



**Cinvestav**

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Evaluación del mecanismo de activación de las cinasas reguladas por  
señales extracelulares ERK-1/2 por el receptor a histamina H<sub>3</sub> humano  
expresado establemente en células CHO-K1**

T E S I S

Que presenta

**Q.F.B. Dení Hernández Bello**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad

**Neurobiología Celular y Molecular**

Directores de tesis

Dr. José Antonio Arias Montaña

Dr. Benjamín Floran Garduña

Dr. Alberto Olivares Reyes

Ciudad de México

Febrero, 2025

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado (CVU 1009441).

Al Dr. José Antonio Arias Montaña por considerarme ser parte de su equipo de trabajo, por compartirme todos sus conocimientos y formarme en el ámbito profesional y sobre todo por enseñarme lo maravilloso que es la ciencia.

Al Dr. Benjamín Floran Garduño 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 del laboratorio Carlos, Luis, Rommel, Victoria, Nikte y Alejandro por sus comentarios, sus ocurrencias y sobre todo por sus observaciones en mi trabajo de tesis.

## **Dedicatorias**

A Dios por permitirme darme la oportunidad de ingresar al posgrado conocer magnificas personas y sobre todo por concluir esta etapa con éxito.

A mis padres María de los Ángeles Bello Marín y Juan Hernández Cortes quienes me apoyaron incondicionalmente en cada paso de mi camino.

A Nicté Hernández Hernández, Romel, Anayansi y Pavel Hernández Bello por su comprensión, paciencia y consejos que me brindaron a lo largo de la maestría.

A mis compañeros de maestría Fernanda, Karla, Sahian y Fernando gracias, chicos por todas las ocurrencias que pasamos a lo largo de la maestría.

## Índice

1.	Introducción.....	1
2.	Histamina .....	1
3.	Sistema histaminérgico del SNC.....	2
4.	Receptores a histamina.....	3
5.	Transducción de señales del H <sub>3</sub> R.....	7
6.	Planteamiento del problema.....	12
7.	Hipótesis.....	14
8.	Objetivos .....	14
8.1.	Objetivo general. ....	14
8.2.	Objetivos específicos .....	14
9.	Materiales y métodos .....	15
9.1.	Cultivo celular .....	15
9.2.	Incubación con agonistas, antagonistas, activadores e inhibidores .....	15
9.3.	Inmunodetección de ERK-1/2 fosforiladas (p44/42-ERK) por <i>Western blot</i> .....	16
9.4.	Determinación de la concentración intracelular de Ca <sup>2+</sup> ([Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ) en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R.....	16
9.5.	Transfección del extremo carboxilo de la GRK-2 en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R.....	17
9.5.1.	Amplificación del plásmido pRK5-βARK1-ct (465-689).....	17
9.5.2.	Transfección transitoria de células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R con el plásmido pRK5 βARK1 .....	22
9.5.3.	Transfección del βARK-ct en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R.....	23
9.6.	Análisis estadístico .....	24
10.	Resultados .....	25
10.1.	Fosforilación de ERK-1/2 inducida por agonistas, ATP y TPA. ....	25
10.2.	Efecto de antagonistas/agonistas inversos selectivos del H <sub>3</sub> R en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por el agonista imetit. ....	26
10.3.	Evaluación de la participación de la vía PLC/PKC en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H <sub>3</sub> R en las células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R.....	27
10.3.1.	Activación de la PLC por estimulación del H <sub>3</sub> R en las células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R. ....	27
10.3.2.	Efecto del inhibidor de la PLC U73122 y su análogo inactivo U73343 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H <sub>3</sub> R en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R29	

10.3.3.	Efecto del inhibidor U73122 y su análogo inactivo U73343 en el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ATP en las células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R. ....	30
10.4.	Efecto de inhibidores farmacológicos de las PKCs en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H <sub>3</sub> R en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R.....	31
10.5.	Efecto del inhibidor farmacológico de la PKC Gö-6983 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H <sub>3</sub> R en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R. ....	32
10.6.	Evaluación de la participación de la vía de la PI3K en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H <sub>3</sub> R en las células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R.....	33
10.6.1.	Efectos del inhibidor farmacológico de la PI3K wortmanina en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H <sub>3</sub> R en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R.....	33
10.6.2.	Efectos del BX-795, inhibidor farmacológico de la PDK1, en la activación de ERK-1/2 inducida por la activación del H <sub>3</sub> R. ....	34
10.7.	Efecto del PP2, inhibidor farmacológico de la cinasa de tirosina Src en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H <sub>3</sub> R en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R. ....	36
10.8.	Efecto de la inhibición de los dímeros Gβγ en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H <sub>3</sub> R en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R. ....	37
10.8.1.	Efecto de la galeína, inhibidor farmacológico de los complejos Gβγ, en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H <sub>3</sub> R en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R. ....	37
10.8.2.	Efecto de βARK1-ct, secuestrador de los complejos Gβγ, en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H <sub>3</sub> R en células CHO-K1-hH <sub>3</sub> R. ....	39
11.	Discusión.....	41
12.	Conclusiones .....	49
13.	Perspectivas.....	50
14.	Referencias.....	51

## Abreviaturas

aa	amino ácido
AC	adenilil ciclasa
AMPC	3,5-Monofosfato ciclico de adenosina
$\beta$ ARK1	Cinasa 1 del receptor $\beta$ -adrenérgico
BCA	Ácido bicinconinico
BSA	Albúmina de suero bovino
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración intracelular de calcio
cDNA	DNA complementario
CHO-K1	Células de ovario de hámster chino
DAG	Diacilglicerol
DAO	Enzima diamino oxidasa
ERK-1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares
G-418	Geneticina
GTP	Trifosfato de guanosina
GIRKs	Canales de potasio rectificadores
HMT	N-metiltransferasa de histamina
hH <sub>3</sub> R <sub>445</sub>	Receptor a histamina H <sub>3</sub> R humano de 445 aa
H <sub>1</sub> R	Receptor a histamina H <sub>1</sub>
H <sub>2</sub> R	Receptor a histamina H <sub>2</sub>
H <sub>3</sub> R	Receptor a histamina H <sub>3</sub>
H <sub>4</sub> R	Receptor a histamina H <sub>4</sub>
HCD	Descarboxilasas de L-histidina
IP <sub>3</sub>	1,4,5-trifosfato de inositol
KRH	Krebs-Ringer-Hepes (solución)
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
MAPKs	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
NHE	Intercambiador sodio/protón (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PI3K	3-Cinasa de fosfatidilinositol
PKA	Cinasa A de proteínas

PKB	Cinasa B de proteínas (AKT)
PKC	Cinasa C de proteínas
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	Fosfalipasa C
PTX	Toxina de <i>Bordetella pertussis</i>
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
SNC	Sistema Nervioso Central
TMN	Núcleo tuberomamilar hipotálamico

## Lista de Figuras

Figura 1.	<b>Síntesis y metabolismo de la histamina.</b> .....	2
Figura 2.	<b>Neuronas histaminérgicas en el cerebro de rata.</b> .....	3
Figura 3.	<b>Representación esquemática del hH<sub>3</sub>R.</b> .....	6
Figura 4.	<b>Vías de señalización del H<sub>3</sub>R.</b> .....	7
Figura 5.	<b>Representación de los componentes principales de las vías de las MAPKs.</b> .....	10
Figura 6.	<b>Representación de las posibles vías de estimulación de ERK-1/2 por activación de GPCRs acoplados a proteínas G<math>\alpha_{i/o}</math>.</b> .....	11
Figura 7.	<b>Estructura del plásmido pRK5-<math>\beta</math>ARK1-ct (495-689).</b> .....	18
Figura 8.	<b>Restricción enzimática del plásmido pRK5-<math>\beta</math>ARK1-ct (495-689).</b> .....	20
Figura 9.	<b>Restricción enzimática y secuencia de nucleótidos y de aa del plásmido pRK-<math>\beta</math>ARK1-(495-689).</b> .....	21
Figura 10.	<b>Expresión del <math>\beta</math>ARK1-ct en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	24
Figura 11.	<b>Fosforilación de ERK-1/2 inducida por agonistas del H<sub>3</sub>R, ATP y TPA en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	25
Figura 12.	<b>Bloqueo por antagonistas selectivos del efecto del agonista imetit en la fosforilación de ERK-1/2 en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	26
Figura 13.	<b>Efecto del imetit y del ATP en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) de las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	28
Figura 14.	<b>Efecto del inhibidor de la PLC U73122 y su análogo inactivo U73343 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	29

<b>Figura 15. Efecto del inhibidor de la PLC U73122 y su análogo inactivo U73343 en el aumento en la concentración intracelular de <math>Ca^{2+}</math> (<math>[Ca^{2+}]_i</math>) inducido por el ATP en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	<b>30</b>
<b>Figura 16. Efecto del inhibidor de la PKC Gö-6976 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	<b>31</b>
<b>Figura 17. Efecto del inhibidor de la PKC Gö-6983 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	<b>32</b>
<b>Figura 18. Efectos del inhibidor de la PI3K wortmanina en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1.</b> .....	<b>34</b>
<b>Figura 19. Efecto del BX-795, inhibidor farmacológico de la PDK1, en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	<b>35</b>
<b>Figura 20. Efecto de PP2, inhibidor farmacológico de la cinasa Src, en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	<b>36</b>
<b>Figura 21. Efecto de la galeína, inhibidor farmacológico de los complejos Gβγ, en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	<b>38</b>
<b>Figura 22. Efecto de la transfección del βARK1-ct en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.</b> .....	<b>40</b>
<b>Figura 23. Mecanismo clásico de la señalización intracelular y desensibilización de los GPCRs.</b> .....	<b>47</b>

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar los mecanismos involucrados en la activación las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK-1/2) inducida por la estimulación del H<sub>3</sub>R humano (hH<sub>3</sub>R) expresado en células CHO-K1.

La activación del H<sub>3</sub>R con los agonistas histamina, imnepip e imetit (100 nM) aumentó significativamente la fosforilación de ERK-1/2 ( $11.2 \pm 2.9$ ,  $11.9 \pm 0.7$  y  $13.6 \pm 2.3$  veces el valor basal, respectivamente). El efecto del imetit fue prevenido por yodofenpropit y clobenpropit (1  $\mu$ M), dos antagonistas/agonistas inversos selectivos del H<sub>3</sub>R. El ATP (10  $\mu$ M, activador de receptores purinérgicos P2Y, acoplados a la estimulación de la fosfolipasa C, PLC), aumentó la fosforilación de ERK-1/2 a  $8.1 \pm 1.3$  veces la basal. El TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol; 200 nM), un activador directo de la cinasa C de proteínas (PKC), aumentó significativamente ( $12.3 \pm 2.2$  veces la basal) la fosforilación de ERK-1/2.

El inhibidor de la PLC U73122 (10  $\mu$ M) redujo, aunque no significativamente, la fosforilación de ERK-1/2 inducida por imetit, y este efecto fue mimetizado por el análogo inactivo U73343 (10  $\mu$ M). El U73122 redujo en 98.6% el aumento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), sin advertirse efecto del U73343. Los inhibidores de las PKCs Gö-6976 y Gö-6983 (1  $\mu$ M) no afectaron de manera significativa los efectos del imnepip y del ATP. La inhibición farmacológica de la cinasa Src con PP2 (10  $\mu$ M) tampoco modificó el efecto del imetit o del ATP.

La inhibición de la 3-cinasa de fosfatidil-inositol (PI3K) con wortmanina (10  $\mu$ M), redujo significativamente la fosforilación de ERK-1/2 estimulada por imetit en 49.4% y por ATP en 57.1%. Un inhibidor de la cinasa PDK1 (BX-795, 10  $\mu$ M) no afectó la fosforilación de ERK-1/2 inducida por imetit o ATP. La galeína, un inhibidor farmacológico de los complejos G $\beta\gamma$ , aumentó por sí sola la fosforilación de ERK-1/2 y no previno el efecto del imetit o del ATP. La transfección del extremo carboxilo de la cinasa 2 de GPCRs (GRK2 o  $\beta$ ARK1), que secuestra a los complejos G $\beta\gamma$ , disminuyó de manera modesta (-35.2%), aunque significativa, los efectos del imetit y del ATP.

Estos resultados indican que en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R la activación del H<sub>3</sub>R induce la fosforilación de ERK-1/2, sin evidencia de la participación de la vía PLC/PKC o de las cinasas Src y PDK1. El efecto está mediado, al menos parcialmente, por los complejos G $\beta\gamma$  y la activación de la PI3K.

## Abstract

This work aimed to evaluate the mechanisms involved in the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK-1/2) induced by stimulation of the human H<sub>3</sub>R (hH<sub>3</sub>R) expressed in CHO-K1 cells.

Activation of the H<sub>3</sub>R with the agonists histamine, immapip or imetit (100 nM) significantly increased ERK-1/2 phosphorylation ( $11.2 \pm 2.9$ ,  $11.9 \pm 0.7$  and  $13.6 \pm 2.3$ -fold of basal, respectively). The effect of imetit was prevented by iodofenpropit and clobenpropit (1  $\mu$ M), two selective H<sub>3</sub>R antagonists/inverse agonists. ATP (10  $\mu$ M, agonist at P2Y purinergic receptors, coupled to phospholipase C, PLC, stimulation) increased ERK-1/2 phosphorylation to  $8.1 \pm 1.3$ -fold of basal. TPA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 200 nM), a direct PKC activator, significantly increased ERK-1/2 phosphorylation to  $12.3 \pm 2.2$ -fold of basal.

The PLC inhibitor U73122 (10  $\mu$ M) reduced, although not significantly, imetit-induced ERK-1/2 phosphorylation, and this effect was mimicked by the inactive analog U73343 (10  $\mu$ M). U73122 reduced by 98.6 % the increase in the intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), with no effect of U73343. The PKC inhibitors Gö-6976 and Gö-6983 (1  $\mu$ M) did not significantly affect ERK-1/2 phosphorylation induced by immapip or ATP. Pharmacological inhibition of the Src kinase with PP2 (10  $\mu$ M) did not modify the effect of immapip or ATP. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) with wortmannin (10  $\mu$ M) significantly reduced imetit- and ATP-stimulated ERK-1/2 phosphorylation by 49.4% and 57.1%, respectively. The PDK1 kinase inhibitor BX-795 (10  $\mu$ M) did not affect imetit- or ATP-induced ERK-1/2 phosphorylation.

Gallein, a pharmacological inhibitor of G $\beta\gamma$  complexes, increased by itself ERK-1/2 phosphorylation and did not prevent the effect of imetit or ATP. Transfection of the carboxyl terminus of the GPCR kinase 2 (GRK2 or  $\beta$ ARK1), which sequesters G $\beta\gamma$  complexes, decreased in a modest (-35.2%) but significant manner the effects of imetit and ATP on ERK-1/2 phosphorylation.

These results indicate that in CHO-K1-hH<sub>3</sub>R cells, H<sub>3</sub>R activation induces ERK-1/2 phosphorylation, with no evidence for the involvement of the PLC/PKC pathway, or activation of the Src and PDK1 kinases. The effect is at least partially mediated by G $\beta\gamma$  complexes and PI3K activation.

## **1. Introducción**

En 1910 el grupo de Sir Henry Dale aisló la histamina del cornezuelo de centeno, descubriendo que tenía un efecto estimulante en el músculo liso del intestino y vías respiratorias, causaba vasoconstricción y estimulaba la contractibilidad cardíaca. En 1920 Popielski mostró que la histamina estimulaba la secreción de ácido gástrico, y en 1927 se aisló del hígado y pulmón concluyéndose que era un constituyente del organismo. En 1919 fue detectada por John Abel en el cerebro, y décadas después su papel como neuromodulador se evidenció con anticuerpos contra la histamina y su enzima sintetizadora, la descarboxilasa de histidina, HDC (revisado por Nieto-Alamilla et al., 2016).

## **2. Histamina**

La histamina ([2-(4-imidazolil)etilamina]) se conforma por un anillo imidazol y un grupo etilamino en la cadena lateral. En los seres vivos, la histamina es sintetizada por la descarboxilación oxidativa del aminoácido L-histidina, reacción catalizada por la HDC, y su inactivación se lleva a cabo a través de dos vías principales, la N-metilación y la oxidación (Figura 1). En la metilación la enzima N-metil-transferasa de histamina convierte a ésta en 3-(tele)-metil-histamina, la cual es transformada a ácido 3-(tele)-metil-imidazol-acético por la enzima monoamino oxidasa tipo B (MAO<sub>B</sub>), mientras que la oxidación por la enzima diamino-oxidasa genera ácido imidazol-acético (Ramos-Jiménez et al., 2009). La principal enzima metabolizadora de histamina en los tejidos periféricos es la diamino-oxidasa, mientras que en el sistema nervioso central (SNC) la N-metiltransferasa es la principal enzima inactivadora (Nieto-Alamilla et al., 2016).

La histamina pertenece a la clase de las aminas biogénicas que incluye a la dopamina, la noradrenalina y la serotonina, y desempeña papeles importantes en múltiples procesos fisiológicos como moduladora de la inflamación, la secreción de ácido gástrico, la frecuencia cardíaca, la respuesta inmune y respuestas alérgicas (Ramos-Jiménez et al., 2009; Ghamari et al., 2019). En el SNC, la histamina tiene una función importante como neuromodulador regulando a través de mecanismos pre-sinápticos y post-sinápticos funciones que incluyen las conductas motora y sexual, el ciclo sueño y vigilia, la nocicepción, la ingesta de agua y alimento, la circulación cerebral, la temperatura corporal, el aprendizaje y la memoria

(García-Gálvez et al., 2016; Molina-Hernández et al. 2012). Por lo anterior, la histamina está también implicada en varias condiciones patológicas (Ghamari et al., 2019).

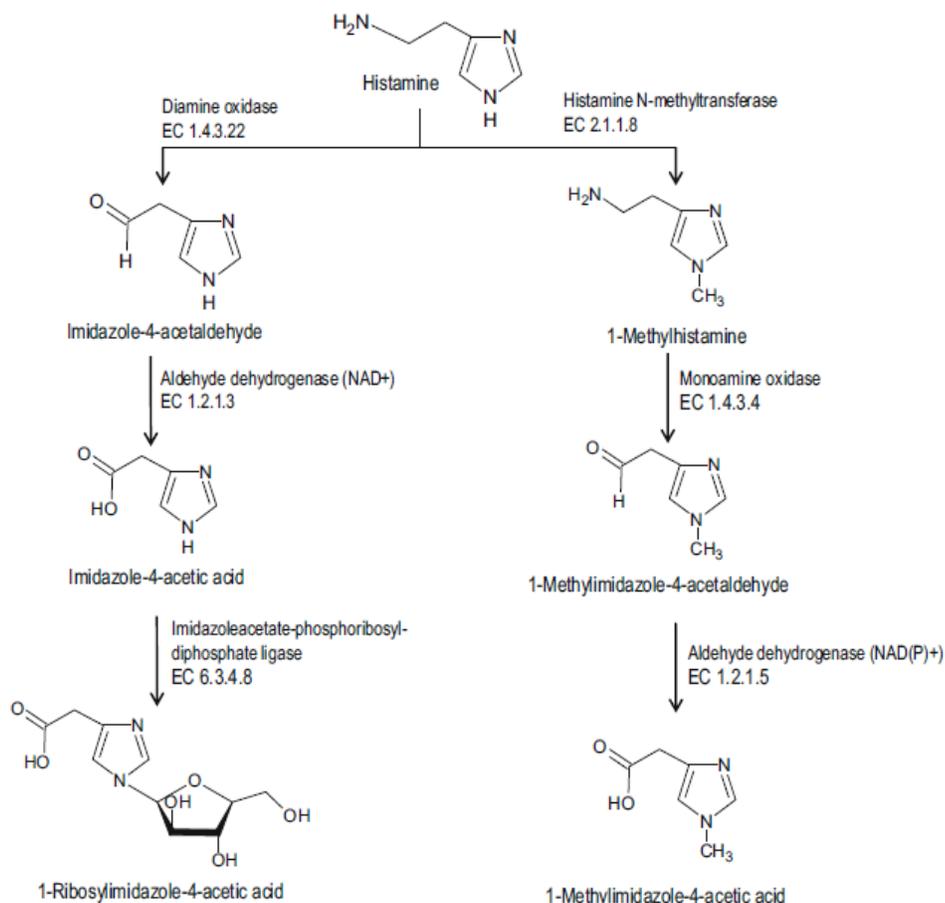


Figura 1. **Síntesis y metabolismo de la histamina.** Se ilustra la síntesis de la amina por la descarboxilasa de L-histidina (HDC) en un solo paso enzimático, y su inactivación por dos vías: a) metilación por la enzima N-metiltransferasa de histamina (HMT), y b) oxidación por la enzima diamino oxidasa (DAO) (Tomado de Hattori y Seifert, 2004).

