

Isoformas del receptor a histamina H₃ humano: generación, expresión en el sistema nervioso central (SNC) e implicaciones funcionales

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

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

Resumen

La histamina es un importante neuromodulador del SNC humano que participa en la regulación de diversas de sus funciones. Las neuronas histaminérgicas se localizan exclusivamente en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo, de donde envían axones a otras regiones del cerebro, al cerebelo y a la médula espinal. Los efectos de la histamina se ejercen mediante la activación de cuatro receptores acoplados a proteínas G (GPCR): H₁, H₂, H₃ y H₄. En el SNC los tres primeros se expresan de manera importante; el receptor H₃ (H₃R) se encuentra exclusivamente en las células neuronales como auto o heterorreceptor, y un aspecto relevante es la existencia de isoformas con diferente número de aminoácidos, generadas por el procesamiento alternativo del ARN mensajero (ARNm) precursor. Para el receptor humano se han identificado 20 isoformas con base en la detección del ARNm correspondiente. Un número importante de ellas no son funcionales, ya que carecen de las regiones necesarias para la unión del agonista o para la transducción de señales, pero al menos cinco isoformas muestran funcionalidad al ser expresadas en sistemas heterólogos. En este trabajo se revisan los procesos que generan las diferentes isoformas del H₃R humano (hH₃R), sus características estructurales, su expresión en el SNC y la información disponible sobre su función.

PALABRAS CLAVE: Histamina. Receptor H₃. Isoformas. Procesamiento alternativo. ARN mensajero. Sistema nervioso central. Neuromodulación.

Abstract

Histamine plays a significant role as a neuromodulator in the human central nervous system. Histamine-releasing neurons are exclusively located in the tuberomammillary nucleus of the hypothalamus, project to all major areas of the brain, and participate in functions such as the regulation of sleep/wakefulness, locomotor activity, feeding and drinking, analgesia, learning, and memory. The functional effects of histamine are exerted through the activation of four G protein-coupled receptors (H₁, H₂, H₃ and H₄), and in the central nervous system the first three receptors are widely expressed. The H₃ receptor (H₃R) is found exclusively in neuronal cells, where it functions as auto- and hetero-receptor. One remarkable characteristic of the H₃R is the existence of isoforms, generated by alternative splicing of the messenger RNA. For the human H₃R, 20 isoforms have been reported; although a significant number lack those regions required for agonist binding or receptor signaling, at least five isoforms appear functional upon heterologous expression. In this work we review the evidence for the generation of human H₃R isoforms, their expression, and the available information regarding the functionality of such receptors. (Gac Med Mex. 2016;152:94-102)

Corresponding author: José Antonio Arias-Montaño, jaarias@fisio.cinvestav.mx

KEY WORDS: Histamine. H₃ receptor. Isoform. mRNA. Alternative splicing. Central nervous system.

Correspondencia:

*José Antonio Arias-Montaño
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias
Cinvestav
Apdo. postal 14-740, C.P. 07000, México, D.F., México
E-mail: jaarias@fisio.cinvestav.mx

Fecha de recepción en versión modificada: 06-06-2015

Fecha de aceptación: 10-06-2015

Introducción

La histamina participa en numerosas funciones en el organismo humano, como las respuestas alérgicas, la secreción ácida gástrica, la modulación de la transmisión sináptica y la respuesta inmune, mediante la activación de cuatro subtipos de GPCR¹⁻⁵: H₁, H₂, H₃ y H₄.

En el SNC existe un grupo de neuronas histaminérgicas (64,000 células en total), localizadas en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo posterior, que envían proyecciones al cerebro, el cerebelo y la médula espinal^{6,7}, con la mayor densidad de inervación en la corteza cerebral, los ganglios basales, el tálamo, el hipotálamo y el hipocampo^{7,8}.

La histamina actúa como un neuromodulador en el SNC, facilitando o inhibiendo la actividad neuronal⁹, y participa en procesos como el ciclo de sueño y vigilia, la actividad motora, la circulación cerebral, la temperatura corporal, la ingestión de agua y alimentos, la nocicepción y la memoria y el aprendizaje. Tres de los cuatro receptores a histamina, H₁, H₂, y H₃, tienen una amplia expresión en el SNC^{9,10}; y el H₃R se expresa de manera exclusiva en las células neuronales, tanto del SNC como del sistema nervioso periférico. En el SNC el H₃R se encuentra en las propias neuronas histaminérgicas como autorreceptor y en las neuronas que liberan otros neurotransmisores (heterorreceptor). Una característica importante del H₃R es la existencia de isoformas, generadas por el procesamiento alternativo (*alternative splicing*) del ARNm precursor. En el caso del hH₃R, se han reportado 20 isoformas, y si bien algunas de ellas carecen de las regiones necesarias para la unión del agonista o de los dominios involucrados en la señalización, al menos cinco son funcionales al ser expresadas en sistemas heterólogos.

En este trabajo se describen brevemente la estructura y la función del hH₃R, y posteriormente se revisa la información disponible sobre las isoformas descritas en relación con su estructura, su expresión en el SNC, sus características farmacológicas y funcionales, y su posible relación con funciones cerebrales específicas.

H₃R

El H₃R fue identificado farmacológicamente en 1983 como el autorreceptor responsable de la retroalimentación negativa de la síntesis y liberación de histamina^{11,12}. Como heterorreceptor, el H₃R modula la liberación de la noradrenalina, la serotonina, la dopamina, el ácido glutámico, el ácido γ -aminobutírico (GABA)

y neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)^{9,13}.

Existen evidencias de una localización postsináptica del H₃R en ciertas regiones del cerebro, como el neocórtico, la corteza cerebral, el hipocampo y el núcleo *accumbens*^{14,15}. En las neuronas estriatales GABAérgicas los H₃R postsinápticos forman heterodímeros con los receptores a dopamina D₁ y D₂ modulando su señalización, con implicaciones relevantes para la actividad locomotora¹⁶⁻¹⁹. En el cultivo primario de neuronas de la corteza cerebral del ratón, la activación del H₃R aumenta la expresión de proteínas antiapoptóticas y protege parcialmente a las células del daño inducido por la privación de suero o por la activación de receptores a glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA)²⁰.

Conformación estructural

El H₃R es una proteína de siete dominios transmembranales (TM), lo que da origen a tres asas extracelulares y tres intracelulares de diferente tamaño. La tercera asa intracelular (i3) y la región carboxilo terminal son importantes para el acople del receptor a proteínas G y la consecuente señalización intracelular²¹⁻²³.

