



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LABORATORIO DE NEUROINMUNOLOGÍA

RELACIÓN SENSORIAL NEURO-INMUNOLÓGICA

Evaluación del nivel de Ca^{2+} citosólico ante la aplicación de histamina en neuronas sensoriales del nervio vago de ratas neonatas en cultivo primario

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA:

FERNANDO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

MATRÍCULA:

201820643

DIRECTOR:

D.C. EMMANUEL SESEÑA MÉNDEZ

PUEBLA DE ZARAGOZA, SEPTIEMBRE, 2025

Agradecimientos

La ciencia es un concepto difícil de explicar. Gracias a la directriz del Dr. Emmanuel Seseña y el trabajo elaborado en nuestro Laboratorio de Neuroinmunología, la ciencia empezó a tener significado en mi vida. El sinsentido que surge de la teoría científica a través de las asignaturas de la licenciatura se fue transformando positivamente hasta que hice mis primeros experimentos y el abordaje al conocimiento práctico se sintió tan natural. Gracias a las equivocaciones y aprendizajes en este periodo estoy donde quiero estar y con la gente que más quiero. Les agradezco a mis padres por su apoyo incondicional y por estar a mi lado en cada decisión a lo largo de mi trayectoria como biomédico y como ser humano, por estar orgullosos de mí. Les agradezco a mis hermanos por ser cómplices de este proyecto y estar atentos de mi progreso como tesista y como persona. Le agradezco al Dr. Emmanuel Seseña por acompañarme en este proceso, por la decisión de recibirme como su alumno y amigo.

Este proyecto no pudo haber sucedido sin la colaboración de muchas personas, por brindarme el apoyo de su instrucción, disposición personal y convicción por conseguir los objetivos planteados: gracias a la doctora Elena Hernández por abrirme las puertas de su laboratorio y la oportunidad de aprender de su vocación. Gracias al doctor Roberto Berra Romaní y a sus alumnos de servicio social por la convivencia y la enorme ayuda en mis experimentos, así como también agradezco a la doctora Karla Rojas Valderrama por su participación en este proyecto y la confianza brindada a nuestro equipo de trabajo.

Índice

Abreviaturas	iii
1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
2.1 Antecedentes generales	3
2.1.1 Organización sensorial y motora del nervio vago	3
2.1.2 Composición neuronal de los ganglios yugular y nodoso	8
2.1.3 El nervio vago responde a estímulos inmunológicos	13
2.2 Antecedentes específicos	17
2.2.1 La histamina en la modulación vagal	17
2.2.2 El Ca^{2+} + citosólico en neuronas sensoriales vagales	21
3. Planteamiento del problema	25
4. Objetivos	26
4.1 Objetivo General	26
4.2 Objetivos Metodológicos	26
4.3 Objetivos Experimentales	26
5. Material y métodos	27
5.1 Bioética	27
5.2 Disección de ganglios vagales y cultivo primario de neuronas vagales de ratas neonatas Long Evans cepa CII	27
5.3 Ensayo de MTT	28
5.4 Medición de Ca^{2+} + intracelular	29
5.5 Análisis estadístico	30
5.5.1 Ensayo de MTT	30
5.5.2 Medición de Ca^{2+} + intracelular	31
6. Resultados	32
6.1 El ensayo de MTT-formazán valida la viabilidad de las células vagales	32
6.2 El efecto de la aplicación de histamina en la actividad metabólica de las células cultivadas a partir de ganglios vagales	34
6.3 La excitabilidad a la aplicación de solución con alto K^{+} como indicador celular neuronal modula el nivel de Ca^{2+} + citosólico	36
6.4 La histamina modula los niveles de Ca^{2+} + citosólico reflejado en el cambio de fluorescencia en neuronas de los ganglios vagales	38
7. Discusión	42

8.	Conclusiones	46
9.	Bibliografía	47

Abreviaturas

Ácido ribonucleico	RNA
Ácido α -amina-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico	AMPA
Adenilato ciclasa	AC
Adenosina-monofosfato cíclico	cAMP
Área postrema	AP
Bomba de Ca^{2+} en la membrana plasmática	PMCA
Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5, -difetil tetrazolio	MTT
Canal dependiente del almacenamiento	SOCE
Canal operado por receptor	ROC
Canal operado por voltaje	VOC
Decimo par craneal (nervio vago)	CN X
Estimulación del nervio vago	ENV
Factor de necrosis tumoral	TNF
Factor de transcripción de unión a elementos de respuesta a cAMP	CREB
Factor nuclear de células T activadas	NFAT
Factor nuclear potenciador de las cadenas κ de células B	NF κ B
Fibras no peptidérgicas	NP
Fibras peptidérgicas	PEP
Ganglio nodoso	Gn
Ganglio yugular	Gy
Ganglios de la raíz dorsal	DRG
Ganglios del nervio vago	GNV
Grupos neuronales del ganglio nodoso	NG
Grupos neuronales del ganglio yugular	JG
Interleucina	IL
Isolectina B4	IB4
Mecanorreceptores de bajo umbral tipo A β	A β -LTMR

ABREVIATURAS

Mecanorreceptores de bajo umbral tipo A δ	A δ -LTMR
Mecanorreceptores de bajo umbral tipo C	C-LTMR
Medula ventrolateral dorsal	VLM
N-metil-D-aspartato	NMDA
Norepinefrina	NE
Núcleo ambiguo	NA
Núcleo del tracto solitario	NTS
Núcleo espinal del nervio trigémino	Ne5
Núcleo motor dorsal del nervio vago	DMV
Núcleo paratrigeminal	pa5
Potencial de acción	PA
Proteína activadora tipo 1	AP-1
Proteína de alta movilidad tipo 1	HGMB1
Proteína fluorescente asociado a vector tipo adenovirus	AVV-GFP
Proteína-quinasa tipo A	PKA
Proteína-quinasa tipo C	PKC
Receptor acoplado a proteínas G	GPCR
Receptor de inositol tri-fosfato	ITPR
Receptor de potencial transitorio tipo ankirina	TRPA
Receptor de potencial transitorio tipo melastatina	TRPM
Receptor de potencial transitorio tipo vaniloide	TRPV
Receptor de rianodina	RyR
Receptor metabotrópico de glutamato	mGluR
Receptor nicotínico tipo $\alpha 7$	$\alpha 7$ nAChR
Receptores de adaptación lenta	SAR
Secuenciación de una sola célula	scRNA-seq
Sistema nervioso central	SNC
Sistema secretorio de bomba ATPasa de Ca^{2+}	SPCA
Sprague Dawley	SD

ABREVIATURAS

Tirosina-quinasa

TK

Transportador de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico

SERCA

Uniportador de Ca^{2+} mitocondrial

MCU

Vía antiinflamatoria colinérgica

CAP

1. Resumen

Planteamiento. La activación del nervio vago presenta propiedades regulatorias de la actividad cortical y la respuesta inmune. La histamina produce un efecto excitatorio de las neuronas sensoriales vagales y creemos que promueve el cambio de la concentración de Ca^{2+} citosólico a través de las vías de señalización activadas por los receptores histaminérgicos.

Métodos. Se elaboraron cultivos primarios de ganglios del nervio vago de ratas neonatas Long Evans cepa CII de 14 ± 2 días. El ensayo de MTT fue utilizado para validar la viabilidad y actividad metabólica celular de las células cultivadas y adicionalmente para examinar el efecto de la histamina (10 nM a 3 μ M) a corto (2 h de incubación) y largo plazo (48 h de incubación). La actividad funcional de las células fue evaluada con mediciones de Ca^{2+} intracelular a través del indicador FURA-2/AM ante la aplicación de una solución alta en K^+ e histamina (3 μ M y 10 μ M).

Resultados. Con el ensayo de MTT encontramos que los cultivos de células del nervio vago eran viables y metabólicamente activos, así mismo se mostró que la aplicación de histamina no generó un cambio en la función mitocondrial a largo plazo; sin embargo, si existió una disminución significativa en la absorbancia cuando el cultivo se incubó por 2 h con histamina a 0.01, 0.3 y 3 μ M. Las células sometidas a la técnica de FURA-2/AM presentaron un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico bajo la aplicación de la solución alta en K^+ (12/12) y ante un lavado posterior, la concentración de Ca^{2+} regresó a los valores iniciales, lo cual demostró que las células registradas eran neuronas. La aplicación de histamina mostró un aumento en el Ca^{2+} citosólico (6.4%, $p = 0.001$).

