera excelente mi proyecto y gracias a su apoyo, esfuerzo y dedicación estoy culminando esta etapa de mi vida

Al Dr. Alberto Olivares, Dr. Benjamín Florán, Dr. Manuel Arias, Dr. Fanis Missirlis por sus observaciones y sugerencias para lograr una mejor presentación del proyecto

Al equipo secretarial del departamento (Rosi, Maru, Moises), al departamento de becas y de servicios escolares por facilitar y agilizar los trámites burocráticos, sin ustedes esto hubiese sido más difícil

Al Dr. Juan Escamilla Sánchez por su apoyo en la obtención de plásmidos, en el montaje de la metodología para la transformación de bacterias y para la transfección de células. Al Arq. Raúl González Pantoja por su apoyo técnico durante toda mi estancia en el laboratorio

A mis compañeros del laboratorio 37 de neurociencias, por sus observaciones, trabajo en equipo y discusiones en los seminarios, sus comentarios fueron de mucha utilidad, y a los integrantes de los laboratorios vecinos porque en varias ocasiones actuaron como proveedores de material para trabajar. ¡Gracias!

Dedicatorias

Este logro está dedicado con mucho cariño a:

Dios, porque siempre pude aferrarme a él en los momentos más difíciles

Mis padres Mario y Maribel quienes con su apoyo incondicional fueron pieza clave para la culminación de este proyecto de vida, motivándome en los momentos más difíciles, respetando y apoyando mis decisiones. ¡Los quiero!

Mis hermanos César y Alex quienes pronto serán mis patrocinadores (just kidding), aunque no lo demuestre quiero que sepan que los llevo en mi corazón y pensamientos

Mis abuelos Álvaro, Emilia, Elia y Calimerio quienes con sus regaños y consejos me formaron como la persona que ahora soy, los quiero y los extraño

Mis tíos y tías a quienes agradezco su cariño, motivación y apoyo

Mis primos y primas a quienes les agradezco por tomarme en cuenta en todo, su cariño, buena vibra, buenos momentos

Mis amigos, Leo, Lalo, Elide, Alina, Gaby, Alita, Elena, Adolfo, Beto, Wamba, Ivette, Nayeli, Wilis, Alex, Peter, Dany, Sandry, Paty, Lucy, Tanya, Paco, Ángeles, Yazmín, Marquina y la banda basquetbolera algunos se convirtieron en mi familia desde el bachillerato y otros poco a poco se fueron incorporando en mi vida, gracias por su amistad, consejos, aventuras y por apoyarme siempre aunque sea a distancia, los quiero mucho

Índice

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 8 |
| Lista de figuras | 9 |
| Resumen | 11 |
| Summary | 13 |
| 1. Introducción | 14 |
| 2. Antecedentes | 15 |
| 2.1 Histamina | 15 |
| 2.1.1 Síntesis y catabolismo de la histamina | 16 |
| 2.2 Sistema histaminérgico del SNC | 17 |
| 2.3 Receptores a histamina | 18 |
| 2.3.1 Receptor a histamina H ₁ | 19 |
| 2.3.2 Receptor a histamina H ₂ | 19 |
| 2.3.3 Receptor a histamina H ₃ | 19 |
| 2.3.4 Receptor a histamina H ₄ | 20 |
| 2.4 Isoformas del receptor H ₃ (H ₃ R) | 20 |
| 2.5 Señalización intracelular del H ₃ R | 24 |
| 2.6 Actividad constitutiva del H ₃ R | 26 |
| 2.7 Regulación funcional de los GPCRs | 27 |
| 2.8 Desensibilización de los GPCRs | 28 |
| 2.8.1 Fosforilación de los GPCRs | 29 |
| 2.8.2 Internalización de los GPCRs | 32 |
| 2.9 Desensibilización homóloga de los receptores a histamina | 33 |
| 2.10 Desensibilización constitutiva de los GPCRs | 34 |
| 3. Planteamiento del problema | 37 |
| 4. Hipótesis | 38 |
| 5. Objetivos | 38 |
| 5.1 Objetivo general | 38 |
| 5.2 Objetivos específicos | 38 |

| | |
|---|----|
| 6. Materiales y métodos | 40 |
| 6.1 Generación de sublíneas de células CHO-K1 con expresión estable de las isoformas H ₃ R ₄₄₅ y H ₃ R ₃₆₅ | 40 |
| 6.2 Experimentos de desensibilización homóloga | 41 |
| 6.3 Ensayos de unión de [³ H]-NMHA | 41 |
| 6.4 Unión de [³⁵ S]GTP _γ S a membranas celulares totales | 43 |
| 6.5 Determinación de la formación de AMPc | 44 |
| 6.6 Análisis bioinformático | 45 |
| 6.7 Análisis estadístico | 45 |
| 7. Resultados | 46 |
| 7.1 Caracterización farmacológica de los receptores hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ expresados establemente en células CHO-K1 | 46 |
| 7.2 Caracterización funcional de los receptores hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ expresados establemente en células CHO-K1 | 49 |
| 7.3 Identificación de residuos en los receptores hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ susceptibles de fosforilación por las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) | 52 |
| 7.4 Efecto de la pre-incubación con el agonista del H ₃ R RAMH en la inhibición por immpip de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina | 56 |
| 7.5 Efecto de la pre-incubación con el agonista RAMH en la unión de [³ H]-NMHA a células intactas y a membranas celulares totales | 58 |
| 7.6 Evaluación de la desensibilización constitutiva de los receptores hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ | 61 |
| 8. Discusión | 63 |
| 8.1 Caracterización farmacológica de los receptores hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ expresados establemente en células CHO-K1 | 63 |
| 8.2 Caracterización funcional de los receptores hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ expresados establemente en células CHO-K1 | 64 |
| 8.3 Desensibilización funcional homóloga de los receptores hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ | 67 |

| | |
|---|----|
| 8.4 Internalización de los hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ por exposición prolongada a agonista | 70 |
| 8.5 Disminución del número total de los receptores hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ y su afinidad por immpip por la exposición prolongada a agonista | 71 |
| 8.6 Desensibilización constitutiva de los hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ | 72 |
| 8.7 Consideraciones finales | 73 |
| 9. Conclusiones | 76 |
| 10. Perspectivas | 77 |
| 11. Bibliografía | 78 |
| 12. Apéndices | 94 |

Abreviaturas

| | |
|------------------------|---|
| aa | Amino ácidos |
| AMPc | 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| Bmax | Unión máxima |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| CHO-K1 | Células de ovario de hámster chino |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GPCRs | Receptores acoplados a proteínas G |
| GRKs | Cinasas de receptores acoplados a proteínas G |
| H₃R | Receptor a histamina H ₃ |
| hH₃R | Receptor a histamina H ₃ de humano |
| IL3 | Tercera asa intracelular |
| IC₅₀ | Concentración inhibitoria media |
| Kd | Constante de disociación |
| Ki | Constante de inhibición |
| KRH | Krebs-Ringer-Hepes |
| MAPKs | Cinasas de proteína activadas por mitógenos |
| NMHA | <i>N</i> - α -metilhistamina |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PI3K | 3-cinasa de fosfatidil-inositol |
| PKA | Cinasa A de proteínas |
| RAMH | (<i>R</i>)- α -metil-histamina |
| SFB | Suero fetal bovino |
| TM | Transmembranal |

Lista de figuras

- Figura 1 Síntesis y catabolismo de la histamina
- Figura 2 Sistema histaminérgico en el cerebro de la rata
- Figura 3 Expresión del ARNm de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ en diferentes regiones del SNC humano
- Figura 4 Vías de señalización del H₃R
- Figura 5 Mecanismo canónico de la desensibilización homóloga de los GPCRs
- Figura 6 Estructura de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs)
- Figura 7 Modelo de la desensibilización e internalización constitutivas de un receptor acoplado a proteínas G_{αi/o}
- Figura 8 Unión específica de [³H]-NMHA a membranas de células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅
- Figura 9 Saturación de la unión específica de [³H]-NMHA a membranas de células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅
- Figura 10 Inhibición de la unión de [³H]-NMHA por ligandos selectivos del H₃R
- Figura 11 Señalización de los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ establemente expresados en células CHO-K1

- Figura 12 Actividad constitutiva de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅
- Figura 13 Residuos susceptibles de fosforilación por GRK2/3 en la tercera asa intracelular y en el carboxilo terminal del hH₃R₄₄₅
- Figura 14 Desensibilización homóloga diferencial de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅
- Figura 15 Efecto de la pre-incubación con agonista en el número de receptores expresados en la superficie celular
- Figura 16 Efecto de la pre-incubación con agonista en el número de receptores y en la afinidad por el agonista immepip en membranas celulares totales
- Figura 17 Posible desensibilización constitutiva de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅
- Figura 18 Modelo de la desensibilización homóloga de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅

Resumen

Los receptores a histamina H₃ (H₃Rs) señalizan mediante proteínas G_{α_{i/o}} y se expresan en células neuronales como auto- y hetero-receptores. El procesamiento alternativo del receptor a histamina H₃ humano (hH₃R) origina 20 isoformas, y el ARNm de dos receptores, uno de 445 y otro de 365 amino ácidos (hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅), se expresa de manera abundante en el cerebro. En nuestro laboratorio se mostró que el hH₃R₄₄₅ establemente expresado en células CHO-K1 experimenta desensibilización homóloga. El hH₃R₃₆₅ tiene 80 residuos menos en la tercera asa intracelular en comparación con la isoforma hH₃R₄₄₅, y en este trabajo se estudió si el hH₃R₃₆₅ también experimenta desensibilización homóloga y las posibles diferencias con la isoforma hH₃R₄₄₅.

En clonas de las células CHO-K1 que establemente expresan niveles similares de los dos receptores (211 ± 12 y 199 ± 16 fmol/mg proteína para el hH₃R₄₄₅ y el hH₃R₃₆₅, respectivamente) no existieron diferencias en la afinidad de los receptores por ligandos selectivos del H₃R, o en la estimulación por agonista de la unión de [³⁵S]-GTPγS a membranas celulares y la inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina en células intactas.

En ambas clonas celulares, la pre-incubación con el agonista del H₃R (*R*)-α-metilhistamina (RAMH) resultó en desensibilización funcional de los receptores, evaluada por ensayos de acumulación de AMPc y por la pérdida de receptores en la superficie celular, así como en reducción de la afinidad de ambos receptores por el agonista immpip observada en membranas celulares por ensayos de unión de radioligando. Sin embargo, la desensibilización funcional difiere entre las dos isoformas en la magnitud (96 ± 15% y 58 ± 8% para el hH₃R₄₄₅ y el hH₃R₃₆₅, respectivamente) y el tiempo de pre-exposición requerido para alcanzar la máxima desensibilización (60 y 30 min, respectivamente). Además, las isoformas difieren en sus características de recuperación de la desensibilización.

Estos resultados indican que el hH₃R₃₆₅ experimenta desensibilización funcional homóloga, pero que el proceso es diferente del observado para el hH₃R₄₄₅ en el curso temporal, la magnitud y la re-sensibilización. Además, la desensibilización homóloga induce la pérdida de receptores de la superficie celular y disminuye la afinidad de ambos receptores por el agonista selectivo immpip.

Summary

Histamine H₃ receptors (H₃Rs) signal through G_{αi/o} proteins and are found in neuronal cells as auto- and hetero-receptors. Alternative splicing of the human H₃R (hH₃R) mRNA originates 20 isoforms, and the mRNAs of two receptors of 445 and 365 amino acids (hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅) are widely expressed in the brain. Our laboratory previously showed that the hH₃R₄₄₅ stably expressed in CHO-K1 cells experiences homologous desensitization. The hH₃R₃₆₅ lacks 80 residues in the third intracellular loop, and in this work we therefore studied whether the shorter isoform also experiences homologous desensitization and the possible differences with the hH₃R₄₄₅.

In clones of CHO-K1 cells stably expressing similar receptor levels (211 ± 12 and 199 ± 16 fmol/mg protein for hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅, respectively), there were no differences in receptor affinity for selective H₃R ligands or for agonist-induced [³⁵S]-GTP_γS binding to membranes and inhibition of forskolin-stimulated cAMP accumulation in intact cells. For both cell clones, pre-incubation with the H₃R agonist (*R*)- α -methylhistamine (RAMH) resulted in functional receptor desensitization, as indicated by cAMP accumulation assays, and loss of receptors from the cell surface and reduced affinity for the agonist immpip in cell membranes, evaluated by radioligand binding. However, functional desensitization differed in the maximal extent (96 ± 15% and 58 ± 8% for the hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅ respectively) and the length of pre-exposure required to reach the maximum desensitization (60 and 30 min, respectively). Furthermore, the isoforms differed in their recovery from desensitization.

These results indicate that the hH₃R₃₆₅ experiences homologous desensitization, but that the process differs between the isoforms in time course, magnitude and re-sensitization. Furthermore, the homologous desensitization induces the loss of receptors from the cell surface and decreases the affinity of both isoforms for the selective agonist immpip.

1. Introducción

La histamina pertenece al grupo de las aminas biogénicas que incluye también a la serotonina, la adrenalina, la noradrenalina, la dopamina y la acetilcolina. Estas aminas son neurotransmisores moduladores y como tales regulan la actividad neuronal de forma excitadora o inhibidora (Sundvik, 2012). Mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés, *G Protein-Coupled Receptors*), la histamina participa en numerosas funciones en el organismo, como las respuestas alérgicas, la secreción ácida gástrica, la conducta motora, el ciclo de sueño y vigilia, la nocicepción y la respuesta inmune, entre otras (Ramos-Jiménez y Arias-Montaño 2009). Los efectos de la histamina en estas funciones se deben a la interacción a nivel pre- y post-sináptico con cuatro subtipos de GPCRs, H₁, H₂, H₃ y H₄ (Yamashita et al., 1991; Gantz et al., 1991; Lovenberg et al., 1999; Liu et al., 2001; Tiligada et al., 2011).

Los cuerpos celulares de las neuronas histaminérgicas se encuentran exclusivamente en el núcleo tuberomamilar (TMN) del hipotálamo posterior, pero sus proyecciones están distribuidas en casi todas las regiones del Sistema Nervioso Central (SNC; Watanabe et al., 1984; Haas, 2008). El receptor H₃ (H₃R) se expresa de manera primaria por células neuronales, tanto del SNC como del sistema nervioso periférico, y en el SNC el H₃R se encuentra en las propias neuronas histaminérgicas como auto-receptor y en neuronas que liberan otros neurotransmisores como hetero-receptor.

Una característica importante del H₃R es la existencia de isoformas, generadas por procesamiento alternativo (*alternative splicing*) del ARN mensajero (ARNm) precursor (Bongers et al., 2007a; García-Gálvez y Arias-Montaño, 2016). En el caso del receptor humano se han reportado 20 isoformas, de las cuales al menos cinco activan vías de señalización al ser expresadas en líneas celulares. Los H₃Rs, como otros GPCRs, tienen diferentes mecanismos regulatorios, que van de la modulación de su expresión en la superficie celular al control de la eficacia de

su señalización. Una forma de regulación identificada para la familia de receptores a histamina es la desensibilización de la respuesta funcional, mecanismo importante para la modulación y la prevención de respuestas fisiológicas excesivas inducidas por la activación de los receptores.

2. Antecedentes

2.1 Histamina

La participación de la histamina (imidazol-etilamina, Figura 1) en la comunicación celular fue reconocida por Sir Henry Dale en 1910. Posteriormente se identificó su participación en otras funciones como la contracción del músculo liso intestinal y de las vías respiratorias, así como su papel modulador en la respuesta alérgica inmediata. En 1924, Popielski mostró que la histamina inducía secreción de ácido gástrico en el estómago. La presencia de la amina en el sistema nervioso fue demostrada con el desarrollo de anticuerpos contra la histamina y la enzima responsable de sus síntesis (descarboxilasa de histidina, HDC), lo que permitió establecer la presencia en el cerebro de neuronas productoras de histamina, así como la distribución de sus proyecciones.

Diversos estudios han mostrado la participación de la histamina a nivel periférico en la regulación de varios procesos fisiológicos que involucran a los sistemas cardiovascular, inmunológico y gastrointestinal, y a nivel del SNC la histamina actúa como un neuromodulador, facilitando o inhibiendo la actividad neuronal, y participando en procesos como el ciclo de sueño y vigilia, la actividad motora, la regulación de la temperatura corporal, la ingestión de agua y alimentos, la nocicepción y la memoria y el aprendizaje (Panula y Nuutinen, 2013; Panula et al., 2015).

2.1.1 Síntesis y catabolismo de la histamina

A nivel periférico, la histamina es sintetizada por mastocitos, linfocitos, basófilos, plaquetas y células entero-cromafines de la mucosa gástrica (Masini et al., 1998; Zwadlo-Klarwasser et al., 1998; Kubo y Nakano, 1999; Coruzzi et al., 2001). Atraviesa de manera poco eficaz la barrera hemato-encefálica, por lo que la histamina presente en el SNC proviene de las neuronas histaminérgicas y en menor proporción de los mastocitos (Molina-Hernández et al., 2012; Panula et al., 2015). La histamina es sintetizada a partir del amino ácido (aa) L-histidina por la acción de la enzima HDC (Figura 1), y la biodisponibilidad del aa precursor es por tanto el factor limitante de su síntesis.

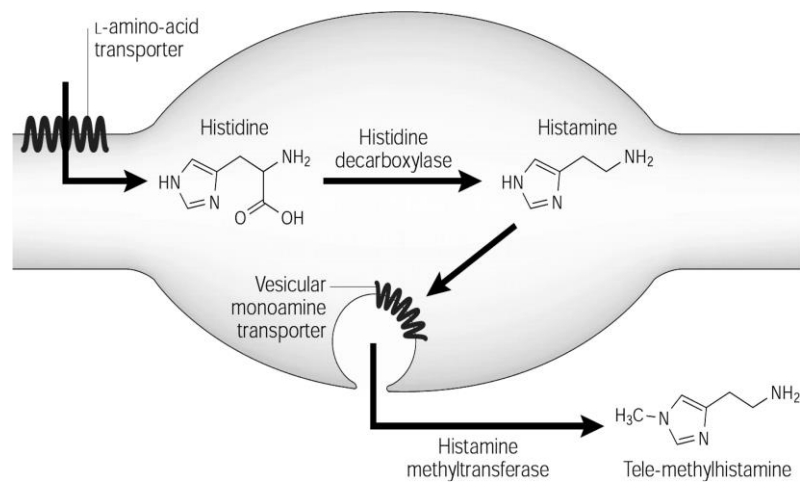


Figura 1. Síntesis y catabolismo de la histamina. La histamina es sintetizada a partir del amino ácido L-histidina por la acción de la enzima descarboxilasa de histidina. La inactivación cerebral de la histamina se debe principalmente a la acción de la enzima N-metiltransferasa de histamina produciendo 3-(*tele*)-metilhistamina. Tomado de Haas, 2008.

La inactivación cerebral de la histamina se debe principalmente a la acción de la enzima N-metiltransferasa de histamina produciendo 3-(*tele*)-metilhistamina que es transformada a ácido 3-(*tele*)-metil-imidazolacético por acción de la enzima monoamino oxidasa tipo B (Figura 1). En tejidos periféricos la diamino oxidasa es la principal enzima que metaboliza la histamina, pero su actividad en el SNC es baja (Barnes y Hough, 2002; Maldonado y Maeyama, 2015). Una forma eficaz de reducir la concentración de los neurotransmisores en el espacio sináptico es mediante sistemas de recaptura. A diferencia de otras neuronas aminérgicas, las neuronas histaminérgicas no poseen un sistema de recaptura específico; sin embargo, los astrocitos pueden capturar a la histamina a través del transportador de monoaminas y del transportador 3 de cationes orgánicos (Yoshikawa et al., 2013).

2.2 Sistema histaminérgico del SNC

Las neuronas histaminérgicas del TMN envían proyecciones a prácticamente todas las regiones del SNC a través de tres principales vías: dos ramas ascendentes que inervan estructuras del encéfalo y una rama descendente que llega a la médula espinal (Figura 2; Watanabe et al., 1984; Airaksinen y Panula, 1988; Haas, 2008).

La histamina almacenada en las vesículas presentes en las terminales sinápticas de las neuronas histaminérgicas es liberada por exocitosis inducida por el arribo de potenciales de acción (Haas, 2008). La síntesis y liberación de la histamina es regulada por los autoreceptores H₃ y por heterorreceptores muscarínicos M₁, adrenoceptores α_2 y receptores GABA_B (Arrang et al., 1983, 1987; Morisset et al., 2000).

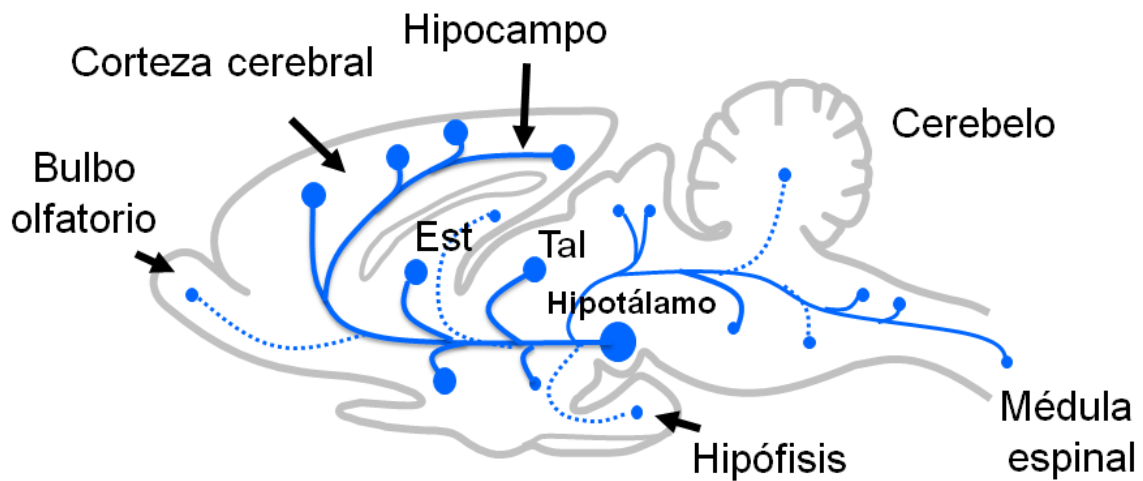


Figura 2. Sistema histaminérgico en el cerebro de la rata. La histamina es sintetizada por neuronas histaminérgicas presentes en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo posterior, las cuales envían proyecciones al SNC a través de tres principales vías, dos ramas ascendentes que inervan estructuras del encéfalo, y una rama descendente que llega a la médula espinal. Est, estriado), Tal, tálamo. Modificado de Nieto-Alamilla et al., 2016.

