



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

Regulación de la función del receptor a histamina H₃

Tesis que presenta

M. en C. Wilber Montejo López

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Neurobiología Celular y Molecular

Director de la Tesis

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

México, D.F

Marzo, 2019

Agradecimientos

A mi familia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado.

“La verdad no existe, no ha existido nunca. La verdad es siempre la verdad de algunos, que aceptan que otros tengan su propia verdad o al contrario, imponen su verdad a la verdad de los otros.....”

JOSÉ SARAMAGO

ÍNDICE

CAPITULO I. Desensibilización heteróloga mediada por la PKC del receptor H₃ humano expresado en células CHO-K1

1.1 Antecedentes	1
1.1.2 El sistema histaminérgico del SNC.....	1
1.1.3 Receptores a histamina	2
1.1.4 Receptor a histamina H ₃ (H ₃ R)	3
1.1.5 Señalización intracelular del H ₃ R.....	4
1.1.6 Desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)	5
1.1.7 Desensibilización de los H ₁ Rs y H ₂ Rs	6
1.1.8 Desensibilización del H ₃ R.....	7
1.2 Planteamiento del problema.....	10
1.3 Hipótesis de trabajo.....	12
1.4 Objetivos	12
1.4.1 Objetivo general.....	12
1.4.2 Objetivos específicos.....	12
1.5 Metodología	13
1.5.1 Análisis bioinformático.....	13
1.5.2 Cultivo celular.....	14
1.5.3 Determinación de la concentración de Ca ²⁺ libre citosólico ([Ca ²⁺] _i).....	14
1.5.4 Experimentos de desensibilización.....	14
1.5.5 Efecto del TPA o ATP en la estimulación por el H ₃ R de la unión de [³⁵ S]-GTPγS en membranas celulares.....	15
1.5.6 Efecto del TPA o ATP en la unión de [³ H]-NMHA en células intactas.....	16

1.6 Resultados	17
1.6.1 Identificación de posibles sitios e fosforilación por PKC en el hH ₃ R ₄₄₅	17
1.6.2 Expresión del H ₃ R ₄₄₅ por células CHO-K1 establemente transfectadas.....	18
1.6.3 Efecto de la activación directa de la PKC por un éster de forbol (TPA) en la inhibición mediada por el hH ₃ R ₄₄₅ de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina.	20
1.6.4 Efecto del ATP en la [Ca ²⁺] _i en las células CHO-K1- hH ₃ R ₄₄₅	23
1.6.5 Efecto del ATP en la inhibición por el H ₃ R de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina.	25
1.6.6 Efecto del TPA o ATP en la unión de [³⁵ S]-GTPγS en membranas celulares.	28
1.6.7 Efecto de TPA o ATP en la unión de [³ H]-NMHA a células intactas CHO-K1- hH ₃ R ₄₄₅	30
1.7 Discusión.....	32
1.8 Conclusión	35
1.9 Bibliografía	36
CAPITULO II. Densidad y señalización del receptor H₃ en el hipocampo de la rata en un modelo de Diabetes Mellitus I	47
2.1 Antecedentes	52
2.1.1 Diabetes Mellitus	53
2.1.2 Expresión del H ₃ R en el sistema nervioso central	56
2.1.3 Histamina y diabetes	58
2.1.4 Neuropatía diabética e histamina	61
2.2 Planteamiento del problema.....	65
2.3 Hipótesis de trabajo.....	67
2.4 Objetivos	67

2.4.1 Objetivo general.....	67
2.4.2 Objetivos específicos.....	67
2.5 Metodología	68
2.5.1 Animales y protocolos.....	68
2.5.2 Inducción de la diabetes.....	68
2.5.3 Preparación de rebanadas del hipocampo.....	68
2.5.4 Preparación de sinaptosomas.....	69
2.5.5 Unión de [³ H]-NMHA en membranas sinaptosomales.....	69
2.5.6 Liberación de [³ H]-glutamato en rebanadas del hipocampo. .	70
2.5.7 Detección por Western Blot de la fosforilación inducida por el H ₃ R de ERK-1/2 (p44/p42 ERK) y Akt (Serina473) en rebanadas del hipocampo.....	71
2.6 Resultados	73
2.6.1 Efecto de la DMI en la densidad del H ₃ R en sinaptosomas de la corteza prefrontal, el hipocampo y el neocórtex de ratas hembra y macho.....	73
2.6.2 Efecto de la DMI en la expresión del H ₃ R en sinaptosomas y en membranas totales del hipocampo de ratas hembra.....	74
2.6.3 Efecto de la DMI en la modulación de la transmisión glutamatérgica mediada por el H ₃ R en el hipocampo de rata.....	76
2.6.4 Efecto de la DMI en la fosforilación de ERK1/2 mediada por el H ₃ R en el hipocampo de la rata hembra.....	78
2.6.5 Efecto de la DMI en la fosforilación de Akt (Serina473) mediada por el H ₃ R en el hipocampo de la rata hembra.....	80
2.7 Discusión.....	86
2.8 Conclusión	93
2.9 Bibliografía	94

Abreviaturas

[³ H]-NMHA	[³ H]-N-metilhistamina
Aa	Aminoácido
AC	Adenilil ciclasa
AGE	Producto final de glicación avanzada
AMPc	3,5-Monofosfato cíclico de adenosina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero (ARNm)
ATP	Trifosfato de adenosina
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
[Ca ²⁺] _i	Concentración intracelular de calcio
cDNA	ADN complementario
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CHO-K1	Células de ovario de hámster chino
DAG	Diacilglicerol
DAO	Diamina oxidasa
DM	Diabetes mellitus
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERKs	Cinasas activadas por mitógenos
FPR	Tasa máxima de falsos positivos
FRET	Transferencia de energía por resonancia de Förster
Fura-2/AM	Fura-2 acetoximetil-éster
G-418	Geneticina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDP	Difosfato de guanosina
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de la glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagón-1
GLUT	Transportador de Glucosa
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPS	Sistema de predicción basada en grupos
GRKs	Cinasas de GPCRs

GSK3 β	Cinasa 3 β de la sintasa de glucógeno
GTP	Trifosfato de guanosina
hH ₃ R ₄₄₅	Receptor a histamina H ₃ R humano de 445 aa
H ₁ R	Receptor a histamina H ₁
H ₂ R	Receptor a histamina H ₂
H ₃ R	Receptor a histamina H ₃
H ₄ R	Receptor a histamina H ₄
HDC	Descarboxilasa de L-histidina
I _{max}	Inhibición máxima
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IBMX	Isobutil-metil-xantina
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
KRH	Krebs-Ringer-Hepes (solución)
MAPKs	Cinasas de proteína activadas por mitógenos
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NADPH ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PIP ₂	4,5-bifosfato de fosfatidil-inositol
PI3K	3-cinasa de fosfatidilinositol
PKA	Cinasa A de proteínas
PKB	Cinasa B de proteínas (Akt)
PKC	Cinasa C de proteínas
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PS	fosfatidilserina
PSP	Sitios peptídicos de fosforilación
RAGE	Receptor de productos finales de glicación avanzada
RAMH	R- α -metilhistamina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SFB	Suero fetal bovino
shRNAi	ARN de interferencia pequeño horquillado
SNr	Sustancia nigra pars reticulata
STZ	Estreptozotocina
TMN	Núcleo tuberomamilar
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
SNC	Sistema Nervioso Central
TMN	Núcleo tuberomamilar

C A P I T U L O I

Desensibilización heteróloga mediada por la PKC
del receptor a histamina H₃ humano expresado
en células CHO-K1

Resumen

La desensibilización es un mecanismo importante para regular la función de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). El objetivo de la primera parte de esta tesis fue determinar si el receptor H₃ humano de 445 aa (hH₃R₄₄₅) experimenta desensibilización heteróloga debida a la activación de la cinasa C de proteínas (PKC). Un análisis bioinformático indicó la presencia de residuos de Serina y Treonina susceptibles de fosforilación por la PKC en la tercera asa intracelular y el extremo carboxilo terminal del hH₃R₄₄₅. En células CHO-K1 establemente transfectadas con el hH₃R₄₄₅, la activación directa de la PKC por el éster de forbol-12-miristato-13-acetato (TPA, 200 nM) abolió el efecto inhibitorio de la activación del hH₃R₄₄₅ en la formación de AMPc inducida por forskolina. La activación de receptores purinérgicos por ATP (10 μM) aumentó la concentración intracelular de calcio ([Ca²⁺]_i) confirmando su acople a la estimulación de la fosfolipasa C. La incubación con ATP también abolió el efecto inhibitorio de la activación del hH₃R₄₄₅ en la formación de AMPc inducida por forskolina, y este efecto fue prevenido por los inhibidores de la PKC Ro-31-8220 y Gö-6976. La preincubación con TPA o ATP redujo la estimulación mediada por la activación del H₃R de la unión de [³⁵S]-GTPγS a membranas de células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ (-39.7% y -54.2%, respectivamente), sin cambios en la potencia del agonista, y el efecto fue prevenido por Ro-31-8220 o Gö-6976. La exposición a ATP o TPA también redujo el número de H₃Rs en la superficie celular (-30.4% y -45.1%) de acuerdo a los ensayos de unión de [³H]-NMHA en células intactas. En conjunto, estos resultados indican que el hH₃R₄₄₅ es susceptible de desensibilización heteróloga inducida por la activación de receptores acoplados a la estimulación de la PKC.

Abstract

Desensitization is a major mechanism to regulate the functional response of G protein-coupled receptors (GPCRs). In the first part of this thesis we studied whether the human histamine H₃ receptor of 445 amino acids (hH₃R₄₄₅) experiences heterologous desensitization mediated by PKC activation. Bioinformatic analysis indicated the presence of Serine and Threonine residues susceptible of PKC-mediated phosphorylation on the third intracellular loop and the carboxyl terminus of the hH₃R₄₄₅. In CHO-K1 cells stably transfected with the hH₃R₄₄₅, direct PKC activation by phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA, 200 nM) abolished the H₃R-mediated inhibition of forskolin-stimulated cAMP accumulation. Activation of endogenous purinergic receptors by ATP (10 μM) increased the free calcium intracellular concentration ([Ca²⁺]_i) confirming their coupling to phospholipase C stimulation. Incubation with ATP also abolished the H₃R-mediated inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation, and this effect was prevented by the PKC inhibitors Ro-31-8220 and Gö-6976. Pre-incubation with TPA or ATP reduced H₃R-mediated stimulation of [³⁵S]-GTPγS binding to membranes from CHO-K1-hH₃R₄₄₅ cells by 39.7% and 54.2%, respectively, with no effect on the agonist potency, and the effect was prevented by either Ro-31-8220 or Gö-6976. Exposure to ATP or TPA also resulted in the loss of cell surface H₃Rs (-30.4% and -45.1 %) as evaluated by [³H]-NMHA binding to intact cells. These results indicate that the hH₃R₄₄₅ undergoes heterologous desensitization upon activation of receptors coupled to PKC stimulation.

1.1 Antecedentes

En el sistema nervioso central (SNC), la histamina es producida por una población de neuronas y por los mastocitos mediante la acción de la enzima descarboxilasa de L-histidina (HDC), que cataliza la síntesis a partir del amino ácido L-histidina. Sin embargo, la contribución de los mastocitos a la generación de histamina es modesta en la mayoría de las regiones del SNC en el cerebro de la rata adulta, y un número significativo de mastocitos se encuentra solo en el tálamo dorsal y en la eminencia media. La importancia funcional de la histamina producida por los mastocitos no está bien definida, si bien durante el desarrollo post-natal temprano estas células generan una fracción significativa de la histamina total presente en el SNC (Hospital 1991).

1.1.2 El sistema histaminérgico del SNC

El núcleo tuberomamilar (TMN), situado en el hipotálamo posterior, congrega a todas las neuronas histaminérgicas del SNC de los mamíferos. Las neuronas que producen histamina, envían sus axones (que son extensiones del cuerpo de la célula encargadas de la comunicación con otras neuronas) a prácticamente todo el cerebro. En el ser humano se encuentran aproximadamente 64,000 neuronas histaminérgicas en el TMN, localizadas entre dos áreas, rostralmente al núcleo supraóptico y caudalmente al tegmento ventral, mientras que en el cerebro de la rata se encuentran aproximadamente 4,600 neuronas histaminérgicas distribuidas bilateralmente (Watanabe et al. 1984; Panula y Nuutien 2013). Por lo que la histamina de manera natural regula muchas funciones que forman parte de nuestra vida cotidiana como: el control del sueño y la vigilia, la ingestión de agua y alimentos, el comportamiento, la atención, la actividad motora, la temperatura corporal, la conducta sexual, de agresión y de defensa (Nieto-Alamilla et al. 2017).

Además de la histamina, las neuronas del TMN sintetizan otros neurotransmisores, como el ácido γ -aminobutírico (GABA), y neuromoduladores como galanina, encefalinas y sustancia P. La función de estos transmisores aún se desconoce, y solo se sabe que las neuronas del TMN pueden actuar como una fuente importante de GABA extra-sináptico (Vincent et al. 1983; Hass et al. 2008).

Las neuronas del TMN aparecen tardíamente en el desarrollo de los mamíferos y maduran lentamente. Envían proyecciones a todas las áreas principales del SNC, con algunas excepciones (Panula y Nuutinen 2013). En todos los mamíferos, la corteza cerebral, la amígdala, la sustancia negra y el neocórtex reciben inervación histaminérgica moderada o densa, y la retina y la médula espinal también reciben fibras histaminérgicas (Haas y Panula 2003).

Se ha reportado también inervación del TMN recíproca con otros grupos de neuronas aminérgicas. Las proyecciones aferentes a las neuronas del TMN provienen de diferentes áreas, destacando la corteza infralímbica, el septum lateral y el núcleo preóptico. La inervación por el tallo cerebral se origina principalmente en los grupos adrenérgicos C1-C3, noradrenérgicos A1-A3 y serotoninérgicos B5-B9, mientras que el locus coeruleus y las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y el área ventral tegmental envían sólo unas pocas fibras (Haas y Panula 2003).

1.1.3 Receptores a histamina

A la fecha se han descrito cuatro receptores a histamina, todos acoplados a proteínas G (H_1 a H_4), y en el SNC se ha determinado la presencia de tres de ellos (H_1R , H_2R y H_3R ; ver Tabla 1). Los H_1R s y H_2R s se encuentran en células neuronales y gliales, mientras que los H_3R s se expresan de manera mayoritaria en las neuronas. Los H_1R s y H_2R s se expresan post-sinápticamente en todas las regiones del cerebro, con funciones importantes principalmente en la corteza cerebral, el hipocampo, el neocórtex y el hipotálamo (Haas y Panula 2003; Panula et al. 2015).

Inicialmente se planteó que los H₃Rs actuaban como autorreceptores en las neuronas histaminérgicas, regulando la liberación de histamina. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que los H₃Rs también actúan como heterorreceptores en neuronas no histaminérgicas, modulando la liberación de varios neurotransmisores, incluyendo el GABA, el glutamato, la acetilcolina y la noradrenalina (Panula y Nuutinen 2013). Además, los H₃Rs también tienen una localización post-sináptica en algunas regiones cerebrales, como el neostriado, donde modulan la señalización de los receptores a dopamina (Ferrada et al. 2008).

La posible función del H₄R en el SNC todavía está en duda, en buena medida debido a la ausencia de pruebas concluyentes de su expresión en las estructuras cerebrales. Sin embargo, el ARNm del H₄R está presente en todas las regiones analizadas del SNC humano, incluyendo la médula espinal, el hipocampo, la corteza, el tálamo y la amígdala, con altos niveles de ARNm en la médula espinal. En rata, se detectó el ARNm del H₄R en la corteza, el cerebelo, el tronco encefálico, la amígdala, el tálamo y el estriado, con niveles muy bajos en el hipotálamo, y no se detectó señal del ARNm para el H₄R en el hipocampo de la rata. Curiosamente, se detectó una fuerte expresión de ARNm del H₄R en el GRD de rata y la médula espinal (Strakhova et al. 2009).

1.1.4 Receptor a histamina H₃ (H₃R)

Después del descubrimiento de los efectos biológicos de la histamina en 1910, los dos primeros receptores fueron propuestos en 1966 y 1972, con base en los criterios farmacológicos clásicos de la selectividad de las drogas (Ash y Schild 1966; Black et al. 1972).

Una estrategia similar permitió a Jean-Michel Arrang y Jean-Charles Schwartz identificar en 1983 al H₃R como un autorreceptor pre-sináptico que regulaba negativamente la liberación de la propia histamina en rebanadas del cerebro de la rata. Posteriormente, el H₃R fue identificado como un heterorreceptor pre-sináptico en neuronas no histaminérgicas

Tabla 1. Características de los receptores a histamina

Características	H ₁ R	H ₂ R	H ₃ R	H ₄ R
Proteína G	Gαq/11	Gαs	Gαi/o	Gαi/o
Actividad constitutiva	Moderada	Moderada	Alta	?
Expresión periférica	Íleon, músculo liso, corazón	Pulmón, corazón, intestino, músculo liso	Pulmón, sistema cardiovascular, intestino	Células hematopoyéticas
Expresión en el SNC	Tálamo, hipocampo, corteza, amígdala y prosencéfalo basal	Ganglios basales, hipocampo, amígdala, núcleos del rafe, sustancia negra	Núcleo accumbens, neocórtex, tubérculo olfatorio, amígdala, sustancia negra	?
Función general	Ciclo vigilia-sueño, respuestas inflamatorias, disminución de la presión arterial	Regulación de la secreción ácida gástrica, control de la presión arterial, relajación del músculo liso vascular y de las vías aéreas, excitación neuronal, regulación de la secreción hormonal	Regulación de la síntesis y liberación de la histamina; modulación de la liberación de otros neurotransmisores	Modulación del sistema inmune
Función celular	Excitabilidad post-sináptica y plasticidad	Excitabilidad post-sináptica y plasticidad	Regulación pre-sináptica de la liberación de transmisores‡ y plasticidad	?
Aminoácidos	486 (rata) 487 (humano) 489 (ratón)	358 (rata y ratón) 359 (canino, cobayo y humano)	445: más abundante. Múltiples isoformas de 326 a 453 aa	390 aa
Vía de señalización	↑PLC→↑IP ₃ →↑Ca ²⁺ →↑DAG→↑PKC	↑AC→↑AMPc→↑PKA	↓AC→↓AMPc→↓PKA Gβγ →↓gCa ²⁺	↓AC→↓AMPc→↓PKA
Afinidad por la histamina	Micromolar	Micromolar	Nanomolar	Nanomolar
Agonistas	2-piridiletilamina Metil-histaprodifen 2-fenilhistamina	dimaprit amtamina impromidina	immepip imetit	4-metilhistamina VUF-8430
Antagonistas	tripolidina mepiramina clorfeniramina	tiotidina ranitidina cimetidina	clobenpropit tioperamida iodoproxifan	VUF-6002 tioperamida
Radioligandos	[³ H]-mepiramina	[³ H]-tiotidina	[³ H]-NMHA [³ H]-RMHA [¹²⁵ I]-yodoproxifan	[³ H]-histamina

‡ Autorreceptor en las neuronas histaminérgicas y heterorreceptor en neuronas aminérgicas, glutamatérgicas, GABAérgicas y peptidérgicas.

de los sistemas nerviosos central y periférico, modulando la liberación de otros neurotransmisores, incluyendo el GABA, el glutamato, la dopamina, la acetilcolina, adrenalina/noradrenalina, la serotonina y la sustancia P (Schlicker et al. 1994; Blandina et al. 1996; Yamamoto et al. 1997; García et al. 2004).

Como parte de un esfuerzo dirigido a descubrir nuevos receptores acoplados a proteínas G, mediante la búsqueda de homología en bases de datos con una secuencia tag expresada, se identificó una clona parcial (GPCR97) con una homología significativa con los receptores de aminas biogénicas (Lovenberg et al. 1999). La transfección del GPCR97 en varias líneas celulares resultó en inhibición por la histamina de la formación de AMP cíclico (AMPC) estimulada por forskolina, pero no por acetilcolina u otras aminas biogénicas, siendo identificado como el H₃R humano, cuyo cDNA codificaba una proteína de 445 amino ácidos (aa).

En el ser humano, el gene se encuentra en el cromosoma 20 en la posición 20q13.33 y se ha propuesto que la región codificadora consiste de tres exones y dos intrones, o cuatro exones y tres intrones. La aparición del exón adicional conduce a la presencia de ocho aa adicionales en el extremo carboxilo terminal, que se encuentran en algunas isoformas del H₃R humano (Cogé et al. 2001).

En el SNC humano, y por procesamiento alternativo en los sitios de unión exón-intrón, se generan al menos 20 isoformas del H₃R y se han identificado varias isoformas del receptor en la rata, el cobayo, el mono y el ratón. Algunas de las isoformas identificadas carecen de regiones críticas para la unión de agonistas (regiones transmembranales, TM, 3 y 5-7) o de señalización (asas intracelulares, ICL, 2 y 3, y el extremo carboxilo terminal, CT) y, por lo tanto, no desencadenan las vías de señalización típicamente asociadas con la activación del H₃R (Wess, 1997; Uveges et al., 2002; Oldham and Hamm, 2007; Ishikawa et al., 2010; Kim et al., 2011; Kuramasu et al., 2011).

El H₃R es expresado principalmente en neuronas y en muy baja densidad por las células gliales (Arrang et al., 1987a; Ferreira et al., 2012). Los estudios de hibridación *in situ* muestran niveles muy altos del RNAm del H₃R en la corteza (principalmente en la capa V, con menor expresión en las capas superficiales), hipocampo (CA1 y capas piramidales ventrales de CA3 del cuerno de Ammon), caudado y putamen. También se observa una alta expresión del RNAm en el núcleo olfatorio anterior, la amígdala, los núcleos del lecho de la estría terminal, cerebelo, el tálamo (principalmente en los núcleos sensoriales e intralaminares) y algunos núcleos hipotalámicos, particularmente el TMN, donde se localizan las neuronas histaminérgicas. Una expresión baja a moderada del ARNm se detecta en la habénula y la zona incerta; y los niveles son bajos en el globo pálido y la sustancia negra (SN) (Tardivel-Lacombe et al., 2000; Pillot et al., 2002; Sallmen et al., 2003).

El análisis por RT-PCR de la expresión de las isoformas de 445 y 365 aa del H₃R en el cerebro humano, indica niveles elevados en cerebelo y en el núcleo caudado, con una moderada expresión en el hipotálamo y el tálamo, una baja expresión en la SN, hipocampo, corteza prefrontal, cuerpo caloso y la amígdala, y niveles muy bajos en la médula espinal (Bongers et al., 2007b).

Los ensayos de unión muestran una distribución similar del H₃R en cerebros de primates y roedores. El receptor se expresa ampliamente pero con densidad heterogénea, y se encuentra en niveles elevados en la corteza cerebral (excepto en la capa V), la tenia tecta, el núcleo accumbens, el neocórtex, el hipocampo, los núcleos del lecho de la estría terminal, los núcleos olfativos, algunos núcleos hipotalámicos (principalmente el TMN), la amígdala y la corteza piriforme. En contraste con la expresión del RNAm, los ensayos muestran una alta unión en el globo pálido y la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Se ha reportado además una baja densidad de los sitios de unión en el locus coeruleo y los núcleos del rafé (Martinez-Mir et al., 1990; Pollard et al., 1993; Anichtchik et al., 2000; Pillot et al., 2002).

La localización del H₃R es principalmente pre-sináptica, ya sea como autorreceptor o como heteroreceptor, pero hay evidencia de una localización post-sináptica en el neocórtex, la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo accumbens, el hipotálamo lateral y la zona incerta (Pillot et al., 2002; González-Sepúlveda et al., 2013; Parks et al., 2014).

1.1.5 Señalización intracelular del H₃R

La clonación del cDNA del H₃R en 1999 por Lovenberg et al. permitió el estudio detallado de sus características moleculares mostrando que el H₃R puede activar varias vías de transducción de señales dependientes del acople a proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Bongers et al. 2007). La activación de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ por el H₃R se ha confirmado mediante la expresión heteróloga del receptor, y en diversas líneas de células transfectadas con el H₃R éste se acopla negativamente a la adenilato ciclasa, la cual estimula la formación de AMPc. A su vez el AMPc activa a la cinasa A de proteínas (PKA) que fosforila a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), modulando así la transcripción de genes.

La activación del H₃R y de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ resulta en la estimulación de otras vías efectoras, incluyendo las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) y la vía de la 3-cinasa de fosfatidilinositol (PI3K). La activación de las MAPKs y de la PI3K por el H₃R resulta en la fosforilación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) y de la cinasa B de proteínas (PKB, también conocida como Akt). La Akt activada inhibe la acción de la 3 β -cinasa de la sintasa de glucógeno (GSK₃ β), una proteína crítica que participa en los procesos tempranos del desarrollo neuronal, como la neurogénesis y la migración neuronal (Luo, 2012).

También mediante las proteínas G $\alpha_{i/o}$ la activación del H₃R estimula a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y la liberación de ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico y lisofosfolípidos, y la actividad de la PLA₂ está controlada por la alta actividad constitutiva del H₃R, definida como la activación del receptor en ausencia de agonistas. Esta característica

tiene como resultado la señalización intracelular tónica, y en el SNC de la rata la actividad constitutiva del H₃R inhibe de manera tónica la síntesis y la liberación de la histamina, así como la excitabilidad de las neuronas histaminérgicas (Morisset et al. 2000; Stevens et al. 2001; Rouleau et al. 2002; Moreno-Delgado et al. 2006; Arrang et al. 2007; Haas et al. 2008;)

Por otra parte, la activación del H₃R disminuye la actividad del intercambiador Na⁺/H⁺ neuronal, y esta vía fue propuesta como el mecanismo por el cual el H₃R inhibe la liberación excesiva de noradrenalina en la isquemia miocárdica prolongada. La activación del H₃R disminuye también la entrada de Ca²⁺ a través de canales dependientes de voltaje, acción que subyace el efecto inhibitorio de los H₃Rs en la liberación de neurotransmisores inducida por despolarización mediante la unión de los complejos G_{βγ} a la subunidad α₁ que forma el poro de los canales de Ca²⁺ regulados por voltaje tipos N y P/Q (Zamponi y Currie, 2013). En consecuencia, la activación del H₃R reduce la entrada de Ca²⁺ inducida por la despolarización (Takeshita et al., 1998; Molina-Hernández et al., 2001; Silver et al., 2002; Morrey et al., 2008).

Las subunidades G_{βγ} se unen y activan a los canales de K⁺ de rectificación de entrada o GIRKs (Bünemann et al., 2001), y el H₃R activa a los canales formados por las subunidades GIRK1 (Kir3.1) y GIRK4 (Kir3.4) expresadas en ovocitos de *Xenopus* (Sahlholm et al., 2012). Los GIRKs pueden inhibir la transmisión sináptica (Meneses et al., 2015), y su activación representaría un mecanismo adicional para la modulación por el H₃R de la liberación de neurotransmisores.

1.1.6 Desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los GPCRs constituyen la más grande familia de proteínas receptoras de la superficie celular (Pierce et al. 2002). Todos los GPCRs exhiben un contexto dependiente de su actividad, es decir, la sensibilidad del

receptor cambia en relación a la magnitud de la señalización que se genera en una célula dada, de manera que los receptores modifican su sensibilidad a la gama de concentraciones de agonistas a los que están expuestos (Premont y Gainetdinov 2007). En este contexto, la desensibilización de un GPCR puede ser descrita como la pérdida de la respuesta después de la administración prolongada o repetida de un agonista (Caron et al. 1990).