### 3. Sistema histaminérgico del SNC

La histamina es sintetizada y almacenada en gránulos intracelulares por mastocitos, basófilos, células entero-cromafines de la mucosa gástrica, y neuronas. Existen 64,000 neuronas histaminérgicas en el humano y 4,500 neuronas en la rata, localizadas en el núcleo tubero-mamilar (TMN) del hipotálamo posterior, de donde envían sus axones a todo el SNC

a través de tres vías, dos ascendentes que inervan las estructuras del cerebro anterior, y una vía descendente que inerva la médula espinal (Figura 2) (Nieto-Alamilla et al., 2016).

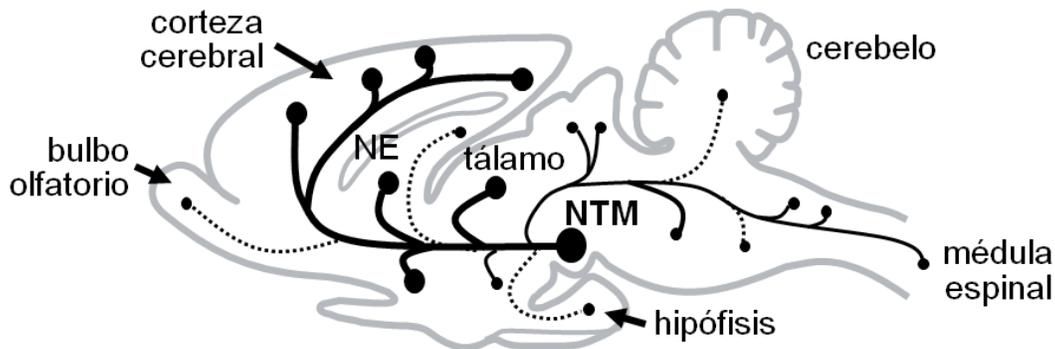


Figura 2. **Neuronas histaminérgicas en el cerebro de rata.** Se ilustran las vías histaminérgicas que a partir del núcleo tubero-mamilar inervan a todo el SNC. Figura tomada de Aquino-Miranda et al., 2012.

#### 4. Receptores a histamina

Las funciones fisiológicas de la histamina se ejercen mediante la activación de cuatro tipos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs): los receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>. Los primeros tres receptores se encuentran en el cerebro, y el receptor H<sub>4</sub> se ha identificado principalmente en las células del sistema inmune (Panula et al., 2015).

Los GPCRs pertenecen a la familia más grande de proteínas de membrana en el genoma humano y están constituidos por una sola cadena proteica que forma siete hélices transmembranales, interconectadas por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular (Herrera-Zúñiga et al., 2020). La activación de cada uno de los cuatro receptores a histamina genera diferentes respuestas biológicas, debido a la proteína G a la que se encuentren acoplados (Panula et al., 2015).

**Receptor a histamina H<sub>1</sub> (H<sub>1</sub>R).** El gen que codifica al receptor H<sub>1</sub> se encuentra en el cromosoma 3p25 y codifica una proteína de 478 aminoácidos (aa) con una tercera asa intracelular larga (IL3); fue el primer receptor identificado, y es el blanco de acción de los antihistamínicos y por consiguiente se ha involucrado en los procesos alérgicos. Se expresa

en el SNC (corteza cerebral, hipocampo, núcleo accumbens, tálamo e hipotálamo posterior), en las vías urinarias, los vasos sanguíneos, las células endoteliales vasculares, el músculo liso de los bronquios, el intestino, en las células cromafines de la médula de las glándulas suprarrenales y los linfocitos.

Los H<sub>1</sub>Rs se acoplan a proteínas G $\alpha_{q/11}$ , las cuales activan a la fosfolipasa C (PLC) dando como resultado dos segundos mensajeros: el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) que induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares, y el diacilglicerol (DAG) que activa a varias isoformas de la cinasa C de proteínas (PKC). Se ha reportado que el H<sub>1</sub>R aumenta constitutivamente los niveles de IP<sub>3</sub> y activa al factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), factor de transcripción involucrado en la inflamación y cáncer. La activación constitutiva de NF- $\kappa$ B se debe principalmente a las subunidades G $\beta\gamma$ ; sin embargo, la activación de NF- $\kappa$ B requiere de las proteínas G $\alpha_{q/11}$  y las subunidades G $\beta\gamma$  (Ramos-Jiménez et al., 2009; Molina-Hernández et al., 2012; Bongers, 2008).

**Receptor a histamina H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>R).** En 1956 Code y cols. concluyeron que la histamina tenía una función relevante en el control de la secreción del ácido gástrico, lo que se confirmó 16 años después por el descubrimiento de los antagonistas del H<sub>2</sub>R (Parsons y Ganellin, 2006). El receptor fue identificado farmacológicamente en la década de 1970, y fue el primero de los receptores a histamina que se clonó. El gen se encuentra en el cromosoma 5q35.5 y codifica una proteína de 358 aa con un asa intracelular corta y un extremo carboxilo terminal largo (Busse y Knuffman, 2006, Bongers, 2008). Se expresa en el SNC (ganglios basales, amígdala, hipocampo y corteza cerebral) teniendo una localización celular post-sináptica. A nivel periférico se expresa en el músculo liso vascular y pulmonar, hepatocitos, condrocitos, células endoteliales, células epiteliales, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, células dendríticas y linfocitos T y B (Ramos-Jiménez, 2009). El H<sub>2</sub>R se acopla a proteínas G $\alpha_s$  que activan a las adenilil ciclasas y por lo tanto la formación del segundo mensajero AMPc, el cual estimula a la cinasa A de proteínas (PKA) que fosforila diferentes proteínas en residuos de Treonina y Serina, como CREB (Molina-Hernández et al., 2012; Ramos-Jiménez, 2009).

**Receptor a histamina H<sub>4</sub> (H<sub>4</sub>R).** Fue identificado por técnicas de biología molecular a inicios del milenio; el gen correspondiente se encuentra en el cromosoma 18q11.2, contiene tres exones y codifica una proteína de 390 aa (Bongers, 2008). El H<sub>4</sub>R es predominantemente

expresado por células del sistema inmune incluidos los monocitos, los eosinófilos, las células dendríticas, las células T y las células *natural killers* (Burns et al., 2014). También se ha identificado en tejidos periféricos como el bazo, colon, timo y médula ósea, con una expresión moderada (Zampeli y Tiligada, 2009).

El H<sub>4</sub>R muestra una homología con el H<sub>3</sub>R del 70% en los dominios transmembranales (Parsons y Ganellin, 2006), y es responsable de la quimiotaxis inducida por histamina de los leucocitos a los sitios de inflamación, y por lo tanto parece intervenir en este proceso y las alergias. Los H<sub>4</sub>Rs activan a proteínas G $\alpha_{i/o}$ , por lo cual inhiben la formación de AMPc, aumentan la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y activan a las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) (Zampeli y Tiligada, 2009; Ramos-Jiménez et al., 2009).

**Receptor a histamina H<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>R).** El receptor se expresa predominantemente en el SNC y el sistema nervioso periférico, en el SNC se encuentra principalmente en neuronas histaminérgicas y con baja densidad en células gliales. El H<sub>3</sub>R se expresa en la corteza cerebral, núcleo accumbens, neocórtex, hipocampo, núcleo de la estría terminal, núcleo olfatorio, algunos núcleos hipotalámicos (principalmente el núcleo tubero mamilar), amígdala y la corteza piriforme (Nieto-Alamilla et al, 2016).

El H<sub>3</sub>R fue identificado farmacológicamente en 1983 por Jean-Michael Arrang y Jean Charles Schwartz, evaluando el efecto de la histamina en rebanadas de la corteza cerebral de rata y mostrando que el receptor funciona como autorreceptor presináptico que inhibe la síntesis y la liberación de histamina en las terminales nerviosas (Ghamari et al., 2019). Los H<sub>3</sub>Rs actúan también como heterorreceptores presinápticos, inhibiendo la liberación de varios neurotransmisores como acetilcolina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), dopamina, serotonina (5-HT), noradrenalina, glutamato, neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (García-Gálvez et al., 2016; Nieto-Alamilla et al., 2016; Ghamari et al., 2019). Existe evidencia de expresión postsináptica de dicho receptor en algunas regiones del cerebro como la corteza cerebral, el neocórtex, el núcleo accumbens y el hipocampo (Nieto-Alamilla et al., 2016).

En 1999 el ácido desoxirribonucleico complementario (DNAc) del H<sub>3</sub>R humano (hH<sub>3</sub>R) fue clonado por Lovenberg et al. (1999) utilizando el clon GPCR97 para evaluar una biblioteca de DNAc del tálamo humano, dando como resultado un clon completo el cual codificó un

GPCR de 445 aa. El análisis filogenético mostró una baja homología (20%) con el H<sub>1</sub>R y el H<sub>2</sub>R, y una similitud del 60% con el H<sub>4</sub>R (Parsons y Ganellin, 2006, Leurs et al., 2005).

El gen que codifica al hH<sub>3</sub>R se encuentra en el cromosoma 20q13.33, y consta de tres o cuatro exones y de dos o tres intrones, generando 20 isoformas por procesamiento alternativo (*alternative splicing*) con diferencias en la longitud en los extremos carboxilo y amino, así como diferencias de aa en la tercera asa intracelular y eliminación de secuencias en las regiones transmembranales (Bongers et al., 2007; Panula et al., 2015; Gálvez y Arias Montaña 2016), como se ilustra en la Figura 3.

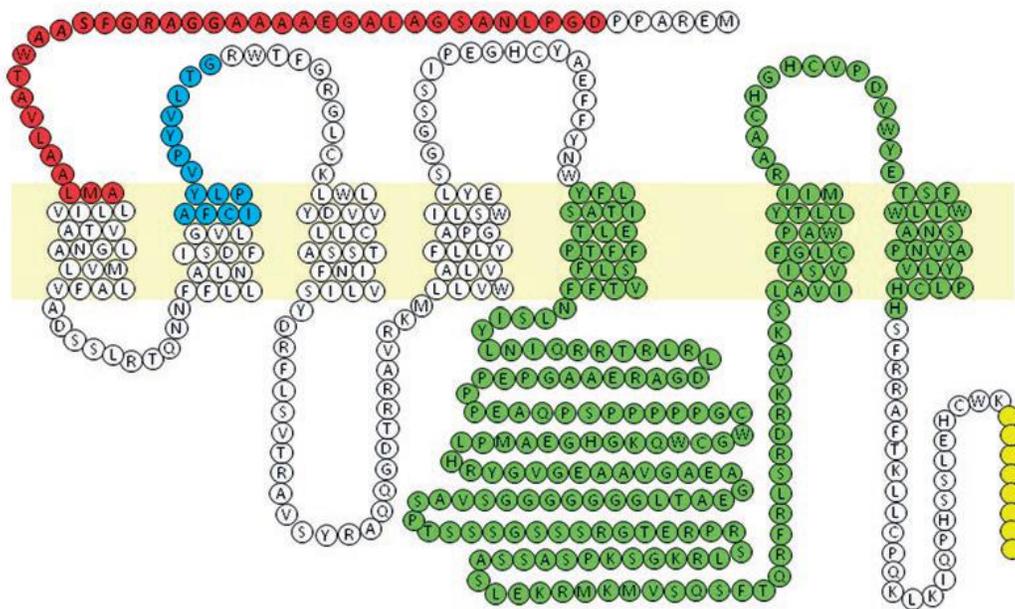


Figura 3. **Representación esquemática del hH<sub>3</sub>R.** Las regiones del procesamiento alternativo se indican con diferentes colores. Tomado de García-Gálvez y Arias-Montaña, 2016.

**Actividad constitutiva del H<sub>3</sub>R.** Los H<sub>3</sub>R, tanto nativos como expresados en sistemas heterólogos, muestran actividad constitutiva o espontánea, debida a una secuencia de 12 aa en el extremo carboxilo de la tercera asa intracelular. Como consecuencia los autorreceptores H<sub>3</sub> ejercen un control tónico inhibitorio en la síntesis y liberación de la histamina (Aquino-Miranda y Arias Montaña, 2012).

## 5. Transducción de señales del H<sub>3</sub>R.

El H<sub>3</sub>R se acopla a proteínas G $\alpha_{i/o}$ , y su estimulación conduce a diferentes vías de señalización (Figura 4): las subunidades G $\alpha_{i/o}$  reducen la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje tipos N y P/Q, inhiben la formación del AMPc y al intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE) y los complejos G $\beta\gamma$  activan las vías de la fosfolipasa C, de la 3-cinasa de fosfatidil-inositol (PI3K) y de las MAPKs, estimulan a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), y activan a los canales de potasio rectificadores entrantes (GIRKs) (Nieto-Alamilla et al., 2016).

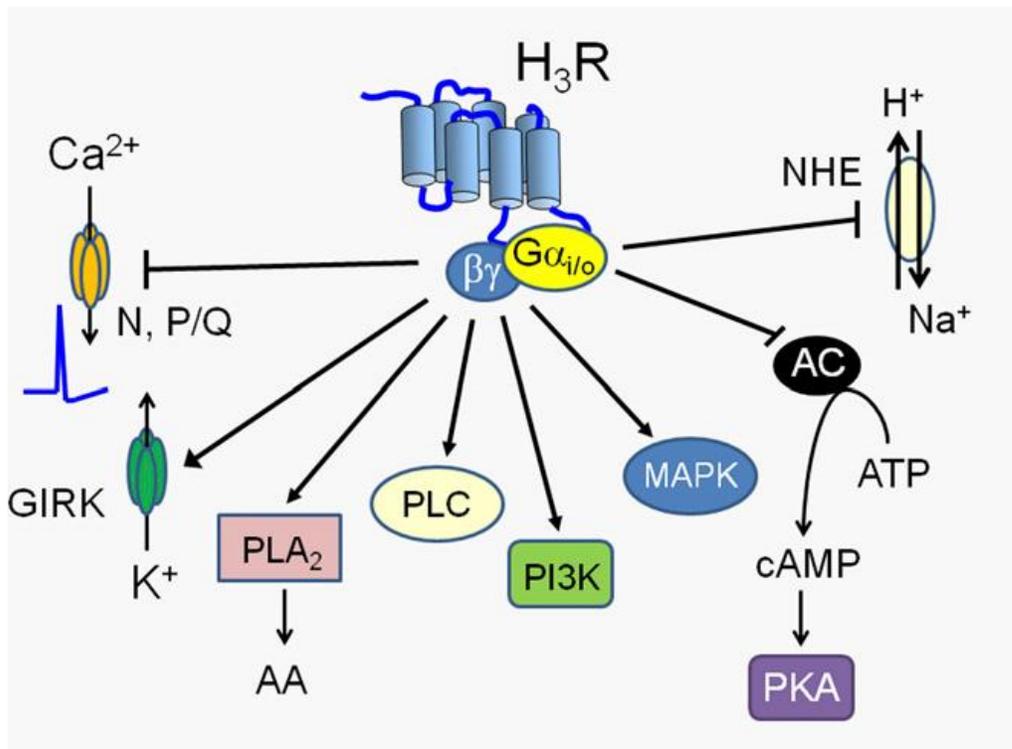


Figura 4. **Vías de señalización del H<sub>3</sub>R.** Se esquematizan las vías activadas o inhibidas por las subunidades G $\alpha_{i/o}$  y los complejos G $\beta\gamma$ . AC, adenilil ciclasa; AMPc, 3-5-monofosfato cíclico de adenosina; GIRKs, canales de K<sup>+</sup> rectificadores de entrada activados por proteínas G; AA, ácido araquidónico; NHE, intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; PI3K, 3-cinasa de fosfatidilinositol; PKA, cinasa A de proteínas; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub>; PLC, fosfolipasa C; MAPK, cinasas de proteína activada por mitógenos. Tomado de Nieto-Alamilla et al., 2016.

**Inhibición de la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje N y P/Q.** En esta vía de señalización están implicados los complejos  $\text{G}\beta\gamma$ , los cuales inhiben la apertura de canales N y P/Q uniéndose a la subunidad  $\alpha_1$  que forma el poro de dichos canales y reduciendo así la liberación de neurotransmisores, efecto abolido por la toxina de *Bordetella pertussis*, PTX y por inhibidores de los complejos  $\text{G}\beta\gamma$  (Panula et al., 2015).

**Inhibición de la formación de AMPc.** La estimulación de los  $\text{H}_3\text{Rs}$  inhibe las adenilil ciclasas, disminuyendo la formación de AMPc y por consiguiente la activación de la PKA, la cual participa en diversas vías de señalización que conducen a diferentes respuestas biológicas; por ejemplo, plasticidad sináptica y expresión génica. Este efecto fue evidenciado expresando el DNAc del  $\text{H}_3\text{R}$  en células SK-N-MC observándose inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina, efecto abolido por la PTX (Bongers et al., 2007).

**Inhibición del NHE.** Este intercambiador es importante para restaurar el pH intracelular después de la acidosis inducida por isquemia, mediante el intercambio de un ion  $\text{H}^+$  intracelular por un ion  $\text{Na}^+$  extracelular. El aumento de  $\text{Na}^+$  puede invertir la vectorialidad del transportador de noradrenalina dependiente de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (NET) conduciendo a la liberación de neurotransmisores, y esta vía se propone como el mecanismo por el cual el  $\text{H}_3\text{R}$  inhibe la liberación excesiva de noradrenalina durante la isquemia miocárdica al disminuir la actividad del NHE (Haas et al., 2008).

**Activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ).** La estimulación del  $\text{H}_3\text{R}$  activa a la  $\text{PLA}_2$  induciendo la liberación de ácido araquidónico y ácido docosahexaéico, así como de lisofosfolípidos, los cuales son sustratos de la síntesis de mediadores lipídicos como el factor activador de plaquetas, los eicosanoides y el 4-hidroxinonanal, este último un metabolito altamente citotóxico que aumenta en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Bongers et al., 2007; Nieto-Alamilla et al., 2016).