2.3 Receptores a histamina

En los mamíferos la transmisión histaminérgica es mediada por receptores de siete dominios transmembranales y acoplados a proteínas G (GPCRs). A la fecha se conocen cuatro subtipos de estos receptores: H₁, H₂, H₃ y H₄ (Panula et al., 2015). Las diferencias entre los subtipos de receptores se basan en la estructura molecular, la afinidad por la histamina, la región donde se expresan y sus características de señalización. De manera general, los receptores H₁ y H₂ se expresan en diversos tejidos incluyendo el SNC, el receptor H₃ se expresa de manera preferencial en los sistemas nerviosos central y periférico, y el receptor H₄ se expresa en células del sistema inmune (Leurs et al., 2005; Panula et al., 2015).

2.3.1 Receptor a histamina H₁

El ADNc para el receptor H₁ (H₁R) se clonó por primera vez en 1991 en células de la médula adrenal de bovino (Yamashita et al., 1991). Este receptor se acopla a proteínas G $\alpha_{q/11}$ y se expresa en una gran variedad de tejidos, incluyendo el músculo liso de los bronquios, el intestino, las vías urinarias y los vasos sanguíneos, así como en las células cromafines de la médula de las glándulas suprarrenales, y en el SNC se expresa en la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo *accumbens*, el tálamo y el hipotálamo (Yanai et al., 1992; Panula et al., 2015). Los H₁Rs participan en funciones como respuestas alérgicas, contracción del músculo liso y la regulación del ciclo vigilia-sueño (Hill et al., 1997; Panula et al., 2015; Monczor y Fernández, 2016).

2.3.2 Receptor a histamina H₂

El primer ADNc clonado para el receptor H₂ (H₂R) fue el canino (Gantz et al., 1991). Los receptores H₂ se acoplan a proteínas G α_s y al igual que el H₁R se encuentran expresados en diversos tejidos a nivel periférico y a nivel del SNC. Las acciones principales de estos receptores incluyen la estimulación de la secreción de ácido gástrico, la regulación del ciclo vigilia-sueño y la regulación de la ingesta de agua (Ramos-Jiménez et al., 2009; Panula et al., 2015; Monczor y Fernández, 2016).

2.3.3 Receptor a histamina H₃

El receptor a histamina H₃ (H₃R) fue identificado por primera vez en 1983 por Jean-Michael Arrang y Jean Charles Schwartz, quienes mostraron que este receptor era responsable de la retroalimentación negativa de la liberación de la histamina en rebanadas del cerebro de la rata. Posteriormente se le atribuyeron otras funciones neuromoduladoras a este receptor, como la inhibición de la síntesis de la propia histamina (Arrang et al., 1987) y la inhibición de la liberación de los neurotransmisores noradrenalina, serotonina, dopamina, ácido glutámico, y

ácido γ -aminobutírico (GABA), entre otros (Haas, 2008; Panula y Nuutinen, 2013, Márquez-Gómez et al., 2016).

El ADNc para el H₃R humano (hH₃R) fue clonado en 1999 por el grupo de Lovenberg, mostrándose su acople a proteínas G α_i/o . El H₃R se expresa primordialmente en células neuronales del SNC y del sistema nervioso periférico (Panula et al., 2015; Monczor y Fernández, 2016), y participa en procesos como el ciclo vigilia-sueño, la actividad motora, la circulación cerebral, la regulación de la temperatura corporal, la ingestión de agua y alimentos, la nocicepción y la memoria y el aprendizaje (Panula et al., 2015).

2.3.4 Receptor a histamina H₄

En el año 2000, un cuarto receptor a histamina (H₄R) fue clonado (Nakamura et al., 2000). De manera similar al H₃R, el H₄R activa proteínas G α_i/o ; sin embargo, su expresión parece estar limitada a células hematopoyéticas y su función se relaciona con la maduración de estas células y el control de la respuesta inmune (Panula et al., 2015; Monczor y Fernández, 2016).

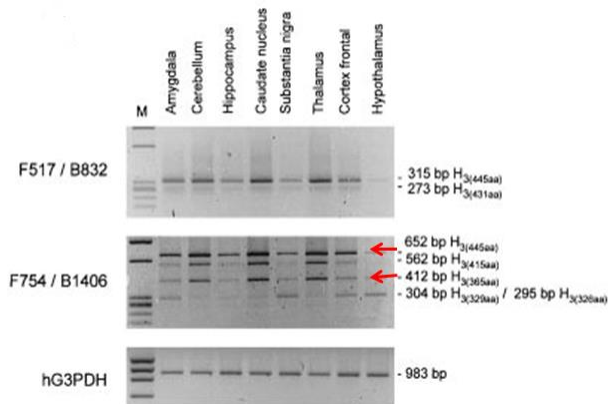
2.4 Isoformas del H₃R

La clonación de la secuencia codificante (cDNA) del H₃R humano (hH₃R) en 1999 por Lovenberg et al. permitió el estudio molecular del receptor, mostrando que el gene codificante se encuentra en el brazo largo del cromosoma 20 (20q13.32-20q13.33) y que el cDNA codifica una proteína de 445 aa con baja homología con el H₁R y el H₂R (Bongers et al., 2007a). El análisis de la secuencia de nucleótidos del gene muestra que contiene 3 exones y 2 intrones (Tardivel-Lacombe et al., 2001; Wiedemann et al., 2002), lo que permite la generación de isoformas del receptor por procesamiento alternativo (*alternative splicing*). El exón 1 contiene la secuencia que codifica desde el primer aa (Metionina) hasta la parte N-terminal del

dominio transmembranal 2 (TM2). El exón 2 codifica desde la parte C-terminal del TM2 hasta la región N-terminal del asa intracelular 2 (IL2). En el exón 3 se encuentra la secuencia que codifica la parte C-terminal de la IL2 hasta el final del hH₃R (Tardivel-Lacombe et al., 2001). En la estructura del gene los dos intrones están localizados en la misma posición, tanto en el humano como en roedores, sugiriendo la existencia de isoformas funcionales y no funcionales con cierta similitud entre diferentes especies (Tardivel-Lacombe et al., 2000; Drutel et al., 2001; Morisset et al., 2001; Wellendorph et al., 2002).

El análisis por la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retro-transcripción (RT-PCR) ha permitido identificar hasta el momento 20 isoformas del hH₃R con diferencias en la longitud de los extremos amino y carboxilo terminal, truncaciones en la tercera asa intracelular (IL3) y secuencias faltantes en las regiones transmembranales. Se ha descrito que la existencia de varias isoformas del hH₃R se debe a mecanismos de procesamiento que involucran la retención/eliminación de un pseudo-intrón (Tardivel-Lacombe et al., 2001), además de que algunas isoformas son generadas por la combinación de eventos de procesamiento alternativo (Tsui, 2001; Wellendorph et al., 2002). De las 20 isoformas del hH₃R descritas, se ha determinado que solamente cinco son funcionales al ser expresadas en sistemas heterólogos (Tabla 1).

Mediante estudios de RT-PCR, Cogé et al. (2001), Esbenshade et al. (2006) y Bongers et al. (2007b) mostraron la expresión diferencial de varias isoformas del receptor en tejido cerebral humano, siendo las isoformas de 445 (hH₃R₄₄₅) y 365 (hH₃R₃₆₅) aa las que se encuentran expresadas con mayor abundancia y en diversas regiones (Figura 3). La expresión de las isoformas en líneas celulares en conjunto con ensayos de movilización de calcio, de unión de [³⁵S]-GTP γ S y de inhibición de la formación de AMPc mostraron que ambas isoformas son funcionales (Tabla 1), aunque con diferentes propiedades farmacológicas, por lo que se considera que la isoforma hH₃R₃₆₅ también participa en la transmisión histaminérgica y en las funciones atribuidas de manera general al hH₃R.



| Expresión en el cerebro humano | | |
|--------------------------------|-----|---|
| H ₃ (445) | +++ | Amígdala, núcleo caudado, sustancia negra, tálamo, hipotálamo, cerebelo |
| H ₃ (415) | - | No detectada |
| H ₃ (413) | + | Amígdala, núcleo caudado |
| H ₃ (365) | +++ | Amígdala, núcleo caudado, sustancia negra, tálamo, hipotálamo, cerebelo |
| H ₃ (329) | + | Amígdala |

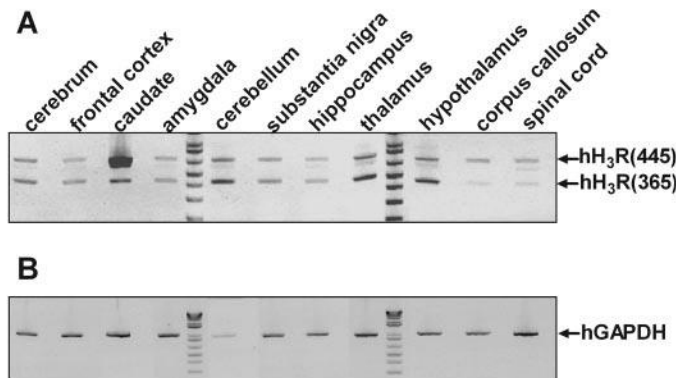


Figura 3. Expresión del ARNm de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ en diferentes regiones del SNC humano. Las figuras muestran la amplia y abundante expresión del ARNm de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅. Modificado de Cogé et al. (2001), Esbenshade et al. (2006) y Bongers et al. (2007b).

El hH₃R₃₆₅ tiene 80 residuos menos en la tercera asa intracelular (IL3) del receptor, región importante para el acople receptor-proteína G (Wess, 1997; Oldham y Hamm, 2007), para la fosforilación por cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y para la unión de las proteínas β -arrestinas en el mecanismo de desensibilización homóloga (Ferguson, 2001; Luttrell y Lefkowitz, 2002; Marchese et al., 2008; ver más adelante), por lo que es probable que dadas

las diferencias estructurales entre esta isoforma y la de 445 aa, los mecanismos implicados en la desensibilización sean diferentes.

Tabla 1. Expresión y señalización de las isoformas del hH₃R

| Isoforma (aa) | Expresión en el SNC | Señalización | Referencias |
|-----------------------|---|---|---|
| H ₃ (445) | Tálamo, neocórtex, corteza cerebral, cerebelo, amígdala, sustancia negra, hipocampo, hipotálamo, cuerpo calloso, médula espinal | ↓ AMPc, ↑ [Ca ²⁺] _i ↑ p42/p44-MAPK, ↑ unión de [35S]-GTPγS | Lovenberg et al., 1999; Nakamura et al., 2000; Cogé et al., 2001; Tardivel-Lacombe et al., 2001; Tsui, 2001; Wiedemann et al., 2002; Wellendorph et al., 2002; Gallagher y Yates, 2007; Bongers et al., 2007a,b |
| H ₃ (453) | ND | ↓ AMPc | |
| H ₃ (415) | Tálamo, cerebelo, amígdala | ↑ [Ca ²⁺] _i | |
| H ₃ (373) | Hipocampo, sustancia negra, amígdala, hipotálamo | ↓ AMPc | |
| H ₃ (365) | Cerebelo, tálamo, hipotálamo, neocórtex, sustancia negra, hipocampo, amígdala, corteza cerebral | ↓ AMPc, ↑ [Ca ²⁺] _i ↑ unión de [35S]-GTPγS | |
| H ₃ (431) | Amígdala, cerebelo, córtex, tálamo, corteza prefrontal | ND | |
| H ₃ (413) | Córtex, amígdala | ND | |
| H ₃ (409) | ND | ND | |
| H ₃ (395) | ND | ND | |
| H ₃ (379) | ND | ND | |
| H ₃ (351) | ND | ND | |
| H ₃ (340) | ND | ND | |
| H ₃ (329a) | SN, amígdala, corteza cerebral, hipotálamo | NF | |
| H ₃ (329b) | ND | ND | |
| H ₃ (326) | SN, corteza prefrontal, amígdala, hipotálamo | ND | |
| H ₃ (309) | ND | NF | |
| H ₃ (301) | ND | NF | |
| H ₃ (293) | ND | ND | |
| H ₃ (290) | ND | ND | |
| H ₃ (221) | ND | ND | |

Se indican las 20 isoformas del hH₃R generadas por procesamiento alternativo. La funcionalidad de las isoformas se ha evaluado en sistemas de expresión heteróloga. ↑ aumento; ↓ disminución; [Ca²⁺]_i, concentración intracelular de calcio. ND, no determinado; NF, no funcional.

2.5 Señalización intracelular del H₃R

Como se mencionó anteriormente, el H₃R comunica señales al interior de las células mediante la activación de proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Clark y Hill, 1996), conduciendo a la inhibición de la actividad de las adenilil ciclasas 1, 3, 5, 6, 8 y 9 (Watts y Neve, 2005), y consecuentemente a la disminución de la formación de AMPc (Seyedi et al., 2005; Bongers et al., 2007a), efecto que es abolido por la toxina de *Bordetella pertussis* (PTX, Shi et al., 2012). Otra vía de señalización debida a la activación de proteínas G $\alpha_{i/o}$ es la inhibición del intercambiador Na⁺/H⁺, importante para el mantenimiento del pH intracelular en la acidosis inducida por la isquemia miocárdica (Karmazyn, 1999; Silver et al., 2001; Leurs et al., 2005).

Mediante los dímeros $\beta\gamma$ de las proteínas G $\alpha_{i/o}$, el H₃R inhibe la apertura de canales de Ca²⁺ activados por voltaje (N y P/Q), por unión de los dímeros a la subunidad α_1 de los canales (Takeshita et al., 1998; Silver et al., 2001; Morrey et al., 2008; Zamponi y Currie, 2013), efecto que subyace a la acción inhibitoria de los H₃Rs en la liberación de neurotransmisores inducida por despolarización.

Los dímeros $\beta\gamma$ también puede activar otras vías efectoras, como la vía de la 3-cinasa de fosfatidil-inositol (PI3K) (Bongers et al., 2007b; Mariottini et al., 2009) y la vía de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs). La activación de las MAPKs por el H₃R puede ser también debida a las proteínas β -arrestinas, las cuales se unen al receptor previamente activado para inducir la internalización del mismo en el proceso de desensibilización (ver más adelante), o probablemente por la transactivación de receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosina (Drutel et al., 2001; Giovannini et al., 2003; Flores-Clemente et al., 2013; Lai et al., 2016).

El H₃R también puede inducir la movilización de Ca²⁺ desde depósitos intracelulares por activación por el dímero $\beta\gamma$ de la fosfolipasa C (PLC) y la consecuente formación de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP₃; Cogé et al., 2001;

Bongers, 2008; Rivera-Ramírez et al., 2016). Por otra parte, el H₃R puede inducir liberación de ácido araquidónico mediante la activación de la fosfolipasa A₂ (Burgaud y Oudart, 1993), y mediante los dímeros βγ la activación de canales de K⁺ rectificadores entrantes (GIRKs), representando este último un mecanismo adicional de los receptores para modular la liberación de los neurotransmisores (Bünemann et al., 2001; Meneses et al., 2015).

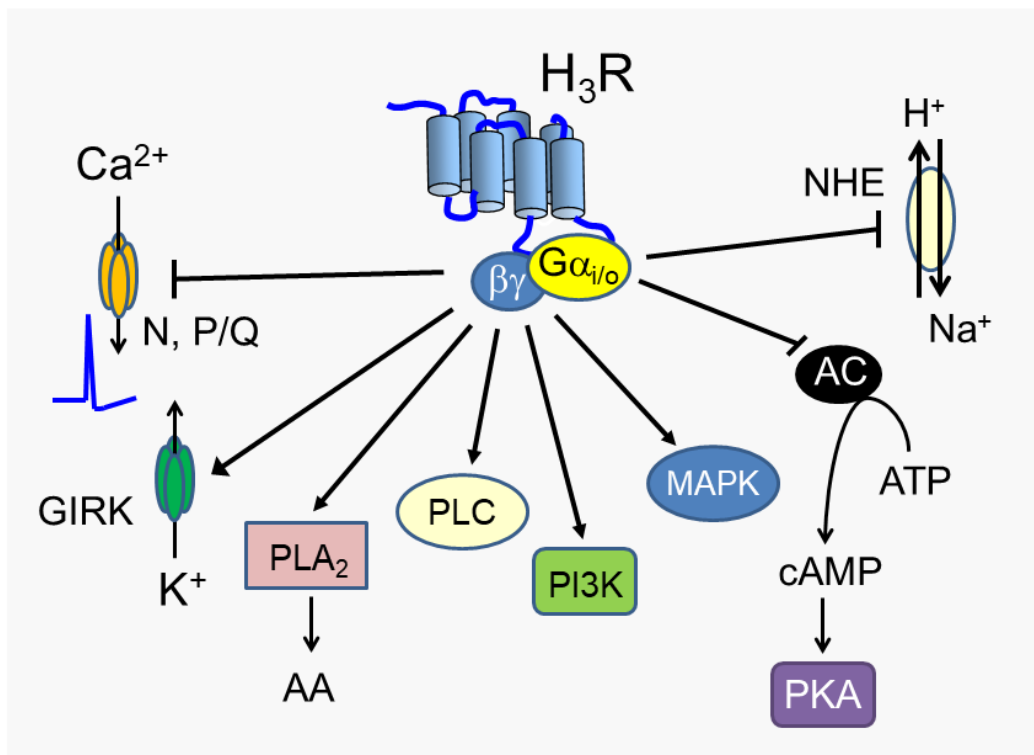


Figura 4. Vías de señalización del H₃R. El receptor activa o modula varias vías de señalización mediante la subunidad Gα o los dímeros βγ de las proteínas Gα_{i/o}. Para más detalle ver al texto. AA, ácido araquidónico; AC, adenilil ciclasa; AMPc, 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina; GIRKs, canales de K⁺ rectificadores entrantes; MAPK, cinasa de proteína activada por mitógenos; NHE, intercambiador Na⁺/H⁺; PI3K, 3-cinasa de fosfatidilinositol (PI3K); PKA, cinasa A de proteínas; PLA₂, fosfolipasa A₂; PLC, fosfolipasa C. Tomado de Nieto-Alamilla et al., 2016.

2.6 Actividad constitutiva del H₃R

La actividad constitutiva se define como la habilidad de un receptor para activar vías de señalización independientemente de la unión de un agonista. Estructuralmente, un receptor constitutivamente activo se encuentra en un estado conformacional que le permite activar proteínas G y por lo tanto las vías de señalización corriente abajo.

La actividad constitutiva del H₃R humano (hH₃R), de la rata (rH₃R) y del ratón (mH₃R) se ha evaluado para receptores recombinantes expresados en líneas celulares y en receptores nativos del cerebro de roedores (Morisset et al., 2000; Wieland et al., 2001; Rouleau et al., 2002). Los agonistas inversos inducen y estabilizan un estado conformacional del receptor de menor actividad reduciendo la señalización constitutiva, y por lo tanto disminuyen la unión basal de [³⁵S]-GTP γ S en membranas de células de neuroblastoma y CHO transfectadas con los hH₃R, rH₃R y mH₃R, así como en membranas de varias regiones cerebrales donde se expresan endógenamente los rH₃R y mH₃R. La expresión del receptor de las tres especies en líneas celulares induce también la activación e inhibición constitutivas de las enzimas fosofolipasa A₂ y adenilil ciclasas respectivamente, efecto revertido por agonistas inversos (Morisset et al., 2000; Wieland et al., 2001; Rouleau et al., 2002). En sinaptosomas corticales del ratón la inhibición basal de la liberación de histamina por el mH₃R es reducida por agonistas inversos, indicando además la actividad constitutiva de dos isoformas del mH₃R (mH₃R₄₄₅ y mH₃R₄₁₃; Morisset et al., 2000), las cuales difieren en la longitud de la IL3, sugiriendo que la actividad constitutiva no es específica de una isoforma, sino que puede observarse para otras variantes del receptor con expresión abundante.

Se ha descrito que la región C-terminal de la IL3 de los GPCRs es crítica para la actividad constitutiva (Pei et al., 1993; Rouleau et al., 2002). En este sentido, el rH₃R posee un motivo SRDKKVAK que se observa también en la secuencia del

hH₃R, con siete aa idénticos y uno conservado (SRDRKVAK; Nieto-Alamilla et al., 2016). Como mostraron Morisset et al. (2000), este motivo está conservado en la región C-terminal de la IL3 del adrenoceptor β_2 con una mutación que le confiere actividad y desensibilización constitutivas (Pei et al., 1993). Así, es posible que esta secuencia ubicada en la IL3 le confiera actividad constitutiva al H₃R; sin embargo, los tres residuos iniciales del motivo SRDRKVAK del hH₃R son diferentes (PLHRKVAK) en el receptor de 365 aa, por lo que es factible que la actividad constitutiva sea diferente entre las isoformas del receptor.

2.7 Regulación funcional de los GPCRs

La regulación de la función de los GPCRs previene la sobre-activación que pueda conducir a situaciones patológicas, o bien conduce al aumento de la disponibilidad de los receptores en situaciones que requieran una respuesta de mayor magnitud. Los GPCRs tienen diferentes mecanismos reguladores, que van desde el control de su expresión en la superficie celular (mayor o menor número de receptores que puedan ser activados por el agonista), hasta la regulación de la eficacia de su función.

La desensibilización consiste en la disminución de la capacidad de los receptores para activar proteínas G, y por lo tanto las vías de señalización intracelulares (Gainetdinov et al., 2004). Existen diferentes mecanismos y proteínas que participan en la desensibilización como las cinasas de proteínas activadas por segundos mensajeros, activadas por un receptor diferente al que será desensibilizado y que fosforilan a los receptores blanco para disminuir su actividad, fenómeno conocido como desensibilización heteróloga (Kelly et al., 2008).

La actividad de los GPCRs puede ser modulada también por otro tipo de cinasas, las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), que fosforilan al

receptor cuando éste es sobre-activado por un agonista (desensibilización homóloga). La fosforilación promueve el reclutamiento de las proteínas β -arrestinas, clatrina y dinamina, impidiendo el re-acople de los GPCRs a las proteínas G y conduciendo a su internalización (Ferguson 2001; Luttrell y Lefkowitz, 2002; Gainetdinov et al., 2004). Por otro lado, un grupo de proteínas accesorias denominadas RGS (por sus siglas en inglés, *Regulators of G protein Signaling*) actúan como aceleradoras de la actividad de GTPasas, por lo que promueven la hidrólisis del GTP unido a la subunidad $G\alpha$ de la proteína G y por lo tanto la inactividad de las proteínas, resultando en disminución de la eficacia de la señalización del GPCR (Hollinger y Hepler, 2002; Sjögren et al., 2010; Gainetdinov et al., 2004).