Señalización intracelular

El H₃R se acopla a las proteínas G $\alpha_{i/o}$, las cuales desencadenan varias vías de señalización intracelular, entre las que se encuentran las siguientes:

- Inhibición de la formación de 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc).
- Activación de la fosfolipasa A₂.
- Inhibición de la apertura de canales de Ca²⁺ activados por voltaje (N y P/Q), lo que subyace al efecto inhibitorio en la liberación de neurotransmisores.
- Activación de la vía de la 3-cinasa de fosfatidil-inositol (PI3K).
- Activación de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPK).
- Activación de la fosfolipasa C, que conduce a la movilización de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares.
- Inhibición del intercambiador de Na⁺/H⁺.
- Activación de canales de K⁺ rectificadores entrantes²⁴⁻²⁶.

Generación de isoformas del H₃R por procesamiento alternativo del ARNm

Un solo gen potencialmente puede codificar varias proteínas mediante el procesamiento alternativo del

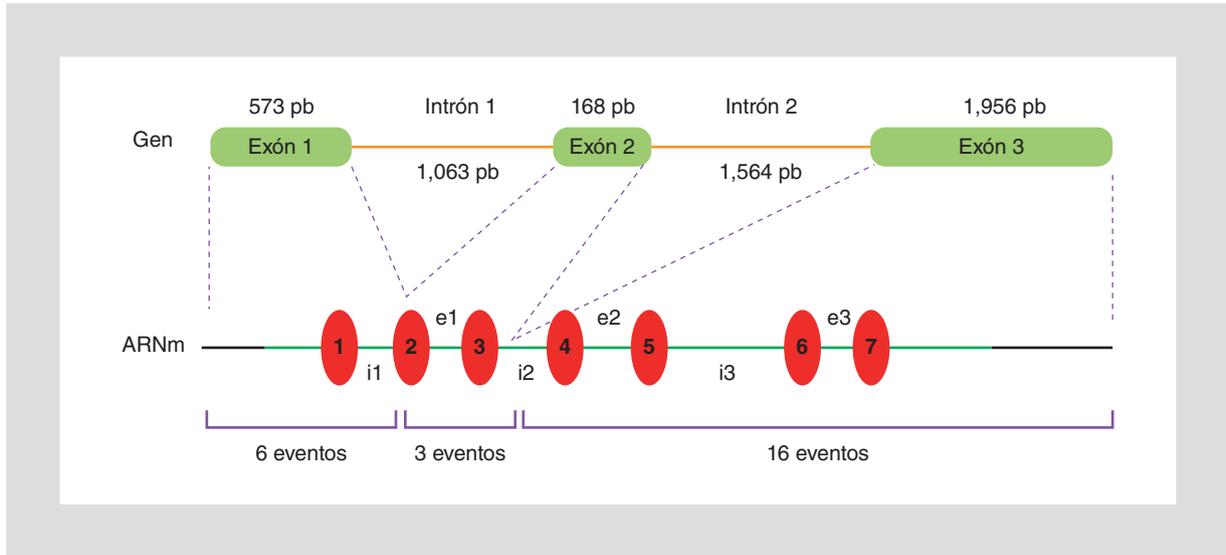


Figura 1. Organización genómica del hH_3R . En la representación esquemática del gen del hH_3R se muestran los exones (verde) y los intrones (líneas cafés), cuya extensión se expresa en pares de bases (pb). En la representación esquemática del ARNm del hH_3R , se muestra la región codificante (línea verde) con los dominios TM ilustrados en óvalos rojos, y se indican las asas extra e intracelulares. La línea negra indica la región no traducida. En los corchetes se indican las regiones del ARNm donde tienen lugar los eventos de procesamiento alternativo (alternative splicing) y su número.

ARNm. En este proceso los exones o intrones pueden ser incluidos o excluidos del ARNm precursor, generando así diversas variantes de ARNm maduro. El resultado final es la síntesis de varias proteínas a partir del mismo gen, con diferente secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, con diferencias potenciales en sus propiedades estructurales y funcionales. El procesamiento alternativo del ARNm también puede conducir a la presencia de un codón de paro prematuro, lo que tiene como resultado una proteína de menor tamaño.

Inicialmente se sugirió la existencia de isoformas del H_3R en varias especies de mamíferos (cobayo, rata, ratón, mono y humano) por la heterogeneidad farmacológica de los H_3R de diferentes áreas cerebrales, evidenciada por ensayos de unión de radioligando y funcionales²⁷⁻³³. En 1999 la clonación del ADN complementario (ADNc) por Lovenberg, et al. permitió el estudio molecular del receptor, que mostró que el gen correspondiente se encuentra en el brazo largo del cromosoma 20 (20q13.32-20q13.33) y que el ADNc codifica una proteína de 445 aminoácidos (aa)³. El análisis de la secuencia de nucleótidos muestra que el gen contiene dos intrones (Fig. 1) localizados en la misma posición en el gen de los roedores y que las regiones a los lados de los sitios de eliminación de secuencias y de generación de isoformas contienen sitios donadores y aceptores de procesamiento alternativo presentes también en los genes homólogos del ratón y del cobayo^{27,29,34,35}.

El análisis con la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción ha permitido identificar, a la fecha, 20 isoformas del hH_3R , con diferencias en la longitud de los extremos amino y carboxilo, pérdida de aminoácidos en la tercera asa intracelular (i3) y eliminación de secuencias en las regiones TM (Fig. 2). De ellas, ocho isoformas (hH_3R_{445} , hH_3R_{453} , hH_3R_{415} , hH_3R_{413} , hH_3R_{409} , hH_3R_{373} , hH_3R_{365} y hH_3R_{329}) pueden unir ligandos al ser expresadas en sistemas heterólogos. Estas isoformas son homólogas en sus regiones TM, y difieren en las regiones amino y carboxilo terminales y/o en el asa i3. Las otras 12 isoformas no unen ligandos y serían, por lo tanto, no funcionales, aunque en varios casos su actividad no ha sido estudiada con detalle.