**Activación de canales de potasio de rectificación interna activados por proteínas G (GIRKs).** Los complejos  $\text{G}\beta\gamma$  activan los canales GIRKs, representando un mecanismo adicional para la modulación inhibitoria por los  $\text{H}_3\text{Rs}$  de la liberación de neurotransmisores (Ramos-Jiménez et al., 2009).

**Activación de la PLC.** Canónicamente la activación de la PLC y la formación de los segundos mensajeros IP<sub>3</sub> y DAG se debe a la subunidad G $\alpha$  de las proteínas G $\alpha_{q/11}$ , pero los complejos G $\beta\gamma$  de las proteínas G $\alpha_{i/o}$  también pueden activarla (Nieto-Alamilla et al., 2016) mediante su unión a una región (dominios PH e Y) diferente del dominio de unión de la subunidad G $\alpha_{q/11}$  (dominio C2 y carboxilo terminal), dando como resultado el incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por liberación de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares mediante la formación de IP<sub>3</sub>.

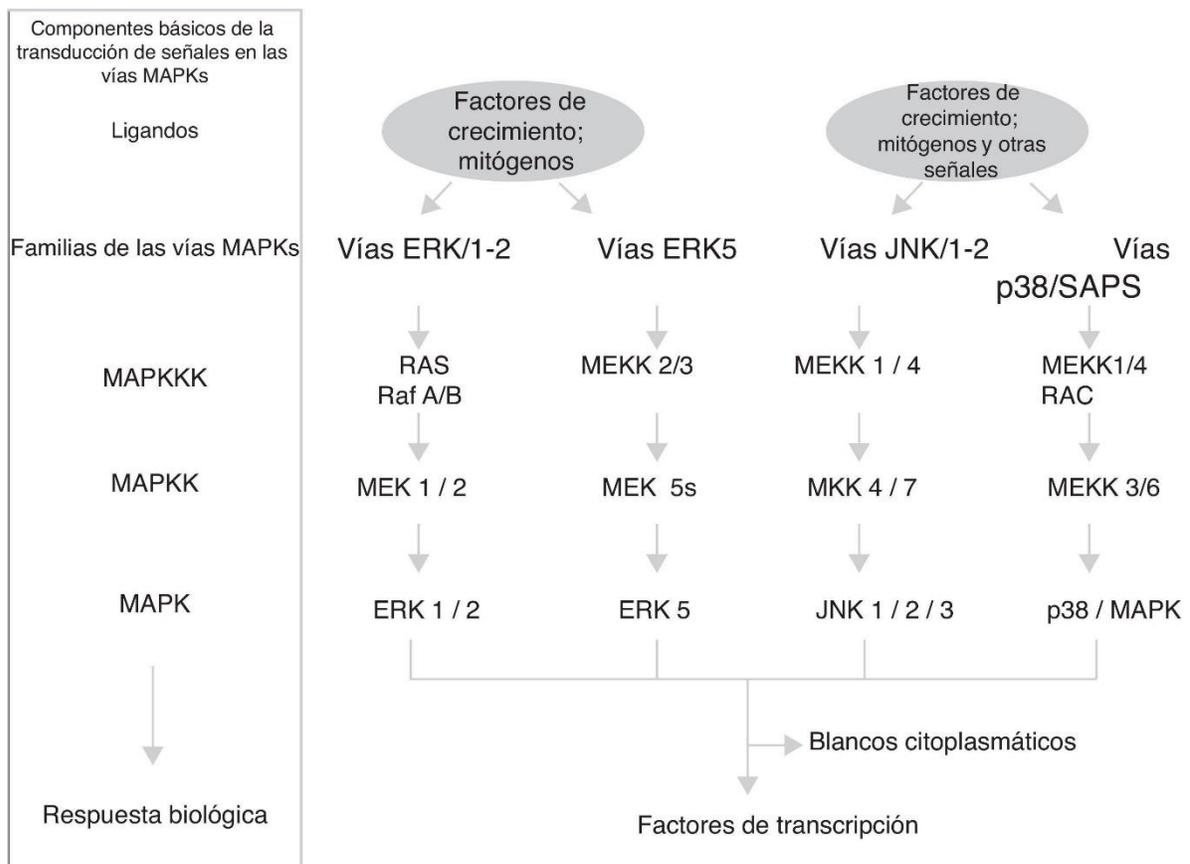
**Activación de la vía de la PI3K.** La activación del H<sub>3</sub>R induce la fosforilación de la PKB (también conocida como Akt) en los aa Serina<sup>473</sup> y Treonina<sup>308</sup>, y la fosforilación en la Serina<sup>9</sup> de la cinasa 3 de la sintasa de glucógeno (GSK-3 $\beta$ ). La cinasa Akt está implicada en el desarrollo y función neuronal, y la cinasa GSK-3 $\beta$  es relevante en diferentes funciones cerebrales (Bongers et al., 2007).

**Activación de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs).** En células COS-7, HEK-293 y CHO-K1 transfectadas establemente con el H<sub>3</sub>R, la activación del receptor estimula la fosforilación de ERK-1/2, pertenecientes a las vías de las MAPKs, efecto también observado en sistemas nativos. La inhibición de los complejos G $\beta\gamma$  con la transfección de la proteína G $\alpha_t$  (transducina) previno el efecto en las células HEK293 transfectadas (Lai et al., 2016).

Las MAPKs cinasas son una familia de cinasas de Serina/Treonina citoplasmáticas evolutivamente conservadas, las cuales desempeñan una función crítica en la traducción de señales extracelulares a respuestas intracelulares. Se han caracterizado tres familias de MAPKs: 1) las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK-1/2), 2) las cinasas c-JUN N-terminal (JNK/SAPK), y 3) las cinasas p38. Cada cascada de señalización de las MAPKs incluye tres cinasas: una MAPK cinasa cinasa (MAPKKK), una MAPK cinasa (MAPKK) y una MAPK. La activación de las MAPKKK normalmente se debe a interacción con una proteína GTPasa pequeña o a fosforilación por cinasas corriente abajo de los receptores de la superficie celular (Zhang y Liu 2002; Guo et al., 2007).

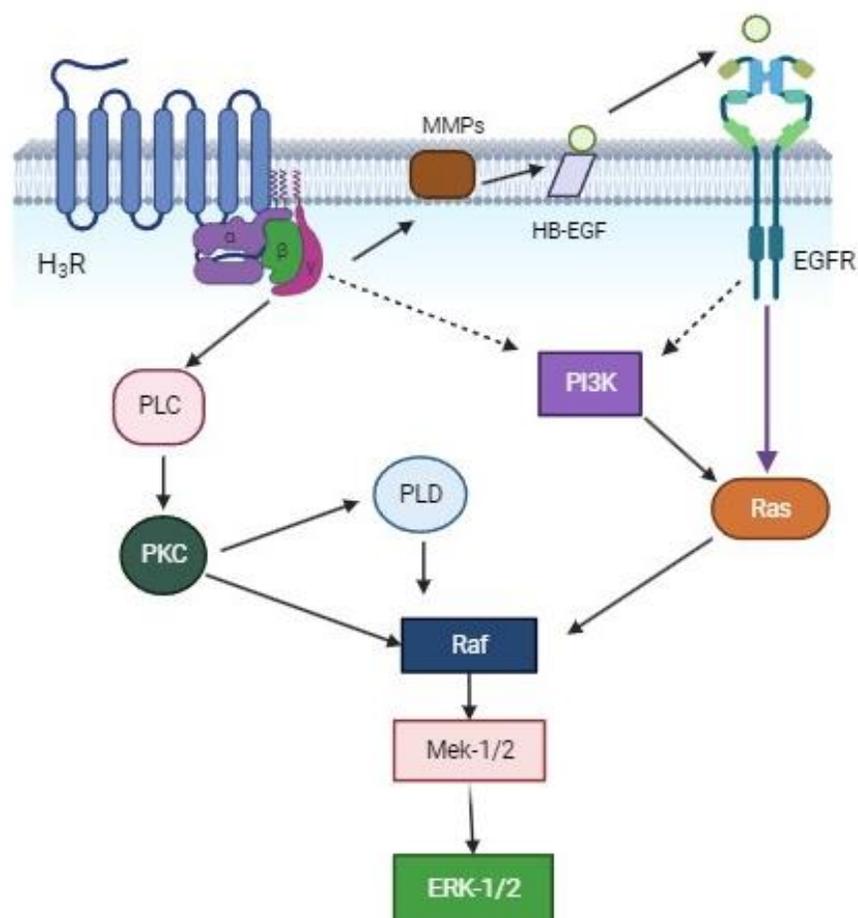
Las MAPKKK fosforilan y activan directamente a MAPKK, cinasas intermediarias de doble función, que a su vez fosforilan y activan a las MAPK efectoras (Figura 5). La vía canónica de las cinasas ERK-1/2 está constituida por tres cinasas: las cinasas B-Raf y C-Raf/Raf-1 (MAPKKK), las cinasas MEK-1/2 (MAPKK) y las cinasas efectoras ERK-1/2 (MAPK). La

señalización por ERK-1/2 participa en funciones importantes como la proliferación y la diferenciación celulares, la apoptosis, la plasticidad neuronal, y los procesos de aprendizaje y memoria. Las ERK-1/2 pueden ser activadas por diferentes vías de señalización, incluidos los receptores con actividad de cinasa de Tirosina (RTKs), los GPCRs, protooncogenes y por los sistemas de señalización MAPK activados por estrés (Morrison 2012; Luttrell y Luttrell, 2003).



**Figura 5. Representación de los componentes principales de las vías de las MAPKs.** Cada cascada es estimulada por señales extracelulares particulares y conduce a la activación de una MAPK particular. Tomado de Valdespino-Gómez et al., 2015.

La activación de ERK-1/2 por GPCRs frecuentemente involucra la fosforilación de RTKs y la activación de GTPasas de la familia Ras; sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuáles la activación del H<sub>3</sub>R estimula esta vía aún no se conocen del todo, proponiéndose algunas posibilidades, representadas en la Figura 6 (Lia et al., 2016).



**Figura 6. Representación de las posibles vías de estimulación de ERK-1/2 por activación de GPCRs acoplados a proteínas Gα<sub>i/o</sub>.** La activación del GPCR induce la disociación de los complejos Gβγ de las subunidades Gα<sub>i/o</sub>, los cuales pueden estimular las vías de la fosfolipasa C (PLC)/PKC y de la PI3K, así como la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por activación de metalopeptidasas de matriz extracelular (MMP). Tomado de Lai et al., 2016.

## 6. Planteamiento del problema.

El H<sub>3</sub>R está acoplado a proteínas G $\alpha_{i/o}$ , cuya activación disocia al heterotrímero G $\alpha_{i/o}\beta\gamma$  en la subunidad G $\alpha_{i/o}$  y el dímero G $\beta\gamma$ . Los complejos G $\beta\gamma$  activan diferentes vías de señalización intracelular, una de ellas la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). La cascada de transducción de las MAPKs sigue la secuencia: Ras  $\rightarrow$  Raf  $\rightarrow$  MEK  $\rightarrow$  ERK, y las cinasas de proteínas ERK-1/2 se translocan al núcleo celular donde regulan la transcripción de genes relacionados con la adhesión, la migración, la supervivencia y la proliferación, entre otros.

En sistemas heterólogos (células CHO-K1, COS-7 y HEK-293; Herón et al., 2001; Giovannini et al., 2003; Flores-Clemente et al., 2013; Lai et al., 2016), así como en neuronas corticales de la rata en cultivo primario (Lai et al., 2016), la activación del H<sub>3</sub>R induce la fosforilación de ERK-1/2. Datos de nuestro laboratorio (Flores-Clemente et al., 2013) indican que en células CHO-K1 la activación del H<sub>3</sub>R humano (hH<sub>3</sub>R) induce la fosforilación de ERK-1/2 con un patrón temporal rápido, con un pico a los 2.5-5 min, lo que sugiere la participación de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ , y específicamente de los complejos G $\beta\gamma$ . Sin embargo, los mecanismos celulares subsecuentes que participan en la activación de ERK-1/2 no están del todo establecidos.

Se han propuesto varias vías como responsables de la fosforilación y activación de ERK-1/2 inducidas por la estimulación de receptores acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ , como el H<sub>3</sub>R (Figura 6; Lai et al., 2016): a) la vía PLC/PKC, ya que la activación del H<sub>3</sub>R induce un aumento significativo en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en células CHO y SK-N-MC transfectadas, indicativo de la activación de la PLC; b) la vía de la PI3K, dado que en células SK-N-MC transfectadas la activación del H<sub>3</sub>R estimula el eje Akt/GSK-3 $\beta$  de manera dependiente de la PI3K, y c) la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por activación de metalopeptidasas de matriz extracelular (MMPs), que escinden al factor de crecimiento epidérmico (EGF) de la heparina (Hb-EGF) permitiendo su unión al EGFR y la subsecuente dimerización y activación de este receptor (Palanisamy et al., 2021).

Por lo anterior, en este proyecto planteamos estudiar las vías involucradas en la activación de ERK-1/2 en respuesta a la estimulación del hH<sub>3</sub>R en células CHO-K1 establemente transfectadas, iniciando con la evaluación de la vía PLC/PKC ya que en células CHO (precursoras de la línea CHO-K1) establemente transfectadas la activación del hH<sub>3</sub>R induce aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> indicando la activación de la PLC.

## **7. Hipótesis**

La activación del hH<sub>3</sub>R induce la fosforilación de ERK-1/2 mediante la estimulación de la vía PLC/PKC por los complejos Gβγ de las proteínas Gα<sub>i/o</sub>.

## **8. Objetivos**

### **8.1. Objetivo general.**

Determinar la participación de los complejos βγ de las proteínas Gα<sub>i/o</sub> y la vía PLC/PKC en la activación de ERK-1/2 inducida por la estimulación del hH<sub>3</sub>R expresado en células CHO-K1.

### **8.2. Objetivos específicos**

1. Corroborar que la activación del hH<sub>3</sub>R induce la fosforilación de ERK-1/2 en células CHO-K1 transfectadas, mediante el uso de agonistas y antagonistas selectivos.
2. Determinar la participación de la vía PLC/PKC evaluando la movilización de Ca<sup>2+</sup> por activación del hH<sub>3</sub>R y el uso de inhibidores farmacológicos (PLC: U73122; PKC: Gö-6983 y Gö-6976).
3. Determinar la participación de los complejos Gβγ mediante inhibición farmacológica (galeína) y la transfección de un secuestrador de los complejos (βARK1).
4. En su caso, determinar mediante inhibidores farmacológicos la participación de otras vías de señalización como la activación de la vía Src/PI3K/PDK1.

## **9. Materiales y métodos**

### **9.1. Cultivo celular**

Se utilizaron células CHO-K1 establemente transfectadas con el hH<sub>3</sub>R (211 ± 12 fmol/mg proteína; García-Gálvez et al., 2017), las cuales se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (DMEM-F12), suplementado con suero fetal bovino al 10%, 1% de antibióticos (AA; concentraciones finales: 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 0.25 µg/ml de anfotericina B) y el antibiótico de selección geneticina (G-418, 400 µg/ml) incubándose a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

### **9.2. Incubación con agonistas, antagonistas, activadores e inhibidores**

Para evaluar la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R, las células se sembraron en cajas de 6 pozos. Después de 24 h y con una confluencia celular del 90% el medio se substituyó por medio DMEM/F12 con G-418 (400 µg/ml) y AA (1%), sin suero, incubándose por 16 h.

Las células se lavaron con solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH) a 37°C, se agregaron 1.96 ml de la misma solución a cada pozo y se incubó durante 15 min a 37°C, antes de adicionar en un volumen de 20 µl los agonistas del H<sub>3</sub>R (histamina, impropip e imetit; concentración final 100 nM), ATP (activador de receptores purinérgicos P2Y<sub>2</sub>; 10 µM) o TPA (éster de forbol mimético del DAG que activa directamente a las isoformas clásicas y nuevas de la PKC; 200 nM). Cuando se requirió, los siguientes fármacos se agregaron en un volumen de 20 µl, 15 min antes de los agonistas: a) antagonistas selectivos del H<sub>3</sub>R (clobenpropit y yodofenpropit, 1 µM como concentración final); b) el inhibidor de la PLC U73122 o su análogo inactivo U73343 (10 µM); c) los inhibidores de la PKC Gö-6976 o Gö-6983 (1 µM); d) el inhibidor de PI3K wortmanina (100 nM); e) galeína, inhibidor de los complejos Gβγ (10 µM); f) BX-795, inhibidor de PDK1 (100 nM); g) PP2 inhibidor de Src (10µM).

La composición de la solución KRH fue (en mM): NaCl 113, HEPES 20, NaHCO<sub>3</sub> 25, D-glucosa 15, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.2 y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2. El pH se ajustó a 7.4 con una solución de NaOH.

Al término de la incubación se aspiró la solución KRH y se adicionaron 200 µl de solución RIPA (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10% desoxicolato, 10% SDS, 1% glicerol) conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini Roche, dilución 1:50) y fosfatasas (dilución 1:500). Después de 10 min sobre hielo, los lisados celulares se sonicaron (2 veces, 10 s) y se centrifugaron durante 10 min a 16,000xg a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método del ácido bicinonínico (BCA), para después adicionar solución amortiguadora de carga (6X) e incubar a 90°C durante 5 min.

### **9.3. Inmunodetección de ERK-1/2 fosforiladas (p44/42-ERK) por *Western blot***

Las muestras de los extractos proteicos (15 µg de proteína) se resolvieron por SDS-PAGE al 10%, y las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), las cuales se bloquearon durante 1 h con leche descremada en polvo al 5% en una solución Tris-Tween-20 (0.1% v:v; T-BST). Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos monoclonales primarios anti-fosfo-42/44-ERK-1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) o anti-42/44-ERK-1/2, generados en el conejo (Cell Signaling Technology), a una dilución 1:2000 en T-BST con 1.5% de BSA.

Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces durante 10 min con T-BST y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-conejo de cabra acoplado a HRP; dilución 1:10000 en T-BST/BSA al 3%) durante 1 h a 22°C. Las membranas se enjuagaron con T-BST, se revelaron con quimioluminiscencia y la señal se cuantificó por análisis de densitometría con el programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH) utilizando el equipo C-DiGit Blot Scanner LI-COR. Las bandas de interés se expresaron cuantitativamente mediante la normalización con la intensidad de la señal de ERK-1/2 total en una membrana diferente procesada en paralelo.

### **9.4. Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R**

Una vez que las células alcanzaran una confluencia de ~80 % se levantaron mediante la incubación con una solución de tripsina (500 mg/l), la suspensión se centrifugó a 100xg, por 3 min, y la pastilla se re-suspendió en 5 ml de solución KRH. La densidad de las células y la

viabilidad se determinaron con un contador automático Countess (Invitrogen) en presencia de azul de tripano.