2.8 Desensibilización de los GPCRs

Una forma de regulación de los GPCRs ampliamente estudiada es la desensibilización funcional, la cual puede ser heteróloga (independiente de agonista e inducida por segundos mensajeros previamente activados por la vía de señalización de un receptor diferente al que será desensibilizado), y/o homóloga (inducida por un agonista del receptor, es decir, el receptor es activado previamente). Esta última implica la fosforilación del receptor en la IL3 y/o en el carboxilo terminal (C-terminal) por las GRKs cuando el receptor es ocupado por un agonista. Una vez fosforilado, se unen al receptor las proteínas β -arrestinas, las cuales previenen por impedimento estérico la unión y activación de proteínas G a pesar de la estimulación continua del receptor por el agonista. La fosforilación del receptor por GRKs y el reclutamiento de las β -arrestinas pueden inducir la internalización del mismo a través de cubiertas de clatrina o por caveolas, desde la superficie celular hacia endosomas tempranos, donde el receptor puede ser re-sensibilizado a corto o largo plazo, o ser dirigido a degradación vía lisosomal (Figura 5; Ferguson, 2001; Luttrell y Lefkowitz, 2002; Gainetdinov et al., 2004; Marchese et al., 2008).

2.8.1 Fosforilación de los GPCRs

De acuerdo al modelo canónico (Figura 5), la fosforilación es parte del mecanismo de desensibilización de los GPCRs y ocurre en tiempos cortos, que van de segundos a minutos, dependiendo del tipo de receptor y el ambiente celular donde se expresa. En el proceso de regulación de la respuesta funcional los GPCRs, estos pueden ser fosforilados por las cinasas de proteína A y C (PKA y PKC, respectivamente) activadas por segundos mensajeros, o por GRKs, y la fosforilación puede inducir el reclutamiento de otras proteínas que participan en la desensibilización del receptor impidiendo el reclutamiento del mismo a proteínas G. En el caso de la desensibilización homóloga de los GPCRs, la participación de las GRKs es crítica (Luttrell y Lefkowitz, 2002; Gainetdinov et al., 2004).

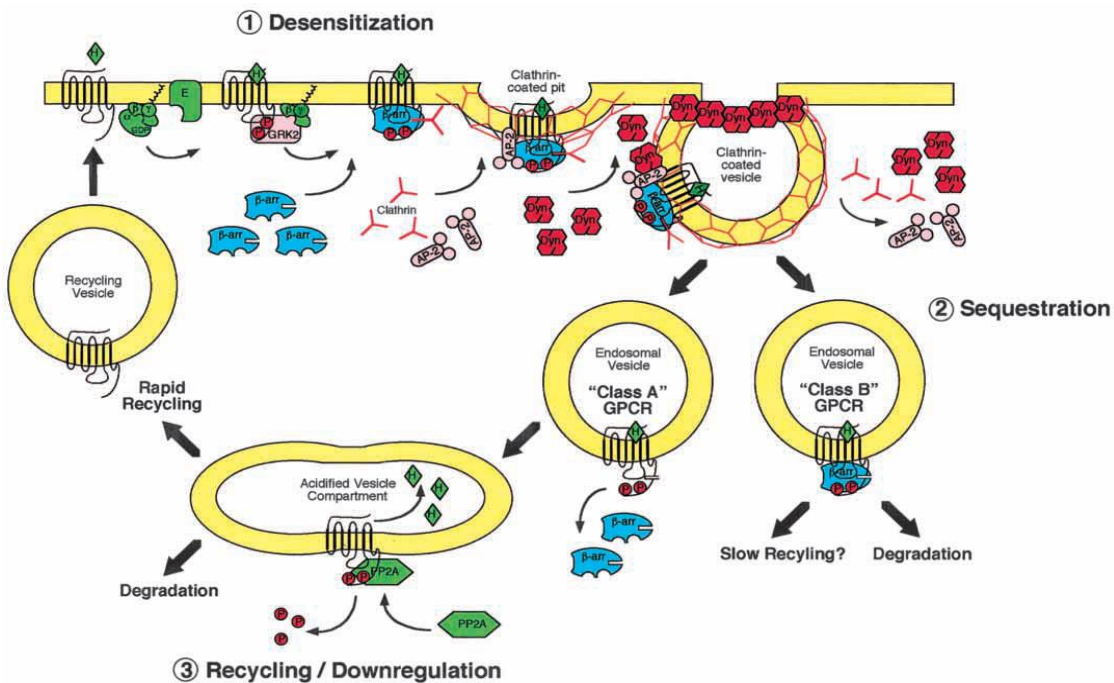


Figura 5. Mecanismo canónico de la desensibilización homóloga de los GPCRs. Para más detalle ver el texto. Tomado de Luttrell y Lefkowitz 2002.

Las GRKs fosforilan residuos de Serina y/o Treonina cercanos a ácidos (Glutamato o Aspartato), o en regiones de repetidos de Serina y/o Treonina (Palczewski et al., 1989; Onorato et al., 1991) ubicados principalmente en la IL3 y en el dominio C-terminal del receptor. Existen siete subtipos de GRKs clasificados en tres subfamilias de acuerdo con su estructura y similitud funcional (Gainetdinov et al., 2004). Estructuralmente estas familias comparten un dominio N-terminal o de homología a las proteínas RGS lo que les permite el reconocimiento de los GPCRs, un dominio catalítico central y un dominio C-terminal donde se observan diferencias estructurales y las características que les permite anclarse a la membrana plasmática o ser reclutadas por otras proteínas de membrana (Figura 6).

La primera subfamilia está conformada por GRK1 y GRK7, denominadas también cinasas visuales por su expresión restringida a la retina, y que en su extremo C-terminal tiene modificaciones post-traduccionales que les permiten anclarse a la membrana celular. La segunda familia incluye GRK2 y GRK3, cinasas citoplasmáticas para las cuales se ha descrito su participación en la fosforilación y regulación funcional de varios GPCRs, y que en su extremo C-terminal contienen un dominio de homología a pleckstrina que les permite interactuar con los dímeros $\beta\gamma$ de las proteínas G y con el PIP₂ (4,5-bisfosfato de fosfatidil-inositol) membranal. La tercera subfamilia está conformada por GRK4, GRK5 y GRK6, las cuales se anclan a la membrana celular a través de modificaciones lipídicas en su extremo C-terminal (Ferguson, 2007; Gainetdinov et al., 2004).

Los miembros de las subfamilias GRK2/3 y GRK4/5/6 están ampliamente distribuidos en regiones cerebrales como la corteza cerebral, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, la sustancia negra compacta, el cerebelo y el neocórtex (Premont y Gainetdinov, 2007), por lo que estas cinasas pueden participar en la regulación funcional de diferentes GPCRs en el SNC.

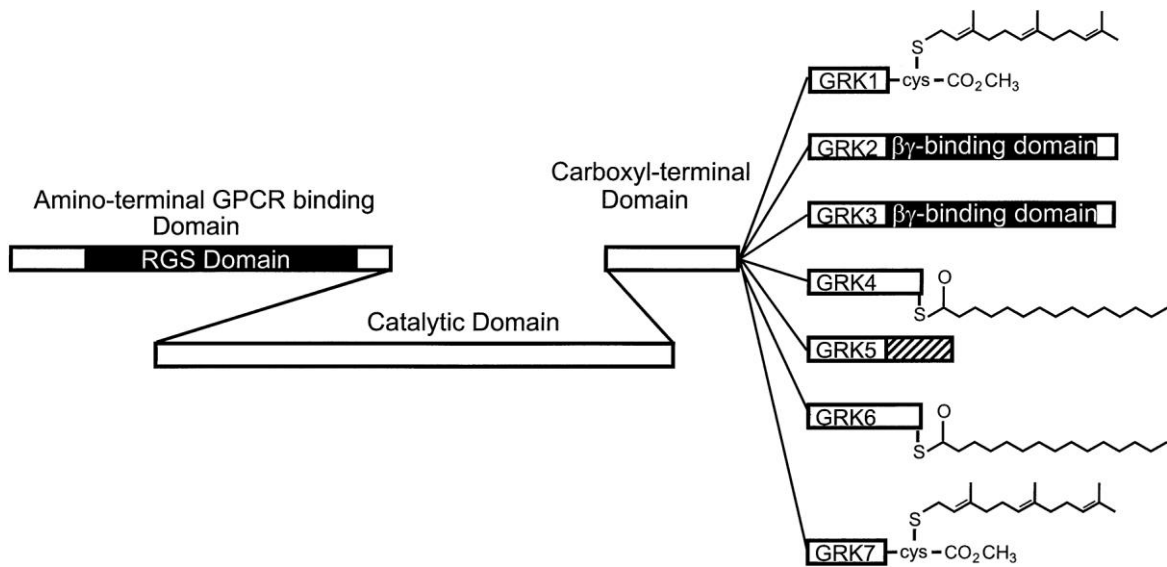


Figura 6. Estructura de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs).

Las GRKs poseen un extremo N-terminal que contiene un dominio de homología con las proteínas RGS, lo que les permite el reconocimiento de los GPCRs; un dominio catalítico central, y un dominio C-terminal variable que les permite anclarse a la membrana plasmática o ser reclutadas por otras proteínas de membrana. Tomado de Ferguson, 2001.

El ARNm de la GRK2 y la GRK3 tiene un patrón de expresión similar y abundante en la corteza cerebral, las islas de Calleja, el hipotálamo, el tálamo, el hipocampo, la sustancia negra compacta (SNr), la corteza cerebelar, el locus *coeruleus* y el neocórtex (Gaintetdinov et al., 2004; Premont y Gaintetdinov, 2007). Por otra parte, las GRK4 y GRK5 parecen tener una distribución principal en tejidos periféricos, mientras que la GRK6 tiene una distribución ubicua. En el cerebro, el patrón de expresión del ARNm de GRK6 es similar al del ARNm de la GRK2; sin embargo, la expresión del ARNm de GRK6 es mayor en la sustancia negra y el neocórtex. Además, el análisis con inmunohistoquímica reveló una alta expresión de la proteína GRK6 en las neuronas GABAérgicas espinosas medianas y en las interneuronas colinérgicas del neocórtex (Vourliotis et al., 2001;

Gaintetdinov et al., 2004). La amplia y abundante expresión de las GRK2/3 y GRK6 en diferentes regiones cerebrales sugiere en consecuencia que varios GPCRs expresados en el SNC son sustratos de estas cinasas en el proceso de desensibilización.

2.8.2 Internalización de los GPCRs

De acuerdo con el modelo clásico (Figura 5), los GPCRs son internalizados como consecuencia de la desensibilización de los mismos; sin embargo, estos mecanismos no están necesariamente asociados, es decir, puede existir desensibilización de un receptor sin internalización. Estudios con diferentes GPCRs indican que la internalización ocurre en minutos a horas, lo que depende del receptor en cuestión (Ferguson et al., 2001; Gainetdinov et al., 2004).

Los GPCRs son internalizados por endocitosis mediada por clatrina o por la vía endocítica mediada por caveolas (Lamaze et al., 2001). La primera vía implica el direccionamiento del receptor a zonas de la membrana celular ricas en moléculas de clatrina, donde el receptor es endocitado por invaginaciones de la membrana celular cubiertas de clatrina ubicadas en el espacio intracelular de la membrana plasmática. En esta vía de endocitosis, además de clatrina se requieren moléculas adaptadoras como el complejo hetero-tetraédrico AP2 que forma un puente para unir a las β -arrestinas previamente reclutadas al receptor con las cubiertas de clatrina (Ferguson et al., 2001; Gainetdinov et al., 2004), y la dinamina, una Tasa que promueve la fisión de la invaginación para la conversión posterior de la membrana en una vesícula (Ferguson et al., 2001).

La vía endocítica mediada por caveolas implica la invaginación de micro dominios de la membrana plasmática enriquecidos con colesterol y caveolina-1. Estas estructuras se denominan balsas lipídicas o caveolas, y este tipo de endocitosis participa en la internalización de esfingolípidos, toxinas unidas a los esfingolípidos (como la toxina del cólera), hormonas, virus y bacterias (Nabi y Le, 2003). Los

mecanismos moleculares de este tipo de endocitosis involucran la actividad GTPasa de la proteína dinamina para la fisión de la invaginación, la señalización por cinasas de tirosina, y la polimerización y despolimerización de los microtúbulos y los filamentos de actina (Mundy et al., 2002; Le et al., 2002; Nabi y Le, 2003).

2.9 Desensibilización homóloga de los receptores a histamina

La desensibilización funcional homóloga de los receptores a histamina ha sido evaluada en sistemas de expresión heteróloga y en sistemas nativos, mediante la pre-exposición de los receptores a concentraciones elevadas de agonista o por tiempos prolongados.

Receptor a histamina H₁

El receptor a histamina H₁ humano (hH₁R) se acopla a proteínas G $\alpha_{q/11}$ y su vía canónica de señalización es la activación de fosfolipasa C (PLC), para formar IP₃ y activar a la PKC a partir de la hidrólisis del PIP₂. La sobre-activación del hH₁R expresado endógenamente en células de músculo liso uterino con concentraciones elevadas de histamina (100 μ M) conduce a disminución de su respuesta funcional que se manifiesta como reducción en la actividad de la PLC, de la formación de IP₃ y de la movilización de calcio desde depósitos intracelulares. En este proceso se mostró la participación de la cinasa GRK2, y no de GRK3, GRK5 y GRK6 (Willets et al., 2008).

Receptor a histamina H₂

El receptor a histamina H₂ humano (hH₂R) se acopla a proteínas G α_s y su activación conduce a la estimulación de las adenilil ciclasas con la subsecuente formación de AMPc. La capacidad del hH₂R transfectado en células COS-7 para inducir la formación de AMPc disminuye rápidamente ($t_{1/2}$ 0.4 min) cuando es pre-expuesto al agonista amtamina. Además, la sobre-expresión de GRK2 y GRK3, pero no de GRK5 y GRK6, acelera la disminución de la actividad del H₂R con la

concomitante reducción del número de receptores expresados en la membrana celular, indicando desensibilización homóloga del receptor debida a GRK2 y GRK3, y la internalización del receptor (Shayo et al., 2001).

Receptor a histamina H₃

Una de las primeras evidencias de que el H₃R puede experimentar desensibilización fue presentada en el 2006 por Garduño-Torres y Arias-Montaño, quienes mostraron en preparaciones de membranas estriatales de la rata una disminución en el número de receptores (*down-regulation*). Mediante ensayos de saturación de la unión de [³H]-NMHA se observó que el pre-tratamiento de rebanadas estriatales con immpip (agonista selectivo del H₃R) disminuyó la unión máxima del radioligando (B_{max}) y la afinidad de los receptores por [³H]-NMHA, indicando un menor número de receptores en la membrana celular (endocitosis) como efecto de la pre-exposición a agonista; además, se observó recuperación parcial de los receptores internalizados (34%) a los 90 min de lavado del agonista, argumentando que el receptor experimenta degradación. Experimentos realizados con el hH₃R de 445 aa expresado establemente en células CHO-K1 muestran que este receptor experimenta desensibilización funcional homóloga, estando involucradas en el mecanismo las GRK2 y GRK3, y la endocitosis del receptor mediante cubiertas de clatrina (Osorio-Espinoza et al., 2014).

2.10 Desensibilización constitutiva de los GPCRs

En los últimos 25 años se ha descrito la actividad y la desensibilización constitutivas, independientes de agonista, de los GPCRs, además de la función de ciertas regiones de los receptores en ambos fenómenos.

Como se ha indicado anteriormente, en la desensibilización homóloga los GPCRs sobre-activados por agonista pueden ser fosforilados por GRKs o por cinasas activadas por segundos mensajeros, para después ser internalizados a través de

cubiertas de clatrina (Ferguson et al., 1996; Gainetdinov et al., 2004). En la desensibilización constitutiva un GPCR puede ser fosforilado y/o endocitado, pero el mecanismo no depende de la pre-activación del receptor con agonista, es decir, ocurre en condiciones basales (Pei et al., 1994; Miserey-Lenkei et al., 2002; Rankin et al., 2006; Sullivan et al., 2016). Como se mencionó en el apartado de actividad constitutiva (página 19), la desensibilización e internalización constitutivas de un GPCR también pueden ser reguladas por agonistas inversos (Figura 7), permitiendo que los receptores constitutivamente desensibilizados se re-sensibilicen, es decir, inducen la permanencia del receptor en la superficie celular y la disponibilidad para ser ocupado y activado por un agonista, resultando en una respuesta funcional mayor una vez que el agonista inverso es removido del sitio de unión.

Mutaciones en la región C-terminal de la IL3 del adrenoceptor β_2 inducen cambios conformacionales que promueven su actividad independiente de agonista, y se ha observado que la actividad espontánea de estos receptores puede ser reducida por desensibilización constitutiva con la participación de GRK2 y la degradación de los receptores (Pei et al., 1994). En un estudio realizado por Miserey-Lenkei y colaboradores (2002), usando mutantes constitutivamente activos del receptor a angiotensina tipo 1 (AT₁R), se observó que los receptores expresados en células HEK-293 son constitutivamente internalizados y reciclados a la membrana plasmática; además, los agonistas inversos del receptor promueven la localización de los receptores en la superficie celular, sugiriendo desensibilización constitutiva del AT₁R. Por su parte, Rankin y colaboradores (2006) indicaron que el receptor a dopamina D₁ transfectado en células HEK-293 es fosforilado constitutivamente por GRK4 resultando en disminución de la respuesta funcional y pérdida de receptores en la superficie celular. La desensibilización constitutiva también se ha observado para los receptores a opioides μ y δ expresados en neuronas sensoriales periféricas, ya que la falta de respuesta a agonista de los receptores se debe a la actividad y desensibilización constitutivas, y los agonistas inversos promueven la recuperación de la respuesta de los receptores a agonistas (Sullivan et al., 2016).

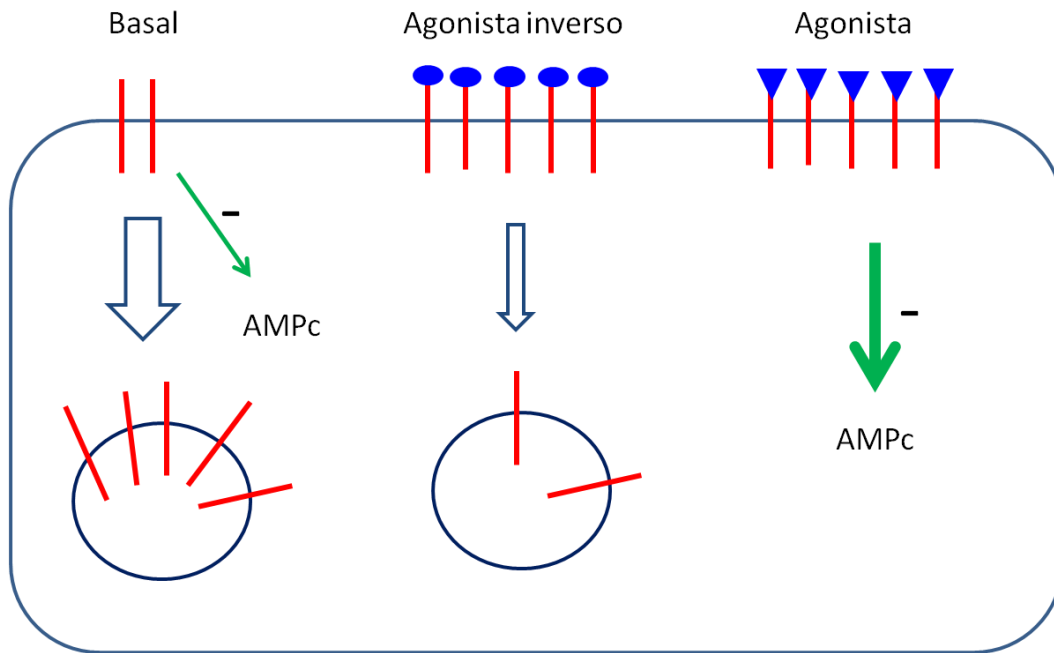


Figura 7. Modelo de la desensibilización e internalización constitutivas de un receptor acoplado a proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$. En condiciones basales el receptor constitutivamente activo (líneas rojas) es desensibilizado e internalizado independientemente de la unión de un agonista, resultando en disminución de la respuesta del receptor. La unión del agonista inverso (óvalos azules) al receptor promueve la permanencia del mismo en la membrana plasmática. Cuando el agonista inverso es retirado, el agonista (triángulo azul) se une y activa al receptor y se observa una mayor respuesta funcional. Se ilustra un receptor acoplado a proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, si bien el modelo puede aplicarse a otros GPCRs.

3. Planteamiento de problema

La histamina ejerce funciones importantes como neuromodulador, y ha sido implicada en enfermedades que afectan funciones cognitivas y motoras y al metabolismo. En el SNC humano, además del hH₃R de 445 aa (hH₃R₄₄₅) la isoforma de 365 aa (hH₃R₃₆₅) se expresa de manera importante en varias regiones cerebrales, y debido a su relativa abundancia es probable que participe también en la regulación de la neurotransmisión.

Datos de nuestro laboratorio indican que el hH₃R₄₄₅ expresado en células CHO-K1 experimenta desensibilización homóloga, un mecanismo importante de regulación de la función de los GPCRs. Dado que la isoforma hH₃R₃₆₅ carece de 80 residuos en la tercera asa intracelular, sitio donde frecuentemente ocurre la fosforilación del receptor por las cinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y la unión de las proteínas β -arrestinas en el proceso de desensibilización homóloga, planteamos que es posible que la desensibilización y/o la internalización del hH₃R₃₆₅ y la del hH₃R₄₄₅ tengan características diferentes.

Por lo anterior, en este trabajo se propuso determinar si la isoforma hH₃R₃₆₅ establemente expresada en células CHO-K1 experimenta desensibilización homóloga y evaluar si existían diferencias en este proceso con respecto a la isoforma hH₃R₄₄₅.

4. Hipótesis

Las características de la desensibilización homóloga de la isoforma de 365 amino ácidos del receptor a histamina H₃ (hH₃R₃₆₅) difieren de las observadas para el receptor de 445 amino ácidos (hH₃R₄₄₅).