Discusión. La viabilidad celular del cultivo primario se evaluó a través de dos métodos: el ensayo de MTT y la aplicación de solución alta en K^+ ; con los valores obtenidos, las células estudiadas se consideran neuronas metabólicamente activas. La respuesta del cultivo primario ante la aplicación de histamina se asocia con la diversidad funcional de los receptores histaminérgicos. El aumento de Ca^{2+} citosólico es conferido a la

activación de los receptores H1R y H2R, aunque se estima que no existe un gran número de receptores H1R.

Conclusiones. La histamina modula el Ca^{2+} intracelular, así como la actividad metabólica y/o la viabilidad de las neuronas del nervio vago, lo cual evidencia la participación antiinflamatoria de este neuromodulador en el reflejo inflamatorio evocado por estímulos inmunológicos.

2. Antecedentes

2.1 Antecedentes generales

2.1.1 Organización sensorial y motora del nervio vago

El nervio vago es el décimo par craneal formado por fibras nerviosas autónomas parasimpáticas especializadas en el control homeostático de los sistemas gastrointestinal, respiratorio, cardiovascular, inmunológico y endocrino (Bonaz et al., 2016). Se constituye por fibras aferentes (80-90% de fibras) y eferentes (10-20% de fibras aproximadamente) provenientes de núcleos de la medula oblonga a través del espacio subaracnoideo en dirección a la periferia por el foramen yugular paralelamente a las arterias carótideas hasta los ganglios vagales: yugular y nodoso (Berthoud & Neuhuber, 2000). Estas fibras presentan una compleja distribución a lo largo de todo el nervio vago interviniendo en regiones cervicales, torácicas y abdominales (Ottaviani & Macefield, 2022).

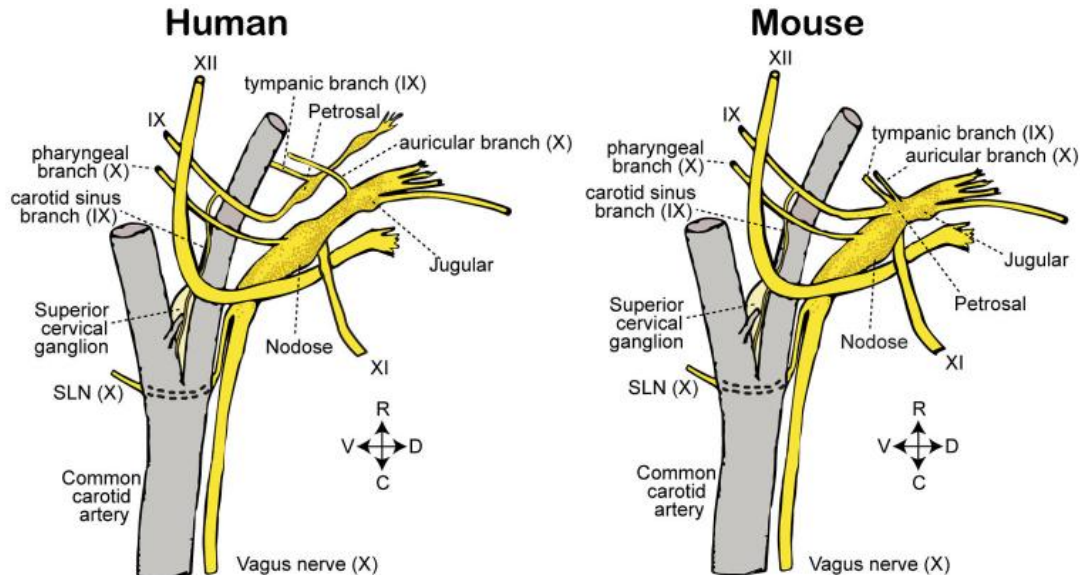


Figura 1. Localización del nervio vago y comparación de GNV de humanos y de ratón. Los GNV se ubican en la región dorsolateral de la bifurcación carótida que incluye el seno carotídeo. En roedores, el ganglio yugular (*jugular* en la imagen) se encuentra fusionado con el ganglio petroso (*petrosal*) del nervio glossofaríngeo (IX, por el par craneal IX), mientras que el ganglio nodoso presenta una región de unión con el ganglio cervical superior (*Superior cervical ganglion*) como estructura vestigial, localizando las únicas neuronas posganglionares simpáticas vagales, pero no se ha esclarecido a qué ganglio pertenecen. Fuente: Prescott SL, Liberles SD. Internal senses of the vagus nerve. Cell Press; 2022.

Los ganglios del nervio vago (GNV) están constituidos aproximadamente entre 4,600 neuronas en ratones hasta 200,000 en seres humanos (Figura 1) (Prescott & Liberles, 2022). Presentan menos neuronas en los ganglios izquierdos con respecto a los ganglios derechos, así como una disminución en el diámetro de las fibras supraganglionares en comparación a las fibras infraganglionares, presuntamente por su composición miélnica (Mei et al., 1980). Además, los GNV tiene una gran diversidad de células encargadas de colaborar en la función vagal como son: las células de Schwann, glía satélite, células endoteliales y microglía (Waise et al., 2018).

El nervio vago presenta fibras premotoras colinérgicas, catecolaminérgicas, nitrérgicas y GABAérgicas provenientes del núcleo motor dorsal del nervio vago (*DMV* por sus siglas en inglés), el núcleo ambiguo (NA) y el núcleo espinal del nervio trigémino (Ne5) de la medula oblonga (Neuhuber & Berthoud, 2021), y proyectan sus axones con neuronas posganglionares parasimpáticas en el tórax y abdomen, encargadas del control somático general y visceral (Cámara & Griessenauer, 2015), formadas en pequeños cúmulos nerviosos cerca de los órganos inervados denominados plexos. Algunos plexos parasimpáticos controlados por el nervio motor vago y otros pares craneales son: el plexo cardiaco, faríngeo, pulmonar posterior derecho e izquierdo, esofágico, celiaco, esplénico, suprarrenal, mesentérico y mientérico (Ruffoli et al., 2011; Yuan & Silberstein, 2016a).

El nervio vago consiste en su mayoría de neuronas sensoriales primarias pseudobipolares glutamatérgicas aglomeradas en los GNV, con una pequeña porción de células unipolares. Las neuronas tienen un axón que se proyecta bidireccionalmente: hacia la medula oblonga y la periferia (Prescott & Liberles, 2022). La región axonal que se dirige al sistema nervioso central (SNC), también denominado axón central, conecta el ganglio yugular y el núcleo paratrigeminal (*pa5*, un segmento dorsal del Ne5), así como el ganglio nodoso con el núcleo del tracto solitario (NTS) con una pequeña inervación en el área postrema (AP) (Figura 2) (McGovern et al., 2015).