La desensibilización de los GPCRs puede ser homóloga o heteróloga; la homóloga se refiere a la pérdida de respuesta únicamente a los agonistas que actúan en un subtipo de receptor en particular, mientras que la desensibilización heteróloga se refiere a un efecto más generalizado que implica la pérdida simultánea de la capacidad de respuesta al agonista en múltiples subtipos de GPCRs, incluso en ausencia del agonista de los otros receptores (Kelly et al. 2008). Un importante mecanismo para regular la respuesta de los GPCRs es la vía de las cinasas de GPCRs (GRKs) y β -arrestinas (Gainetdinov et al. 2004; Penela et al. 2003; Ferguson 2001). Esta vía también facilita la internalización del receptor a través de vesículas revestidas de clatrina. Además, mediante la unión a proteínas de señalización adicionales, las GRKs y las β -arrestinas funcionan como interruptores de la señalización, convirtiendo las vías mediadas por proteínas G en vías independientes de las mismas (Luttrell 2005; Lefkowitz y Shenoy 2005).

1.1.7 Desensibilización de los H₁Rs y H₂Rs

Un importante mecanismo subyacente a la desensibilización de los GPCRs es su fosforilación, y diversos estudios han mostrado la capacidad de las GRKs para fosforilar y, en conjunto con las proteínas β -arrestinas, desensibilizar a numerosos GPCRs (Stadel et al. 1983; Krupnick y Benovic 1998; Pitcher et al. 1998; Ferguson 2001; Willets et al. 2003).

Existen evidencias que los H₁Rs y H₂Rs experimentan desensibilización. Los H₁Rs estimulan la generación de los segundos mensajeros

1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y diacilglicerol, DAG (Hill 1990; Willets et al. 2008; Dale et al. 2018). El IP₃ conduce a la liberación de Ca²⁺ desde depósitos intracelulares, mientras que el DAG activa a varias isoformas de la PKC (Huang 1989; Webb et al. 2000; Steinberg 2008). La transfección de células de músculo liso con dominantes negativos de las GRKs o con RNAs de interferencia pequeños para estas cinasas mostraron que la GRK2 es responsable de la desensibilización del H₁R (Willets et al., 2008). Por otra parte, estudios realizados en células COS-7 co-transfectadas transitoriamente con el H₂R y diferentes GRKs (2, 3, 5 ó 6), muestran que las GRK2 y GRK3 son las responsables de la fosforilación del receptor (Shayo et al, 2001).

Con base en la co-expresión de los H₁Rs y H₂Rs en diferentes líneas celulares, varios estudios apoyan una regulación coordinada entre ambos receptores. Alonso-Natalia et al. (2013) evidenciaron la desensibilización cruzada que ocurre entre los H₁Rs y H₂Rs, independiente de las cinasas PKA o PKC, tanto en las células U937 con expresión endógena de los receptores como en células CHO transfectadas. Las respuestas antiproliferativa y apoptótica inducidas por la activación del H₁R fueron inhibidas por la estimulación del H₂R, lo que indica que la interacción entre ambos receptores modifica su función. Los análisis por FRET y estudios de microscopía confocal revelaron que ambos receptores heterodimerizan y co-internalizan en respuesta a los agonistas respectivos, y que esta desensibilización cruzada está mediada por la GRK2 (Alonso et al. 2013).

1.1.8 Desensibilización del H₃R

Pérez-García y colaboradores estudiaron la posible desensibilización del H₃R en el íleo de cobayo, donde la activación de estos receptores inhibe la contracción inducida por un choque eléctrico al reducir la liberación de acetilcolina de las neuronas colinérgicas post-ganglionares. Su reporte muestra que en la exposición subsecuente al agonista *R*- α -metilhistamina (RAMH, 30 y 60 min después de la primera aplicación) se reducen tanto la potencia del agonista como la inhibición

máxima, aunque de manera modesta (~16%; Pérez-García et al., 1998; Alguacil y Pérez-García, 2003).

En un resumen de congreso, utilizando microscopía confocal Powell y Hill (2003) indican que en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con el H₃R humano fusionado con la proteína verde fluorescente (GFP), la estimulación con un agonista indujo internalización del receptor con un máximo a los 90 min. Aparentemente este trabajo no se continuó ya que no existen reportes posteriores. Por otra parte, llama la atención el tiempo requerido para la internalización, ya que para otros receptores acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ como el receptor a dopamina D₂ (Roseboom y Gnegy 1989; Macey et al. 2004) y el receptor muscarínico M₂ (Tsuga et al. 1998a) la desensibilización, analizada también en sistemas de expresión heteróloga, requiere tiempos menores (10-30 min).

Por otra parte, la desensibilización del H₃R no había sido abordada en el SNC de los mamíferos, y nuestro laboratorio reportó que la incubación de rebanadas del neocórtex con agonistas del H₃R (5-30 min) resultaba en una disminución significativa tanto en la densidad de los receptores, evaluada por la unión de [³H]-N-metil-histamina a membranas de dichas rebanadas, como en la afinidad por el radioligando. Este efecto fue prevenido, aunque parcialmente, por incubación en un medio hipertónico, pero no por otros inhibidores de la endocitosis (Garduño-Torres y Arias-Montaña 2006).

En otro estudio de nuestro laboratorio (Osorio-Espinoza et al. 2014) se analizó la desensibilización homóloga del H₃R utilizando un sistema de expresión heteróloga. En células CHO-K1 transfectadas de manera estable con el H₃R humano (hH₃R) las respuestas funcionales se redujeron después de la exposición al agonista. Para los ensayos de acumulación de AMPc el efecto fue significativo a los 60 min con un máximo a los 90 min, y fue acompañado de la pérdida de receptores en la membrana celular. Estos efectos fueron prevenidos por pre-incubación a 4°C o en un medio hipertónico, pero no por filipina III, indicando la

endocitosis del receptor por un mecanismo dependiente de clatrina. Estos resultados indicaron que el hH₃R experimenta desensibilización homóloga en respuesta a la exposición prolongada a sus agonistas.

Las células CHO-K1 expresan a las GRK2 y/o GRK3 (Osorio-Espinoza et al. 2014), y tanto la desensibilización funcional como la internalización del hH₃R fueron prevenidas por un shRNAi contra la GRK2, indicando la participación selectiva de esta cinasa en la desensibilización homóloga del receptor.

Sin embargo, y hasta donde podemos decir, la posible desensibilización heteróloga del H₃R es un aspecto que no ha habido sido abordado. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar si el hH₃R se desensibiliza por la activación de cinasas dependientes de segundos mensajeros, en particular de la PKC, al estimular otros receptores.

1.2 Planteamiento del problema

La exposición a sus agonistas a menudo resulta en una rápida atenuación de la capacidad de respuesta de los GPCRs. Este proceso, denominado desensibilización homóloga, es la consecuencia de una combinación de diferentes mecanismos. El grado de desensibilización del receptor está regulado por un número de factores, que incluyen la estructura del receptor y el medio ambiente celular. En la desensibilización heteróloga, el receptor no necesita estar activado, sino que la estimulación de cinasas dependientes de segundos mensajeros (PKA y PKC) por un receptor diferente, conduce a la fosforilación de residuos de Serina y/o Treonina en la tercera asa intracelular o en la región carboxilo terminal del GPCR y consecuentemente a la desensibilización del receptor (Ferguson y Caron 1998).

Ejemplo de lo anterior es la fosforilación del adrenoceptor β_2 (β_2 AR) mediada por PKA, que disminuye el acople del receptor a las proteínas $G\alpha_s$ en favor de un acople a proteínas $G\alpha_{i/o}$, lo que conduce a la activación de vías características de estas proteínas como la estimulación de las cinasas ERKs y MAPKs (Daaka et al. 1997; Lawler et al. 2001; Zamah et al. 2002; Martin et al. 2004).

Una posibilidad sería entonces que el H_3R , como otros GPCRs, pudiera experimentar desensibilización heteróloga. Análisis preliminares sugerían la presencia de residuos de Serina y Treonina en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo del H_3R humano, y un estudio realizado en el laboratorio indicó que la activación de la PKC por el éster de forbol TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) reducía la respuesta funcional de la activación del H_3R humano de 445 aa expresado establemente en células de neuroblastoma SH-SY5Y. Sin embargo, y como se definió antes, la desensibilización heteróloga implicaría la activación de un receptor diferente al H_3R , acoplado a la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) y por lo tanto a la formación de diacilglicerol (DAG) y la activación de la PKC.

Por lo tanto, en este proyecto se planteó utilizar a las células CHO-K1 establemente transfectadas con el H₃R humano de 445 aa, para analizar si la activación de receptores a ATP, expresados de manera endógena y acoplados a la activación de la PLC y por lo tanto de la PKC, inducía desensibilización del receptor.

1.3 Hipótesis de trabajo

El receptor H₃ humano de 445 aa (hH₃R₄₄₅) presentará desensibilización heteróloga debida a la activación de receptores acoplados a la estimulación de la PLC y la activación de la PKC.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar si el hH₃R₄₄₅ experimenta desensibilización heteróloga mediada por PKC en un sistema de expresión heterólogo.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia en el hH₃R₄₄₅ de residuos de Serina y/o Treonina susceptibles de fosforilación por la PKC, utilizando un análisis bioinformático.
2. Determinar el efecto de la activación directa de la PKC por un éster de forbol (TPA) en la señalización del hH₃R₄₄₅ en células CHO-K1 establemente transfectadas.
3. Confirmar que las células CHO-K1 expresan receptores a ATP acoplados a la activación de la PLC, y por lo tanto a la movilización de calcio desde depósitos intracelulares.
4. Determinar si la activación de receptores a ATP induce cambios en la señalización del hH₃R₄₄₅.

1.5 Metodología

1.5.1 Análisis bioinformático.

La predicción de los sitios de fosforilación en el hH₃R₄₄₅ se realizó con GPS 3.0, un programa de predicción basado en grupos, con un corte de umbral alto (tasa de falsos positivos del 2%, FPR). Nuestro estudio consideró a la familia de las PKCs, una de las ocho familias de cinasas de Serina/Treonina. El reconocimiento y la fosforilación de residuos de Serina y/o Treonina por la PKC requieren la presencia de amino ácidos básicos en la proximidad de dichos residuos. Por lo tanto, se analizaron todos los posibles dominios de reconocimiento por la PKC. Los residuos putativos de fosforilación por PKC presentes fueron elegidos de acuerdo a la puntuación. La similitud entre dos sitios peptídicos de fosforilación (PSP; 15 aminoácidos), dado un PSP putativo, se comparó con todos los sitios conocidos para calcular las puntuaciones de sustitución. El valor medio de las puntuaciones de sustitución se calculó como el resultado final de la predicción de un sitio dado.

Utilizando un algoritmo de puntuación para fosforilación, se analizó si el sitio dado era un sitio potencial y real de fosforilación bajo diferentes umbrales (alto, medio, bajo). El valor de la puntuación es proporcional a la probabilidad de fosforilación. Los valores de corte (*cut-off*) y de umbral fueron elegidos de la misma manera. En primer lugar, se calculó la tasa máxima de falsos positivos (FPR) teórica para cada grupo de cinasas de proteínas. Los tres umbrales de GPS 3.0 se determinaron con base en los FPRs calculados. Para las cinasas de Serina/Treonina, los umbrales alto, medio y bajo, se establecieron con FPRs de 2%, 6% y 10%. El umbral alto fue validado por una predicción a gran escala de los sitios de fosforilación de mamíferos, con un rendimiento satisfactorio. El valor de corte (*cut-off*) fue la puntuación requerida para considerar a una predicción como plausible (GPS 3.0).

1.5.2 Cultivo celular.

Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅, generadas en el laboratorio (Flores-Clemente et al., 2013) se cultivaron en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ en aire, a 37 °C, en medio DMEM/F-12 conteniendo 10% de suero fetal bovino y geneticina (G-418; 400 µg/ml).

1.5.3 Determinación de la concentración de Ca²⁺ libre citosólico ([Ca²⁺]_i).

Las mediciones se realizaron en células individuales cargadas con Fura 2-AM. Las células se incubaron en solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH) que contenía Fura 2-AM (2 µM, Molecular Probes), albúmina de suero bovino (BSA, 5 mg/ml) y probenecid (1 mM). Después de 1 h en la oscuridad y a temperatura ambiente, la cámara de registro se montó en un microscopio invertido TMD (Nikon) acoplado a un microfluorómetro RF-F3010 (Photon Technology International), para la determinación de la relación de fluorescencia de Fura2 (λ 510 nm) después de la excitación a 340 o 380 nm. Se adquirieron datos a 20 Hz y se determinó la fluorescencia de fondo a 340 y 380 nm en un área libre de células, la cual fue sustraída. Los fármacos se aplicaron por perfusión (1 ml/min). La composición de la solución KRH fue (mM): NaCl 113, Hepes 20, NaHCO₃ 25, glucosa 15, KCl 4.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2 y KH₂PO₄ 1.2; pH 7.4 con NaOH.

1.5.4 Experimentos de desensibilización.

Efecto del TPA o ATP en la inhibición por el H₃R de la acumulación de AMPc inducida por forskolina

Las células, cultivadas en placas de 24 pozos, se lavaron con 500 µl de solución KRH antes de la incubación (37 °C) en 250 µl de la misma solución que contenía IBMX (3-isobutil-1-metilxantina, 1 mM). Después de 20 min, se añadieron 10 µl de H₂O (basal) o forskolina (10 µM como concentración final) y la incubación se continuó durante 15 min. Cuando se requirió, se adicionó el agonista del H₃R immepip en un volumen de

10 μ l, 5 min antes que la forskolina. El TPA y el ATP se adicionaron en un volumen de 10 μ l, 15 min antes del imepip. La incubación se terminó por aspiración del medio y la adición de 250 μ l de HCl 0.1 M frío. La composición de la solución KRH fue (mM): NaCl 113, Hepes 20, NaHCO₃ 25, glucosa 15, KCl 4.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2 y KH₂PO₄ 1.2; el pH fue ajustado a 7.4 con NaOH.

Las muestras se neutralizaron con 25 μ l de NaOH (1 M) y 100 μ l de Tris-HCl (1 M, pH 7.4), se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 15,000xg por 5 min (4°C). Muestras de 50 μ l del sobrenadante se mezclaron con 75 μ l de solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, EGTA 1 mM, BSA 5 mg/ml, pH 7.0). conteniendo [³H]-AMPc (10 nM). El contenido de AMPc endógeno se determinó por inhibición de la unión de [³H]-AMPc a la subunidad reguladora de la PKA, y se expresó como pmol AMPc/pozo con base en una curva estándar.

1.5.5 Efecto del TPA o ATP en la estimulación por el H₃R de la unión de [³⁵S]-GTP γ S en membranas celulares.

Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅, sembradas en placas Petri de plástico de 10 cm de diámetro, se incubaron en solución KRH en ausencia o presencia de TPA (200 nM) o ATP (10 μ M). Después de 35 min, las células se lavaron con solución PBS, se lisaron en una solución hipotónica fría (Hepes 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4) conteniendo un cóctel de inhibidor de proteasas (1:100 v:v; Sigma-Aldrich), y la suspensión se centrifugó a 32,000xg (20 min, 4°C). La pastilla (membranas) se resuspendió en 2 ml de solución Hepes (Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4) que contenía desaminasa de adenosina (10 UI/ml) y se incubó durante 30 min a 30 °C. Se añadió solución Hepes fría (20 ml) y la suspensión se centrifugó (42,000xg, 20 min, 4 °C).

La pastilla resultante se resuspendió en solución Hepes, y alícuotas de ~20 μ g de proteína se incubaron en ausencia y presencia del agonista del H₃R imepip en 250 μ l de solución de Hepes que contenía 10 mM de MgCl₂, 0.1 mM de ditioneitol (DTT), 10 μ M de GDP, 1 mg/ml de BSA,

0.2 mM de EDTA, 10 mg/ml de saponina y 50 pM de [³⁵S]-GTPγS. La unión no específica se determinó en presencia de 10 μM de GTPγS. Después de 60 min a 30°C, se filtró rápidamente a través de filtros GF/B, con tres lavados de 1 ml con solución Hepes fría. La radiactividad retenida en los filtros se cuantificó por centelleometría. El contenido de proteína se determinó con el ensayo de ácido bicinconínico (BCA, Pierce) utilizando BSA como estándar.

1.5.6 Efecto del TPA o ATP en la unión de [³H]-NMHA en células intactas.

La unión de [³H]-NMHA a los receptores de la superficie celular se evaluó en el lavado ácido, como se describe por Heding et al. (1998). Las células, sembradas placas de 24 pozos (2.5x10⁵ células/pozo), se incubaron con TPA (200 nM) o ATP (10 μM) durante 35 min a 37°C, y se lavaron 2 veces con 500 μl de solución KRH fría antes de incubar (4°C, 5 h) en 200 μl de la misma solución conteniendo [³H]-NMHA. La unión no específica se determinó en presencia de 10 μM de clobenpropit. Al final de la incubación, las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío y la [³H]-NMHA unida al receptor se disoció mediante incubación en 400 μl de una solución salina ácida (ácido acético 50 mM, NaCl 150 mM, pH 2.8) durante 12 min a 37°C. Se determinó la radiactividad presente en el lavado ácido y la unión específica se obtuvo restando la unión insensible a clobenpropit de la unión total.

La unión específica se expresó como receptores/célula después de la transformación del conteo de radiactividad (desintegraciones/min, dpm) en Curies (2.22x10¹² dpm/Ci), y posteriormente en fmol del ligando marcado, de acuerdo a la actividad específica (85.4 Ci/mmol) El valor resultante se dividió por el número de células presente en los pozos, determinado con un contador automático (Countess; Invitrogen). La radiactividad restante en las células se determinó después de la solubilización durante 1 h en Triton-X 100 (1% en H₂O desionizada).

1.6 Resultados

1.6.1 Identificación de posibles sitios e fosforilación por PKC en el hH₃R₄₄₅.

Las PKCs fosforilan residuos de Serina o Treonina localizados en la proximidad de residuos básicos (Zeng et al., 2012), y el análisis de la secuencia de aminoácidos del hH₃R₄₄₅ con el programa bioinformático GPS 3.0 indicó la presencia de 14 de estos residuos (Figura 1) en la tercera asa intracelular (11 Serinas y 2 Treoninas) y en el extremo C terminal (1 Serina).

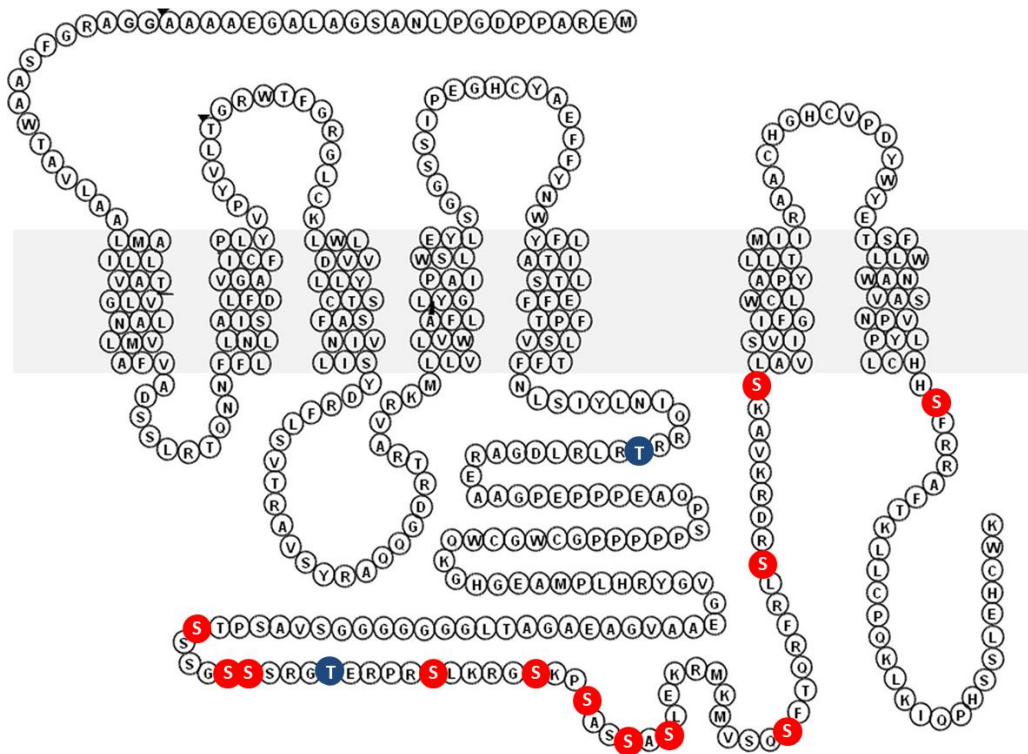


Figura 1. Identificación de residuos de Serina y Treonina en la secuencia de aminoácidos del hH₃R₄₄₅ susceptibles de fosforilación por la PKC. Los residuos de Serina se muestran en rojo y los de Treonina en azul. Estos residuos corresponden a 11 residuos de Serina y 2 de Treonina en la tercera asa intracelular, y 1 residuo de Serina en el extremo carboxilo terminal.

La Tabla 2 muestra estos residuos, la secuencia peptídica identificada, los valores de puntuación y el umbral asignado por el programa GPS 3.0.

Tabla 2. Posibles sitios de fosforilación del hH₃R₄₄₅ por la PKC.

Posición	Residuo	Péptido	Puntaje	Cut-off
229	T	YLN I QRR T RLRLDGA	2.513	1.944
305	S	GSVASPT S SGSSSR	3.032	2.892
309	S	SPTSSSG S SRGTER	3.909	2.702
310	S	PTSSSG S SRGTERP	3.441	2.702
314	T	SGSSSRG T ERPRSLK	3.430	2.702
319	S	RGTERPR S LKRGSKP	5.928	2.702
324	S	PRSLKRG S KPSASSA	3.782	2.702
327	S	LKRGSKP S ASSASLE	3.372	2.702
330	S	GSKPSAS S ASLEKRM	4.125	4.069
332	S	KPSASSA S LEKRMKM	3.812	2.702
343	S	RMKMVSQ S F T QRFRL	3.613	2.892
351	S	FTQRFRL S RDRK V AK	4.111	2.702
359	S	RDRK V AK S LAVIVSI	3.409	2.122
418	S	LYPLCHH S FRRAFTK	3.857	2.702

La identificación de los residuos se realizó con el programa GPS 3.0; solo se muestran los aminoácidos presentes en la tercera asa intracelular y el extremo carboxilo terminal del hH₃R₄₄₅. S, serina; T, treonina.

1.6.2 Expresión del H₃R₄₄₅ por células CHO-K1 establemente transfectadas.

La clonación del hH₃R por Lovenberg et al. (1999) indicó que el gene codificaba un GPCR de 445 aa expresado casi exclusivamente en el cerebro. Sin embargo, estudios posteriores han identificado varias isoformas del H₃R en diferentes especies, incluyendo el humano. Estas isoformas se generan por la eliminación de un pseudo-intrón, de longitud variable, que se encuentra en la región del gene correspondiente a la tercera asa intracelular del receptor (Hancock et al. 2003).

El análisis por RT-PCR de la distribución en el cerebro del RNAm de las isoformas del hH₃R reveló que las variantes del receptor se co-expresan en el cerebro humano, que su nivel relativo de expresión varía de manera específica para las regiones cerebrales, y que la isoforma de 445 aa (hH₃R₄₄₅) es la más abundante (Cogé et al. 2001).

Para esta tesis, se confirmó la expresión del hH₃R₄₄₅ en dos clonas de células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ generadas previamente en nuestro laboratorio (Flores-Clemente et al. 2013). Como se muestra en la Figura 2, la expresión correspondió a 112 ± 10 y 312 ± 12 fmol/mg de proteína para las clonas A y B, respectivamente. La clona B, con mayor nivel de expresión, fue seleccionada para los experimentos subsecuentes.

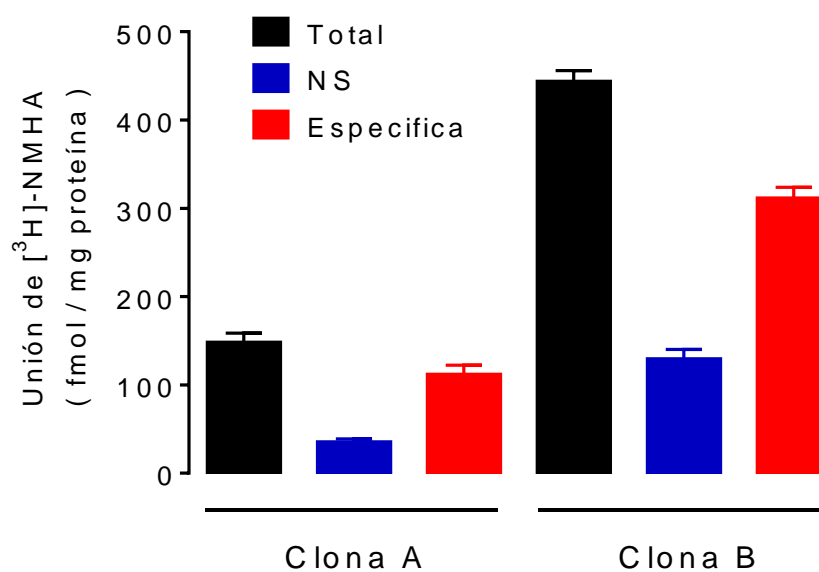


Figura 2. Expresión del hH₃R₄₄₅ por células CHO-K1 establemente transfectadas. Las membranas celulares se incubaron con 2 nM de [³H]-NMHA, y la unión específica se obtuvo al restar la unión en presencia de histamina (10 μM, unión inespecífica) de la unión total. Los valores son la media ± error estándar (SEM) de determinaciones por cuadruplicado.

1.6.3 Efecto de la activación directa de la PKC por un éster de forbol (TPA) en la inhibición mediada por el hH₃R₄₄₅ de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina.

Desde su descubrimiento en 1958 por Rall y Sutherland, el AMPc ha sido implicado en una amplia variedad de vías de señalización celular en prácticamente todos los tipos de células de los mamíferos. El segundo mensajero es producido por las enzimas adenilil ciclasas (ACs) y degradado por fosfodiesterasas. Como medida directa de la actividad de las ACs, en células intactas se determinó la acumulación de AMPc inducida por forskolina, un fármaco que activa directamente a las ACs (Manji y cols. 1992).

El H₃R se acopla a proteínas G $\alpha_{i/o}$ y por lo tanto a la inhibición de las ACs (Lovenberg et al. 1999; Morisset et al. 2000). Como para otros GPCRs acoplados a proteína G $\alpha_{i/o}$, este efecto se debe a una interacción directa entre la subunidad G $\alpha_{i/o}$ y las ACs sensibles (1, 3, 5, 6 y 8). En las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ (Figura 3) el agonista immpip inhibió la acumulación de AMPc inducida por forskolina de manera dependiente de la concentración, lo que confirma la expresión funcional del hH₃R₄₄₅.

Una manera de estudiar los efectos celulares de la activación de la PKC es el empleo de análogos estructurales del diacilglicerol. El TPA, también conocido como PMA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*), es un diéster de forbol y un potente promotor de tumores (Nakajima et al. 2013), que transloca y activa directamente a las PKCs e induciendo la fosforilación de proteínas (Lee et al. 2014).

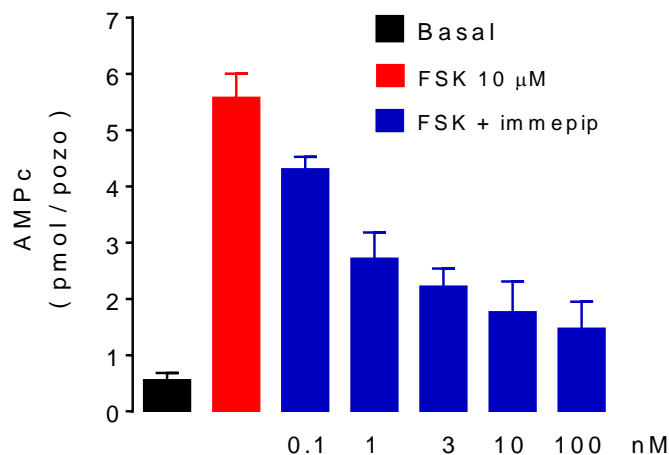


Figura 3. Inhibición por activación del H₃R de la acumulación de AMPc inducida por forskolina en células CHO-K1-hH₃R₄₄₅. Las células fueron incubadas en ausencia y presencia de forskolina y las concentraciones indicadas del agonista im m e pip. Se muestra un experimento representativo de 11 realizados con resultados similares. Los valores corresponden al promedio \pm SEM de determinaciones por triplicado.