Las isoformas del hH_3R son generadas por mecanismos de eliminación y/o retención de un pseudointrón, que en el humano y en la rata tienen lugar primariamente en la secuencia de ARNm correspondiente al exón 3 del gen^{28,35}. Se ha reportado un mecanismo similar para otros receptores también acoplados a proteínas $G\alpha_{i/o}$, como los receptores a dopamina D_2 y D_3 , a GABA tipo B y a opioides tipo μ ³⁶⁻³⁹.

Isoformas del hH_3R

Los eventos de procesamiento alternativo del hH_3R ocurren en cuatro regiones del ARNm, tres de ellas ubicadas en las regiones correspondientes a los aminoácidos 7-42, 85-98 y 197-417 de la proteína (Fig. 2),

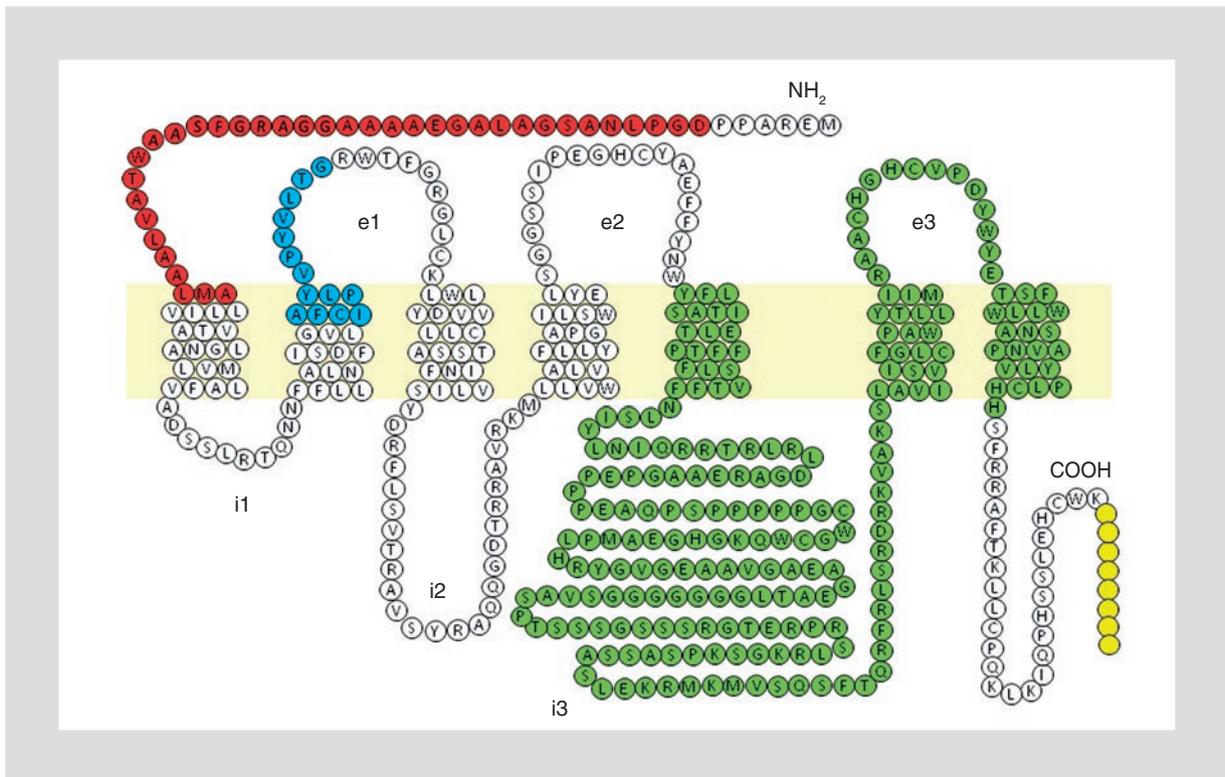


Figura 2. Regiones de ocurrencia del procesamiento alternativo del hH₃R. Los eventos ocurren en cuatro regiones diferentes, tres de ellas ubicadas en las posiciones que corresponden a los aminoácidos 7-42 (rojo), 85-98 (azul) y 197-417 (verde). En la cuarta región los eventos generan isoformas que consisten en 8 aa adicionales en el extremo carboxilo terminal (amarillo).

mientras que en la cuarta región los eventos generan isoformas con 8 aa adicionales en el extremo carboxilo terminal (Fig. 2)⁴⁰.

Utilizando ARNm del tálamo humano, Cogé, et al., en 2001⁴¹, clonaron el hH₃R de 445 aa (hH₃R₄₄₅) y cinco diferentes isoformas de 431, 415, 365, 329 y 326 aa, las cuales presentan eliminación de aminoácidos en la región TM2 (hH₃R₄₃₁) o en el asa i3 (hH₃R₄₁₅, hH₃R₃₆₅, hH₃R₃₂₉ y hH₃R₃₂₆). Ese mismo año, Tardivel-Lacombe, et al.³⁵ confirmaron la presencia en el cerebro humano de la isoforma hH₃R₄₄₅ y detectaron otro receptor con eliminación de un fragmento de 32 aa (aa 274-305) en el asa i3 (hH₃R₄₁₃) (Tabla 1). También en el año 2001, Tsui describió dos isoformas más del receptor (hH₃R₃₅₁ y hH₃R₃₄₀) (Tabla 1)⁴², generadas por la combinación de eventos de procesamiento alternativo, que consisten en la ausencia de los aminoácidos 85-98 o 393-417, además del evento de procesamiento alternativo del asa i3 que da origen al receptor de 365 aa al eliminar 240 nucleótidos⁴¹.

Nakamura, et al., en 2000⁴³, y posteriormente Wiedemann, et al., en 2002⁴⁴, identificaron una isoforma más del hH₃R, con 8 aa adicionales en el extremo carboxilo terminal del receptor (hH₃R₄₅₃) (Tabla 1), generada

por la presencia de un sitio donador de procesamiento alternativo en la secuencia del codón de paro de la traducción y de un nuevo sitio aceptor de procesamiento alternativo localizado en la región no codificante del extremo 3' del ADNc original.