El NTS se activa por funciones aferentes viscerales especiales en la región rostral del NTS por receptores gustativos unipolares en el ganglio nodoso, inervado dos terceras partes de la lengua y la epiglotis; y la región caudal del NTS se activa por

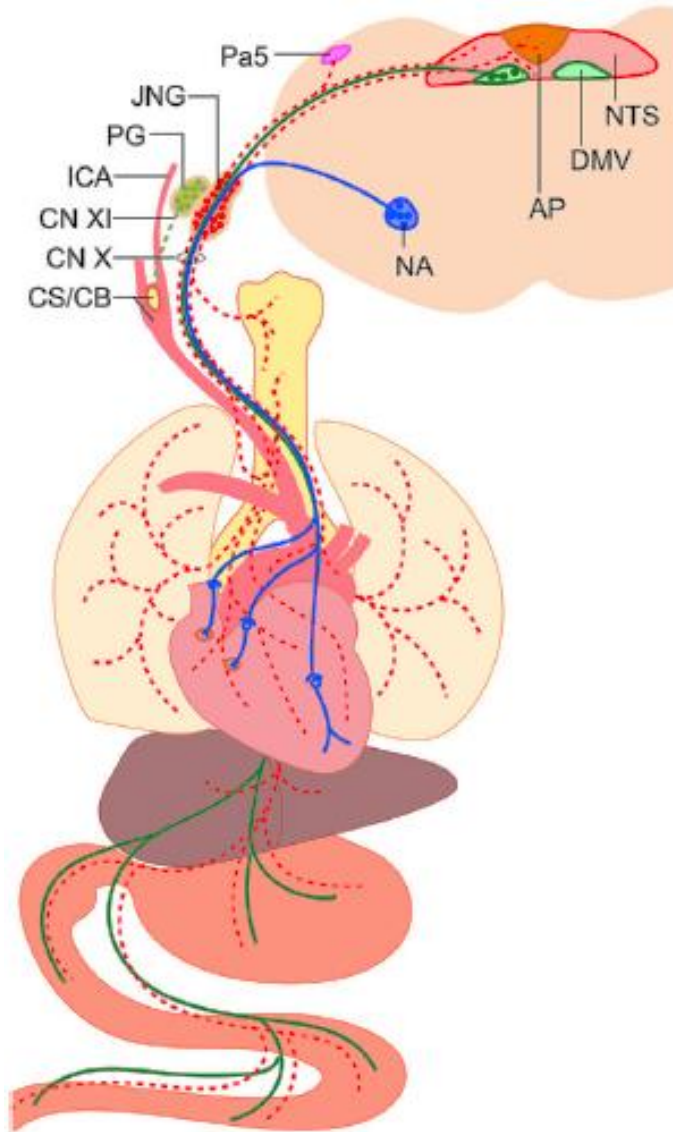


Figura 2. Esquema de la trayectoria del nervio vago (CN X) y su asociación estructural con la medula oblonga. Los núcleos de la medula oblonga asociados al nervio vago: el núcleo del tracto solitario (NTS); el núcleo motor dorsal (DMV), el núcleo ambiguo (NA), el área postrema (AP) y el núcleo paratrigeminal (Pa5), reciben terminaciones del complejo ganglionar yugular-nodoso (JNG). El tracto eferente visceral general vagal es una proyección proveniente del NA (línea azul) con funciones gastrointestinales y cardiopulmonares en su mayoría, así como también provenientes del DMV (línea verde). Las terminaciones de las neuronas sensoriales ubicadas en JNG (línea discontinua roja) se proyectan a la periferia y a los núcleos centrales de la medula oblonga (W. Han & de Araujo, 2021). Fuente: Han W, de Araujo IE. Dissection and surgical approaches to the mouse jugular-nodose ganglia. STAR Protoc. 2021.

estímulos viscerales generales e información interoceptiva asociada a la regulación homeostática (Yuan & Silberstein, 2016a). El NTS se conecta recíprocamente con núcleos centrales como la medula ventrolateral (VLM por sus siglas en inglés) inhibiendo neuronas excitatorias simpáticas, los núcleos parabraquiales que integran la transmisión de neuronas de lámina I, V y X en la medula espinal (Figura 3) (Craig, 2002), grupos catecolaminérgicos A1 que inhiben la secreción de vasopresina en la neurohipófisis, el NA permite la regulación de la frecuencia cardíaca y la deglución, el DMV regula la frecuencia respiratoria y cardíaca, así como los movimientos peristálticos junto con neuronas preganglionares simpáticas espinales, el hipotálamo,

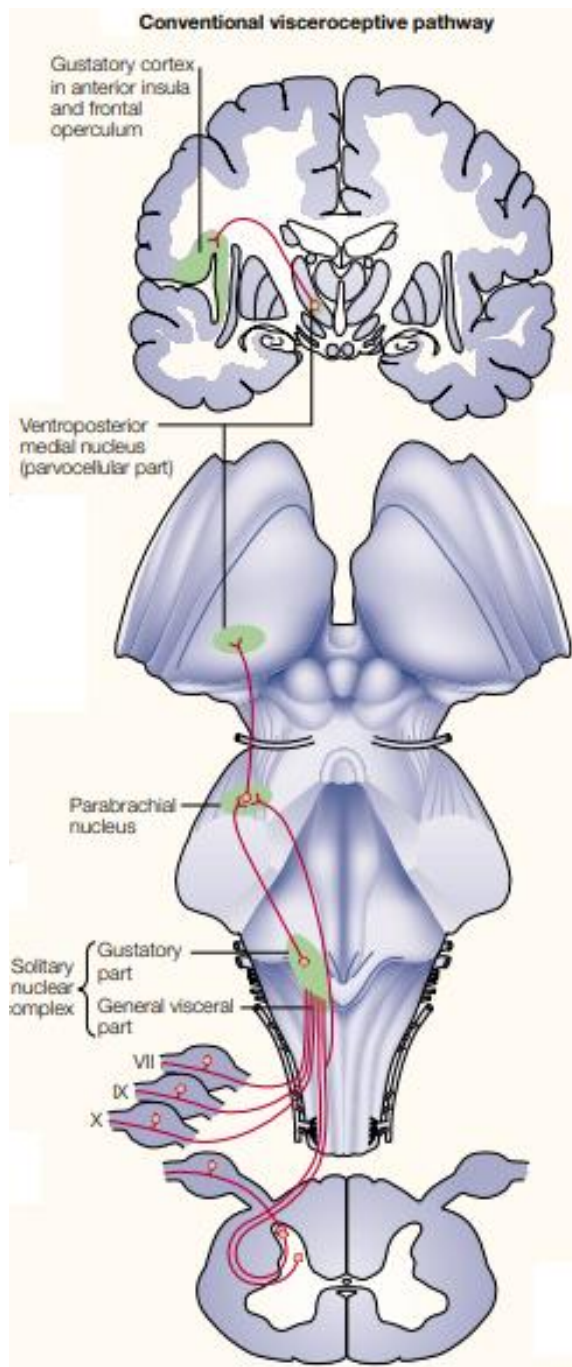


Figura 3. Conexiones del sistema visceroceptico. La nocicepción visceral, así como estímulos metabotrópicos, provocan una actividad aferente parasimpática evocada en los nervios espinales y pares craneales. Los estímulos viscerales dirigidos por el Gn del nervio vago (X en la imagen) logran activar las neuronas del NTS (*Solitary nuclear complex* en la imagen) en la medula oblonga, constituidas por una porción visceral general y otra gustatoria asociada a la deglución. El NTS activa los núcleos talámicos ventromedial posterior, así como su región parvocelular (*Ventroposterior medial nucleus (parvocellular part)*) por medio del núcleo parabraquial (*Parabrachial nucleus*). La actividad parasimpática del NTS se dirige principalmente a la corteza insular como sistema de regulación sensorial (Craig, 2002). Fuente: Craig AD. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. Perspectives. 2002.

el núcleo central de la amígdala, el núcleo del lecho de la estría terminal, la sustancia gris periacueductal, entre otros (Neuhuber & Berthoud, 2021; Ruffoli et al., 2011; Barraco, et al., 1992).

El NTS se involucra en la nocicepción visceral por medio de quimiorreceptores y mecanorreceptores instalados en el sistema cardiorrespiratorio hacia la medula

espinal como constitución efectora (reflejo de Bezold-Jarisch) (Lovelace et al., 2023), así como también en sistemas a través de quimio y baro-reflejos del seno carotideo, reflejo de la tos en una formación refleja baro-receptiva bronquial (reflejo de Hering-Breuer) (Barraco, et al., 1992; Yuan & Silberstein, 2016b).

