



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Generación y expresión heteróloga del receptor a histamina H₂ humano
con la mutación N217D**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. MIROSLAVA CARRASCO MEZA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de tesis

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

Ciudad de México

Diciembre 2024



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio 37 (Neurofarmacología) del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav-IPN, bajo la dirección del Doctor José Antonio G. Arias Montaña (Cinvestav-IPN). Los recursos fueron otorgados por el propio Cinvestav y por el CONAHCYT (beca número 1237215, M.C.M.).

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado (CVU 1237215).

Al Dr. José Antonio Arias Montaña por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por los conocimientos transmitidos y por ser parte de mi formación como investigadora.

Al Dr. Juan Manuel Arias Montaña, al Dr. Gerardo Contreras Patiño y al Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes por sus observaciones y sugerencias en el proyecto de investigación.

Al Dr. Juan Escamilla Sánchez y al Arq. Raúl González Pantoja por el apoyo técnico y moral.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Luis, Rommel, Carlos, Victoria, Nikte, Alejandro y Daniel por su apoyo, su conocimiento, por los buenos ratos que pasamos dentro y fuera del laboratorio.

A Kari y Emma, gracias por las tardes de pláticas, las risas y por el apoyo que me dieron.

Dedicatorias

A mis padres, que me han apoyado incondicionalmente todo este tiempo, por darme las herramientas para ser la persona que soy.

A mi hermano, por estar en los momentos difíciles y siempre motivarme a seguir adelante.

A Esteban, por ser mi luz en la oscuridad, sin ti no hubiera sido capaz de afrontar todos los momentos difíciles que he pasado. Gracias por todo.

A Perseo y Kira.

Índice

Resumen	3
Abstract	4
Abreviaturas	5
I. Introducción	6
1. Sistema histaminérgico del sistema nervioso central (SNC).....	6
2. Receptores a histamina.	8
Receptores a histamina H ₂ (H ₂ R).....	8
Localización en el SNC y estructura.	8
Vías de señalización intracelular.	11
H ₂ R y esquizofrenia.	12
II. Planteamiento del problema	13
III. Hipótesis	14
IV. Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
V. Métodos	15
Obtención de la mutación puntual N217D en el hH ₂ R _{WT}	15
Subclonación de los fragmentos F1-BGHR, F1-R1 y F3-BGHR en el vector pCI-neo.	17
Cultivo celular	18
Transfección estable de los receptores hH ₂ R _{WT} y hH ₂ R _{N217D}	18
Evaluación por <i>Western blot</i> de la expresión de los receptores hH ₂ R _{WT} y hH ₂ R _{N217D}	19
Evaluación por <i>Western blot</i> de la señalización de los receptores hH ₂ R _{WT} y hH ₂ R _{N217D} en la fosforilación de proteínas por PKA en células CHO-K1 transfectadas.	19
Determinación de AMPc endógeno por el ensayo de competición con [³ H]-AMPc.	21
Determinación de AMPc endógeno utilizando el biosensor GloSensor.....	22
Identificación de la expresión de los receptores hH ₂ R _{WT} y hH ₂ R _{N217D} mediante inmunofluorescencia.	24
VI. Resultados	26
Evaluación de la integridad de la secuencia del cDNA del hH ₂ R _{WT}	26
Obtención de la mutación puntual N217D en el hH ₂ R.....	26
Evaluación de la mutación puntual N217D mediante secuenciación.....	28
Evaluación por <i>Western blot</i> de la expresión de los receptores hH ₂ R _{WT} y hH ₂ R _{N217D} en la membrana citoplasmática de células CHO-K1 transfectadas.....	29
Determinación de la expresión del receptor hH ₂ R _{WT} y hH ₂ R _{N217D} por inmunofluorescencia.	32

Evaluación por <i>Western blot</i> de la señalización de los receptores hH ₂ R _{WT} y hH ₂ R _{N217D} en la fosforilación de proteínas por PKA en células CHO-K1 transfectadas.	33
Determinación de AMPc endógeno con el ensayo de GloSensor.	34
Curva concentración-respuesta para el agonista amtamina.	36
<i>VII. Discusión</i>	37
Generación de la mutación y expresión de los receptores hH ₂ R _{WT} y hH ₂ R _{N217D}	37
Evaluación de la activación de los receptores hH ₂ R _{WT} y al hH ₂ R _{N217D}	39
<i>IX. Perspectivas</i>	41
<i>X. Referencias</i>	42

Resumen

El receptor a histamina H₂ (H₂R) pertenece a la clase A de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), es codificado por un gen localizado en el cromosoma 5 humano, que da lugar a una proteína de 359 aminoácidos, y posee una masa molar aproximada de ~40 kDa. Además, posee actividad constitutiva y ejerce sus efectos funcionales a través de proteínas G_{as} induciendo la síntesis de AMPc.

El H₂R ha sido estudiado principalmente en el sistema gastrointestinal debido a su participación en la regulación de la secreción de ácido gástrico y ha sido un blanco farmacológico para el control de patologías gástricas. Sin embargo, se ha identificado también su expresión en el sistema nervioso central. En 1996 se describió la mutación N217D en el H₂R en pacientes diagnosticados con esquizofrenia en una población del Reino Unido. La mutación se localiza en la tercera asa intracelular, una región fundamental para la unión con la proteína G_{as}, y consiste en el cambio de la adenina 649 por una guanina que ocasiona el cambio de la Asparagina 217 por Aspartato.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la mutación N217D modifica la expresión y las propiedades de señalización del hH₂R en un sistema heterólogo (células CHO-K1). Para ello, se generó el receptor con la mutación mencionada (hH₂R_{N217D}) y se comparó con el receptor nativo (hH₂R_{WT}). La evaluación de la expresión se realizó mediante ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia, mientras que la funcionalidad fue evaluada mediante ensayos de competición de la unión de [³H]-AMPc y empleando el biosensor GloSensor.

Los resultados muestran que las células CHO-K1 no expresan de manera endógena al receptor H₂R, y la expresión estable de los receptores transfectados (hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}). Los ensayos funcionales sugieren que el receptor mutado posee una menor actividad constitutiva respecto al receptor nativo y con disminución de la afinidad del receptor por el agonista.

Abstract

The histamine H₂ receptor (H₂R) belongs to the class A of G protein-coupled receptors (GPCRs), encoded by a gene located on the human chromosome 5, and generates a 359 amino-acid protein with a molar mass of ~40 kDa. The H₂R exhibits constitutive activity and exerts its functional effects through G_{αs} proteins, inducing cAMP synthesis.

The H₂R has been primarily studied in the gastrointestinal system due to its role in regulating gastric acid secretion, making it a pharmacological target for controlling gastric pathologies. However, receptor expression has also been identified in the central nervous system. In 1996, the N217D mutation in the H₂R was described in patients diagnosed with schizophrenia in a population from the United Kingdom. The mutation is located on the third intracellular loop, a crucial region for G_{αs} protein binding and activation, and involves the substitution of adenine 649 by guanine, leading to the replacement of Asparagine 217 by Aspartate.

The aim of this study was to determine whether the N217D mutation alters the expression and signaling properties of the hH₂R in a heterologous system (CHO-K1 cells). The receptor with the mutation was generated (hH₂R_{N217D}) and compared with the wild-type receptor (hH₂R_{WT}). Receptor expression was assessed by Western blot and immunofluorescence assays, while receptor functionality was evaluated by [³H]-cAMP binding competition assays and the GloSensor biosensor.

The results of this work show that CHO-K1 cells do not express endogenously H₂Rs, and that stable expression of the transfected receptors (hH₂R_{WT} and hH₂R_{N217D}) was achieved. The functional assays suggest that the mutated receptor exhibits lower constitutive activity than the wild-type receptor, along with a decrease in agonist affinity.

Abreviaturas

aa	Aminoácido
AC	Adenilil ciclasa
AMPC	3,5-Monofosfato cíclico de adenosina
BSA	Albúmina de suero bovino
[Ca²⁺]_i	Concentración intracelular de calcio
CHO-K1	Células de ovario de hámster chino K1
DNAc	DNA complementario
G-418	Geneticina
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Trifosfato de guanosina
H₁R	Receptor a histamina H ₁
H₂R	Receptor a histamina H ₂
H₃R	Receptor a histamina H ₃
H₄R	Receptor a histamina H ₄
IP₃	1,4,5-Trifosfato de inositol
KRH	Krebs-Ringer-HEPES
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PI3K	3-Cinasa de fosfatidilinositol
PKA	Cinasa A de proteínas
PKC	Cinasa C de proteínas
PLC	Fosfolipasa C
SNC	Sistema Nervioso Central
TMN	Núcleo tuberomamilar

I. Introducción

1. Sistema histaminérgico del sistema nervioso central (SNC).

La histamina, 2-(4-imidazolil)etilamina de acuerdo con la IUPAC, es un neurotransmisor que se encuentra en distintas regiones del organismo incluyendo el SNC, el estómago, la piel y el sistema inmunológico (Feldberg, 1956; Schwartz *et al.*, 1991). En el SNC humano el sistema histaminérgico se encuentra conformado por aproximadamente 64,000 neuronas, y las áreas que poseen una mayor densidad de neuronas histaminérgicas se localizan en los núcleos hipotalámicos, en el *septum* medial y en el área ventral tegmental. Sin embargo, el núcleo tuberomamilar (NTM) es la única fuente de eferencias histaminérgicas al SNC (Leurs *et al.*, 2011a). Dichas eferencias forman dos vías ascendentes principales que inervan a los ganglios basales, la amígdala, el hipocampo, la corteza cerebral y el hipotálamo (Figura 1), y una vía descendente que inerva el tallo cerebral (incluyendo a los núcleos monoaminérgicos), el cerebelo y la médula espinal (Benarroch, 2010).

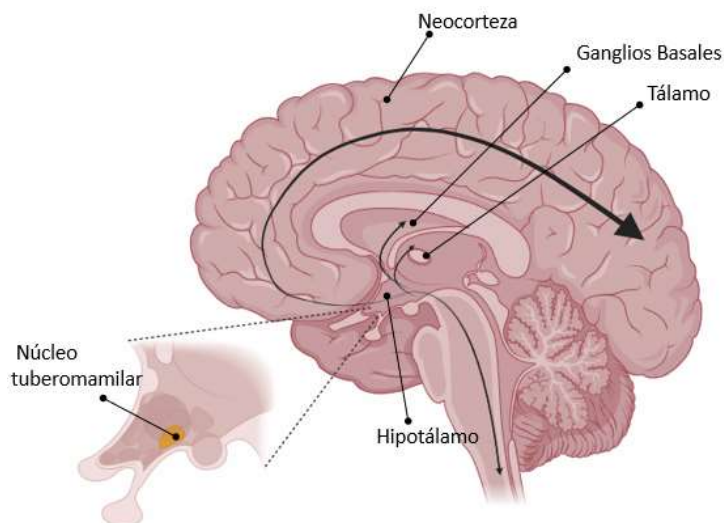


Figura 1. Sistema histaminérgico en el humano. Se ilustra la inervación histaminérgica por el NTM a diversas áreas del cerebro humano. Tomada de Benarroch, 2010.

El sistema histaminérgico participa en la neuromodulación de los ciclos circadianos, la actividad motriz, la analgesia, la ingesta de alimentos, la memoria y el aprendizaje, la señalización de daño tisular y la inflamación (Benarroch, 2010; Yoshikawa *et al.*, 2021).

A pesar de encontrarse en el plasma, la histamina no puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) por lo que debe ser sintetizada dentro del cerebro, y para ello se requiere el transporte de L-histidina a través del transportador de L-aminoácidos (LAT-1), y su descarboxilación por la enzima descarboxilasa de L-histidina (HDC), como se ilustra en la Figura 2. Morfológicamente, las neuronas histaminérgicas poseen un soma con un diámetro de 20–30 μm , con subdivisiones dendríticas y varicosidades en los axones, y es en estas últimas donde se sintetiza mayoritariamente la histamina (Haas *et al.*, 2008).

Su metabolismo en el espacio extracelular se realiza por dos vías: a) oxidación, mediada en el tejido periférico por la enzima diamina oxidasa (DAO), generando al ácido imidazol acético (IAA); y b) metilación, vía principal en el SNC, por la enzima N-metiltransferasa de histamina (HMT) produciendo telemetilhistamina (t-MH), la cual es degradada a ácido telemetilimidazol-acético por la monoamino-oxidasa B, MAO-B (Figura 2) (Schwartz *et al.*, 1991).

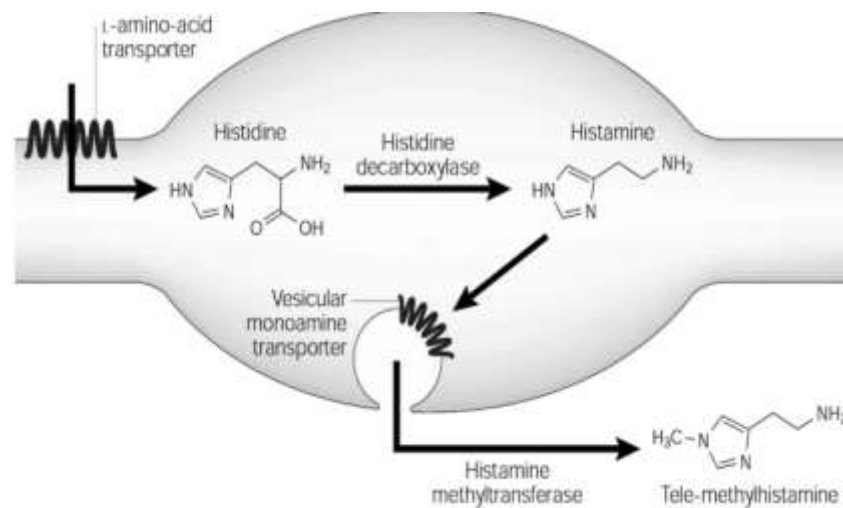


Figura 2. Síntesis y catabolismo de la histamina en el SNC. Se ilustran las vías metabólicas principales que ocurren en las neuronas, así como el transporte de la histamina a las vesículas sinápticas. Tomado de Haas *et al.*, 2008.