Se han reportado eventos de procesamiento alternativo combinados que dan origen a cuatro isoformas más del hH₃R⁴⁵:

- hH₃R₃₀₁, generada por la eliminación de 144 aa, con pérdida de gran parte del asa i3, así como de las regiones TM6 y TM7 de la proteína.
- hH₃R₃₇₃, con la eliminación de 80 aa en el asa i3 reportada para la isoforma hH₃R₃₆₅⁴¹, y un segundo sitio de procesamiento alternativo ubicado después del codón de paro en la secuencia codificante, lo que remueve el codón y conlleva 8 aa adicionales en la región carboxilo terminal.
- hH₃R₃₀₉, con eliminación de 408 nucleótidos, originando un receptor sin las regiones TM4 y TM5, y sin parte del asa i3.
- hH₃R₂₂₁, con un evento de procesamiento alternativo idéntico al del hH₃R₃₀₁, así como el evento observado para el asa i3 de la isoforma hH₃R₃₇₃, lo que origina un receptor con sólo cinco TM.

Tabla 1. Expresión en el cerebro humano y señalización en sistemas heterólogos de las isoformas del hH₃R

Isoforma	Expresión en el cerebro	Señalización
H ₃ (445)	Tálamo, neocórtex, corteza cerebral, cerebelo, amígdala, sustancia negra, hipocampo, hipotálamo, cuerpo calloso, médula espinal	↓ AMPc, ↑ MAPK, ↑ unión de [³⁵ S]-GTPγS, ↑ [Ca ²⁺] _i
H ₃ (431)	Amígdala, cerebelo, neocórtex, tálamo, corteza prefrontal	No determinada
H ₃ (415)	Neocórtex, tálamo, cerebelo, amígdala	↑ [Ca ²⁺] _i
H ₃ (365)	Cerebelo, tálamo, hipotálamo, neocórtex, sustancia negra, hipocampo, amígdala, corteza prefrontal	↑ [Ca ²⁺] _i , ↓ AMPc, ↑ unión de [³⁵ S]-GTPγS
H ₃ (329a)*	Sustancia negra, amígdala, corteza cerebral, hipotálamo	No funcional
H ₃ (326)	Sustancia negra, corteza prefrontal, amígdala, hipotálamo	No determinada
H ₃ (413)	Neocórtex, amígdala	No determinada
H ₃ (453)	No determinada	↓ AMPc
H ₃ (301)	No determinada	No funcional
H ₃ (373)	Hipocampo, sustancia negra, amígdala, hipotálamo	↓ AMPc
H ₃ (309)	No determinada	No funcional
H ₃ (221)	No determinada	No determinada
H ₃ (409)	No determinada	No determinada
H ₃ (329b)*	No determinada	No determinada
H ₃ (395)	No determinada	No determinada
H ₃ (379)	No determinada	No determinada
H ₃ (293)	No determinada	No determinada
H ₃ (290)	No determinada	No determinada
H ₃ (351)	No determinada	No determinada
H ₃ (340)	No determinada	No determinada

*Las isoformas hH₃R_{329a} y hH₃R_{329b} tienen el mismo número de aminoácidos, pero difieren en la región de eliminación de nucleótidos.

↑: aumento; ↓: disminución; [Ca²⁺]_i: concentración intracelular de calcio.

Adaptado de Lovenberg, et al.³, Bongers, et al.³², Tardivel-Lacombe, et al.³⁵, Bongers, et al.⁴⁰, Cogé, et al.⁴¹, Tsui⁴², Nakamura, et al.⁴³, Wiedemann, et al.⁴⁴, Wellendorph, et al.⁴⁵ y Gallagher, et al.⁴⁶.

Gallagher y Yates, en 2007⁴⁶, describieron seis isoformas más obtenidas a partir del ARNm de tejido cerebral humano. Una de ellas, hH₃R₄₀₉, consiste de la pérdida de 36 aa (aa 7-42) de la región amino terminal del hH₃R₄₄₅. Las demás isoformas se generan por la combinación de eventos de procesamiento alternativo previamente reportados. Una isoforma de 329 aa, hH₃R₃₂₉, es generada por la pérdida de los aminoácidos 7-42 en la región amino terminal y de 80 aa en el asa i3, esta última descrita para la isoforma hH₃R₃₆₅⁴¹. Otra isoforma, hH₃R₃₉₅, consiste en la eliminación de los aminoácidos 7-42 antes mencionada y la pérdida adicional de 14 aa en la región TM2, importante para la unión del ligando al receptor y, por lo tanto, para su activación. Las tres últimas isoformas reportadas tienen

una eliminación variable de aminoácidos en el asa i3 (30, 116 y 119 aa), además de la ausencia de 36 aa en el extremo amino terminal de la proteína, generando los receptores hH₃R₃₇₉, hH₃R₂₉₃ y hH₃R₂₉₀ (Tabla 1).

Expresión de las isoformas del hH₃R en el SNC

El análisis realizado por Cogé, et al.⁴¹ de la expresión en el SNC humano del ARNm de las seis isoformas clonadas por este grupo (hH₃R₄₄₅, hH₃R₄₃₁, hH₃R₄₁₅, hH₃R₃₆₅, hH₃R₃₂₉ y hH₃R₃₂₆) mostró que la isoforma hH₃R₄₄₅ fue la más abundante, y se detectó, a la par de una alta expresión de las isoformas hH₃R₄₁₅ y hH₃R₃₆₅, en el tálamo, el núcleo caudado y el cerebelo, donde

los niveles de las isoformas hH₃R₃₂₉ y hH₃R₃₂₆ fueron muy bajos. En contraste, la expresión del ARNm de las isoformas hH₃R₃₂₉ y hH₃R₃₂₆ fue alta en la amígdala, la sustancia negra, la corteza cerebral y el hipotálamo, sin evidencia de expresión en el hipocampo (Tabla 1). En el estudio de Wellendorph, et al. (2002)⁴⁵ el ARNm de la isoforma hH₃R₄₄₅ se encontró en el hipocampo, los ganglios basales, la sustancia negra, la amígdala y el hipotálamo, pero no en el tálamo o en el cerebro anterior. Este mismo patrón se observó para el ARNm de los receptores hH₃R₃₆₅/hH₃R₃₇₃, con la excepción de que la señal del hipotálamo fue mayor para este ARNm.

Esbenshade, et al. (2006)³¹ reportaron niveles variables del ARNm de las isoformas hH₃R₄₄₅, hH₃R₄₁₃, hH₃R₃₆₅ y hH₃R₃₂₉ en el tejido cerebral humano; las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ fueron las más abundantes, con los niveles más altos en el hipotálamo y el cerebelo, y una expresión similar en la amígdala, el núcleo caudado, la sustancia negra, el tálamo y el cerebelo. Las isoformas hH₃R₄₁₃ y hH₃R₃₂₉ fueron mucho menos abundantes; la isoforma hH₃R₄₁₃ se detectó sólo en el núcleo caudado y la amígdala, y el receptor hH₃R₃₂₉, únicamente en la amígdala.