En un primer abordaje para analizar si la respuesta del hH₃R expresado en las células CHO-K1 podía ser modificada por la acción de la PKC, las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ fueron expuestas a TPA (200 nM), 15 minutos antes que el im e pip. La Figura 4 muestra que el TPA abolió el efecto inhibitorio del im e pip (100 nM), agonista selectivo del H₃R, en la acumulación de AMPc estimulada por forskolina. Este efecto fue prevenido por dos inhibidores de la PKC, Ro-81220 o Gö-6976 (10 μM).

La acumulación de AMPc estimulada por forskolina fue significativamente mayor en las células tratadas con TPA que en las células control ($134.8 \pm 2.1\%$, Figura 5). Este efecto fue también prevenido por Ro-81220 y Gö-6976 (Figura 5A), y podría deberse a la sensibilización por la PKC de las adenilil ciclasas (ACs) 6 y 7 (Beazely et al., 2005; Willoughby et al., 2007), expresadas por las células CHO (Varga et al., 1998), precursoras de las células CHO-K1. Los inhibidores de la PKC no modificaron por sí mismos el efecto de la forskolina (Figura 5B). La acción del TPA en la inhibición por el hH₃R₄₄₅ de la acumulación

de AMPc sugirió que la activación de la PKC resulta en desensibilización funcional del hH₃R₄₄₅.

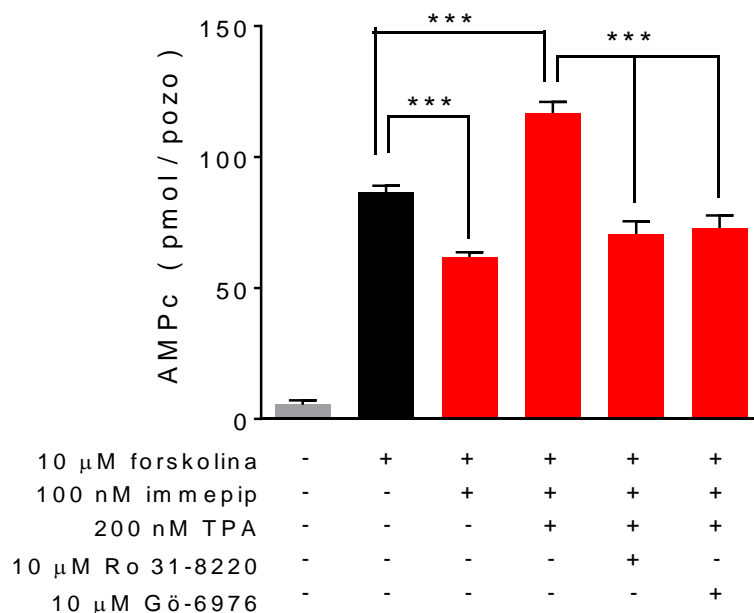


Figura 4. Efecto de la activación de la PKC con TPA y de los inhibidores Ro-81220 y Gö-6976 en la inhibición por immpip, agonista del H₃R, de la acumulación de AMPc inducida por forskolina. Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ se incubaron durante 20 min en medio KRH que contenía IBMX (1 mM) en ausencia o presencia de TPA (200 nM) antes de la adición de forskolina (10 μM) y la incubación durante 15 min adicionales. El immpip (100 nM) se añadió 5 min antes de la forskolina, y el Ro-31-81220 y el Gö-6976 (10 μM) 20 min antes del TPA. Los datos son la media ± SEM de cinco experimentos, cada uno con determinaciones por triplicado. El análisis estadístico se realizó con Anova de una vía y la prueba de Tukey; *** *P* < 0.001.

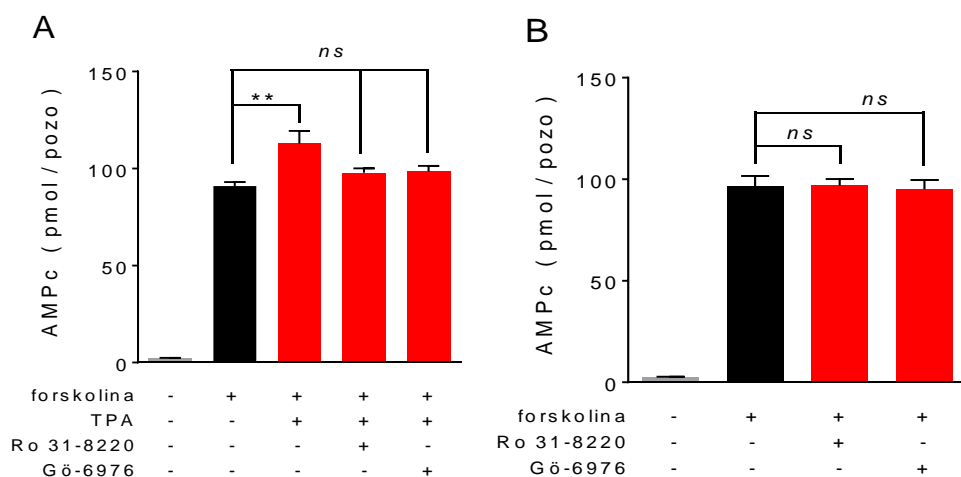


Figura 5. Efecto del TPA y de los inhibidores de la PKC Ro-81220 y Gö-6976 en la en la acumulación de AMPc inducida por forskolina. Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ se incubaron durante 20 min en medio KRH que contenía IBMX (1 mM) en ausencia o presencia de TPA (200 nM) antes de la adición de forskolina (10 μM) y la incubación por 15 min adicionales. Los inhibidores de la PKC, Ro-31-81220 y Gö-6976 (10 μM), se añadieron 20 min antes del TPA. **A)** Prevención por los inhibidores de la PKC de la acción estimuladora del TPA en la acumulación de AMPc estimulada por forskolina. Los datos son promedios ± SEM de tres experimentos, cada uno con determinaciones por triplicado. **B)** Ausencia de efecto de los inhibidores de la PKC en la acumulación de AMPc estimulada por forskolina. Los datos son promedios ± SEM de tres experimentos, cada uno con determinaciones por triplicado. El análisis estadístico se realizó con Anova de una vía y la prueba de Tukey; *ns*, sin diferencia, ** *P* < 0.01.

1.6.4 Efecto del ATP en la [Ca²⁺]_i en las células CHO-K1- hH₃R₄₄₅.

Las purinas (adenosina, ADP y ATP) y pirimidinas (UDP y UTP) son moléculas que inducen diversos e importantes efectos biológicos, incluyendo el desarrollo, la proliferación y la diferenciación celulares en numerosos tejidos, acciones debidas a la activación de receptores presentes en la superficie celular, denominados receptores a purina (Abbracchio et al. 1998). Existen dos familias de estos receptores, a adenosina (P1), y los receptores P2, que reconocen principalmente a ATP, ADP, UTP y UDP. Con base en la estructura molecular y los mecanismos de señalización, los receptores P2 se dividen en dos

subfamilias: 1) metabotrópicos P2Y (acoplados a proteínas G) y 2) ionotrópicos P2X (Von Kugelgen 2006). Se han clonado siete y ocho subtipos de receptores P2X (P2X₁₋₇) y P2Y (P2Y_{1,2,4,6,11-14}; White y Burnstock 2006). Los receptores P2Y_{1,2,4,6,y11} se acoplan preferentemente a proteínas G $\alpha_{q/11}$ y por lo tanto a la activación de la PLC β , y la consiguiente formación de IP₃ y DAG (Ralevic y Burnstock 1998; Bowler 1999; Erb 2006).

Las células CHO-K1 expresan receptores purinérgicos P2Y₂, acoplados a la estimulación de la PLC y a la formación DAG e IP₃ (Ashida et al., 2008; Alexander et al., 2011). A fin de evaluar la estimulación fisiológica de la PKC, se analizó el efecto de la activación de los receptores purinérgicos endógenos con ATP, un agonista general, en la [Ca²⁺]_i.

La perfusión de las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ con solución KRH que contenía 10 μ M de ATP indujo un marcado aumento en la [Ca²⁺]_i (Figura 6A). El ATP indujo una respuesta similar en células perfundidas con solución KRH sin CaCl₂, lo que indica que el aumento en la [Ca²⁺]_i se debe principalmente a la liberación del catión desde depósitos intracelulares por activación de receptores a IP₃. La Figura 6B muestra que el efecto del ATP fue prevenido por suramina (100 μ M), un antagonista general de los receptores P2Y (pK_B para los receptores P2Y₂, 50 μ M; Von et al., 2016).

Estos resultados confirmaron la presencia de receptores purinérgicos acoplados a la activación de PLC en las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅.

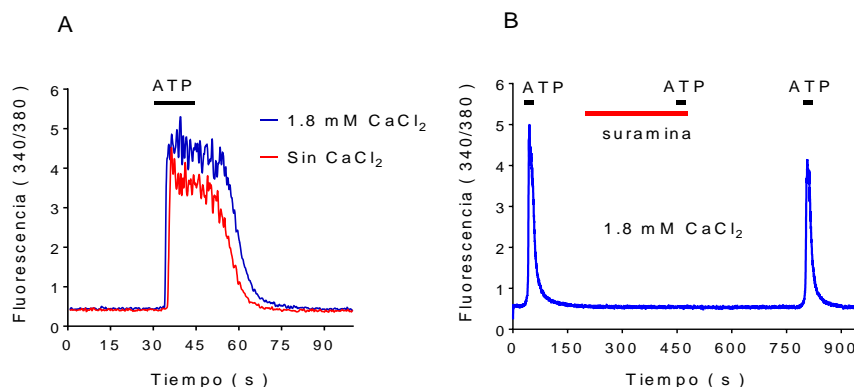


Figura 6. Efecto del ATP en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) de las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅. Las células cargadas con Fura 2-AM se perfundieron con solución KRH y se expusieron a los fármacos por los tiempos indicados por las barras. **A)** Efecto del ATP (10 μM) en solución KRH que contiene CaCl_2 (1.8 mM) o solución sin adición de CaCl_2 . **B)** Bloqueo del efecto del ATP por suramina (100 μM), un antagonista general de los receptores purinérgicos. Después de la adición de la suramina, las células fueron lavadas por 5 minutos con solución KRH. Se muestran trazos representativos de 10 determinaciones para cada condición, en células individuales.

1.6.5 Efecto del ATP en la inhibición por el H₃R de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina.

La exposición de las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ a ATP (10 μM) abolió el efecto inhibitorio del agonista immpip (100 nM) en la acumulación de AMPc estimulada por forskolina (Figura 7). A su vez, la acción del ATP fue prevenida por la suramina (100 μM), indicando una acción mediada por receptores purinérgicos.

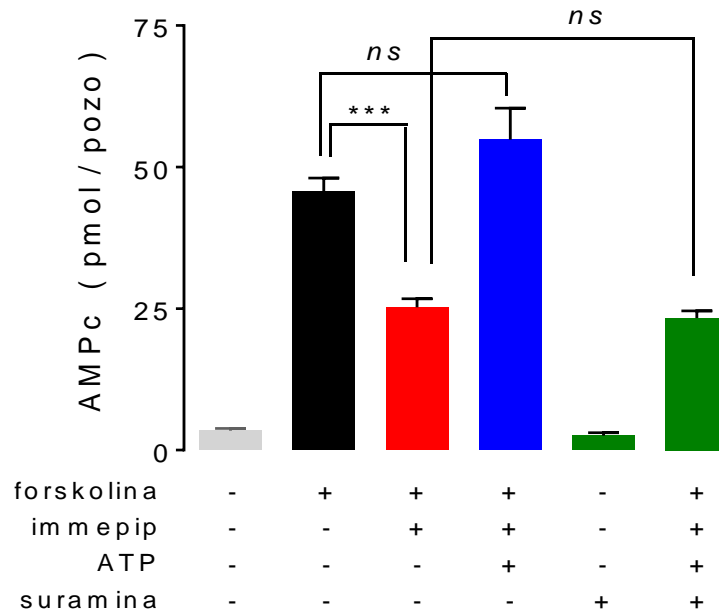


Figura 7. Efecto del ATP en la inhibición por im m e pip de la acumulación de AMPc inducida por forskolina. Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ se incubaron durante 20 min en medio KRH que contenía IBMX (1 mM) en ausencia o presencia de ATP (10 μ M) antes de la adición de forskolina (10 μ M) y la incubación durante 15 min adicionales. El agonista del H₃R im m e pip (100 nM) se adicionó 5 min antes de la forskolina y, cuando fue necesario, el antagonista del receptor P2Y suramina (100 μ M) estuvo presente 10 min antes. Los valores son promedios \pm SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico se realizó con Anova de una vía y la prueba de Tukey; *ns*, sin diferencia significativa; *** $P < 0.001$.

La Figura 8 muestra que el efecto del ATP fue prevenido por los inhibidores de la PKC Ro-31-81220 y Gö-6976 (10 μ M). En presencia de estos fármacos, la inhibición por im m e pip fue $48.0 \pm 2.8\%$ y $49.5 \pm 6.5\%$, respectivamente, sin diferencia estadística de la inhibición control ($47.7 \pm 12.2\%$, 3 experimentos).

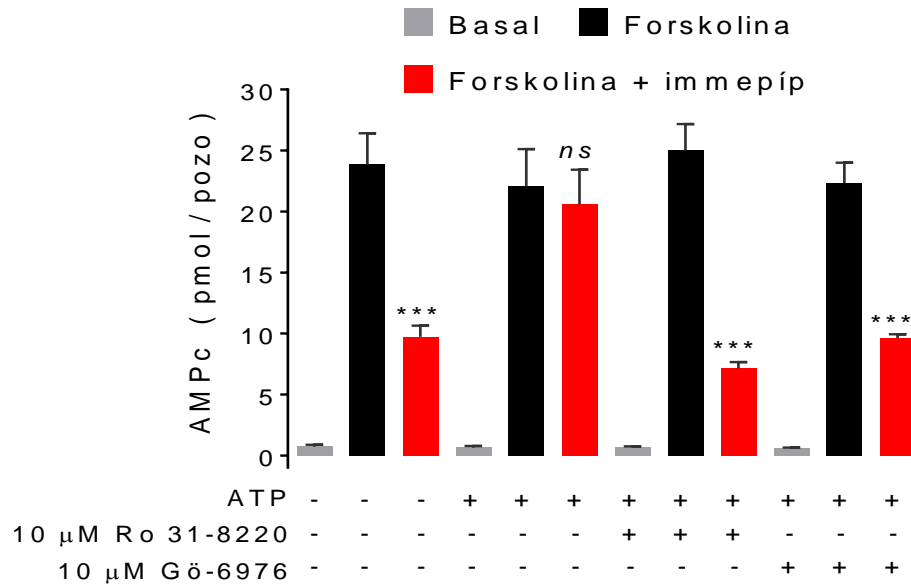


Figura 8. Efecto de los inhibidores de la PKC en la inhibición por el H₃R de la acumulación de AMPc inducida por forskolina. Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ se incubaron durante 20 min en medio KRH que contenía IBMX (1 mM) en ausencia o presencia de ATP (10 μM) antes de la adición de forskolina (10 μM) y la incubación durante 15 min adicionales. El agonista del H₃R imnepip (100 nM) se adicionó 5 min antes que la forskolina, y los inhibidores de la PKC (Ro-31-81220 o Gö-6976, 10 μM) 20 min antes del ATP. Los datos son promedios ± SEM de tres experimentos, cada uno con determinaciones por triplicado. *ns*, sin diferencia significativa; *** *P* < 0.001 comparado con forskolina; Anova de una vía y prueba de Tukey.

Por otra parte, las isoformas de la PKC difieren en su sensibilidad a los inhibidores Ro-81220 y Gö-6976 (Anastassiadis et al., 2011). Una menor concentración de los inhibidores de la PKC (1 μM) también redujo el efecto del ATP en la inhibición por el imnepip de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina (Figura 9). Sin embargo, la magnitud del bloqueo fue significativamente mayor para Gö-6976 (inhibición control 60.6 ± 7.0%; 49.8 ± 3.2% para ATP/Ro-81220 y 29.2 ± 11.3% para ATP/Gö-6976, 4 experimentos, Anova de una vía y prueba de Tukey).

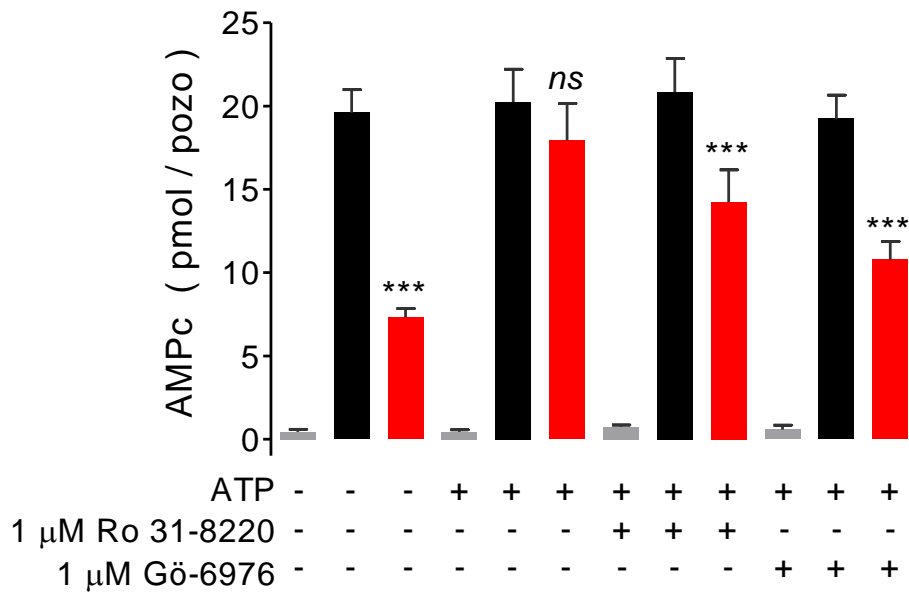


Figura 9. Efecto de los inhibidores de PKC en la inhibición por el agonista del H₃R imepip de la acumulación de AMPc inducida por forskolina. Las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ se incubaron durante 20 min en medio KRH que contenía IBMX (1 mM) en ausencia o presencia de ATP (10 μ M) antes de la adición de forskolina (10 μ M) y la incubación durante 15 min adicionales. El agonista del H₃R imepip (100 nM) se adicionó 5 min antes que la forskolina, y los inhibidores de la PKC (Ro-31-81220 o Gö-6976, 1 μ M) 20 min antes del ATP. Basal (gris), FSK (negro), FSK + imepip (rojo). Los datos son los promedios \pm SEM de cuatro experimentos, cada uno con determinaciones por triplicado. *ns*, sin diferencia significativa; *** $P < 0.001$ comparado con forskolina; Anova de una vía y la prueba de Tukey.

1.6.6 Efecto del TPA o ATP en la unión de [³⁵S]-GTP γ S en membranas celulares.

La unión de [³⁵S]-GTP γ S a las membranas celulares indica la capacidad de los GPCRs para activar proteínas G. En membranas de las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅, el agonista del H₃R imepip estimuló la unión de [³⁵S]-GTP γ S con una estimulación máxima (E_{max}) de $298 \pm 13\%$ de la basal y una concentración efectiva media (EC_{50}) de 5.5 nM (pEC_{50} 8.25 ± 0.12 ; Figura 10). La preincubación de las células con TPA (200 nM) o

ATP (10 μ M) redujo significativamente la estimulación máxima a 217 ± 3 y $188 \pm 12\%$ del valor basal ($60.3 \pm 5.4\%$ y $45.8 \pm 9.4\%$ de la estimulación control, respectivamente; cuatro experimentos; $P < 0.01$ y $P < 0.001$; Anova de una vía y prueba de Dunnett), sin efecto significativo en la potencia del agonista (TPA, EC_{50} 7.1 nM, pEC_{50} 8.15 ± 0.09 ; ATP, EC_{50} 5.0 nM, pEC_{50} 8.30 ± 0.04).

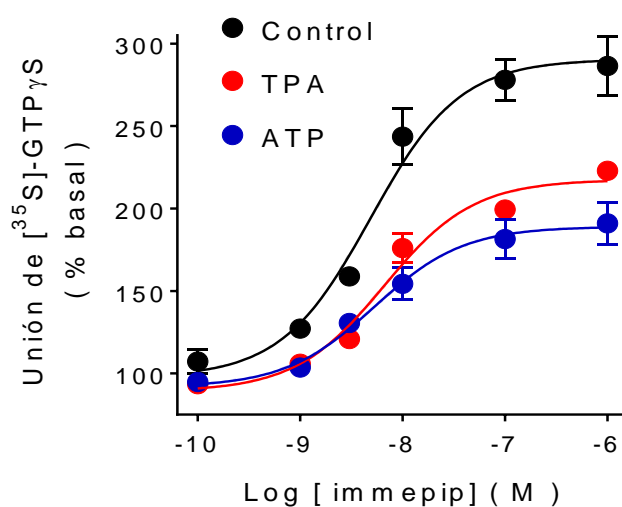


Figura 10. Efecto del TPA y ATP en la unión de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ estimulada por el agonista del H_3R immepip. Las células CHO-K1-h H_3R_{445} se preincubaron con TPA (200 nM) o ATP (10 μ M) por 35 min, se obtuvieron las membranas y se incubaron durante 60 min con 50 nM de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ y las concentraciones indicadas del agonista del H_3R immepip. Los valores se expresan como porcentaje de la unión basal de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ después de substrair la unión inespecífica y son los promedios \pm SEM de triplicados de un experimento representativo, repetido tres veces más con resultados similares. La línea representa el mejor ajuste a una ecuación logística. Los valores del efecto máximo (E_{max}), EC_{50} y pEC_{50} se indican en el texto.

En una serie diferente de experimentos, los inhibidores de la PKC Ro-31-81220 y Gö-6976 (10 μ M) previnieron el efecto del ATP en la unión de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ estimulada por immepip (Figura 11).

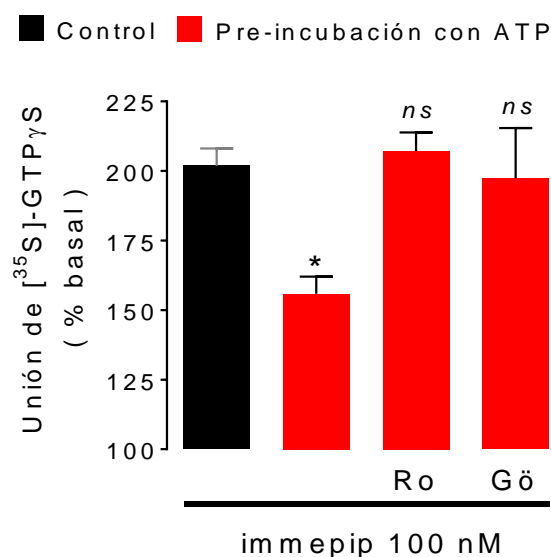


Figura 11. Efecto de los inhibidores de la PKC en la unión de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ estimulada por el agonista del H_3R im m e p i p. Las células CHO-K1-h H_3R_{445} se pre-incubaron con ATP (10 μM) por 35 min. Los inhibidores de la PKC Ro-31-81220 (Ro) o Gö-6976 (Gö), ambos a 10 μM , se agregaron 20 min antes del ATP. Se obtuvieron las membranas y se incubaron durante 60 min con 50 nM de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ y 100 nM del agonista del H_3R im m e p i p. Los valores se expresan como porcentaje de la unión basal de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ después de la substracción de la unión inespecífica y son los promedios \pm SEM de cuatro experimentos. *ns*, sin diferencia significativa; * $P < 0.05$ comparado con el control; Anova de una vía y prueba de Dunnett.

1.6.7 Efecto de TPA o ATP en la unión de $[^3\text{H}]\text{-NMHA}$ a células intactas CHO-K1- h H_3R_{445} .

El proceso de desensibilización de un GPCR puede implicar la internalización del receptor, y previamente se reportó que la desensibilización homóloga del h H_3R_{445} conduce a la endocitosis de este receptor (Osorio-Espinoza et al., 2014). En este estudio, los ensayos de unión de $[^3\text{H}]\text{-NMHA}$ a las células intactas mostraron que la incubación de las células CHO-K1-h H_3R_{445} con TPA (200 nM) o ATP (10 μM) resultó en una pérdida significativa de los receptores presentes en la superficie celular (-30.4 ± 7.7 y $-45.1 \pm 4.1\%$ de los valores control; Figura 12A).

La [³H]-NMHA es un agonista de los H₃R, y una disminución de la afinidad del receptor por agonistas podría explicar la reducción en los sitios de unión observada en las determinaciones de un solo punto. Sin embargo, los experimentos de saturación con células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ pre-expuestas a ATP (Figura 12B) mostraron una reducción en la unión máxima a 36.5 ± 6.3% de los valores control, sin efecto en la constante de disociación (K_d; células control: K_d 1.52 nM, pK_d 8.817 ± 0.049; células expuestas a ATP: K_d 1.49 nM, pK_d 8.826 ± 0.110; 3 experimentos; *P* = 0.942, prueba *t* de Student pareada).

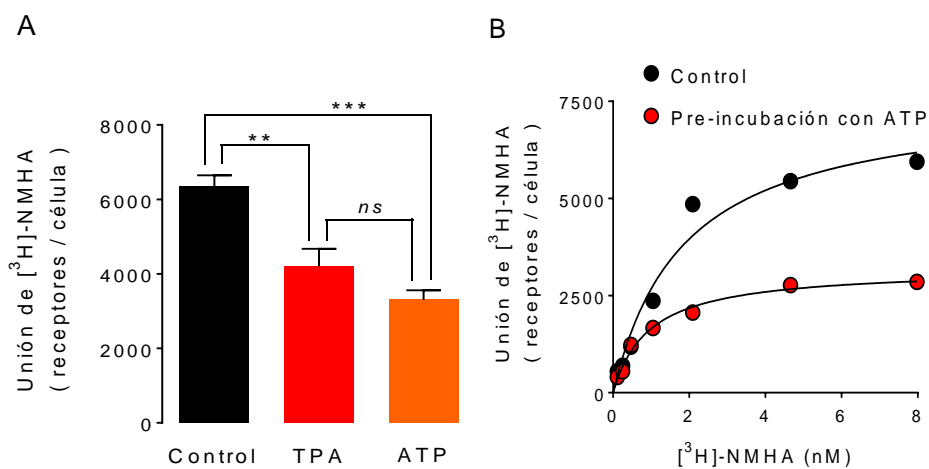


Figura 12. Efecto de TPA o ATP en la unión de [³H]-NMHA en células CHOK1-hH₃R₄₄₅ intactas. Las células se incubaron durante 35 min en medio KRH que contenía TPA (200 nM) o ATP (10 μM), y se lavaron antes de incubarse con [³H]-NMHA durante 5 h a 4°C. La unión de [³H]-NMHA a los receptores de superficie se determinó en el lavado ácido como se describe en Materiales y Métodos. La unión específica se determinó restando la unión en presencia de clobenpropit (10 μM) de la unión total y fue expresada como receptores por célula. **A)** Determinaciones con una concentración única del radioligando. Los valores son promedio ± SEM de la unión específica de cuatro experimentos con 3-4 replicados. *ns*, sin diferencia; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; Anova de una vía y prueba de Tukey. **B)** Ensayo de saturación. Los valores son las medias ± rango de la unión específica de determinaciones por duplicado en un experimento representativo repetido dos veces más con resultados similares. Los valores para la unión máxima y la constante de afinidad (K_d) se indican en el texto.

1.7 Discusión

En este trabajo mostramos que el hH₃R₄₄₅ expresado de manera estable en células CHO-K1 experimenta desensibilización por estimulación directa de la PKC (TPA) o por la activación de receptores purinérgicos endógenos acoplados a la vía de señalización PLC/Ca²⁺/PKC.