Para determinar la actividad del inhibidor de PLC U73122 y su análogo inactivo U73343, se evaluó la  $[Ca^{2+}]_i$ . La suspensión celular se dividió en alícuotas de  $2 \times 10^6$  células/ml, que se incubaron por 1 h en la oscuridad y a temperatura ambiente en solución KRH que contenía el indicador fluorescente Fura 2-AM (1  $\mu$ M) y probenecid (10 mM; inhibidor de los transportadores de aniones orgánicos). Finalizado el tiempo de incubación las células se centrifugaron para eliminar el indicador no exceso de colorante, y se re-suspendieron en solución KRH conteniendo probenecid.

La evaluación de la  $[Ca^{2+}]_i$  se realizó a temperatura ambiente determinando la emisión de fluorescencia del Fura 2 ( $\lambda$  510 nm) después de la excitación a 340 o 380 nm. Los datos se expresan como el cociente de fluorescencia F (380 nm) / F (340 nm), y en su caso como el aumento en el cociente de fluorescencia sobre el valor basal ( $\Delta F/F_0$ ).

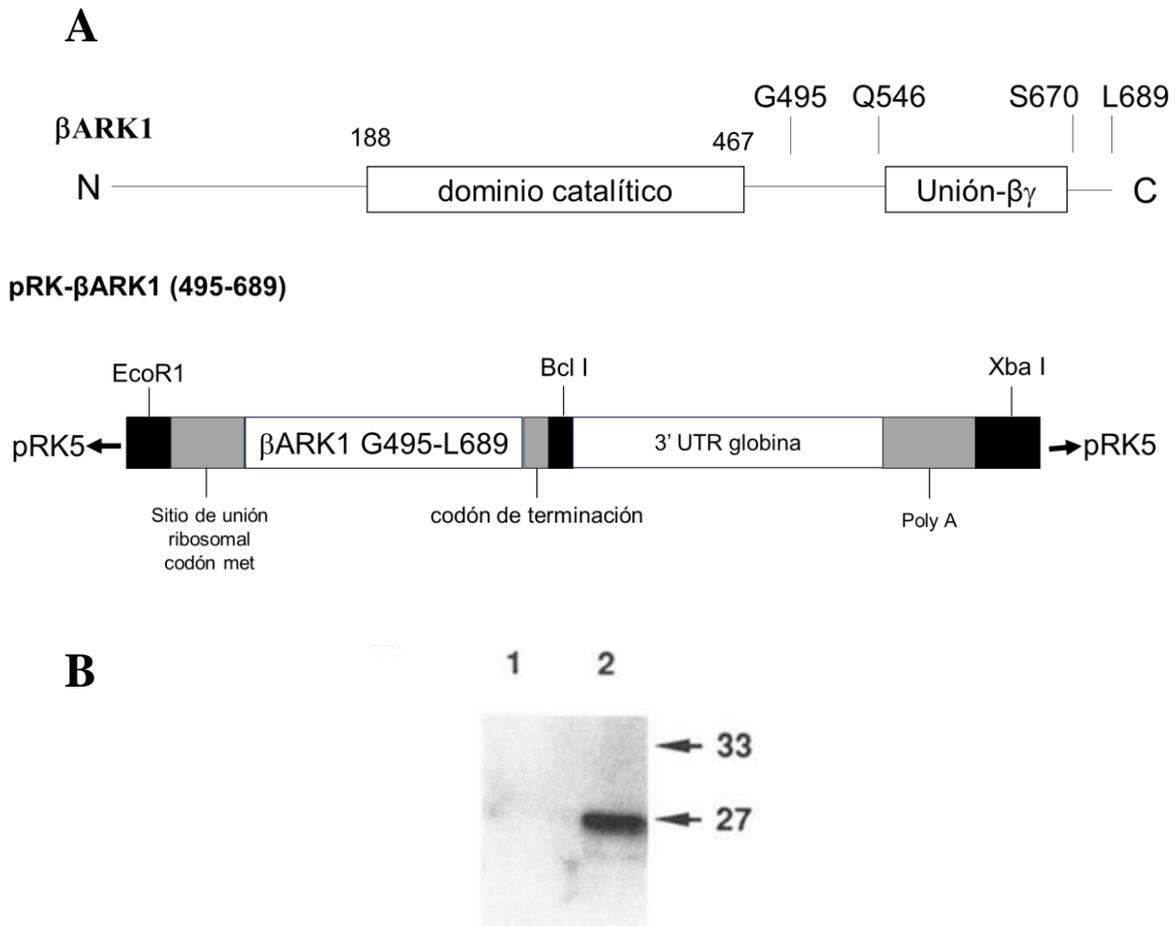
El Fura 2-AM (éster acetoximetílico de Fura-2) es un indicador fluorescente radiométrico selectivo para iones de calcio y la forma des-esterificada tiene una constante de disociación por calcio ( $K_d$  145 nM) cercana a la  $[Ca^{2+}]_i$  basal (100 nM). El Fura 2-AM atraviesa las membranas celulares y las esterasas citoplasmáticas rápidamente hidrolizan sus grupos acetoximetilo generando al colorante activo Fura 2, sensible a  $Ca^{2+}$ .

## **9.5. Transfección del extremo carboxilo de la GRK-2 en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R**

### **9.5.1. Amplificación del plásmido pRK5- $\beta$ ARK1-ct (465-689)**

El plásmido (Figura 7) fue generado en el laboratorio de R. J. Lefkowitz (Koch et al., 1994) y fue obtenido del laboratorio del Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes (Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN). A 200  $\mu$ l de bacterias competentes (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ) se adicionaron 8 ng del plásmido pRK- $\beta$ ARK1 y la suspensión bacteriana se incubó durante 30 min en baño de hielo-agua antes de un choque térmico (42°C durante 45 s). Se adicionaron 800  $\mu$ l de medio Luria-Bertani (LB) conteniendo ampicilina (75  $\mu$ g/ml) y se incubó durante 1 h a 37°C, con agitación, para permitir su recuperación. Finalmente 100  $\mu$ l de la suspensión

bacteriana se sembraron en cajas de Petri (100 mm de diámetro) con agar/medio LB con ampicilina (100 µg/ml) incubando durante 14 h a 37°C.

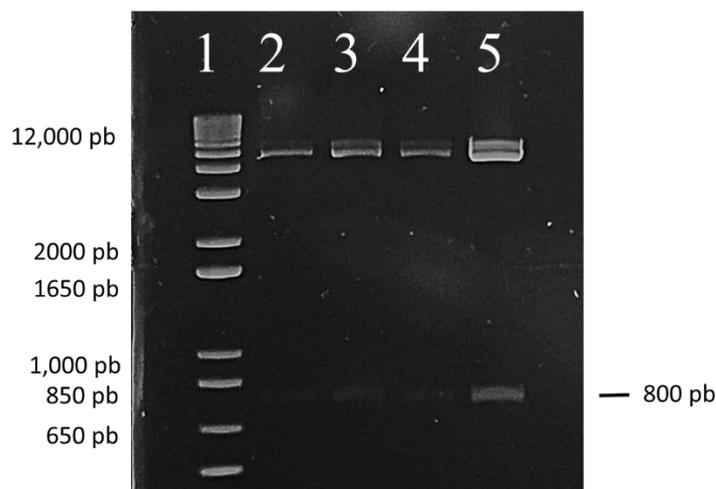


**Figura 7. Estructura del plásmido pRK5-βARK1-ct (495-689).** **A)** El panel superior muestra esquemáticamente la estructura de la cinasa βARK1 (GRK-2) ilustrando los dominios amino y carboxilo terminales, y la región catalítica. El DNA que codifica el extremo Gln<sup>495</sup>-Leu<sup>689</sup> se subclonó como un minigene en el vector pRK para generar el plásmido pRK-βARK1-(495-689) o pRK-βARK1-ct, que se muestra en el panel inferior. UTR, región no traducida. **B)** Inmunoblot de un extracto proteico citosólico de células COS-7 transfectadas con el plásmido pRK-βARK1-ct mostrando la expresión del βARK1-ct. Carril 1: extracto de células transfectadas con el vector pRK5 vacío; carril 2: extracto de células transfectadas con el plásmido pRK-βARK1-ct. Se indican los marcadores de masa molecular (kilodaltons). Modificado de Koch et al., 1994.

Se seleccionaron 4 colonias que se transfirieron a tubos de vidrio estériles conteniendo 5 ml de medio LB/ampicilina para incubar a 37°C con agitación vigorosa (200 rpm) durante toda la noche. Al terminar este periodo, se realizó una lisis alcalina para la obtención del plásmido: 1.5 ml de la suspensión bacteriana se colocaron en un tubo Eppendorf, se centrifugó (13,000 rpm, 1 min) y se descartó el sobrenadante; la pastilla se re-suspendió en 200 µl de solución I (D-glucosa 50 mM, Tris 25 mM y EDTA 10 mM pH 8.0), se agregaron 400 µl de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión de los tubos y se incubó sobre hielo durante 5 min. Se agregaron 300 µl de la solución III (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 5 M, CH<sub>3</sub>COOH en agua MiliQ), se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, y el sobrenadante (800 µl) se transfirió a un tubo Eppendorf. Se adicionaron 480 µl de isopropanol para precipitar el DNA incubando a temperatura ambiente por 15 min; se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Después de centrifugar a 13,000 rpm por 5 min, el sobrenadante se descartó y la pastilla se re-suspendió en 50 µl de agua libre de endonucleasas. El DNA obtenido de cuatro suspensiones bacterianas se analizó por digestión enzimática utilizando las enzimas EcoRI y XbaI en reacciones de 10 µl de volumen final conteniendo DNA plasmídico, enzimas, soluciones amortiguadoras (New England, *cut smart* 10X y NEBuffer 2 10X), BSA y agua (Tabla 1). Los tubos se colocaron en un *mixing block* y se incubaron a 37°C por 1 h, después de lo cual el resultado de la reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 8).

**Tabla 1. Composición de la reacción de restricción del plásmido pRK-βARK1-ct.**

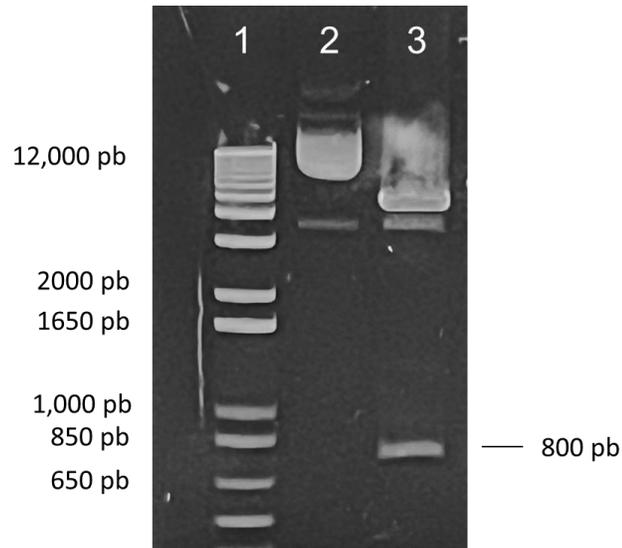
	Volumen	<i>mix</i>
DNA plasmídico (pRK-βARK-ct)	3 µl	
EcoRI	0.25 µl	1 µl
XbaI	0.25 µl	1 µl
Buffer	1 µl (10X)	4 µl
BSA	1 µl (10X)	4 µl
H <sub>2</sub> O	4.5 µl	18 µl



**Figura 8. Restricción enzimática del plásmido pRK5-βARK1-ct (495-689).** El DNA se incubó con las enzimas EcoRI y XbaI, y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de pares de bases; Carriles 2-5: plásmido pRK5-βARK1-ct, proveniente de cuatro suspensiones bacterianas diferentes.

Para obtener un plásmido con la calidad adecuado para la transfección celular, el DNA del tubo 4 se diluyó (1:1000) y con esta solución se transformaron nuevamente bacterias competentes con 20 ng del DNA plasmídico como se describió antes. Se seleccionó una colonia que se transfirió a un tubo de vidrio estéril conteniendo 2 ml de medio LB/ampicilina para incubarse a 37°C con agitación vigorosa (200 rpm) durante 4 h. El volumen se transfirió a un matraz conteniendo 100 ml de medio LB/ampicilina y se incubó durante 16 h a 37°C con agitación vigorosa. Posteriormente, la suspensión bacteriana se centrifugó a 5000xg por 10 min, se eliminó el sobrenadante por decantación y se utilizó el *kit* Promega PureYieldPLasmid para la purificación del plásmido. El producto se analizó por digestión enzimática utilizando las enzimas EcoRI y XbaI en reacciones de 10 µl de volumen conteniendo DNA plasmídico, enzimas, soluciones amortiguadoras (New England, cut smart 10X y NEBuffer 2 10X), BSA y agua como se indicó en la Tabla 1. El resultado se ilustra en la Figura 9, destacándose una banda de ~800 pb que corresponde al tamaño del minigen de interés (βARK-ct). Posteriormente se cuantificó el DNA plasmídico con un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000) a una longitud de onda de 220-350 nm.

A



B

```
aattcggcgccaccatgggaatcaagctactggacagtgaccaggagctctaccgcaacttccccctgaccatct  
cggagcggtagcagcaggaggttagcagagactgtctttgacaccatcaatgctgagacggaccggctggaggccc  
gcaagaaaacaaaacaagcagttgggccacgaggaagactacgccctgggcaaggactgcatcatgcatggctac  
atgtccaagatgggcaacccttctgaccagtgagcggcggtacttctacctgttccctaaccggctcgag  
tggcggggcgagggcgaggccccgcagagcctgctgacatggaggagatccagtcggtggaggagacgcgagatca  
aggagcgaagtgctcctcctcaagatccgaggtggcaagcagttgtcctgcagtcgcatagtgaccagagc  
tggtgcagtggaagaaggagcttcgagacgcctaccgcgaggccagcagctagtgcagcgggtgccaagatgaa  
gaacaagccgcgctcgcccgtcgtggagctgagcaaggtgccactgatccagcgcggcagtgccaacggcctcta  
atgatcagctcgcttcttgctgtccaatttctattaaaggttcttgttccctaagtccaactactaaactgg  
gggatattatgaagggccttggcatctggattctgcctaataaaaaacatttattttcattgcatgatgtatta  
atctaga
```

```
FAATMGIKLLSDQELYRNFPLTISERWQQEVAVTFDTINAETDRLEARKKTKQAVGPRGRLRPGQLHHAWLHVQD  
GQPLPDPVAAAALLPVPPARVAGRGRGPAEPADMEEQSVEETQIKERKCLLLKIRGGKQFVLQCDSDPELVQWKEL  
RDAYREAQQLVQRVPRRTSRARPSWSARCHSSAAVPTASNDQLAFLLSNFYRFLCSLSPTTKLGDIMKGLGIWILPNK  
KHLFSLHDVFNL
```

Figura 9. **Restricción enzimática y secuencia de nucleótidos y de aa del plásmido pRK-βARK1-(495-689).** A) Electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. El DNA se incubó con las enzimas EcoRI y XbaI. Carril 1: Marcadores de pares de bases; Carril 2: vector; Carril 3: plásmido pRK-βARK1-ct. B) Secuencia de nucleótidos. El cuadro rojo indica el sitio de restricción de EcoRI (rojo). Se indican también el codón de inicio (amarillo), el residuo de Glicina<sup>495</sup> (rosa), y el sitio de restricción de XbaI (verde). El cuadro azul muestra la secuencia de aa. La secuencia se obtuvo de Addgene ([www.addgene.org/14695/](http://www.addgene.org/14695/)).

### 9.5.2. Transfección transitoria de células CHO-K1-hH3R con el plásmido pRK5-βARK1-ct

Las células se cultivaron en cajas de 6 pozos con medio DMEM-F12 con SFB al 10%, 1% de AA y G-418, hasta alcanzar una confluencia del 75-80%. Después de 24 h se realizó el siguiente protocolo: en 6 tubos Eppendorf de 1.5 ml se adicionaron diferentes concentraciones del plásmido vacío pcDNA3.1, del plásmido βARK-ct, de *enhancer* (2 μl:1 μl DNA), y de medio DMEM/F12 sin SFB, como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones para la transfección del plásmido pRK-βARK1-ct en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.**

Tubos	Condición	pcDNA3.1	pRK-βARK1-ct	Enhancer	Medio
1	Control	---	---	---	---
2	Mock (5 μg)	5 μl	---	5 μl	240 μl
3 y 4	βARK-ct (1.25 μg)	2.5 μl	10 μl	5 μl	232.5 μl
5 y 6	βARK-ct (2.5 μg)	---	20 μl	5 μl	225 μl

Las concentraciones de los plásmidos fueron: pcDNA3.1 0.5 μg/μl, pRK-βARK-ct 0.1247 μg/μl.

En un segundo tubo Eppendorf se colocaron 40 μl de Lipofectamina 3000 (3 μl: 1 μg DNA) y 760 μl de medio DMEM/F12 sin SFB. A cada uno de los tubos 1-6 se le adicionaron 133.3 μl de la mezcla de Lipofectamina 3000 y medio DMEDM/F12 y se incubó durante 15 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 350 μl de esta mezcla al cultivo celular y se incubó durante 6 h a 37°C, al cabo de las cuales se retiró el medio y se añadieron 2 ml de medio DMEM/F12 suplementado con SFB, antibióticos y G-418, incubando por 42 h adicionales.

Para determinar la transfección del plásmido  $\beta$ ARK-ct en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R, se obtuvieron extractos celulares, las proteínas se resolvieron con SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), las cuales se bloquearon durante 1 h con leche descremada en polvo al 5% en una solución Tris-Tween-20 (0.1% v:v; T-BST). Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-GRK-2/3 de conejo (Santa Cruz Biotechnology), a una dilución 1:5000 en T-BST con 3% de BSA. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces durante 10 min con T-BST y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-conejo de cabra acoplado a HRP; dilución 1:10000 en T-BST/BSA al 3%) durante 1 h a 22°C. Las membranas se lavaron tres veces con T-BST, y se revelaron con quimioluminiscencia.

### 9.5.3. Transfección del $\beta$ ARK-ct en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R

Las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R se sembraron en cajas de 6 pozos un día antes de la transfección, para obtener una confluencia del 70-80%. El día de la transfección se sustituyó el medio por medio sin SFB, sin AA y sin G-418, y se realizó el siguiente protocolo (Tabla 3): para dos cajas de 6 pozos, en un tubo de 15 ml (A; transfección *mock*) se colocaron 32.5  $\mu$ l de pcDNA3.1, 65  $\mu$ l de *enhancer* y 1.2 ml de medio, y en un segundo tubo (B) se preparó una mezcla de 130  $\mu$ l del plásmido pRK- $\beta$ ARK1-ct, 65  $\mu$ l de *enhancer* y 1.1 ml de medio. En un tercer tubo (C) se mezclaron 90  $\mu$ l de Lipofectamina 3000 y 1.8 ml de medio no suplementado. Se tomaron 900  $\mu$ l de la mezcla del tubo C para añadirlos a cada uno de los tubos A y B, y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se adicionaron 350  $\mu$ l de la mezcla del tubo A a los primeros tres pozos (*mock*) y 350  $\mu$ l de la mezcla del tubo B a los últimos tres pozos (pRK- $\beta$ ARK1-ct). Las células se mantuvieron por 6 h a 37°C en la incubadora, se retiró el medio y se agregaron 2 ml de medio DMEM-F12 suplementado con SFB, AA y G-418. Después de 42 h se realizaron los experimentos correspondientes. La Figura 10 muestra la detección por Western blot de la expresión de  $\beta$ ARK1-ct.