2. Receptores a histamina.

Los efectos fisiológicos de la histamina son debidos a la activación de 4 tipos de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés, *G Protein-Coupled Receptors*): H₁, H₂, H₃ y H₄. Todos ellos se clasifican como clase A o similares a la rodopsina (subgrupo α) de acuerdo con la homología de su secuencia y su origen filogenético, respectivamente.

Estructuralmente, son proteínas con siete dominios transmembranales (TM1–TM7), un segmento amino terminal extracelular (N-terminal), un segmento carboxilo-terminal (C-terminal) intracelular, tres asas extracelulares (e1–e3) y tres asas intracelulares (i1–i3) (Haas *et al.*, 2008). Las características farmacológicas moleculares y funcionales se describen en la Tabla 1.

Receptores a histamina H₂ (H₂R)

Localización en el SNC y estructura.

El H₂R fue identificado farmacológicamente en la década de los 70, clonado por homología en 1991 usando un gen canino (Gantz *et al.*, 1991a), y en el mismo año fue clonado el H₂R humano (Gantz *et al.*, 1991b). Inicialmente se le atribuyó como función principal la regulación de la secreción de ácido gástrico; sin embargo, estudios posteriores identificaron su expresión en el SNC de manera post-sináptica en neuronas de áreas como la corteza cerebral, la sustancia negra, el hipocampo, el neocórtex, la amígdala y los núcleos del rafe (alta densidad), así como en el hipotálamo y el cerebelo (baja densidad) (ver Figura 3: Traiffort *et al.*, 1992; Panula y Nuutinen, 2013).

El receptor es codificado por un gen carente de intrones localizado en el cromosoma 5, que da lugar a una proteína de 358 aminoácidos (aa) en la rata y el ratón o de 359 aa en el humano, el cuyo y los caninos; tiene una masa molar aproximado de ~40 kDa. Su tercera asa intracelular es corta (30 aa) mientras que el extremo C-terminal es largo (71 aa; ver Figura 4; Arrang *et al.*, 1995). Tiene una homología del 21.50, 20.70 y 18.95% con los receptores H₁, H₃ y H₄, respectivamente (Micallef *et al.*, 2013). Además, posee sitios putativos de glicosilación y de fosforilación por la cinasa A de proteínas (PKA).

Tabla 1. Propiedades moleculares, farmacológicas y funcionales de los receptores a histamina.

Características	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄
Localización cromosómica	3p25	5q35.2	20q13.33	18q11.2
Proteína G	Gα _{q/11}	Gα _s	Gα _{i/o}	Gα _{i/o}
Vías de señalización	↑ PLC → IP ₃ → DAG ↑ PKC ↑ [Ca ²⁺] _i ↓ Canales de K ⁺	↑ AC → AMPc → PKA ↑ CREB ↓ Canales K _{Ca2+}	↓ AC → ↓ AMPc → ↓ PKA ↓ canales de Ca ²⁺ N y P/Q ↑ Canales de K ⁺	↓ AC → ↓ AMPc ↑ MAPK
Agonistas selectivos	2-tiazoliletilamina, histaprodifen	Dimaprit, amantadina, impromidina.	(R)-α-metilhistamina immepip imetit	4-metilhistamina VUF8430
Antagonistas	Mepiramina	Tiotidina, ranitidina, cimetidina.	Tioperamida clobenpropip	Tioperamida yodofenpropit
Radioligandos	[³ H]-pirilamina [¹²⁵ I]yodobolpiramina	[³ H]-tiotidina [¹²⁵ I]yodoaminopotentina	[³ H]-NMHA [¹²⁵ I]-yodofenpropit [¹²⁵ I]-yodoproxifan	[³ H]-histamina [³ H]-JNJ777120
Distribución fuera del SNC	Vasos sanguíneos, tejido cardíaco, músculo liso, tracto gastrointestinal, endotelio.	Mucosa del estómago, tejido cardíaco, útero, músculo liso, epitelio de la mucosa nasal.	Tracto gastrointestinal, vías respiratorias, glándulas nasales.	Eosinófilos, mastocitos, basófilos, neutrófilos, médula ósea, bazo, hígado.
Distribución en el SNC	Hipotálamo, núcleos aminérgicos, cerebelo, tálamo, corteza e hipocampo.	Corteza, neocórtex, núcleo accumbens, hipocampo, amígdala.	Corteza, neocórtex, núcleo accumbens, sustancia negra.	Hipocampo, corteza, neocórtex, tálamo, amígdala.
Funciones	Excitabilidad postsináptica, plasticidad, memoria de trabajo, control endócrino.	Excitabilidad postsináptica, plasticidad, consolidación del aprendizaje y memoria.	Autorreceptores o heterorreceptores.	Respuesta inflamatoria y alérgica.

AC: adenilil ciclasa; AMPc: 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina; DAG: diacilglicerol; IP₃: 1,4,5-trifosfato de inositol; MAPK: cinasas de proteínas activadas por mitógenos; PKA: cinasa A de proteínas; PKC: cinasa C de proteínas; PLC: fosfolipasa C. ↑ activación, ↓ inhibición, → síntesis. Elaborada a partir de: Leurs *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2008; Lieberman, 2011 y Ramos-Jiménez *et al.*, 2009.

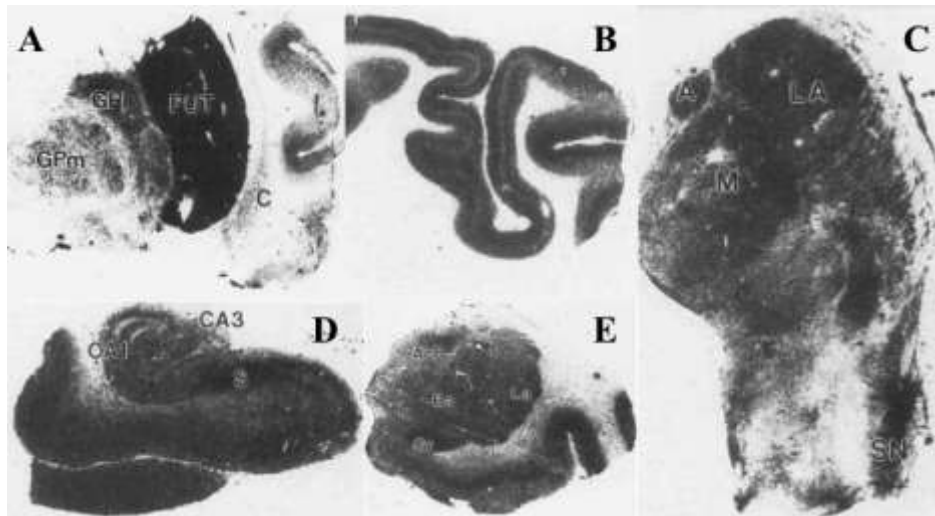


Figura 3. Identificación de la localización del H₂R en el cerebro humano empleando [¹²⁵I]yodoaminopotentidina. Autorradiografías que muestran la distribución de los receptores en **A)** núcleo lentiforme, **B)** corteza cerebral, **C)** tálamo, **D)** formación hipocámpal y **E)** amígdala. A: núcleo del tálamo anterior, AcB: núcleo basal accesorio de la amígdala, Ba: núcleo basal de la amígdala, CA1: región 1 del hipocampo, CA3: región 3 del hipocampo, Gr: núcleo granular de la amígdala, La: núcleo lateral de la amígdala, LA: núcleo lateral del tálamo, M: núcleo medial del tálamo, S: subículo, SN: sustancia negra, C: claustró, GPI: globo pálido lateral, GPM: globo pálido medial, PUT: putamen. Modificado de Traiffort *et al.*, 1992.

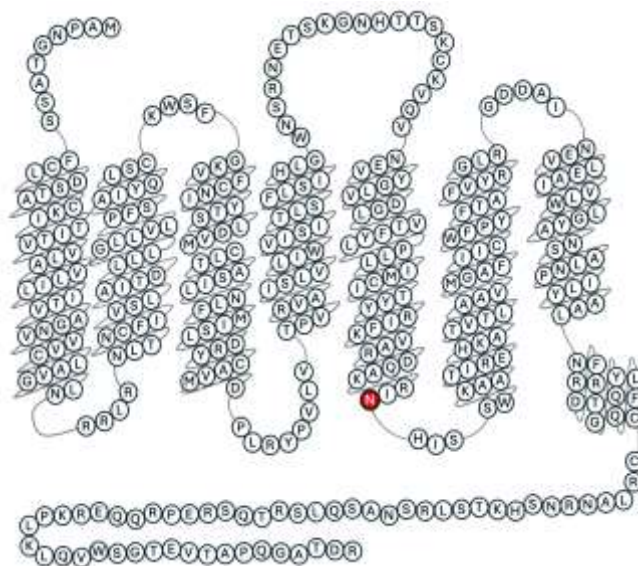


Figura 4. Representación esquemática de la estructura del H₂R. El aminoácido marcado en rojo corresponde a la Asparagina²¹⁷ cuya mutación a Aspartato (N217D) es abordada en este trabajo. Modificado de McNaught, 2024.

Vías de señalización intracelular.

Los H₂Rs presentan actividad constitutiva (Haas *et al.*, 2008), se acoplan a proteínas G α_s y en algunas células a proteínas G $\alpha_{q/11}$. Al ser activados se produce un cambio conformacional del receptor provocando el desacople de la proteína G, y la subunidad G α_s estimula a las adenilil ciclasas (AC) promoviendo la formación de AMPc a partir de ATP, lo que permite la activación de la PKA y con ello la fosforilación de residuos de Treonina y Serina de proteínas diversas, como la proteína de unión a elemento de respuesta al AMPc (CREB) que funciona como factor de transcripción (ver Figura 5; Haas y Panula, 2003; Ramos-Jiménez *et al.*, 2009).

La activación de los H₂Rs facilita la excitabilidad neuronal a través del bloqueo de canales de K⁺ de conductancia pequeña (SK) provocando la disminución de conductancias dependientes de Ca²⁺ responsables de la adaptación del potencial y de la hiperpolarización post-potencial de larga duración en células piramidales, y con ello modificando su disparo (ver Figura 6; Haas y Konnerth, 1983). También participan en la modulación de la excitabilidad de interneuronas que poseen canales de K⁺ K_v3.2 (Atzori *et al.*, 2000) y en la inhibición de la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y de la formación ácido araquidónico (Traiffort *et al.*, 1992).

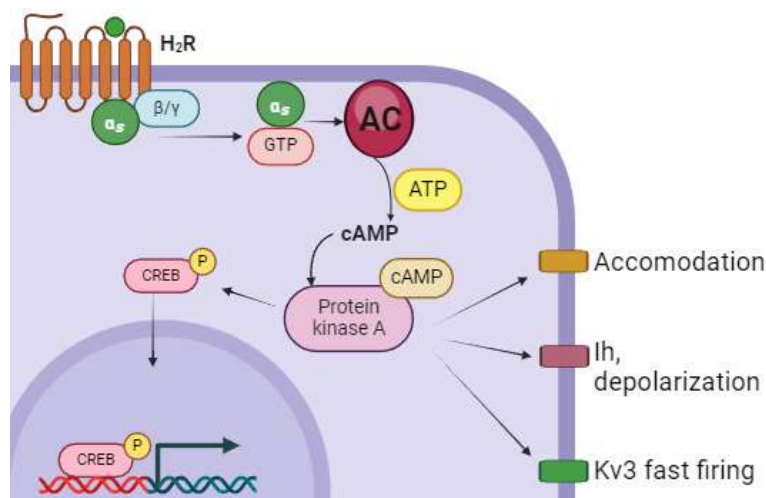


Figura 5. Vía de señalización de los H₂Rs. La activación de los H₂Rs induce la formación de AMPc y la activación de la PKA, lo que lleva a la fosforilación y activación de CREB y la subsecuente activación de la transcripción de genes. Modificado de Haas y Panula, 2003; Ramos-Jiménez *et al.*, 2009.