5. Objetivos

5.1. General

Determinar si la isoforma hH₃R₃₆₅ expresada establemente en células CHO-K1 experimenta desensibilización homóloga y si existen diferencias con la isoforma hH₃R₄₄₅.

5.2 Específicos

1. Obtener sub-líneas de las células CHO-K1 que expresen de manera estable y similar a las isoformas hH₃R₄₄₅ o hH₃R₃₆₅.
2. Determinar las características farmacológicas de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ expresados en células CHO-K1.
3. Evaluar las características funcionales de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ mediante ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS y de inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina.
4. Determinar si el hH₃R₃₆₅ experimenta desensibilización funcional homóloga mediante ensayos de acumulación de AMPc inducida por forskolina.

5. Establecer si el hH₃R₃₆₅ experimenta internalización como consecuencia de la exposición prolongada a agonista.

6. En su caso, determinar si existen diferencias en las características de desensibilización de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅.

6. Materiales y métodos

6.1 Generación de sublíneas de células CHO-K1 con expresión estable de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅.

Las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ fueron amplificadas en el laboratorio del Profesor Rob Leurs (Vrije Universiteit Amsterdam) a partir de la clona humana RP5-1005F21, y posteriormente fueron subclonadas en el vector pCIneo (5.5 Kb) usando las endonucleasas ECoRI y NotI. La identidad de los receptores fue confirmada por secuenciación y corresponde a las secuencias publicadas de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ (números de GenBank NM_007232 y AF321911.1, respectivamente).

Las células CHO-K1 se cultivaron a una confluencia de ~80% en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) y F12 (1:1) suplementada con suero fetal bovino (SFB) al 10% y una mezcla de penicilina/estreptomicina al 1%, incubándose a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

La transfección celular se efectuó con Lipofectamina 2000 (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA, dilución 1:2.5, ADN:Lipofectamina). Se mezclaron 4 µg del plásmido (pCIneo-hH₃R₄₄₅ o pCIneo-hH₃R₃₆₅) y 10 µl de Lipofectamina en 500 µl de DMEM/F12 libre de SFB y antibióticos, y después de 25 min de incubación a temperatura ambiente la mezcla se agregó a cada uno de los pozos de una caja de 6 pozos. Las células se incubaron a 37 °C y después de 24 h, el medio de mantenimiento se substituyó por medio DMEM/F12 conteniendo SFB (10%) y el antibiótico de selección (geneticina, G-418; 600 µg/ml), manteniéndolas en este medio durante 4 semanas con cambio del medio cada tercer día. Al término de este periodo, las células sobrevivientes se sembraron en medio conteniendo geneticina (400 µg/ml) para realizar los ensayos de unión de [³H]-NMHA a fin de evaluar la densidad de receptores y seleccionar dos sublíneas con expresión similar de las isoformas.

6.2 Experimentos de desensibilización homóloga

Las células CHOK1-hH₃R₄₄₅ y CHOK1-hH₃R₃₆₅ se pre-incubaron durante 15-120 min en solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH) en presencia o ausencia de RAMH (1 μ M), agonista selectivo del H₃R. Al término de la incubación el agonista se retiró aspirando el medio de incubación y se realizaron tres lavados (5 min cada uno) con KRH a 37 °C, para posteriormente evaluar la expresión y la funcionalidad de los receptores. La composición de la solución KRH fue (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.

6.3 Ensayos de unión de [³H]-*N*-metil-histamina ([³H]-NMHA)

Las células CHOK1-hH₃R₄₄₅ y CHOK1-hH₃R₃₆₅ se sembraron 24 h antes del ensayo en cajas de Petri de 10 cm de diámetro con medio DMEM/F12 conteniendo SFB (10%) y el antibiótico de selección G-418 (400 μ g/ml).

Obtención de membranas celulares

Las células se lavaron 1 vez con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, pH 7.4), antes de ser expuestas a la solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4, 4 °C). La suspensión celular se centrifugó a 32,000 \times g (4 °C, 25 min) y la pastilla resultante se re-suspendió en solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7.4).

Ensayos de unión de un solo punto

Muestras de la suspensión membranal (~50 μ g de proteína, determinada por el método de BCA, ácido bicínico) se incubaron por 60 min a 30 °C en 100 μ l de solución de incubación conteniendo ~2 nM de [³H]-NMHA (79.7 Ci/mmol). La reacción se detuvo al agregar solución Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) fría, para rápidamente filtrar a través de papel de fibra de vidrio GF/B previamente

neutralizado con polietilenimina (0.3%, 2 h), utilizando un colector automático Brandel. Los filtros se lavaron tres veces con la misma solución fría y se transfirieron a viales a los que se les adicionaron 4 ml de líquido de centelleo. Después de al menos 4 h, la radioactividad presente en los filtros se cuantificó por centelleometría.

La unión inespecífica se determinó en incubaciones en paralelo que contenían histamina (10 μ M). La unión específica se obtuvo al restar la unión inespecífica de la total; y la cantidad de receptores presentes en las muestras se expresó como fmol/mg de proteína.

Ensayos de saturación

Alícuotas de la suspensión membranal (~50 μ g de proteína) se incubaron por 60 min a 30 °C con concentraciones crecientes (0.1–6.0 nM) de [³H]-NMHA en un volumen de 100 μ l de buffer de incubación. La unión específica y la inespecífica se determinaron como se describió previamente. Los valores de unión máxima (Bmax) y de la constante de disociación (Kd) se determinaron por regresión no lineal usando el programa estadístico GraphPad 5.0.

Ensayos de inhibición

Alícuotas de la suspensión membranal se incubaron a 30 °C durante 60 min en presencia de [³H]-NMHA (~2 nM) y concentraciones crecientes (10^{-11} – 10^{-5} M) de dos agonistas y dos antagonistas/agonistas inversos del hH₃R. La unión específica y la inespecífica se determinaron como se mencionó anteriormente. Las constantes de inhibición (K_i) se determinaron por regresión no lineal (GraphPad 5.0) utilizando la ecuación de Cheng y Prussoff (1973):

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$$

Unión de [³H]-NMHA en células intactas

La unión de [³H]-NMHA a receptores expresados en la superficie celular fue evaluada utilizando lavado ácido como se describe por Heding et al. (1998). Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ cultivadas en cajas de 24 pozos (~3 × 10⁵ células/pozo) se lavaron con PBS frío conteniendo CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 1 mM (PBS Ca/Mg), antes de incubarlas durante 5 h (4 °C) en 220 μl de PBS Ca²⁺/Mg²⁺ conteniendo [³H]-NMHA (~2 nM). La unión específica se obtuvo al restar de la unión total la unión inespecífica, la cual se determinó en paralelo usando 10 μM de clobenpropit.

Al terminar la incubación, las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS Ca²⁺/Mg²⁺ frío para eliminar el radioligando no unido al receptor, posteriormente se realizó un tercer lavado con solución ácida (ácido acético 50 mM, NaCl 150 mM, pH 2.8) para inducir la disociación del radioligando de los receptores. La cantidad de radioligando unido a los receptores expresados en la superficie celular se determinó en el lavado ácido y la unión específica se obtuvo como se describió anteriormente. La unión específica se expresó como receptores por célula después de dividir la radioactividad (desintegraciones/min, dpm) entre el número de células determinado por un contador automático, transformar las dpm en Curies (2.22 × 10¹² dpm/Ci) y después el valor en Curies en fmol del ligando marcado de acuerdo con la actividad específica (79.7 Ci/mmol).

6.4 Unión de [³⁵S]-GTPγS a membranas celulares totales

Células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ cultivadas en cajas de Petri de 10 cm de diámetro (~5 × 10⁶ células) se lavaron con PBS y posteriormente se cosecharon usando solución Hepes hipotónica (20 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH 7.4 a 4 °C) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (1:100 v:v; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Las suspensiones se centrifugaron a 32,000 × g por 25 min, y las membranas obtenidas se re-suspendieron en solución Hepes

(Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.2 mM, pH 7.4 a 4 °C) conteniendo desaminasa de adenosina (1 UI/ml), incubando por 30 min a 30 °C. Este proceso elimina la adenosina endógena y reduce la unión basal de [³⁵S]-GTP γ S debida a los receptores a adenosina expresados endógenamente por las células CHO-K1.

Alícuotas de la preparación membranal (~50 μ g proteína) se incubaron por 60 min adicionales a 30 °C en ausencia y presencia del agonista immepip en 250 μ l de solución Hepes conteniendo 10 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 0.1 mM ditioneitol (DTT), 10 μ M GDP, 10 μ g/ml saponina y 100 pM [³⁵S]-GTP γ S. La unión no específica se determinó en paralelo y en presencia de 10 μ M de GTP γ S. La reacción se detuvo por filtración a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) con tres lavados de 1 ml de solución Hepes fría y la radioactividad retenida en los filtros se cuantificó por centellometría. La unión de [³⁵S]-GTP γ S estimulada por agonista se determinó como porcentaje de la unión basal después de restar la unión no específica.

6.5 Determinación de la formación de AMPc.

Células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ cultivadas en cajas de 24 pozos (~3 \times 10⁵ células/ pozo) se lavaron con solución KRH antes de incubarse a 37 °C en la misma solución conteniendo 3-isobutil-metil-xantina (IBMX, 1 mM), inhibidor general de las fosfodiesterasas. Después de 5 min, se agregó el agonista immepip en diferentes concentraciones o en su caso los antagonistas/agonistas inversos ciproxifan, A-331440 y clobenpropit (1 μ M). Después de 10 min se adicionó forskolina (3 o 1 μ M como concentración final) y la incubación se continuó por 15 min. La reacción se detuvo aspirando el medio de incubación y adicionando 250 μ l de HCl 0.1 N. Después de 15 min sobre hielo, las muestras se neutralizaron con 25 μ l de NaOH 1 N y 100 μ l de solución amortiguadora Tris-HCl (1 M, pH 7.0), y las placas se centrifugaron a 2,000 \times g durante 10 min (4 °C).

Alícuotas de 50 μ l del sobrenadante se colocaron en tubos de polietileno para la reacción de competencia entre el AMPc endógeno y \sim 10 nM de [3 H]-AMPc por la unión a la subunidad reguladora de la PKA (\sim 0.5 UI/reacción). En paralelo se prepararon tubos para determinar la unión total e inespecífica del [3 H]-AMPc en ausencia y presencia de 10 μ M de AMPc no marcado, respectivamente. Las muestras se incubaron durante 2.5 h a 4 $^{\circ}$ C y después se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B neutralizados con polietiliminina al 0.3%). Se realizaron 3 lavados con 1 ml de H₂O desionizada a 4 $^{\circ}$ C y la radioactividad retenida en los filtros se determinó por centellometría. Los resultados se analizaron utilizando el procesador Excel y el programa estadístico GraphPad 5.0. La formación de AMPc se expresó como pmol AMPc/pozo en base a una curva estándar.

6.6 Análisis bioinformático

La predicción de los sitios de fosforilación por GRKs en los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ se realizó con el programa bioinformático GPS 3.0 (*Group-based Prediction System*; Xue et al., 2008), con un corte de alto umbral (tasa de 2% de falsos positivos, *FPR*).

6.7 Análisis estadístico

Los datos se presentan como el promedio \pm SEM (error estándar de la media), o como el promedio \pm rango de duplicados. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student o con análisis de varianza (ANOVA) de una o de dos vías, y pruebas de comparación múltiple usando el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA).

7. Resultados

7.1 Caracterización farmacológica de los receptores hH_3R_{445} y hH_3R_{365} expresados establemente en células CHO-K1

Determinación de la densidad de los receptores hH_3R_{445} y hH_3R_{365} y afinidad por el radioligando [3H]-NMHA

Inicialmente se seleccionaron dos clonas celulares (una de cada isoforma) con densidad similar de receptores (Figura 8), a fin de prevenir que diferencias en el nivel de expresión de los mismos dificultara el análisis comparativo de la desensibilización de las isoformas.

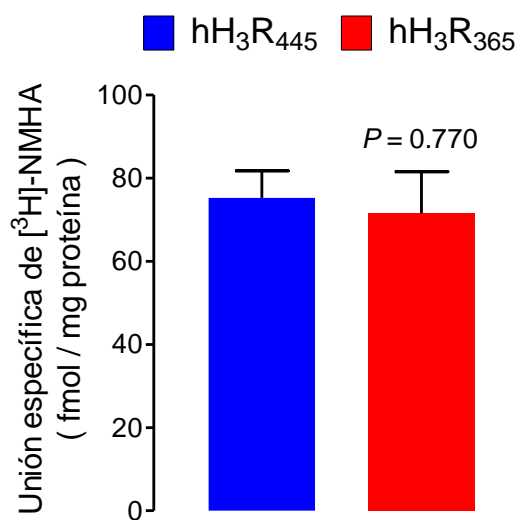


Figura 8. Unión específica de [3H]-NMHA a membranas de células CHO-K1- hH_3R_{445} y CHO-K1- hH_3R_{365} . Las membranas celulares fueron incubadas en presencia de [3H]-NMHA (~ 2 nM), y la unión específica fue determinada al substrar la unión en presencia de histamina (10 μ M) de la unión total. Los valores son promedios \pm SEM (error estándar de la media) de determinaciones por triplicado de un experimento representativo de 3 realizados. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

Posteriormente se realizaron ensayos de saturación de la unión de [³H]-NMHA para determinar la densidad máxima (B_{max}) de receptores expresados en las membranas celulares y la afinidad de los mismos por el radioligando (Figura 9). Los valores de la unión máxima fueron 211 ± 12 y 199 ± 16 fmol/mg de proteína para membranas de las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅, respectivamente, sin diferencia estadística (3 experimentos, $P = 0.58$, prueba *t* de Student). Los valores de la constante de disociación (K_d) fueron 0.88 nM y 0.95 nM, respectivamente (pK_d 9.07 ± 0.06 y 9.03 ± 0.06 , $P = 0.66$). En conjunto, estos datos indican que las clonas celulares seleccionadas (denominadas CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅) expresan de manera similar a los receptores.

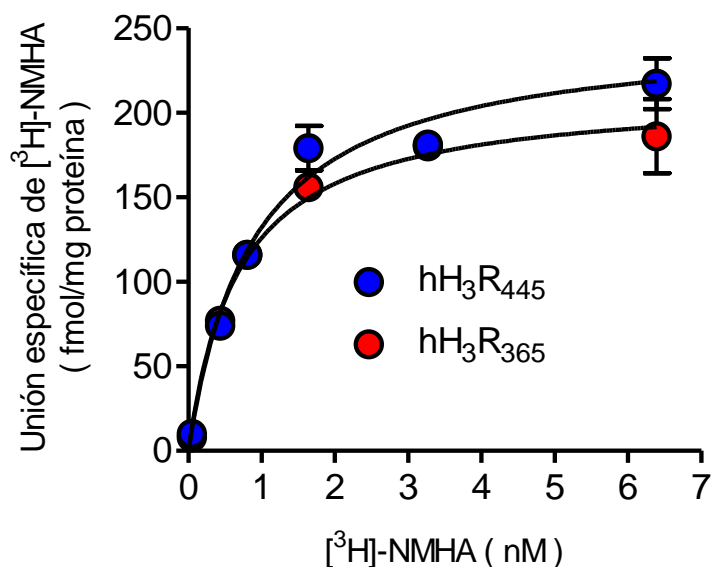


Figura 9. Saturación de la unión específica de [³H]-NMHA a membranas de células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅. Las membranas celulares fueron incubadas con concentraciones crecientes de [³H]-NMHA, y la unión específica fue determinada al substrar la unión en presencia de histamina (10 μ M) de la unión total. Los valores corresponden a los promedios \pm el rango de determinaciones por duplicado de un experimento representativo de 3 realizados. La curva es el mejor ajuste a una hipérbola. Los valores de unión máxima (B_{max}) y de la constante de disociación (K_d) se indican en el texto.

Determinación de la afinidad de los receptores hH_3R_{445} y hH_3R_{365} por ligandos selectivos

Para evaluar posibles diferencias en la afinidad de los hH_3R_{445} y hH_3R_{365} expresados establemente en las células CHO-K1 por ligandos selectivos del H_3R , se realizaron ensayos de inhibición de la unión de $[^3H]$ -NMHA (Figura 10). Para ambas isoformas, la unión del radioligando fue inhibida de manera dependiente de la concentración por los agonistas immpip y RAMH, así como por los antagonistas/agonistas inversos clobenpropit y ciproxifan. El análisis estadístico mostrado en la Tabla 2 indica que no existen diferencias significativas entre las dos isoformas en su afinidad por los ligandos evaluados.

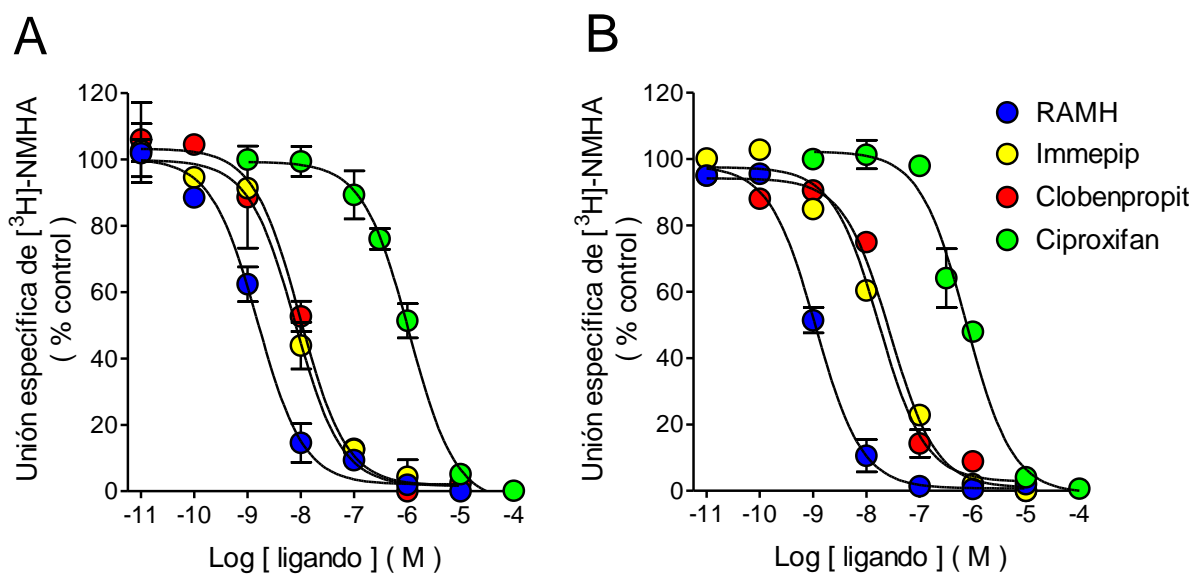


Figura 10. Inhibición de la unión de $[^3H]$ -NMHA por ligandos selectivos del H_3R . Las membranas de células CHO-K1- hH_3R_{445} (A) o CHO-K1- hH_3R_{365} (B) se incubaron con $[^3H]$ -NMHA (~ 2 nM) y concentraciones crecientes de los ligandos indicados. Los valores se expresan como porcentaje de la unión específica control, y son promedios \pm rango de duplicados de un experimento representativo de 3 a 5 experimentos realizados. Las líneas son el mejor ajuste a una ecuación logística (Hill) y corresponden al modelo de unión a un solo sitio. Los valores del logaritmo negativo ($-\log_{10}$) de las constantes de inhibición (K_i) se comparan en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de la afinidad de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ por ligandos selectivos

| Ligando | pKi | | n | P |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|---|------|
| | hH ₃ R ₃₆₅ | hH ₃ R ₄₄₅ | | |
| RAMH | 9.18 ± 0.08 | 9.17 ± 0.16 | 5 | 0.95 |
| Immepip | 8.70 ± 0.24 | 8.73 ± 0.35 | 4 | 0.93 |
| Clobenpropit | 8.24 ± 0.13 | 8.39 ± 0.07 | 4 | 0.37 |
| Ciproxifan | 6.96 ± 0.18 | 6.69 ± 0.11 | 3 | 0.27 |

La afinidad de los receptores se expresa como $-\text{Log}_{10}$ (pKi) de las constantes de inhibición (Ki). El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

7.2 Caracterización funcional de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ expresados establemente en células CHO-K1

Determinación de la capacidad de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ para activar proteínas G

La unión de [³⁵S]-GTPγS a membranas celulares indica la capacidad de los GPCRs para activar proteínas G (Harrison y Traynor, 2003). La Figura 11A muestra que en membranas de células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ el immepip, agonista del H₃R, estimula la unión de [³⁵S]-GTPγS de manera dependiente de la concentración, con un efecto máximo (E_{max}) de $173 \pm 11\%$ y $177 \pm 06\%$ de la basal, respectivamente; la concentración efectiva media (EC_{50}) fue 1.74 nM (pEC_{50} 8.76 ± 0.37) y 1.86 nM (pEC_{50} 8.73 ± 0.19), respectivamente. El análisis estadístico indica que la respuesta máxima y la potencia del agonista no fueron diferentes entre las isoformas (6 experimentos, $P = 0.77$ y 0.84 respectivamente, prueba *t* de Student).

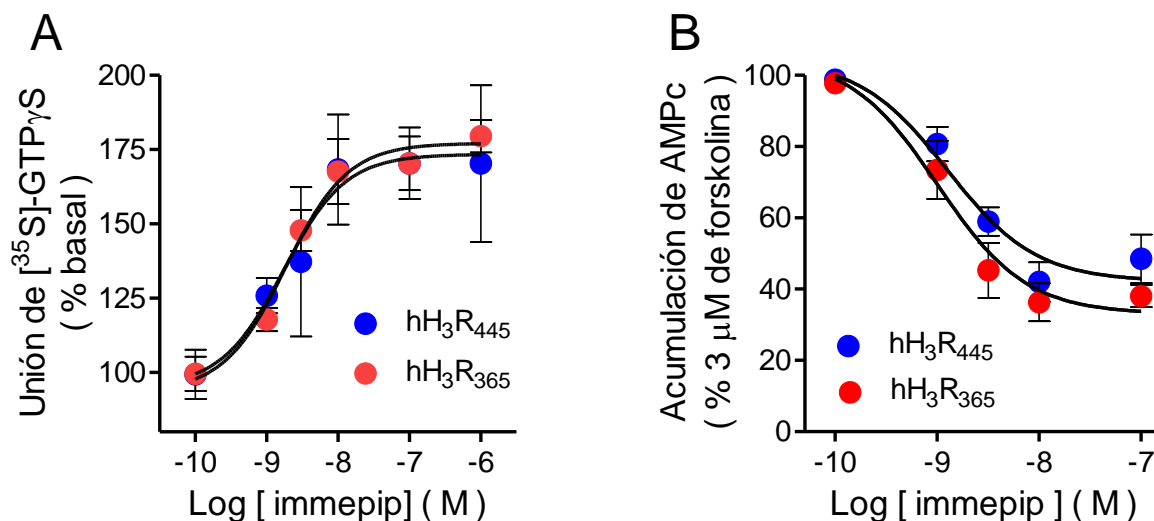


Figura 11. Señalización de los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ establemente expresados en células CHO-K1. A. Estimulación por el agonista del H₃R immapip de la unión de [³⁵S]-GTP_γS a membranas de células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅. Las membranas celulares se incubaron con las concentraciones indicadas del agonista immapip y los valores corresponden al promedio ± SEM de 6 experimentos independientes. Los valores de E_{max} y pEC₅₀ se indican en el texto. B. Inhibición de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina en células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅. Células intactas se incubaron con las concentraciones indicadas del agonista immapip. Los valores corresponden al promedio ± SEM de 9 experimentos independientes. Los valores de I_{max} y pIC₅₀ se mencionan en el texto.