**Tabla 3. Protocolo para la transfección del  $\beta$ ARK1-ct en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.**

Tubos	Condición	Concentración final	Volumen	Enhancer	Medio
A. Mock	pcDNA 3.1 (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ g/ $\mu$ l	32.5 $\mu$ l	65 $\mu$ l	1200 $\mu$ l
B. pRK- $\beta$ ARK1-ct	$\beta$ ARKct (0.1247 $\mu$ g / $\mu$ l)	2.5 $\mu$ g / $\mu$ l	130 $\mu$ l	65 $\mu$ l	1100 $\mu$ l
C. Lipofectamina			90 $\mu$ l		1800 $\mu$ l



Figura 10. **Expresión del  $\beta$ ARK1-ct en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.**, Carril 1: células sin transfección; carril 2: células con transfección mock (pcDNA3.1); carriles 3 y 4: células transfectadas con el plásmido pRK- $\beta$ ARK-ct (1.25  $\mu$ g); carriles 5 y 6, células transfectadas con el plásmido pRK- $\beta$ ARK-ct (2.5  $\mu$ g).

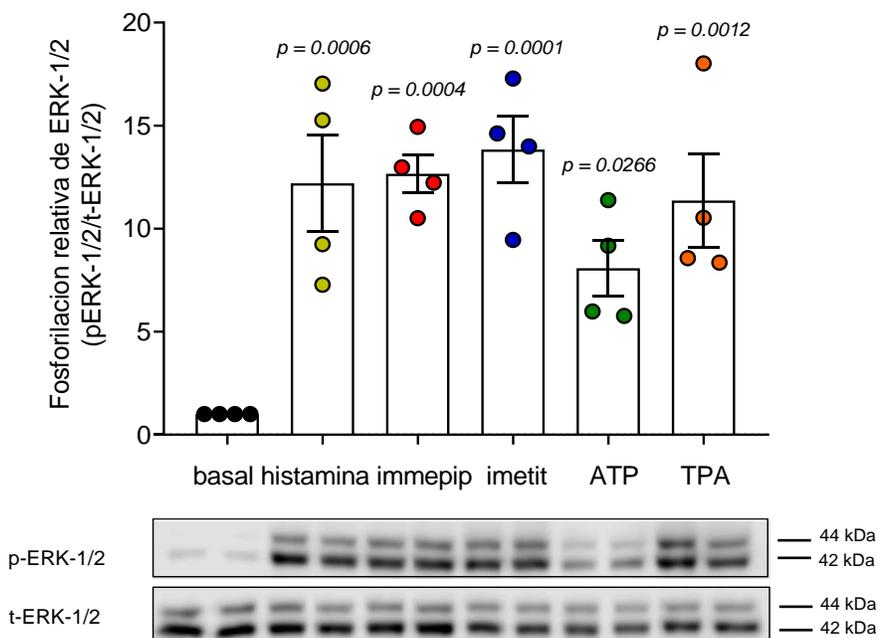
### 9.6. Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos tres veces por duplicado. El análisis de densitometría se realizó con el programa ImageJ, la señal de las ERK-1/2 fosforiladas se normalizó con respecto al control de carga (ERK-1/2 totales), y el cociente de la condición basal se transformó a 1 (100%). El análisis de los datos se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk (para determinar si una muestra aleatoria proviene de una distribución normal), e indicada la distribución normal los datos se analizaron con ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (comparación con el valor basal) o de Tukey (comparaciones múltiples entre grupos). Se utilizó el programa Prism 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA), considerando diferencias significativas con un valor  $P \leq 0.05$

## 10. Resultados

### 10.1. Fosforilación de ERK-1/2 inducida por agonistas del H<sub>3</sub>R, ATP y TPA

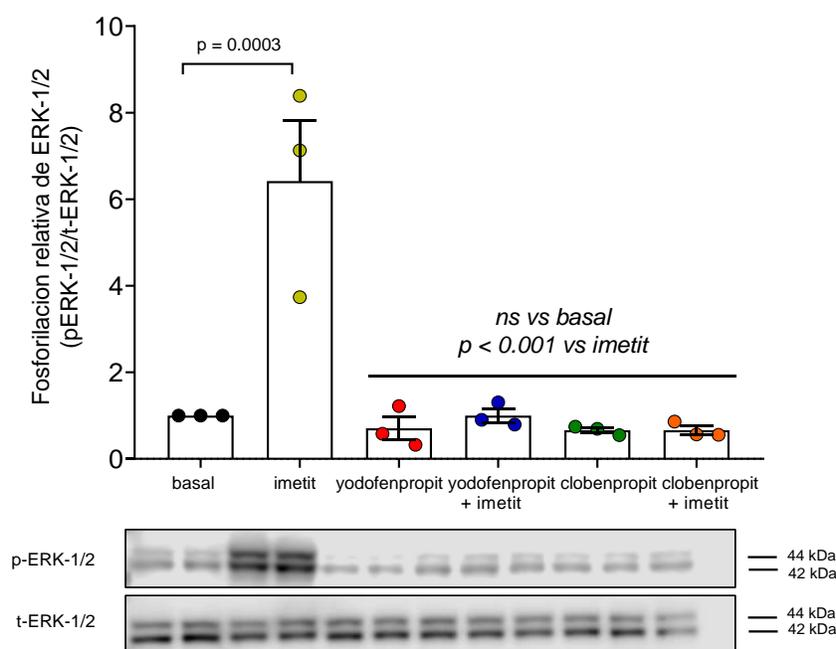
Para evaluar la fosforilación de ERK-1/2, las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R se incubaron con el agonista endógeno histamina y los agonistas selectivos del H<sub>3</sub>R immepip e imetit, así como con ATP (agonista de receptores purinérgicos acoplados a la vía PLC/PKC) y TPA (activador directo de la PKC). La Figura 11 muestra que los tres agonistas del H<sub>3</sub>R aumentaron significativamente la fosforilación de ERK-1/2 (veces la basal: histamina  $12.21 \pm 2.33$ , immepip  $12.66 \pm 0.92$ , imetit  $13.84 \pm 1.63$ ). El ATP y TPA también aumentaron significativamente la fosforilación de ERK-1/2 a  $8.08 \pm 1.35$  y  $11.37 \pm 2.27$  veces la basal, respectivamente.



**Figura 11. Fosforilación de ERK-1/2 inducida por agonistas del H<sub>3</sub>R, ATP y TPA en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.** Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk (distribución normal), ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett para comparación con la fosforilación basal. En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2). Las concentraciones utilizadas fueron: histamina, immepip e imetit, 100 nM; ATP, 10  $\mu$ M; TPA 200 nM. El tiempo de incubación con los fármacos correspondió a 5 min en todos los experimentos.

## 10.2. Efecto de antagonistas/agonistas inversos selectivos del H<sub>3</sub>R en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por el agonista imetit

Para confirmar la participación del H<sub>3</sub>R en la fosforilación de ERK-1/2, se utilizaron los fármacos yodofenpropit y clobenpropit, ambos antagonistas/agonistas inversos selectivos del H<sub>3</sub>R. La Figura 12 muestra que el agonista imetit aumentó la fosforilación de ERK-1/2 a  $6.42 \pm 1.39$  veces la basal, y que tanto el yodofenpropit como el clobenpropit por sí solos no afectaron significativamente la fosforilación de ERK-1/2 ( $0.71 \pm 0.27$  y  $0.66 \pm 0.05$  veces la basal, respectivamente), pero previnieron el efecto del imetit ( $0.99 \pm 0.15$  y  $0.66 \pm 0.10$  veces la basal).



**Figura 12. Bloqueo por antagonistas selectivos del efecto del agonista imetit en la fosforilación de ERK-1/2 en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.** Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. Las concentraciones utilizadas fueron: imetit, 100 nM; yodofenpropit y clobenpropit, 1  $\mu$ M. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2). ns, no significativo.

### **10.3. Evaluación de la participación de la vía PLC/PKC en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R**

Como se señaló en la introducción, canónicamente la activación de la PLC y la formación de los segundos mensajeros IP<sub>3</sub> y DAG se debe a la subunidad G $\alpha$  de las proteínas G $\alpha_{q/11}$ , pero los complejos G $\beta\gamma$  de las proteínas G $\alpha_{i/o}$  estimuladas por GPCRs acoplados a ellas, como el H<sub>3</sub>R, también pueden activar a la PLC (Nieto-Alamilla et al., 2016).

#### **10.3.1. Activación de la PLC por estimulación del H<sub>3</sub>R en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R**

Para evaluar la activación de la PLC se determinó el efecto de la estimulación del H<sub>3</sub>R en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Las células CHO-K1 expresan de manera endógena receptores purinérgicos P2Y2 acoplados a proteínas G $\alpha_{q/11}$  y que por lo tanto activan a la PLC en respuesta al agonista general ATP, por lo cual esta respuesta se utilizó como un control positivo.

La Figura 13 muestra que tanto la activación del H<sub>3</sub>R con imetit (100 nM) como de los receptores purinérgicos con ATP (10  $\mu$ M) indujo un aumento en la fluorescencia del Fura 2, indicativo de incrementos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Figura 13A). El efecto de la activación del H<sub>3</sub>R fue significativamente menor que el inducido por el ATP (46.2%), como se ilustra en la Figura 13B. Estos resultados confirman que la activación de los hH<sub>3</sub>Rs expresados en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R induce un aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, presumiblemente por estimulación de las PLCs presentes en estas células por los dímeros G $\beta\gamma$  de las proteínas G $\alpha_{i/o}$  activadas por el H<sub>3</sub>R.

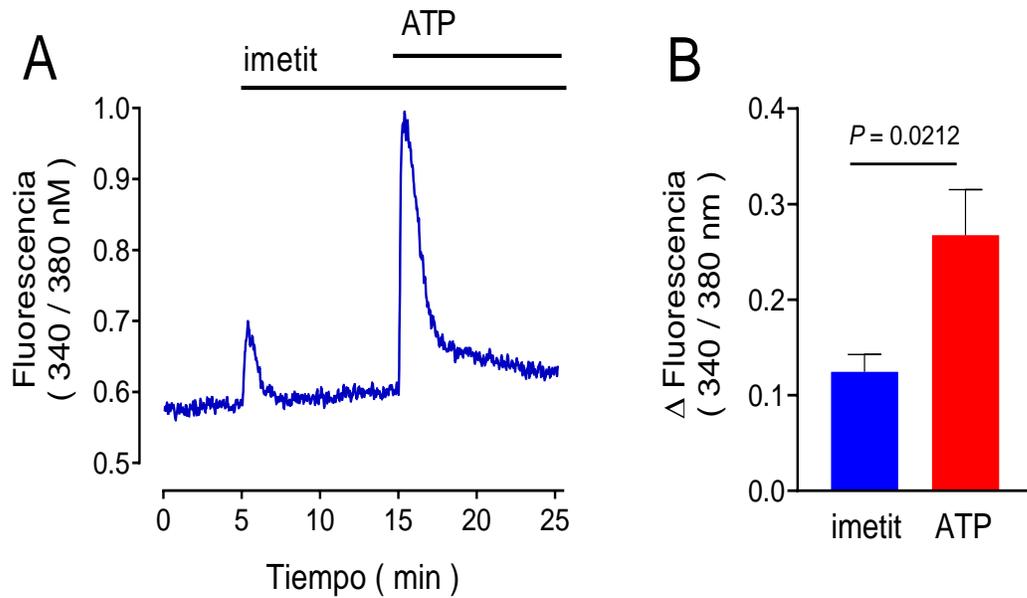


Figura 13. **Efecto del imetit y del ATP en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) de las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.** Las células cargadas con Fura 2-AM se expusieron al agonista del H<sub>3</sub>R imetit (100 nM) y al ATP (10  $\mu\text{M}$ ), agonista de los receptores purinérgicos. **A)** Experimento representativo. **B)** Comparación de los efectos del imetit y ATP. Los valores son las medias  $\pm$  SEM de 5 determinaciones con preparaciones celulares diferentes. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student pareada.

### 10.3.2. Efecto del inhibidor de la PLC U73122 y su análogo inactivo U73343 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R

Para evaluar si la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R involucraba la activación de la PLC, se utilizó el U73122, inhibidor de la PLC, así como su análogo inactivo, el compuesto U73343. La Figura 14 muestra que el agonista del hH<sub>3</sub>R imetit estimuló la fosforilación de ERK-1/2 a  $15.2 \pm 4.2$  veces la basal. El inhibidor de la PLC U73122 no modificó significativamente la fosforilación basal ( $1.65 \pm 0.24$  veces la basal) pero disminuyó la fosforilación de ERK-1/2 inducida por el imetit a  $8.25 \pm 8.2$  veces la basal; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Además, el análogo inactivo U73343 mostró un efecto similar, sin efecto significativo en la fosforilación basal ( $0.84 \pm 0.17$  veces la basal) y reducción del efecto del imetit a  $8.62 \pm 1.39$  veces la basal, sin diferencia significativa con respecto a la respuesta al imetit solo.

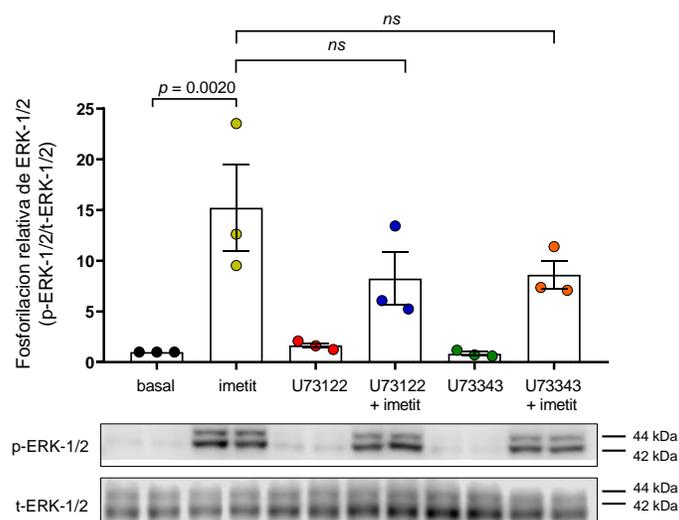


Figura 14. Efecto del inhibidor de la PLC U73122 y su análogo inactivo U73343 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R. Los valores son las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2). Las concentraciones utilizadas fueron: imetit, 100 nM; U73122 y U73343, 10  $\mu$ M. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. ns, no significativo.

### 10.3.3. Efecto del inhibidor U73122 y su análogo inactivo U73343 en el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ATP en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R

La similar inhibición por los fármacos U73122 y U73343 de la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R no permitió evaluar la participación de la PLC en dicho efecto. Para corroborar la eficacia de los fármacos utilizados, se evaluó su efecto en el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por ATP. La Figura 15 muestra que el U73122 previno en un 98.6% el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , sin un efecto significativo del análogo inactivo U73343. Este resultado confirmó la especificidad de efectos de ambas sustancias.

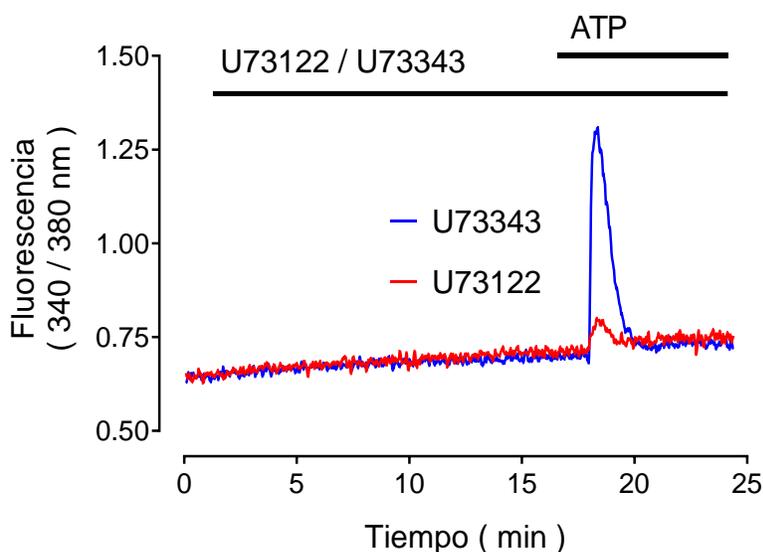
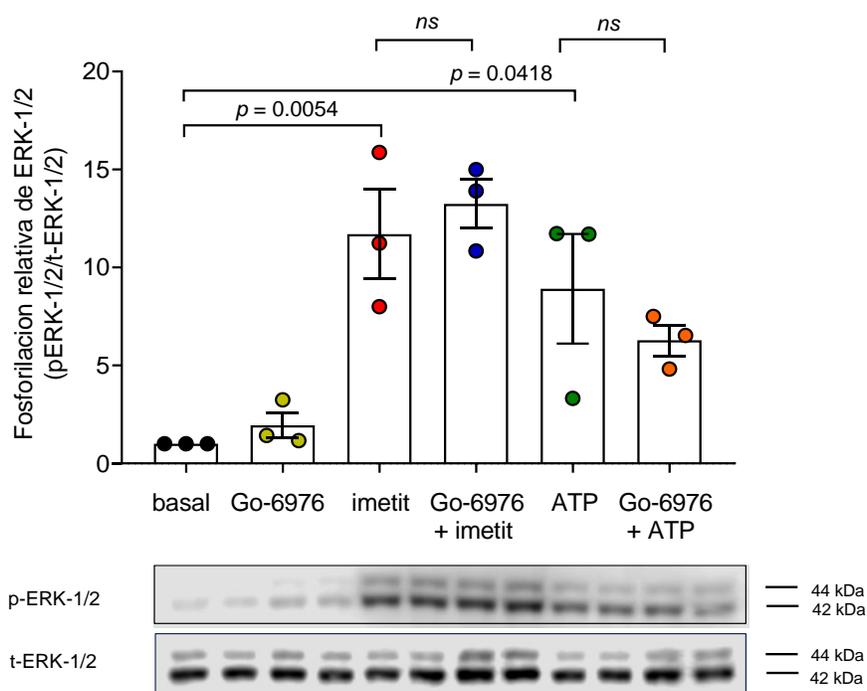


Figura 15. Efecto del inhibidor de la PLC U73122 y su análogo inactivo U73343 en el aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) inducido por el ATP en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R. Las células cargadas con Fura 2-AM fueron pre-incubadas por 15 min con los fármacos U73122 o U73343 (10  $\mu$ M) antes de exponerlas a ATP (10  $\mu$ M). Se muestra una determinación representativa, repetida 5 veces para el compuesto U73122 y 4 veces para el análogo U73343 con preparaciones celulares diferentes, obteniéndose resultados semejantes.

En conjunto, los resultados mostrados en la Figura 14 indicaron efectos inespecíficos de los fármacos U73122 y U73343 en la fosforilación de ERK-1/2, y por lo tanto no permitieron evaluar la participación de la PLC en el efecto de la activación del H<sub>3</sub>R.