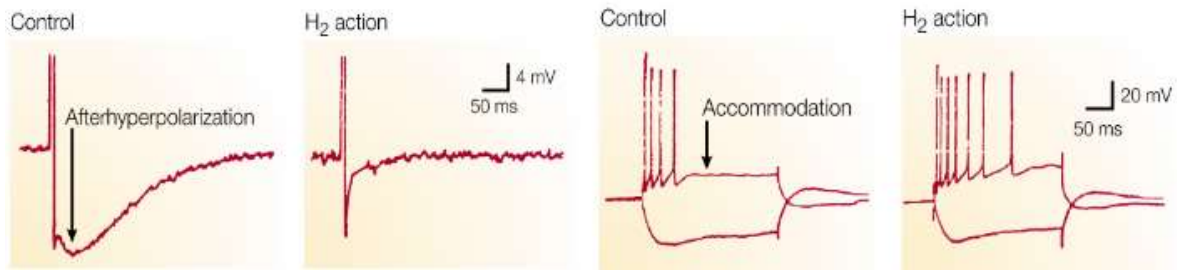


Figura 6. Acción neurofisiológica de los H₂Rs. Se ilustra el bloqueo de la hiperpolarización post-potencial y de la adaptación del potencial de acción por la activación de los H₂Rs. Tomado de Panula y Nuutinen, 2013.

H₂R y esquizofrenia.

Debido a que el H₂R fue identificado inicialmente como regulador de la secreción de ácido gástrico, el receptor ha sido un blanco farmacológico para el control de desórdenes gástricos y esofágicos. Sin embargo, en 1990 se describió un caso de un paciente en una etapa avanzada de esquizofrenia que debido a una úlcera gástrica fue tratado con famotidina. Después de 3 semanas de administración continua se observó mejoría en la sociabilidad, actividad y condición mental. Seis meses después el tratamiento fue suspendido debido a la mejoría de la úlcera, y se observó un deterioro del estado mental, así como la reaparición de los síntomas de la esquizofrenia (Kaminsky *et al.*, 1990). Posteriormente se realizaron estudios de cohorte y se demostró un efecto terapéutico significativo en el tratamiento de la esquizofrenia, sugiriendo una participación de los H₂Rs en el desarrollo de los síntomas negativos de la enfermedad (Deutsch *et al.*, 1993; Rosse *et al.*, 1996; Meskanen *et al.*, 2013).

II. Planteamiento del problema

El H₂R se ha estudiado principalmente en el sistema gastrointestinal debido a su participación en la regulación de la secreción de ácido gástrico. Sin embargo, en la década de los 90 se planteó su participación en la fisiopatología de la esquizofrenia a partir de la descripción de un caso clínico con atenuación de los síntomas negativos por el bloqueo de los H₂Rs.

En 1996 se describió la presencia de la mutación N217D en el receptor H₂R en pacientes con esquizofrenia en una población caucásica del Reino Unido (Orange *et al.*, 1996). Sin embargo, estudios posteriores de Ito *et al.* (2000), Mancama *et al.* (2000) y Fukushima *et al.* (2001), en poblaciones francesas, del Reino Unido y japonesas, respectivamente, no encontraron correlación entre la mutación y el desarrollo de la enfermedad por lo que no se ha estudiado con mayor profundidad la participación del H₂R en la esquizofrenia.

La mutación N217D es provocada por una transición de una adenina por una guanina en el nucleótido 649, generando que en la traducción se cambie la Asparagina por Aspartato en el aminoácido 217. Debido a que la mutación se encuentra en la tercera asa intracelular, una región crítica para la señalización de los GPCRs, el cambio de un aa neutro polar por uno ácido podría afectar las interacciones intermoleculares del H₂R con las proteínas G, modificando su capacidad de unión y la activación de las vías de señalización.

Por lo anterior, en este proyecto se propone estudiar el efecto de la mutación puntual N217D en la expresión del H₂R humano en un sistema heterólogo (células CHO-K1), así como en sus características de señalización.

III. Hipótesis

La mutación puntual N217D en el receptor a histamina H₂ (hH₂R) humano modifica su expresión y su señalización intracelular.

IV. Objetivo general

Determinar si la mutación N217D modifica la expresión, y las propiedades de señalización del hH₂R en un sistema heterólogo (células CHO-K1).

Objetivos específicos

1. Generar el hH₂R con la mutación N217D, mediante mutagénesis dirigida al sitio.
2. Expresar de manera estable en células CHO-K1 a los receptores nativo (hH₂R_{WT}) y mutado (hH₂R_{N217D}).
3. Determinar si la mutación N217D modifica la expresión del hH₂R, mediante ensayos de *Western blot*.
4. Determinar si la mutación N217D modifica las propiedades funcionales del hH₂R, mediante ensayos de formación de AMPc.

V. Métodos

Obtención de la mutación puntual N217D en el hH₂R_{WT}.

Empleando la secuencia del ADNc que codifica al hHRH₂, reportada en la base de datos GeneBank (número de acceso AY136744), se diseñaron los oligonucleótidos indicados en la tabla 2 usando los programas Alignment Technologies (www.genomics.agilent.com) y Clone Manager 9 Professional (Scientific & Educational Software, Denver, CO, USA).

Se diseñaron tres oligonucleótidos en sentido (F1–F3) y tres en antisentido (R1, BGH_R y pCI–neo_R), donde el oligonucleótido F3 contiene el cambio de adenina por guanina y el R1 posee un cambio de timina por citosina, ambos en el nucleótido 655 de la secuencia de ADNc del H₂R_{WT}. Estos cambios permitieron la formación de una mutación puntual donde el triplete original AAT, que codifica una Asparagina (N), fue cambiado a GAT codificando para Aspartato (D); además, la mutación originó un sitio de restricción por las enzimas ClaI y TaqI, y se empleó la primera enzima para evaluar la presencia de la mutación en el ADNc resultante.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para obtener la mutación N217D.

Oligonucleótidos	ID	Secuencia
Sentido	F1	5'-GCTAGCGAATTCCACCATGGCACCCAATG-3'
	F2	5'-TCTGCACAGCCTCCATTC-3'
	F3	5'-AGGCCAAGAGGAT CG ATCACATTAGCTC-3'
Anti-sentido	R1	5'-CTAATGTGATCGAT C CTCTTGGCCTGATC-3'
	BGHR	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
	pCIneoR	3'-GTCTGCTCGAAGCATTAACC-3'

En rojo se indican los nucleótidos modificados.

Los oligonucleótidos F1 y BGH_R hibridan cerca de sitios de restricción por las endonucleasas EcoRI y XbaI, respectivamente, y ambos son sitios únicos en toda la secuencia del plásmido pCI-neo-hH2R_{WT} generado, lo que permite la sustitución dirigida del fragmento mutado (Figura 7). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por T4 Oligo (Irapuato, Gto., México).

Empleando la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), se amplificaron tres fragmentos usando como molde la secuencia codificante del hH2R_{WT} clonado en el vector pCDNA3.1: F1-BGHR, F1-R1 y F3-BGHR, respectivamente. Cada una de las reacciones tuvo un volumen de 50 μ L, con el regulador de polimerasa de ADN Q5 1 \times , potenciador de Q5 1 \times , y enzima ADN polimerasa de alta fidelidad Q5 (1 U) (todos los reactivos fueron de New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), dNTPs (0.2 mM de cada uno; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.4 μ M de cada oligonucleótido empleado y 50 ng/ μ L de la secuencia molde.

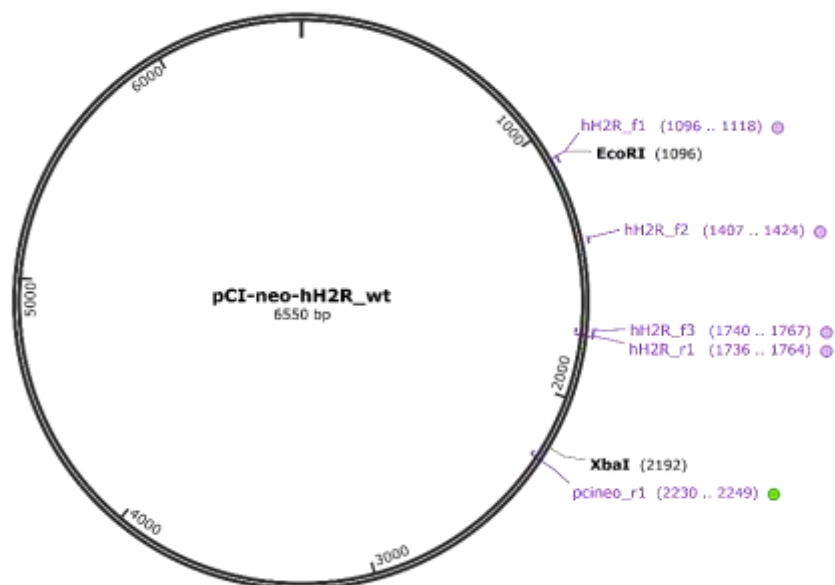


Figura 7. Representación de la estructura del plásmido y sitios de hibridación para la obtención de la mutación N217D.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: a) desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min; b) 20 ciclos de una fase de desnaturalización a la misma temperatura, esta vez durante 45 s; c) hibridación a 55 °C durante 30 s; d) una fase de elongación a 72 °C durante

30 s; e) por último, una fase de extensión a 72 °C por 5 min. Para confirmar que los amplicones fueran los esperados, los productos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TBE (Tris/Borato/EDTA; 0.75×) teñidos con bromuro de etidio (0.2 µg/mL) adicionado al momento de preparar el gel.

Posteriormente los fragmentos fueron escindidos del gel de agarosa y purificados con el kit *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific). Los productos purificados se digirieron empleando las siguientes enzimas de restricción EcoRI (10 U), XbaI (10 U) y ClaI (10 U), así como rCutSmart (1 ×) y 40 ng del amplificado EcoRI-ClaI, 76 ng del amplificado ClaI-XbaI y 52 ng del amplificado EcoRI-XbaI, a 37 °C y un volumen final de 50 µL (New England Biolabs) (ver Tabla 3) para su posterior ligación.

Subclonación de los fragmentos F1-BGHR, F1-R1 y F3-BGHR en el vector pCI-neo.

Antes de la reacción de ligación los fragmentos se digirieron con las endonucleasas EcoRI-HF (10 U) y XbaI (10 U), ambas de New England Biolabs, utilizando el regulador rCutSmart (1×), el vector pCI-neo (3000 ng) (*pCI-neo Mammalian expression vector*; Promega, Madison, WI, USA) y fosfatasa alcalina (1 U, adicionada 1 h después).

Los fragmentos de restricción se resolvieron en un gel de agarosa al 1%, con amortiguador TBE y fueron teñidos con SYBR Gold (1:6000) (Thermo Fisher Scientific). Los fragmentos del tamaño esperado se purificaron por el método de columna (*GeneJET Gel Extraction Kit*), para eliminar el regulador adicionado que puede interferir con la ligación de los fragmentos. El producto de la purificación se corrió en un gel de agarosa al 1.0% con las especificaciones mencionadas anteriormente, para comprobar su integridad. La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 20 µL, utilizándose el regulador ligasa del fago T4 (1 ×), ligasa del fago T4 (2.5 U), y 150 ng de ADN total en una relación molar de 3:1 (inserto: vector). Como resultado se obtuvieron los plásmidos pCI-neo-hH₂R_{WT} y pCI-neo-Hh₂R_{N217D}.

La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, y se utilizó para transformar bacterias *E. coli* competentes (cepa DH5α, 50 µL de bacterias y 5 µL del producto de ligación). Se incubó durante 30 min en baño hielo-agua, antes de un choque térmico durante 45 s a 42 °C, para después transferir nuevamente al baño hielo-agua durante 2 min. Se agregaron 200 µL de medio Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37 °C con agitación durante 1 h. Finalmente la suspensión bacteriana (100 µL) se sembró en placas de agar/LB

conteniendo ampicilina (75 µg/mL) para la selección de colonias transformadas, incubando a 37 °C durante ~16 h.

Se seleccionaron 4 colonias bacterianas de los receptores nativo y mutado, las cuales se inocularon en 5 mL de medio LB con ampicilina (75 µg/mL) y se incubaron a 37 °C con agitación vigorosa durante 16 h. Posteriormente se obtuvo el ADN plasmídico empleando el *Pure Yield® Plasmid Midiprep System* (Promega). La identidad de los plásmidos purificados se realizó por el tamizaje por digestión con las endonucleasas KpnI, NgoMIV y por último ClaI; para esta última enzima se amplificó la secuencia del receptor empleando las condiciones de PCR descritas anteriormente, además de los oligonucleótidos F2 y pcineo_r1. Las tres enzimas fueron de New England Biolabs; cada digestión (1 h, 37 °C) tuvo un volumen final de 10 µL y contuvo CutSmart® (1 µL, amortiguador adecuado para cada enzima; New England Biolabs), albúmina sérica bovina, BSA, 1 µL (New England Biolabs) y ADN purificado (1.5 µL), a fin de evaluar la presencia de la mutación puntual en los receptores mutados y su ausencia en los receptores silvestres. Los receptores fueron secuenciados por el Laboratorio de Secuenciación del Instituto de Biología, UNAM.

Cultivo celular

Se emplearon células CHO-K1, que no expresan al H₂R (https://tumor-gene.org/cgi-bin/GPCR/by_cell_line.cgi). Las células se mantuvieron a 37 °C en medio DMEM/F12 adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) y 1% de una solución con antibióticos y antimicótico (penicilina 10,000 U/mL, estreptomycin 10 mg/mL y fungizona 25 µg/mL, Gibco Life Technologies) en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire saturado de humedad.

Transfección estable de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}.

Las células se cultivaron en cajas de 9.6 cm² y al alcanzar una confluencia del 70-80% la transfección se realizó con los plásmidos pCI-neo-hH₂R_{WT} o pCI-neo-Hh₂R_{N217D} empleando Lipofectamina 3000, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA), con una relación 1 µg DNA: 3 µL Lipofectamina.