En el pa5, más del 68-72 % de neuronas son barosensitivas y presentan una actividad sincrónica relacionada con el ciclo cardiaco; por ello, ha demostrado ser un centro regulador importante del nivel de presión sanguínea por su acción inhibitoria de la medula ventrolateral rostral (VLM por sus siglas en inglés), un conjunto de neuronas premotoras simpáticas; así como por su unión directa con el NA y el DMV (Sousa & Lindsey, 2009). El pa5 responde a estímulos químicos, táctiles, nociceptivos y térmicos

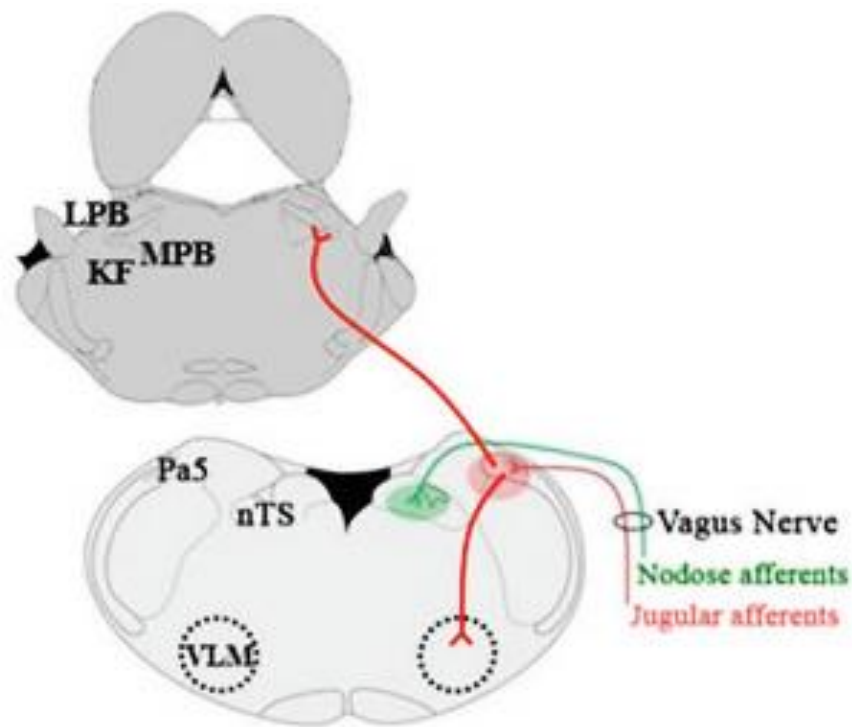


Figura 4. Esquema de la transmisión aferente del nervio vago. La activación de las neuronas aferentes del ganglio yugular (*Jugular afferents* en la imagen y línea roja) transmite la señal periférica a núcleos en la medula oblonga (*corte transversal presentado en la parte inferior*) activando a neuronas aferentes secundarias en el Pa5 ubicado en la medula laterodorsal. El Pa5 se conectan con núcleos centrales como la medula oblonga ventrolateral (VLM en la imagen), encargada en la regulación cardiorrespiratoria; así como presenta neuronas ascendentes a núcleos pontinos (*corte transversal del puente presentado en la parte superior*) como son los núcleos Kölliker Fuse (KF en la imagen), parabraquiales laterales (LPB en la imagen) y mediales (MPB en la imagen). En la imagen también se presenta un circuito aferente transmitido por el ganglio nodoso (*Nodose afferents* en la imagen y línea verde) (Driessen, 2019). Fuente: Driessen AK. Vagal afferent processing by the paratrigeminal nucleus. Vol. 10, Frontiers in Physiology. Frontiers Media S.A.; 2019.

de los receptores del Gy, así como del nervio trigémino, facial, y glossofaríngeo (Yuan & Silberstein, 2016a). De esta manera, el pa5 logra conectar áreas centrales sensitivas como regiones de relevo en el puente, el núcleo ventromedial posterior hasta la corteza sensorial (Figura 4) (Driessen, 2019).

2.1.2 Composición neuronal de los ganglios yugular y nodoso

Las neuronas del nervio vago se agrupan en el ganglio vagal superior, también denominado ganglio yugular (Gy); y el ganglio vagal inferior, denominado como ganglio nodoso (Gn). Para identificar estos ganglios, se han descubierto marcadores genéticos específicos en las neuronas yugulares y nodosas utilizando un mapeo desde su origen embrionario. El Gn se deriva de la placoda craneal, así como el petroso y el geniculado, ya que esta región expresa un factor de transcripción denominado homoproteína PHOX2B, asociado al desarrollo de neuronas sensoriales y motoras viscerales (D'Autréaux et al., 2011). Contrario a las neuronas del Gn, las neuronas del Gy son *Phox2b*⁻ y expresan el gen *Prdm12*, el cual codifica a un factor de transcripción modificador de histonas, encargado de la diferenciación y migración neurogénica en los ganglios sensoriales craneales y presente en los nociceptores (Nagy et al., 2015). Otros genes diferenciales para estos ganglios se han establecido como marcadores génicos como son *Cited1*, *Gm13157* y *Tshz1* para el Gy; y *Nhlh2*, *Tbx3* y *Hoxb5* para el Gn (Wang et al., 2017).

Las neuronas sensoriales vagas se clasificaron en 24 grupos por la expresión de 6,705 genes detectados a través de una secuenciación de RNA (*ácido ribonucleico* por sus siglas en inglés) de una sola célula (*scRNA-seq*) en ratones (Kupari et al., 2019). Las neuronas del Gy se clasificaron en 6 grupos JG (*Jugular Ganglion*) y las neuronas del Gn en 18 grupos denotadas NG (*Nodose Ganglion*) (Figura 5). Los transcriptomas y perfiles funcionales aún no se han relacionado completamente, ya que se cree que las diferencias génicas mostradas entre las neuronas de GNV pueden ser factores de origen embriológico y desarrollo de neuronas sensoriales, más que asociadas a la función realizadas por cada grupo (Moody & LaMantia, 2015), pero esta clasificación celular forma el primer peldaño para caracterizar la diversidad filogenética en función de las neuronas aferentes vagas esperando un estudio más completo

tanto *in vitro* como *in vivo* en la modulación del nervio vago (Prescott & Liberles, 2022).

Los grupos JG y neuronas del ganglio de la raíz dorsal (*DRG* por sus siglas en inglés) presentan mismos elementos fundamentales en su funcionamiento celular (Emery & Ernfors, 2018; Li et al., 2018). JG1 se asemeja a las neuronas somatosensoriales “tirosina hidroxilasa/Vglut3” que son mecanorreceptores de bajo umbral y velocidad de conducción lenta (fibras tipo-C) (*C-LMTR*, por sus siglas en inglés), relacionados con el tacto suave y agradable, así como alodinia mecánica (Larsson & Broman, 2019; Liljencrantz et al., 2017). JG2 expresa genes al igual que las fibras tipo C mecánico-nociceptivas *Mrgprd*⁺ NP1 (no peptidérgicas), fundamental en la intensidad de la nocicepción mecánica y térmica (Cavanaugh et al., 2009).