#### 10.4. Efecto de inhibidores farmacológicos de las PKCs en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R

Dado que no se pudo determinar la participación de la PLC en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R, se decidió evaluar la participación de las PKCs utilizando el inhibidor Gö-6976 (1  $\mu$ M; IC<sub>50</sub> PKC $\alpha$  2.3 nM, PKC $\beta$  6.2 nM). El Gö-6976 no modificó significativamente la fosforilación basal de ERK-1/2 ( $1.95 \pm 0.65$  veces) y tampoco el efecto del imetit, como se observa en la Figura 16 ( $11.70 \pm 2.28$  y  $13.25 \pm 1.24$  veces la basal en ausencia y presencia de Gö-6976, respectivamente). El Gö-6976 redujo de manera modesta y no significativa el efecto del ATP ( $8.91 \pm 2.80$  versus  $6.28 \pm 0.78$  veces la basal).



**Figura 16. Efecto del inhibidor de la PKC Gö-6976 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.** Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. Las concentraciones utilizadas fueron: imetit (100 nM), ATP (10  $\mu$ M), Go-6976 (1  $\mu$ M). En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2). El análisis estadístico se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. ns, no significativo.

### 10.5. Efecto del inhibidor farmacológico de la PKC Gö-6983 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R

Para corroborar la ausencia de efecto de la inhibición de la PKC en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R, se utilizó un segundo inhibidor, el Gö-6983 (1  $\mu$ M; IC<sub>50</sub> PKC $\alpha$  y PKC $\beta$  7 nM, PKC $\gamma$  6 nM, PKC $\delta$  10 nM, PKC $\zeta$  60 nM). La Figura 17 muestra que el Gö-6983 no afectó la fosforilación basal de ERK-1/2 ( $1.62 \pm 0.10$ ) y tampoco modificó significativamente los efectos del imetit ( $12.30 \pm 1.04$  versus  $10.65 \pm 2.49$  veces la basal en presencia del inhibidor). Por otra parte, el Gö-6983 redujo (-41.5%) el efecto del ATP ( $16.89 \pm 3.98$  versus  $10.30 \pm 2.55$  veces la basal en presencia del Gö-6983), aunque el efecto no fue estadísticamente significativo.

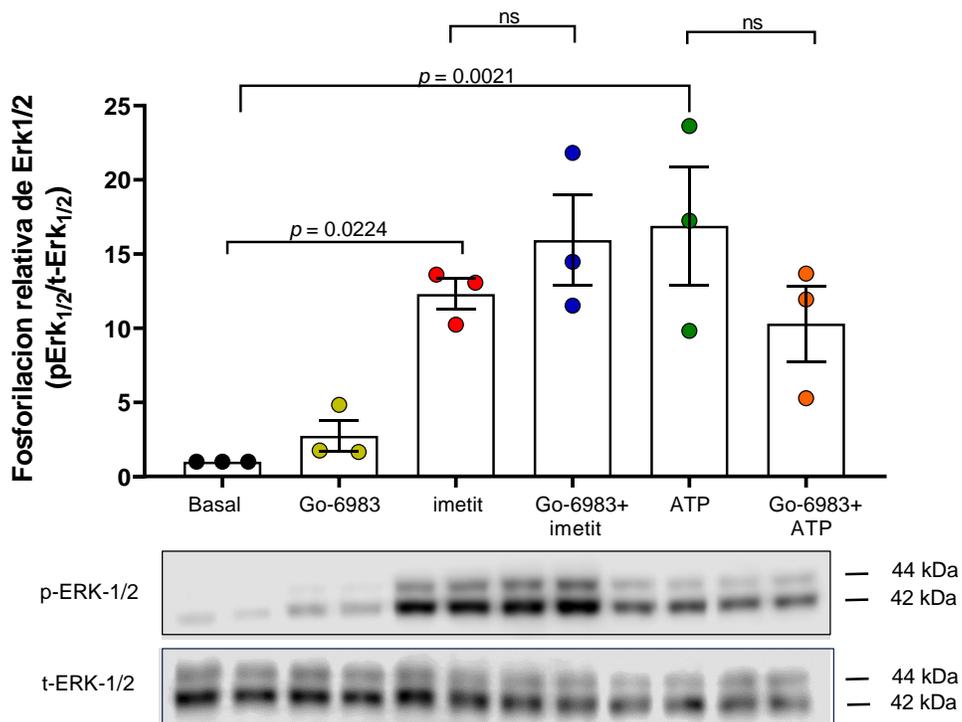


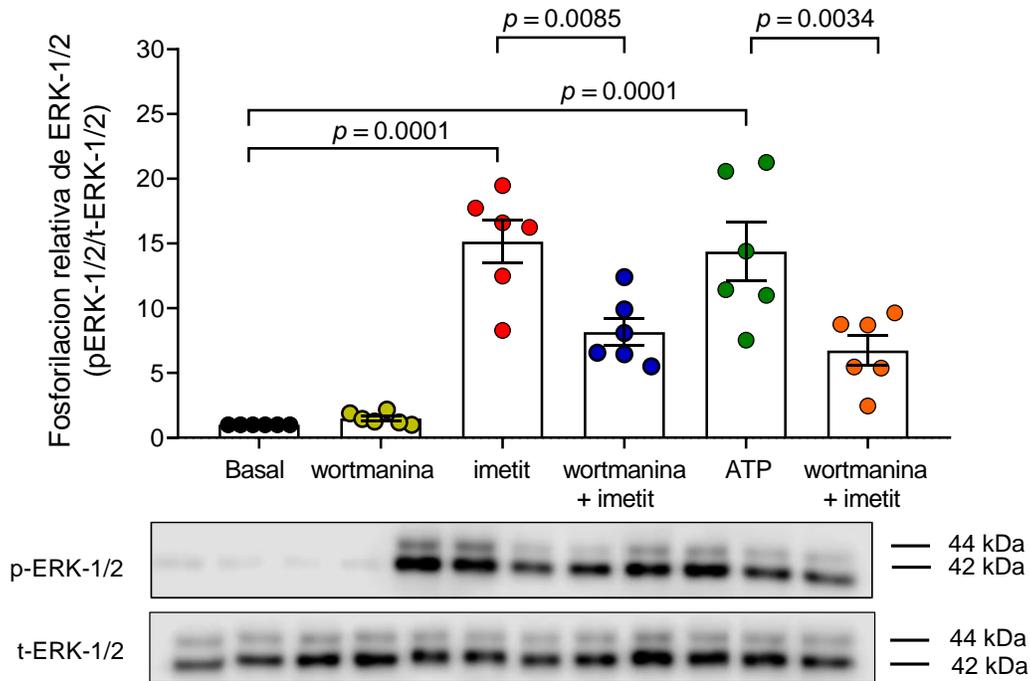
Figura 17. Efecto del inhibidor de la PKC Gö-6983 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R. Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. Las concentraciones utilizadas fueron: imetit (100 nM), ATP (10  $\mu$ M), Gö-6983 (1  $\mu$ M). En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2). El análisis estadístico se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. ns, no significativo.

## **10.6. Evaluación de la participación de la vía de la PI3K en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R**

La vía de la cinasa PI3K es otra de las vías de señalización descritas para el H<sub>3</sub>R (Nieto-Alamilla et al., 2016). Por ello, se evaluó el efecto de la inhibición farmacológica de la cinasa por wortmanina, así como la inhibición por BX-795 de la cinasa PDK1, activada por la PI3K, y que fosforila a la cinasa Raf1, la primera de las cinasas participantes en la vía de las MAPKs (Manne et al., 2018).

### **10.6.1. Efectos del inhibidor farmacológico de la PI3K wortmanina en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R**

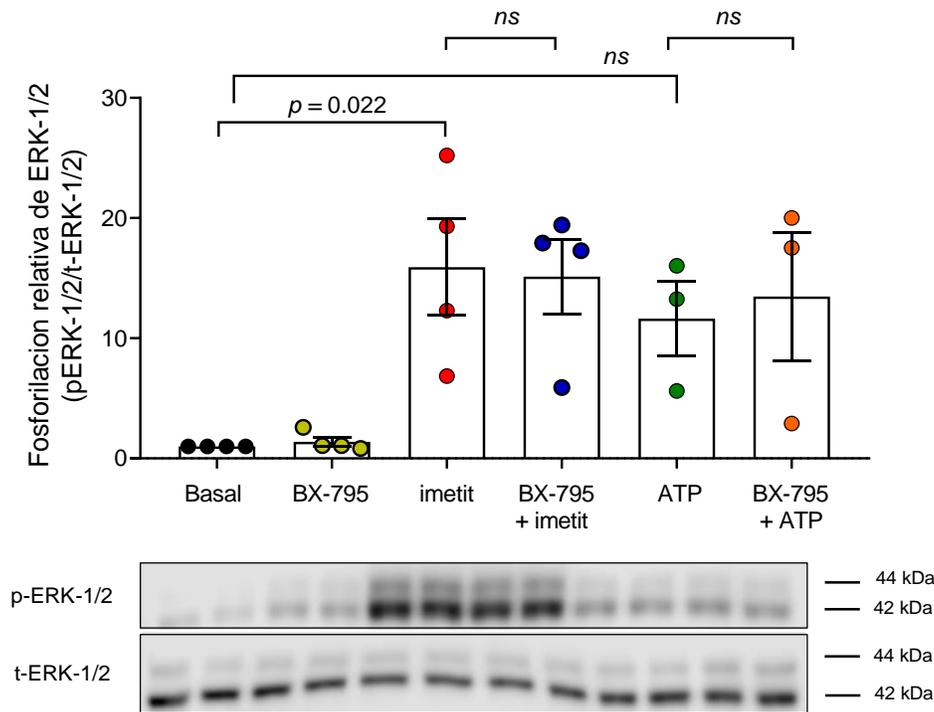
Para determinar la participación de la vía PI3K en la fosforilación de ERK-1/2 activada por el H<sub>3</sub>R, se utilizó el inhibidor wortmanina (100 nM; IC<sub>50</sub> 5 nM). La Figura 18 muestra que este inhibidor no modificó significativamente la fosforilación basal ( $1.48 \pm 0.18$  veces), pero disminuyó de manera significativa la fosforilación de ERK-1/2 inducida por imetit ( $15.13 \pm 1.66$  y  $8.15 \pm 1.05$  veces la basal en ausencia y presencia de wortmanina; inhibición del 49.4%) y por ATP ( $14.37 \pm 2.26$  y  $6.73 \pm 1.12$  veces la basal en ausencia y presencia de wortmanina; inhibición del 57.1%).



**Figura 18. Efectos del inhibidor de la PI3K wortmanina en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1.** Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. Las concentraciones utilizadas fueron: imetit (100 nM), ATP (10  $\mu$ M), wortmanina (100 nM). En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2). El análisis estadístico se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y la prueba de Tukey.

### 10.6.2. Efectos del BX-795, inhibidor farmacológico de la PDK1, en la activación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R

Para estudiar la participación de PDK1 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R se utilizó el inhibidor BX-795 (100 nM; IC<sub>50</sub> 6 nM). La Figura 19 muestra que este fármaco no modificó significativamente la fosforilación basal ( $1.38 \pm 0.40$  veces), ni el efecto del imetit ( $15.91 \pm 4.01$  versus  $15.13 \pm 3.11$  veces la basal en ausencia y presencia de BX-795) o del ATP ( $11.63 \pm 3.11$  versus  $13.47 \pm 9.24$  veces la basal en ausencia y presencia del inhibidor).



**Figura 19. Efecto del BX-795, inhibidor farmacológico de la PDK1, en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R.** Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. Las concentraciones utilizadas fueron: imetit 100 nM, ATP 10  $\mu$ M, BX-795 100 nM. En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2). El análisis estadístico se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. ns, no significativo.

### 10.7. Efecto del PP2, inhibidor farmacológico de la cinasa de tirosina Src en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R

La activación de los GPCRs puede inducir la actividad de cinasas de Tirosina pertenecientes a la familia Src, conduciendo a la activación de las MAPKs (Ma et al., 2000), por lo que evaluamos la participación de la cinasa Src en la fosforilación de ERK-1/2 utilizando el inhibidor farmacológico PP2 (10  $\mu$ M, IC<sub>50</sub> 4-5 nM). La Figura 20 muestra que el PP2 no modificó significativamente la fosforilación basal de ERK-1/2 ( $1.46 \pm 0.02$ ) y disminuyó de manera modesta y no significativa la fosforilación de ERK-1/2 inducida por imetit ( $11.05 \pm 0.83$  versus  $9.45 \pm 0.42$  veces la basal). En contraste, el PP2 aumentó la fosforilación de ERK-1/2 inducida por ATP ( $6.48 \pm 1.27$  versus  $9.68 \pm 1.71$  veces la basal), si bien el efecto tampoco fue significativo.

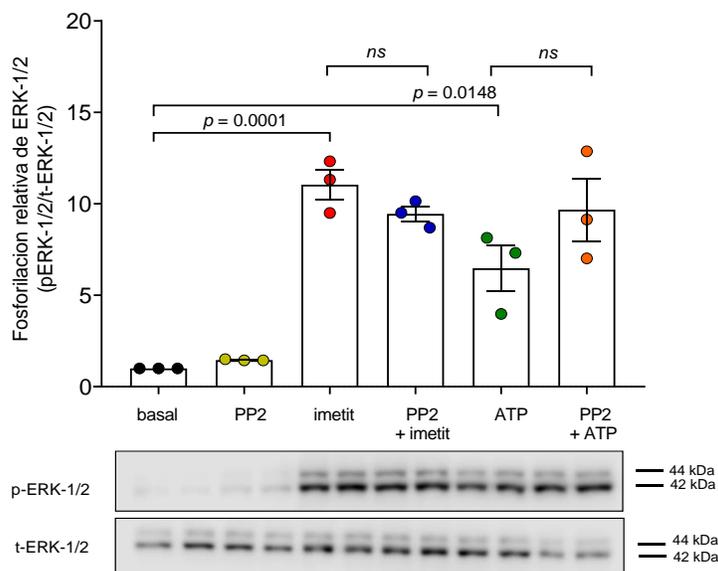


Figura 20. Efecto de PP2, inhibidor farmacológico de la cinasa Src, en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R. Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2). Las concentraciones utilizadas fueron: imetit 100 nM, ATP 10  $\mu$ M, PP2, 10  $\mu$ M. El análisis estadístico se realizó con las pruebas de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y de Tukey. ns, no significativo.

## **10.8. Efecto de la inhibición de los dímeros $G\beta\gamma$ en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del $H_3R$ en células CHO-K1-h $H_3R$**

Como se mencionó en la introducción, se ha propuesto que los dímeros  $G\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas son responsables de la estimulación de la vía de las MAPKs desencadenada por la activación de GPCRs acoplados a proteínas  $G\alpha_{i/o}$ . En este sentido, se ha reportado que la sobreexpresión de los dímeros  $G\beta\gamma$  es suficientes para activar las MAPKs mediante la activación de Ras, y la estimulación con isoproterenol en células COS-7 genera la activación de ERK-1/2 dependiente de los dímeros  $G\beta\gamma$  (Gutkind, et al., 2000; Luttrell y Luttrell., 2003).

### **10.8.1. Efecto de la galeína, inhibidor farmacológico de los complejos $G\beta\gamma$ , en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del $H_3R$ en células CHO-K1-h $H_3R$ .**

La Figura 21 muestra que la galeína (10  $\mu$ M;  $IC_{50}$  por el dímero  $G\beta_1\gamma_2$  200 nM) aumentó por sí misma la fosforilación basal de ERK-1/2 a  $6.92 \pm 0.84$  veces, y no tuvo efecto significativo en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por imetit ( $16.51 \pm 1.16$  y  $14.51 \pm 2.33$  veces la basal en ausencia y presencia de galeína). El ATP aumentó la fosforilación de ERK-1/2 a  $9.76 \pm 2.14$  veces la basal y en presencia de galeína el efecto fue aún mayor,  $18.93 \pm 3.49$  veces la basal, aunque no estadísticamente significativo.

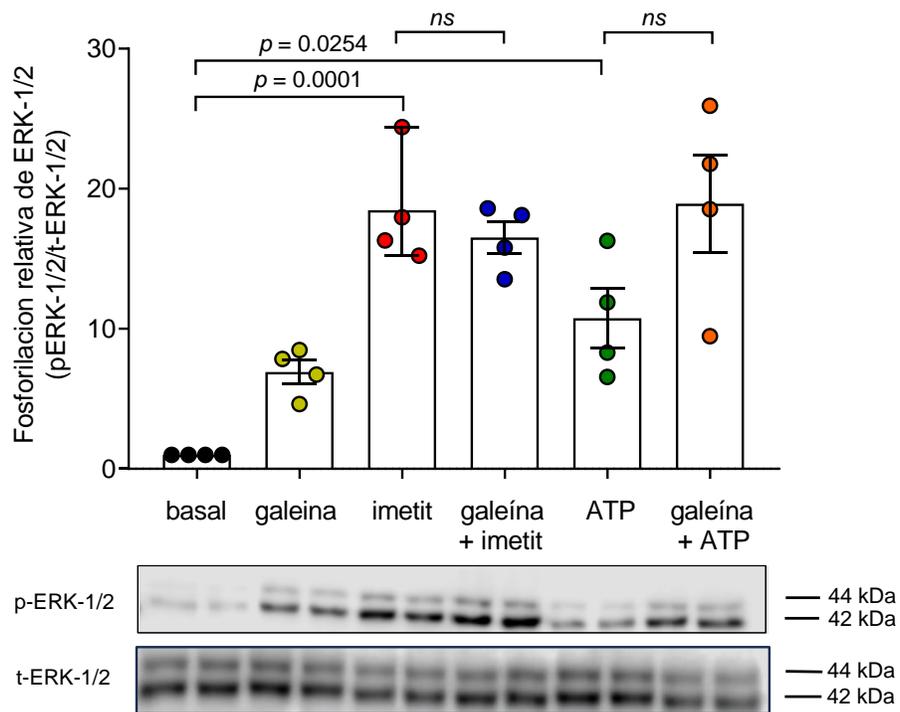


Figura 21. Efecto de la galeína, inhibidor farmacológico de los complejos  $G\beta\gamma$ , en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del  $H_3R$  en células CHO-K1-h $H_3R$ . Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2). Las concentraciones utilizadas fueron: imetit 100 nM, ATP 10  $\mu$ M, galeína 10  $\mu$ M. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. ns, no significativo.

### **10.8.2. Efecto de $\beta$ ARK1-ct, secuestrador de los complejos $G\beta\gamma$ , en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del $H_3R$ en células CHO-K1-h $H_3R$**

Las cinasas receptoras acopladas a proteínas G (GRKs) fosforilan a un GPCR cuando éste es activado por un agonista. La fosforilación del receptor promueve el reclutamiento de las proteínas  $\beta$ -arrestinas, clatrina y dinamina, lo cual impide el re-acople de los GPCRs a las proteínas G, conduciendo a su desensibilización y posible internalización. Las cinasas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ ARKs) pertenecen a la familia de las GRKs (Luttrell y Luttrell, 204), y los dímeros  $G\beta\gamma$  se unen al extremo carboxilo de la  $\beta$ ARK1 (GRK2) y por lo tanto dicho extremo actúa como un inhibidor de los complejos  $G\beta\gamma$  al secuestrarlos después de su disociación de la subunidad  $G\alpha$ .

Por lo anterior, las células CHO-K1-h $H_3R$  se transfectaron con el plásmido pRK- $\beta$ ARK1-ct, que permitió la expresión del carboxilo terminal de la  $\beta$ ARK1 (GRK2) que interacciona físicamente con los complejos  $G\beta\gamma$ , actuando como secuestrador de los complejos.