Después de 42 h en medio DMEM/F12 suplementado, éste se substituyó por medio de selección (DMEM/F12 con 10% de SFB y geneticina, G418, 600 µg/mL (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) el cual se renovó cada 48–72 h por 4 semanas.

Posteriormente, las células se mantuvieron en medio con 250 µg/mL de G418 en medio DMEM/F12 con 10% de SFB.

Evaluación por *Western blot* de la expresión de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}.

Al alcanzar una confluencia celular de 90-100% se adicionaron 600 µL de una solución de RIPA (Tris 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.2%, Triton X-100 1% y glicerol 0.1%, pH 8.0) y el inhibidor de proteasas cOmplete™ 50 × (1:50) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Después de 30 min sobre hielo, se rasparon las cajas y el volumen obtenido se colocó en tubos Eppendorf. El extracto se sonicó durante 14 s a una amplitud de 40% (8 kHz, 100% 20 kHz y 130W), se centrifugó a 15,000 ×g (4 °C) por 10 min y se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante con el ensayo de BCA (Thermo Fisher Scientific).

En un gel de acrilamida al 10% se cargaron 25 µg de proteína, y se separaron a 80–100 V durante 40 min, antes de cambiar el voltaje a 120 V por 105 min. Posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PDVF) de manera semihúmeda fijando el amperaje a 0.239 A (para 1 membrana) por 40 min.

Se incubó la membrana por 1 h con solución de bloqueo al 5% (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) y posteriormente por 16 h a 4 °C con el anticuerpo primario policlonal contra el H₂R (Abcam, ab215992 o Sigma-Aldrich, HPA013770; en ambos casos el fabricante no proporciona la secuencia del epitopo reconocido por el anticuerpo) a una dilución 1:2,000 en solución TBS-Tween con BSA al 3%. Después de tres lavados con TBS-Tween, se incubó con el anticuerpo secundario anti-Ig de conejo (1:10,000; Sigma-Aldrich, A0545) durante 1 h a 25 °C. Las membranas se enjuagaron con TBS-Tween y se revelaron con quimioluminiscencia. La señal se cuantificó por análisis de densitometría con el programa ImageJ (NIH, *National Institute of Health*), empleando el equipo C-DiGit Blot Scanner LICOR.

Evaluación por *Western blot* de la señalización de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} en la fosforilación de proteínas por PKA en células CHO-K1 transfectadas.

Se sembraron células en cajas de 6 pozos de cada grupo experimental, se incubaron 16 h con medio DMEM/F12 sin suplementar, a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire. Posteriormente, se aspiró el medio, se enjuagó cada pozo con 1 mL de solución Krebs-

Ringer-HEPES (KRH), se adicionaron 250 μ L de la solución KRH y 1 mM de IBMX (3-isobutil-1-mentilxantina) y se incubó por 15 min a 37 °C. Se adicionó amtamina (agonista selectivo de los H₂Rs; Coruzzi, 1993) a una concentración final de 10 μ M, en un curso temporal de 2.5, 5, 10, 15 y 30 min. La composición de la solución KRH fue: NaCl 130 mM, HEPES 20 mM, glucosa 11 mM, KCl 3.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1.18 mM, K₂HPO₄ 1.8 mM, pH 7.4 con NaOH.

Transcurrido cada tiempo indicado, la reacción fue detenida aspirando el medio y agregando con 200 μ L de una solución de RIPA y cOmplete (1:50), y los extractos proteicos fueron obtenidos como se indicó previamente. En un gel de acrilamida al 10% se cargaron 15 μ g de proteína y se separaron a 100 V durante 40 min, antes de cambiar el voltaje a 120 V por 105 min. Posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas PDVF de manera húmeda fijando el amperaje a 0.239 A (para 1 membrana) por 70 min.

Se incubó la membrana por 1 h con solución de bloqueo al 5%, y posteriormente por 16 h a 4 °C con el anticuerpo primario policlonal contra una de las secuencias de fosforilación por la PKA (Cell Signaling Technology, 100G7E; secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo RRXS*/T*) a una dilución 1:10,000 en solución TBS-Tween con BSA al 3%. Después de tres lavados, se incubó con el anticuerpo secundario anti-Ig de conejo (1:10,000) durante 1 h a 25 °C. Las membranas se enjuagaron con TBS-Tween y se revelaron con quimioluminiscencia. La señal se cuantificó empleando el equipo C-DiGit Blot Scanner LICOR y se analizó por densitometría con el programa ImageJ (NIH, *National Institute of Health*).

Para normalizar los resultados con base en la cantidad de proteína cargada, se eliminaron los anticuerpos de las membranas con una solución de ácido acético al 10% durante 30 min, se enjuagaron con agua, se bloquearon las membranas nuevamente y se incubaron 16 h con el anticuerpo primario policlonal contra GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc., No. cs-32233) en una dilución 1:5,000 en solución TBS-Tween con BSA al 3%, posteriormente se lavaron y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-Ig de cabra (1:10,000). Se enjuagaron las membranas y se revelaron con el método descrito anteriormente.

Determinación de AMPc endógeno por el ensayo de competición con [³H]-AMPc.

El ensayo se basa en la competición entre una concentración conocida de [³H]-AMPc y el AMPc presente en un extracto celular por la unión a las subunidades reguladoras de la PKA presentes en un extracto de las suprarrenales de bovino.

Se cultivaron células en cajas de 24 pozos y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire hasta alcanzar una confluencia de 90%. Posteriormente se aspiró el medio, se enjuagó cada pozo con 1 mL de solución KRH, se adicionaron 240 µL de la misma solución conteniendo 1 mM de IBMX y se incubó por 15 min a 37 °C. Se adicionaron 11 µL de H₂O (basal) o de una solución de amfetamina o forskolina, que activa a las AC estimulando directamente la formación de AMPc. Se incubó por 30 min a 37 °C y se detuvo la reacción aspirando la solución de cada pozo y adicionando 250 µL de HCl 0.1 N frío. Las cajas se colocaron sobre hielo por 15 min antes de adicionar 30 µL de NaOH 1 N y 100 µL de Tris-HCl 1 M (pH 7.0).

Se centrifugaron las cajas a 1,800 × g (2,873 rpm; centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST40) durante 10 min a 4 °C, se tomaron 50 µL del sobrenadante que se colocaron en un tubo al que se le agregaron 25 µL de solución de incubación (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mg/mL de BSA, pH 7.0) conteniendo el extracto proteico de las suprarrenales de bovino y 50 µL de una solución de [³H]-AMPc en solución de incubación. Para la determinación de la unión total de [³H]-AMPc total se colocaron en un tubo 50 µL de la solución de [³H]-AMPc, 25 µL de solución con el extracto de la PKA y 50 µL de solución de incubación con BSA. Para la determinación de la unión no específica se colocaron en un vial 50 µL de la solución de [³H]-AMPc, 25 µL de solución con el extracto de la PKA, 12.5 µL de AMPc no marcado (1 mM) y 37.5 µL de solución de incubación.

Las muestras se incubaron en hielo-agua durante 2.5 h, y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B, previamente remojados por 2 h en una solución al 0.3% de polietiliminina (PEI). Los filtros se colocaron en viales de plástico, se agregaron 3 mL de líquido de centelleo y el contenido de tritio fue determinado por centellometría. La cantidad de AMPc formado se calculó empleando una curva estándar de AMPc (10⁻¹²–10⁻⁶ M) y se expresó en pmol/pozo.

Determinación de AMPc endógeno utilizando el biosensor GloSensor.

Se sembraron células en cajas de 100 mm de diámetro y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire hasta alcanzar una confluencia de 90–95%. Posteriormente se tripsinizaron, se centrifugaron a 1,000 rpm (100 × g) por 5 min, se aspiró el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 1 mL de medio suplementado. Se tomaron 5 µL de la suspensión para realizar el conteo celular, se sembraron 2.5 millones de células por caja y se incubaron por 16 h. Se aspiró el medio y se adicionaron 1.8 mL de medio sin suplementar, 200 µL del complejo DNA-lipofectamina 3000 (1:2) (Tabla 6) previamente incubado por 15 min, y se incubó por 6 h a 37 °C.

Tabla 6. Preparación del complejo DNA-lipofectamina 3000

Reactivo	Volumen (µL) *
Enhancer	20
Lipofectamina 3000	30
DNA	64
Medio sin suplementar	736

*Volumen para 4 cajas.

Se finalizó la transfección aspirando el medio con el complejo DNA-Llipofectamina 3000 y adicionando 10 mL de medio suplementado. Después de 48 h se aspiró el medio, se tripsinizaron las células y se obtuvo una pastilla como se describió anteriormente, la cual fue resuspendida en 1 mL de solución KRH. Nuevamente se contaron las células y se ajustó el volumen de KRH para obtener una densidad de 2.5 millones de células/mL.

En una caja de 96 pozos con fondo blanco, se adicionaron 40 µL de la suspensión celular en cada pozo, 40 µL de la solución de equilibrio (solución KRH conteniendo 10 % de SFB y 2.5% de solución stock de GloSensor), y se incubó por 105 min en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 10 µL de solución KRH conteniendo 10 mM de IBMX y se

incubó por 15 min. La solución stock de GloSensor se encuentra constituida por 25 mg del reactivo de GloSensor diluïdos en 817 μ L de solución amortiguadora HEPES.

Finalmente, se adicionaron 10 μ L de una solución conteniendo amtamina (concentración final 10 μ M) o forskolina (concentración final 10 μ M) e inmediatamente se determinó la luminiscencia (30 s) e un lector de placas y la determinación continuó cada 5 min por 1 h (Figura 7).

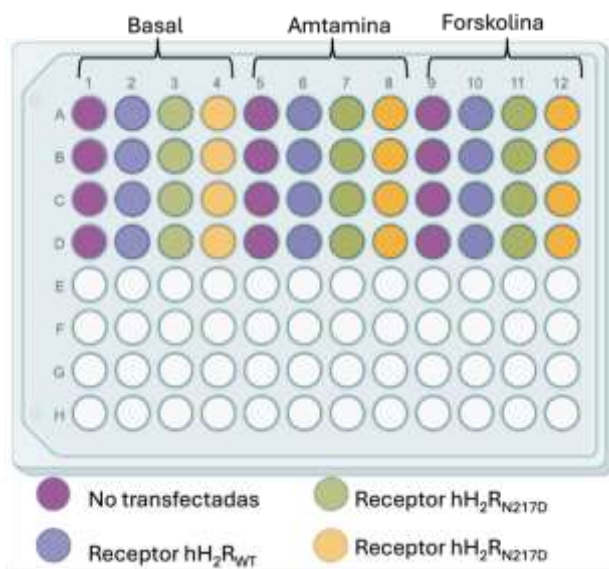


Figura 7. Arreglo de los grupos experimentales y los fármacos adicionados en la placa de 96 pozos.

Obtención de membranas plasmáticas y nucleares a partir de tejido cerebral y células transfectadas.

Animales. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (NIH No. 80-23, revisado en 1978) y a la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, No. 94-14). Se utilizaron ratas Wistar (230-300 g) sin distinción de sexo, las cuales se mantuvieron en condiciones de temperatura constante

(22 ± 2 °C), ciclo luz: oscuridad de 12:12 h y 20 humedad relativa de 40%, así como agua y alimento *ad libitum*.

Obtención de membranas plasmáticas de tejido cerebral. Se utilizaron el globo pálido, el neocórtex y la corteza cerebral. El tejido se homogenizó en solución Tris-HCl 10 mM y EDTA 5 mM a pH 7.0. Los homogenizados se centrifugaron a $15,000 \times g$ durante 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante (membranas celulares) y se centrifugó a $32,000 \times g$ por 25 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en la solución previamente preparada. Se volvió a centrifugar a $32,000 \times g$ por 25 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en solución amortiguadora de lisis RIPA con inhibidores de proteasas en una proporción 1:100 (Sigma, Cat. No. P8340).

Para las células transfectadas, se adicionaron 600 μ L de la solución de lisis a las cajas de 100 mm con una confluencia del 90%, se sonicaron las muestras y se centrifugaron a $720 \times g$ por 5 min. Para la obtención de membranas plasmáticas el sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se centrifugó a $10,000 \times g$ durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a $100,000 \times g$ durante 1 h, se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en la solución amortiguadora de lisis.

Para la obtención de membranas nucleares se resuspendió la pastilla obtenida de la centrifugación a $720 \times g$ con solución amortiguadora de lisis y se centrifugó nuevamente a $720 \times g$, se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en solución RIPA.

En los tres casos se determinó la concentración de proteínas, siguiendo el protocolo descrito previamente.

Identificación de la expresión de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} mediante inmunofluorescencia.

Se sembraron células en cajas de 100 mm de diámetro, y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire hasta alcanzar una confluencia de 90–95%.

Se cubrieron cubreobjetos con poli-Lisina y se incubaron 24 h; posteriormente se lavaron tres veces con PBS estéril y se dejaron secar por 10–15 min. Una vez suspendidas, 25 μ L de la suspensión celular se colocaron en los cubreobjetos y se incubó a temperatura ambiente por

10 min; se lavaron los pozos con 400 μ L de medio sin suplementar y se adicionaron 400–500 μ L de medio suplementado. Se incubaron los cubreobjetos a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire hasta alcanzar una confluencia de 70–80%.