Bongers, et al.³² compararon la expresión del ARNm de las isoformas de 445 y 365 aa en el cerebro humano, y reportaron lo siguiente: expresión alta del hH₃R₄₄₅ en el cerebelo y el núcleo caudado, expresión moderada en el hipotálamo y el tálamo, expresión baja en la corteza prefrontal, la amígdala, el hipocampo, el cuerpo caloso y la sustancia negra, y muy baja expresión en la médula espinal. La isoforma hH₃R₃₆₅ fue detectada en las mismas regiones, con una expresión mayor (1.4 veces) que la del hH₃R₄₄₅, con excepción del núcleo caudado, el cuerpo caloso y la médula espinal, áreas en las que la expresión de la isoforma hH₃R₄₄₅ fue 3.5, 2.8 y 2.2 veces la correspondiente al receptor hH₃R₃₆₅.

Características farmacológicas y funcionales de las isoformas del hH₃R

A la fecha, las características farmacológicas y funcionales de las isoformas del H₃R sólo han sido evaluadas mediante su expresión en líneas celulares.

La expresión en células NIH-3T3 en conjunción con ensayos de gen reportero que involucran la inhibición de la formación de AMPc mostró que los receptores hH₃R₄₄₅, hH₃R₃₆₅ y hH₃R₃₇₃ fueron funcionales, no así las isoformas hH₃R₃₀₁ (carente de la mayor parte del asa i3, así como de las regiones TM6 y TM7) y hH₃R₃₀₉ (sin las regiones TM4 y TM5, y parte del asa i3)⁴⁵. No se analizó la funcionalidad de la isoforma hH₃R₂₂₁, con

sólo cinco regiones TM y pérdida de 80 aa en el asa i3. En este mismo estudio, la respuesta a diferentes agonistas mostró que éstos fueron 5-27 veces más potentes para activar la isoforma hH₃R₃₆₅ que la isoforma hH₃R₄₄₅. En contraste, los antagonistas selectivos fueron 5-6 veces menos potentes para la isoforma hH₃R₃₆₅ que para la isoforma hH₃R₄₄₅.

La isoforma con 8 aa adicionales en el extremo carboxilo terminal del receptor (hH₃R₄₅₃) mostró unión de ligandos al ser expresada en las células COS-7, y en las células HEK-293 este receptor inhibe la formación de AMPc al ser activado por los agonistas histamina, N- α -metilhistamina (NMHA), R- α -metilhistamina (RAMH) e imetit, con una concentración efectiva media (EC₅₀) de 19, 0.26, 0.71 y 1.7 nM, respectivamente⁴³.

En las células C6, de glioma de rata, las isoformas hH₃R₄₄₅, hH₃R₄₁₅, hH₃R₃₆₅ y hH₃R₃₂₉ mostraron una afinidad semejante por el agonista marcado [³H]-NMHA, con constantes de disociación (Kd) de 0.50, 1.0, 0.25 y 0.63 nM, respectivamente³¹. En este mismo trabajo, el análisis de la movilización de calcio en células HEK transfectadas con proteínas G $\alpha_{q/5}$, acopladas a la estimulación de la fosfolipasa C y cuyos últimos 5 aa corresponden a la secuencia de las proteínas G $\alpha_{i/o}$, lo que les permite ser activadas por H₃R, mostró respuestas funcionales al agonista RAMH con una potencia similar para las isoformas hH₃R₄₄₅, hH₃R₄₁₅ y hH₃R₃₆₅ (EC₅₀ de 7.9, 5.0 y 7.9 nM, respectivamente), mientras que la isoforma hH₃R₃₂₉ no fue funcional. En relación con la respuesta máxima, el efecto de la isoforma hH₃R₄₁₅ fue el 60% de la respuesta del hH₃R₄₄₅ y la respuesta de la isoforma hH₃R₃₆₅ fue menor al 10%.

En el año 2007, Bongers, et al.³² reportaron una comparación detallada de las características farmacológicas y funcionales de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅. El análisis de la inhibición por 27 ligandos de la unión de [³H]-NMHA a las isoformas expresadas en células C6 de glioma mostró una mayor afinidad del hH₃R₃₆₅ (en promedio 3.4 veces) por agonistas como la propia histamina, el imemip y el imetit. Esta diferencia fue todavía mayor (en promedio 55 veces) al utilizar un segundo radioligando, [¹²⁵I]-yodofenpropit. En contraste, la isoforma hH₃R₄₄₅ mostró mayor afinidad por los antagonistas/agonistas inversos del H₃R, como el ciproxifán, el clobenpropit y A-331440. El H₃R puede tener actividad espontánea o constitutiva^{47,48}, definida como la activación del receptor en ausencia de agonistas. Esta característica tiene como resultado la señalización intracelular tónica, y en el SNC de la rata la actividad constitutiva de los H₃R inhibe de manera tónica la síntesis y la liberación de la histamina, así como la excitabilidad de

las neuronas histaminérgicas^{7,48-52}. La actividad constitutiva puede ser reducida o abolida por fármacos que se unen al receptor y lo estabilizan en un estado de menor o nula actividad (agonistas inversos).

En el estudio de Bongers, et al.³² la funcionalidad de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ fue analizada con ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS, indicativos de la activación de proteínas G por el receptor (en células HEK), y de inhibición de la formación de AMPc (en células C6). Para la unión de [³⁵S]-GTPγS, los agonistas fueron más potentes (4.6 veces en promedio) con la isoforma hH₃R₃₆₅. Sin embargo, el efecto máximo fue mayor con la isoforma hH₃R₄₄₅ (220 y 120% de la unión basal para las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅, respectivamente). En este ensayo los agonistas inversos fueron más potentes (2.6 veces) con la isoforma hH₃R₄₄₅. Para inhibir la formación de AMPc inducida por forskolina, los agonistas fueron más potentes (35 veces en promedio) con la isoforma hH₃R₃₆₅, pero más eficaces con el receptor hH₃R₄₄₅ (inhibición del 80% comparada con el 44% para la isoforma hH₃R₃₆₅). De manera opuesta, los agonistas inversos fueron más potentes (14 veces) con la isoforma hH₃R₄₄₅, pero la eficacia fue mayor con la isoforma hH₃R₃₆₅, lo que indica una mayor actividad constitutiva de la isoforma más corta. La aplicación del modelo cúbico ternario de la interacción agonista-receptor-proteína G indicó que la mayor actividad espontánea de la isoforma hH₃R₃₆₅ explicaría también la mayor potencia y afinidad de los agonistas con esta isoforma, así como la menor potencia y afinidad de los agonistas inversos.