La Figura 22 muestra que la expresión de  $\beta$ ARK-ct no modificó significativamente la fosforilación basal de ERK-1/2 ( $1.04 \pm 0.15$  veces) y atenuó de manera moderada (-35.2%), pero significativa, la fosforilación de ERK-1/2 inducida por imetit ( $37.98 \pm 5.57$  versus  $26.05 \pm 2.80$  veces la basal). La expresión de  $\beta$ ARK-ct no modificó la fosforilación de ERK-1/2 inducida por ATP ( $17.56 \pm 2.23$  versus  $16.66 \pm 1.85$  veces la basal).

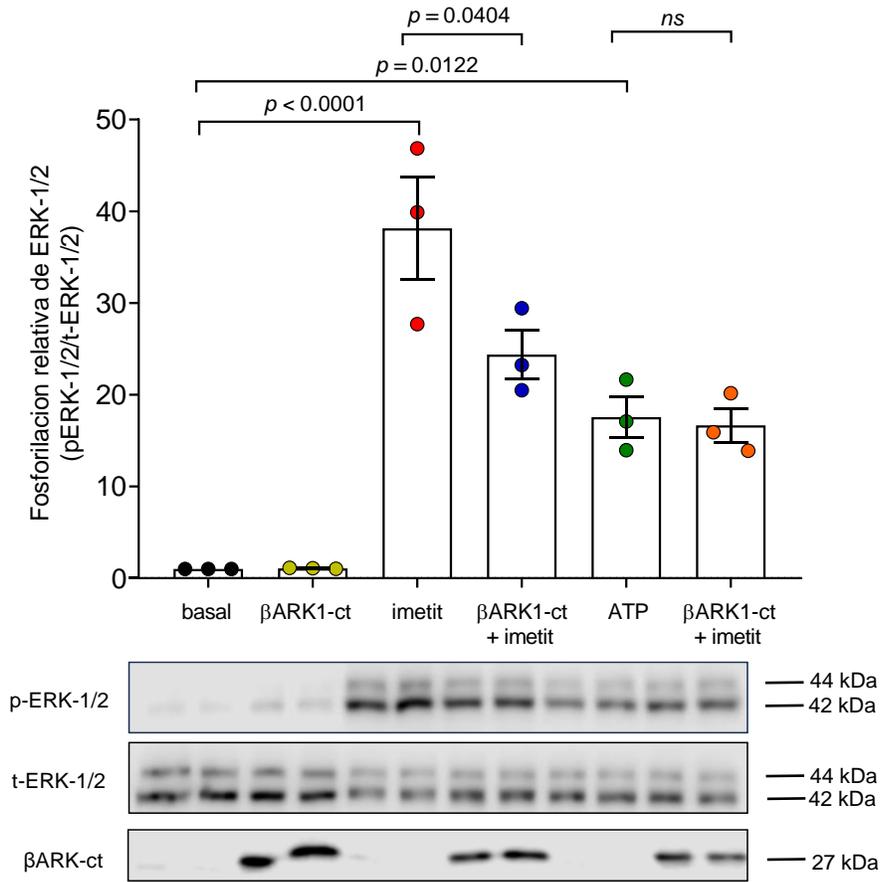


Figura 22. Efecto de la transfección del  $\beta$ ARK1-ct en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R. Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de la cuantificación de la fosforilación de ERK-1/2, y los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por duplicado. Las concentraciones utilizadas fueron: imetit 100 nM, ATP 10  $\mu$ M. En la parte inferior se muestran Westerns blots representativos de ERK-1/2 fosforiladas (p-ERK-1/2) y totales (t-ERK-1/2), así como de la expresión de  $\beta$ ARK1-ct. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk, ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. ns, no significativo

## **11. Discusión**

El H<sub>3</sub>R se ha relacionado con diversas patologías del SNC, como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, la migraña, la narcolepsia y trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), entre otras, lo que convierte al receptor en un blanco importante para su tratamiento farmacológico. Por otra parte, las cinasas ERK-1/2 regulan diferentes procesos celulares como la adhesión, la proliferación, la plasticidad neuronal, el aprendizaje y la memoria. La sobre-activación en esta vía se correlaciona con el crecimiento de las células tumorales y la progresión del cáncer.

La fosforilación de ERK-1/2 es activada por diversos agentes como péptidos (v.gr. bradicinina e insulina), factores de crecimiento (epidérmico, EGF; de fibroblastos, FGF; similar a la insulina-1, IGF-1; nervioso, NGF; derivado de plaquetas, PDGF), así como por citocinas, estrés osmótico y la activación de GPCRs (Roskoski-Robert, 2012). La fosforilación de ERK-1/2 por estimulación del H<sub>3</sub>R se ha observado tanto en sistemas nativos como heterólogos, pero aún se requiere dilucidar plenamente los mecanismos moleculares implicados.

Los resultados de esta tesis indicaron que en células CHO-K1 transfectadas establemente con el hH<sub>3</sub>R (CHO-K1-hH<sub>3</sub>R) la activación del receptor por tres diferentes agonistas (histamina, immpip e imetit) aumentó la fosforilación de ERK-1/2, y el bloqueo del efecto del imetit por dos antagonistas selectivos, yodofenpropit y clobenpropit, corrobora la participación del H<sub>3</sub>R en el efecto funcional.

### **Evaluación de la vía PLC/PKC**

Se ha propuesto que la activación de las MAPKs por GPCRs acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$  se debe a los complejos G $\beta\gamma$  que estimulan la actividad de la PLC. En células HEK-293 la activación del H<sub>3</sub>R transfectado estimula la fosforilación de ERK-1/2, efecto prevenido por inhibición de la PKC por el compuesto Gö-6983 (Lai et al., 2016). En las células CHO-K1 la activación por ATP de receptores purinérgicos P2Y2 (acoplados a proteínas G $\alpha_q$  y por lo tanto a la activación de la PLC) induce movilización de calcio de depósitos intracelulares (Montejo-López et al., 2016), y en las células CHO y SK-N-MC transfectadas con el H<sub>3</sub>R (Cogé et al., 2001; Bongers et al., 2008) así como en una subpoblación de neuronas estriatales

de la rata en cultivo primario (Rivera-Ramírez et al., 2016), la activación del H<sub>3</sub>R induce un aumento significativo en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. En este trabajo en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R tanto el ATP como el TPA, un activador directo de la PKC, aumentaron la fosforilación de ERK-1/2, y tanto la activación del H<sub>3</sub>R con imetit como la estimulación de los receptores purinérgicos con ATP indujo un aumento en la fluorescencia del Fura 2 en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R, indicativo de un aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Figura 13A). En conjunto, estos resultados sugerían que la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del hH<sub>3</sub>R involucraba la vía PLC/PKC.

Para evaluar la participación de la PLC en el efecto funcional, se utilizó un inhibidor de la enzima (U73122) que redujo en 49% la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R; sin embargo, el análogo inactivo U73343 también inhibió el efecto del agonista con una magnitud similar (-46%). Lo anterior indicaba efectos inespecíficos de ambos compuestos, que podrían estar relacionado con la concentración (10 μM) y el tiempo de incubación (15 min) empleados en nuestras determinaciones. No obstante, en células SK-N-SH la hidrólisis de fosfoinosítidos inducida por la activación de receptores muscarínicos fue inhibida por el U73122 con un valor de IC<sub>50</sub> de 2.5 μM (pre-incubación de 30 min; Thompson et al., 1991), y datos de nuestro laboratorio indican el mismo valor de IC<sub>50</sub> para inhibir la hidrólisis de fosfoinosítidos inducida por activación del H<sub>1</sub>R en células de astrocitoma humano U373MG con un tiempo de pre-incubación de 15 min e inhibición máxima de 92% con 10 μM del fármaco (Hernández-Angeles et al., 2001). Esta información indica que la concentración de U73122 utilizada y el tiempo de pre-incubación no determinaron el efecto del compuesto.

Para corroborar la eficacia del U73122 para inhibir a la PLC, se evaluó su efecto en el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por ATP en las células CHO-K1-hH<sub>3</sub>R. A la misma concentración (10 μM) y tiempo de pre-incubación (15 min) el U73122 previno en más del 95% el aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por el ATP, sin advertirse efecto significativo del análogo inactivo U73343 (Figura 15). Este resultado confirmó la especificidad de efectos de ambas sustancias. Nuestros resultados concuerdan con los datos de Bosch et al. (1998) que muestran que el inhibidor U73122 y su análogo inactivo U73343 (10 μM, 5 min) inhibieron la activación de la fosfolipasa D (PLD) inducidas por el receptor a colecistocinina-A (CCKA) en células CHO establemente transfectadas; sin embargo, el U73343 no afectó la

movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCK8 y por activación de la PLC, indicando que estos aminoesteroides ejercen efectos inhibitorios corriente abajo de la PLC. En otro estudio, Heemskerk et al. (1998) reportaron que el U73343 interfiere en la señalización intracelular, inhibiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por vaciamiento de los depósitos en los hepatocitos y bloqueando canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje tipo L en el musculo liso vascular. Además, nuestros resultados concuerdan con los datos de Lai et al. (2016) que muestran que en células HEK-293 la incubación por 45 min con la misma concentración del U73122 (10  $\mu\text{M}$ ) no afectó la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del  $\text{H}_3\text{R}$ .

En el mismo estudio de Lai et al. (2016) la fosforilación de ERK-1/2 en respuesta a la activación del  $\text{H}_3\text{R}$  fue inhibida por el compuesto Gö-6983, un inhibidor de las PKCs, por lo que la activación de la cinasa por un mecanismo diferente a la vía  $\text{PLC} \rightarrow \text{PKC}$  podría participar en el efecto.

Las PKCs son una familia de cinasas de Serina/Treonina dependientes de fosfolípidos que se dividen en tres grupos en función de su activación (Kawano, T et al., 2021): a) PKC clásicas ( $\alpha$ ,  $\beta\text{I}$ ,  $\beta\text{II}$ ,  $\gamma$ ), que requieren  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG y fosfatidilserina; b) PKC nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ,  $\mu$ ), que requieren DAG y fosfatidilserina; c) PKC atípicas ( $\zeta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ) que no requieren DAG o  $\text{Ca}^{2+}$  y que pueden activarse por interacciones proteína-proteína o bien por activación de la PI3K y la subsecuente generación de  $\text{PIP}_3$  que induce el reclutamiento y activación de proteínas que contienen dominios de homología de pleckstrina (PH) como las propias PKCs atípicas, Akt, la proteína ribosómica S6 cinasa (p70S6) y la GSK-3 $\beta$ .

Las PKCs están involucradas en múltiples sistemas de transducción de señales desencadenados por la activación de GPCRs, incluyendo la activación de las ERK-1/2 (Shah, et al., 2004), y la activación de PKCs por GPCRs acoplados a proteínas  $\text{G}\alpha_o$  estimula a las MAPKs por fosforilación directa al activar a la proteína Raf-1 (Luttrell y Luttrell, 2003). Se mencionó anteriormente que la activación del  $\text{H}_3\text{R}$  puede activar a la vía de la PI3K (Bongers et al., 2007; Nieto-Alamilla et al., 2016), por lo que sería factible que este mecanismo condujera a la activación de PKCs atípicas, que podrían fosforilar a Raf y activar la fosforilación de ERK-1/2. Por ello, se evaluó el efecto de la inhibición de las PKCs con dos inhibidores farmacológicos, el Gö-6983 (inhibidor de las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ) y el Gö-6976, el cual tiene especificidad por las isoformas clásicas  $\alpha$  y  $\beta$ . Estos inhibidores no

previnieron el efecto del H<sub>3</sub>R, si bien disminuyeron de manera modesta, aunque no significativa, el efecto del ATP. La ausencia de efecto podría deberse al tiempo de incubación con los inhibidores; por ejemplo, Lai et al. (2016) incubaron células HEK-293-hH<sub>3</sub>R con Gö-6983 durante 1 h y con una concentración de 10 µM, observando una disminución significativa. Sin embargo, la IC<sub>50</sub> de los inhibidores es: Gö-6976, PKCα 2.3 nM y PKCβ 6.2 nM; Gö-6983, PKCα y PKCβ 7 nM, PKCγ 6 nM, PKCδ 10 nM y PKCζ 60 nM, y la concentración utilizada en nuestro estudio fue de 1 µM, 15-500 veces mayor a los valores de IC<sub>50</sub> reportados, lo que indica que la concentración utilizada no determina el efecto de los inhibidores. Roman et al (2006) reportaron que el rottlerin, un inhibidor selectivo de la PKCδ (IC<sub>50</sub> 3-6 µM) inhibió de manera dependiente de la concentración la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la interleucina 1β (IL-1β) en células del músculo liso vascular; sin embargo, en las mismas células el inhibidor Gö-6976 no atenuó la fosforilación de ERK-1/2 a una concentración de 3 µM y 30 min de incubación. Estos resultados indican que el tiempo de incubación no es determinante para el efecto de los inhibidores.

En conjunto, estos resultados indicaron que la vía PLC/PKC no es responsable de la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1 establemente transfectadas con el receptor.

### **Evaluación de la vía Src/ PI3K/ PDK1**

La activación de los GPCRs aumenta la actividad de las cinasas de Tirosina de la familia Src; en particular las proteínas Gα<sub>s</sub> y Gα<sub>i/o</sub> estimulan directamente a dos miembros de la familia Src, aumentando la accesibilidad del sitio activo a los sustratos como PI3K, desencadenando eventos que incluyen la activación de las MAPKs, la quimiotaxis, hipertrofia/hiperplasia cardiovascular en la hipertensión arterial, agregación plaquetaria y contracción del músculo liso (Ma et al., 2000). Se han descrito interacciones cruzadas entre las vías de señalización PI3K/Akt y Ras/MAPK (Aksamitiene et al., 2001), y la activación del H<sub>3</sub>R puede conducir a la estimulación de la vía de la PI3K/Akt (Bongers et al., 2007; Nieto-Alamilla et al., 2016). por lo que la fosforilación de ERK-1/2 en células CHO-K1 podría involucrar a esta vía por varios mecanismos (Aksamitiene et al., 2001) como: a) activación de Ras por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RasGEF). que conduce a la activación de MEK; b) la vía PI3K/PIP<sub>3</sub>/cinasa PLD/Ras); c) la vía PI3K/PIP<sub>3</sub>/PLCγ/PKC; d) la vía

PI3K/PIP<sub>3</sub>/PDK1 que conduce a la fosforilación por PDK1 de MEK en los residuos Serina<sup>222</sup> y Serina<sup>226</sup>. Se ha reportado que PI3K activa la cinasa PDK1 que fosforila a Raf1, la primera de las cinasas participantes en la vía de las MAPKs (Manne, et al., 2018).

En este trabajo, la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R no fue afectada significativamente por el PP2, inhibidor de Src, o por el BX-795, inhibidor de la PDK1, indicando que estas cinasas no participan en el efecto descrito. No obstante, el inhibidor de PI3K wortmanina redujo significativamente la fosforilación de ERK-1/2. La activación del H<sub>3</sub>R aumenta la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; lo que a su vez desencadena la activación de otras vías de señalización intracelular que involucran la PKC, la PKA, la proteína cinasa II dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMKII), PI3K y ERK-1/2 (Zhang et al 2010). Por ejemplo, la estimulación de los receptores P2Y por ATP en los osteoblastos sensibiliza los canales de calcio activados por estrés mecánico, lo que conduce a una rápida activación de las ERK-1/2, involucrando a proteínas de señalización como PLC, PKC y cinasas de la familia Src. Así, la elevación en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducida por la activación del H<sub>3</sub>R podría conducir a la estimulación de la vía de la PI3K y a través de ésta a la fosforilación de ERK-1/2.

### **Participación de los complejos Gβγ**

Los complejos Gβγ participan de manera importante en la señalización de los GPCRs acoplados a proteínas Gαi/o, y promueven señales Ras-ERK mitogénicas a través de la activación de múltiples efectores, los cuales incluyen PI3K, Src y algunas fosfolipasas (Bookout et al., 2003).

En este trabajo se evaluó la participación de los complejos Gβγ a través de un inhibidor farmacológico (galeína), la cual no inhibió el efecto del H<sub>3</sub>R en la fosforilación de ERK-1/2. Lo anterior podría deberse a que los inhibidores de tamaño molecular pequeño no bloquean todas las funciones de los dímeros; por ejemplo, los inhibidores de Gβγ no previenen la activación de la subunidad Gα (Smrcka et al., 2013). Además, la galeína aumentó por sí misma la fosforilación de ERK-1/2 inducida por ATP, indicando efectos inespecíficos.

En los procesos de desensibilización de los GPCRs participan las cinasas de GPCRs (GRKs), las cuales fosforilan al receptor cuando este es activado por su agonista, promoviendo el reclutamiento de las proteínas β-arrestinas lo que impide el re-acople de las proteínas G a los

GPCRs y promueve la internalización del receptor al reclutar a las proteínas clatrina y dinamina (Luttrell y Lefkowitz, 2002). La cinasa 1 de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ ARK1) pertenece a la familia de las GRKs (Luttrell y Luttrell 204) y fue denominada posteriormente GRK2. Los dímeros  $G\beta\gamma$  se unen al extremo carboxilo de  $\beta$ ARK1 y por lo tanto la cinasa puede secuestrar a los complejos  $G\beta\gamma$  al ser sobre-expresada.

La transfección del  $\beta$ ARK1-ct inhibió de manera moderada (-35.2%), pero significativa, la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del  $H_3R$ . Este resultado indica la participación, al menos de forma parcial, de los dímeros  $G\beta\gamma$  en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del  $H_3R$ .

El efecto parcial de la transfección del  $\beta$ ARK1-ct podría deberse a que la concentración del  $\beta$ ARK1-ct que se alcanza en las células transfectadas es menor que la concentración de los dímeros  $G\beta\gamma$ . La cinasa  $\beta$ ARK1 corresponde a la cinasa GRK2, y una diferente afinidad de los dímeros  $G\beta\gamma$  por el sitio de unión a  $\beta$ ARK1 podría también contribuir al efecto parcial, ya que se ha reportado que en las células GH3 de la hipófisis de la rata los diferentes dímeros  $G\beta\gamma$  dirigen el acoplamiento específico del receptor a diferentes canales iónicos, indicando la existencia de diferentes conformaciones de complejos  $G\beta\gamma$  con afinidad variable por las GRKs 2 y 3.

Por otra parte, se ha demostrado que las  $\beta$ -arrestinas además de inhibir el acoplamiento de la proteína G a los GPCR activados por agonistas y así promover la desensibilización e internalización de este; promueven diferentes vías de señalización una de ellas es la activación de las MAPKs específicamente ERK-1/2. (Smith et al., 2021; ver Figura 23). Estudios recientes indican que las  $\beta$ -arrestinas mejoran directamente la actividad de las cinasas Src, Raf-1 y ERK-1/2, mediante regulación alostérica (Pakharukova et al., 2020, Zang et al., 2021; Kahsai et al., 2023,). En el caso de ERK-2 las  $\beta$ -arrestinas al unirse a ERK-1/2 mejora la autofosforilación de la cinasa en el residuo Thr<sup>183</sup>, lo que induce un estado de activación parcial que además facilita la fosforilación por Raf-1 en el residuo Tyr<sup>185</sup>, conduciendo a la activación total de ERK-2 que requiere la fosforilación de ambos residuos (Kahsai et al., 2023). Por lo anterior sería de suma importancia evaluar si la unión de las  $\beta$ -arrestinas al  $H_3R$  activado estimula la fosforilación de ERK-1/2.