Determinación de la capacidad de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ para inhibir la formación del 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc)

Los H₃R están acoplados a proteínas G_{αi/o} y una vía de señalización canónica de estos receptores es por lo tanto la inhibición de la actividad de las adenilil ciclasas (Nieto-Alamilla et al., 2016). La Figura 11B muestra que en células intactas CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ el agonista immapip inhibe la formación de AMPc estimulada por forskolina, con una inhibición máxima (I_{max}) de 58 ± 4% y

67 ± 5%, respectivamente, sin diferencia estadística entre las isoformas (9 experimentos, $P = 0.19$, prueba t de Student). Los valores de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) fueron 1.29 nM ($pIC_{50} 8.89 \pm 0.18$) y 1.02 nM ($pIC_{50} 8.99 \pm 0.19$) respectivamente, sin diferencia estadística ($P = 0.72$). En conjunto, estos resultados indican que ambas isoformas del hH₃R activan proteínas $G_{\alpha i/o}$ e inhiben la formación de AMPc con eficacia y potencia similares.

Evaluación de la actividad constitutiva de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅

La actividad constitutiva se define como la capacidad de un GPCR para activar una o más vías de señalización independientemente de la presencia de un agonista. En este sentido, los ligandos que actúan como agonistas inversos conducen al receptor a un estado conformacional de menor actividad o incluso inactivo, y por lo tanto disminuyen la eficacia de la respuesta constitutiva del receptor. La actividad constitutiva del H₃R del humano, de la rata y del ratón se ha observado en líneas celulares con receptores transfectados, pero también en H₃Rs nativos presentes en el tejido cerebral de roedores (Morisset et al., 2000; Wieland et al., 2001; Rouleau et al., 2002).

En este trabajo, se evaluó la actividad constitutiva de las isoformas del hH₃R mediante ensayos de acumulación de AMPc, empleando tres antagonistas/agonistas inversos ciproxifan, A-331440 y clobenpropit (Figura 12). En ambas líneas celulares (CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅) el ciproxifan aumentó la acumulación de AMPc estimulada por forskolina, mientras que el A-331440 produjo este efecto solamente en las células CHO-K1-hH₃R₃₆₅, y el clobenpropit no indujo cambio en ninguna de las isoformas. Estos datos indican que ambos receptores (hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅) expresados en células CHO-K1 poseen actividad constitutiva; sin embargo, los efectos diferenciales observados sugieren agonismo inverso sesgado (Seifert, 2013; Alonso et al., 2014; Tao, 2014), como se aborda en la sección de discusión.

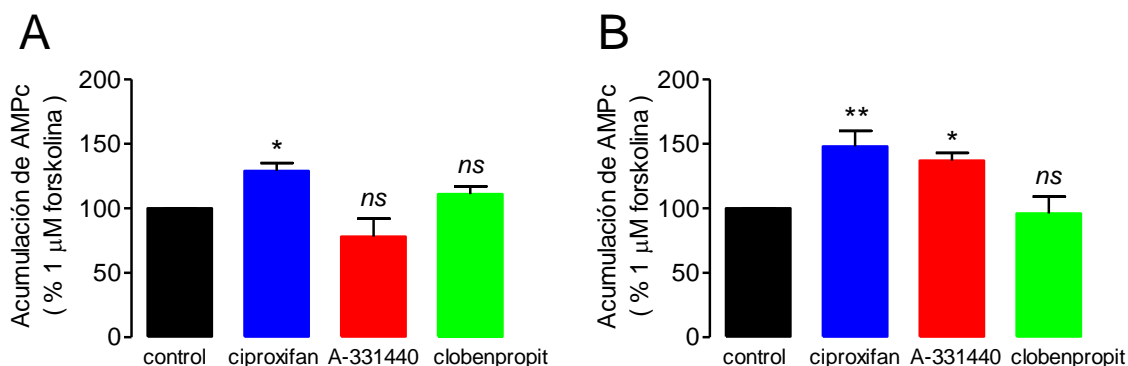


Figura 12. Actividad constitutiva de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅. Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ (A) y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ (B) se incubaron con forskolina (1 μM) en ausencia o presencia de los antagonistas/agonistas inversos ciproxifan, A-331440 ó clobenpropit, los tres a una concentración de 1 μM. Los valores se expresan como porcentaje de la respuesta a forskolina después de restar la formación basal y corresponden al promedio ± SEM de 4-6 experimentos. *ns*, sin diferencia significativa, **P* < 0.05, ***P* < 0.01 *versus* el valor control; ANOVA de una vía y prueba de Dunnett.

7.3 Identificación de residuos en los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ susceptibles de fosforilación por las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs)

Las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) fosforilan residuos de Serina (Ser) o Treonina (Thr) localizados en proximidad de los residuos ácidos Aspartato o Glutamato, o bien en secuencias de repetidos de Ser/Thr (Palczewski et al., 1989; Onorato et al., 1991). El análisis de la secuencia de aa de las isoformas con el programa bioinformático GPS 3.0 indicó la presencia de 24 residuos susceptibles de fosforilación mediada por GRKs dentro de la IL3 y del C-terminal del hH₃R₄₄₅. La Tabla 3 muestra estos residuos, los aa conservados en la isoforma hH₃R₃₆₅, la GRK que probablemente fosforila estos residuos, la secuencia peptídica donde se encuentra el aa presumiblemente fosforilado, y el puntaje y umbral de fosforilación asignado por el programa. El umbral indica la

confiabilidad de la predicción, habiéndose escogido un umbral alto, que indica una probabilidad de falsos positivos $\leq 2\%$.

El análisis bioinformático también indicó que 8 de los 9 aa presumiblemente fosforilados por GRK2/3 en la IL3 del hH₃R₄₄₅ se pierden en el hH₃R₃₆₅ (Tabla 3). La Figura 13 muestra que el hH₃R₃₆₅ conserva el residuo Thr²²⁹, localizado en el N-terminal de la IL3, así como los residuos localizados en el C-terminal del receptor (Ser³⁵⁸ y Ser³⁵⁹) que corresponden a los aa Ser⁴³⁸ y Ser⁴³⁹ en el hH₃R₄₄₅ (Tabla 3).

Es importante destacar que, de acuerdo con el análisis bioinformático, los dos residuos localizados en el C-terminal tienen más alta probabilidad de ser fosforilados por GRK2/3 en comparación con aquellos residuos de Ser/Thr localizados en la IL3 y que no están presentes en la isoforma hH₃R₃₆₅, sugiriendo un papel importante de los aa Ser³⁵⁸ y Ser³⁵⁹ en la desensibilización del hH₃R₃₆₅. Además, el reducido número de residuos susceptibles de fosforilación por GRK2/3 en el hH₃R₃₆₅ sugiere procesos diferenciales de desensibilización entre los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅.

Tabla 3. Análisis de la posible fosforilación por GRKs de los aminoácidos de la tercera asa intracelular y el carboxilo terminal de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅.

| Residuo | hH ₃ R ₄₄₅ | | hH ₃ R ₃₆₅ | | Cinasa | Péptido | Puntaje | Cut-off |
|---------|----------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------|--------|----------------------------|---------|---------|
| | Posición | Localización | Posición | Localización | | | | |
| Thr | 229 | IL3 | 229 | IL3 | GRK2 | YLN I QRRLRLDGA | 6.977 | 4.78 |
| Ser | 299 | IL3 | - | - | GRK2 | GGGGGGG S VASPTSS | 4.837 | 4.78 |
| Ser | 302 | IL3 | - | - | GRK2 | GGGGSVASPTSSSGS | 7.786 | 5.269 |
| Thr | 304 | IL3 | - | - | GRK2 | GGSVASPTSSSGSSS | 8.357 | 5.269 |
| Ser | 305 | IL3 | - | - | GRK2 | GSVASPT S SSGSSSR | 6.357 | 5.269 |
| Ser | 306 | IL3 | - | - | GRK2 | SVASPT S SSGSSSRG | 5.786 | 5.269 |
| Ser | 307 | IL3 | - | - | GRK2 | VASPT S SSGSSSRGT | 6.333 | 5.269 |
| Ser | 311 | IL3 | - | - | GRK2 | TSSSGSS S RGTERPR | 6.833 | 5.269 |
| Ser | 438 | C-terminal | 358 | C-terminal | GRK2 | KLKIQPH S SLEHCWK | 11.214 | 5.269 |
| Ser | 439 | C-terminal | 359 | C-terminal | GRK2 | LKIQPH S SLEHCWK | 25.762 | 5.269 |
| Ser | 311 | IL3 | - | - | GRK3 | TSSSGSS S RGTERPR | 3.6 | 3.58 |
| Ser | 319 | IL3 | - | - | GRK3 | RGTERPR S LKRGSKP | 4.6 | 3.58 |
| Ser | 332 | IL3 | - | - | GRK4 | KPSASSAS L EKRMMK | 3.667 | 3.317 |
| Ser | 351 | IL3 | - | - | GRK4 | FTQRFRL S RDRKVAK | 3.333 | 3.317 |
| Thr | 149 | IL2 | 149 | IL2 | GRK5 | YRAQQGDTRRAVRKM | 3.944 | 3.442 |
| Thr | 290 | IL3 | - | - | GRK6 | GAEAGEATLGGGGGG | 8.857 | 3.086 |
| Ser | 299 | IL3 | - | - | GRK6 | GGGGGGG S VASPTSS | 7.714 | 3.086 |
| Ser | 302 | IL3 | - | - | GRK6 | GGGGSVASPTSSSGS | 8.143 | 3.086 |
| Thr | 304 | IL3 | - | - | GRK6 | GGSVASPTSSSGSSS | 9.571 | 3.086 |
| Ser | 307 | IL3 | - | - | GRK6 | VASPT S SSGSSSRGT | 7.714 | 3.086 |
| Ser | 310 | IL3 | - | - | GRK6 | PTSSSG S SRGTERP | 5.143 | 3.086 |
| Ser | 311 | IL3 | - | - | GRK6 | TSSSGSS S RGTERPR | 8.429 | 3.086 |
| Ser | 324 | IL3 | - | - | GRK6 | PRSLKRG S KPSASSA | 3.571 | 3.086 |
| Ser | 327 | IL3 | - | - | GRK6 | LKRGSKP S ASSASLE | 4.286 | 3.086 |
| Ser | 438 | C-terminal | 358 | C-terminal | GRK6 | KLKIQPH S SLEHCWK | 3.714 | 3.086 |

Los residuos putativos de fosforilación se indican en negritas dentro la secuencia peptídica, y fueron identificados por análisis bioinformático con el programa GPS 3.0 (*Group-based Prediction System*; Xue et al., 2008), con un corte de umbral alto (tasa de falsos positivos, *FPR*, ≤ 2%).

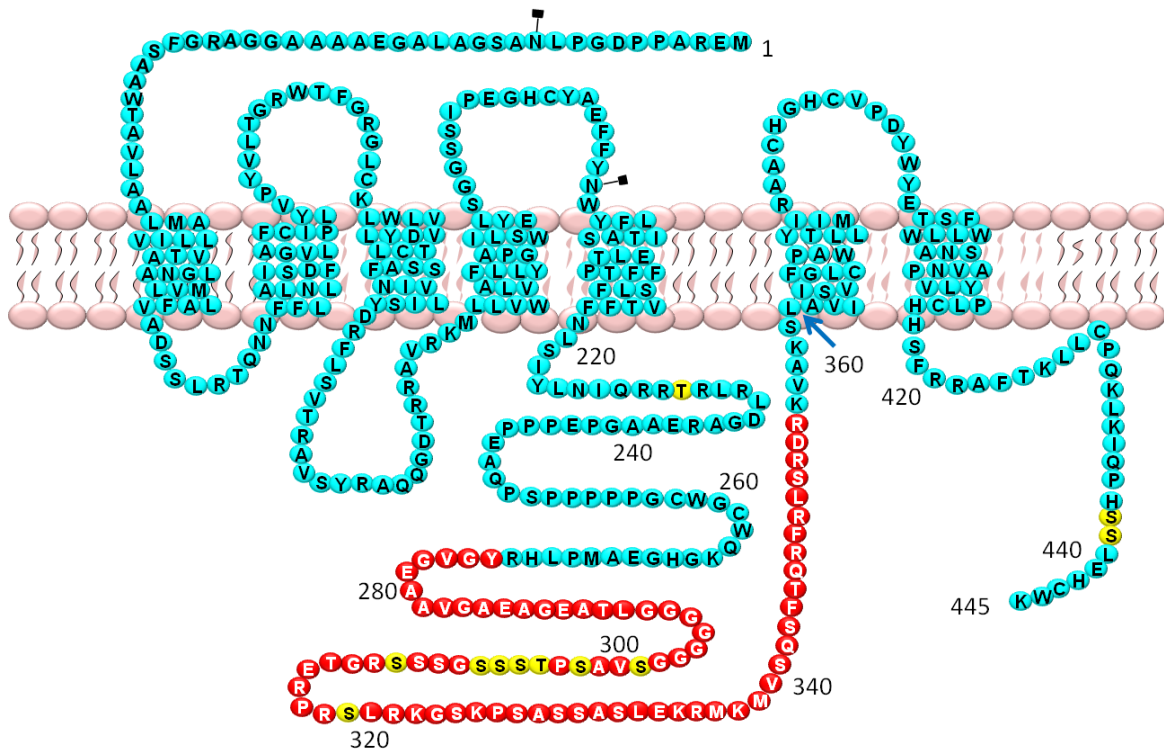


Figura 13. Residuos susceptibles de fosforilación por GRK2/3 en la tercera asa intracelular y el carboxilo terminal del hH₃R₄₄₅. Se muestra la secuencia de amino ácidos del hH₃R₄₄₅; en rojo se ilustra la región sujeta a procesamiento alternativo que está ausente en la isoforma hH₃R₃₆₅; en amarillo los residuos potencialmente fosforilados por GRK2/3 identificados con el programa bioinformático GPS 3.0 (*Group-based Prediction System*; Xue et al., 2008), con un corte de alto umbral (tasa de falsos positivos, *FPR*), con un corte de umbral alto (tasa de falsos positivos, *FPR*, ≤ 2%). Los números indican la posición de algunos residuos como referencia.

7.4 Efecto de la pre-incubación con el agonista del H₃R RAMH en la inhibición por imepip de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina

Como se mencionó en los antecedentes, la exposición de un receptor a agonistas puede inducir disminución de la eficacia de la señalización del receptor, fenómeno conocido como desensibilización homóloga. Para evaluar si la isoforma hH₃R₃₆₅ experimenta desensibilización homóloga funcional y las posibles diferencias con el receptor hH₃R₄₄₅, las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ se pre-incubaron durante 15, 30, 60 y 120 min con el agonista RAMH (1 μM) antes de ser expuestas a forskolina en presencia y ausencia del agonista imepip (100 nM).

El análisis estadístico mostró que en ambas líneas celulares (CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅), la inhibición por imepip de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina fue significativamente menor después de 30, 60 y 120 min de pre-exposición al agonista RAMH (1 μM), indicando desensibilización homóloga de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅. Sin embargo, la magnitud de desensibilización fue diferente: 22.9% y 51.9% a 30 min; 96.9% y 19.9% a 60 min; y 67.0% y 24.3% a 120 min, respectivamente (Figura 14, A y B).

Estos resultados indican que ambas isoformas experimentan desensibilización homóloga funcional, pero también muestran que existen diferencias en el proceso (Figura 14C): 1) la desensibilización máxima ocurre a diferentes tiempos de pre-exposición al agonista (30 y 60 min para el hH₃R₃₆₅ y hH₃R₄₄₅, respectivamente); 2) la magnitud de la desensibilización fue diferente (51.9% y 96.9% para el hH₃R₃₆₅ y hH₃R₄₄₅, respectivamente); 3) las isoformas difieren en la re-sensibilización, ya que el hH₃R₃₆₅ muestra 24.3% de desensibilización a los 120 min mientras que la isoforma hH₃R₄₄₅ muestra 67.0%.

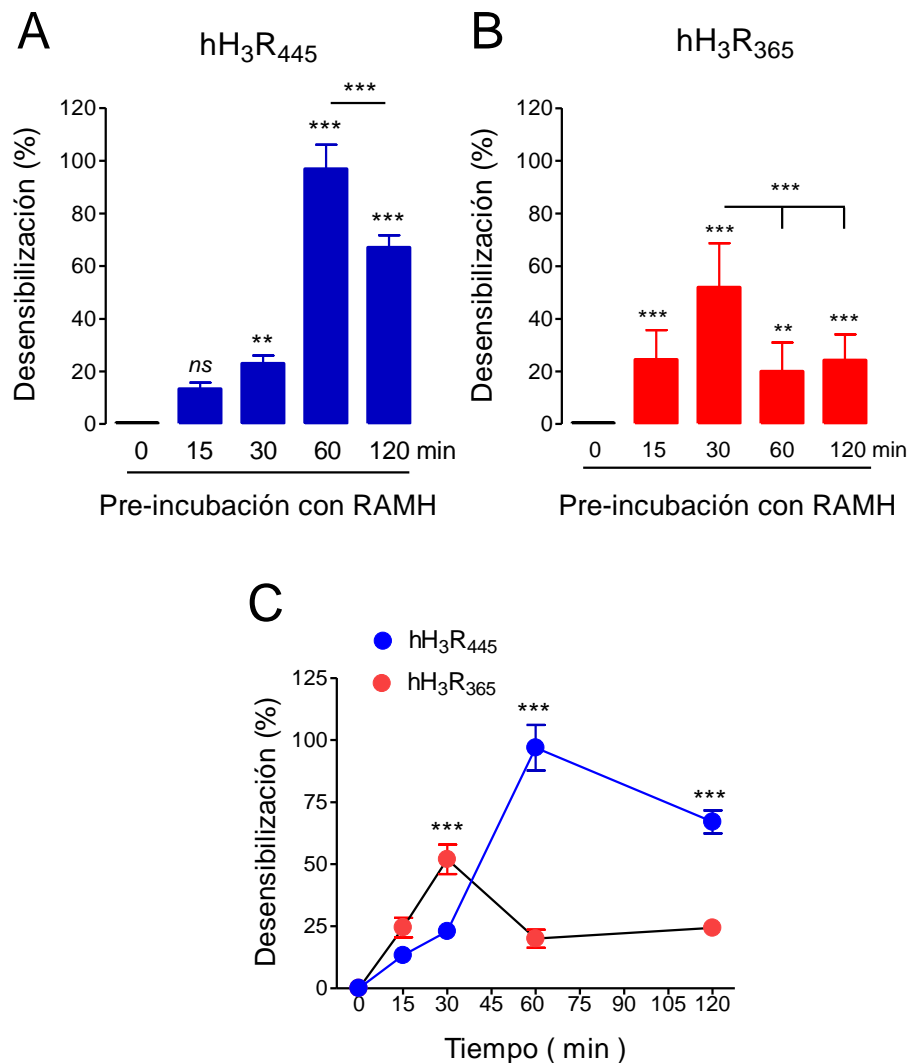


Figura 14. Desensibilización homóloga diferencial de las isoformas hH_3R_{445} y hH_3R_{365} . A, B. Curso temporal de la desensibilización funcional de los receptores. Las células CHO-K1- hH_3R_{445} (A) y CHO-K1- hH_3R_{365} (B) fueron pre-incubadas en ausencia o presencia del agonista del H_3R RAMH (1 μ M) por los tiempos indicados antes de evaluar la inhibición por el agonista immpip (100 nM) de la acumulación de AMPc inducida por forskolina. Los valores se expresan como porcentaje de desensibilización (células no expuestas a RAMH = 0) y son el promedio \pm SEM de 8-10 experimentos. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. C. Comparación de la desensibilización funcional de las isoformas del hH_3R . El análisis estadístico se realizó con ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni. *** $P < 0.001$ en comparación con la otra isoforma, *ns*, sin diferencia significativa.

En los experimentos posteriores la pre-incubación con el agonista RAMH se evaluó a los 30 y 60 min, tiempos en los que se observó la desensibilización máxima de cada una de las isoformas, así como diferencias en las características de desensibilización entre ellas.

7.5 Efecto de la pre-incubación con el agonista RAMH en la unión de [³H]-NMHA a células intactas y a membranas celulares totales

De acuerdo con el modelo clásico de la desensibilización homóloga (Figura 5), la sobre-activación de un receptor puede conducir a la reducción del número de receptores expresados en la superficie celular (Luttrell y Lefkowitz, 2002; Marchese et al., 2008). En este sentido, la unión específica de [³H]-NMHA a células intactas indicó que el número de receptores localizados en la superficie celular en nuestro modelo de expresión heteróloga fue $7,734 \pm 1,089$ y $9,639 \pm 851$ receptores por célula para las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ respectivamente, sin diferencia estadística entre ellas (4 experimentos, $P = 0.21$, prueba *t* de Student).

En ambas líneas celulares, la pre-incubación con el agonista RAMH (1 μ M) durante 30 y 60 min resultó en la pérdida de receptores en la superficie celular (Figura 15). Para las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ (Figura 15A) el valor de la unión específica fue $73.8 \pm 9.7\%$ y $70.8 \pm 4.2\%$ de los valores control (células no expuestas a agonista), mientras que en las células CHO-K1-hH₃R₃₆₅ (Figura 15B) la pre-incubación con agonista redujo el número de receptores a $50.0 \pm 6.5\%$ y $53.3 \pm 8.8\%$ de los valores control a los 30 y 60 min, respectivamente.