Las isoformas de la PKC se dividen en tres clases con base en su estructura molecular y el requerimiento de DAG y iones Ca²⁺ para su activación (Steinberg et al., 2008; Zeng et al., 2012): clásicas (DAG y Ca²⁺), nuevas (DAG) y atípicas (no requieren DAG o Ca²⁺). Las células CHO-K1 expresan un miembro de cada clase: PKC- α (clásica), PKC- ϵ (nueva) y la isoforma atípica PKC- ζ (Ashida et al., 2008).

A una concentración de 10 μ M, los inhibidores de la PKC Ro 31-8220 y Gö-6976 previnieron completamente el efecto del TPA y de la activación de los receptores purinérgicos en la respuesta funcional del hH₃R₄₄₅, lo que indica la participación de la PKC en la desensibilización funcional del hH₃R₄₄₅. El Ro-31-8220 es un inhibidor general de las PKCs, mientras que a concentraciones bajas el Gö-6976 actúa selectivamente en las isoenzimas clásicas de la PKC. En determinaciones *in vitro* y en presencia de 10 μ M de ATP, el Gö-6976 (500 nM) inhibió a las PKCs clásicas en 80%, 41-65% a las PKCs nuevas, y 13% a las isoenzimas atípicas de la PKC (Anastassiadis et al., 2011). Por lo tanto, la mayor inhibición por 1 μ M de Gö-6976 del efecto del ATP sugiere una contribución importante de la PKC- α en el proceso de desensibilización del H₃R₄₄₅, aunque se requieren análisis adicionales para confirmar esta posibilidad.

Aunque parece probable la fosforilación mediada por PKC del hH₃R₄₄₅, no se pueden descartar efectos indirectos. La desensibilización homóloga de un GPCR se desencadena por la fosforilación mediada por las GRKs de receptores activados, y la fosforilación por PKC induce la translocación de GRK2 del citosol a la membrana plasmática y reduce la inhibición tónica por la calmodulina (Penela et al., 2003). En relación a lo

anterior, recientemente nuestro laboratorio mostró que las GRKs 2/3 participan en la desensibilización homóloga del hH₃R₄₄₅ (Osorio-Espinoza et al., 2014); por lo tanto, un mecanismo adicional para la desensibilización heteróloga del hH₃R₄₄₅ mediado por PKC sería una acción indirecta implicando la fosforilación de GRK2.

La fosforilación del receptor produce cambios conformacionales que afectan su interacción con las proteínas G, y por lo tanto la señalización intracelular, además de promover la unión de β -arrestinas y la consecuente endocitosis dependiente de clatrina (Moser et al., 2010). La incubación de las células CHO-K1-hH₃R₄₄₅ con TPA o ATP resultó en una reducción significativa en los sitios de unión de [³H]-NMHA en células intactas, y nuestros datos indican que este efecto se debe a la internalización del receptor y no a una disminución en la afinidad por el agonista empleado como radioligando. Se ha mostrado que la desensibilización homóloga del hH₃R₄₄₅ involucra internalización del receptor en células CHO-K1 y HEK-293 (Osorio-Espinoza et al., 2014; Shi et al., 2012), con una reducción de los receptores de la superficie celular de ~50%. Por lo tanto, la reducción de las respuestas funcionales mediadas por el hH₃R₄₄₅ después de la activación de la PKC puede explicarse tanto por el bloqueo de la interacción receptor/proteína G como por la internalización del receptor.

En las células CHO, la exposición a TPA resulta en la fosforilación y desensibilización de los receptores a histamina H₁ y a opioides μ (Fujimoto et al., 1999; Feng et al., 2011), y en las células HEK-293 la fosforilación de los receptores D_{2L} mediada por la PKC disminuye la potencia de la dopamina endógena para inhibir la formación de AMPc inducida por forskolina, sin efecto en la eficacia (Namkung et al., 2004). Sin embargo, análisis posteriores mostraron que la desensibilización heteróloga mediada por PKC disminuía la densidad del receptor D_{2L} así como su eficacia (sin cambio aparente en la potencia agonista) para estimular la unión de [³⁵S]-GTP γ S (Namkung et al., 2009), como se muestra aquí para el hH₃R₄₄₅. Se requieren más estudios para obtener

una visión más profunda de los mecanismos moleculares de la desensibilización heteróloga del H₃R.

Nuestros datos indican que la desensibilización heteróloga de los H₃R nativos podría por lo tanto ocurrir en neuronas que expresan a estos receptores y a un segundo receptor acoplado a la PLC. Ejemplos de esta condición son las propias neuronas histaminérgicas localizadas en el núcleo tuberomamilar y que expresan receptores a orexina (Haas et al., 2008), las neuronas espinosas de médula espinal que poseen receptores NK1 y muscarínicos M₁ (Lin et al., 2004; Shen et al., 2005; Blomeley et al., 2009) y las neuronas localizadas en la capa de células piramidales del hipocampo (CA1) y en la corteza prefrontal que expresan adrenoceptores α_1 (Szot et al., 2005; Luo et al., 2014). Se requieren más trabajos para abordar específicamente esta posible interacción funcional en los sistemas nativos.

El H₃R se ha convertido en un blanco farmacológico prometedor para el tratamiento de varias alteraciones neurológicas (Passani et al., 2011; Berlin et al., 2011; Tiligada et al., 2011). Anteriormente se mostró que el hH₃R₄₄₅ expresado en células CHO-K1 experimenta desensibilización homóloga (Osorio-Espinoza et al., 2014), y en esta tesis proporcionamos evidencia de desensibilización heteróloga mediada por la PKC en el mismo sistema celular. Estos datos indican que la desensibilización del receptor debe considerarse en el uso de drogas que actúan en el H₃R.

1.8 Conclusión

El receptor a histamina H₃ humano de 445 amino ácidos experimenta desensibilización heteróloga mediada por la PKC.

1.9 Bibliografía

- Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Japanese Journal of Pharmacology* 78: 113-145
- Airaksinen MS, Paetau A, Paljärvi L, Reinikainen K, Riekkinen P, Suomalainen R, Panula P (1991) Histamine neurons in human hypothalamus: anatomy in normal and Alzheimer diseased brains. *Neuroscience* 44: 465-481
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2011) Guide to receptors and channels (GRAC). *British Journal of Pharmacology* 164(Suppl 1):S91–S92
- Alonso N, Fernandez N, Notcovich C, Monczor F, Simaan M, Baldi A, Gutkind JS, Davio C, Shayo C (2013) Cross-Desensitization and Cointernalization of H1 and H2 Histamine Receptors Reveal New Insights into Histamine Signal Integration. *Molecular Pharmacology* 83: 1087–1098
- Anastassiadis T, Deacon SW, Devarajan K, Ma H, Peterson JR (2011) Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology* 29:1039–1045
- Anichtchik OV, Huotari M, Peitsaro N, Haycock JW, Männistö PT, Panula P (2000) Modulation of histamine H3 receptors in the brain of 6-hydroxydopaminelesioned rats. *European Journal of Neuroscience*, 12: 3823–3832
- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1987) Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H3-receptors. *Neuroscience* 23: 149–157
- Arrang JM, Morisset S, Gbahou F (2007) Constitutive activity of the histamine H3 receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 28: 350-7
- Ash AS, Schild HO (1966) Receptors mediating some actions of histamine. *British Journal of Pharmacology* 27: 427–439
- Ashida N, Ueyama T, Rikitake K, Shirai Y, Eto M, Kondoh T, Kohmura E, Saito N (2008) Ca²⁺ oscillation induced by P2Y₂ receptor activation and its regulation by a neuron-specific subtype of PKC (γ PKC). *Neuroscience Letters* 446: 123–128
- Beazely MA, Alan JK, Watts VJ (2005) Protein kinase C and epidermal growth factor stimulation of Raf1 potentiates adenylyl cyclase type 6 activation in intact cells. *Molecular Pharmacology* 67: 250–259

- Berlin M, Boyce CW, Ruiz M de L (2011) Histamine H₃ receptor as a drug discovery target. *Journal of Medicinal Chemistry* 54: 26–53
- Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. (1972). Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* 236: 385–390
- Blomeley CP, Kehoe LA, Bracci E (2009) Substance P mediates excitatory interactions between striatal projection neurons. *Journal of Neuroscience* 29:4953–4963
- Bongers G, Bakker RA, Leurs R (2007) Molecular aspects of the histamine H₃ receptor. *Biochemical Pharmacology* 73, 1195–1204
- Bünemann M, Bücheler MM, Philipp M, Lohse MJ, Hein L (2001) Activation and deactivation kinetics of a 2A- and a 2C-adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel currents. *Journal of Biological Chemistry* 276: 47512–47517
- Cogé F, Guénin SP, Audinot V, Renouard-Try A, Beauverger P, Macia C, Ouvry C, Nagel N, Rique H, Boutin JA, Galizzi JP (2001) Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H₃ receptor. *Biochemical Journal* 15: 279-88
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997) Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390: 88–91
- Dale P, Head V, Dowling MR, Taylor CW (2018) Selective inhibition of histamine-evoked Ca²⁺ signals by compartmentalized cAMP in human bronchial airway smooth muscle cells. *Cell Calcium* 71: 53-64
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA (2006) P₂ receptors: intracellular signaling. *Pflügers Archives European Journal of Physiology* 5: 552-62
- Feng B, Li Z, Wang JB (2011) Protein kinase C-mediated phosphorylation of the μ -opioid receptor and its effects on receptor signaling. *Molecular Pharmacology* 79:768–775
- Ferreira R, Santos T, Gonçalves J, Baltazar G, Ferreira L, Agasse F, Bernardino L (2012) Histamine modulates microglia function (Abstract). *Journal of Neuroinflammation* 9: 90
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Review* 53: 1–24
- Ferguson SS, Caron MG (1998) G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9: 119–127

- Feuerstein TJ (2008) Presynaptic receptors for dopamine, histamine, and serotonin. *Handbook of Experimental Pharmacology* 184: 289–338
- Flores-Clemente C, Osorio-Espinoza A, Escamilla-Sánchez J, Leurs R, Arias JM, and Arias-Montaña JA (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. *British Journal of Pharmacology* 170: 127–135
- Fujimoto K, Ohta K, Kangawa K, Kikkawa U, Ogino S, Fukui H (1999) Identification of protein kinase C phosphorylation sites involved in phorbol ester-induced desensitization of the histamine H₁ receptor. *Molecular Pharmacology* 55: 735–742
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annual Review of Neuroscience* 27:107–144
- Garcia-Ramirez M, Aceves J, Arias-Montano JA (2004) Intranigral injection of the H₃ agonist immpip and systemic apomorphine elicit ipsilateral turning behaviour in naive rats, but reduce contralateral turning in hemiparkinsonian rats. *Behavioral Brain Research* 154: 409–415
- Gill DS, Thompson CS, Dandona P (1998) Increased histamine in plasma and tissues in diabetic rats. *Diabetes Research* 7: 31–34
- González-Sepúlveda M, Rosell S, Hoffmann H, Castillo-Ruiz MM, Mignon V, Moreno-Delgado D, Vignes M, Díaz J, Sabriá J, and Ortiz J (2013) Cellular distribution of the histamine H₃ receptor in the basal ganglia: functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia* 3: 109–121
- Gurevich EV, Tesmer JJ, Mushegian A, Gurevich VV (2012) G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacology & Therapeutics* 133: 40–69
- Haas H, Panula P (2003) The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews in Neuroscience* 4: 121–30
- Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O (2008) Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews* 88:1183–1241
- Hancock AA, Esbenshade TA, Krueger KM, Yao BB (2003) Genetic and pharmacological aspects of histamine H₃ receptor heterogeneity. *Life Sciences* 73: 3043-3072

- Hausdorff WP, Hnatowich M, O'Dowd BF, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) A mutation of the β_2 -adrenergic receptor impairs agonist activation of adenylyl cyclase without affecting high affinity agonist binding. Distinct molecular determinants of the receptor are involved in physical coupling to and functional activation of Gs. *Journal of Biological Chemistry* 25: 1388-1393
- Heijink IH, Vellenga E, Oostendorp J, de Monchy JG, Postma DS, Kauffman HF (2005) Exposure to TARC alters beta2-adrenergic receptor signaling in human peripheral blood T lymphocytes. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 289: L53-L59
- Hill SJ (2006) G-protein-coupled receptors: past, present and future. *British Journal of Pharmacology* 147(Suppl 1): S27–S37
- Hirano S, Miyata S, Onodera K, Kamei J (2006) Effects of histamine H₁ receptor antagonists on depressive-like behavior in diabetic mice. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 83: 214-20
- Huang KP (1989) The mechanism of protein kinase C activation. *Trends in Neurosciences* 12: 425-32
- Ishikawa M, Watanabe T, Kudo T, Yokoyama F, Yamauchi M, Kato K, Kakui N, Sato Y (2010) Investigation of the histamine H₃ receptor binding site. Design and synthesis of hybrid agonists with a lipophilic side chain. *Journal of Medicinal Chemistry* 53: 6445–6456
- Kelly E, Bailey CP, Henderson G (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *British Journal of Pharmacology* 153(Suppl 1): S379–S388
- Kim SK, Fristrup P, Abrol R, Goddard WA III (2011) Structure-based prediction of subtype selectivity of histamine H₃ receptor selective antagonists in clinical trials. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51: 3262–3274
- Kobayashi K, Sueyoshi T, Inoue K, Moore R, Negishi M (2003) Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells. *Molecular Pharmacology* 64: 1069-75
- 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 H(3) receptor are involved in receptor-G-protein coupling. *Cell Signal* 23: 1843–1849
- Lawler O, Miggin SM, Kinsella BT (2001) Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor

- regulates its coupling to Gs-, to Gi-, and to Gq-coupled effector signaling. *Journal of Biological Chemistry* 276: 596–607
- Lawler O, Miggin SM, Kinsella BT (2001) Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to Gs-, to Gi-, and to Gq-coupled effector signaling. *Journal of Biological Chemistry* 276: 596–607
- Lee EJ, Park MK, Kim HJ, Kang JH, Kim YR, Kang GJ, Byun HJ, Lee CH (2014) 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate induces keratin 8 phosphorylation and reorganization via expression of transglutaminase-2. *Biomolecules and Therapeutics* 22: 122-128
- Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 273: 18677-18680
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308: 512–517
- Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJ (2005) The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs. *Nature Reviews in Drug Discovery* 4: 107-120
- Li L, Akashi K (2003) Unraveling the molecular components and genetic blueprints of stem cells. *Reviews in Biotechnology* 6: 1233-1239
- Liang M, Eason MG, Jewell-Motz EA, Williams MA, Theiss CT, Dorn GW, Liggett SB (1998) Phosphorylation and functional desensitization of the α_{2A} -adrenergic receptor by protein kinase C. *Molecular Pharmacology*, 54: 44-49
- Lin JY, Chung KK, de Castro D, Funk GD, Lipski J (2004) Effects of muscarinic acetylcholine activation on membrane currents and intracellular messengers in medium spiny neurons of the rat striatum. *European Journal of Neuroscience* 20: 1219–1230
- Linder ME, Gilman AG (1991) Purification of recombinant Gi α and Go α proteins from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* 195: 202-215
- 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. *Molecular Pharmacology* 55: 1101-1107
- Luo F, Tang H, Li BM, Li SH (2014) Activation of α_1 -adrenoceptors enhances excitatory synaptic transmission via a pre- and postsynaptic protein kinase C-dependent mechanism in the medial prefrontal cortex of rats. *European Journal of Neuroscience* 39: 1281–1293

- Luo J (2012) The role of GSK3beta in the development of the central nervous system. *Frontiers in Biology* 7: 212–220
- Luttrell LM (2005) Composition and function of G protein-coupled Receptor signalsomes controlling mitogen-activated protein kinase activity. *Journal of Molecular Neuroscience* 26: 253-264
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-34
- Martin NP, Whalen EJ, Zamah MA, Pierce KL, Lefkowitz RJ (2004) PKA-mediated phosphorylation of the β_1 -adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cell Signaling* 16: 1397-403
- Martinez-Mir MI, Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Ruat M, Traiffort E, Schwartz JC, and Palacios JM (1990) Three histamine receptors (H1, H2 and H3) visualized in the brain of human and non-human primates. *Brain Research* 526: 322–327
- Matthews HR (1995) Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacology and Therapeutics* 67:323-50
- Meneses D, Mateos V, Islas G, and Barral J (2015) G-protein-coupled inward rectifier potassium channels involved in corticostriatal presynaptic modulation. *Synapse* 69: 446–452
- Molina-Hernández A, Nuñez A, Sierra JJ, and Arias-Montaña JA (2001) Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 41: 928–934
- Moreno-Delgado D, Torrent A, Gómez-Ramírez J, de Esch I, Blanco I, Ortiz J (2006) Constitutive activity of H3 autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway. *Neuropharmacology* 51: 517-23.
- 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: 860-4
- 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326: 871–878
- Morris SJ, Van-Ham II, Daigle M, Robillard L, Sajedi N, Albert PR (2007) Differential desensitization of dopamine D₂ receptor isoforms by

protein kinase C: the importance of receptor phosphorylation and pseudosubstrate sites. *European Journal of Pharmacology*, 577: 44-53

Moser E, Kargl J, Whistler JL, Waldhoer M, Tschische P (2010) G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors. *Pharmacology* 86: 22–29

Moulédous L, Froment C, Dauvillier S, Burlet-Schiltz O, Zajac JM, Mollereau C (2012) GRK2 protein-mediated transphosphorylation contributes to loss of function of μ -opioid receptors induced by neuropeptide FF (NPFF2) receptors. *Journal of biological chemistry* 16: 12736-49

Mundell S, Kelly E (2011) Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808: 1319–1328

Namkung Y, Sibley DR (2004) Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *Journal of Biological Chemistry* 279: 49533–49541

Namkung Y, Dipace C, Javitch JA, Sibley DR (2009) G protein coupled receptor kinase-mediated phosphorylation regulates postendocytic trafficking of the D2 dopamine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 15038–15051

Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM (2002) Protein kinase C isoforms and lipid second messengers: a critical nuclear partnership?. *Histology and Histopathology*, 17: 1311-1316

Newton AC (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical Reviews*, 101: 2353-64

Nishibori M, Oishi R, Itoh Y, Saeki K. (1989) Changes in histamine metabolism in the brains of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Neurochemistry* 52: 1375–81

Numaga-Tomita T, Putney JW (2013) Role of STIM1- and Orai1-mediated Ca^{2+} entry in Ca^{2+} -induced epidermal keratinocyte differentiation. *Journal of Cell Science* 126: 605–12

Ochizuki T, Okakura-Mochizuki KA, Yamatodani A (1997) Thioperamide, a histamine H_3 receptor antagonist, increases GABA release from the rat hypothalamus. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 19: 289–298

Oldham WM, Hamm HE (2007) How do receptors activate G proteins? *Advances in Protein Chemistry*, 74: 67–93

- Osorio-Espinoza A, Escamilla-Sanchez J, Aquino-Jarquín G, Arias-Montaña JA (2014) Homologous desensitization of human histamine H₃ receptors expressed in CHO-K1 cells. *Neuropharmacology* 77: 387–397
- Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WL, Stark H, Thurmond RL, Haas HL (2015) International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacology Review* 67: 601–655
- Panula P, Nuutinen S (2013) The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience* 14: 472–487
- Parks GS, Olivas ND, Ikrar T, Sanathara NM, Wang L, Wang Z, Civelli O, and Xu X (2014) Histamine inhibits the melanin-concentrating hormone system: implications for sleep and arousal. *Journal of Physiology* 592: 2183–2196
- Passani MB, Lin JS, Hancock A, Crochet S, Blandina P (2004) The histamine H₃ receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25: 618-25
- Passani MB, Blandina P (2011) Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32: 242–249
- Penela P, Ribas C, Mayor F (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cellular Signalling*, 15: 973–981
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 3: 639–50
- Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM (2002) A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* 114: 173–193
- Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Schwartz JC (1993) A detailed autoradiographic mapping of histamine H₃ receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 52: 169–189
- Premont RT, Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual Review of Physiology*, 69: 511–34
- Rall TW, Sutherland EW (1958) Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *Journal of Biological Chemistry*, 232: 1065-76

- Rouleau A, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Morisset S, Gbahou F, Schwartz JC, Arrang JM (2002) Histamine H₃ receptor-mediated [³⁵S]GTPγ[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H₃ receptors. *British Journal of Pharmacology* 135: 383-92
- Sahlholm K, Nilsson J, Marcellino D, Fuxe K, Arhem P (2012) Voltage sensitivities and deactivation kinetics of histamine H₃ and H₄ receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818: 3081–3089
- Sallmen T, Lozada AF, Anichtchik OV, Beckman AL, and Panula P (2003) Increased brain histamine H₃ receptor expression during hibernation in golden-mantled ground squirrels. *BMC Neuroscience* 4: 24
- Schlicker E, Kathmann M, Detzner M, Exner HJ, Gothert M (1994) H₃ receptor-mediated inhibition of noradrenaline release: an investigation into the involvement of Ca²⁺ and K⁺ ions, G protein and adenylate cyclase. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 350: 34-41
- Schneider EH, Seifert R (2015) The histamine H₄-receptor and the central and peripheral nervous system: a critical analysis of the literature. *Neuropharmacology* 106: 116-28
- Silver RB, Poonwasi KS, Seyedi N, Wilson SJ, Lovenberg TW, Levi R (2002) Decreased intracellular calcium mediates the histamine H₃-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 501–506
- Shen W, Hamilton SE, Nathanson NM, Surmeier DJ (2005) Cholinergic suppression of KCNQ channel currents enhances excitability of striatal medium spiny neurons. *Journal of Neuroscience* 25: 7449–7458
- 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
- Steinberg SF (2008) Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiological Reviews* 88: 1341-78
- Stevens DR, Eriksson KS, Brown RE, Haas HL (2001) The mechanism of spontaneous firing in histaminergic neurons. *Behavioural Brain Research* 124: 105-12
- Strakhova MI, Nikkel AL, Manelli AM, Hsieh GC, Esbenshade TA, Brioni JD, Bitner RS (2009) Localization of histamine H₄ receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain Research* 1250: 41-8

- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36: 461-80
- Szot P, White SS, Greenup JL, Leverenz JB, Peskind ER, Raskind MA (2005) α 1-Adrenoreceptor in human hippocampus: binding and receptor subtype mRNA expression. *Brain Research. Molecular Brain Research* 139: 367–371
- Takeshita 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
- 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
- Tiligada E, Kyriakidis K, Chazot PL, Passani MB (2011) Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17: 620–628
- Uveges AJ, Kowal D, Zhang Y, Spangler TB, Dunlop J, Semus S, Jones PG (2002) The role of transmembrane helix 5 in agonist binding to the human H3 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301: 51–458
- Varga EV, Stropova D, Rubenzik M, Wang M, Landsman RS, Roeske WR, Yamamura HI (1998) Identification of adenylyl cyclase isoenzymes in CHO and B82 cells. *European Journal of Pharmacology* 348: R1-R2
- Vázquez-Prado J, Casas-González P, García-Sáinz JA (2003) G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cellular Signalling*, 15: 549-57
- Vincent SR, Hökfelt T, Skirboll LR, Wu JY (1983) Hypothalamic gamma-aminobutyric acid neurons project to the neocortex. *Science* 7: 1309-1311
- Von Ku"gelgen I, Hoffmann K (2016) Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* 104: 50-61
- 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 Research*, 12: 13-25

- Wess J (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J*, 11: 346–354
- Webb BL, Hirst SJ, Giembycz MA (2000) Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *British Journal of Pharmacology* 130: 1433–1452
- Willets JM, Taylor AH, Shaw H, Konje JC, Challiss RA (2008) Selective regulation of H1 histamine receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in uterine smooth muscle cells. *Molecular Endocrinology* 22: 1893-907
- Willoughby D, Cooper DM (2007) Organization and Ca²⁺ Regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiological Reviews* 87: 965–1010
- Wong YC, Chan K, Lau OW, Aun C, Houghton IT (1991) Protein binding characterization of pethidine and norpethidine and lack of interethnic variability. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 13: 273-9
- Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) Protein kinase A-mediated phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *Journal of Biological Chemistry* 23: 49-56
- Zamponi GW and Currie KP (2013) Regulation of CaV2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828: 1629–1643
- Zeng L, Webster SV, Newton PM (2012) The biology of protein kinase C. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 639–661

C A P I T U L O II

Densidad y señalización del receptor H₃ en el hipocampo de la
rata en un modelo de Diabetes Mellitus I

Resumen

La diabetes mellitus tipo I (DM-I) es una enfermedad metabólica compleja con una producción alterada de insulina e hiperglucemia. La diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) produce alteraciones morfológicas y funcionales en el hipocampo de rata, como disminución de la plasticidad neuronal (proliferación y neurogénesis), cambios neuroquímicos y modificaciones en las vías de señalización de la insulina. El receptor a histamina H_3 (H_3R) se expresa abundantemente en el hipocampo, donde regula la liberación de la propia histamina, acetilcolina, noradrenalina y glutamato. En ratas diabéticas, el contenido de histamina y telemetilhistamina, su metabolito principal, aumenta en todo el cerebro, e inferimos que el aumento de la transmisión histaminérgica contribuye a los déficits cognitivos en las ratas diabéticas. El objetivo de este trabajo fue por lo tanto evaluar la densidad y la función del H_3R en el hipocampo de ratas Wistar hembras tratadas con STZ. En las membranas de los sinaptosomas del hipocampo, que contienen principalmente receptores pre-sinápticos, la densidad del H_3R , evaluada por la unión de [3H]-NMHA, aumentó significativamente en los días 7, 14 y 21 después del tratamiento con STZ (B_{max} animales control: día 7, 159 ± 2 fmol/mg proteína; día 14, 213 ± 4 ; día 21, 166 ± 6 ; B_{max} animales tratados: día 7, 263 ± 32 ; día 14, 810 ± 30 ; día 21, 1231 ± 23). En membranas de todo el tejido hipocampal (receptores totales), la densidad del H_3R también fue significativamente mayor (B_{max} animales control: 384 ± 34 fmol/mg de proteína (promedio de los 7, 14 y 21 días); animales tratados: día 7, 663 ± 56 ; día 14, 825 ± 82 ; día 21, 1150 ± 110). En condiciones normales, la activación de los H_3Rs no modificó la liberación de [3H]-glutamato en rebanadas del hipocampo, pero en la condición de DM-I, inhibió de manera significativa la liberación del neurotransmisor a los 14 y 21 días post-inducción con STZ. Los H_3R se acoplan a proteínas $G\alpha_{i/o}$ y activan varias vías de señalización, incluyendo las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la vía Akt/GSK-3 α/β . En rebanadas del hipocampo de ratas tratadas con STZ, la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H_3R se atenuó

significativamente de $168.4 \pm 18.8\%$ de la basal a los 5 min a 52.3 ± 3.4 , 56.2 ± 17.5 y $54.6 \pm 2.7\%$ a los 7, 14 y 21 días después de la administración de STZ, respectivamente). La activación del H₃R (60 min) incrementó la fosforilación de Akt (Ser⁴⁷³) a 253 ± 25 , 295 ± 6 y $441 \pm 29\%$ de los valores basales a los 7, 14 y 21 días después de la administración de STZ, siendo estos valores significativamente mayores que los observados para las rebanadas de los animales control ($163 \pm 11\%$ de la basal). Estos resultados indican que la DM-I altera la densidad y la señalización del H₃R en el hipocampo de ratas hembras.