Posibles implicaciones funcionales de la expresión de las isoformas del hH₃R

La histamina participa en la regulación de diversas funciones cerebrales. La expresión diferencial de las isoformas del H₃R en el SNC humano y de la rata (Tabla 1) plantea la posibilidad de acciones selectivas de las isoformas en la regulación de dichas funciones. Por ejemplo, en los roedores, los primates y el humano existe una expresión abundante del ARNm de la isoforma hH₃R₄₄₅ en regiones límbicas como el hipocampo, la amígdala y el prosencéfalo basal, lo que sugiere la participación de esta isoforma en la modulación de los estados cognitivos y afectivos^{3,33,34,45}. Esta isoforma es también predominante en el tálamo y la corteza cerebral, regiones cerebrales que forman parte del circuito corteza cerebral → ganglios basales → tálamo → corteza cerebral, crítico para el control de la conducta motora²⁶. La expresión importante de la isoforma

hH₃R₄₄₅ en la corteza cerebral y el hipocampo, regiones importantes para las funciones cognitivas, sugiere también su participación en estos procesos.

Bongers, et al.³² mostraron que la isoforma hH₃R₃₆₅ se expresa abundantemente en el tálamo y el cerebelo, lo que sugiere su participación en la modulación de la información sináptica proveniente del circuito de los ganglios basales, y, por lo tanto, en la regulación de la conducta motora, por ejemplo inhibiendo la liberación de glutamato⁵³ de las terminales talamocorticales y talamoestriatales⁵³. En comparación con la isoforma de 445 aa, el hH₃R₃₆₅ tiene una expresión abundante en el hipotálamo, donde se localizan las neuronas histaminérgicas, por lo que esta isoforma podría ser la principal ejecutora de la función de autorreceptor y modular la síntesis y liberación de la propia histamina, así como la frecuencia de disparo de las neuronas histaminérgicas. En este sentido, en la rata el receptor de 413 aa parece ejercer el papel de autorreceptor⁵⁴. La isoforma hH₃R₃₆₅ tiene una alta actividad constitutiva³², por lo que también podría ser responsable de la inhibición tónica observada en la frecuencia de disparo de las neuronas histaminérgicas, en las que la tioperamida, un antagonista/agonista inverso, aumenta dicha frecuencia^{48,52}.

El ARNm de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ es abundante en el neocórtex, donde al menos el 95% de la población neuronal corresponde a las neuronas espinosas medianas de naturaleza GABAérgica, divididas a su vez en dos poblaciones que envían sus axones a la sustancia negra reticulada (vía directa) o al globo pálido (vía indirecta)²⁶. En el neocórtex se observa también una de las más altas expresiones del H₃R¹⁴, y en las neuronas espinosas medianas el receptor modula los efectos de la dopamina tanto a nivel somático¹⁶⁻¹⁹ como en las terminales sinápticas, donde inhibe la liberación de GABA⁵⁵. En consecuencia, resulta de interés determinar si ambas poblaciones expresan las dos isoformas del H₃R o si éstas están segregadas en subpoblaciones neuronales, como ocurre para los receptores a dopamina, cuyos receptores D₁ y D₂ se expresan predominantemente en las neuronas estriadonigrales y estriadopalidales, respectivamente²⁶.

Drutel, et al.²⁸ mostraron que dos isoformas cortas de la rata (rH₃R₄₁₃ y rH₃R₃₉₇) tienen mayor potencia para inhibir la formación de AMPc, mientras que la isoforma de 445 aa es más potente para inducir la activación de la vía de las MAPK, lo cual, unido a la fuerte expresión del rH₃R₄₄₅ en el hipocampo, sugiere que la participación de la histamina en procesos de aprendizaje y memoria estaría mediada por este último receptor. Por

otra parte, en la rata la isoforma de 413 aa se expresa predominantemente en el núcleo dorsal del rafe y en el *locus coeruleus*, lo que sugiere que esta isoforma es responsable de la inhibición de la liberación de serotonina y noradrenalina, mientras que la fuerte expresión de las isoformas H₃R₄₄₅ en las células granulares y H₃R₃₉₇ en las células de Purkinje de la rata indicaría la participación diferencial de estas dos isoformas en la regulación de las funciones motoras del cerebelo.

En resumen, la información disponible sugiere que en el humano y la rata dos isoformas con menor número de aminoácidos en la región i3 (hH₃R₃₆₅ y rH₃R₄₁₃, respectivamente) podrían expresarse preferencialmente en las neuronas histaminérgicas y, en consecuencia, ser responsables de la modulación de la frecuencia de disparo y de la síntesis y liberación de la propia histamina. En cambio, la función de la isoforma de 445 aa parece ser más generalizada y entre sus efectos estarían la modulación del circuito motor corteza cerebral → ganglios basales → tálamo → corteza cerebral, así como de conductas afectivas mediante la regulación del sistema límbico.

De las 20 isoformas del hH₃R identificadas a la fecha 12 podrían ser no funcionales ya que carecen de regiones críticas para la unión del agonista y/o para la señalización. Sin embargo, en la rata tres isoformas de 497, 465 y 449 aa (rH₃R_D, rH₃R_E y rH₃R_F), que carecen de la región TM7 (necesaria para la unión del agonista)⁵⁶⁻⁵⁹ y que a la vez poseen un extremo carboxilo extracelular de 105 aa, sin homología con el dominio carboxilo de las variantes con 7 TM (rH₃R_A, rH₃R_B y rH₃R_C, con 445, 413 y 397 aa, respectivamente), reducen de manera importante la expresión en la membrana celular de la isoforma de 445 aa (rH₃R_A) al ser coexpresadas en células COS-7⁶⁰. Así, una posibilidad es que la coexpresión de isoformas no funcionales del hH₃R regule la expresión y la funcionalidad de las isoformas funcionales en el SNC humano.