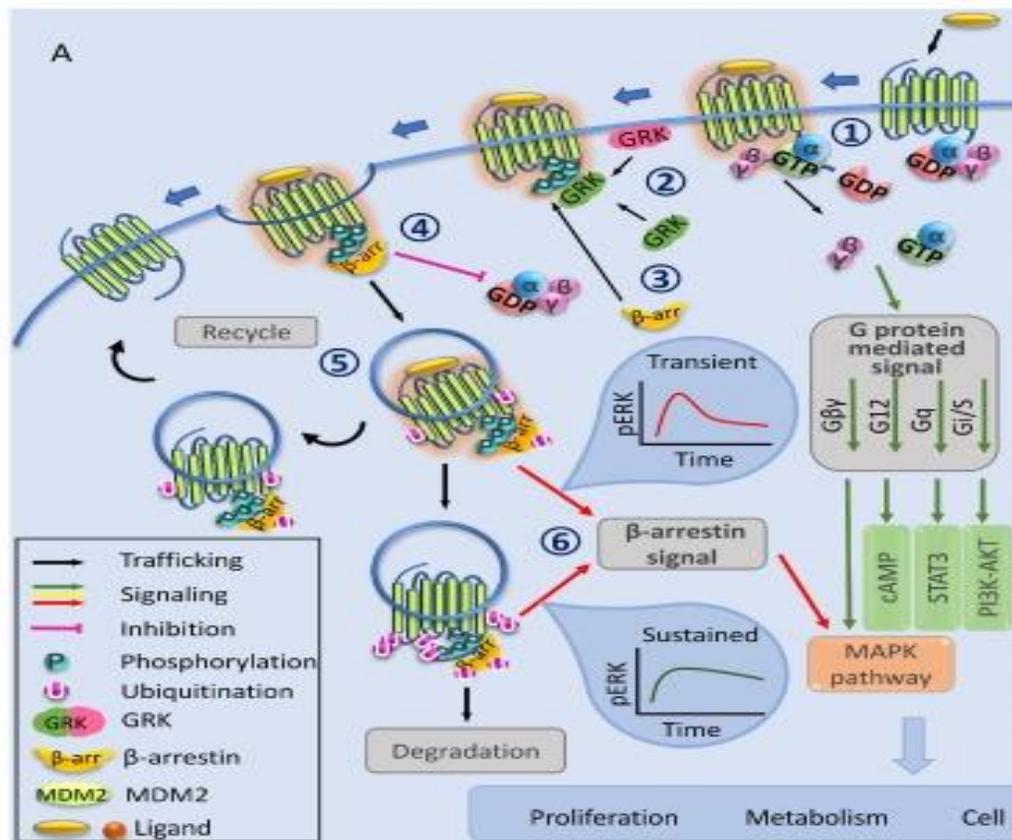


Figura 23. Mecanismo clásico de la señalización intracelular y desensibilización de los GPCRs. 1) La activación del receptor por un agonista conduce al intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, resultando la disociación en las subunidades  $G\alpha$  y los complejos  $G\beta\gamma$  los cuales interactúan con proteínas efectoras para promover varias vías de señalización. 2) Las cinasas de los GPCRs (GRKs) fosforilan al receptor en residuos de Serina/Treonina localizados en el carboxilo terminal y/o la tercera asa intracelular. 3) Las proteínas  $\beta$ -arrestinas se unen al receptor fosforilado. 4) La unión de las  $\beta$ -arrestinas impide el re-acoplamiento de la proteína G al receptor. 5) El receptor desensibilizando puede ser internalizado y posteriormente ser reciclado a la membrana plasmática o bien ser derivado a degradación lisosomal. 6) Las  $\beta$ -arrestinas inician una segunda vía de señalización intracelular que conduce al reclutamiento y activación de ERK-1/2. Tomado de Smith et al., 2021.

### **Transactivación por GPCRs de receptores a factores de crecimiento.**

Un mecanismo alternativo de la activación de ERK-1/2 por GPCRs en un número importante de tipos celulares implican la señalización cruzada entre un GPCR y un miembro de una segunda clase de receptores, comúnmente receptores a factores de crecimiento, que poseen actividad intrínseca de cinasa de Tirosina, como el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La autofosforilación del EGFR en residuos de Tirosina proporciona una plataforma de reclutamiento en la membrana de factores de intercambio de nucleótidos de guanina de Ras, como mSos, y la activación de Raf-1 dependiente de Ras. Lai et al. (2016) mostraron que la fosforilación de ERK-1/2 fue prevenida al inhibir la autofosforilación del EGFR con el fármaco AG1478 y la actividad de las metaloproteasas de matriz extracelular por el compuesto M6001. Lo anterior sugiere la transactivación del EGFR por activación de un GPCR, donde las metaloproteinasas actúan sobre el EGF unido a heparina (Hb-EGF) escindiendo al factor de crecimiento y permitiendo su unión al EGFR y la dimerización y activación de éste (Palanisamy et al., 2021).

Las células CHO-K1 no expresan el EGFR (Jo et al., 2003), pero sí al IGF-1R (receptor para el factor de crecimiento similar a la insulina, IGF) que podría experimentar transactivación, por lo que en experimentos posteriores se evaluará la transactivación de receptores a factores de crecimiento por activación de metaloproteasas utilizando los fármacos AG1024, inhibidor del receptor a IGF-1, y el inhibidor de metaloproteasas M6001 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del H<sub>3</sub>R.

## **12. Conclusiones**

1. La fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R en células CHO-K1 transfectadas no involucra a las vías PLC/PKC o a las cinasas PDK1 o Src.
2. El efecto estimulador de la activación del H<sub>3</sub>R en la fosforilación de ERK-1/2 se debe parcialmente a los complejos Gβγ de las proteínas G activadas por el receptor.
3. La vía de la PI3K está también involucrada en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del H<sub>3</sub>R.

## 13. Perspectivas

### Corto plazo

- Confirmar la participación de las proteínas  $G\alpha_{i/o}$  en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del hH<sub>3</sub>R, utilizando la toxina de *B. pertussis* (PTX).
- Confirmar la participación de los complejos  $G\beta\gamma$  en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del hH<sub>3</sub>R.
- Evaluar la participación de la cinasa Ras, utilizando el inhibidor AMG510.
- Evaluar la transactivación del receptor a IGF-1 utilizando el inhibidor de cinasas de Tirosina AG1024.

### Mediano y largo plazo

- Evaluar y comparar la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del hH<sub>3</sub>R y los mecanismos responsables en:
  - a. Células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y.
  - b. Rebanadas de tejido cerebral (neocórtex y corteza cerebral).
  - c. Eventualmente, en cultivos primarios de neuronas del neocórtex y de la corteza cerebral.

## 14. Referencias

1. Aquino-Miranda, G., Molina-Hernández, A., Arias-Montaño, J.A., 2012. Regulation by histamine H<sub>3</sub> receptors of neurotransmitter release in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease pathophysiology. *Gac. Med. Mex.* 148, 467-475.
2. Bongers G., Bakker R. A., Leurs R., 2007. Molecular aspects of the histamine H<sub>3</sub> receptor. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1195–1204.
3. Bongers G., Sallmen T., Passani M. B., 2007 Akt/GSK-3 $\beta$  axis as a new signaling pathway of the histamine H<sub>3</sub> receptor. *J. Neurochem.* 103, 248–258.
4. Bongers, G.M. 2008. Signal transduction of the histamine H<sub>3</sub> receptor. [PhD-Thesis-Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].
5. Bookout, A. L., Finney, A. E., Guo, R., Peppel, K., Koch, W. J., & Daaka, Y. (2003). Targeting Gbetagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth. *J. Biol. Chem.*, 278(39), 37569–37573
6. Busse, W.W., Knuffman, J.E., 2006. Histamine. University of Wisconsin Medical School, Madison, Wi, USA. *Elsevier*. pp. 219-283.
7. Crudden, C.; Song, D.; Cismas, S.; Trocmé, E.; Pasca, S.; Calin, G.A.; Girnita, A.; Girnita, L. Below. 2019. The Surface: IGF-1R Therapeutic Targeting and Its Endocytic Journey. *Cells*, 8, 1223
8. Erb, L., & Weisman, G. A. (2012). Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1, 789–803.
9. Flores-Clemente, C., Osorio-Espinoza, A., Escamilla-Sánchez, J., Leurs. R., Arias. J.M., Arias-Montaño, J.A., 2013. A single-point mutation (Ala280Val) in the third intracellular loop alters the signalling properties of the human histamine H<sub>3</sub> receptor stably expressed in CHO-K1 cells. *Br. J. Pharmacol.* 170, 127-35.
10. Francis, H., Onori, P., Gaudio, E., Franchitto, A., DeMorrow, S., Venter, J., Kopriva, S., Carpino, G., Mancinelli, R., White, M., Meng, F., Vetusch, A., Sferra, R., Alpini, G., 2009. H<sub>3</sub> histamine receptor-mediated activation of protein kinase C $\alpha$  inhibits the growth of cholangiocarcinoma in vitro in vivo. *Mol. Cancer Res.* 7, 1704-1713.
11. García-Gálvez, A. M., Escamilla-Sánchez, J., Flores-Maldonado, C., Contreras, R. G., Arias, J. M., & Arias-Montaño, J. A. (2018). Differential homologous desensitization of the human histamine H<sub>3</sub> receptors of 445 and 365 amino acids expressed in CHO-K1 cells. *Neurochem. Int.* 112, 114–123.

12. García-Gálvez, A.M., Arias-Montaña, J.A., 2016. Isoformas del receptor a histamina H<sub>3</sub> humano: generación, expresión en el sistema nervioso central (SNC) e implicaciones funcionales. *Gac. Med. Mex.* 152, 94-102.
13. Ghamari, N., Zarei. O., Arias-Montaña, J.A., Reiner, D., Dastmalchi, S., Stark. Holger., Hamzeh-Mivehroud. M., 2019. Histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists/inverse agonist: Where do they go? *Pharmacol. Ther.* 200, 69-84.
14. Ginnan, R., Guikema, B. J., Singer H.A., Jourd'heuil D. (2006). PKC- $\delta$  mediates activation of ERK-1/2 and induction of iNOS by IL-1 $\beta$  in vascular smooth muscle cells. *Am J. Physiol Cell Physiol.* 209, 1583-1591.
15. Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., & Hu, L. L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp. Ther. Med.* 19, 1997–2007.
16. Gutkind J. S. (2000). Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Science's STKE* (40), re1
17. Hernández-Angeles, A., Soria-Jasso, L. E., Ortega, A., Arias-Montaña, J. A., 2001. Histamine H<sub>1</sub> receptor activation stimulates mitogenesis in human astrocytoma U373 MG cells. *J. Neurooncol.* 55, 81–89.
18. Holdsworth, G., Slocombe, P., Hutchinson, G., & Milligan, G. (2005). Analysis of endogenous S1P and LPA receptor expression in CHO-K1 cells. *Gene* 350, 59–63.
19. Jan, C.-R., Ho, C.-M., Wu, S.-N., Tseng, C.-J. (1998). The phospholipase C inhibitor U73122 increases cytosolic calcium in MDCK cells by activating calcium influx and releasing stored calcium. *Life Sci.* 63, 895-908.
20. Jo, M., Thomas, K. S., O'Donnell, D. M., Gonias, S. L., 2003. Epidermal growth factor receptor-dependent and -independent cell-signaling pathways originating from the urokinase receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 1642–1646.
21. Kahsai, A. W., Shah, K. S., Shim, P. J., Lee, M. A., Shreiber, B. N., Schwalb, A.M., Zhang, X., Kwon, H. Y., Huang, L.-Y., Soderblom, E. J., Ahn, S., Lefkowitz, R. J.. Signal transduction at GPCRs: Allosteric activation of the ERK MAPK by  $\beta$ -arrestin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 120, e2303794120.
22. Katz, S., Boland, R., Santillán, G. 2006. Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: Involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 2082-209.

23. Kawano, T., Inokuchi, J., Eto, M., Murata, M., & Kang, J. H. (2021). Activators and Inhibitors of Protein Kinase C (PKC): Their Applications in Clinical Trials. *Pharmaceutics* 13, 1748.
24. Koch, W.J., Hawes, B.E., Inglese, J., Luttrell, L.M, Lefkowitz, J. (1993). Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G $\beta$  mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 269, 6193-6197.
25. Lai, X., Ye, L., Liao, Y., Jin, L., Ma, Q., Lu, B., Sun, Y., Shi, Y., & Zhou, N., 2016. Agonist-induced activation of histamine H<sub>3</sub> receptor signals to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through PKC-, PLD-, and EGFR-dependent mechanisms. *J. Neurochem.* 137, 200–215.
26. Lovenberg, T., Roland, BL., Wilson, SJ., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, RM., Erlander, G., 1999. Cloning and functional expression of the human histamine H<sub>3</sub> receptor. *R.W. Mol. Pharmacol.* 55, 1101-1107.
27. Luttrell, Deirdre K. y Luttrell, Louis M. 2003. Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases. *Assay Drug Dev. Technol.* 1, 327-338.
28. Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* 115, 455-465.
29. Ma, Y. C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W., & Huang, X. Y. (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* 102, 635–646.
30. Macmillan, D., & McCarron, J. G. (2010). The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca<sup>2+</sup> release from the intracellular sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store by inhibiting Ca<sup>2+</sup> pumps in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1295–1301.
31. Manne, B. K., Münzer, P., Badolia, R., Walker-Allgaier, B., Campbell, R. A., Middleton, E., Weyrich, A. S., Kunapuli, S. P., Borst, O., & Rondina, M. T. (2018). PDK1 governs thromboxane generation and thrombosis in platelets by regulating activation of Raf1 in the MAPK pathway. *Thromb. Haesmost.* 16, 1211–1225.
32. Mariottini, C., Scartabelli, T., Bongers, G., Arrigucci, S., Nosi, D., Leurs, R., Chiarugi, A., Blandina, P., Pellegrini-Giampietro, D. E., Passani, M. B., 2009. Activation of the histaminergic H<sub>3</sub> receptor induces phosphorylation of the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway in cultured cortical neurons and protects against neurotoxic insults. *J. Neurochem.* 110, 1469–1478.

33. Martínez, M., Martínez, N. A., Silvia, W.I. 2017. Measurement of the intracellular calcium concentration with Fura-2 AM using a fluorescence plate reader. *Bio Protoc.* 7, e2411.
34. Molina-Hernández. A., Fabián-Díaz. N., Arias-Montaña. J.A., 2012. Histamine in brain development. *J. Neurochem.* 122, 872-882.
35. Morrison, K. Deborah., 2012. Map kinase pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11, 1-6.
36. Newton A.C., 1995. Protein kinase C: Structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 28495-28498.
37. Nieto-Alamilla, G., Marquez-Gómez, R., García-Gálvez, A., Morales-Figueroa, G.-E., Arias-Montaña, J.A., 2016. The histamine H<sub>3</sub> receptor: structure, pharmacology and fuction. *Mol. Pharmacol.* 90, 649-673.
38. Okat, Z.,2018. The molecular functions of protein kinase C (PKC) isoforms. *IPMRJ.* 3, 540-544.
39. Osorio-Espinoza, A., Escamilla-Sánchez, J., Aquino-Jarquín, G., y Arias-Montaña, J. A. 2014. Homologous desensitization of human histamine H<sub>3</sub> receptors expressed in CHO-K1 cells. *Neuropharmacology.* 77, 387-397
40. Palanisamy, S., Xue, C., Ishiyama, S., Naga, P, S.V., Gabrielson, K., 2021. GPCR-ErbB transactivation pathways and clinical implications. *Cell Signal.* 86, 110092.
41. Panula, P., Chazot, P.L., Cowart, M., Gutmer, R., Leurs, R., Liu, W.L., Stark, H., Thurmond, R.L., Haas, H.L., 2015. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 67, 601-655.
42. Parsons, E.M., Ganellin.; 2006. Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.* 147, 127-135.
43. Patel, A. (2013). Measurement of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in whole cell suspensions using Fura-2. Lambert, D. G., Rainbow, R.D. Calcium Signalling Protocols. *Methods Mol. Biol.* 937, 37-47.
44. Patel, P., Golla, K., Naik, U. P. (2018). PDK1 governs thromboxane generation and thrombosis in platelets by regulating activation of Raf1 in the MAPK pathway: comment. *Thromb. Haemost.* 16(9), 1901–1904.
45. Ramos-Jiménez, J., Garduño-Torres, B., Arias-Montaña, J.A., 2009. Histamina y comunicación intracelular: 99 años de historia. *Rev. Biomed.* 20, 110-126.

46. Roskoski, R., 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* 66, 1043-6618.
47. Shah, B. H., Olivares-Reyes J.A., Catt, K.J., 2005. The protein Kinase C inhibitor Go6976 [12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole] potentiates agonist-induced mitogen-activated protein kinase activation through tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Mol. Pharmacol.* 67, 184-194.
48. Siew, L. P., Ray, S.C, Rao, S., 2015. Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation. *Immunology* 146, 508-522.
49. Smith, J. S., Pack, T. F., Inoue, A., Lee, C., Zheng, K., Choi, I., Eiger, D. S., Warman, A., Xiong, X., Ma, Z., Viswanathan, G., Levitan, I. M., Rochelle, L. K., Staus, D. P., Snyder, J. C., Kahsai, A. W., Caron, M. G., Rajagopal, S., 2021. Noncanonical scaffolding of G<sub>αi</sub> and β-arrestin by G protein-coupled receptors. *Science* 371, e1833.
50. Smrcka A. V. (2013). Molecular targeting of G<sub>α</sub> and Gβγ subunits: a potential approach for cancer therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 290–298.
51. Thompson, A. K., Mostafapour, S. P., Denlinger, L. C., Bleasdale, J. E., Fisher, S. K. 1991. The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for G<sub>q</sub> in receptor compartmentation. *J. Biol. Chem.* 266, 23856-23862.
52. Valdespino-Gómez. V. M., Valdespino-Castillo. P. M., Valdespino-Castillo. V. E., 2015. Cell signaling pathways interaction in cellular proliferation: Potential target for therapeutic interventions. *Cirugía y Cirujanos.* 83, 165-174.
53. Wang, C. Y., Lin, Y. W., & Yang, J. L. 2008. Activation of protein kinase C<sub>α</sub> signaling prevents cytotoxicity and mutagenicity following lead acetate in CL3 human lung cancer cells. *Toxicology* 250, 55–61.
54. Zampeli, E., Tiligada, E. 2009. The role of histamine H<sub>4</sub> receptor in immune and inflammatory disorders. *Br. J. Pharmacol.* 157, 24-33.
55. Zayzafoon Majd., 2005. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *J. Cell. Biochem.* 97, 56-70.
56. Zhang, W., Lui, T.-H., 2002. Mapk signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 12, 9-18.

57. Zhang, X., Daugherty, S. L., de Groat, W. C. 2011. Activation of CaMKII and ERK1/2 contributes to the time-dependent potentiation of Ca<sup>2+</sup> response elicited by repeated application of capsaicin in rat DRG neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R644–R654.