Para la fijación se empleó paraformaldehído al 2%; se adicionaron 400 μ L a cada pozo y se incubó por 10 min a 4° C, y posteriormente se lavó tres veces con PBS estéril. Para la permeabilización se adicionaron 400 μ L de solución amortiguadora de bloqueo a cada pozo (PBS 1 \times , 0.3 M de glicina, 5% de suero fetal bovino y 0.001% de digitonina al 0.5%). Se incubó 1 h a temperatura ambiente, se aspiró y se enjuagó con PBS no estéril.

Los cubreobjetos fueron incubados con el anticuerpo primario contra el H₂R (1:250, Sigma-Aldrich; HPA013770, el fabricante no proporciona el epítipo reconocido por el anticuerpo) durante 16 h a 4 °C. Se enjuagó con PBS no estéril y se incubó 2 h con Alexa Fluor 555 (1:750, Thermo Fisher, No. A-21428); se enjuagó con PBS no estéril y se incubó 10 min con Hoechst 33342 (1:1000; Santa Cruz, 23491-52-3). Los cubreobjetos fueron montados con Vectashield en portaobjetos y fueron observadas utilizando un microscopio confocal Leica SP8 (Leica; Wetzlar, Alemania).

VI. Resultados

Evaluación de la integridad de la secuencia del cDNA del hH₂R_{WT}.

El plásmido pcDNA3.1-hH₂R_{WT} se digirió el plásmido con las endonucleasas BamHI+XhoI o KpnI+XhoI, obteniéndose una banda de 1,089 pb y tres bandas de 394, 519 y 184 pb, respectivamente, además de la banda correspondiente al vector de 5.4 kpb (figura 8). Este patrón confirmó la integridad del fragmento de ADNc insertado en el plásmido pcDNA3.1.

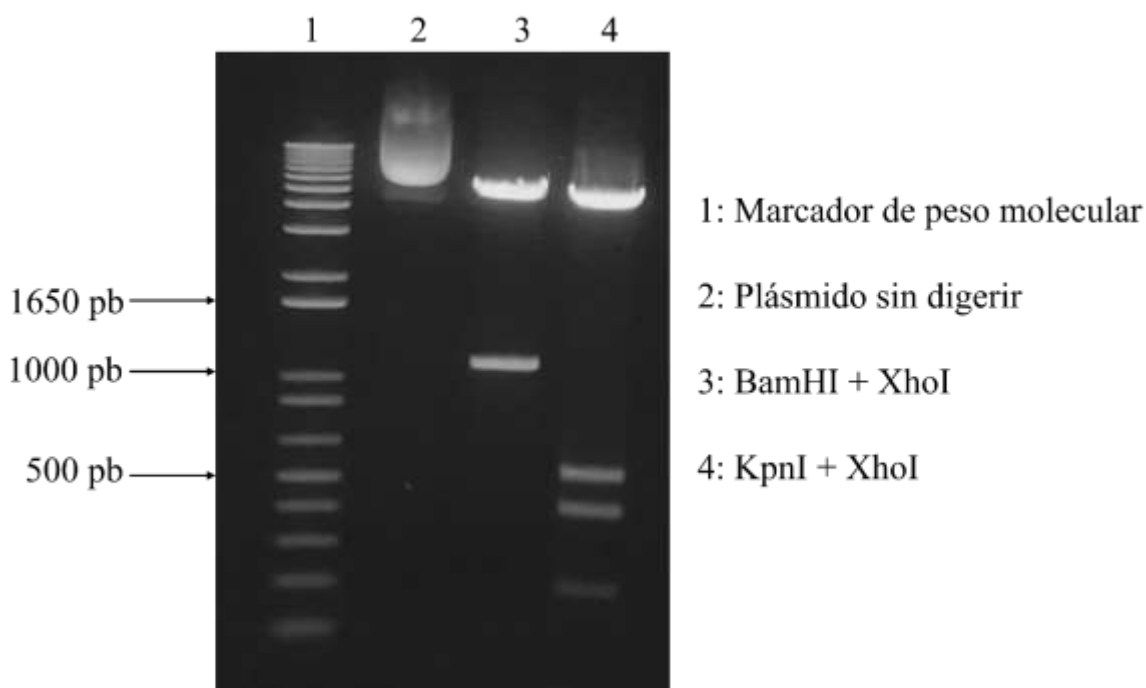


Figura 8. Evaluación de la integridad de la longitud del ADNc del hH₂R_{WT}. El plásmido pcDNA3.1-hH₂R_{WT} se digirió con las endonucleasas BamHI+XhoI o KpnI+XhoI y los productos fueron analizados por electroforesis. pb: pares de bases.

Obtención de la mutación puntual N217D en el hH₂R.

Utilizando los oligonucleótidos F1-BGHr se amplificó la secuencia nativa del receptor (hH₂R_{WT}), generando una banda de 1151 pb, mientras que los oligonucleótidos F1-r1 y F3-BGHr se emplearon para introducir la mutación (hH₂R_{N217D}) en la secuencia del receptor. Al amplificar estos fragmentos se obtuvieron bandas de 675 pb y 501 pb, respectivamente. La amplificación de los fragmentos se realizó utilizando el plásmido pcDNA3.1-hH₂R_{WT} (ver

Figura 9). Posteriormente los fragmentos fueron ligados al plásmido pCI-neo (debido a la eficacia de transfección del mismo), de tal manera que se obtuvieron dos plásmidos: pCI-neo-hH₂R_{WT} y pCI-neo-hH₂R_{N217D}.

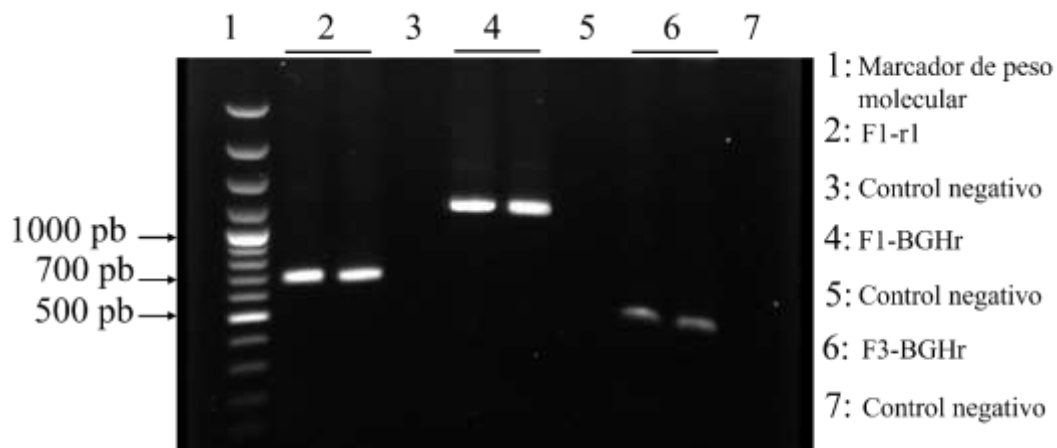


Figura 9. Amplificación de fragmentos e introducción de la mutación N217D. Se amplificó la secuencia del hH₂R_{WT} y dos fragmentos del hH₂R_{N217D} que permitieron obtener la secuencia mutada del receptor, utilizando los oligonucleótidos diseñados. pb: pares de bases.

Posteriormente, los plásmidos pCI-neo-hH₂R_{WT} y pCI-neo-hH₂R_{N217D} se digirieron con la enzima de restricción ClaI, generando un fragmento de 843 y dos fragmentos de 344 y 499 pb (ver Figura 10). Los fragmentos obtenidos fueron los esperados dado que el hH₂R_{WT} no posee sitios de escisión para la enzima, mientras que en el hH₂R_{N217D} existe un único sitio de escisión. Este resultado permitió identificar preliminarmente la presencia de la mutación.

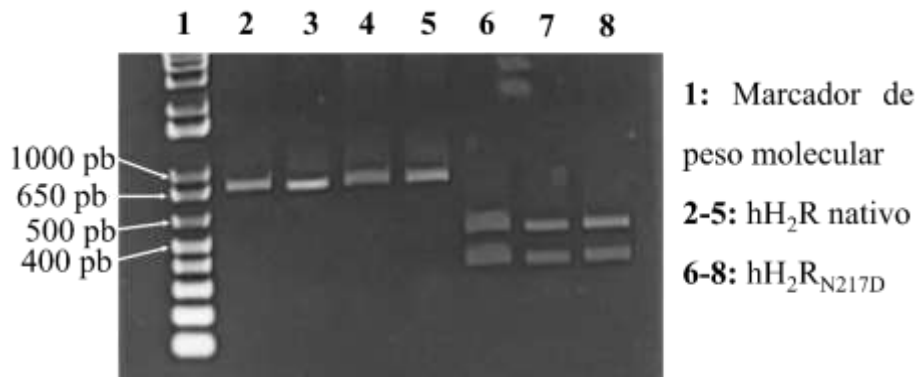


Figura 10. Evaluación de la mutación N217D en el hH₂R. Los amplicones obtenidos (hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}) fueron digeridos con la endonucleasa ClaI y los productos fueron analizados por electroforesis. Las muestras se corrieron por duplicado exceptuando la muestra 6. pb: pares de bases.

Evaluación de la mutación puntual N217D mediante secuenciación.

Muestras de los plásmidos nativo y mutado fueron sometidos a secuenciación tipo Sanger. Con las secuencias obtenidas se confirmó la presencia de la mutación A649G en los fragmentos amplificados de los hH₂R_{N217D} analizados, así como su ausencia en los fragmentos del hH₂R_{WT}. Además, se confirmó la integridad y que la identidad de la secuencia insertada en el plásmido pCI-neo corresponde al hH₂R (Figura 11).

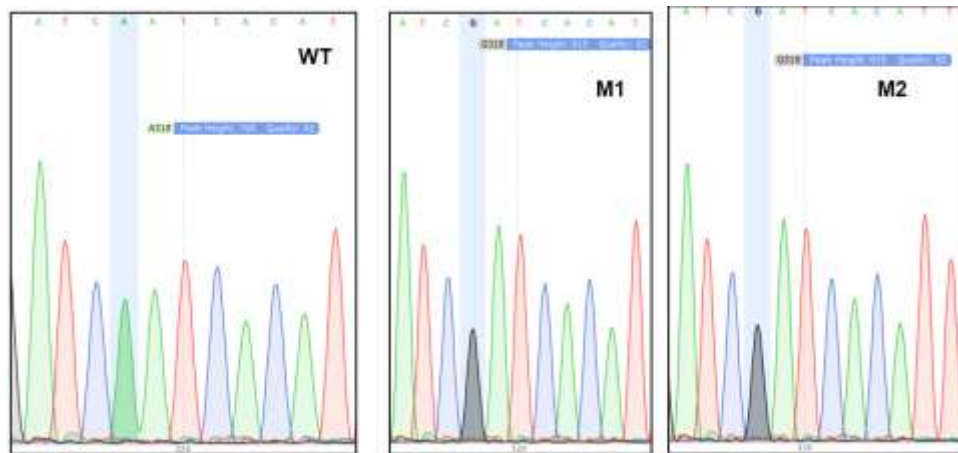


Figura 11. Electroferogramas de fragmentos amplificados del hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}. Se analizó una muestra correspondiente al hH₂R_{WT} (WT) y dos muestras del hH₂R_{N217D} (M1 y M2), en los tres casos la calidad obtenida es la deseada (superior a 50, es decir una probabilidad de error de 1 en 100,000 bases).

Para asegurar la presencia de la mutación en el nucleótido de interés, los fragmentos obtenidos se alinearon y se compararon con las secuencias del hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}. Como puede observarse en la Figura 12, todos los fragmentos mantienen la identidad en la secuencia exceptuando el nucleótido nativo (Adenina) 649 respecto al mutado (Guanina).



Figura 12. Alineación de las secuencias obtenidas con la secuencia original del hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}. En A se comparan los fragmentos obtenidos del receptor mutado y la secuencia nativa del receptor, en B se compara la secuencia mutada del receptor con los fragmentos mutados, y en C se compara la secuencia del receptor nativo con los fragmentos nativos. En rojo y amarillo se marca el nucleótido de interés.

Evaluación por *Western blot* de la expresión de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} en la membrana citoplasmática de células CHO-K1 transfectadas.

La expresión heteróloga de proteínas permite introducir un gen que codifica una proteína de interés de una especie a una célula de otra especie, y con ello la expresión de la proteína exógena. Empleando esta técnica se pueden estudiar proteínas expresadas en células difíciles de cultivar o que tienen un nivel bajo de expresión endógeno (Flores-Clemente, 2017; Nieto-Alamilla, 2018).

Por lo anterior, se transfectaron células CHO-K1 con el hH₂R_{WT}, y se evaluó la expresión proteica del receptor empleando un anticuerpo contra el hH₂R (Abcam, ab215992). Como se muestra en la Figura 13, el anticuerpo detectó tres bandas donde la más intensa tendría en una masa molar aparente > 100 kDa, que no corresponde con la esperada para el hH₂R

(40.1 kDa). Además, la misma banda fue detectada en el control negativo (células no transfectadas), por lo que se infiere inespecificidad del anticuerpo.