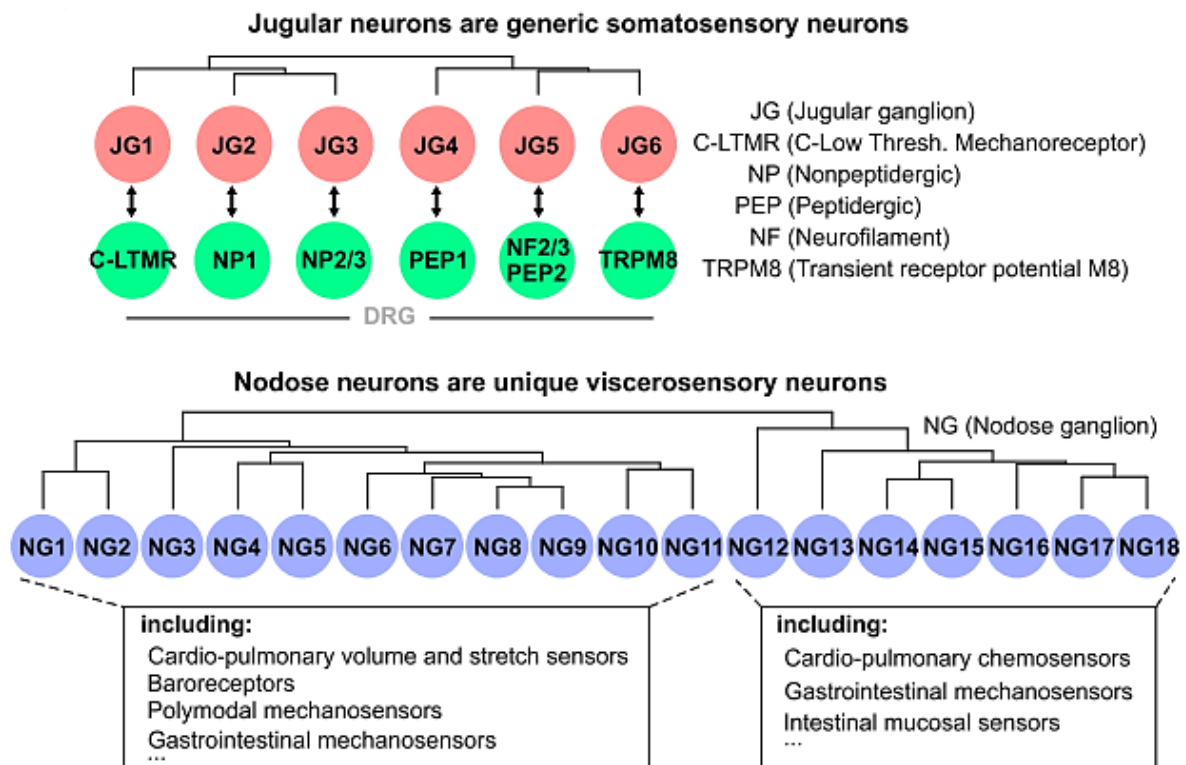


Figura 5. Esquema general de los tipos neuronales de los ganglios vagales. *Esquema superior:* los grupos neuronales del Gy (círculos rojos) presentan gran similitud con algunas familias de neuronas de DRG (círculos verdes) con base en la expresión transcripcional de genes. *Esquema inferior:* los grupos neuronales en Gn (círculos azules) han sido relacionadas teóricamente entre la expresión génica individual y la función viscerosensitiva del nervio vago. Cada esquema presenta en la parte superior un dendograma basado en los genes que definen las divisiones principales de los transcriptomas (*no mostrados*) (Kupari et al., 2019). Fuente: Kupari J, Häring M, Agirre E, Castelo-Branco G, Ernfors P. An Atlas of Vagal Sensory Neurons and Their Molecular Specialization. Cell Rep. 2019.

La expresión génica en JG3 se asemeja a las neuronas *MgprA3*⁺ NP2 y NP3, exclusivas en los DRG y especializadas en la nocicepción de la comezón y la sensibilidad a estímulos químicos (Cranfill & Luo, 2021; Han et al., 2013). JG4 tiene gran similitud con neuronas PEP1 (peptidérgicas) polimodales de alto umbral tipo C sensible a estímulos térmicos, mecánicos y químicos asociadas al dolor inflamatorio. JG5 es el único grupo de neuronas mielinizadas en el Gy y son parecidas a las neuronas Aβ-LMTR y Aδ nociceptivas encargadas de transmitir el tacto y el dolor agudo, respectivamente. JG6 presenta similitud con neuronas TRPM8 sensibles al frío y parece tener relación con la constricción de las vías respiratorias y la secreción de mucosa (Figura 6) (Li et al., 2016; Zhou et al., 2011).

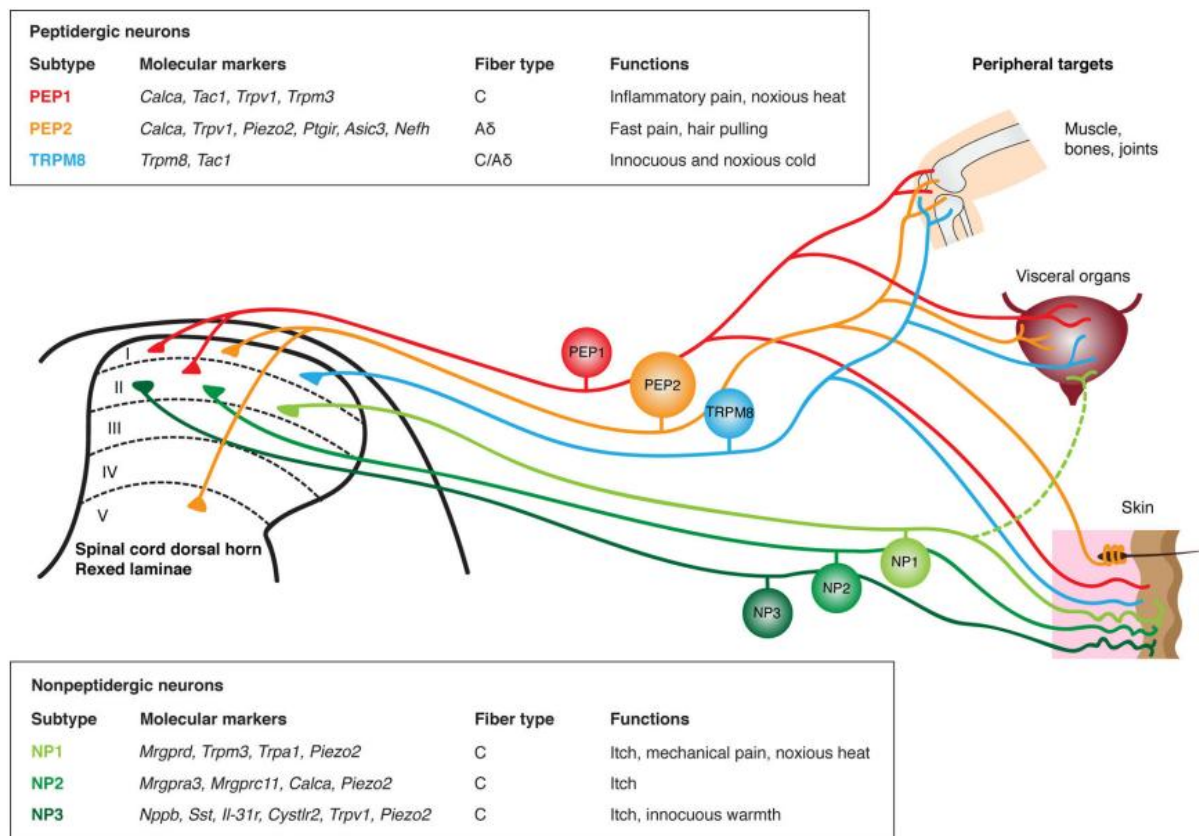


Figura 6. Esquema de nociceptores peptidérgicos y no peptidérgicos de DRG. Las neuronas no peptidérgicas inervan principalmente la epidermis y terminan en la lámina II en su parte interna localizada en el hasta dorsal de la médula espinal, a diferencia de las neuronas peptidérgicas ya que inervan regiones más profundas como la dermis, el músculo, el hueso y órganos viscerales, conectando en la lámina I y II en su parte externa. Funcionalmente estas láminas de la médula espinal se dedican a la integración de estímulos nociceptivos y somatosensoriales. Fuente Cranfill SL, Luo W. The development of somatosensory neurons: Insights into pain and itch. In: Current Topics in Developmental Biology. Academic Press Inc.; 2021.

Los grupos NG1, NG2 y NG3 han expresado marcadores de trabajo asociados a fibras neuronales tipo A β -LMTR de adaptación rápida o lenta encontradas principalmente en los pulmones, componentes dinámicos y sostenidos involucrados en la ventilación pulmonar (Figura 7) (Mazzone & Undem, 2016). El grupo NG1 comparte gran similitud transcripcional con fibras propioceptivas tipo A. Se cree que este tipo de neuronas, junto con el grupo NG2, se asocian en la respuesta volumétrica pulmonar en los arreglos musculares análogos a los husos musculares y las células intersticiales de Cajal (Powley & Phillips, 2011). También las neuronas de los grupos NG1 hasta NG3 caben en la descripción transcripcional de receptores activados por estiramiento tipo A β (Kupari et al., 2019).