Abstract

Diabetes Mellitus type I (DM-I) is a complex metabolic disease with impaired insulin production and hyperglycemia. Streptozotocin (STZ)-induced diabetes results in morphological and functional alterations in the rat hippocampus, such as decreased neuronal plasticity (proliferation and neurogenesis), neurochemical changes and modifications in insulin signaling pathways. The histamine H₃ receptor (H₃R) is abundantly expressed in the hippocampus, where it regulates the release of histamine, acetylcholine, noradrenaline and glutamate. In diabetic rats, the content of histamine and telemethyl-histamine, its main metabolite, increases throughout the brain, and we inferred that increased histaminergic transmission contributes to cognitive deficits in diabetic rats. The aim of this work was therefore to evaluate the H₃R density and function in the hippocampus of STZ-treated female Wistar rats. In membranes from hippocampal synaptosomes, which contain mainly pre-synaptic receptors, H₃R density, evaluated with [³H]-NMHA binding, increased significantly on days 14 and 21 after STZ treatment (B_{max} control animals: day 7, 161 ± 2 fmol/mg protein; day 14, 213 ± 4; day 21, 163 ± 4; B_{max} treated animals: day 7, 263 ± 32; day 14, 810 ± 30; day 21, 1231 ± 23). In membranes from the whole hippocampus (total receptors), H₃R density was also significantly higher (B_{max} control animals: 285 ± 34 fmol/mg protein; treated animals: day 7, 663 ± 56; day 14, 825 ± 82; day 21, 1150 ± 110). The increase in H₃R density also resulted in a modulation of glutamatergic transmission. Under normal conditions, H₃R activation failed to modify [³H]-glutamate release from hippocampal slices, whereas in slices from diabetic animals reduced the release of the neurotransmitter at 14 and 21 days post-induction with STZ. H₃Rs couple to G $\alpha_{i/o}$ proteins and trigger several signaling pathways, including the activation of the MAPK and Akt/GSK-3 α/β pathways. In hippocampal slices from STZ-treated rats, ERK-1/2 phosphorylation induced by the H₃R agonist immepip (1 μ M) was significantly attenuated, with maximum phosphorylation (168.4 ± 18.8% of basal at 5 min) reduced to 52.3 ± 3.4, 56.2 ± 17.5 and 54.6 ± 2.7% at 7, 14 and 21 days after STZ

administration, respectively. H₃R activation (60 min) increased Akt phosphorylation (Ser⁴⁷³) to 253 ± 25, 295 ± 6 and 441 ± 29% of basal values at 7, 14 and 21 days after STZ administration, these values being significantly higher than those observed for the slices of the control animals (163 ± 11% of basal). These results indicate that the DMI alters H₃R density and signaling in the hippocampus of female rats.

2.1 Antecedentes

Existe evidencia que además de sus acciones periféricas, la insulina produce efectos directos en las células del sistema nervioso central (SNC). Numerosos datos clínicos y experimentales indican que esta hormona podría estar implicada en algunas enfermedades neurodegenerativas, en las que sus acciones en el SNC se encontrarían alteradas (Laron et al. 2009). El receptor a insulina está presente en todas las regiones del SNC, mayoritariamente en las neuronas (pre- y post-sinápticamente), pero también en la glía (Schwartz et al. 1992). Su distribución regional no es uniforme, siendo más abundante en la corteza, el cerebelo, el hipocampo, el hipotálamo, la amígdala y el bulbo olfatorio (Schulingkamp et al. 2000).

Los mecanismos moleculares por los cuales la insulina ejerce sus acciones en el SNC son los mismos que en los tejidos periféricos: cuando la hormona se une a sus receptores, éstos se autofosforilan e inducen vías de señalización que se activan en paralelo. Una de ellas conduce a la estimulación de las cinasas PI3K (3-cinasa de fosfatidilinositol) y Akt, y otra vía, mediante las proteínas Shc y ras, estimula a las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs). Se ha sugerido que la insulina tiene efectos en funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje, y por ello se han estudiado en particular la corteza cerebral y el hipocampo. En este sentido, la inyección directa de la insulina en el hipocampo dorsal de ratas facilita la memorización de tareas sencillas (Babri et al. 2007).

El contenido de receptores de insulina es variable, su número aumenta en células de respuesta al metabolismo energético (Matthaei et al. 2000). GLUT4 es uno de los transportadores que presenta alta afinidad por la glucosa y se expresa en aquellos tejidos sensibles a la insulina, como el músculo esquelético, el tejido adiposo o el corazón. Actualmente se sabe que la insulina estimula la incorporación del GLUT 4 a la membrana plasmática a partir de vesículas intracelulares, incrementando de 10 a 20 veces el transporte de la glucosa (Mastick et al. 1994; Suh et

al. 2005). Cuando existe una deficiencia de insulina, la glucosa se acumula en el torrente sanguíneo en lugar de ser transportada al interior de las células. Esta acumulación se denomina hiperglucemia: el organismo es incapaz de utilizar la glucosa para obtener energía, lo que origina la sintomatología de la Diabetes Mellitus, DM (Schroeder et al. 2005). En el curso de la DM se producen alteraciones en diversos órganos periféricos, y aunque la enfermedad nunca ha sido considerada como una patología neurológica, actualmente se acepta que algunas funciones del SNC también pueden ser afectadas, y se ha propuesto el término “encefalopatía diabética” para denominar al conjunto de alteraciones cerebrales asociado a la DM (Ziegler et al. 2010). Sin embargo, los posibles deterioros cognitivos en los pacientes diabéticos no son sujetos de estudio y raramente son mencionados o discutidos.

2.1.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) se caracteriza por la hiperglucemia que conduce al desarrollo de graves complicaciones (Polonsky et al. 2012; Zimmet et al. 2016). A pesar de los numerosos esfuerzos para controlar la incidencia de este trastorno metabólico, en las últimas décadas se ha observado un aumento repentino en todo el mundo. Actualmente, la DM tipo I (DM-I) y la DM tipo II (DM-II) son los tipos prevalentes. La DM-I, que también se conoce como DM dependiente de insulina, se debe a un deterioro en la regulación de la glucosa sanguínea por la destrucción total de las células β productoras de insulina, mientras que la respuesta insuficiente o nula a la insulina se atribuye a la patogénesis de la DM-II. La Federación Mundial de la Diabetes informó que la población diabética aumentará de 415 millones en 2015 a 642 millones en 2040 (Zimmet et al. 2016).

Cabe destacar que cualquier defecto en la regulación de la insulina en la sangre también desencadena desórdenes metabólicos de carbohidratos, grasas y proteínas que conducen a un estado de hiperglucemia (American Diabetes Association 2014). La secreción de insulina es estimulada principalmente por la glucosa; sin embargo, otros factores

como los amino ácidos, los ácidos grasos, la acetilcolina, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), el polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP) y el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) también participan en la regulación de la liberación de insulina (Bratanova-Tochkova et al. 2002). La sed, la polidipsia, la pérdida de peso, la poliuria y la visión borrosa son algunos de los síntomas comunes de la DM; en casos graves, la hiperglucemia junto con la cetoacidosis o las condiciones hiperosmolares no cetóticas son prevalentes.

La retinopatía, la nefropatía y la neuropatía diabética son las principales complicaciones de la DM. Se ha reportado que estas complicaciones se deben a los productos finales de glucosilación avanzada (AGE), un grupo heterogéneo de moléculas generadas por reacciones no enzimáticas de glicación y de oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos modificados post-transcripcionalmente, y pueden sintetizarse en exceso durante condiciones hiperglucémicas. Los niveles elevados de AGE alteran los mecanismos de defensa de las células β y ayudan a su destrucción (Vlassara y Uribarri et al. 2014).

El receptor de los productos finales de glicación avanzada (RAGE) es un receptor multiligando perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se expresa de manera constitutiva en una amplia gama de células adultas diferenciadas, como cardiomiocitos, neuronas, neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos, células dendríticas y células endoteliales vasculares, entre otras, y es considerado un receptor de reconocimiento de patrones por su capacidad para detectar estructuras tridimensionales en lugar de secuencias específicas de amino ácidos (Grossin et al. 2009; Kiedorf y Fritz 2013). Además de los AGE, los ligandos que son reconocidos por el RAGE son el péptido β -amiloide, la proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB1; llamada también anfoterina), proteínas del grupo S100, productos avanzados de oxidación de proteínas, C3a, integrinas- β 2 Mac/CD11b,

lipopolisacáridos y fosfatidilserina en la superficie de células apoptóticas (Ramasamy et al. 2005; Lee y Park 2013).

La interacción del RAGE con sus ligandos induce la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de diversas vías de transducción de señales intracelulares, incluyendo la vía de las MAPKs/ERKs, p38, la NADPH oxidasa, las cinasas c-Jun N-terminal (JNKs), p21/RAS, GTPasas Rac y Cdc42 (Ramasamy et al. 2005). La translocación del NF- κ B del citoplasma al núcleo, y su acción en el ADN induce la producción de moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas, entre otros efectos (Herold et al. 2007; Yan et al. 2009). Además de inducir vías de señalización, la molécula *per se* actúa como receptor de otras moléculas en el endotelio y permite la extravasación y la infiltración de leucocitos a los tejidos, aumentando el fenómeno inflamatorio (Orlova et al. 2007). Otros estudios muestran que la unión de los ligandos a RAGEs activan al complejo multiproteico NADPH encargado de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y promover la síntesis de más AGEs, desencadenando así mecanismos de lesión celular (Guimaraes et al. 2010; Zhang et al. 2006; Bierhaus et al. 2001). Notablemente, los AGE no sólo destruyen las células productoras de insulina sino que también desarrollan resistencia a la insulina, un síntoma principal de la DM-II (Nowotny et al. 2015).

La insulina y otros agentes hipoglucémicos exógenos se han empleado para controlar el nivel de glucosa en la sangre. El trasplante de células de páncreas o islotes es también una opción; sin embargo, este enfoque es limitado debido a la falta de donantes y las complicaciones quirúrgicas y post-quirúrgicas asociadas (Bouwens et al. 2013). La terapia basada en células madre se considera una opción promisoría para la DM y las complicaciones diabéticas debido a su diferenciación multilínea y su potencial de regeneración (Seo et al. 2017; Hussien et al. 2017; Wang et al. 2017).

2.1.2 Expresión del H₃R en el sistema nervioso central (SNC)

El H₃R acoplado a proteínas G $\alpha_{i/o}$, se expresa principalmente en las neuronas, y se diferencia de los otros subtipos de receptores de histamina (H₁, H₂ y H₄) por su ubicación predominantemente pre-sináptica, que le permite regular la liberación de varios neurotransmisores, incluida la acetilcolina, la dopamina, el glutamato, la noradrenalina, la serotonina y la propia histamina (Schlicker et al. 1988, 1989; Clapham y Kilpatrick, 1992; Schlicker et al. 1993; Brown y Reymann 1996). Existe evidencia que el H₃R se expresa también post-sinápticamente (Ellenbroek y Ghiabi 2014), y por ejemplo en las neuronas estriatales regula la señalización de los receptores a dopamina D₁ y D₂ (Ferrada et al. 2008; Brabant et al. 2009). Experimentos en ratones con abolición de la expresión del receptor (H₃R^{-/-}) muestran que el H₃R regula numerosas funciones como la actividad locomotora, la percepción del dolor, la ingesta de alimentos, la memoria, el ritmo circadiano, y la cognición (Schneider et al. 2014). La deficiencia del H₃R reduce el comportamiento adictivo en los modelos de consumo de alcohol, lo que probablemente se debe a la función inhibitoria de la recompensa debido a una mayor liberación de histamina. Estos modelos sugieren también que a diferencia de los otros tres subtipos de receptores a histamina, el H₃R no desempeña una función importante en los procesos inmunológicos y la inflamación (Neumann et al. 2014)

Estudios *in vitro* e *in vivo* indican un potencial uso terapéutico de los ligandos del H₃R, y han llevado también al reconocimiento de la heterogeneidad del receptor (Leurs et al., 1998). Los ensayos de unión a radioligandos y estudios funcionales han proporcionado evidencia de la existencia de subtipos o isoformas del H₃R (West et al. 1990; Cumming y Gjedde 1994; Jansen et al. 1994; Schworer et al. 1994; Leurs et al. 1996; Schlicker et al. 1996; Harper et al. 1999).

Desde que el H₃R fue descrito por Arrang en 1983, los subsecuentes estudios electrofisiológicos y de liberación de neurotransmisores, muestran que el H₃R se localiza en las terminales de los axones de las

neuronas histaminérgicas y no histaminérgicas (Arrang et al. 1983). Estudios electrofisiológicos muestran que el H₃R también se encuentra somadendríticamente en las neuronas histaminérgicas (Stevens et al. 2001), y la autorradiografía con [³H]-R- α -metilhistamina en el cerebro de la rata (Pollard et al. 1993) mostró una alta densidad de unión en el área perimamilar del hipotálamo, es decir, en el área de los cuerpos celulares histaminérgicos descritos previamente por Pollard y Schwartz (1987). Otras áreas del cerebro, como la corteza cerebral, el neocórtex y el hipocampo, muestran un alto grado de unión, y en la mayoría de las regiones del tallo cerebral, el cerebelo y la médula espinal se encontraron bajos grados de unión (Pollard et al. 1993). Un patrón similar de distribución del H₃R se observó con otros radioligandos como [³H]-S-metil-tioperamida (Yanai et al. 1994), [¹²⁵I]-yodoproxifan (Ligneau et al. 1994), [¹²⁵I]-yodofenpropit (Jansen et al. 1994) y [¹⁸F]-ST889 (Selivanova et al. 2012). La distribución del H₃R se ha estudiado en el cerebro de los humanos (Anichtchik et al. 2001; Jin et al. 2002; Jin and Panula 2005) y de ratones (Chazot et al. 2001), con resultados similares.

Por otra parte, los estudios de hibridación *in situ* muestran niveles muy altos del ARNm del H₃R en la corteza (principalmente en la capa V, con menor expresión en las capas superficiales), el hipocampo (capas piramidales del cuerno de Ammon CA1 y CA3 ventral), el caudado y el putamen. También se observa una alta expresión del ARNm en el núcleo olfatorio anterior, la amígdala, el cerebelo, el tálamo (principalmente en los núcleos sensoriales e intralaminares) y algunos núcleos hipotalámicos, en particular el núcleo tuberomamilar, donde se encuentran las neuronas histaminérgicas. Una expresión baja o moderada del ARNm se observa en la habénula y en la zona incerta; y la expresión es muy baja en el globo pálido, la sustancia negra y la sustancia innominada (Tardivel-Lacombe et al. 2000; Pillot et al. 2002; Sallmen et al. 2003).

El análisis por RT-PCR de la expresión de las isoformas de 445 y 365 amino ácidos del H₃R en el cerebro humano indica altos niveles en

cerebelo y el caudado; moderados en el hipotálamo y el tálamo; expresión baja en la SN, hipocampo, la corteza prefrontal, el cuerpo calloso y la amígdala; y niveles muy bajos en la médula espinal (Bongers et al., 2007). En este mismo sentido Leurs y cols. (2001) reportaron la existencia del DNA complementario (cDNA) de al menos tres isoformas funcionales del H₃R en la rata (H_{3A}, H_{3B} y H_{3C}), que se generan como resultado de un empalme alternativo. Las isoformas H_{3A}, H_{3B} y H_{3C} varían en la longitud de su tercera asa intracelular, y los receptores H_{3B} y H_{3C} carecen de 32 y 48 amino ácidos respectivamente. Las tres isoformas activan diferencialmente las vías de señalización de las adenilato ciclasas y MAPKs, y se describió una expresión diferencial de las isoformas.

Una vez que el H₃R fue clonado (Lovenberg et al. 1999), fue posible comparar la unión del H₃R con la expresión del ARNm. Se ha encontrado una expresión del ARNm moderada a alta en oposición a la unión baja en el locus coeruleus y los núcleos de rafé. Una combinación de alta expresión del ARNm del H₃R y una baja unión también es típica de las células piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y las células cerebelosas de Purkinje, lo que sugiere que el H₃R se encuentra en las terminaciones nerviosas, y no en el pericaria celular. Para el núcleo tuberomamilar se describió una situación diferente, unión y expresión del RNAm muy altas, indicando la presencia de receptores H₃Rs somatodendríticos en esta área del cerebro y de receptores presinápticos en las terminales histaminérgicas (Pillot et al. 2002).

2.1.3 Histamina y diabetes

La histamina está involucrada en una amplia variedad de eventos fisiopatológicos relacionados principalmente con respuestas inflamatorias mediante los cuatro receptores descritos (H₁₋₄). En la década de los 1950 se realizaron los primeros estudios relacionados con la histamina y la DM. Como se describió anteriormente, los mastocitos contienen histamina. El dextrano, cuando se inyecta por vía intracutánea, produce la ruptura de los mastocitos en el sitio de la

reacción de la piel (Beraldo et al. 1962). En experimentos *in vitro*, la inyección intravenosa de dextrano produce un incremento en la liberación de histamina de la piel de ratas (Halpern y Briot, 1952). En un modelo de Diabetes experimental inducida por alloxan, la inyección intravenosa de dextrano, resultó en una significativa inhibición de la liberación de histamina. El pretratamiento con insulina restauró la capacidad de estas ratas para responder de una manera normal a la liberación de histamina inducida por dextrano (Goth et al. 1957). En 1989 Gill y cols. reportaron un aumento en el contenido de histamina en el plasma y los leucocitos de pacientes con DM I y II, que contribuía a la patogénesis del aumento de la permeabilidad endotelial. Desde entonces, la participación de la histamina en la DM se ha relacionado con sus propiedades vasoactivas y el aumento de la permeabilidad vascular correlacionadas con las complicaciones microvasculares. Estos hallazgos concuerdan con estudios *in vivo* que muestran un aumento en los niveles de histamina en el plasma, riñón, cerebro, pulmón, corazón, páncreas e intestino en un modelo de diabetes experimental en roedores (Gill et al. 1989; Fogel et al. 1990).

Otros reportes evidencian un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la histamina en la DM, con una síntesis cada vez mayor y un catabolismo disminuido simultáneamente (Kahlson et al. 1967; Levine et al. 1969; Orledge et al. 1982; Hollis et al. 1893), debido a la disminución significativa de la actividad de la diamina oxidasa (DAO) intestinal (Fogel et al. 1990), y el aumento de la actividad de la histidina descarboxilasa (HDC) en diversos tejidos (Gill et al. 1990). Estos reportes están íntimamente relacionados con el hallazgo reciente que muestra que la ausencia de histamina endógena en ratones NOD HDC^{-/-} (un modelo animal de DMI espontánea) reduce la incidencia de DM en relación con su homólogo nativo, con disminución además en la circulación de interleucina 12 e interferón γ (IL-12/IFN- γ), lo que sugiere que la histamina modula principalmente el entorno inflamatorio (Alkan et al. 2015).

Bajo ciertas circunstancias, como la DM o el estrés, la síntesis de la histamina en la aorta propicia aterogénesis, que consiste en el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias originando una reacción inflamatoria y la proliferación de las células musculares lisas de la pared (Orlidge et al. 1982). En ratas diabéticas la administración de insulina reduce significativamente los niveles plasmáticos de la histamina y su síntesis en la aorta (Hollis et al. 1985). De manera interesante, en un modelo de DM inducida por STZ se observa un aumento en el contenido de histamina en los islotes pancreáticos, lo que apoya fuertemente la hipótesis de la interconexión entre la histamina y el estado glucémico (Azevedo et al. 1990).

Datos recientes proporcionan la primera evidencia del potencial efecto diabetogénico del H₃R expresado en las células MIN6, una línea celular derivada de células β de los islotes pancreáticos de ratón, donde el receptor inhibe la secreción de la insulina asociada con altos niveles de glucosa y posiblemente la proliferación de las células β (Nakamura et al. 2014). Por otra parte, se ha reportado la expresión del H₃R en células pancreáticas α, y su activación inhibe la secreción de glucagón al inhibir un aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺. Además el immpip, un agonista selectivo del H₃R, disminuye la concentración de glucagón en suero en ratas. Estos resultados sugieren que H₃R modula la secreción de glucagón de las células pancreáticas α (Nakamura et al. 2015). Aunque la patogenia de la DM se centra en la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta, la función de las células alfa incrementada de manera inadecuada y la consiguiente hiperglucagonemia se han reconocido como contribuyentes de la hiperglucemia en pacientes diabéticos, al estimular la producción de glucosa hepática (Unger et al. 1970, Godoy-Matos et al. 2014). De hecho, en pacientes con DM-II, se han reportado concentraciones elevadas de glucagón en ayunas, así como la alteración de la supresión del glucagón inducida por la glucosa y una interrupción de la interacción insulina-glucagón en el período posprandial, a diferencia de los sujetos

sanos que presentan glucagon plasmático y concentraciones de insulina inversamente relacionadas en el estado posprandial (Menge et al. 2011).

El H₃R desempeña un papel crítico en las funciones reguladoras homeostáticas, como el control de la ingesta de alimentos y el mantenimiento del peso corporal (Hancock et al. 2005). Se ha mostrado que el clobenpropit, antagonista/agonista inverso del H₃R, aumenta la liberación de histamina en el hipotálamo y reduce la absorción de energía en ratones normales y resistentes a la leptina con obesidad inducida por la dieta (Ishizuka et al. 2008). Algunos antagonistas del H₃R recientemente sintetizados han sido probados en modelos de animales diabéticos, mostrando efectividad en la reducción de los niveles de glucosa sin ayuno, al bloquear significativamente el aumento de la hemoglobina glicosilada, HbA1 (Lazewska y Kiec-Kononowicz 2018).

Además, en ratones con obesidad inducida por dieta, la administración crónica del agonista imetit disminuye el apetito y el peso corporal, reduciendo la grasa corporal, las concentraciones plasmáticas de leptina e insulina y el contenido hepático de triglicéridos (Yoshimoto et al. 2006). De manera opuesta, el agonista proxifan reduce las fluctuaciones de glucosa a corto plazo (variabilidad glucémica) en ratones mediante el aumento en los niveles de insulina en plasma, sin afectar los niveles plasmáticos de glucagón (Henry et al. 2011). Estos resultados proporcionan evidencia de la función del H₃R en la homeostasis energética y sugieren un potencial uso terapéutico de los agonistas del H₃R en el tratamiento de la obesidad y la DM.

2.1.4 Neuropatía diabética e histamina

La neuropatía diabética es la complicación más común en pacientes con DM I y II, y se clasifica ampliamente como una complicación microvascular de la DM. Se define como la presencia de síntomas y/o signos de disfunción del sistema nervioso periférico en pacientes diabéticos después de la exclusión de otras causas (Boulton 2012). Los síntomas clínicos de la neuropatía diabética se pueden dividir en

positivos y negativos según las fibras nerviosas afectadas (Yagihashi et al. 2007). Los pacientes que presentan síntomas positivos desarrollan sensaciones anormales, frecuentemente alodinia (sensaciones dolorosas a estímulos inocuos) e hiperalgesia (sensibilidad aumentada a estímulos dolorosos), mientras que los pacientes con síntomas negativos pueden experimentar pérdida sensorial que conduce a la ulceración y amputación de los pies (Callaghan et al. 2012). Se ha reportado que algunos pacientes diabéticos experimentan dolor y pérdida sensorial al mismo tiempo (Mixcoatl-Zecuatl y Calcutt 2013).

La histamina se libera por los mastocitos cuando los tejidos se inflaman o al ser estimulados por alérgenos (Benditt et al. 1995; Rowley et al. 1956), y una vez liberada induce prurito desencadenado por la excitación de un subconjunto de fibras C amielínicas (Tani et al. 1990). En relación a ello, desde 1930 se ha evaluado la respuesta de la aplicación intradérmica de la histamina en las complicaciones de la diabetes en la piel (Aronin et al. 1987). Pero fue hasta 1991 que Schwartz y cols. reconocieron por primera vez la participación de la histamina en la transmisión del dolor. A la fecha numerosos reportes señalan a la neurotransmisión histaminérgica como un factor importante en el control del dolor (Schwartz 1991; Onodera et al 1994; Mobarakeh et al. 2000; Mobarakeh et al. 2006). De hecho, se ha descrito que los pacientes diabéticos son menos sensibles a la histamina y a otros mediadores de la inflamación neurogénica, como la sustancia P (Aronin et al. 1987).

El ARNm del H₁R se ha detectado en las neuronas inmunorreactivas a la sustancia P y se ha mostrado que la histamina regula la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) junto con la sustancia P y la neurocinina A en la articulación de la rodilla de la rata o en el fluido cerebro espinal (Bileviciute et al. 1994). Una vez liberados, estos neuropéptidos inducen a su vez la liberación de la histamina de los mastocitos adyacentes. Así, se establece un puente bidireccional entre la histamina y los neuropéptidos en la inflamación neurogénica (Rosa y Fantozzi 2013). Además, se ha reportado la expresión del H₁R y/o H₃R

en las neuronas inmunorreactivas al CGRP, el cual junto con la sustancia P, están involucrados en la transmisión del dolor (Kashiba et al. 1999). Estos hallazgos sugieren que la histamina y el CGRP pueden actuar sinérgicamente en la percepción del dolor inflamatorio.

Se ha reportado que la histamina modula la nocicepción a través de los cuatro tipos de receptores, H₁R (Mobarakeh et al. 2000; Oluyomi et al. 1991; Malmberg-Aiello et al. 1998; Farzin et al. 2002), H₂R (Oluyomi et al. 1991; Lamberti et al. 1996; Farzin et al. 2002), H₃R (Lamberti et al. 1996; Farzin et al. 2002) y H₄R (Coruzzi et al. 2007; Smith et al. 2007; Hsieh et al. 2010; Shin et al. 2012; Galeotti et al. 2013; Sanna et al. 2015). Pero fue hasta el año 2014 que Gilron y Dickenson reportaron una base de datos con nuevas drogas emergentes para el dolor neuropático que han alcanzado ensayos clínicos de Fase II o III, y que incluye a los antagonistas del H₃R.

Sin embargo, solo existe un reporte del efecto antinociceptivo del H₃R en un modelo diabético (Hasanein 2011). Este trabajo muestra que la administración sistémica de immpip, agonista selectivo del H₃R, revirtió la hiperalgesia inducida por formalina en ratas con DM inducida por STZ. Este efecto podría asociarse tanto con la activación periférica del H₃R, que resulta en reducción de la liberación de péptidos inflamatorios, y la activación central del H₃R, que conduce a la inhibición de la transmisión del dolor (Delaunois et al. 1995; Ohkubo et al. 1995; Imamura et al. 1996; Nemmar et al. 1999; Cannon et al. 2007). De acuerdo con lo anterior, la administración sistémica (subcutánea e intratecal) de immpip produce antinocicepción robusta en ratas en una prueba mecánica (pinzamiento de la cola), pero no alteró las respuestas nociceptivas en una prueba térmica (sacudida de la cola), y en ratones el immpip no afecta la sensibilidad mecánica o térmica (Cannon et al. 2003). Esta discrepancia puede explicarse por la observación que el H₃R se expresa como autorreceptor y como heterorreceptor, inhibiendo la liberación de la propia histamina y de otros neurotransmisores (Nieto-Alamilla et al. 2016). De hecho, se ha mostrado que la histamina

desempeña un papel importante en la neuropatía autónoma, y Rhind y cols. (1987) reportaron que los pacientes diabéticos con neuropatía autonómica tienen una respuesta exagerada a la broncoconstricción inducida por histamina.

Una estimulación directa de la contracción del músculo liso bronquial combinada con reflejos mediados por el nervio vago, después de la estimulación de receptores irritantes de adaptación rápida y de las fibras C, ha sido sugerida como el mecanismo subyacente a la broncoconstricción inducida por la histamina, mientras que el estado de contracción o relajación del músculo liso en las paredes bronquiales, que regula el calibre de las vías aéreas (tono broncomotor), está controlado principalmente por el sistema parasimpático (Engel et al. 1992). Por lo tanto, la respuesta exagerada a la histamina en los pacientes diabéticos podría deberse al daño autonómico generalizado de las vías respiratorias parasimpáticas y simpáticas o alternativamente, a la hipersensibilidad a la denervación (Irvin et al. 1978; Nadel et al. 1980; Coleridge et al. 1983). Sin embargo, a pesar de las observaciones anteriores, el papel de la histamina en la neuropatía autónoma está lejos de esclarecerse.

2.2 Planteamiento del problema

En los pacientes con DMI disminuye el número de dendritas en la materia gris, sugiriendo que la hiperglucemia persistente y la hipoglucemia aguda severa tienen impacto en la estructura del cerebro (Musen et al. 2006). En ratas hiperglucémicas por administración de estreptozotocina se ha mostrado la presencia de modificaciones en el hipocampo: alteraciones anatómicas, disminución de la plasticidad neuronal (proliferación y neurogénesis), cambios neuroquímicos y alteraciones en las vías de señalización de la insulina (Kamal et al. 2000; Stranahan et al. 2007).