Conclusiones

El control de la liberación de la propia histamina y de otros neurotransmisores, en particular de la acetilcolina, la dopamina, la noradrenalina y la serotonina, ha conducido a considerar el H₃R un blanco importante para el abordaje farmacológico de trastornos neurológicos como la esquizofrenia, los desórdenes cognitivos, la migraña, las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, el síndrome de Gilles de la Tourette y el desorden de hiperactividad con déficit de atención^{9,26,61-69}. La presencia de varias isoformas funcionales del hH₃R, con heterogeneidad en sus características farmacológicas

y de señalización, así como con patrones de expresión diferencial en las distintas áreas cerebrales, sugiere una fina regulación de la función del SNC por parte del sistema histaminérgico. La profundización de la comprensión del comportamiento farmacológico y funcional de las isoformas del hH₃R permitirá también el diseño de ligandos selectivos para ellas e incidir así de manera más específica en las alteraciones del SNC en las que se ha involucrado al sistema histaminérgico.

Agradecimientos

La investigación realizada en el laboratorio de José Antonio Arias Montaño ha sido apoyada por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Conacyt) (donativo 220448). Ana Maricela García Gálvez realiza estudios de doctorado en neurobiología celular y molecular en el Cinvestav, con el apoyo del Conacyt.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Yamashita M, Fukui H, Sugama K, et al. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(24):11515-9.
2. Gantz I, Schäffer M, DelValle J, et al. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H₂ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(13):429-33.
3. Lovenberg T, Roland B, Wilson S, et al. Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol Pharmacol*. 1999;55(6):1101-7.
4. Liu C, Ma XJ, Jiang X, et al. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H₄) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol*. 2001;59(3):420-6.
5. Tiligada E, Kyriakidis K, Chazot P, Passani MB. Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS Neurosci Ther*. 2011;17(6):620-8.
6. Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, et al. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res*. 1984;295(1):13-25.
7. Haas H, Sergeeva O, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev*. 2008;88(3):1183-241.
8. Arias-Montaño JA, Guerrero-Serna MG. Neuromodulación: una nueva función para la histamina. *Rev Biomed*. 1995;6:222-36.
9. Panula P, Nuutinen S. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(7):472-87.
10. Ramos-Jiménez J, Garduño-Torres B, Arias-Montaño JA. Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed*. 2009;20:100-26.
11. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature*. 1983;302(5911):832-7.
12. Arrang JM, Garbarg M, Lancelot JC, et al. Highly potent and selective ligands for histamine H₃ receptors. *Nature*. 1987;327(6118):117-23.
13. Aquino-Miranda G, Arias-Montaño JA. Neuromodulación e histamina: regulación de la liberación de neurotransmisores por receptores H₃. *Salud Mental*. 2012;35:345-54.
14. Pillot C, Heron A, Cochois V, et al. A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*. 2002;114(1):173-93.