Los transcriptomas de los grupos NG4, NG5 y NG6 parecen ser de neuronas quimiosensitivas, aunque tiene elementos esenciales de mecanorreceptores tipo C. Es probable que estos grupos estén involucrados en la evocación de la tos causada por irritantes inhalados provocando broncoconstricción (Lee & Pisarri, 2001). De igual manera, los grupos NG7-NG10 se han caracterizado por expresar marcadores constitutivos de fibras mecano y quimiosensitivas, pero no hay conclusiones claras de su función vagal; no obstante, la consistencia transcripcional del grupo NG1 y NG10

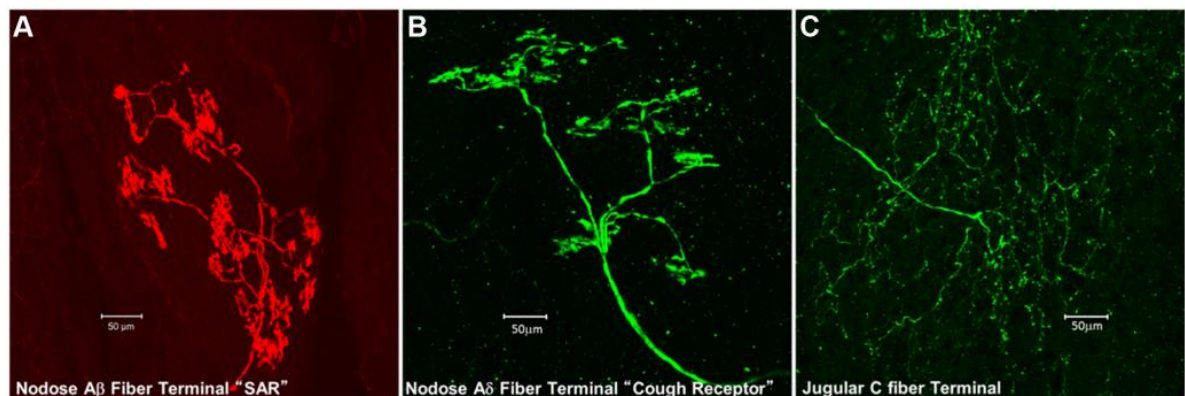


Figura 7. Tinción inmunohistoquímica de terminaciones nerviosas de neuronas aferentes vagales en los pulmones de roedores. A) Inervación en ratas del Gn tipo A β denominadas como receptores de adaptación lenta (SAR por sus siglas en inglés) las cuales fueron identificadas por inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos a Na-K-ATPasa. B) Inervación vagal nodosa en la tráquea del Gn tipo A δ de un receptor asociado a el reflejo de la tos en hurones. Estas neuronas fueron identificadas por medio de una transfección con AAV-GFP dirigida al neurofilamento 200. C) Transfección dirigida a Trpv1 en terminaciones nerviosas del Gy tipo C (Mazzone & Undem, 2016) (Kollarik et al., 2010). Fuente: Mazzone SB, Undem BJ. Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2016.

parece ser muy fuerte y suponen tener funciones similares a excepción de propiedades morfológicas como es la mielinización (Kupari et al., 2019). El grupo NG11 puede funcionar como fibras mecano receptoras de tensión gástrica, encargadas de la relajación muscular del esfínter esofágico, esto por ser el único grupo que presenta la expresión del receptor metabotrópico de glutamato subtipo 5 (mGluR5) encargado de la inhibición contráctil del esfínter, comprobado por un antagonista del mGluR5 que muestra una reducción en el reflujo gástrico (Ferrigno et al., 2017; Frisby et al., 2005).

Los grupos NG12 hasta NG18 expresan elementos proteicos de receptores a nutrientes hasta moduladores inflamatorios como TRPA1, fundamentales en la sensibilidad química vagal en fibras tipo C, innervando principalmente el tracto gastrointestinal y respiratorio (Kupari et al., 2019). NG13 y 15 se consideran mecano-

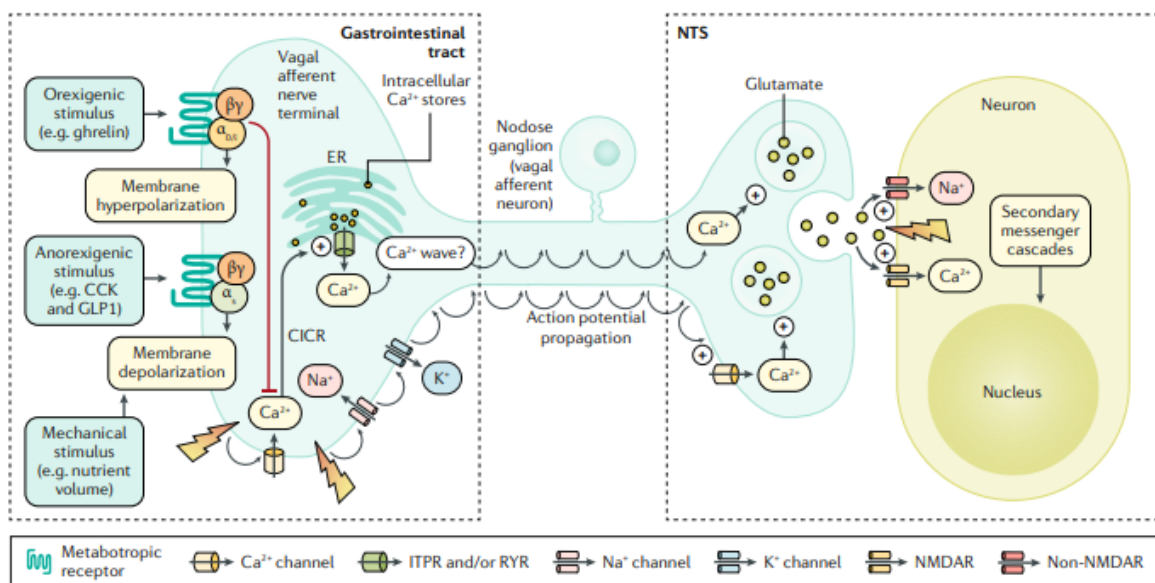


Figura 8. Estimulación de calcio por nutrientes y hormonas captada por la innervación enterovagal. Las terminaciones nerviosas del Gn presentan en su membrana receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G activados por señales provenientes de las células del epitelio intestinal en reacción a los nutrientes en la luz intestinal. Este mecanismo activa (despolarización) o inhibe (hiperpolarización) vías de señalización responsables de regular la concentración de Ca^{2+} citosólico mediante mecanismos de bloqueo y apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje o bloqueo proteico. La liberación de Ca^{2+} se lleva a cabo de almacenes celulares como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi mediante receptores encargados de aumentar la concentración de Ca^{2+} citosólico como son ITPR (receptor de inositol tri-fosfato) y RyR (receptor de rianodina). Cuando el estímulo despolariza la neurona aferente vagal, la propagación del potencial de acción permite la exocitosis de vesículas de glutamato como transmisión de la señal hacia neuronas de NTS receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA (Ottaviani & Macefield, 2022). Fuente: Ottaviani MM, Macefield VG. Structure and Functions of the Vagus Nerve in Mammals. Compr Physiol. 2022.

receptores entremetidos en el esófago, el estómago y el duodeno, captando el estiramiento y saciedad durante la ingesta de alimentos por medio de receptores de péptido YY, serotonina, colecistoquinina, ácidos grasos, ghrelina, péptido 1 tipo glucagón, neuropéptido W, secretina, orexina A, entre otros (Figura 8) (Chambers et al., 2013; Williams et al., 2016; Li, 2007).

Los grupos NG12, NG14 y NG16 presentan receptores del neuropéptido Y que permiten la respiración rápida y lenta afectando a la frecuencia y volumen ventilatorio. Además, forman un papel fundamental en la señalización nociceptiva e inflamatoria (Kupari et al., 2019; Chang et al., 2015). Los grupos NG17 y NG18 contienen neuronas que parecen ser mecano y quimiorreceptores de bajo umbral. Están presentes en una gran extensión de la en las vellosidades intestinales, el esfínter pilórico y el pulmón, encargadas de la motilidad gástrica y ritmo peristáltico (Williams et al., 2016).