El H₃R se expresa de manera abundante en el hipocampo, donde regula la liberación de histamina, acetilcolina, noradrenalina y glutamato. En consecuencia, antagonistas del H₃R, como la tioperamida, han sido utilizados para reducir el deterioro del aprendizaje en ratones, aumentando la liberación de neurotransmisores que intervienen en los procesos cognitivos, en particular de la acetilcolina (Eastwood et al. 2012; Zhang et al. 2013; Masini et al. 2017).

El H₃R se expresa en la membrana apical de las células del túbulo colector del riñón de la rata, y los animales diabéticos con daño renal muestran niveles significativamente elevados del H₃R (Pini et al. 2015), sin establecerse si este efecto tiene una implicación compensatoria o patológica en la nefropatía diabética. Además, en relación con el capítulo I de esta tesis, referido a la desensibilización heteróloga del hH₃R₄₄₅ expresado en células CHO-K1, en la línea celular OK (porción proximal de los túbulos renales de la zarigüeya) el receptor a dopamina D₁ (D₁R) experimenta desensibilización heteróloga inducida por la insulina (Banday et al. 2007).

La insulina potencia la actividad de la PKC de manera dependiente de la PI3K, induciendo la translocación de GRK2 a la membrana y aumentando la fosforilación del D₁R, lo que resulta en cambios en los sitios de unión al D₁R, y conduce finalmente a la pérdida de la afinidad

por agonistas y del acople a proteínas G. Así, la insulina puede activar a la PKC y la fosforilación por la PKC de GRK2 induce su activación y translocación a la membrana plasmática (Chuang et al. 1995; Kanzaki et al. 2004), donde puede fosforilar GPCRs.

La DM-I es una enfermedad metabólica compleja con una producción de insulina alterada. En ratas diabéticas se ha determinado un aumento del 35% en el contenido de histamina en todo el cerebro, excepto en el hipotálamo y el cerebelo, así como en los niveles de tele-metil-histamina, el principal metabolito de la histamina en el SNC (Gill et al. 1998; Nishibori et al. 1989). Estos estudios sugieren que la función de las neuronas histaminérgicas podría verse alterada por la diabetes. Otros reportes indican que a pesar del aumento de los niveles de histamina en ratones diabéticos, no existieron cambios significativos en la densidad o la afinidad de los receptores H₁ en la corteza frontal (Hirano et al. 2006).

Sin embargo, a pesar de que existen evidencias de alteración en los niveles de histamina y del H₃R en ratones diabéticos, la relación entre las alteraciones neuronales causadas por los efectos neurotóxicos de la hiperglucemia y los cambios en la función del H₃R aún no ha sido abordada. Inferimos que un aumento en la transmisión histaminérgica puede contribuir al déficit cognitivo en ratas diabéticas, por lo que el objetivo de este trabajo es determinar los posibles cambios en la densidad del H₃R en el hipocampo de ratas diabéticas y sus implicaciones en la señalización del receptor.

2.3 Hipótesis de trabajo

La expresión y la función de los receptores a histamina H₃ del hipocampo de la rata se modifican en un modelo de Diabetes Mellitus I en la rata.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la Diabetes Mellitus en la densidad y función del H₃R en el hipocampo de la rata en un modelo de Diabetes Mellitus I.

2.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la Diabetes Mellitus experimental en la densidad del H₃R en el hipocampo de la rata.
2. Determinar el efecto de la Diabetes Mellitus experimental en la regulación por el H₃R de la liberación de glutamato en rebanadas del hipocampo de la rata.
3. Determinar el efecto de la Diabetes Mellitus experimental en la activación por el H₃R de las cinasas ERK-1/2 y Akt en el hipocampo de la rata.

2.5 Metodología

2.5.1 Animales y protocolos.

Se utilizaron ratas (Wistar) proporcionadas por el Bioterio del Cinvestav. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio emitidos por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Publicaciones NIH No. 8023, revisada en 1978) y el Consejo Mexicano para el Cuidado Animal, y fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales del Cinvestav. Se tuvo especial cuidado para minimizar el sufrimiento de los animales y para usar solo la cantidad de animales necesaria para un análisis estadístico adecuado.

2.5.2 Inducción de la diabetes.

Se utilizaron ratas hembras (200-250 g) alojadas a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ con ciclos de 12/12 h de luz/oscuridad y $50 \pm 5\%$ de humedad. Los animales fueron divididos en 4 grupos (6-7 ratas por grupo): 1) control; 2) diabéticas semana 1; 3) diabéticas semana 2; y 4) diabéticas semana 3.

La diabetes fue inducida con la administración de una dosis única de estreptozotocina (STZ, 50 mg/kg, i.v.) en solución de citratos (pH 6.0). A las ratas control se les inyectó un volumen igual del vehículo. Después de 3 días, se determinó la glucemia utilizando un glucómetro (OneTouch Ultra). Los animales fueron considerados como diabéticos cuando la glucemia fue mayor a 250 mg/dl. Los experimentos fueron realizados al término de la primera, segunda y tercera semana después de la inducción con STZ.

2.5.3 Preparación de rebanadas del hipocampo.

Los animales se decapitaron, el cerebro se retiró rápidamente del cráneo, se sumergió en una solución Krebs-Henseleit (KH) fría y se obtuvieron cortes coronales (400 μm de grosor) con un vibratomo (World Precision Instruments). La composición de la solución de KH fue (mM):

NaCl, 116; KCl, 3, MgSO₄, 1; KH₂PO₄, 1; NaHCO₃, 25; D-glucosa, 11; pH 7.4 después de la saturación con O₂ / CO₂ (95: 5% v: v). Para reducir la excitotoxicidad, no se añadió CaCl₂.

2.5.4 Preparación de sinaptosomas.

Se utilizó el método descrito por Cristóvão-Ferreira et al. (2009). Las rebanadas del hipocampo de 3 ratas se colocaron en 10 ml de solución de sacarosa 0.32 M que contenía Hepes 10 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml y EDTA 1 mM (pH 7.4 con NaOH) y se homogenizaron usando 10 golpes de un homogenizador manual. La suspensión se centrifugó (1,500xg, 4°C, 10 min) y el sobrenadante se centrifugó a 14,000xg (12 min, 4°C). La pastilla resultante se resuspendió en 5 ml de Percoll (45%) en una solución Krebs-Hepes modificada (en mM: NaCl 140, Hepes 10, D-glucosa 5, KCl 4.7, EDTA 1, pH 7.3 con NaOH). Después de centrifugar (2 min, 14,000xg, 4°C), se colectó la fase superior de la suspensión y se llevó a 20 ml con solución KRH antes de centrifugar a 20,000xg (20 min, 4°C). La pastilla (sinaptosomas) se resuspendió en la solución apropiada. La composición de la solución KRH fue (mM): NaCl 113, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, MgCl₂ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, D-glucosa 15, Hepes 20; pH 7.4 con NaOH.

2.5.5 Unión de [³H]-NMHA en membranas sinaptosomales.

Obtención de membranas. La pastilla sinaptosomal se resuspendió en 20 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4) y se incubó durante 20 min a 4°C. Se centrifugó (32,000xg, 20 min, 4°C) y la pastilla (membranas sinaptosomales) se resuspendió en solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7.4). El contenido de proteína se determinó mediante el ensayo de ácido bicinonínico (BCA).

Ensayo de unión de [³H]-NMHA. Alícuotas de la suspensión membranal (~20 µg de proteína) se incubaron en 100 µl de solución de incubación con [³H]-NMHA (0.01-10 nM). Se incubó durante 60 min a 30°C y se filtró en papel de fibra de vidrio Whatman GF/B, previamente tratado con

polietilenimina al 0.3%. La unión inespecífica se determinó utilizando histamina (10 μ M). El contenido de tritio se determinó por centelleometría. Los datos se ajustaron a una hipérbola por regresión no lineal con GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

2.5.6 Liberación de [³H]-glutamato en rebanadas del hipocampo.

Debido al gran número de animales requeridos para los ensayos de liberación de glutamato con sinaptosomas, estos experimentos se realizaron con rebanadas del hipocampo (250x250 μ m) obtenidas con un cortador (*chopper*). El tejido de tres animales se mantuvo a 37°C en una solución de KH normal (CaCl₂ 1.8 mM), con cambios de solución cada 10 min. Después de 30 min, el tejido fue transferido a 1 ml de solución KH conteniendo [³H]-glutamato (50 nM) en presencia de ácido dihidrokaínico (500 μ M) para prevenir la captura por las células gliales. Las rebanadas se lavaron con solución KH y se distribuyeron aleatoriamente en las cámaras de un aparato de superfusión (16 cámaras en paralelo, 30 μ l de tejido en cada cámara) para ser perfundidas (1 ml/min) con medio KH con CaCl₂. Después de perfundir por 20 min se colectaron 10 fracciones de 1 ml (1 min) cada una. La liberación de [³H]-glutamato fue estimulada cambiando a una solución con alto K⁺ (30 mM) durante 1 min (fracción 4), regresando a la solución KH normal. Cuando se requirió el tejido fue expuesto al agonista del H₃R RAMH (1 μ M), 5 min antes y durante la despolarización.

El contenido de tritio en las fracciones se determinó por centelleometría. El tejido de de cada cámara se colectó y se incubó en 0.5 ml de HCl (1 M) durante 3 h antes de la adición de líquido de centelleo para determinar la cantidad de tritio presente en el tejido. El eflujo de tritio se calculó como fracción del tritio presente en el tejido al comienzo del período de colección respectivo. Los valores se expresan como porcentaje de la fracción colectada inmediatamente antes del cambio al medio con alto K⁺ (fracción 3 = 100%).

2.5.7 Detección por Western Blot de la fosforilación inducida por el H₃R de ERK-1/2 (p44/p42 ERK) y Akt (Serina473) en rebanadas del hipocampo.

Las ratas fueron decapitadas, los cerebros se extrajeron rápidamente y se colocaron en solución KH fría. Con un vibratomo se obtuvieron rebanadas de 400 µm de grosor que se colocaron en solución KH fría. Las rebanadas se estabilizaron en medio KH con CaCl₂ bajo oxigenación constante (95% O₂/5% CO₂) durante 1 h a 30 °C, antes de transferirse a viales de incubación que contenían 1 ml del mismo medio. Se incubó a 37 °C durante 30 min, se reemplazó el medio y se agregó el agonista del H₃R immepip. La reacción se detuvo agregando solución de KRH fría. Las rebanadas fueron homogenizadas en solución de lisis con 10 golpes de un homogenizador manual y el homogenado fue centrifugado (3 min, 2°C, 8,000 rpm), y el sobrenadante fue utilizado para el ensayo. La cantidad de proteínas fue determinada mediante el ensayo BCA. La composición de la solución de lisis fue: 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10% desoxicolato, 10% SDS, 1% glicerol, 150 mM NaCl y 1% de un cóctel de inhibidores de proteasas.

Muestras de los extractos (20 µg de proteína) se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), se resolvieron por electroforesis y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se bloquearon durante 1 h a 21°C en TBS-T con 5% de BSA y después se incubó durante la noche a 4°C con un anticuerpo anti-fosfo-Akt (Ser⁴⁷³; *Cell Signalling*; dilución 1: 1000 en TBS-T con 5% de BSA) o con un anticuerpo anti-fosfo-ERK-1/2 (*Cell Signalling*, 1:1000 en T-BST con 1.5% de BSA). La membrana se lavó con TBS-T (5x5 min) y se incubó a 21°C durante 1 h con el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo de cabra acoplado a HRP; 1:5000 en T-BST/1.5% BSA). La membrana se lavó con TBS-T (5x5 min) y la inmunorreactividad se determinó por quimioluminiscencia (*Amersham Biosciences ECL Western Blotting Analysis System*).

Para la determinación de los niveles totales de ERK-1/2 o Akt las membranas se incubaron en *stripping buffer* (0.1 M glicina, pH 2.5) durante 30 min a 21°C y se enjuagaron con PBS frío (2x5 min) y en TBS-T (2x5 min). La membrana se bloqueó con BSA al 5% en TBS-T, se incubó con anticuerpo anti-Akt o anti-ERK1/2 (1:1000) a 4 °C durante la noche; posteriormente se incubó con anticuerpo secundario como se describió antes.

2.6 Resultados

2.6.1 Efecto de la DMI en la densidad del H₃R en sinaptosomas de la corteza prefrontal, el hipocampo y el neostriado de ratas hembra y macho.

Diferentes estudios han mostrado que el H₃R se expresa de manera abundante en el SNC, principalmente en las neuronas donde actúa como autorreceptor y heterorreceptor. Los ensayos de saturación de la unión de [³H]-NMHA mostraron un aumento en la densidad de H₃R (B_{max}) en la corteza prefrontal, el hipocampo y el neostriado de las ratas hembras después de una semana de tratamiento con estreptozotocina (STZ), no así en ratas macho de la misma cepa (Figura 13 y Tabla 3).

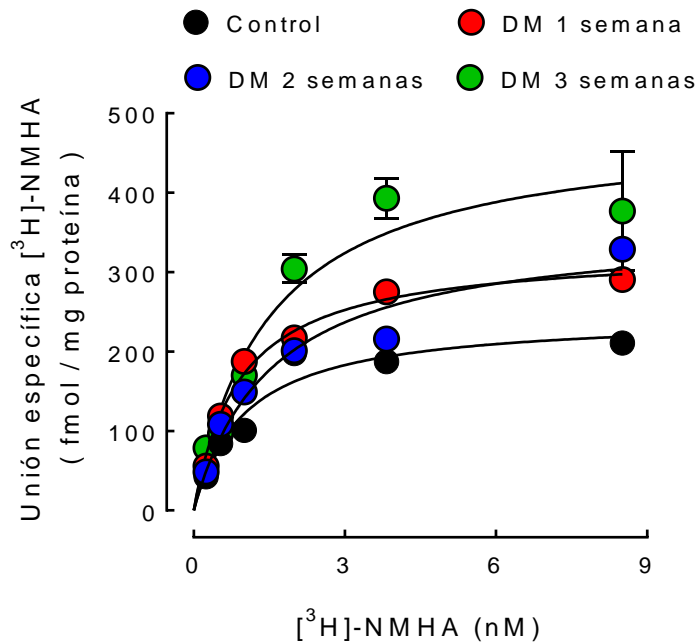


Figura 13. Unión saturante de [³H]-NMHA a membranas de sinaptosomas del neostriado de ratas hembra. Las membranas se incubaron con las concentraciones indicadas de [³H]-NMHA y la unión específica del receptor se determinó restando la unión en presencia de histamina (10 μ M) de la unión total. Los valores son el promedio \pm SEM de triplicados en un experimento.

Tabla 3 Unión saturante de [³H]-NMHA a membranas sinaptosomales en un modelo de DMI

Núcleo	Ratas macho		Ratas hembra	
<i>Neostriado</i>	Control	DMI	Control	DMI
B _{max}	328.0	371.4	244.8	329.2
K _d (nM)	2.980	2.232	1.644	1.108
<i>Corteza prefrontal</i>				
B _{max}	387.6	391.8	286.6	401.2
K _d (nM)	2.383	1.279	0.877	3.425
<i>Hipocampo</i>				
B _{max}	219.9	213.4	159.2	233.1
K _d (nM)	4.086	2.762	2.335	2.101

La unión de [³H]-NMHA se determinó en membranas de sinaptosomas de la corteza prefrontal, el hipocampo y el neostriado de ratas hembra y macho 7 días después de la administración de estreptozotocina. Los valores son de 1 experimento.

2.6.2 Efecto de la DMI en la expresión del H₃R en sinaptosomas y en membranas totales del hipocampo de ratas hembra.

En membranas sinaptosomales del hipocampo, que contienen principalmente receptores pre-sinápticos, la densidad del H₃R aumentó a los 7, 14 y 21 días de la DMI, en comparación con los controles (Tabla 4). En membranas del hipocampo íntegro, que contienen los receptores totales, la densidad del H₃R aumentó a los 7, 14 y 21 días de la DMI, en comparación con los valores de los animales controls (Figura 14).

Tabla 4 Unión de [³H]-NMHA a membranas sinaptosomales del hipocampo en un modelo de DMI.

	Control	SEM	DM-7 días	SEM	<i>P</i>
B _{max}	161.9	2.4	263.2	32.7	0.037
K _d (nM)	1.78	0.55	2.13	0.03	0.710
	Control	SEM	DM-14 días	SEM	
B _{max}	213.3	3.6	809.8	29.8	< 0.001
K _d (nM)	4.96	0.83	8.92	0.66	0.046
	Control	SEM	DM-21 días	SEM	
B _{max}	163.1	3.6	1231.5	22.5	< 0.001
K _d (nM)	7.11	4.77	14.74	0.68	0.226

La densidad máxima (B_{max}) corresponde a fmol/mg proteína. La evaluación se realizó a los 7,14 y 21 días después de la inducción de DM con STZ. Los valores son la media ± SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student.

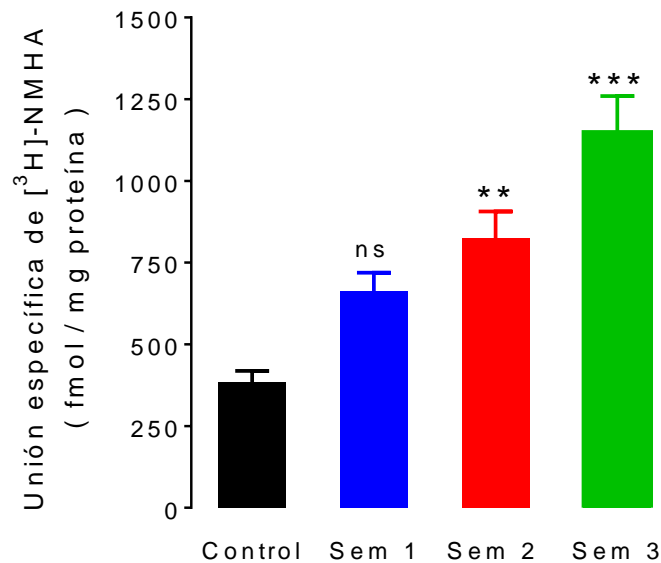


Figura 14. Unión de [³H]-NMHA a las membranas totales del hipocampo después de la primera, segunda y tercera semana con DMI inducida con STZ. Los valores son la media \pm SEM de 6 experimentos independientes. *ns*, sin diferencia significativa; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, con respecto al control; Anova de una vía y prueba de Dunnett.

2.6.3 Efecto de la DMI en la modulación de la transmisión glutamatergica mediada por el H₃R en el hipocampo de rata.

La DM produce glucotoxicidad y la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), que median varios efectos sistémicos, particularmente en el tejido cerebral. Se han reportado alteraciones en la neurotransmisión glutamatergica debido a la formación de AGEs a causa de la DMI. El H₃R inhibe la liberación de glutamato en las terminales aisladas del neocórtex de la rata (Molina Hernández et al. 2001). En este trabajo, en rebanadas del hipocampo de ratas hembra control la activación de los receptores H₃ con el agonista RAMH no modificó la liberación de [³H]-glutamato inducida por despolarización química (Figura 15, A-B). Sin embargo, en rebanadas del hipocampo de ratas diabéticas la activación del H₃R inhibió de manera significativa la liberación de [³H]-glutamato a los 14 y 21 días post-inducción con STZ (Figura 15C-D).

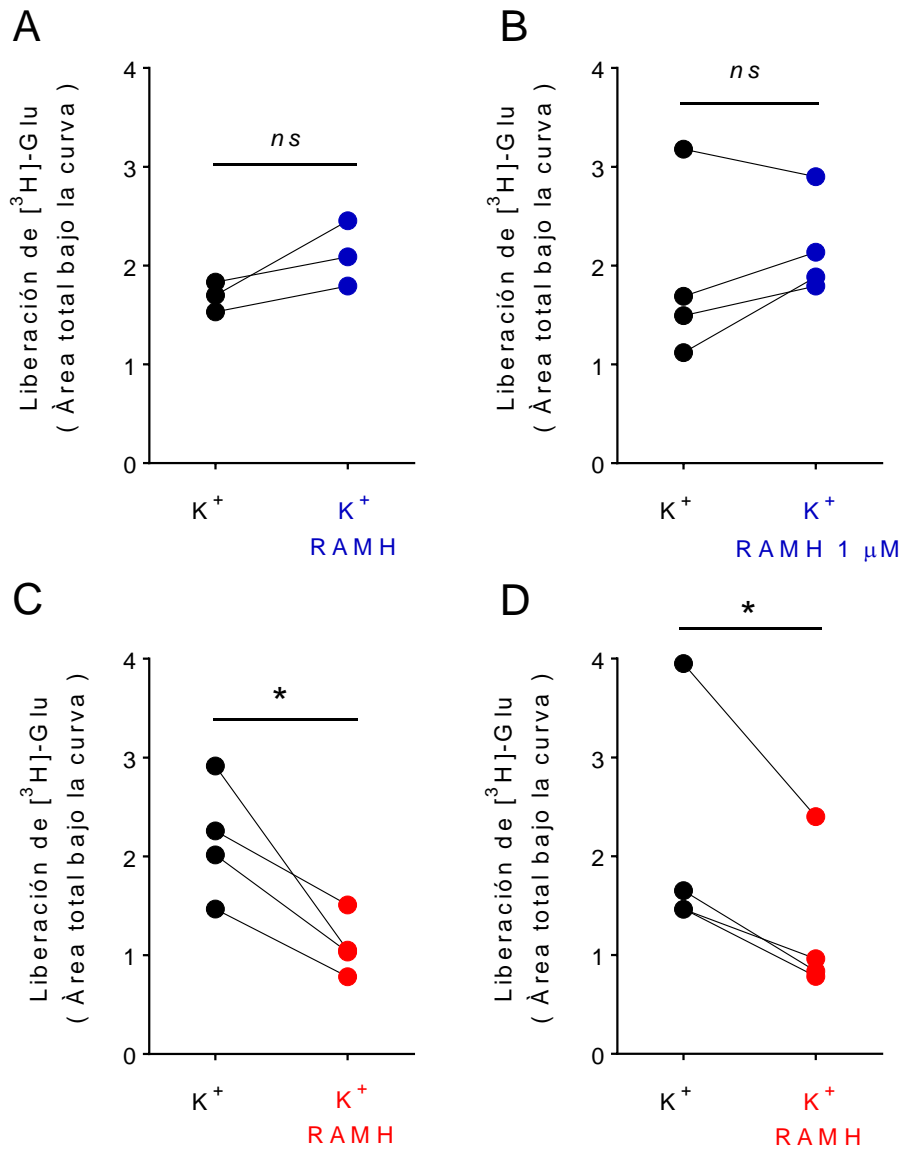


Figura 15. Efecto de la activación del H₃R en la liberación de [³H]-glutamato evocada por despolarización en rebanadas del hipocampo de la ratona hembra. A-B) Ausencia de efecto de la liberación de [³H]-glutamato en rebanadas del hipocampo de animales control (A, 14 días; B, 21 días). Las rebanadas marcadas con [³H]-glutamato (50 nM), se perfundieron con solución Krebs-Henseleit y se colectaron fracciones de 1 ml (1 min). La liberación se evocó aumentando la concentración de KCl de 4 a 30 mM durante 1 minuto. El agonista del H₃R, RAMH (R- α -metilhistamina, 1 μ M), fue perfundido durante 5 min antes y durante el pulso despolarizante. Los valores son promedios \pm SEM de 4 experimentos. **C-D)** La activación del H₃R inhibe la liberación de [³H]-glutamato evocada por K⁺ en rebanadas del hipocampo de animales con DMI (C, 14 días; D, 21 días). Los valores son promedios \pm SEM de 4 experimentos. *ns*, sin diferencia significativa; **P* < 0.05; prueba *t* de Student pareada.

2.6.4 Efecto de la DM-I en la fosforilación de ERK1/2 mediada por el H₃R en el hipocampo de ratas hembras control.

Los H₃Rs se acoplan a proteínas G $\alpha_{i/o}$ e inducen varias vías de señalización que incluyen la activación de las MAPKs (ERK-1/2). La estimulación del H₃R con el agonista immpip resultó en un aumento de la fosforilación de ERK-1/2 a los 5 min, para decaer rápidamente después (Figura 16). El efecto del agonista fue prevenido por el antagonista selectivo ciproxifan (Figura 17).

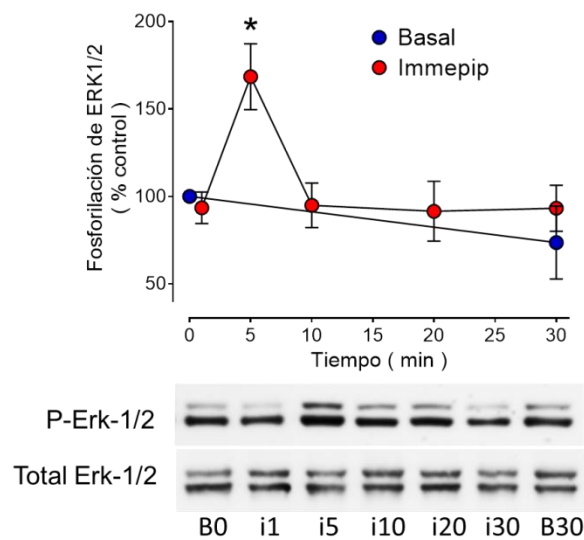


Figura 16. Curso temporal de la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H₃R en rebanadas del hipocampo de la rata. Se muestra el efecto en rebanadas de ratas controles, incubadas con immpip (1 μ M) por los tiempos indicados. Los valores son promedios \pm SEM de 5 experimentos; * $P < 0.05$, Anova de una vía y prueba de Tukey.

Para estudiar el mecanismo por el cual el H₃R induce la fosforilación de ERK-1/2, las rebanadas del hipocampo fueron incubadas con U0126, inhibidor de las cinasas MEK1/MEK2, o con Gö-6976, inhibidor de las cinasas C de proteínas, PKC (PKC α y PKC β). La pre-incubación con Gö-6976 disminuyó significativamente el efecto del H₃R en la fosforilación de ERK-1/2, sin efecto del inhibidor U0126 (Figura 18), indicando que la acción del H₃R implica la vía PLC/PKC/ERK-1/2.

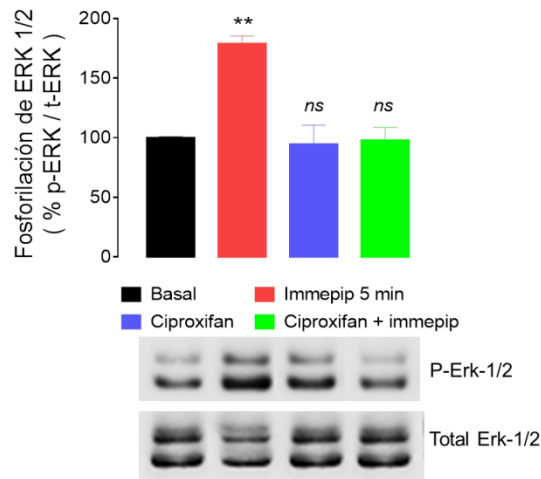


Figura 17. Antagonismo del efecto del H₃R en la fosforilación de ERK-1/2 en rebanadas del hipocampo de la rata. Las rebanadas se incubaron por 5 min con el agonista immeipip (1 μ M), en ausencia o presencia del antagonista ciproxifan (10 μ M), presente 10 min antes. Los valores son promedios \pm SEM de 3 experimentos. ns, no significativamente diferente, ** $P < 0.01$ con respecto a la basal; Anova de una vía y prueba de Tukey.