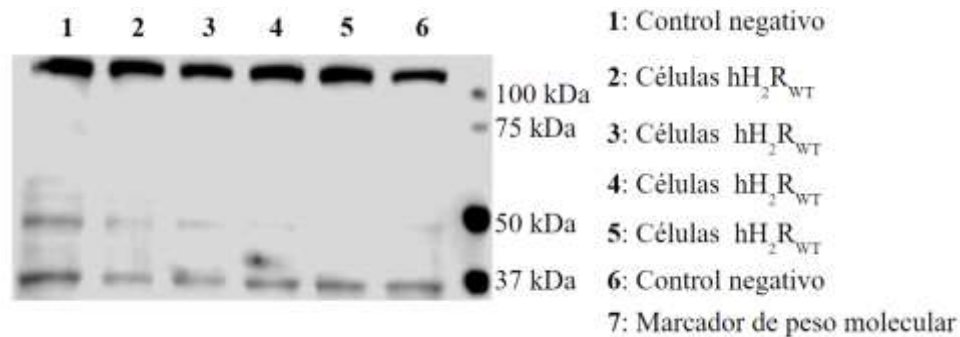


Figura 13. Evaluación de la expresión del hH₂R en células transfectadas y no transfectadas. Las bandas más intensas que se observan no corresponden a la masa molar esperada de la proteína del hH₂R, además de ser detectadas en el control negativo (células no transfectadas). kDa: kilo Daltons.

Posteriormente, se obtuvieron membranas citoplasmáticas y nucleares de células transfectadas y no transfectadas, con la finalidad de eliminar proteínas que el anticuerpo estuviera detectando de manera inespecífica, así como muestras de tejido cerebral de rata (corteza cerebral, globo pálido y neostriado) como controles positivos, ya que son las áreas del cerebro con mayor expresión del hH₂R (Karlstedt *et al.*, 2001). Sin embargo, en las muestras de membranas celulares sólo se obtuvo una banda con una masa molar aparente > 100 kDa, mientras que en las muestras de tejido se obtuvieron bandas de ~90, ~60 y 50 kDa (Figura 14).

Se adquirió un nuevo anticuerpo (Sigma-Aldrich, HPA013770), y se repitieron los ensayos de *Western blot* utilizando proteína total, obteniéndose una banda > 50 kDa e inferior a los 75 kDa (ver Figura 15). A pesar de ser una masa molar mayor a la esperada, existen anticuerpos contra el hH₂R validados para *Western blot*, Abcam ab108540 y Alomone Laboratories AHR-002, que identifican al receptor entre esas masas molares.

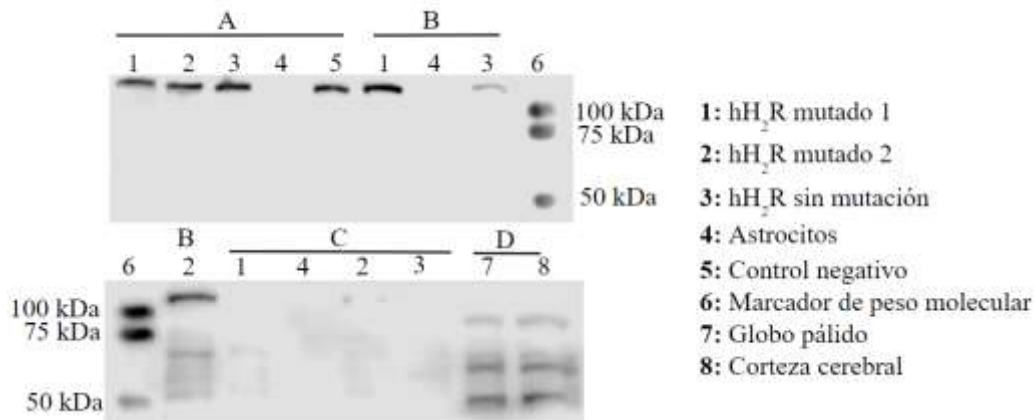


Figura 14. Evaluación de la expresión del H₂R en membranas citoplasmáticas y nucleares de células CHO-K1 (nativas y transfectadas) y tejido cerebral de rata. Se evaluaron tres grupos de células, dos transfectadas con hH₂R_{WT} o hH₂R_{N217D} y células sin transfectar, de las cuales se obtuvieron: A) Membranas totales, B) Membranas nucleares y C) Membranas citoplasmáticas. Como control positivo se utilizó tejido cerebral de rata. kDa: kilo daltones.

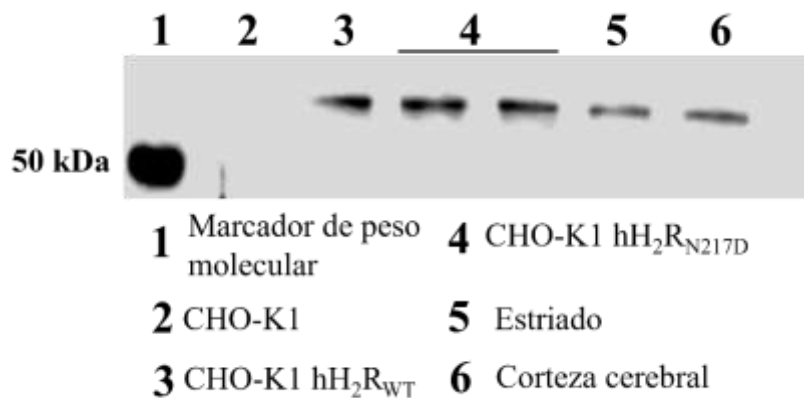


Figura 15. Evaluación de la expresión del hH₂R en células transfectadas y no transfectadas. Las bandas observadas se ubican en una masa molar > 50 kDa e inferior a los 75 kDa. Se empleó proteína total. kDa: kilo daltones.

Determinación de la expresión del receptor hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} por inmunofluorescencia.

En células transfectadas se evaluó la expresión de los receptores mediante inmunofluorescencia, obteniéndose que las células no transfectadas carecen de señal inmunofluorescente lo que indica la ausencia de la expresión del H₂R, consistente con los resultados obtenidos en el *Western blot*. En contraste, en las células transfectadas con hH₂R_{WT} o con hH₂R_{N217D} se observa señal inmunofluorescente localizada principalmente en la membrana citoplasmática (señal en rojo, ver Figura 16). Es importante mencionar que en las células transfectadas se observan células sin señal del anticuerpo contra el hH₂R, lo que puede deberse a la eficiencia de expresión del receptor transfectado. A pesar de esto último, se pudo confirmar la expresión de los receptores transfectados en las células CHO-K1. Posteriormente se evaluó mediante ensayos funcionales las posibles diferencias en la señalización del hH₂R_{WT} y el hH₂R_{N217D}.

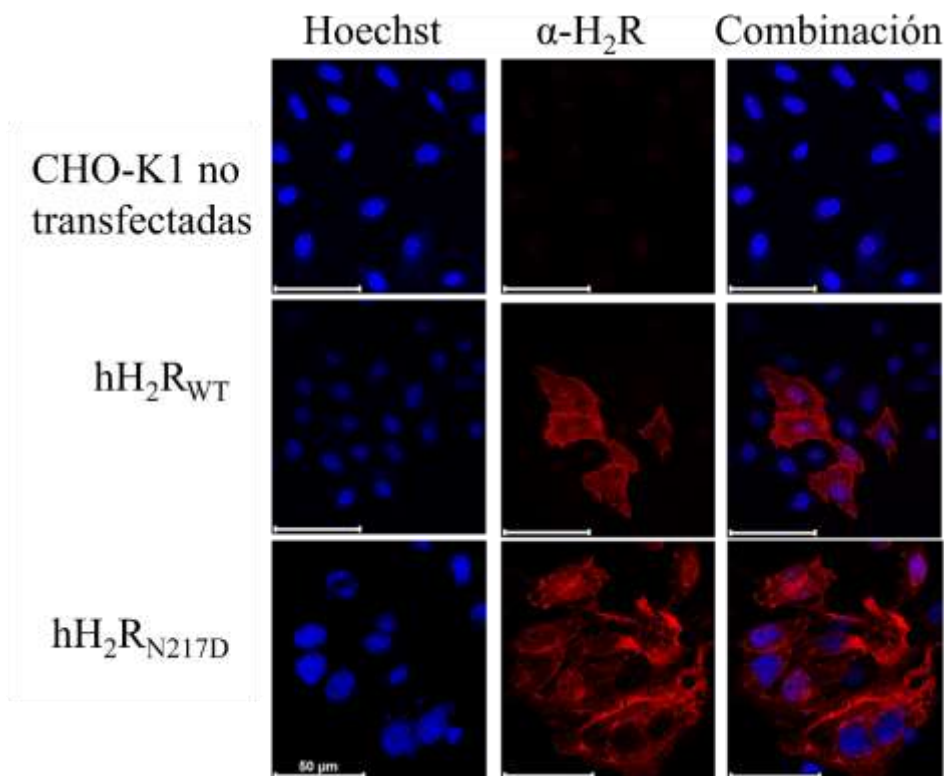


Figura 16. Inmunorreactividad del anticuerpo α -hH₂R en células CHO-K1 transfectadas y no transfectadas. Imágenes de inmunofluorescencia representativas; los núcleos fueron marcados con Hoechst (azul) y la señal del anticuerpo α -hH₂R se muestra en color rojo. Escala, 50 μ m.

Evaluación por *Western blot* de la señalización de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} en la fosforilación de proteínas por PKA en células CHO-K1 transfectadas.

Se transfectaron células CHO-K1 con el hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} para evaluar el efecto de la activación de los receptores en la fosforilación de proteínas por la PKA, empleando un anticuerpo que reconoce la secuencia de fosforilación RRXS/T. La Figura 17 muestra el curso temporal de la fosforilación de proteínas por PKA tras la activación de los receptores con amtamina.

El patrón de bandas obtenido es similar en las células transfectadas y no transfectadas exceptuando la banda de ~25 kDa, que únicamente se observa en las células con hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}; además, en éstas últimas se observa con mayor intensidad (Figura 17).

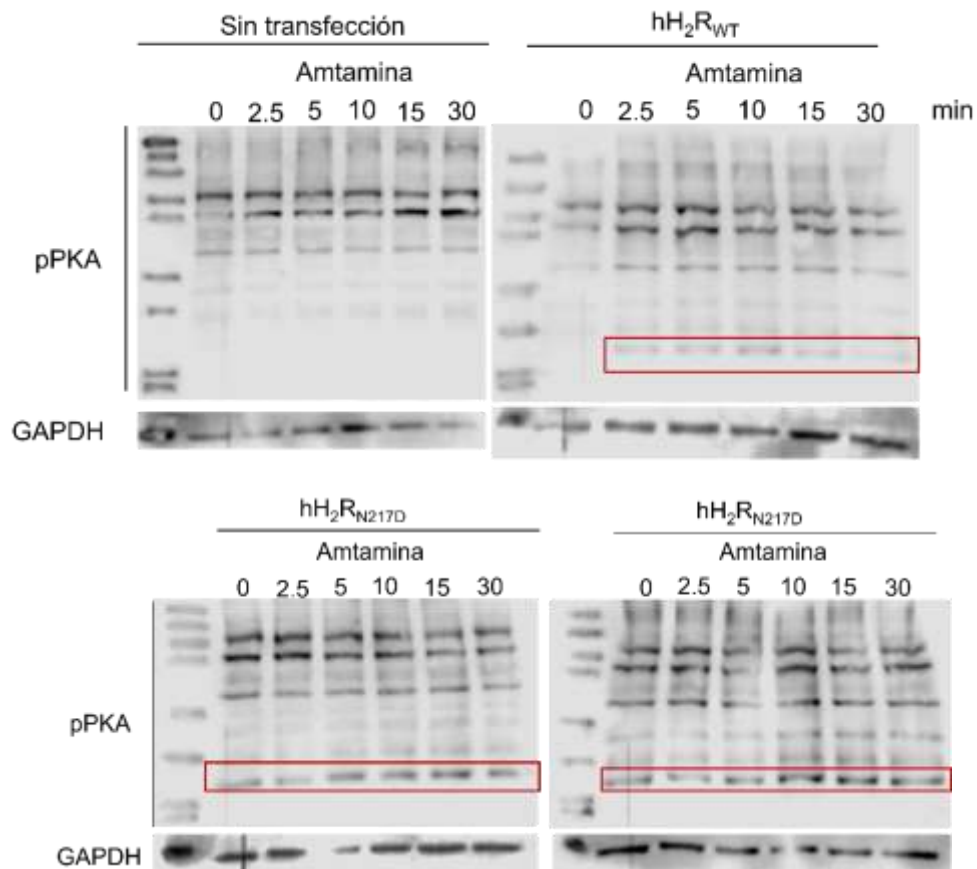


Figura 17. Evaluación de la señalización de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} en la fosforilación de proteínas por la PKA. Imágenes representativas de la inmunodetección de las proteínas fosforiladas por la PKA en la secuencia de fosforilación RRXS/T, indicadas como pPKA. Como control de carga se empleó la proteína GAPDH.

Determinación de AMPc endógeno con el ensayo de GloSensor.

Dado que los H₂R se acoplan a proteínas G_{αs}, su activación induce la producción de AMPc por las AC. Por lo tanto, para evaluar si la mutación N217D modifica la señalización del receptor, se determinó la acumulación de AMPc endógeno con el ensayo de GloSensor. La Figura 18 muestra que en las células no transfectadas (NT) la amfetamina (10 μM), agonista selectivo del H₂R, no indujo acumulación de AMPc, resultado esperado ya que las células CHO-K1 no expresan endógenamente al H₂R.