2.1.3 El nervio vago responde a estímulos inmunológicos

El nervio vago y la distribución periférica que presenta le han permitido detectar una gran gama de estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Este papel está desempeñado por la porción aferente del nervio vago la cual se activa en la integración sensorial y produce una respuesta acorde a la modulación fisiológica correspondiente por medio de circuitos nerviosos denominados reflejos (Zanos, 2019). No obstante, cuando el nervio vago es estimulado por los mecanismos homeostáticos del fuego cruzado entre el sistema inmune y patógenos, así como del daño tisular y enfermedades, las terminaciones de las neuronas sensoriales vagales cercanas a las células inmunológicas inician un proceso regulador denominado “reflejo inflamatorio” vagal (Ottaviani & Macefield, 2022; Andersson & Tracey, 2012).

El primer componente efector del reflejo inflamatorio es el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Figura 9 a la izquierda). La estimulación de las células A2 noradrenérgicas del NTS (no proviene específicamente de la activación del nervio vago) activa al núcleo paraventricular parvocelular del hipotálamo para secretar el factor liberador de corticotropina en la hipófisis y liberar la hormona adrenocorticotrópica (Bonaz et al., 2016). Esta última, estimula la producción de gluco-

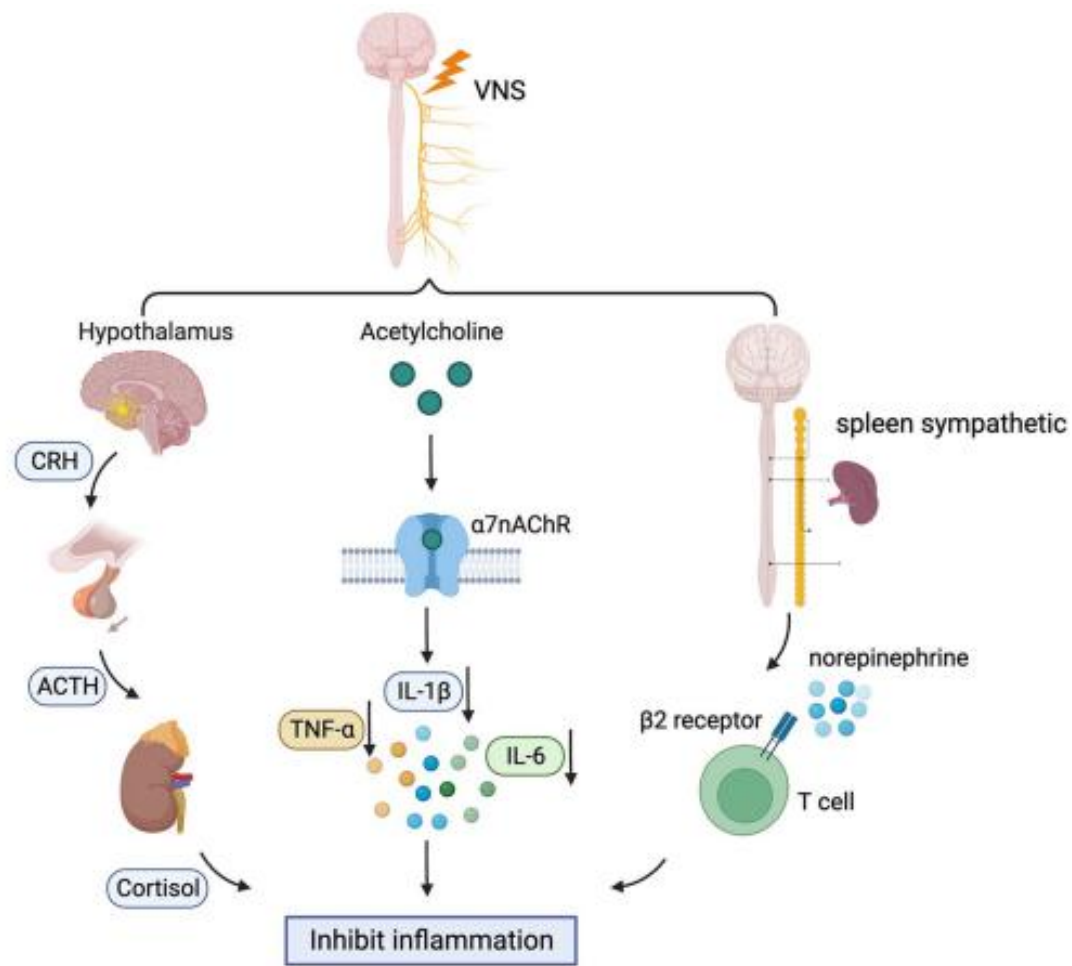


Figura 9. Mapa de las vías antiinflamatorias asociadas al reflejo inflamatorio. La estimulación del nervio vago (ENV) como método terapéutico permite activar las vías del reflejo inflamatorio contribuyendo a la inhibición inflamatoria desencadenada por el NTS y núcleos efectores en la medula oblonga. En la vía izquierda del mapa se muestra la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, favoreciendo el aumento de glucocorticoides para la inhibición inflamatoria. En la vía central se muestra el papel de la acetilcolina en la CAP, que logra activar la región simpática esplénica (vía derecha) y regular la función antiinflamatoria del $\alpha 7nAChR$ ubicado en la membrana de macrófagos residentes en la mucosa intestinal o el bazo (Jin et al., 2023). Fuente: Jin Z, Dong J, Wang Y, Liu Y. Exploring the potential of vagus nerve stimulation in treating brain diseases: a review of immunologic benefits and neuroprotective efficacy. Vol. 28, European Journal of Medical Research. BioMed Central Ltd; 2023.

corticoides en la zona fasciculada de la corteza suprarrenal (Komegae et al., 2018; Ottaviani & Macefield, 2022). El papel liderado por los glucocorticoides después de su unión con su receptor nuclear es inhibir la expresión de mediadores proinflamatorios, así como promover la diferenciación de macrófagos M2c que eliminan leucocitos polimorfonucleares, secreción de factores antiinflamatorios, inhibición de la angiogénesis e inhibir la reepitelialización (Cain & Cidlowski, 2017).

El segundo mecanismo del reflejo inflamatorio depende de la activación de *CAP* (*vía colinérgica antiinflamatoria* por sus siglas en inglés) vago-vagal que transita por la porción sensorial y efectora del nervio vago (Figura 9 al centro); esto modula la función neuroinmunitaria en el tracto gastrointestinal y esplénica en contra de la secreción de citocinas producidas por macrófagos residentes (Borovikova et al., 2000; Cailotto et al., 2014; Mowat & Agace, 2014). Las neuronas presinápticas vagales no inhiben la secreción de citocinas directamente, necesitan el relevo de neuronas simpáticas celiacas y neuronas posganglionares entéricas en el bazo y el intestino, respectivamente (Cailotto et al., 2014). La *CAP* activa neuronas postsinápticas simpáticas esplénicas secretando norepinefrina (NE) (Figura 9 a la derecha). La NE activa linfocitos T β 2AR (receptores adrenérgicos tipo β 2) en el bazo y libera acetilcolina para regular negativamente la secreción de citocinas [TNF, IL-1, IL-18 y HMGB1 (*proteína de alta movilidad tipo 1* por sus siglas en inglés)] en los macrófagos α 7nAChR (receptores nicotínicos α 7) (Andersson & Tracey, 2012).

La activación del nervio vago se ha aplicado en muchas condiciones patológicas de forma alternativa mediante el cambio inflamatorio a través de métodos bioeléctricos como la estimulación del nervio vago (ENV) (Yuan & Silberstein, 2016b). Un ejemplo de esto es la ENV en individuos con epilepsia resistente a los tratamientos farmacológicos o en pacientes pediátricos, la ENV se ha postulado como un tratamiento neuromodulador a largo plazo que refleja mejoría desincronizando la actividad cortical y disminuyendo la frecuencia y duración de las convulsiones (González et al., 2019; Möbius & Welkoborsky, 2022). El reflejo inflamatorio produce una disminución de TNF secretado por monocitos en el torrente sanguíneo y la acción de citocinas antiinflamatorias como TGF (*factor de crecimiento transformante*, por sus siglas en inglés) (Kaur et al., 2023). Gracias a estos atributos, la ENV contribuye a través de diversos mecanismos antiinflamatorios al bienestar de pacientes con epilepsia y se incorpora en el tratamiento de alteraciones patológicas neurológicas, cancerígenas, metabólicas y autoinmunes (Koopman et al., 2016; Kumaria & Ashkan, 2023; Kumaria et al., 2022).