15. González-Sepúlveda M, Rosell S, Hoffmann H, et al. Cellular distribution of the histamine H₃ receptor in the basal ganglia: Functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia*. 2013;3:109-21.
16. Sánchez-Lemus E, Arias-Montaño JA. Histamine H₃ receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-induced cAMP accumulation in rat striatal slices. *Neurosci Lett*. 2004;364(3):179-84.
17. Ferrada C, Ferré S, Casadó V, et al. Interactions between histamine H₃ and dopamine D₂ receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology*. 2008;55(2):190-7.
18. Ferrada C, Moreno E, Casadó V, et al. Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D₁ and histamine H₃ receptors. *Br J Pharmacol*. 2009;157(1):64-75.
19. Moreno E, Hoffmann H, Gonzalez-Sepúlveda M, et al. Dopamine D₁-histamine H₃ receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5846-54.
20. Mariottini C, Scartabelli T, Bongers G, et al. Activation of the histaminergic H₃ receptor induces phosphorylation of the Akt/GSK-3 β pathway in cultured cortical neurons and protects against neurotoxic insults. *J Neurochem*. 2009;110(5):1469-78.
21. Oldham W, Hamm H. How do receptors activate G proteins? *Adv Protein Chem*. 2007;74:67-93.
22. Wess J. G protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G protein recognition. *FASEB J*. 1997;11(5):346-54.
23. Kuramasu A, Sukegawa J, Sato T, et al. The hydrophobic amino acids in putative helix 8 in carboxy-terminus of histamine H₃ receptor are involved in receptor-G-protein coupling. *Cell Signal*. 2011;23(11):1843-9.
24. Leurs R, Bakker R, Timmerman H, de Esch I. The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(2):107-20.
25. Bongers G, Sallmen T, Passani MB, et al. The Akt/GSK-3β axis as a new signaling pathway of the histamine H₃ receptor. *J Neurochem*. 2007;103(1):248-58.
26. Aquino-Miranda G, Molina-Hernández A, Arias-Montaño JA. [Regulation by histamine H₃ receptors of neurotransmitter release in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease pathophysiology]. *Gac Med Mex*. 2012;148(5):467-75.
27. Tardivel-Lacombe J, Rouleau A, Héron A, et al. Cloning and cerebral expression of the guinea pig histamine H₃ receptor: evidence for two isoforms. *Neuroreport*. 2000;11(4):755-9.
28. Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, et al. Identification of rat H₃ receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol*. 2001;59(1):1-8.
29. Rouleau A, Héron A, Cochois V, Pillot C, Schwartz JC, Arrang JM. Cloning and expression of the mouse histamine H₃ receptor: evidence for multiple isoforms. *J Neurochem*. 2004;90(6):1331-8.
30. Bakker R. Histamine H₃ receptor isoforms. *Inflamm Res*. 2004;53(10):509-16.
31. Esbenshade TA, Strakhova M, Carr TL, et al. Differential CNS expression and functional activity of multiple human H₃ receptor isoforms. *Inflamm Res*. 2006; 55 Suppl 1:S38-9.
32. Bongers G, Krueger K, Miller T, et al. An 80-amino acid deletion in the third intracellular loop of a naturally occurring human histamine H₃ isoform confers pharmacological differences and constitutive activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;323(3):888-98.
33. Strakhova MI, Fox GB, Carr TL, et al. Cloning and characterization of the monkey histamine H₃ receptor isoforms. *Eur J Pharmacol*. 2008;601(1-3):8-15.
34. Morisset S, Sasse A, Gbahou F, et al. The rat H₃ receptor: gene organization and multiple isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 280(1):75-80.
35. Tardivel-Lacombe J, Morisset S, Gbahou F, Schwartz JC, Arrang JM. Chromosomal mapping and organization of the human histamine H₃ receptor gene. *Neuroreport*. 2001;12(2):321-4.
36. Doyle G, Sheng R, Lin S, et al. Identification of five mouse μ-opioid receptor (MOR) gene (*Oprm1*) splice variants containing a newly identified alternatively spliced exon. *Gene*. 2007;395(1-2):98-107.
37. Markovic D, Challiss RA. Alternative splicing of G protein-coupled receptors: physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(20):3337-52.
38. Moyer R, Wang D, Papp A, et al. Intronic polymorphisms affecting alternative splicing of human dopamine D₂ receptor are associated with cocaine abuse. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(4):753-62.
39. Wise H. The roles played by highly truncated splice variants of G protein-coupled receptors. *J Mol Signal*. 2012;7(1):13.
40. Bongers G, Bakker R, Leurs R. Molecular aspects of the histamine H₃ receptor. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(8):1195-204.
41. Cogé F, Guénin SP, Audinot V, et al. Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H₃ receptor. *Biochem J*. 2001;355(Pt 2):279-88.
42. Tsui P. Human histamine H₃ gene variant-3. Patent WO2001068816 A1. 2001.
43. Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, hH₃R. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279(2):615-20.
44. Wiedemann P, Bönisch H, Oerters F, Brüss M. Structure of the human histamine H₃ receptor gene (HRH3) and identification of naturally occurring variations. *J Neural Transm (Vienna)*. 2002;109(4):443-53.
45. Wellendorph P, Goodman M, Burstein E, Nash N, Brann M, Weiner D. Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H₃ receptor. *Neuropharmacology*. 2002;42(7): 929-40.
46. Gallagher M, Yates S. Histamine receptor H₃ polynucleotides. United States Patent. No. US 7,223,839 B2. 2007.
47. Rouleau A, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, et al. Histamine H₃ receptor-mediated [³⁵S]GTP[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H₃ receptors. *Br J Pharmacol*. 2002;135(2):383-92.
48. Arrang JM, Morisset S, Gbahou F. Constitutive activity of the histamine H₃ receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28(7):350-7.
49. Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, et al. High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature*. 2000; 408(6814):860-4.
50. Moreno-Delgado D, Torrent A, Gómez-Ramírez J, de Esch I, Blanco I, Ortiz J. Constitutive activity of H₃ autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway. *Neuropharmacology*. 2006;51(3):517-23.
51. Stevens DR, Eriksson KS, Brown RE, Haas HL. The mechanism of spontaneous firing in histaminergic neurons. *Behav Brain Res*. 2001;124(2): 105-12.
52. Eriksson KS, Sergeeva OA, Selbach O, Haas HL. Orexin (hypocretin)/dynorphin neurons control GABAergic inputs to tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci*. 2004;19(5):1278-84.
53. Garduño-Torres B, Treviño M, Gutiérrez R, Arias-Montaño JA. Pre-synaptic histamine H₃ receptors regulate glutamate, but not GABA release in rat thalamus. *Neuropharmacology*. 2007;52(2):527-35.
54. Gbahou F, Rouleau A, Arrang JM. The histamine autoreceptor is a short isoform of the H₃ receptor. *Br J Pharmacol*. 2012;166(6):1860-71.
55. Arias-Montaño JA, Floran B, García M, Aceves J, Young JM. Histamine H₃ receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D₁ receptor-dependent release of [3H]-γ-aminobutyric acid from rat striatal slices. *Br J Pharmacol*. 2001;133(1):165-71.
56. Leurs R, Smit M, Tensen C, TerLaak A, Timmerman H. Site-directed mutagenesis of the histamine H₁ receptor reveals a selective interaction of asparagine²⁰⁷ with subclasses of H₁ receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;201(1):295-301.
57. Uveges A, Kowal D, Zhang Y, et al. The role of transmembrane helix 5 in agonist binding to the human H₃ receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(2):451-8.
58. Ishikawa M, Watanabe T, Kudo T, et al. Investigation of the histamine H₃ receptor binding site. Design and synthesis of hybrid agonists with a lipophilic side chain. *J Med Chem*. 2010;53(17):6445-56.
59. Kim SK, Fristrup P, Abrol R, Goddard W III. Structure-based prediction of subtype selectivity of histamine H₃ receptor selective antagonists in clinical trials. *J Chem Inf Model*. 2011;51(12):3262-74.
60. Bakker R, Lozada-Flores A, Van Marle A, Shenton F, et al. Discovery of naturally occurring splice variants of the rat histamine H₃ receptor that act as dominant-negative isoforms. *Mol Pharmacol*. 2006;69(4):1194-206.
61. Esbenshade TA, Browman KE, Bitner RS, Strakhova M, Cowart MD, Brioni JD. The histamine H₃ receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol*. 2008;154(6):1166-81.
62. Passani MB, Blandina P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(4):242-9.
63. Vohora D, Bhowmik M. Histamine H₃ receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia, and drug abuse. *Front Syst Neurosci*. 2012;6:72.
64. Berlin M, Boyce C, Ruiz M. Histamine H₃ receptor as a drug discovery target. *J Med Chem*. 2011;54:26-53.
65. Gemkow M, Davenport A, Harich S, Ellenbroek B, Cesura A, Hallett D. The histamine H₃ receptor as a therapeutic drug target for CNS disorders. *Drug Discov Today*. 2009;14(9-10):509-15.
66. Shan L, Bao AM, Swaab DF. The human histaminergic system in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci*. 2015;38(3):167-77.
67. Castellán Baldan L, Williams KA, Gallezot JD, et al. Histidine decarboxylase deficiency causes Tourette syndrome: parallel findings in humans and mice. *Neuron*. 2014;81(1):77-90.
68. Millán-Guerrero RO, Baltazar-Rodríguez LM, Cárdenas-Rojas MI, et al. A280V polymorphism in the histamine H₃ receptor as a risk factor for migraine. *Arch Med Res*. 2011;42(1):44-7.
69. Flores-Clemente C, Osorio-Espinoza A, Escamilla-Sánchez J, Leurs R, Arias JM, Arias-Montaño JA. A single-point mutation (Ala280Val) in the third intracellular loop alters the signaling properties of the human histamine H₃ receptor stably expressed in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol*. 2013;170(1):127-35.