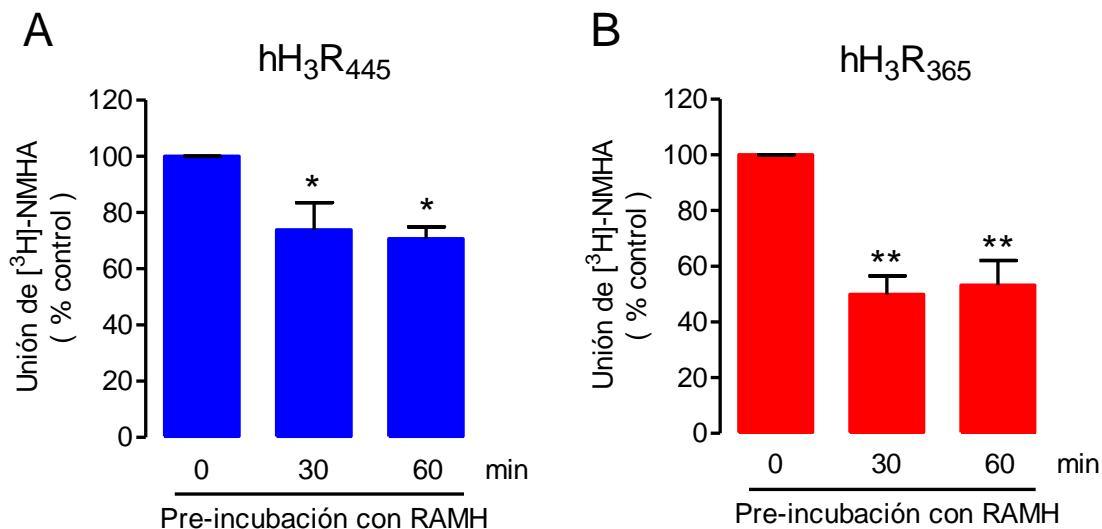


Figura 15. Efecto de la pre-incubación con agonista en el número de receptores expresados en la superficie celular. Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ fueron incubadas con el agonista RAMH (1 μ M) durante los tiempos indicados; posteriormente las células se lavaron (3 \times 5 min) con solución KRH y se incubaron con [3H]-NMHA (2 nM) como se describe a detalle en Materiales y métodos. La unión específica del radioligando se expresa como porcentaje de los valores control (células no pre-expuestas al agonista). Los valores son el promedio \pm SEM de 3 experimentos. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ comparado con los valores control, ANOVA de una vía y prueba de Dunnett.

La pérdida de receptores también se observó en la unión de [3H]-NMHA a membranas celulares totales, ensayos realizados después de la incubación de las células intactas con el agonista RAMH. La Figura 16 muestra que la pre-incubación con agonista resulta en una reducción estadísticamente significativa de los sitios de unión específica. Para el hH₃R₄₄₅ los valores de la unión específica fueron $69.0 \pm 3.8\%$ y $63.4 \pm 3.7\%$ de los valores control a los 30 y 60 min de pre-incubación con agonista, respectivamente; mientras que para el hH₃R₃₆₅ la pre-incubación con agonista redujo los valores a $65.4 \pm 4.2\%$ y $64.1 \pm 2.0\%$ de los valores control en los mismos periodos de pre-incubación. Además, la

afinidad de ambos receptores por el agonista immepip disminuyó como efecto de la pre-incubación con RAMH (Tabla 4). Los datos en conjunto indican que la pre-exposición de ambas isoformas del hH₃R al agonista RAMH resulta en disminución del número total de receptores y en reducción de la afinidad por agonista.

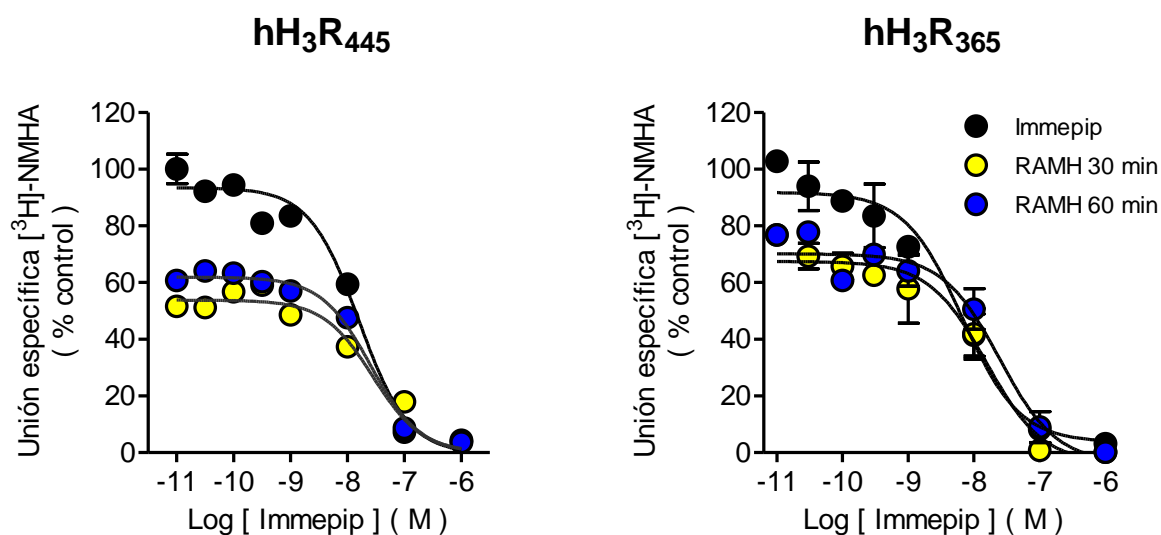


Figura 16. Efecto de la pre-incubación con agonista en el número de receptores y en la afinidad por el agonista immepip en membranas celulares totales. Células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ intactas fueron pre-incubadas con el agonista RAMH (1 μ M) por los tiempos indicados. Posteriormente se lavaron (3 \times 5 min) con solución KRH y las membranas celulares se obtuvieron e incubaron con [³H]-NMHA (2 nM) como se describe en Materiales y métodos. La unión específica del radioligando se expresa como porcentaje de los valores control (membranas de células no pre-expuestas al agonista). Los valores son el promedio \pm SEM de triplicados de un experimento representativo repetido 6-8 veces con resultados similares. La unión máxima (B_{max}) y los valores de pK_i se comparan en la Tabla 4.

Tabla 4. El pre-tratamiento con el agonista RAMH disminuye la densidad y la afinidad de los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ por el agonista imepip en membranas celulares totales.

| | Control | RAMH (30 min) | RAMH (60 min) |
|--------------------------------------|-------------|---------------|----------------|
| hH₃R₄₄₅ | | | |
| pKi | 8.58 ± 0.08 | 8.23 ± 0.09** | 8.23 ± 0.04** |
| Ki (nM) | 2.63 | 5.89 | 5.89 |
| B _{max} (% control) | 100 ± 6 | 69 ± 4*** | 63 ± 4*** |
| hH₃R₃₆₅ | | | |
| pKi | 8.83 ± 0.16 | 8.25 ± 0.09** | 8.00 ± 0.09*** |
| Ki (nM) | 1.48 | 5.62 | 10.00 |
| B _{max} (% control) | 100 ± 10 | 65 ± 4** | 64 ± 2** |

Los valores son el promedio ± SEM de 6-8 experimentos independientes. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 comparado con los valores control; ANOVA de una vía y prueba de Dunnett.

7.6 Evaluación de la desensibilización constitutiva de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅

En los antecedentes se mencionó que los receptores constitutivamente activos también pueden experimentar desensibilización e internalización constitutivas conduciendo a la pérdida de la respuesta basal del receptor. Este fenómeno puede ser reducido o abolido por agonistas inversos, que inducen la permanencia del receptor en la membrana plasmática permitiendo su disponibilidad para ser activado por un agonista una vez que el agonista inverso es retirado, efecto que se reflejaría en una mayor eficacia de la respuesta funcional (Figura 7).

La Figura 17 muestra que en células intactas CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅ el agonista imepip inhibe la formación de AMPc estimulada por forskolina, (I_{max} 67 ± 13% y 65 ± 4%, para el hH₃R₄₄₅ y el hH₃R₃₆₅ respectivamente), sin

diferencia estadísticamente significativa entre las isoformas (3–5 experimentos, $P = 0.81$, prueba t de Student). Interesantemente, la pre-incubación de las células con ciproxifan (un agonista inverso de ambas isoformas) durante 30 y 60 min aumenta la inhibición por immpip de la formación de AMPc estimulada por forskolina, con I_{max} de $88 \pm 5\%$ y $81 \pm 5\%$ para el hH_3R_{445} a los 30 y 60 min respectivamente, y $77 \pm 5\%$ y $78 \pm 6\%$ para el hH_3R_{365} a los 30 y 60 min, respectivamente. Sin embargo, la mayor I_{max} en la formación de AMPc observada en las células pre-incubadas con el agonista inverso ciproxifan no fue estadísticamente diferente de la I_{max} observada en las células control. A pesar de la tendencia observada, los resultados no permiten concluir que ambas isoformas del hH_3R experimentan desensibilización constitutiva.

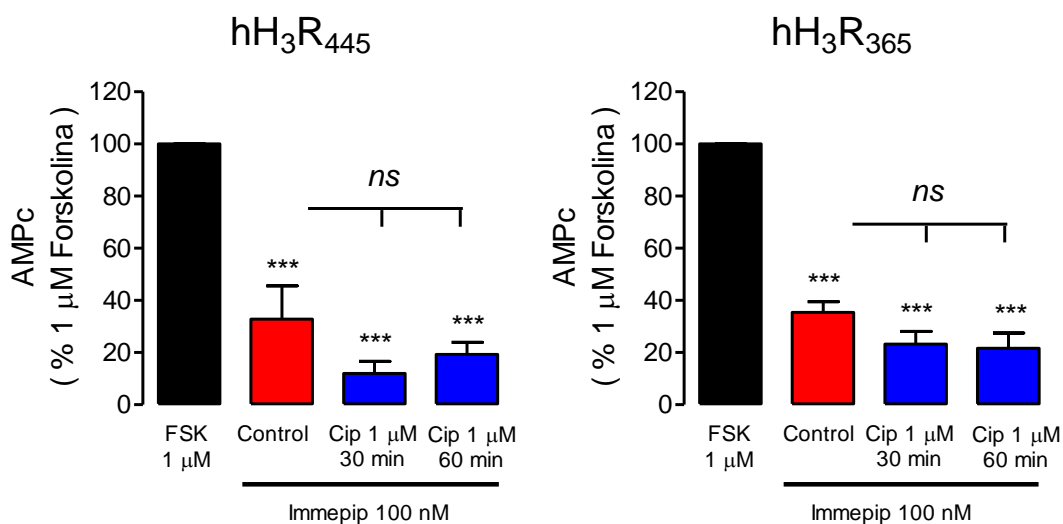


Figura 17. Posible desensibilización constitutiva de los receptores hH_3R_{445} y hH_3R_{365} . Células CHO-K1- hH_3R_{445} y CHO-K1- hH_3R_{365} fueron pre-incubadas en ausencia o presencia del agonista inverso del hH_3R ciproxifan ($1 \mu M$) por los tiempos indicados antes de que la inhibición por immpip (100 nM) de la acumulación de AMPc inducida por forskolina fuera evaluada. Los datos se expresan como porcentaje del efecto de la forskolina ($1 \mu M$) y corresponden al promedio \pm SEM de 3–5 experimentos. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía y prueba de Tukey. *** $P < 0.001$. ns, sin diferencia significativa.

8. Discusión

8.1 Caracterización farmacológica de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ expresados establemente en células CHO-K1

Para el desarrollo de este proyecto se seleccionaron dos sub-líneas de células CHO-K1 que expresaran una densidad similar de receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅, debido a que información en la literatura indica que en sistemas de expresión heteróloga existen diferencias entre las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ en densidad y la afinidad por ligandos selectivos, con ~2–3 veces mayor expresión del hH₃R₄₄₅ con respecto al hH₃R₃₆₅ en células CHO, NIH-3T3, tSA y SH-SY5Y (Cogé et al., 2001; Wellendorph et al., 2002; Riddy et al., 2016; Nieto-Alamilla et al., 2016). Además, Bongers et al. (2007b) reportaron que para la isoforma hH₃R₃₆₅ expresada en células de glioma de rata C6 los agonistas del H₃R tiene mayor afinidad y potencia, con un patrón opuesto para antagonistas/agonistas inversos en comparación con el receptor hH₃R₄₄₅, argumentando que la diferencia en las afinidades entre las isoformas se debe a la mayor actividad constitutiva del hH₃R₃₆₅ en comparación con el hH₃R₄₄₅.

En consecuencia, para evitar que diferencias en el nivel de expresión de las isoformas dificultaran la evaluación y comparación de las características de desensibilización entre receptores, el estudio se realizó con dos sub-líneas celulares con densidades de expresión total de 211 ± 12 y 199 ± 16 fmol/mg de proteína para membranas de las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ y CHO-K1-hH₃R₃₆₅, respectivamente.

Además, las dos isoformas no mostraron diferencias en la afinidad por el radioligando [³H]-NMHA o por ligandos selectivos no marcados. Lo anterior puede explicarse porque los sitios importantes para la unión del ligando al receptor se encuentran en los dominios transmembranales (TMs) 3–7, mientras que la región del ARNm donde ocurre el procesamiento alternativo que origina a la isoforma

hH₃R₃₆₅ corresponde a la secuencia que codifica a la parte central de la IL3 (Uveges et al., 2002; Ishikawa et al., 2010; Kim et al., 2011; Kuramasu et al., 2011).

Por otro lado, la expresión similar de la isoformas a niveles moderados y comparables con otros estudios donde se han evaluado características farmacológicas y funcionales del hH₃R₄₄₅ (Flores-Clemente et al., 2013; Osorio-Espinoza et al., 2014) sustentan que el modelo celular permite el estudio comparativo de las características funcionales y la desensibilización de ambas isoformas del hH₃R.

8.2 Caracterización funcional de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ expresados establemente en células CHO-K1

Activación de proteínas G

De acuerdo con el modelo clásico, la activación de un receptor por agonista induce la activación posterior de las proteínas G, en forma cíclica y en un periodo de milisegundos. En este proceso, en el estado inactivo la subunidad α de la proteína G está unida a una molécula de GDP, y cuando un GPCR es activado se induce un cambio conformacional en el receptor que conlleva a la activación de la proteína G por intercambio de la molécula de GDP por una de GTP (forma activa de la proteína G) y a la disociación de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$. Posteriormente, la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$ hidroliza el GTP unido generando $G\alpha$ -GDP (estado inactivo de la proteína G), y la subunidad α de la proteína G estaría disponible para ser activada nuevamente. En este sentido, se puede evaluar la capacidad de un GPCR para activar proteínas G usando análogos no hidrolizables del GTP (como el GTP γ S) con el objetivo de determinar el estado activo de las proteínas G inducido por la unión de un agonista al receptor (Wettschureck y Offermanns, 2005).

Nuestros datos indican que ambas isoformas del hH₃R activan proteínas G con igual eficacia y potencia, a pesar de la diferencia de 80 aa en la IL3. De acuerdo con Oldham y Hamm (2007), la IL3 es importante para el acople de los GPCRs a las proteínas G correspondientes. Además, en la literatura también se menciona que los extremos N-terminal y C-terminal de la IL3, así como el C-terminal de un GPCR, son las regiones importantes para la activación de proteínas G (Wess, 1997). En este sentido, los 80 residuos no presentes en el hH₃R₃₆₅ corresponden a la parte central de la IL3 del receptor completo (hH₃R₄₄₅), por lo que se conservan los extremos N-terminal y C-terminal de la IL3. Esta característica podría sustentar similar capacidad de las isoformas para activar proteínas G.

Inhibición de la formación de AMPc

El objetivo central del presente trabajo fue determinar si la isoforma hH₃R₃₆₅ expresada en células CHO-K1 es desensibilizada como consecuencia de la pre-exposición a agonista, y comparar las características de desensibilización entre esta isoforma y la de 445 aa. Para poder evaluar la desensibilización de los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ fue necesario determinar primero su funcionalidad, la que se evaluó mediante ensayos de formación de AMPc inducida por forskolina.

Como se menciona en los antecedentes, el hH₃R se acopla a proteínas G_{αi/o} y una de sus vías de señalización es por lo tanto la inhibición de la actividad de las adenilil ciclasas, con la consecuente disminución de la formación de AMPc (Nieto-Alamilla et al., 2016). Los resultados obtenidos muestran que la eficacia y potencia del agonista immpip para disminuir la acumulación de AMPc fue similar entre las isoformas, lo que puede ser debido a que los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ activan la misma cantidad de proteínas G_{αi/o}, como lo indican los ensayos de unión de [³⁵S]-GTP_γS en membranas celulares. Los datos anteriores indican que las eficacias y potencias similares de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ para activar proteínas G e inhibir la formación de AMPc son sustentadas por los niveles semejantes de expresión y la afinidad similar de los receptores por agonistas.

La inhibición máxima de la formación de AMPc inducida por forskolina fue ~60%. Una explicación al efecto remanente de la forskolina sería la presencia de isoformas de las ACs (2, 4 y 7) que son resistentes a la inhibición por las subunidades $G_{\alpha i/o}$ (Taussig et al., 1994; Sunahara et al., 1996; Watts y Neve, 2005). En este sentido, se ha reportado que las células CHO, de donde se derivaron las células CHO-K1, expresan a las ACs 6 y 7 (Rhee et al., 2000), siendo la primera sensible a las subunidades $G_{\alpha i/o}$. En conjunto, los resultados obtenidos indicaron que las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ expresadas en las células CHO-K1 son funcionales, y por lo tanto apoyan que este modelo de expresión heteróloga es adecuado para evaluar la desensibilización de los receptores.

Actividad constitutiva

La actividad constitutiva se define como la capacidad de un receptor de activar proteínas G y sus vías de señalización, sin necesidad de ser activado por un agonista, debido a la adopción espontánea de un estado conformacional activo (Nieto-Alamilla et al., 2016). La actividad constitutiva ha sido observada en H₃Rs del humano, de la rata y del ratón transfectados en líneas celulares, pero también ha sido mostrada para H₃Rs nativos en tejido cerebral de roedores, mediante ensayos de unión de [³⁵S]-GTP γ S a membranas celulares, de formación de AMPc, de liberación de ácido araquidónico y de liberación de la histamina (Morisset et al., 2000; Wieland et al., 2001; Rouleau et al., 2002).

En este trabajo se evaluó la actividad constitutiva de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ establemente expresadas en células CHO-K1 mediante ensayos de inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina, usando tres antagonistas/agonistas inversos, los cuales presentaron diferentes comportamientos. Uno de ellos (ciproxifan) actuó como agonista inverso y otro (clobenpropit) como antagonista neutro en ambas isoformas, mientras que el A-331440 actuó como agonista inverso únicamente en la isoforma hH₃R₃₆₅. Estos resultados indican que con los niveles de expresión de las isoformas en las células

CHO-K1 obtenidos, ambas presentan actividad constitutiva y que esta parece depender de la isoforma del receptor y del ligando empleado, comportamiento conocido como agonismo inverso sesgado (Seifert, 2013; Alonso et al., 2014; Tao, 2014).

Jonczyk y colaboradores (2017) indican que la capacidad de los ligandos para comportarse como agonistas inversos o antagonistas neutros se debe a las interacciones diferenciales con residuos localizados en los dominios TMs y en las asas extracelulares de las isoformas del H₃R. En este sentido, el ciproxifan (agonista inverso imidazólico) conserva las características de unión típicas de los ligandos con un anillo de imidazol. Estos autores describen que el anillo imidazólico del ciproxifan forma un puente de sal con el aa Glu²⁰⁶ en el TM5 y puentes de hidrógeno con aa aromáticos del EL2. En este trabajo también se describe que el antagonista/agonista inverso clobenpropit interacciona de manera diferente con el H₃R, en comparación con el ciproxifan y otros ligandos imidazólicos, ya que una tiourea presente en la estructura del clobenpropit es la que forma la interacción iónica con el aa Glu²⁰⁶, además de formarse un puente de sal entre el anillo imidazólico del clobenpropit y el Asp¹¹⁴ en TM3, así como interacciones polares entre el clorofenil y aa aromáticos del EL2 del H₃R.

En conjunto, estas características le confieren al clobenpropit una fuerte unión con el sitio ortostérico del receptor. Las diferencias en la interacción del ciproxifan y del clobenpropit con el H₃R pueden sustentar que actúen como un agonista inverso o como un antagonista neutro, respectivamente.

8.3 Desensibilización funcional homóloga de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅

Los resultados obtenidos en esta tesis indican desensibilización funcional homóloga de ambas isoformas del hH₃R, aunque con características diferentes;

por ejemplo, el hH₃R₃₆₅ experimenta desensibilización desde tiempos cortos de pre-incubación con agonista y la desensibilización máxima se observa a los 30 min de pre-exposición a RAMH. Además, en tiempos posteriores se observa una recuperación parcial de la respuesta funcional (re-sensibilización). El hH₃R₄₄₅ muestra desensibilización significativa a los 30 min de pre-exposición a RAMH, pero la máxima desensibilización se observa a los 60 min de exposición, y a diferencia de la isoforma de 365 aa el receptor hH₃R₄₄₅ muestra menor recuperación de la respuesta a los 120 min de pre-incubación con el agonista RAMH. Estos datos indican que ambas isoformas establemente expresadas en células CHO-K1 experimentan desensibilización funcional homóloga, pero que la magnitud, curso temporal y re-sensibilización son diferentes.

Datos previos de nuestro laboratorio y de otros grupos de trabajo indican que las GRK2/3 participan en la desensibilización homóloga del hH₃R₄₄₅ (Osorio-Espinoza et al., 2014), del hH₁R (Willets et al., 2008) y del hH₂R (Shayo et al., 2001). En este estudio, el análisis bioinformático indicó que el número de sitios putativos de fosforilación por GRK2/3 se reduce de once en el hH₃R₄₄₅ a tres en el hH₃R₃₆₅. La isoforma de 365 aa únicamente conserva uno (Thr²²⁹) de los sitios putativos localizados en la IL3 y conserva los dos sitios localizados en el C-terminal (Ser³⁵⁸ y Ser³⁵⁹, Figura 13).