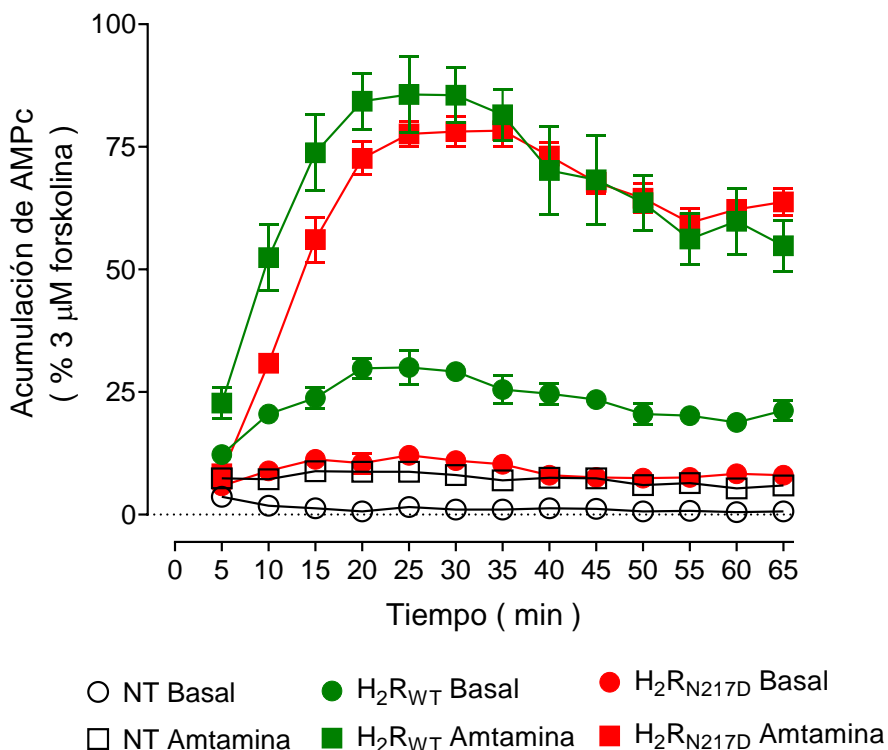


Figura 18. Determinación de AMPc endógeno en células no transfectadas y transfectadas con los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}. Se muestra un ensayo representativo; los valores son la media ± SEM de 4 replicados. El ensayo se repitió 3 veces con resultados similares.

En contraste, en las células transfectadas con los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} la amfetamina estimuló la acumulación de AMPc, con un pico entre los 20–30 min, sin advertirse diferencias entre ambos receptores. No obstante, se apreció una diferencia en la actividad basal entre los receptores con el hH₂R_{N217D} con una actividad basal similar a la observada

para las células no transfectadas, y una mayor acumulación basal de AMPc para el receptor nativo.

Se comparó la acumulación basal de AMPc obtenida a los 30 min de incubación en presencia de amfetamina. Debido a la falta de datos (solo 2 determinaciones), no fue posible comparar la acumulación entre las células NT y las células transfectadas con el receptor hH₂R_{WT}. Sin embargo, al realizar la comparación entre las células transfectadas ya sea con el receptor hH₂R_{N217D} o con el hH₂R_{WT} se observó una disminución significativa en la acumulación de AMPc inducida por la activación del receptor hH₂R_{N217D} respecto a la acumulación obtenida con el receptor hH₂R_{WT} (Figura 19). Esto último sugiere una menor actividad constitutiva del receptor, es decir la activación espontánea en la ausencia de un agonista, ocasionado posiblemente por la mutación N217D.

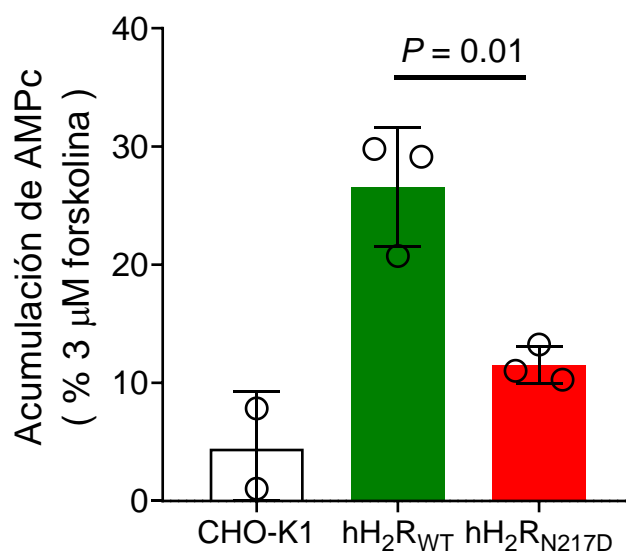


Figura 19. Acumulación basal de AMPc en células no transfectadas y transfectadas con los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}. Se comparó la acumulación basal de AMPc al minuto 30 del curso temporal mostrado en la figura 18. Los valores son la media ± rango (CHO-K1) o la media ± SEM (células transfectadas) del número de determinaciones indicadas por los círculos vacíos, con 3 replicados en cada experimento. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

Curva concentración-respuesta para el agonista amtamina.

Por último, utilizando el ensayo de unión de [³H]-AMPc, se obtuvieron curvas concentración-respuesta para la amtamina incubando las células por 30 min con el agonista (0.1 nM a 10 μM). La Figura 20 muestra que el agonista indujo una acumulación de AMPc dependiente de la concentración.

Como se muestra en el panel A, el receptor hH₂R_{WT} tuvo un efecto máximo (E_{max}) de 11.6 pmol/pozo y una concentración efectiva media (EC₅₀) de 2.2 nM, mientras que el receptor hH₂R_{N217D} tuvo una E_{max} de 16.64 pmol/pozo y una EC₅₀ de 143 nM. En el segundo experimento (panel B) los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} tuvieron una EC₅₀ de 96.3 nM y 728 nM, y una E_{max} de 19.6 y 16.75 pmol/pozo, respectivamente. Estos resultados sugieren una disminución en la afinidad, pero no en la eficacia del receptor mutado.

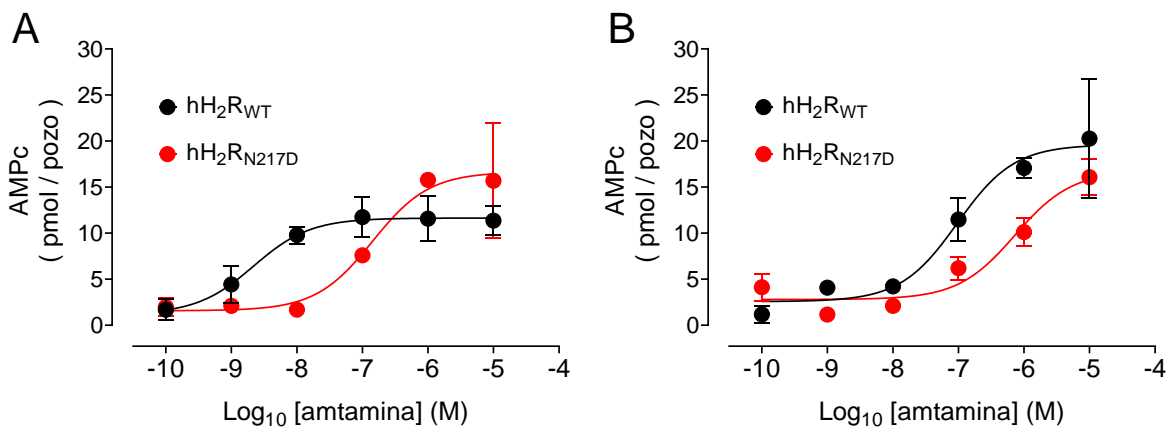


Figura 20. Curva concentración-respuesta de la acumulación de AMPc inducida por la activación por amtamina de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}. Las células fueron incubadas por 30 min con las concentraciones indicadas del agonista. Cada gráfica representa un experimento individual y los valores corresponden al promedio ± SEM de 3 replicados.

VII. Discusión

Los receptores a histamina H₂ han sido estudiados principalmente en el sistema gastrointestinal debido a su relevancia en la regulación de la secreción de ácido gástrico (Panula, 2021). A pesar de expresarse en regiones del cerebro como el hipocampo, la corteza cerebral, los ganglios basales y la amígdala, y estar involucrados en la regulación de la excitabilidad neuronal, no se han estudiado ampliamente las posibles implicaciones de los H₂R en trastornos neurológicos.

En 1996, Orange describió la mutación N217D localizada en la tercera asa intracelular del H₂R en pacientes diagnosticados con esquizofrenia en una población del Reino Unido; sin embargo, estudios posteriores por Ito *et al.* (2000) y Mancama *et al.* (2000) en poblaciones francesas y británicas, no apoyaron la correlación entre la mutación N217D y la fisiopatología de la esquizofrenia. No obstante, recientemente (2022) Ma *et al.* reportaron que existe una disminución en la expresión del H₂R en las neuronas glutamatérgicas de la corteza prefrontal de pacientes diagnosticados con esquizofrenia, y al realizar un *knockout* selectivo de estos receptores en neuronas glutamatérgicas de la corteza prefrontal medial (mPFC) en ratones, éstos mostraron un fenotipo conductual similar al observado en modelos animales de esquizofrenia, como déficit de activación sensoriomotora, hiperactividad, aislamiento social, anhedonia y deterioro de la memoria de trabajo, entre otros.

Por lo anterior, resulta de interés re-evaluar la implicación de los H₂R en la patogénesis y fisiopatología de la esquizofrenia. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto de la mutación N217D en las propiedades funcionales del H₂R humano (hH₂R).

Generación de la mutación y expresión de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}.

Dependiendo de su localización y del cambio de aminoácidos, las mutaciones en los GPCRs pueden conducir a la pérdida, disminución o ganancia de la actividad del receptor, así como a cambios en la afinidad, eficacia, actividad constitutiva y expresión en la membrana plasmática (Preuss, 2007; Schöneberg, 2021), alterando la señalización de los receptores y con ello el intercambio de información entre neuronas.

Mutaciones sin sentido, cambio en un nucleótido que genera un codón distinto al original y que codifica para un aminoácido diferente, pueden impedir el correcto plegamiento de la proteína ocasionando que la proteína sea retenida en el retículo endoplasmático, perjudicando el tráfico hacia la membrana plasmática y con ello la expresión del receptor (Schöneberg, 2004).

No existen reportes de mutaciones sin sentido en los receptores a histamina que alteren su expresión. Sin embargo, Fukushima *et al.* (2001a) generaron el cambio de la Cisteína 305 por Alanina en el H₂R canino y observaron una disminución significativa en la expresión de la proteína mutada, debido a que la Cisteína³⁰⁵ corresponde a un sitio de palmitoilación que es fundamental para el tráfico de la proteína hacia la membrana plasmática.

Por otro lado, mutaciones que se encuentren en las regiones TM3 y TM5–TM7, relevantes para la formación de la cesta de unión para la histamina (Zhang, 2024; Nederkoorn, 1996), o presentes en la tercera asa intracelular, sitio de unión a la proteína G, puede alterar la activación y señalización del receptor (Sadler, 2023).

Debido a que no hay reportes del efecto de la mutación N217D en la expresión del receptor H₂R, se replicó esta mutación realizando la inserción de la mutación puntual cA649G en la secuencia del hH₂R y la secuenciación de los fragmentos amplificados confirmó la presencia de la mutación y descartó la presencia de mutaciones aleatorias ocasionadas durante el proceso. De esta manera se obtuvieron dos secuencias, una sin cambios en el receptor nativo (hH₂R_{WT}) y otra con la mutación puntual (hH₂R_{N217D}).

Se evaluó la expresión de los receptores hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D} a través de inmunofluorescencia, lo que confirmó la expresión de ambos receptores en las células transfectadas, y la ausencia del receptor en las células no transfectadas. Los ensayos de *Western blot* confirmaron este patrón de expresión. Cabe destacar que en ambos grupos de células transfectadas (hH₂R_{WT} y hH₂R_{N217D}) se apreciaron células sin la señal del anticuerpo contra el H₂R, por lo que es necesario determinar si dicha ausencia de señal del anticuerpo es ocasionada por la eficacia de transfección del plásmido, o si se debe a la mutación de interés.

Evaluación de la activación de los receptores hH₂R_{WT} y al hH₂R_{N217D}.

El H₂R es un receptor acoplado a proteínas G α_s en el que la unión de la histamina induce cambios conformacionales que permiten el desacople de las subunidades G α_s de los complejos G $\beta\gamma$. Las subunidades G α_s se unen y activan a las ACs promoviendo la formación de AMPc a partir de ATP. Por ello, para determinar si la mutación N217D modifica la activación o señalización del receptor, se realizaron ensayos de acumulación de AMPc (ensayo de GloSensor y ensayo de unión a [³H]-AMPc) y se comparó la funcionalidad del receptor hH₂R_{N217D} con respecto al hH₂R_{WT}.