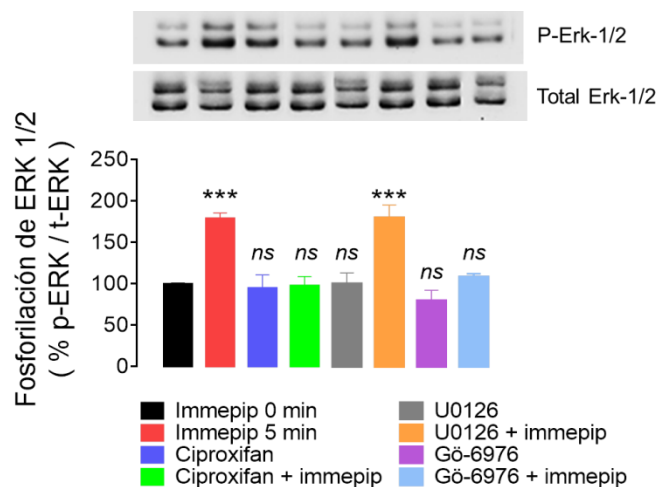


Figura 18. Efecto de la inhibición de MEK1/MEK2 y de la PKC en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H₃R. Las rebanadas del hipocampo se incubaron por 5 min con el agonista immeipip (1 μ M), en ausencia o en presencia de los inhibidores de MEK1/MEK2 (UO126, 10 μ M) y PKC (Gö-6976, 10 μ M), presentes 20 min antes. Se muestra un Western blot representativo y el análisis de 3 experimentos independientes. Los valores son promedios \pm SEM. ns, no significativamente diferente, *** $P < 0.001$, con respecto a la basal; Anova de una vía y prueba de Tukey.

La Figura 19 muestra que la fosforilación de ERK-1/2 inducida por el agonista del H₃R immepip no se observa en las rebanadas de ratas diabéticas. A los 5 min, el efecto en los animales control fue $168.4 \pm 18.8\%$ de la basal (Figura 18), mientras que en los animales diabéticos correspondió a 52.3 ± 3.4 , 56.2 ± 17.48 y $54.6 \pm 2.7\%$ de la basal, a los 7, 14 y 21 días de DMI, respectivamente.

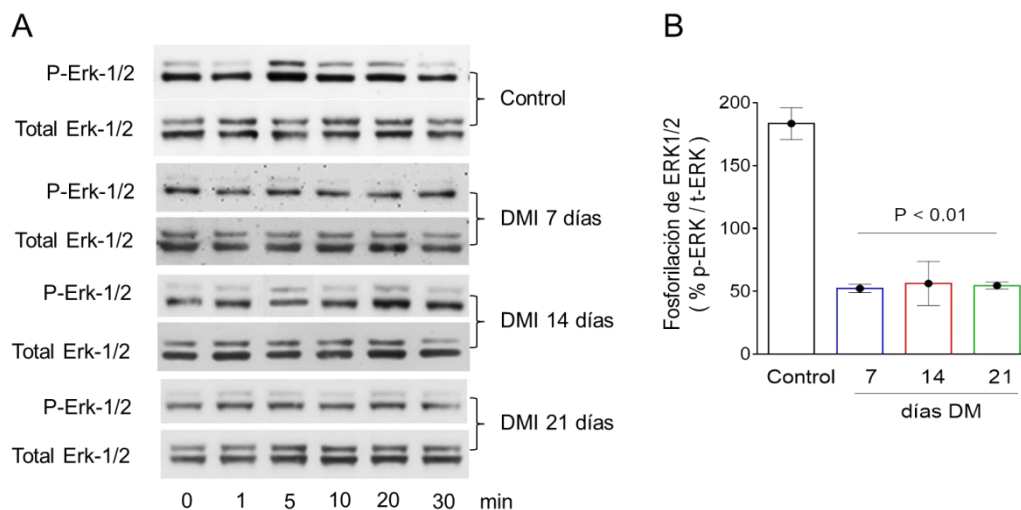


Figura 19. Fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H₃R en rebanadas del hipocampo de la rata. **A)** *Blots* representativos del curso temporal de la fosforilación de ERK-1/2 en rebanadas del hipocampo de ratas control y diabéticas (7, 14 y 21 días después de la inyección de STZ), incubadas con el agonista immepip (1 μ M) por los tiempos indicados. **B)** Comparación de la fosforilación de ERK-1/2 a los 5 min en ratas control y diabéticas. Los valores son promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado con Anova de una vía y la prueba de Tukey.

2.6.5 Efecto de la DMI en la fosforilación de Akt (Serina⁴⁷³) inducida por la activación del H₃R en el hipocampo de ratas hembras.

La cinasa de proteína (Serina/Treonina) PKB/Akt es una de las cinasas más multifacéticas en el “*kinoma*” humano. En los mamíferos, la familia Akt incluye tres miembros altamente homólogos, PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 y PKB γ /Akt3 (Jones, et al., 1991; Cheng et al., 1992; Franke et al., 1995). La 3-cinasa de fosfatidil-inositol (PI3K) fosforila al 3,4-bifosfato de fosfatidil-inositol (PIP₂) convirtiéndolo en el segundo mensajero

3,4,5-trifosfato de fosfatidil-inositol (PIP₃). A través de su dominio de homología a pleckstrina (PH), Akt se recluta a la membrana plasmática donde se une con afinidad similar a los productos de PI3K (PIP₂ y PIP₃). Una vez en la membrana, PDK1 fosforila a Akt en el residuo Treonina 308, lo que lleva a su activación parcial. La fosforilación de Akt en el residuo Serina 473 por mTORC2 induce la actividad enzimática completa de Akt (Brazil y Hemmings 2001; Nicholson et al., 2002). En neuronas corticales y rebanadas del neocórtex de la rata, la estimulación del H₃R induce la fosforilación de Akt tanto en la Serina⁴⁷³ como en la Treonina³⁰⁸ (Bongers et al., 2007).

En rebanadas del hipocampo de la rata hembra, la incubación con el agonista del H₃R imepip (1 μM) resultó en un aumento sostenido en la fosforilación de Akt en la Serina⁴⁷³ (Figura 20A), con un valor a los 60 min de 163 ± 30% de la basal. El efecto del imepip fue prevenido por el antagonista clobenpropit (10 μM; 77 ± 7% de la basal; Figura 20B).

Las proteínas 3-cinasas de la sintasa de glucógeno (GSK3) son cinasas de Serina/Treonina que se identificaron inicialmente como enzimas reguladoras clave en el metabolismo de la glucosa (Woodgett y Cohen, 1984; Wang y Roach, 1993). Existen dos isoformas, GSK3α y GSK3β, codificadas por genes diferentes, con un 95% de homología en los dominios de cinasa (Woodgett 1990). La GSK-3α/β es uno de los principales blancos de Akt (Cross et al., 1995), se encuentra activa cuando las células están en reposo, y la fosforilación por Akt en la Serina⁹ (GSK3β) o la Serina²¹ (GSK3α) conduce a su inactivación (Stambolic y Woodgett 1994; Cross et al. 1995; Frame et al. 2001).

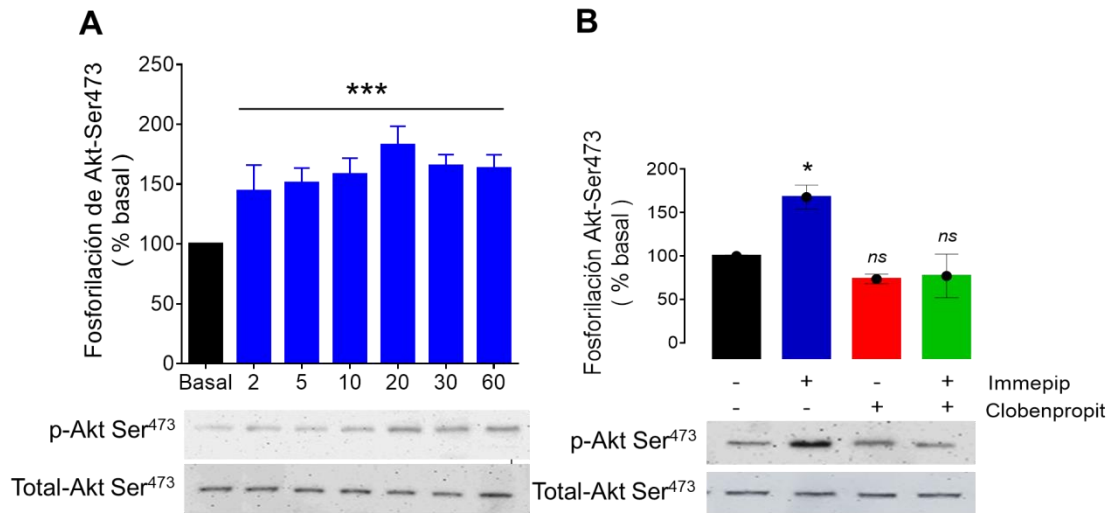


Figura 20. Fosforilación de Akt (Ser⁴⁷³) inducida por la activación del H₃R en rebanadas del hipocampo de ratas hembras. **A)** Curso temporal. Las rebanadas se incubaron con el agonista del H₃R imepip (1 μ M). Se muestra un *blot* representativo y los promedios \pm SEM de 7 experimentos. *** $P < 0.001$ con respecto a la basal. Anova y prueba de Tukey. **B)** Antagonismo del efecto del H₃R. Las rebanadas se incubaron por 60 minutos con el agonista imepip (1 μ M), en ausencia o presencia del antagonista clobenpropit (10 μ M), adicionado 10 min antes. Los valores son promedios \pm SEM de 3 experimentos. *ns*, no significativamente diferente, * $P < 0.05$ con respecto a la basal; Anova de una vía y prueba de Tukey

Para evaluar si la activación del H₃R resultaba en la fosforilación de GSK-3 α / β , se incubaron rebanadas del hipocampo con el agonista imepip y posteriormente se realizó la inmunotransferencia con un anticuerpo anti-fosfo-GSK-3 α / β . La incubación con imepip indujo un aumento significativo en la fosforilación en la Serina⁹ (GSK3 β) y la Serina²¹ (GSK3 α) como se observa en la Figura 21. La fosforilación máxima de GSK-3 α / β inducida por la activación del H₃R ocurre a los 30 min (345 \pm 59% de la fosforilación basal) y regresa a los valores iniciales a los 60 min (Figura 21). El efecto del agonista fue prevenido por el antagonista/agonista inverso ciproxifan, confirmando la participación del H₃R.

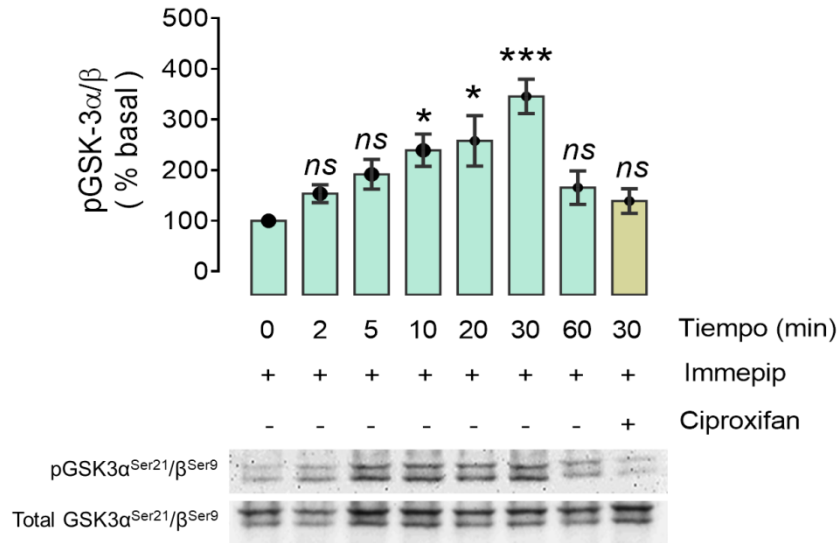


Figura 21. Efecto de la activación del H₃R en la fosforilación de GSK3α (Serina²¹) y GSK3β (Serina⁹). Se muestra un *blot* representativo del curso temporal del efecto del agonista immePIP (1 μM) y el análisis de 5 experimentos (promedios ± SEM de 5 experimentos). El agonista/antagonista inverso ciproxifan (10 μM), estuvo presente 10 min antes de la adición del immePIP. *ns*, no significativamente diferente, * *P* < 0.05, *** *P* < 0.001 con respecto al control; Anova de una vía y prueba de Tukey.

La activación de la vía de la 3-cinasa de fosfatidil-inositol (PI3K) da como resultado la inactivación de GSK3 a través de la fosforilación de residuos de Serina en su extremo amino terminal (Serina⁹ en GSK3β y Serina²¹ en GSK3α; Cross et al., 1995). Para evaluar si la activación de Akt (Serina⁴⁷³) y de GSK-3α/β inducidas por la estimulación del H₃R dependía de la activación de PI3K, se utilizó wortmanina, un inhibidor de la PI3K. La pre-incubación con wortmanina (1 μM) inhibió significativamente la fosforilación de Akt (Serina⁴⁷³) y de GSK-3α/β mediada por el H₃R (Figura 22). Estos datos indican que la activación del H₃R en rebanadas de hipocampo induce la fosforilación de Akt (Serina⁴⁷³)/GSK-3α/β mediante una vía dependiente de PI3K.

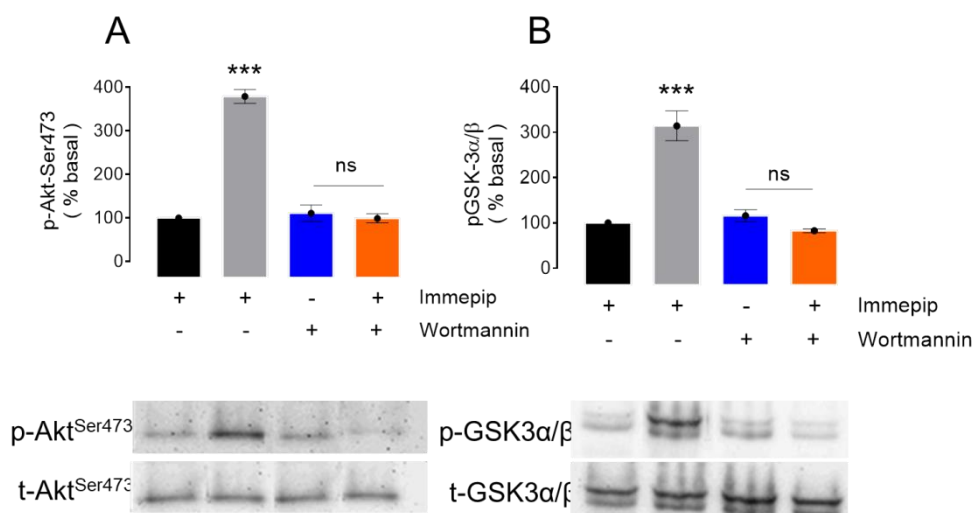


Figura 22. Efecto de la inhibición de la PI3K en la activación de Akt/GSK3α/β mediada por el H₃R. A) Fosforilación de Akt (Serina⁴⁷³). Las rebanadas de hipocampo se incubaron por 60 min con immeipip (1 μM), en ausencia o en presencia de wortmanina (1 μM), un inhibidor de la PI3K, presente 30 min antes. Se muestra un blot representativo y el análisis de 4 experimentos (promedios ± SEM). **B)** Fosforilación de GSK3α/β. Las rebanadas se incubaron por 30 min con imepip (1 μM), en ausencia o presencia de wortmanina (1 μM), adicionada 30 min antes. Se muestra un blot representativo y el análisis de 3 experimentos (promedios ± SEM). *ns*, no significativamente diferente, *** $P < 0.05$ con respecto a la basal; Anova de una vía y prueba de Tukey.

En rebanadas del hipocampo de ratas diabéticas la incubación con el agonista del H₃R immeipip (1 μM) indujo un aumento en la fosforilación de Akt (Serina⁴⁷³) a los 7, 14 y 21 días post-inducción con STZ (253 ± 25, 295 ± 6 y 441 ± 29%, respectivamente; Figura 23). En contraste, la fosforilación de GSK3α/β inducida por la activación del H₃R en rebanadas del hipocampo de ratas control no se observa en las rebanadas de ratas hiperglucémicas (Figura 24).

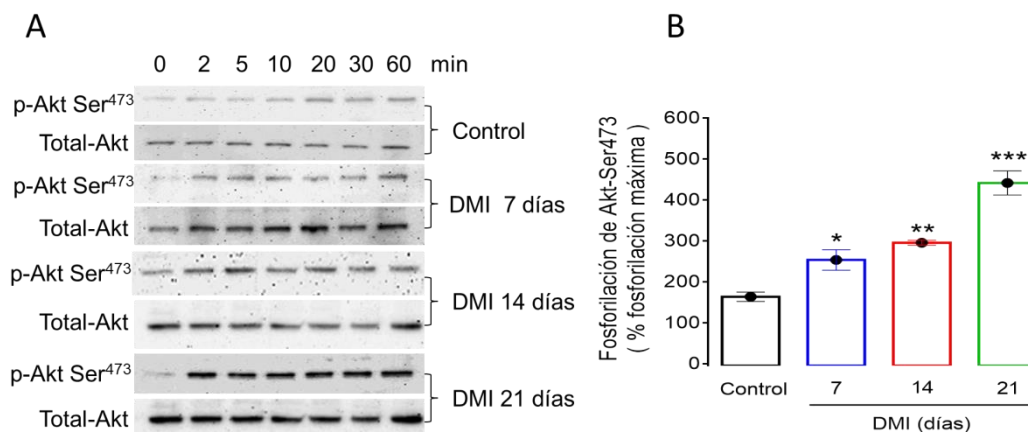


Figura 23. Efecto de la DMI en la fosforilación de Akt (Serina⁴⁷³) inducida por la activación del H₃R en rebanadas del hipocampo de la rata. A) *Blots* representativos del curso temporal de la fosforilación de Akt (Serina⁴⁷³) inducida por el agonista del H₃R imepip (1 μ M) en rebanadas del hipocampo de ratas control y diabéticas (7, 14 y 21 días después de la inducción con STZ). **B)** Análisis de la fosforilación de Akt a los 60 min de estimulación con imepip. Los valores son promedios \pm SEM de 4-5 experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al control; Anova de una vía y prueba de Tukey.

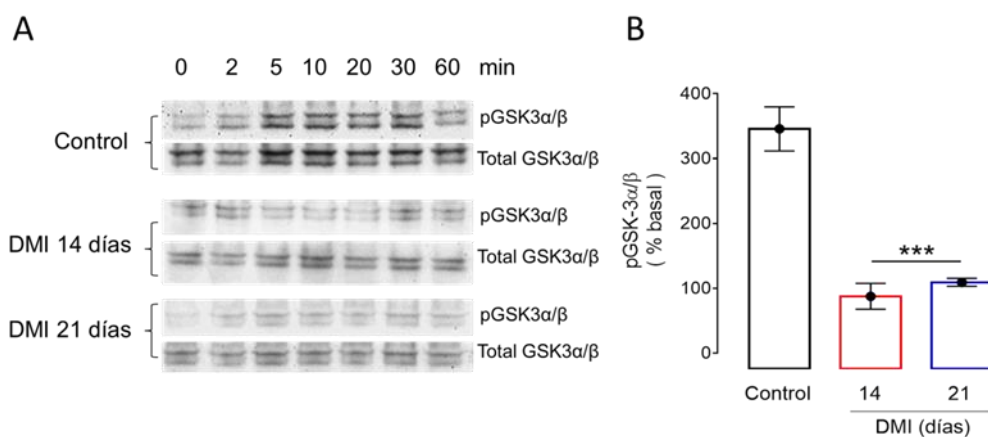


Figura 24. Efecto de la DMI en la fosforilación de GSK3 α/β inducida por la activación del H₃R en rebanadas del hipocampo de la rata. A) *Blots* representativos del curso temporal de la fosforilación de GSK3 α/β inducida por el agonista del H₃R imepip (1 μ M) en rebanadas de hipocampo de ratas control y diabéticas (14 y 21 días después de la inducción con STZ). **B)** Análisis de la fosforilación máxima (minuto 30). Los valores son promedios \pm SEM de 5 experimentos. *** $P < 0.001$ con respecto al control; Anova de una vía y prueba de Tukey.

2.7 Discusión

La DMI se caracteriza por disminución y posterior ausencia de la producción de insulina en el páncreas, lo que conduce a una deficiencia crónica de la hormona. La DMI puede producir efectos en el SNC mediante vías que involucran a receptores acoplados a proteínas G (Oh y Olefsky, 2016).

La histamina ha sido recientemente identificada como mediador de la nefropatía diabética (Pini et al, 2016), y ha sido involucrada en varios procesos inmunoinflamatorios. Los cuatro receptores a histamina ($H_{1-4}R$) se expresan diferencialmente en varios órganos y en el SNC, y recientemente se mostró que los H_3Rs y H_4Rs , expresados en la membrana apical de las células del túbulo colector y en las células renales residentes del asa de Henle, respectivamente, se sobre-expresan en ratas diabéticas (Rosa et al., 2013; Pini et al., 2015). En esta tesis se observó que la densidad de H_3Rs pre-sinápticos de la corteza prefrontal, el hipocampo y el neocórtex aumentó significativamente en las ratas diabéticas (Tabla 3 y Figura 13). En el hipocampo, el efecto se observó también en la densidad total de H_3Rs (Tabla 4 y Figura 14).

De manera interesante, el incremento en la densidad del H_3R se observó en ratas hembra, y no en machos de la misma cepa (Tabla 3). En la fisiopatología de la DMI están involucradas varias hormonas, además de la insulina (Mittendorfer y Klein, 2014), y la ausencia de ésta disminuye la concentración plasmática de leptina al disminuir su secreción del tejido adiposo. Perry y colaboradores (2014) mostraron que la deficiencia de leptina en ratas diabéticas induce hiperglucemia y cetoacidosis, desencadenando una cascada de eventos en múltiples órganos. La disminución de leptina aumenta la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HPA) y promueve la liberación de ACTH de la hipófisis, que a su vez aumenta la secreción de corticosterona (el equivalente del cortisol en el humano) de las glándulas suprarrenales y la lipólisis inducida por corticosterona de los triglicéridos del tejido

adiposo. En la cepa NOD (*nonobese diabetic*), un modelo poligénico de DMI autoinmune, las hembras muestran un aumento significativo en los niveles séricos de leptina comparado con los machos.

Se ha determinado que la presencia de la leptina en el suero está relacionada con la diabetogénesis, ya que la administración de leptina a ratones hembra resultó en infiltración inflamatoria temprana de los islotes pancreáticos con un subsecuente inicio acelerado de la DMI; no así en machos, debido a que los niveles de leptina son 5-10 veces menores que en las hembras (Matarese 2000; Hellström et al., 2000; Matarese et al., 2002). Además, la histamina actúa como un agente anorexígeno al mediar los efectos de la leptina (Itateyama et al., 2003). La infusión de leptina en el hipotálamo de la rata modifica el sistema histaminérgico, ya sea estimulando el proceso postranscripcional de la síntesis de la descarboxilasa de L-histidina (HDC) o aumentando la liberación de la amina (Yoshimatsu et al., 1999; Morimoto et al., 2000); es decir, la leptina puede activar y/o modificar directamente el metabolismo del sistema histaminérgico. Así, en las hembras la leptina podría aumentar la severidad de la DMI y por lo tanto la expresión del H₃R. Los cambios en la densidad del H₃R podrían explicarse como un fenómeno de adaptación en respuesta a modificaciones en los niveles de histamina, un ajuste compensatorio de la actividad neuronal histaminérgica.

El aumento en la densidad de H₃Rs en el hipocampo de las ratas diabéticas, resultó en inhibición de la liberación de [³H]-glutamato en rebanadas, efecto no observado en rebanadas de animales control (Figura 15). En las terminales nerviosas los receptores acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ disminuyen la liberación de neurotransmisores a través de la inhibición de los canales de calcio tipo N y P/Q, proporcionando una retroalimentación negativa (Hille et al., 1994; Ikeda and Dunlap, 1999). Las subunidades G $\beta\gamma$ de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ heterotriméricas, suelen ser responsables de este mecanismo de inhibición de los canales de calcio (Herlitze et al., 1996). Los H₃R se encuentran acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$, y se ha reportado que regula como heterorreceptor la

liberación de diversos neurotransmisores (Nieto-Alamilla et al., 2016). En terminales nerviosas aisladas del neostriado de la rata macho, la activación del H₃R reduce la entrada de calcio e inhibe la liberación de glutamato (Molina-Hernández et al., 2001). Los resultados de esta tesis sugieren que el aumento en la densidad del H₃R en la condición de DMI produce a su vez un aumento en las subunidades Gβγ liberadas a partir de proteínas Gα_{i/o}, lo que se traduce en una mayor inhibición de los canales de calcio N y P/Q, reduciendo por lo tanto la liberación de glutamato.

Mediante el acople a proteínas Gα_{i/o} los H₃Rs desencadenan varias vías de señalización que incluyen la activación de las MAPKs y de la vía Akt/GSK-3β (Bongers et al., 2007a). La activación de ERK-1/2 ha sido implicada en la supervivencia neuronal y en la memoria (Han y Holtzman, 2000; Sweatt, 2004), y la activación del H₃R ejerce un efecto protector en neuronas corticales en cultivo primario contra la lesión hipóxico-isquémica, dependiente de la fosforilación y activación de ERK-1/2, que inhibe la apoptosis en respuesta a un amplio rango de estímulos (Lai et al., 2016).

El efecto anti-apoptótico de ERK-1/2 puede ser regulado indirectamente por la proteína p38 (Lee et al., 2002; Li et al., 2003; Liu y Hofmann, 2004), ya que la inhibición de p38-MAPK estimula la actividad de Raf y ERK e induce la proliferación de mioblastos (Lee et al., 2002). La activación de p38 resulta en la desfosforilación rápida de MEK1/2 y la posterior apoptosis en fibroblastos de piel humana, mientras que la inhibición de p38 inhibe la desfosforilación de MEK1/2 y la apoptosis (Li et al., 2003). p38-MAPK se encuentra activa en el tejido cerebral de ratones con Alzheimer experimental, y la potenciación a largo plazo (LTP) y la densidad de las espinas dendríticas de las células piramidales de CA1 en el hipocampo disminuyen por la expresión aumentada de la proteína p38 fosforilada (Dai et al., 2016). En nuestro trabajo, en el hipocampo de ratas diabéticas hembras la activación del H₃R redujo la fosforilación de ERK-1/2 (Figura 19), sugiriendo una disminución de la

actividad anti-apoptótica hipocampal y por lo consiguiente un probable incremento de la actividad de la apoptosis.

Por su parte, la vía de señalización PI3K-Akt regula múltiples funciones celulares importantes que incluyen la síntesis de proteínas, el crecimiento celular, el metabolismo de la glucosa y la inflamación. Existe creciente interés por la señalización en el SNC mediada por Akt (Brazil et al., 2004), y un blanco relevante de esta cinasa es la proteína de expresión ubicua 3-cinasa de la sintasa de glucógeno, GSK-3 (Jope et al., 2004). En el SNC, la vía Akt/GSK-3 β desempeña un papel importante y ha sido implicada en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurológicos (Li et al., 2002; Rickle et al. 2004).

Niveles altos y una actividad anormal de GSK-3 β se asocian con la muerte neuronal, la formación de filamentos helicoidales pareados tau y la retracción de neuritas, así como con disminución en el rendimiento cognitivo (Kaytor y Orr, 2002; Bhat et al., 2004). En células SK-N-MC transfectadas, el H₃R humano induce la fosforilación de Akt y uno de sus sustratos, GSK-3 β , tanto de forma constitutiva como dependiente de agonista (Bongers et al., 2007b). La fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ por activación del H₃R se observó también en neuronas corticales en cultivo y en rebanadas del neocórtex de la rata (Bongers et al., 2007b), y en las neuronas la activación del H₃R las protege contra el insulto neurotóxico, aumentando la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y disminuyendo la actividad de la caspasa 3 (Mariottini et al., 2009).