Interesantemente, nuestros datos muestran que a pesar de la pérdida de ocho de los once residuos susceptibles a fosforilación por GRK2/3, el hH₃R₃₆₅ experimenta desensibilización funcional homóloga. En este sentido, los residuos Ser⁴³⁸ y Ser⁴³⁹ del hH₃R₄₄₅, correspondientes con los residuos Ser³⁵⁸ y Ser³⁵⁹ del hH₃R₃₆₅ (Tabla 3), tienen los más altos puntajes de fosforilación posible por GRK2/3 (11.21 y 25.76, respectivamente); además, estos valores son mayores que los obtenidos para los residuos localizados en la IL3 y que no se encuentran en la isoforma hH₃R₃₆₅. Por lo tanto, los residuos Ser³⁵⁸ y Ser³⁵⁹ localizados en la región C-terminal parecen ser suficientes para la desensibilización homóloga del hH₃R₃₆₅ mediada por GRK2/3. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la

desensibilización funcional máxima ($96 \pm 15\%$ y $58 \pm 8\%$ para hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅, respectivamente) es diferente entre isoformas y menor para el hH₃R₃₆₅. Esta desensibilización diferente y de menor magnitud podría deberse al menor número de aa susceptibles de fosforilación por GRK2/3 en la isoforma hH₃R₃₆₅, por lo que la fosforilación de los residuos podría estar dificultando, pero no bloqueando totalmente, el acople a y la activación de proteínas G por el hH₃R₃₆₅.

Diversos estudios indican que los H₃Rs se expresan de manera abundante en las terminales nerviosas (revisado por Panula et al., 2015, y Nieto-Alamilla et al., 2016), y la cinasa GRK2 se ha detectado en los axones de neuronas del prosencéfalo de la rata (Saito et al., 2000). La co-expresión de ambas proteínas en las terminaciones nerviosas hace a GRK2 una fuerte candidata para la desensibilización de los H₃Rs pre-sinápticos.

El análisis bioinformático también indicó que GRK6 puede fosforilar 9 residuos de Ser/Thr ubicados en la IL3 y el primer residuo de Serina (Ser⁴³⁸ o Ser³⁵⁸) localizado en el C-terminal de ambas isoformas (Tabla 3); sin embargo, las células CHO-K1 no expresan GRK5 o GRK6 (Osorio-Espinoza et al., 2014). Los puntajes de fosforilación por GRK6 están en un rango de ~3.5 a 9.5, similares e incluso más altos que los puntajes de fosforilación obtenidos para GRK2/3. Las cinasas GRK5 y GRK6 están presentes en la corteza cerebral y el neocórtex de la rata (Osorio-Espinoza et al., 2014), donde los H₃R están también ampliamente expresados, por lo que la participación de la GRK6 en la desensibilización de H₃Rs no puede descartarse para los sistemas nativos.

Como se mencionó anteriormente, GRK2/3 y GRK5/6 están ampliamente distribuidas en el cerebro (Gainetdinov et al., 2004), y existen evidencias que cada GRK fosforila distintos grupos de residuos de Ser/Thr localizados en la IL3 y el C-terminal de un GPCR, originando “códigos de barras” particulares que determinan el reclutamiento diferencial de β -arrestinas o diferentes conformaciones de estas proteínas, culminando en distintos resultados funcionales

en las células, incluyendo la desensibilización y la internalización de un receptor (Nobles et al., 2011; Yang et al., 2015, 2017). Además, el análisis bioinformático indicó que el hH₃R₄₄₅ posee once y diez residuos susceptibles de fosforilación por GRK2/3 y GRK6, respectivamente, mientras que el hH₃R₃₆₅ únicamente posee tres y un sitio para GRK2/3 y GRK6 respectivamente. Este número distinto de sitios susceptibles de fosforilación por GRK2/3 en células CHO-K1, y por GRK2/3 y GRK6 en tejidos cerebrales, puede dar lugar a “códigos de barras” que originen diferencias en la desensibilización e internalización de las isoformas del hH₃R.

8.4 Internalización de los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ por exposición prolongada a agonista

Los resultados obtenidos en ensayos de unión de radioligando en células intactas muestran que la exposición de los receptores a agonista resulta en disminución del número de ellos en la superficie celular, aunque con diferente magnitud, siendo el porcentaje de internalización mayor para la isoforma hH₃R₃₆₅. En este sentido, los receptores a dopamina D₂ (D₂R) humanos existen en dos variantes producto del procesamiento alternativo, una isoforma corta (D_{2S}) y una larga (D_{2L}), las cuales difieren en la longitud de la IL3, con 29 aa menos en esta región para la isoforma D_{2S} (Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Experimentos realizados en células CHO por el grupo de Itokawa (1996) indican que la exposición a agonistas induce disminución de la densidad del D₂R. Esta disminución fue mayor para el D_{2S}R (~44%) que para el D_{2L}R (~22%) y requirió tiempos más cortos para la isoforma D_{2S}R (~18 min contra ~32 min). Un estudio reciente (Tabor et al., 2017) confirma que la internalización inducida por agonista de la isoforma corta del D₂R es significativamente mayor que la observada para la isoforma larga (33–35% para el D_{2S}R, en contraste con 16–20% para el D_{2L}R).

La diferencia en la magnitud de internalización de las isoformas larga y corta del hD₂R, con patrón similar al observado en nuestro estudio para las isoformas corta

y larga del hH₃R, con ambos receptores (D₂ y H₃) acoplados a proteínas G α _{i/o}, plantea que las isoformas cortas (hH₃R₃₆₅ y D_{2S}R) experimentan una mayor reducción en el número de receptores expresados en la superficie celular con respecto a las isoformas largas (hH₃R₄₄₅ y D_{2L}R). Estos datos, en conjunto con lo observado en el curso temporal de la desensibilización del hH₃R₃₆₅, sugieren que esta isoforma es rápidamente desensibilizada e internalizada después de la exposición a agonista, y que la internalización favorece su reciclamiento a la membrana plasmática para tener la oportunidad de ser activada nuevamente por agonista, mientras que para el hH₃R₄₄₅ los resultados sugieren que este receptor es desensibilizado casi totalmente pero no necesariamente internalizado, indicando diferencias en las características de la regulación de la respuesta funcional de los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅.

El ARNm de la isoforma hH₃R₃₆₅ se expresa de manera más abundante que el ARNm del hH₃R₄₄₅ en el hipotálamo, donde se localizan las neuronas histaminérgicas (Bongers et al., 2007b), lo que sugiere que la isoforma hH₃R₃₆₅ podría desempeñar la función de autoreceptor, modulando la síntesis y la liberación de la propia histamina, como ha sido reportado para la isoforma de 413 aa (con 32 aa menos en la IL3) del H₃R de la rata (Gbahou et al., 2012). Si la isoforma hH₃R₃₆₅ desempeñara la función de autoreceptor, la menor susceptibilidad a la desensibilización, así como la mayor y más rápida recuperación de la respuesta (re-sensibilización) harían más eficaz la modulación de la transmisión histaminérgica.

8.5 Disminución del número total de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ y su afinidad por immpip por la exposición prolongada a agonista

La pre-incubación con el agonista RAMH también resultó en una reducción significativa en la densidad de los receptores presentes en membranas totales, acompañada de una modesta pero significativa reducción de la afinidad de las

isoformas por el agonista immpip (Tabla 4). La disminución de la densidad de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ observada en membranas totales indica que la pre-incubación con agonista induce degradación de ambas isoformas después de su internalización; sin embargo, debe considerarse que no todos los receptores internalizados son degradados, ya que el curso temporal de desensibilización sugiere que ambas isoformas son parcialmente re-sensibilizadas, siendo mayor y más rápida la recuperación del receptor hH₃R₃₆₅ en comparación con el receptor hH₃R₄₄₅.

El modelo ternario plantea que el acople de un receptor a proteína G favorece la afinidad del receptor por agonistas, y por el contrario el desacople del receptor a proteína G la disminuye (Prossnitz y Sklar, 2007); en este sentido, en el modelo clásico de la desensibilización homóloga la fosforilación de un GPCR y el subsecuente reclutamiento de las proteínas β-arrestinas previene el re-acople de la proteína G al receptor previamente activado (Luttrell y Lefkowitz, 2002; Gainetdinov et al., 2004). Es probable entonces que la reducción de la afinidad de los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ por el agonista immpip se deba a la fosforilación por GRK2/3 y el reclutamiento de β-arrestinas al receptor, impidiendo el re-acople del receptor a las proteínas G, lo que se ve reflejado en la disminución de la afinidad. Por otro lado, en la reducción de la afinidad de las isoformas del hH₃R puede participar también la internalización de una fracción de receptores de alta afinidad, acoplados a proteínas G, conduciendo a una aparente disminución de la afinidad de la población total de receptores.

8.6 Desensibilización constitutiva de los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅

Como se ha mencionado los GPCRs constitutivamente activos pueden experimentar desensibilización e internalización constitutiva, lo que resulta en la pérdida de la respuesta basal del receptor (Pei et al., 1994; Miserey-Lenkei et al., 2002; Rankin et al., 2006; Sullivan et al., 2016). En nuestros resultados

observamos que el ciproxifan, agonista inverso de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ y que por lo tanto puede reducir la actividad y la desensibilización constitutiva de las mismas, induce una mayor eficacia para inhibir la acumulación de AMPc inducida por forskolina; sin embargo, el efecto observado no fue estadísticamente diferente de las condiciones control no pudiendo establecerse que las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ experimentan desensibilización constitutiva. No obstante, este mecanismo de regulación no puede descartarse por completo, debido a que ambas isoformas expresadas en las células CHO-K1 poseen actividad constitutiva. Además, en esta serie de experimentos se obtuvo una eficacia control (inhibición máxima ~70%) lo que pudo no haber permitido observar un mayor efecto como resultado de la pre-exposición al ciproxifan.

8.7 Consideraciones finales

En resumen, nuestros datos indican que las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ experimentan desensibilización funcional homóloga como consecuencia de la exposición prologada a agonista. De manera interesante, también se observó que las isoformas difieren en la magnitud y el curso temporal de desensibilización, así como en la re-sensibilización (Figura 18). Además, los resultados muestran que la desensibilización homóloga induce disminución del número total de receptores así como reducción de la afinidad de las isoformas por el agonista immpip.

Con base en las características de internalización y re-sensibilización de los receptores hH₃R₃₆₅ y hH₃R₄₄₅, estas isoformas pueden clasificarse como GPCRs de clase A o B, respectivamente. En el mecanismo de desensibilización homóloga (Figura 5; Luttrell y Lefkowitz, 2002) se indica que los GPCRs de clase A son reciclados rápidamente a la membrana plasmática y estar nuevamente disponibles para ser activados por agonistas, patrón que corresponde al curso temporal de desensibilización de la isoforma hH₃R₃₆₅. En contraste, los GPCRs de clase B muestran reciclaje lento e incluso son degradados después de ser internalizados.

Nuestros resultados muestran una desensibilización cercana al 100% para el receptor hH₃R₄₄₅ y una menor internalización; además, la re-sensibilización de esta isoforma es menor en comparación con la de 365 aa, indicando que el receptor hH₃R₄₄₅ se comporta como un GPCR de clase B.

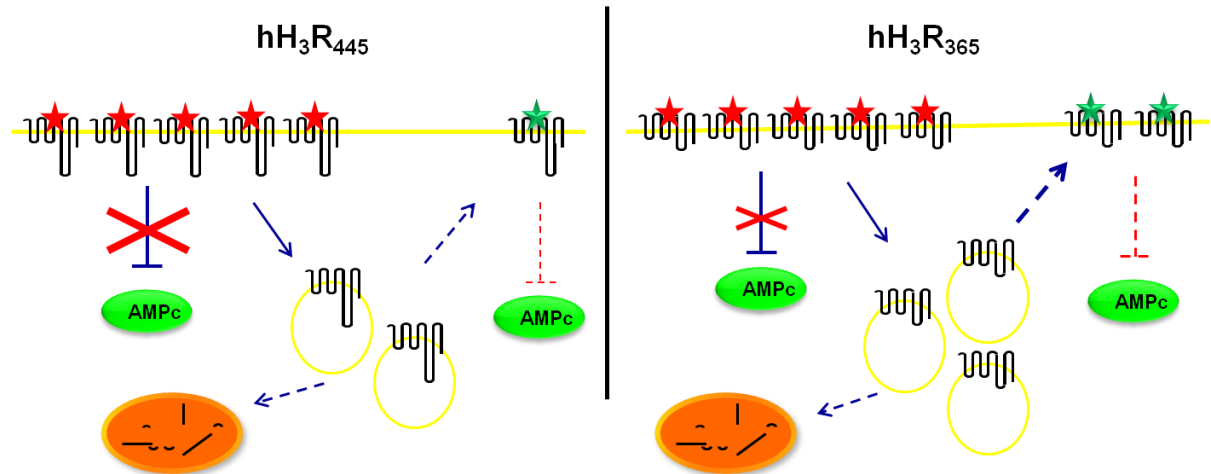


Figura 18. Modelo de la desensibilización homóloga diferencial de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅. El modelo representa que la exposición prolongada a agonista induce disminución de la respuesta funcional de los receptores (inhibición de la formación de AMPc), siendo mayor la magnitud de desensibilización para la isoforma hH₃R₄₄₅. Además, la exposición prolongada a agonista reduce el número de receptores expresados en la superficie celular. Se muestra que tanto la internalización como la recuperación de la respuesta funcional (re-sensibilización) de la isoforma hH₃R₃₆₅ son mayores con respecto al receptor de 445 aa. En ambas isoformas la exposición prolongada a agonista también induce degradación de los receptores, presumiblemente en los lisosomas. En conjunto, el modelo muestra que ambas isoformas experimentan desensibilización funcional homóloga; sin embargo, la magnitud y la velocidad de la desensibilización son diferentes, como lo son también la internalización de las isoformas y el grado de recuperación de la respuesta (re-sensibilización). La estrella roja indica la pre-incubación con el agonista RAMH (1 μM), y la estrella verde la incubación con el agonista immepip (100 nM) para evaluar la funcionalidad de los receptores después de la pre-incubación.

Las diferencias observadas en la desensibilización de las isoformas pueden estar relacionadas con la expresión diferencial del ARNm de los hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ en varias regiones cerebrales y la función asociada a esta localización (Bongers et al., 2007b, García-Galvez et al., 2016). La mayor expresión del ARNm de la isoforma hH₃R₃₆₅ con respecto a la isoforma hH₃R₄₄₅ en el hipotálamo (Bongers et al., 2007b) sugiere la participación del hH₃R₃₆₅ como autoreceptor, modulando la frecuencia de disparo de las neuronas histaminérgicas, así como la síntesis y liberación de la propia histamina (Arrang et al., 2007; Bongers et al., 2007b, Gbahou et al., 2012). Por otra parte, mediante la activación de los H₃Rs el sistema histaminérgico regula la información sináptica dada por otros neurotransmisores (Panula et al., 2015; Nieto-Alamilla et al., 2016), por lo que el control fino de la función del hH₃R₃₆₅ autoreceptor sería importante para controlar la modulación de otros sistemas.

Con base en lo anterior, se puede plantear que la desensibilización del hH₃R₃₆₅ debe alcanzar rápidamente un máximo, y a la vez mostrar una rápida recuperación de la función del receptor (re-sensibilización), características observadas en el patrón de desensibilización de esta isoforma en el presente trabajo.

9. Conclusiones

1. El hH₃R₃₆₅ expresado en células CHO-K1 experimenta desensibilización funcional homóloga.
2. La desensibilización funcional de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ difiere en la magnitud, el curso temporal y la re-sensibilización.
3. La desensibilización induce también una disminución en el número de receptores en la superficie celular, así como una disminución de la afinidad de las isoformas por el agonista immepip.

10. Perspectivas

Con base en los resultados de este proyecto, se pueden plantear nuevas preguntas en relación a la desensibilización diferencial de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅. A corto plazo, se plantean las siguientes perspectivas:

1. Determinar la función de la β -arrestina 1 y de la β -arrestina 2 en la desensibilización de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅.
2. Evaluar la participación de los residuos Ser³⁵⁸ y Ser³⁵⁹ en la desensibilización homóloga de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅.

11. Bibliografía

- Airaksinen MS, Panula P. 1988. The histaminergic system in the guinea pig central nervous system: an immunocytochemical mapping study using an antiserum against histamine. *J Comp Neurol.* 273, 163-186.
- Alonso, N., Monczor, F., Echeverría, E., Davio, C., Shayo, C., Fernández, N., 2014. Signal transduction mechanism of biased ligands at histamine H₂ receptors. *Biochem J.* 459, 117-26.
- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. 1983. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature.* 302, 832-837.
- Arrang JM, Garbarg M, and Schwartz JC. 1987. Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H₃ receptors. *Neuroscience.* 23, 149-157.
- Arrang, J.M., Morisset, S., Gbahou, F., 2007. Constitutive activity of the histamine H₃ receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 28, 350-357.
- Barnes WG, Hough LB. 2002. Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine. *J Neurochem.* 82,1262-1271.
- Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R., 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 63, 182-217.
- Bongers, G., Bakker, R. A., Leurs, R., 2007a. Molecular aspects of the histamine H₃ receptor. *Biochem Pharmacol.* 73, 1195-1204.

Bongers, G., Krueger, K.M., Miller, T.R., Baranowski, J.L., Estvander, B.R., Witte, D.G., Strakhova, M.I., van Meer, P., Bakker, R.A., Cowart, M.D., Hancock A.A., Esbenshade, T.A., Leurs, R., 2007b. An 80-amino acid deletion in the third intracellular loop of a naturally occurring human histamine H₃ receptor isoform confers pharmacological differences and constitutive activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 323, 888-898.

Bongers G. 2008. Signal transduction of the histamine H₃ receptor. Academic thesis. Vrije Universiteit, Amsterdam.

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, 47512-47517.

Burgaud JL, Oudart N. 1993. Bronchodilatation of guinea-pig perfused bronchioles induced by the H₃ receptor for histamine: role of epithelium. *Br J Pharmacol.* 109, 960-966.

Cheng Y, Prusoff W. 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 22, 3099-3108.

Clark EA, Hill SJ. 1996. Sensitivity of histamine H₃ receptor agonist-stimulated [³⁵S]GTP γ [S] binding to pertussis toxin. *Eur J Pharmacol.* 296, 223-225.

Cogé, F., Guénin, S.P., Audinot, V., Renouard-Try, A., Beauverger, P., Macia, C., Ouvry, C., Nagel, N., Rique, H., Boutin, J.A., Galizzi, J.P., 2001. Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H₃ receptor. *Biochem J.* 355, 279-288.

- Coruzzi G, Morini G, Adami M, Grandi D. 2001. Role of histamine H₃ receptors in the regulation of gastric functions. *J Physiol Pharmacol.* 52, 539-553.
- Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H, Panula P, Leurs R. 2001. Identification of rat H₃ receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol.* 59, 1–8.
- Esbenshade, T.A., Strakhova, M.I., Carr, T.L., Sharma, R., Witte, D.G., Yao, B.B., Miller, T.R., Hancock, A.A., 2006. Differential CNS expression and functional activity of multiple human H₃ receptor isoforms. *Inflamm Res.* 55, S45–S46.
- Ferguson, S.S., Barak L.S., Zhang, J., Caron, M.G., 1996. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol.* 74, 1095-1110.
- Ferguson S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 53:1-24.
- Ferguson S. 2007. Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 28, 173-179.
- Flores-Clemente, C., Osorio-Espinoza, A., Escamilla-Sánchez, J., Leurs, R., Arias, J.M., Arias-Montañó, J.A., 2013. A single-point mutation (Ala280Val) in the third intracellular loop alters the signalling properties of the human histamine H₃ receptor stably expressed in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol.* 170, 127-135.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2004. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Ann Rev Neurosci.* 27, 107-144.
- Gallagher M, Yates SL. 2007. inventors, Merck & Co. Inc., assignee. Histamine H₃ receptor polynucleotides. WO Patent o3/042359A2. 2007 May 29.

- Gantz I, Schäffer M, DelValle J, Logsdon C, Campbell V, Uhler M, Yamada T. 1991. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H₂ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 429-433.
- García-Gálvez AM, Arias-Montaña JA. 2016. Isoforms of the human histamine H₃ receptor: Generation, expression in the central nervous system and functional implications. *Gac Med Mex.* 152, 94-102.
- Garduño-Torres B, Arias-Montaña JA. 2006. Homologous down-regulation of histamine H₃ receptors in rat striatal slices. *Synapse.* 60, 165-171.
- Gbahou, F., Rouleau, A., Arrang, J.M., 2012. The histamine autoreceptor is a short isoform of the H₃ receptor. *Br J Pharmacol.* 166, 1860-1871.
- Giovannini MG, Efoudebe M, Passani MB, Baldi E, Bucherelli C, Giachi F, Corradetti R, Blandina P. 2003. Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *J Neurosci.* 23, 9016-9023.
- Haas H, Sergeeva O, Selbach O. 2008. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev.* 88,1183-1241.
- Harrison, C., Traynor, J.R., 2003. The [³⁵S]GTP γ S binding assay: Approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* 74, 489-508.
- Heding, A., Vrecl, M., Bogerd, J., McGregor, A., Sellar, R., Taylor, P.L., Eidne, K.A., 1998. Gonadotropin-releasing hormone receptors with intracellular carboxyl-terminal tails undergo acute desensitization of total inositol phosphate production and exhibit accelerated internalization kinetics. *J Biol Chem.* 273, 11472-11477.

- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL. 1997. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev.* 49, 253-278.
- Hollinger S, Hepler JR. 2002. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev.* 54, 527-559.
- Ishikawa, M., Watanabe, T., Kudo, T., Yokoyama, F., Yamauchi, M., Kato, 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.
- Itokawa, M., Toru, M., Ito, K., Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Arinami, T., Hamaguchi, H., 1996. Sequestration of the short and long isoforms of dopamine D₂ receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol.* 49, 560-566.
- Jończyk, J., Malawska, B., Bajda, M., 2017. Hybrid approach to structure modeling of the histamine H₃ receptor: Multi-level assessment as a tool for model verification. *PLoS One.* 12, e0186108.
- Karmazyn M. 1999. The role of the myocardial sodium-hydrogen exchanger in mediating ischemic and reperfusion injury: from amiloride to cariporide. *Ann N Y Acad Sci.* 874,326-334.
- Kelly E, Bailey CP, Henderson G. 2008. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol.* 153, S379-S388.
- Kim, S.K., Fristrup, P., Abrol, R., Goddard, W.A.3rd, 2011. Structure-based prediction of subtype selectivity of Histamine H₃ receptor selective antagonists in the clinical trials. *J Chem Inf Model.*51, 3262-3274.