De acuerdo con el ensayo de GloSensor, la actividad constitutiva del receptor se ve disminuida en células que expresan al receptor hH₂R_{N217D}. Esto es consistente con lo reportado por Fukushima *et al.* (2001b) quienes evaluaron la mutación en células CHO-K1 transfectadas y compararon la acumulación de AMPc en células con el receptor hH₂R_{WT} y el hH₂R_{N217D}, obteniendo que las células con el receptor nativo aumentaban la acumulación de AMPc conforme aumentaba la expresión del receptor, mientras que las células con el receptor hH₂R_{N217D} no existió aumento. No obstante, no se ha propuesto un mecanismo por el cual la mutación pudiera estar aumentando dicha actividad constitutiva.

Se ha reportado que el H₂R de cobayo (gpH₂R) posee una mayor actividad constitutiva de GTPasa y de la AC comparado con el hH₂R. Se ha propuesto que este aumento en la actividad constitutiva es debido a la presencia de un puente de hidrógeno entre los residuos Tyr¹⁷ y Asp²⁷¹, presentes en el gpH₂R, por lo que Preuss *et al.* (2007) generaron la mutación A271D, localizada en la región transmembranal 7 (TM7), y la mutación C17Y, localizada en el extremo N-terminal del hH₂R, obteniendo que la presencia de ambas mutaciones en el receptor hH₂R aumenta la actividad constitutiva previamente reportada en el gpH₂R, confirmando que los residuos Tyr¹⁷ y Asp²⁷¹ estabilizan la conformación activa del receptor.

Por último, en esta tesis y con el ensayo de competencia de la unión de [³H]-AMPc se observó en 2 experimentos un desplazamiento hacia la derecha en la curva concentración-respuesta para el hH₂R_{N217D} con respecto al receptor nativo, sin un cambio apreciable en la respuesta máxima. Esto indica una disminución en la afinidad del receptor por el agonista, posiblemente ocasionado por la mutación y que lleva a requerirse una mayor concentración del ligando para ocupar el 50% de los receptores expresados.

VIII. Conclusión

La mutación N217D disminuye la actividad constitutiva del hH₂R, así como su afinidad por agonistas.

IX. Perspectivas

1. Determinar si la mutación N217D modifica la expresión del hH₂R, mediante ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia.
2. Determinar si la mutación modifica las propiedades farmacológicas del hH₂R (afinidad por agonistas y antagonistas).
3. Determinar el efecto de la mutación en la conformación del receptor y su implicación la actividad constitutiva del receptor.

X. Referencias

- Alewijnse, A. E., Timmerman, H., Jacobs, E. H., Smit, M. J., Roovers, E., Cotecchia, S., & Leurs, R. (2000). The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H₂ receptor. *Molecular Pharmacology*, *57*, 890–898.
- Arrang, J. M., Drutel, G., Garbarg, M., Ruat, M., Traiffort, E., & Schwartz, J. C. (1995). Molecular and functional diversity of histamine receptor subtypes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *757*, 314–323. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb17489.x>
- Atzori, M., Lau, D., Tansey, E. P., Chow, A., Ozaita, A., Rudy, B., & McBain, C. J. (2000). H₂ histamine receptor-phosphorylation of Kv3.2 modulates interneuron fast spiking. *Nature Neuroscience*, *3*, 791–798. <https://doi.org/10.1038/77693>
- Benarroch E. E. (2010). Histamine in the CNS: multiple functions and potential neurologic implications. *Neurology*, *75*, 1472–1479. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f884b1>
- Coruzzi, G., Timmerman, H., Adami, M., & Bertaccini, G. (1993). The new potent and selective histamine H₂ receptor agonist amthamine as a tool to study gastric secretion. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *348*, 77–81. <https://doi.org/10.1007/BF00168540>
- Deutsch, S. I., Rosse, R. B., Kendrick, K. A., Fay-McCarthy, M., Collins, J. P., Jr, & Wyatt, R. J. (1993). Famotidine adjunctive pharmacotherapy for schizophrenia: preliminary data. *Clinical Neuropharmacology*, *16*, 518–524.
- Flores-Clemente, C., Escamilla-Sánchez, J., Arias-Montaño, J. M., & Arias-Montaño, J. A. (2017). The naturally occurring mutation Y197C does not affect the expression or signaling of the human histamine H₃ receptor. *Neuroscience letters*, *641*, 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.048>
- Fukushima, Y., Saitoh, T., Anai, M., Ogihara, T., Inukai, K., Funaki, M., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Ishikawa, T., Takata, K., Nagai, R., Omata, M., Asano, T.

- (2001). Palmitoylation of the canine histamine H₂ receptor occurs at Cys(305) and is important for cell surface targeting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1539, 181-191. 10.1016/s0167-4889(01)00104-5 (a)
- Fukushima, Y., Saitoh, T., Anai, M., Tsukuda, K., Onishi, Y., Sakoda, H., Inukai, K., Ogihara, T., Funaki, M., Ono, H., Fujishiro, M., Ishikawa, T., Nagai, R., Omata, M., & Asano, T. (2001). G649, an allelic variant of the human H₂ receptor with low basal activity, is resistant to upregulation upon antagonist exposure. *The Pharmacogenomics Journal*, 1, 78–83. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500011> (b)
- Wolstenholme, G.E.W., & O'Connor, C. M. (1956). Ciba Foundation Symposium Jointly with the Physiological Society and the British Pharmacological Society on Histamine. *Postgraduate Medical Journal*, 32, 4-13. <https://doi.org/10.1002/9780470718957.ch2>
- Gantz, I., Munzert, G., Tashiro, T., Schäffer, M., Wang, L., DelValle, J., & Yamada, T. (1991). Molecular cloning of the human histamine H₂ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178, 1386–1392. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91047-g](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91047-g) (b)
- Gantz, I., Schäffer, M., DelValle, J., Logsdon, C., Campbell, V., Uhler, M., & Yamada, T. (1991). Molecular cloning of a gene encoding the histamine H₂ receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 429–433. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.2.429> (a)
- Haas, H. L., & Konnerth, A. (1983). Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. *Nature*, 302, 432–434. <https://doi.org/10.1038/302432a0>
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews*, 88, 1183–1241. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007>
- Haas, H., & Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 121–130. <https://doi.org/10.1038/nrn1034>

- Ito, C., Morisset, S., Krebs, M. O., Olié, J. P., Lôo, H., Poirier, M. F., Lannfelt, L., Schwartz, J. C., & Arrang, J. M. (2000). Histamine H₂ receptor gene variants: lack of association with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 5, 159–164. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000664>
- Jurič, D. M., Kržan, M., & Lipnik-Stangelj, M. (2016). Histamine and astrocyte function. *Pharmacological Research*, 111, 774–783. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.035>
- Kaminsky, R., Moriarty, T. M., Bodine, J., Wolf, D. E., & Davidson, M. (1990). Effect of famotidine on deficit symptoms of schizophrenia. *Lancet*, 335, 1351–1352. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91237-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91237-5)
- Karlstedt, K., Senkas, A., Ahman, M., & Panula, P. (2001). Regional expression of the histamine H₂ receptor in adult and developing rat brain. *Neuroscience*, 102, 201–208. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00464-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00464-4)
- Klingler, F., Mathias, S., Schneider, H., Buck, T., Raab, N., Zeh, N., Shieh, Y. W., Pfannstiel, J., & Otte, K. (2021). Unveiling the CHO surfaceome: Identification of cell surface proteins reveals cell aggregation-relevant mechanisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 118, 3015–3028. <https://doi.org/10.1002/bit.27811>
- Leurs, R., Hough, L. B., Blandina, P. & Haas, H. L. (2012). Histamine. Siegel, G. J., Albers, R. W., Brady, S. T., & Price, D. L. (8a edición), *Basic neurochemistry: Principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*, pp. 323-341. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-00066-X>
- Lieberman, P. (2011). The basics of histamine biology. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 106, S2–S5. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2010.08.005>
- Ma, Q., Jiang, L., Chen, H., An, D., Ping, Y., Wang, Y., Dai, H., Zhang, X., Wang, Y., Chen, Z., & Hu, W. (2023). Histamine H₂ receptor deficit in glutamatergic neurons contributes to the pathogenesis of schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120, 1-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207003120>
- Meskanen, K., Ekelund, H., Laitinen, J., Neuvonen, P. J., Haukka, J., Panula, P., & Ekelund, J. (2013). A randomized clinical trial of histamine 2 receptor antagonism in treatment-

- resistant schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 33, 472–478. <https://doi.org/10.1097/JCP.0b013e3182970490>
- Micallef, S., Stark, H., & Sasse, A. (2013). Polymorphisms and genetic linkage of histamine receptors. *Life Sciences*, 93, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.012>
- Schöneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Hermsdorf, T., Römpler, H., Sangkuhl, K. (2004). Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 104, 173-206. 10.1016/j.pharmthera.2004.08.008.
- Nederkoorn, P.H.J., van Gelder, E.M. & Donné-Op den Kelder, G.M. (1996). The agonistic binding site at the histamine H₂ receptor. II. Theoretical investigations of histamine binding to receptor models of the seven α -helical transmembrane domain. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 10, 479–489. <https://doi.org/10.1007/BF00124477>
- Nieto-Alamilla, G., Escamilla-Sánchez, J., López-Méndez, M. C., Molina-Hernández, A., Guerrero-Hernández, A., & Arias-Montaño, J. A. (2018). Differential expression and signaling of the human histamine H₃ receptor isoforms of 445 and 365 amino acids expressed in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Receptors Signal Transduction*, 38, 141-150. <https://doi.org/10.1080/10799893.2018.1448995>
- Orange, P. R., Heath, P. R., Wright, S. R., Ramchand, C. N., Kolkeiwicz, L., & Pearson, R. C. (1996). Individuals with schizophrenia have an increased incidence of the H₂R649G allele for the histamine H₂ receptor gene. *Molecular Psychiatry*, 1, 466–469.
- Panula, P. (2021). Histamine receptors, agonists, and antagonists in health and disease. Aminoff, M. J., Holler, F. & Swab, F. *Handbook of Clinical Neurology*, 180, 377-387. ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820107-7.00023-9>
- Panula, P., & Nuutinen, S. (2013). The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14, 472–487. <https://doi.org/10.1038/nrn3526>
- Preuss, H., Ghorai, P., Kraus, A., Dove, S., Buschauer, A., & Seifert, R. (2007). Mutations of Cys-17 and Ala-271 in the human histamine H₂ receptor determine the species selectivity of guanidine-type agonists and increase constitutive activity. *The Journal of*

- Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321, 975–982.
<https://doi.org/10.1124/jpet.107.120519>
- Ramos-Jiménez, J.; Garduño-Torres, B.; Arias-Montaña, J.A. (2009). Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Revista Biomédica*, 20, 100-126.
<https://doi.org/10.32776/revbiomed.v20i2.146>
- Rosse, R. B., Kendrick, K., Fay-McCarthy, M., Prell, G. D., Rosenberg, P., Tsui, L. C., Wyatt, R. J., & Deutsch, S. I. (1996). An open-label study of the therapeutic efficacy of high-dose famotidine adjuvant pharmacotherapy in schizophrenia: preliminary evidence for treatment efficacy. *Clinical Neuropharmacology*, 19, 341–348.
<https://doi.org/10.1097/00002826-199619040-00007>
- Sadler, F., Ma, N., Ritt, M. *et al.* (2023). Autoregulation of GPCR signaling through the third intracellular loop. *Nature*, 615, 734–741 <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05789-z>
- Schöneberg, T., Liebscher, I. (2021). Mutations in Gprotein-Coupled Receptors: Mechanisms, Pathophysiology and Potential Therapeutic Approaches. *Pharmacological Reviews*, 73, 89-119. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000011>
- Schwartz, J. C., Arrang, J. M., Garbarg, M., Pollard, H., & Ruat, M. (1991). Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiological Reviews*, 71, 1–51.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.1.1>
- Traiffort, E., Pollard, H., Moreau, J., Ruat, M., Schwartz, J. C., Martinez-Mir, M. I., & Palacios, J. M. (1992). Pharmacological characterization and autoradiographic localization of histamine H₂ receptors in human brain identified with [¹²⁵I]iodoaminopotentidine. *Journal of Neurochemistry*, 59, 290–299.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08903.x>
- Traiffort, E., Ruat, M., Arrang, J. M., Leurs, R., Piomelli, D., & Schwartz, J. C. (1992). Expression of a cloned rat histamine H₂ receptor mediating inhibition of arachidonate release and activation of cAMP accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 2649–2653.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2649>

- Wang, L. D., Hoeltzel, M., Gantz, I., Hunter, R., & Del Valle, J. (1998). Characterization of the histamine H2 receptor structural components involved in dual signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285, 573–578.
- Xu, J., Zhang, X., Qian, Q., Wang, Y., Dong, H., Li, N., Qian, Y., & Jin, W. (2018). Histamine upregulates the expression of histamine receptors and increases the neuroprotective effect of astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 41. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1068-x>
- Xu, N., Ma, C., Ou, J., Sun, W. W., Zhou, L., Hu, H., & Liu, X. M. (2017). Comparative Proteomic Analysis of Three Chinese Hamster Ovary (CHO) Host Cells. *Biochemical Engineering Journal*, 124, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.007>
- Yoshikawa, T., Nakamura, T., & Yanai, K. (2021). Histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus as a control center for wakefulness. *British Journal of Pharmacology*, 178, 750–769. <https://doi.org/10.1111/bph.15220>
- Zhang, X., Liu, G., Zhong, YN. *et al.* (2024). Structural basis of ligand recognition and activation of the histamine receptor family. *Nature Communications*, 27, 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52585-y>