La activación de Akt requiere primero de su reclutamiento a la membrana plasmática, iniciado por la PI3K, seguido de fosforilación en los residuos Treonina³⁰⁸ y Serina⁴⁷³ por la cinasa-1 dependiente de 3-fosfoinosítidos (PDK1) y mTORC2, respectivamente (Manning y Cantley, 2007). Una vez activada, Akt fosforila varios sustratos para regular múltiples funciones celulares. Una de las funciones más conservadas es la promoción del crecimiento celular mediada por la activación del complejo mTORC1 (Manning y Cantley, 2007), un

regulador crítico del inicio de la traducción y de la biogénesis de los ribosomas y que desempeña un papel evolutivamente conservado en el control del crecimiento celular (Wullschleger et al., 2006). Los sustratos de mTORC1 son la proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción en eucariotas 4E-eIF4E (4E-BP1), el motivo hidrofóbico en las cinasas S6 (S6Ks; T389 sobre S6K1) y la proteína TSC2 (también llamada tuberina), un supresor tumoral que forma un complejo heterodimérico con la proteína TSC1, también llamada hamartina (Inoki et al., 2002; Sarbassov et al., 2005; Sabatini 2006).

Zhang y colaboradores (2006) mostraron que en células deficientes del complejo TSC 1-2, S6K1 (p70S6K) es la cinasa dependiente de mTORC1 responsable de la fosforilación de GSK3 en ausencia de señalización de Akt. La pérdida de la función del complejo TSC1-2 conduce a la fosforilación constitutiva y la inhibición de GSK3 debido a la actividad aberrante de p70S6K. Esta regulación alternativa de GSK3 conduce a una alterada regulación de los sustratos de GSK3 y contribuye por lo tanto a la capacidad de las células deficientes del TSC para proliferar en ausencia de factores de crecimiento. La señalización de mTORC1 desempeña un papel clave en la inducción de la autofagia, y se ha reportado que en ratones *knockout* para el H₃R (H₃R^{-/-}) y la inhibición del H₃R en ratones normales, incrementa la autofagia (Yan et al., 2014).

El incremento en la fosforilación de Akt/GSK-3 β inducida por la privación/reperfusión de oxígeno y glucosa (OGD/R) en cultivos primarios de neuronas corticales, fue inhibido significativamente por la tioperamida, un antagonista del H₃R, reduciendo también la señalización PI3K/Akt/GSK-3 β /mTORC1/p70S6K, por inhibición de la unión del H₃R con CLIC-4, una proteína del canal de cloruro intracelular que participa en la respuesta apoptótica al estrés, y activando así la autofagia (Yan et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que el aumento en la fosforilación de Akt en la Serina⁴⁷³ mediada por el H₃R en el hipocampo de las ratas diabéticas (Figura 23) podría alterar los procesos de proliferación celular

y supervivencia neuronal aumentando la actividad de la vía PI3K/Akt/GSK3/mTOR.

Sin embargo, la fosforilación de GSK3 α/β mediada por el H₃R (Figura 21), disminuye significativamente en condiciones hiperglucémicas (Figura 24). La actividad de GSK3 está finamente regulada, y el estado de fosforilación de GSK3 es el mecanismo mejor caracterizado de control de su actividad, aunque la regulación de su distribución subcelular y las interacciones con las proteínas de unión a GSK3 también contribuyen al control de sus acciones (Jope y Johnson, 2004). Ambas isoformas de GSK3 están inhibidas por la fosforilación de un residuo de Serina en su extremo N-terminal, que corresponde a la Serina⁹ en GSK3 β y a la Serina²¹ en GSK3 α . Este sitio puede ser fosforilado por diferentes cinasas, incluyendo Akt (Cross et al., 1995), PKA (Fang et al., 2000; Li et al., 2000), y PKC (Goode et al., 1992), lo que indica que muchas vías de señalización convergen en GSK3 para regular su actividad. Las deficiencias de este control inhibitorio de GSK3 pueden resultar en una actividad de GSK3 anormalmente alta, una condición que puede tener efectos perjudiciales en la plasticidad neural, la estructura y la supervivencia (Jope y Johnson, 2004).

La disminución de la fosforilación de los residuos de Serina de GSK3 se traduce en un aumento en su actividad. En oposición a la inhibición de la actividad de GSK3 por la fosforilación del residuo de Serina en su extremo N-terminal, la fosforilación de un residuo de Tirosina (Tirosina²¹⁶ en GSK3 β y Tirosina²⁷⁹ en GSK3 α) aumenta la actividad de GSK3, pero este efecto parece ser menor que el efecto de la fosforilación de los residuos de Serina (Frame y Cohen, 2001, y aún queda por esclarecer los mecanismos que regulan la fosforilación en el residuo de Tirosina de GSK3).

Nuestros resultados muestran que en la DMI existe una disminución de la fosforilación de GSK3 (Serina⁹ en GSK3 β y Serina²¹ en GSK3 α) inducida por la activación del H₃R en rebanadas de hipocampo, debido muy probablemente al aumento en la densidad de H₃Rs en condiciones

de hiperglucemia, provocando la desfosforilación (activación) de GSK3. Por lo tanto, puede sugerirse que la regulación a la alza del número de H₃Rs en la DMI está asociada a una anormal actividad aumentada de GSK3 α/β , y está establecido que la GSK3 promueve la muerte celular (Grimes y Jope, 2001). Por lo tanto, una hiperactividad de GSK3 α/β asociada a la desregulación de la funcionalidad del H₃R podría afectar perjudicialmente la supervivencia neuronal.

En conjunto, los resultados de esta tesis indican una señalización aumentada del H₃R a nivel pre-sináptico en condiciones hiperglucémicas, debida al aumento en la densidad del receptor, y a nivel post-sináptico una desregulación de la activación de ERK-1/2 así como un aumento sustancial en la actividad de GSK3. Los datos de este trabajo no permiten establecer si los efectos del H₃R en las vías PLC/PKC/ERK1/2 y PI3K/Akt/GSK3 en el hipocampo de la rata se deben directamente al cambio en el número de receptores o si reflejan el daño causado por factores intrínsecos de la DMI, lo que requiere estudios adicionales.

2.8 Conclusión

La DMI modifica la densidad y señalización de los receptores a histamina H₃ en el hipocampo de la rata hembra.

2.9 Bibliografía

- Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Japanese Journal of Pharmacology*, 78, 113-145
- Alkan M, Machavoine F, Rignault R, Dam J, Dy M, Thieblemont N (2015) Histidine decarboxylase deficiency prevents autoimmune diabetes in NODmice. *Journal of Diabetes Research* 2015: 965056
- American Diabetes Association (2014) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37(Supplement 1): S81–S90
- Anichtchik OV, Peitsaro N, Rinne JO, Kalimo H, Panula P (2001) Distribution and modulation of histamine H₃ receptors in basal ganglia and frontal cortex of healthy controls and patients with Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 8: 707–716
- Azevedo MS, Silva IJ, Raposo JF, Neto IF, Falcao JG, Manso CF (1990) Early increase in histamine concentration in the islets of Langerhans isolated from rats made diabetic with streptozotocin. *Diabetes Research and Clinical Practice* 10 : 59–63
- Babri S, Badie HG, Khamenei S, Seyedlar MO (2007) Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats. *Brain and Cognition* 64: 86-91
- Banday AA, Fazili FR, Lokhandwala MF (2007) Insulin causes renal dopamine D₁ receptor desensitization via GRK2-mediated receptor phosphorylation involving phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 293: F877-884
- Beraldo WT, Da Silva W, Fernandes AD (1962) Inhibitory effects of carbohydrates on histamine release and mast cell disruption by dextran. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 19: 405-413
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J (2004) Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *Journal of Neurochemistry* 89: 1313–1317
- Bierhaus A, Schiekofler S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Häring HU, Schleicher E, Nawroth PP (2001) Diabetes associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- κ B. *Diabetes* 50: 2792–2808

- Bongers G, Bakker RA, Leurs R (2007a) Molecular aspects of the histamine H₃ receptor. *Biochemical Pharmacology* 73: 1195–1204
- Bongers G, Sallmen T, Passani MB, Mariottini C, Wendelin D, Lozada A, Marle Av, Navis M, Blandina P, Bakker RA, Panula P, Leurs R (2007b) The Akt/GSK-3 β axis as a new signaling pathway of the histamine H₃ receptor. *Journal of Neurochemistry* 103: 248-58
- Bouwens L, Houbracken I, Mfopou JK (2013) The use of stem cells for pancreatic regeneration in diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 9: 598–606
- Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, Sharp GW (2002) Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 (Supplement 1): S83–S90
- Brabant C, Alleva L, Grisar T, Quertemont E, Lakaye B, Ohtsu H, Lin JS, Jatlow P, Picciotto MR, Tirelli E (2009) Effects of the H₃ receptor inverse agonist thioperamide on cocaine-induced locomotion in mice: role of the histaminergic system and potential pharmacokinetic interactions. *Psychopharmacology (Berl)* 202: 673–687
- Brazil DP, Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences* 26:657-664
- Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA (2004) Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 233–242
- Brown RE, Reymann KG (1996) Histamine H₃ receptor-mediated depression of synaptic transmission in the dentate gyrus of the rat in vitro. *Journal of Physiology* 496: 175–184
- Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR (1992) AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of proteinserine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9267-9271
- Chuang TT, LeVine H 3rd, De Blasi A (1995) Phosphorylation and activation of β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 270: 18660–18665
- Clapham J, Kilpatrick GJ (1992) Histamine H₃ receptors modulate the release of [3H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex—evidence for the possible existence of H₃ receptor subtypes. *British Journal of Pharmacology* 107: 919–923

- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785–789
- Cumming P, Gjedde A (1994) Subclasses of histamine H₃ antagonist Binding Sites in Rat Brain. *Brain Research* 641: 203–207
- Dai HL, Hu WY, Jiang LH, Li L, Gaung XF, Xiao ZC (2016) p38 MAPK inhibition improves synaptic plasticity and memory in angiotensin II-dependent hypertensive mice. *Scientific Reports* 6: 27600
- 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. *Molecular Pharmacology* 59: 1-8
- Eastwood E, Allen CN, Raber J (2012) Effects of neonatal methamphetamine and thioperamide exposure on spatial memory retention and circadian activity later in life. *Behavioral Brain Research* 230: 229-236
- Ellenbroek BA, Ghiabi B (2014) The other side of the histamine H₃ receptor. *Trends in Neurosciences* 37: 191–199
- Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast Jr RC, Woodgett JR, Mills GB (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11960–11965
- Ferrada C, Ferré S, Casadó V, Cortés A, Justinova Z, Barnes C, Canela EI, Goldberg SR, Leurs R, Lluís C, Franco R (2008) Interactions between histamine H₃ and dopamine D₂ receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology* 55: 190–197
- Fogel WA, Chmielecki C, Gralek M, Maslinski C (1990) Histamine metabolism in diabetic rats. *Agents Actions* 30: 243–246
- Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochemical Journal* 359: 1–16
- Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81: 727-736
- Gill DS, Thompson CS, Dandona P (1990) Histamine synthesis and catabolism in various tissues in diabetic rats. *Metabolism* 39: 815–818

- Gill DS, Barradas MA, Fonseca VA, Dandona P (1989) Plasma histamine concentrations are elevated in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease. *Metabolism* 38: 243–247
- Gill DS, Thompson CS, Dandona P (1998) Increased histamine in plasma and tissues of diabetic rats. *Diabetes Research* 7: 31–34
- Godoy-Matos AF (2014) The role of glucagon on type 2 diabetes at a glance. *Diabetology and Metabolic Syndrome* 6: 91
- Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ (1992) Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 β by protein kinase C isotypes. *Journal of Biological Chemistry* 267: 16878–16882
- Goth A, Nash WL, Nangler M, Holman J (1957) Inhibition of histamine release in experimental diabetes. *American Journal of Physiology* 191: 25–28
- Grimes CA, Jope RS (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Progress in Neurobiology* 65: 391–426
- Grossin N, Wautier MP, Picot J, Stern DM, Wautier JL (2009) Differential effect of plasma or erythrocyte AGE-ligands of RAGE on expression of transcripts for receptor isoforms. *Diabetes and Metabolism* 35: 410–417
- Guimaraes ELM, Empsen C, Geerts A, van Grunsven LA (2010) Advanced glycation end products induce production of reactive oxygen species via the activation of NADPH oxidase in murine hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology* 52: 389–397
- Halpern BN and Briot M (1952) Liberation d'histamine par la peau du rat sous l'effet du contact avec le dextran, in vitro. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 146: 1552–1555
- Han BH and Holtzman DM (2000) BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *Journal of Neuroscience* 20: 5775–5781
- Hancock AA, Brune ME (2005) Assessment of pharmacology and potential anti-obesity properties of H₃ receptor antagonists/inverse agonists. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 14: 223–241
- Harper EA, Shankley NP, Black JW (1999) Evidence that histamine homologues discriminate between H₃-receptors in guinea-pig cerebral cortex and ileum longitudinal muscle myenteric plexus. *British Journal of Pharmacology* 128: 751–759

- Hellström L, Wahrenberg H, Hruska K, Reynisdottir S, Arner P (2000) Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. *Journal of Internal Medicine* 247: 457-462
- Henry MB, Zheng S, Duan C, Patel B, Vassileva G, Sondey C, Lachowicz J, Hwa JJ (2011) Antidiabetic properties of the histamine H₃ receptor proteanagonist proxyfan. *Endocrinology* 152: 828–835
- Herlitz S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G protein bg subunits. *Nature* 380: 258–262
- Herold K, Moser B, Chen Y, Zeng S, Yan SF, Ramasamy R, Emond J, Clynes R, Schmidt AM (2007) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. *Journal of Leukocyte Biology* 82: 204-212
- Hille B (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends in Neurosciences* 17: 531–536
- Hirano S, Miyata S, Onodera K, Kamei J (2006) Effects of histamine H₁ receptor antagonists on depressive-like behavior in diabetic mice. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 83:214-220
- Hollis TM, Gallik SG, Orlidge A, Yost JC (1983) Aortic endothelial and smooth muscle histamine metabolism. Relationship to aortic 125I-albumin accumulation in experimental diabetes. *Arteriosclerosis* 3: 599–606
- Hollis TM, Kern JA, Enea NA, Cosgarea AJ (1985) Changes in plasma histamine concentration in the streptozotocin-diabetic rat. *Experimental Molecular Phathology* 43: 90–96
- Hussien NI, Ebrahim N, Mohammed OM, Sabry D (2017) Combination of obestatin and bone marrow mesenchymal stem cells prevents aggravation of endocrine pancreatic damage in type II diabetic rats. *International Journal of Stem Cells* 10: 129–143
- Ikeda SR, Dunlap K (1999) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Advances in second messenger and phosphoprotein research* 33: 131–151
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology* 4: 648–657
- Iateyama E, Chiba S, Sakata T, Yoshimatsu H (2003) Hypothalamic neuronal histamine in genetically obese animals: its implication of

- leptin action in the brain. *Experimental Biology and Medicine* 228:1132e1137
- Jin CY, Kalimo H, Panula P (2002) The histaminergic system in human thalamus: correlation of innervation to receptor expression. *European Journal of Neuroscience* 15: 1125–1138
- Jin CY, Panula P (2005) The laminar histamine receptor system in human prefrontal cortex suggests multiple levels of histaminergic regulation. *Neuroscience* 132: 137–149
- Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA (1991) Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regulation* 2: 1001-1009
- Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 95–102
- Kahlson G, Rosengren E, Thunberg R (1967) Accelerated mobilization and formation of histamine in the gastric mucosa evoked by vagal excitation, *Journal of Physiology* 190: 455–463
- Kamal A, Biessels GJ, Duis SE, Gispen WH (2000) Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and aging. *Diabetologia* 43: 500-506
- Kanzaki M, Mora S, Hwang JB, Saltiel AR, Pessin JE (2004) Atypical protein kinase C (PKC ζ /lambda) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *Journal of Cell Biology* 164: 279–290
- Kaytor MD, Orr HT (2002) The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Current Opinion in Neurobiology* 12: 275–278
- Kiedorf K, Fritz G (2013) RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *Journal of Leukocyte Biology* 94: 55-68
- 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. *Journal of Neurochemistry* 137: 200-215
- Laron Z (2009) Insulin and the brain. *Archives of Physiology and Biochemistry* 115: 112-116
- Lazewska D, Kiec-Kononowicz (2018) Progress in the development of histamine H₃ receptor antagonists/inverse agonists: a patent review (2013-2017). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 28: 175-196

- Lee EJ, Park JH (2013) Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics & Informatics* 11: 224–229
- Lee J, Hong, F, Kwon S, Kim SS, Kim DO, Kang HS, Lee SJ, Ha J, Kim SS (2002) Activation of p38 MAPK induces cell cycle arrest via inhibition of Raf/ERK pathway during muscle differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298: 765–771
- Leurs R, Blandina P, Tedford C, Timmerman H (1998) Therapeutic potentials of histamine H₃ receptor agonists and antagonists. *Trends in Pharmacological Sciences* 19: 177–183
- Levine RJ, Noll WW (1969) Histidine decarboxylase and its inhibition. *Annals of the New York Academy of Sciences* 166: 246–256
- Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β . *Molecular and Cellular Biology* 20: 9356–9363
- Li SP, Junttila MR, Han J, Kahari VM, Westermarck J (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1,2. *Cancer Research* 63: 3473 – 3477
- Li X, Bijur GN, Jope RS (2002) Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disorder* 4: 137–144
- Ligneau X, Garbarg M, Vizuete ML, Diaz J, Purand K, Stark H, Schunack W, Schwartz JC (1994) [¹²⁵I]iodoproxyfan, a new antagonist to label and visualize cerebral histamine H₃ receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 271: 452–459
- Liu Q, Hofmann PA (2004) Protein phosphatase 2A mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 286: H2204 –2212
- Lu Z, Xu S (2006) ERK 1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 58: 621-631
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261–1274

- 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 beta pathway in cultured cortical neurons and protects against neurotoxic insults. *Journal of Neurochemistry* 110: 1469-1478
- Masini D, Lopes-Aguiar C, Bonito-Oliva A, Papadia D, Andersson R, Fisahn A, Fisone G (2017) The histamine H₃ receptor antagonist thioperamide rescues circadian rhythm and memory function in experimental parkinsonism. *Translational Psychiatry* 7: e1088
- Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE (1994) Characterization of a major protein in GLUT 4 vesicles. Concentration in the vesicles and insulin-stimulated translocation to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* 269: 6089 - 6092
- Matarese G (2000) Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response. *European Cytokine Network* 11: 7-14
- Matarese G, Sanna V, Lechler RI, Sarvetnick N, Fontana S, Zappacosta S, La Cava A. (2002) Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice. *Diabetes* 51: 1356-1361
- Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Häring HU (2000) Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocrine Reviews* 21: 585-618
- Menge BA, Gruber L, Jorgensen SM, Deacon CF, Schmidt WE, Veldhuis JD, Holst JJ, Meier JJ (2011) Loss of inverse relationship between pulsatile insulin and glucagon secretion in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 60: 2160–2168
- Mittendorfer B, Klein S (2014) Absence of leptin triggers type 1 diabetes. *Nature Medicine* 20: 705-706
- Molina-Hernández A, Nuñez A, Sierra JJ, Arias-Montaña JA (2001) Histamine H₃ receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 41: 928-934
- Morimoto T, Yamamoto Y, Yamatodani A (2000) Leptin facilitates histamine release from the hypothalamus in rats. *Brain Research* 868: 367–369
- Musen G, Lyoo IK, Sparks CR, Weinger K, Hwang J, Ryan CM, Jimerson DC, Hennen J, Renshaw PF, Jacobson AM (2006) Effects of type 1

diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. *Diabetes* 55: 326-333

Nakamura T, Yoshikawa T, Naganuma F, Mohsen A, Lida T, Miura Y, Sugawara A, Yanai K (2015) Role of histamine H₃ receptor in glucagon-secreting alpha TC1.6 cells. *FEBS Open Bio* 5: 36–41

Nakamura T, Yoshikawa T, Noguchi N, Sugawara A, Kasajima A, Sasano H, Yanai K (2014) The expression and function of histamine H₃ receptors in pancreatic beta cells. *British Journal of Pharmacology* 171: 171–185

Neumann D, Schneider EH, Seifert R (2014) Analysis of histamine receptor knockout mice in models of inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 348: 2–11

Nicholson KM, Anderson NG (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signalling* 14: 381-395

Nieto-Alamilla G, Márquez-Gómez R, García-Gálvez AM, Morales-Figueroa GE, Arias-Montaña JA (2016) The histamine H₃ receptor: Structure, pharmacology, and function. *Molecular Pharmacology* 90(5): 649-673

Nishibori M, Oishi R, Itoh Y, Saeki K (1989) Changes in histamine metabolism in the brains of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Neurochemistry* 52: 1375–1381

Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T (2015) Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules* 5: 194-222

Oh DY, Olefsky JM (2016) G protein-coupled receptors as targets for anti-diabetic therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 15: 161-172

Orlidge A, Hollis TM (1982) Aortic endothelial and smooth muscle histamine metabolism in experimental diabetes. *Arteriosclerosis* 2: 142–150

Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, Ballantyne CM, Gahmberg CG, Bianchi ME, Nawroth PP, Chavakis T (2007) A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO Journal* 26: 1129-1139

Perry RJ, Zhang XM, Zhang D, Kumashiro N, Camporez JP, Cline GW, Rothman DL, Shulman GI (2014) Leptin reverses diabetes by

- suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Nature Medicine* 20: 759-763
- Pini A, Chazot PL, Veglia E, Moggio A, Rosa AC (2015) H₃ receptor renal expression in normal and diabetic rats. *Inflammation Research* 64: 271-3
- Pini A, Obara I, Battell E, Chazot PL, Rosa AC (2016) Histamine in diabetes: is it time to reconsider? *Pharmacological Research* 111: 316–324
- Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Schwartz JC (1993) A detailed autoradiographic mapping of histamine H₃ receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 52: 169–189
- Pollard H, Schwartz JC (1987) Histamine neuronal pathways and their functions. *Trends in Neurosciences* 10: 86–89
- Polonsky KS (2012) The past 200 years in diabetes. *The New England Journal of Medicine* 367: 1332-1340
- Ramasamy R, Vanucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM (2005) Advanced glycation end products and RAGE: A common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* 15: 16R-28R
- Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, Winblad B, Ravid R, Cowburn RF (2004) Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport* 15: 955–959
- Rosa AC, Grange C, Pini A, Katebe MA, Benetti E, Collino M, Miglio G, Bani D, Camussi G, Chazot PL, Fantozzi R (2013) Overexpression of histamine H₄ receptors in the kidney of diabetic rat. *Inflammation Research* 62: 357–365
- Sabatini DM (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Reviews Cancer* 6: 729–734
- Sallmen T, Lozada AF, Anichtchik OV, Beckman AL, and Panula P (2003) Increased brain histamine H₃ receptor expression during hibernation in golden-mantled ground squirrels. *BMC Neuroscience* 4: 24
- Sarbasov DD, Ali SM, Sabatini DM (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion Cell Biology* 17: 596–603
- Schlicker E, Betz R, Göthert M (1988) Histamine H₃ receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Archives of Pharmacology* 337: 588–590

- Schlicker E, Fink K, Detzner M, Göthert M (1993) Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H₃ receptors. *Journal of Neural Transmission* 93: 1–10
- Schlicker E, Fink K, Hinterthaler M, Göthert M (1989) Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H₃ receptors. *Archives of Pharmacology* 340: 633–638
- Schlicker E, Kathmann M, Bitschnau H, Marr I, Reidemeister S, Stark H, Schunack W (1996) Potencies of antagonists chemically related to iodoproxyfan at histamine H₃ receptors in mouse brain cortex and guinea-pig ileum: Evidence for H₃ receptor heterogeneity? *Archives of Pharmacology* 353: 482–488
- Schneider EH, Neumann D, Seifert R (2014) Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from HDC-, H₃R- and H₄R-deficient mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 47: 101–121
- Schroeder EB, Chambless LE, Liao D, Prineas RJ, Evans GW, Rosamond WD, Heiss G (2005) Diabetes, glucose, insulin, and heart rate variability: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Diabetes Care* 28: 668-74
- Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24: 855-872
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocrinology Reviews* 13: 387-414
- Selivanova SV, Honer M, Combe F, Isensee K, Stark H, Krämer S, Schubiger PA, Ametamey SM (2012) Radiofluorinated histamine H₃ receptor antagonist as a potential probe for in vivo PET imaging: radiosynthesis and pharmacological evaluation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20: 2889–2896
- Seo E, Lim JS, Jun JB, Choi W, Hong IS and Jun HS (2017) Exendin-4 in combination with adipose-derived stem cells promotes angiogenesis and improves diabetic wound healing. *Journal of Translational Medicine* 5: 35
- Stranahan A, Arumugam T, Cutler R, Lee K, Egan J, Mattson M (2007) Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nature Neuroscience* 11: 309-317
- Suh YH, Kim Y, Bang JH, Choi KS, Lee JW, Kim WH, Oh TJ, An S, Jung MH (2005) Analysis of gene expression profiles in insulin-sensitive

- tissues from pre-diabetic and diabetic Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 299-315
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 311–317
- 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
- Vlassara H, Uribarri J (2014) Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both?. *Current Diabetes Reports* 14: 453
- Wang X, Liu C, Xu Y, Chen P, Shen Y, Xu Y, Zhao Y, Chen W, Zhang X, Ouyang Y, Wang Y, Xie C, Zhou M, Liu C (2017) Combination of mesenchymal stem cell injection with icariin for the treatment of diabetes-associated erectile dysfunction. *PLoS One* 12: e0174145
- Wang Y, Roach PJ (1993) Inactivation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-3. Dominant role of the phosphorylation of Ser-640 (site-3a). *Journal of Biological Chemistry* 268: 23876–23880
- West RE, Zweig A, Shih N, Siegel MI, Egan RW (1990) Identification of two H₃ histamine receptor subtypes. *Molecular Pharmacology* 38: 610–613
- Woodgett JR, Cohen P (1984) Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochimica et Biophysica Acta* 788: 339–347
- Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9: 2431–2438
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471–484
- Yan H, Zhang X, Hu W, Ma J, Hou W, Zhang X, Wang X, Gao J, Shen Y, Lv J, Ohtsu H, Han F, Wang G, Chen Z (2014) Histamine H₃ receptors aggravate cerebral ischaemic injury by histamine-independent mechanisms. *Nature Communications* 5: 3334
- Yan SF, Du Yan S, Ramasamy R, Schmidt AM (2009) Tempering the wrath of RAGE: An emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation. *Annals of Medicine* 25: 1-15

- Yanai K, Ryu JH, Sakai N, Takahashi T, Iwata R, Ido T, Murakami K, Watanabe T (1994) Binding characteristics of a histamine H₃-receptor antagonist, [³H]S-methylthioperamide: comparison with [³H]α-methylhistamine binding to rat tissues. *Japanese Journal of Pharmacology* 65: 107–112
- Yoshimatsu H, Itateyama E, Kondou S, Tajima D, Himeno K, Hidaka S (1999) Hypothalamic neuronal histamine as target of leptin in feeding behavior. *Diabetes* 48: 2286–2291
- Yoshimoto R, Miyamoto Y, Shimamura K, Ishihara A, Takahashi K, Kotani H, Chen AS, Chen HY, Macneil DJ, Kanatani A, Tokita S (2006) Therapeutic potential of histamine H₃ receptor agonist for the treatment of obesity and diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS* 103: 13866–13871
- Zhang HH, Lipovsky AI, Dibble CC, Sahin M, Manning BD (2006) S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Molecular Cell* 24: 185–197
- Zhang LS, Chen JF, Chen GF, Hu XY, Ding MP (2013) Effects of thioperamide on seizure development and memory impairment induced by pentylenetetrazole-kindling epilepsy in rats. *Chinese Medical Journal* 126: 95-100
- Zhang M, Kho AL, Anilkumar N, Chibber R, Pagano PJ, Shah AM, Cave AC (2006) Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation* 113: 1235–1243
- Ziegler AG, Nepom GT (2010) Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity* 32: 468–78
- Zimmet P, Alberti KG, Magliano DG, Bennett PH (2016) Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nature Reviews Endocrinology* 12: 616–622