- Kubo Y, Nakano K. 1999. Regulation of histamine synthesis in mouse CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Inflamm Res.* 48, 149-153.
- Kuramasu, A., Sukegawa, J., Sato, T., Sakurai, E., Watanabe, T., Yanagisawa, T., Yanai, K., 2011. The hydrophobic amino acids in putative helix 8 in carboxy-terminus of histamine H₃ receptor are involved in receptor-G-protein coupling. *Cell Signal.* 23, 1843-1849.
- Lai X, Ye L, Liao Y, Jin L, Ma Q, Lu B, Sun Y, Shi Y, Zhou N. 2016. Agonist induced activation of histamine H₃ receptor signals to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through PKC-, PLD-, and EGFR-dependent mechanisms. *J Neurochem.* 137, 200-215.
- Lamaze C, Dujancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell.* 7, 661-671.
- Le PU, Guay G, Altschuler Y, Nabi IR. 2002. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 277, 3371-3379.
- Leurs R, Bakker R, Timmerman H, de Esch I. 2005. The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 4, 107-120.
- Liu C, Ma X, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai W, Carruthers N, Lovenberg TW. 2001. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H₄) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol.* 59, 420-426.

- Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang 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.
- Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 115, 455-465.
- Maldonado M, Maeyama K. 2015. The metabolism of histamine in rat hypothalamus and cortex after reserpine treatment. *Neurochem Int.* 85-86, 31-39.
- Marchese, A., Paing, M.M., Temple, B.R., Trejo, J., 2008. G Protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 48, 601-629.
- Mariottini C, Scartabelli T, Bongers G, Arrigucci S, Nosi D, Leurs R, Chiarugi A, Blandina P, Pellegrini-Giampietro DE, Passani MB. 2009. Activation of the histaminergic H₃ receptor induces phosphorylation of the Akt/GSK-3 β pathway in cultured cortical neurons and protects against neurotoxic insults. *J Neurochem.* 110, 1469-1478.
- Márquez-Gómez R, García- Gálvez A, Morales -Figueroa G, Arias-Montaña JA. 2016. Modulation by histamine H₃ receptors of neurotransmitter release in the basal ganglia. Chapter 11, Histamine Receptors, preclinical and clinical aspects. Human Press.
- Masini E, Di Bello MG, Raspanti S, Ndisang JF, Baronti R, Cappugi P, Mannaioni PF. 1998. The role of histamine in platelet aggregation by physiological and immunological stimuli. *Inflamm Res.* 47, 211-220.

- Meneses D, Mateos V, Islas G, Barral J. 2015. G-protein-coupled inward rectifier potassium channels involved in corticostriatal presynaptic modulation. *Synapse*. 69, 446-452.
- Miserey-Lenkei S, Parnot C, Bardin S, Corvol P, Clauser E. 2002. Constitutive internalization of constitutively active angiotensin II AT_{1A} receptor mutants is blocked by inverse agonists. *J Biol Chem*. 277, 5891-5901.
- Molina-Hernández A, Díaz NF, Arias-Montaña JA. 2012. Histamine in brain development. *J Neurochem*. 122, 872-882.
- Monczor F, Fernandez N. 2016. Current knowledge and perspectives on histamine H₁ and H₂ receptor pharmacology: functional selectivity, receptor crosstalk, and repositioning of classic histaminergic ligands. *Mol Pharmacol*. 90, 640-648.
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM. 2000. High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature*. 408, 860-864.
- Morisset S, Sasse A, Gbahou F, Héron A, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Schwartz JC, Arrang JM. 2001. The rat H₃ receptor: gene organization and multiple isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 280, 75-80.
- 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.
- Mundy DI, Machleidt T, Ying YS, Anderson RG, Bloom GS. 2002. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 115, 4327-4339.

- Nabi IR, Le PU. 2003. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *Cell Biol.* 161, 673-677.
- Nakamura, T., Itadani, H., Hidaka, Y., Ohta, M., Tanaka, K., 2000. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun.* 279, 615-620.
- Nieto-Alamilla, G., Márquez-Gómez, R., García-Gálvez, A.M., Morales-Figueroa, G.E., Arias-Montaña J.A., 2016. The histamine H₃ receptor: structure, pharmacology, and function. *Mol Pharmacol.* 90, 649-673.
- Nobles, K.N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A.K., Lam, C.M., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Huang, T.Y., Bressler E.A., Hara, M.R., Shenoy, S.K., Gygi, S.P., Lefkowitz, R.J., 2011. Distinct phosphorylation sites on the β_2 -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci signal.* 4.
- Oldham, W.M., Hamm, H.E., 2007. How do receptors activate G proteins? *Adv Protein Chem.* 74, 67-93.
- Onorato, J.J., Palczewski, K., Regan, J.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Benovic, J.L., 1991. Role of acidic amino acids in peptide substrates of the β -adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase. *Biochemistry.* 30, 5118-5125.
- Osorio-Espinoza, A., Escamilla-Sánchez, J., Aquino-Jarquín, G., Arias-Montaña, J.A., 2014. Homologous desensitization of human histamine H₃ receptors expressed in CHO-K1 cells. *Neuropharmacology.* 77, 387-397.

- Palczewski, K., Arendt, A., McDowell, J.H., Hargrave, P.A., 1989. Substrate recognition determinants for rhodopsin kinase: studies with synthetic peptides, polyanions, and polycations. *Biochemistry*. 28, 8764-8770.
- Panula P, Nuutinen S. 2013. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci*. 14, 472-487.
- Panula, P., Chazot, P.L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W.L., Stark, H., Thurmond, R.L., Haas, H.L., 2015. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacol Rev*. 67, 601-655.
- Pei G, Samama P, Lohse M, Wang M, Codina J, Lefkowitz RJ. 1994. A constitutively active mutant β_2 -adrenergic receptor is constitutively desensitized and phosphorylated. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 2699-2702.
- Premont, R.T., Gainetdinov, R.R., 2007. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*. 69, 511-534.
- Prossnitz, E.R., Sklar L.A., 2007. Modulation of GPCR conformations by ligands, G-proteins, and arrestins. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 2, 211-228.
- Ramos J, Garduño B, Arias-Montaña JA. 2009. Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed*, 20: 100-126.
- Rankin ML, Marinec PS, Cabrera DM, Wang Z, Jose PA, Sibley DR. 2006. The D₁ dopamine receptor is constitutively phosphorylated by G protein-coupled receptor kinase 4. *Mol Pharmacol*. 69, 759-769.
- Rhee MH, Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. 2000. Differential superactivation of adenylyl cyclase isozymes after chronic activation of the CB₁ cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol*. 57, 746-752.

- Riddy, D.M., Cook, A.E., Diepenhorst, N.A., Bosnyak, S., Brady, R., Mannoury la Cour, C., Mocaer, E., Summers, R.J., Charman, W.N., Sexton, P.M., Christopoulos A., Langmead, C.J., 2016. Isoform-specific biased agonism of histamine H₃ receptor agonists. *Mol Pharmacol.* 91, 87-99.
- Rivera-Ramírez N, Montejo-López W, López-Méndez MC, Guerrero-Hernández A, Molina-Hernández A, García-Hernández U, Arias-Montañó JA. 2016. Histamine H₃ receptor activation stimulates calcium mobilization in a subpopulation of rat striatal neurons in primary culture, but not in synaptosomes. *Neurochem Int.* 101, 38-47.
- Rouleau, A., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., Morisset, S., Gbahou, F., Schwartz, J.C., Arrang, J.M., 2002. Histamine H₃-receptor-mediated [³⁵S]GTPγ[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H₃ receptors. *Br J Pharmacol.* 135, 383-392.
- Saito, S., Kadoi, Y., Ohyama, A., Goto, F., 2000. Halothane facilitates the translocation of GRK2 and phosphorylation of β₂-adrenergic receptor in rat synaptosomes. *Can J Anaesth.* 47, 73-80.
- Seifert, R., 2013. Functional selectivity of G-protein-coupled receptors: From recombinant systems to native human cells. *Biochem Pharmacol.* 86, 853-861.
- Seyedi N, Mackins CJ, Machida T, Reid AC, Silver RB, Levi R. 2005. Histamine H₃-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis: a decreased protein kinase activity mediates a reduction in intracellular calcium. *J Pharmacol Exp Ther.* 312, 272-280.
- Shayo, C., Fernandez, N., Legnazzi, B.L., Monczor, F., Mladovan, A., Baldi, A., Davio, C., 2001. Histamine H₂ receptor desensitization: involvement of a select array of G protein-coupled receptor kinases. *Mol Pharmacol.* 60, 1049-1056.

Shi Y, Sheng R, Zhong T, Xu Y, Chen X, Yang D, Sun Y, Yang F, Hu Y, Zhou N. 2012. Identification and characterization of ZEL-H16 as a novel agonist of the histamine H₃ receptor. *PLoS One*. 7:e42185.

Silver RB, Mackins CJ, Smith NC, Koritchneva IL, Lefkowitz K, Lovenberg TW, Levi R. 2001. Coupling of histamine H₃ receptors to neuronal Na⁺/H⁺ exchange: a novel protective mechanism in myocardial ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 2855-2859.

Sjögren B, Blazer LL, Neubig RR. 2010. Regulators of G protein signaling proteins as targets for drug discovery. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 91, 81-119.

Sullivan LC, Chavera TS, Jamshidi RJ, Berg KA, Clarke WP. 2016. Constitutive desensitization of opioid receptors in peripheral sensory neurons. *Pharmacol Exp Ther*. 359, 411-419.

Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 36, 461-480.

Sundvik J. 2012. The histaminergic neurotransmitter system its development and role in neuronal plasticity in zebrafish, *Danio rerio*. Tesis doctoral. Neuroscience Center and Institute of Biomedicine, Anatomy Faculty of medicine, University of Helsinki, Finland.

Tabor, A., Möller, D., Hübner, H., Kornhuber, J., Gmeiner, P., 2017. Visualization of ligand-induced dopamine D_{2S} and D_{2L} receptor internalization by TIRF microscopy. *Sci Rep*. 7, 10894.

Takehita Y, Watanabe T, Sakata T, Munakata M, Ishibashi H, Akaike N. 1998. Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. *Neuroscience*. 87, 797-805.

- Tao, Y.X., 2014. Constitutive activity in melanocortin-4 Receptor: Biased signaling of inverse agonists. *Adv Pharmacol.* 70, 135-154.
- Tardivel-Lacombe J, Morisset S, Gbahou F, Schwartz JC, Arrang JM. 2001. Chromosomal mapping and organization of the human histamine H₃ receptor gene. *Neuroreport.* 12, 321-324.
- Tardivel-Lacombe J, Rouleau A, Héron A, Morisset S, Pillot C, Cochois V, Schwartz JC, Arrang JM. 2000. Cloning and cerebral expression of the guinea pig histamine H₃ receptor: evidence for two isoforms. *Neuroreport.* 11, 755-759.
- Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG. 1994. Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem.* 269, 6093-6100.
- Tiligada, E., Kyriakidis, K., Chazot, P.L., Passani, M.B., 2011. Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS Neurosci Ther.* 17, 620-628.
- Tsui P. 2001. inventor, Smithkline Beecham Co., assignee. Human histamine H₃ gene variant-3. U.S. patent WO2001068816 A1. 2001 Sep 20.
- Uveges, A.J., Kowal, D., Zhang, Y., Spangler, T.B., Dunlop, J., Semus, S., Jones, P.G., 2002. The role of transmembrane helix 5 in agonist binding to the human H₃ receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 301, 451-458.
- Vourliotis M.E., Mayer P., Ammon S., Riechert U., Höllt V. 2001. Distribution of G protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2, 3, 5 and 6 mRNA in the rat brain. *Mol. Brain Res.* 95, 129-137.

- Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H. 1984. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.* 295, 13-25.
- Watts VJ, Neve KA. 2005. Sensitization of adenylate cyclase by $G\alpha_{i/o}$ -coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 106, 405-421.
- Wellendorph, P., Goodman, M.W., Burstein, E.S., Nash, N.R., Brann, M.R., Weiner, D.M., 2002. Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H_3 receptor. *Neuropharmacology.* 42, 929-940.
- Wess, J., 1997. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* 11, 346-354.
- Wettschureck N, Offermanns S. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 85,1159-1204.
- Wiedemann P, Bönisch H, Oerters F, Brüß M. 2002. Structure of the human histamine H_3 receptor gene (HRH3) and identification of naturally occurring variations. *J Neural Transm (Vienna).* 109, 443-453.
- Wieland, K., Bongers, G., Yamamoto, Y., Hashimoto, T., Yamatodani, A., Menge, W.M., Timmerman, H., Lovenberg T.W., Leurs, R., 2001. Constitutive activity of histamine H_3 receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H_3 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 299, 908-914.
- Willets, J.M., Taylor, A.H., Shaw, H., Konje, J.C., Challiss, R.A., 2008. Selective regulation of H_1 histamine receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in uterine smooth muscle cells. *Mol Endocrinol.* 22, 1893-1907.

- Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X., 2008. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics*. 7, 1598-1608.
- Yamashita M, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H. 1991. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88, 11515-11519.
- Yanai K, Watanabe T, Yokoyama H, Meguro K, Hatazawa J, Itoh M, Iwata R, Ishiwata K, Takahashi T, Ido T. 1992. Histamine H₁ receptors in human brain visualized in vivo by [¹¹C]doxepin and positron emission tomography. *Neurosci Lett*. 137, 145-148.
- Yang, F., Yu, X., Liu, C., Qu, C.X., Gong, Z., Liu, H.D., Li, F.H., Wang, H.M., He, D.F., Yi, F., Song, C., Tian, C.L., Xiao, K.H., Wang, J.Y., Sun, J.P., 2015. Phospho-selective mechanisms of arrestin conformations and functions revealed by unnatural amino acid incorporation and ¹⁹F-NMR. *Nat Commun*. 6, 8202.
- Yang, Z., Yang, F., Zhang, D., Liu, Z., Lin, A., Liu, C., Xiao, P., Yu, X., Sun, J.P., 2017. Phosphorylation of G protein-coupled receptors: from the barcode hypothesis to the flute model. *Mol Pharmacol*. 92, 201-210.
- Yoshikawa T, Naganuma F, Iida T, Nakamura T, Harada R, Mohsen AS, Kasajima A, Sasano H, Yanai K. 2013. Molecular mechanism of histamine clearance by primary human astrocytes. *Glia*. 61, 905-916.
- Zamponi GW, Currie KP. 2013. Regulation of Ca_v2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1828, 1629-1643.

Zwadlo-Klarwasser G, Vogts M, Hamann W, Belke K, Baron J, Schmutzler W. 1998. Generation and subcellular distribution of histamine in human blood monocytes and monocyte subsets. *Inflamm Res.* 47, 434-439.

12. Apendices

Apendice 1. Publicaciones

Neurochemistry International 112 (2018) 114–123



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nci



Differential homologous desensitization of the human histamine H₃ receptors of 445 and 365 amino acids expressed in CHO-K1 cells



Ana-Maricela García-Gálvez^a, Juan Escamilla-Sánchez^a, Catalina Flores-Maldonado^a, Rubén-Gerardo Contreras^a, Juan-Manuel Arias^b, José-Antonio Arias-Montaño^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, Zacatenco, Ciudad de México 07360, Mexico

^b Programa de Neurociencias, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 54090 Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2017

Received in revised form

14 November 2017

Accepted 17 November 2017

Available online 21 November 2017

Keywords:

Histamine

H₃ receptor

Isoforms

Desensitization

GRK

CHO-K1 cells

ABSTRACT

Histamine H₃ receptors (H₃R_s) signal through G $\alpha_{i/o}$ proteins and are found in neuronal cells as auto- and hetero-receptors. Alternative splicing of the human H₃R (hH₃R) originates 20 isoforms, and the mRNAs of two receptors of 445 and 365 amino acids (hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅) are widely expressed in the human brain. We previously showed that the hH₃R₄₄₅ stably expressed in CHO-K1 cells experiences homologous desensitization. The hH₃R₃₆₅ lacks 80 residues in the third intracellular loop, and in this work we therefore studied whether this isoform also experiences homologous desensitization and the possible differences with the hH₃R₄₄₅. In clones of CHO-K1 cells stably expressing similar receptor levels (211 \pm 12 and 199 \pm 16 fmol/mg protein for hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅, respectively), there were no differences in receptor affinity for selective H₃R ligands or for agonist-induced [³⁵S]-GTP γ S binding to membranes and inhibition of forskolin-stimulated cAMP accumulation in intact cells. For both cell clones, pre-incubation with the H₃R agonist RAMH (1 μ M) resulted in functional receptor desensitization, as indicated by cAMP accumulation assays, and loss of receptors from the cell surface and reduced affinity for the agonist immpip in cell membranes, evaluated by radioligand binding. However, functional desensitization differed in the maximal extent (96 \pm 15% and 58 \pm 8% for hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅, respectively) and the length of pre-exposure required to reach the maximum desensitization (60 and 30 min, respectively). Furthermore, the isoforms differed in their recovery from desensitization. These results indicate that the hH₃R₃₆₅ experiences homologous desensitization, but that the process differs between the isoforms in time-course, magnitude and re-sensitization.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

MINIREVIEW—A LATIN AMERICAN PERSPECTIVE ON G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

The Histamine H₃ Receptor: Structure, Pharmacology, and Function

Gustavo Nieto-Alamilla, Ricardo Márquez-Gómez, Ana-Maricela García-Gálvez, Guadalupe-Elide Morales-Figueroa, and José-Antonio Arias-Montaña

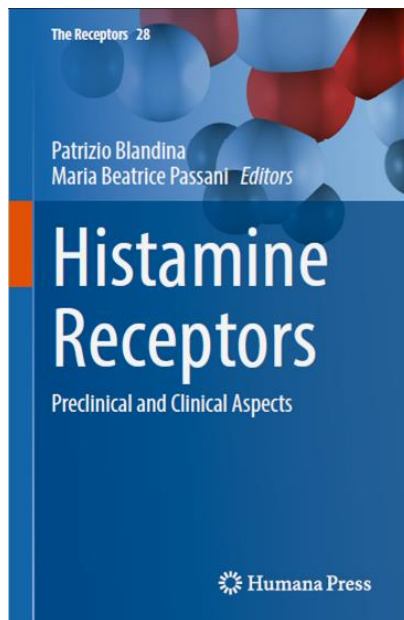
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav-IPN), Zacatenco, Ciudad de México, México

Received April 15, 2016; accepted August 24, 2016

ABSTRACT

Among the four G protein-coupled receptors (H₁–H₄) identified as mediators of the biologic effects of histamine, the H₃ receptor (H₃R) is distinguished for its almost exclusive expression in the nervous system and the large variety of isoforms generated by alternative splicing of the corresponding mRNA. Additionally, it exhibits dual functionality as autoreceptor and heteroreceptor, and this enables H₃Rs to modulate the histaminergic and other neurotransmitter systems. The cloning of the H₃R cDNA in 1999 by Lovenberg et al. allowed for detailed studies of its molecular aspects. In this work, we review the

characteristics of the H₃R, namely, its structure, constitutive activity, isoforms, signal transduction pathways, regional differences in expression and localization, selective agonists, antagonists and inverse agonists, dimerization with other neurotransmitter receptors, and the main presynaptic and postsynaptic effects resulting from its activation. The H₃R has attracted interest as a potential drug target for the treatment of several important neurologic and psychiatric disorders, such as Alzheimer and Parkinson diseases, Gilles de la Tourette syndrome, and addiction.



Chapter 11 Modulation by Histamine H₃ Receptors of Neurotransmitter Release in the Basal Ganglia

Ricardo Márquez-Gómez, Ana-Maricela García-Gálvez, Guadalupe-Elide Morales-Figueroa, and José-Antonio Arias-Montaño

Abstract Among the four G-protein coupled receptors (H₁-H₄) identified as the mediators of the biological effects of histamine, the H₃ receptor (H₃R) distinguishes for its almost exclusive expression in the nervous system and its dual function as auto- and hetero-receptor that enables H₃Rs to modulate the histaminergic and other neurotransmitter systems. The basal ganglia are neuronal nuclei that form a sub-cortical circuitry responsible for integrating motor and sensorial information originated in the cerebral cortex and the thalamus. The abundant presence of H₃Rs in the basal ganglia confers these receptors a preferential and strategic position to modulate both the incoming and the outgoing synaptic information. In this chapter we review the control by H₃Rs of the release of the neurotransmitters involved in the basal ganglia circuitry.

Keywords Acetylcholine • Basal ganglia • Calcium channels • Cerebral cortex • Central nervous system • GABA • G protein-coupled receptors • Dopamine • Globus pallidus • Glutamate • Histamine • Histamine H₃ receptors • Hypothalamus • Neurotransmitter release • Neuromodulation • Noradrenaline • Serotonin (5-Hydroxytryptamine) • Striatum • Substantia nigra • Subthalamic nucleus • Thalamus

Isoformas del receptor a histamina H_3 humano: generación, expresión en el sistema nervioso central (SNC) e implicaciones funcionales

Ana Maricela García-Gálvez y José Antonio Arias-Montaño*

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), México, D.F., México

Resumen

La histamina es un importante neuromodulador del SNC humano que participa en la regulación de diversas de sus funciones. Las neuronas histaminérgicas se localizan exclusivamente en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo, de donde envían axones a otras regiones del cerebro, al cerebelo y a la médula espinal. Los efectos de la histamina se ejercen mediante la activación de cuatro receptores acoplados a proteínas G (GPCR): H_1 , H_2 , H_3 y H_4 . En el SNC los tres primeros se expresan de manera importante; el receptor H_3 (H_3R) se encuentra exclusivamente en las células neuronales como auto o heteroreceptor, y un aspecto relevante es la existencia de isoformas con diferente número de aminoácidos, generadas por el procesamiento alternativo del ARN mensajero (ARNm) precursor. Para el receptor humano se han identificado 20 isoformas con base en la detección del ARNm correspondiente. Un número importante de ellas no son funcionales, ya que carecen de las regiones necesarias para la unión del agonista o para la transducción de señales, pero al menos cinco isoformas muestran funcionalidad al ser expresadas en sistemas heterólogos. En este trabajo se revisan los procesos que generan las diferentes isoformas del H_3R humano (hH_3R), sus características estructurales, su expresión en el SNC y la información disponible sobre su función.

PALABRAS CLAVE: Histamina. Receptor H_3 . Isoformas. Procesamiento alternativo. ARN mensajero. Sistema nervioso central. Neuromodulación.

Apéndice 2. Modelo ternario