Las neuronas de GNV se activan por moduladores químicos en la respuesta

inflamatoria desatando una transmisión evocada en la región caudal de NTS (Thayer et al., 2011). Las neuronas excitables en la porción caudal de NTS asociadas en la respuesta inflamatoria parecen ser glutamatérgicas y GABAérgicas, aunque las primeras parecen ser las responsables de la participación antiinflamatoria del nervio vago (Jin et al., 2024).

Las fibras del nervio vago presentan receptores membranales que detectan citocinas y toxinas patógenas, un ejemplo de esto son el receptor de TNF (factor de necrosis tumoral por sus siglas en inglés), receptor de IL-1 β (interleucina 1 β), IL-6, IL-10 (Jin et al., 2024; Watlins et al., 1995), TLR4 (receptor tipo Toll por sus siglas en inglés) (Jia et al., 2021), receptores de quimiocinas, entre otros (Figura 10). La unión a estos receptores ha demostrado generar un aumento en la excitabilidad sensorial y la frecuencia de potenciales de acción principalmente en neuronas nociceptivas *Trpa*⁺ o la expresión de TRPV1 (Zanos, 2019; Jin et al., 2024; Miller et al., 2009; Steinberg et al., 2016). Los estímulos excitadores provocados por los mediadores inmunitarios en las neuronas sensoriales vagales han sido identificados para el estudio de los mecanismos precisos y las fibras conductoras selectivas en la respuesta antiinflamatoria del nervio vago.

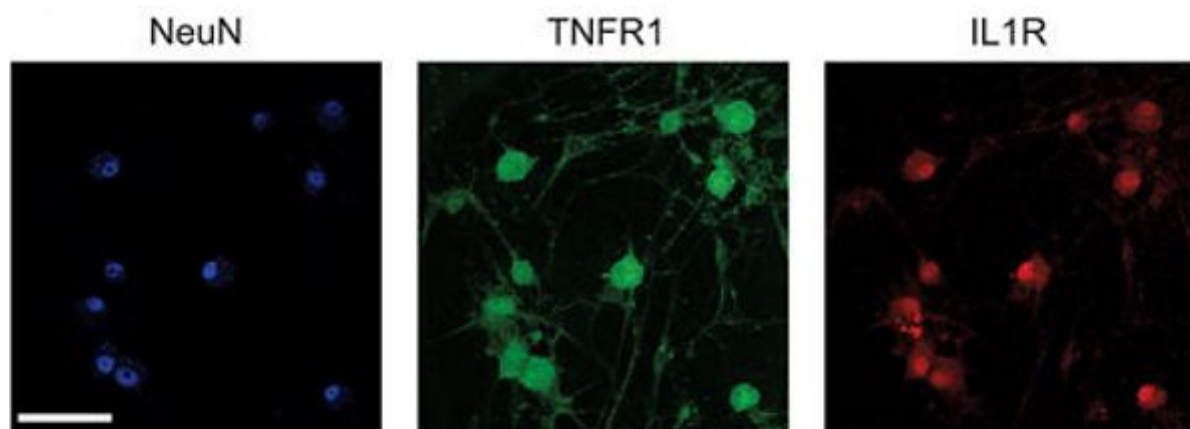


Figura 10. Tinción inmunohistoquímica en cultivo de ganglio nodoso como técnica de identificación de receptores de citocinas. Las neuronas de ratones se tiñeron con anticuerpos primarios dirigidos a NeuN (proteína nuclear neuronal en la imagen a la izquierda), TNFR1 (receptor TNF tipo 1, imagen central) y IL1R (receptor IL-1, imagen a la derecha) (Steinberg et al., 2016). Fuente: Steinberg BE, Silverman HA, Robbiati S, Gunasekaran MK, Tsaava T, Battinelli E, et al. Cytokine-specific Neurograms in the Sensory Vagus Nerve HHS Public Access. Vol. 3, Bioelectron Med. 2016.

2.2 Antecedentes específicos

2.2.1 La histamina en la modulación vagal

La histamina se sintetiza en la descarboxilación oxidativa de la histidina gracias a la enzima L-histidina descarboxilasa en células especializadas como las neuronas, células parietales, células de la mucosa gástrica, mastocitos y basófilos (Branco et al., 2018). La liberación de la histamina desencadena procesos fisiológicos como la contractilidad del músculo liso, músculo cardíaco, secreción del ácido gástrico, vasodilatación y aumento en la permeabilidad vascular (Obara et al., 2019; Chazot, 2022). También contribuye a la respuesta anafiláctica, regula el ciclo sueño-vigilia,

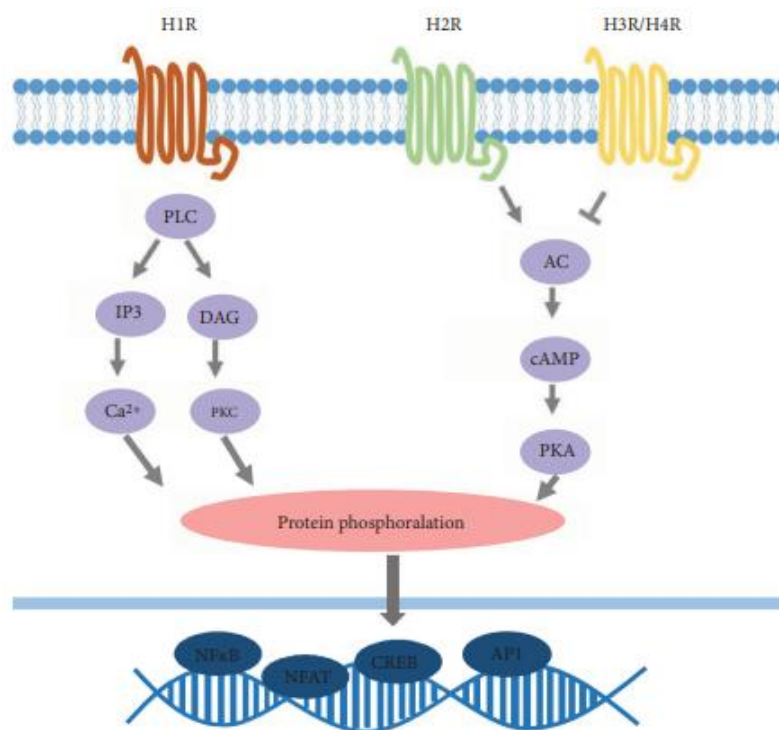


Figura 11. Señalización de los receptores histamínicos. La unión de H1R-histamina activa la proteína Gq, encargada de aumentar el Ca^{2+} citosólico como segundo mensajero y la activación de la calmodulina y la proteína quinasa C (PKC) para la fosforilación de reguladores transcripcionales proinflamatorios (NFkB, NFAT, CREB y API). La activación de la proteína Gs por medio de la unión con H2R genera un aumento del cAMP, generando la activación de las subunidades catalíticas de la proteína quinasa A (PKA) y la fosforilación de proteínas reguladoras transcripcionales. En caso contrario, H3R y H4R se encargan de regular la actividad de H2R inhibiendo la enzima adenilato ciclasa (AC), responsable del aumento de cAMP (Branco et al., 2018). Fuente: Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. Vol. 2018, Mediators of Inflammation. Hindawi Limited; 2018.

diferenciación y proliferación, hematopoyesis, regeneración celular, plasticidad neuronal y el aprendizaje (Lieberman, 2011; Obara et al., 2019).

La histamina evoca una respuesta pleiotrópica mediante cuatro receptores constituido por siete subunidades transmembrana acoplados a proteínas G denominados receptores de histamina H1 (H1R), H2 (H2R), H3 (H3R) y H4 (H4R) (Moriguchi & Takai, 2020; Kiss & Keserű, 2016); la unión histaminérgica genera una señalización mediante mecanismos de activación de la fosfolipasa C y adenilato ciclasa, propiedades encargadas por proteínas Gq y Gs, respectivamente; así como de la inhibición a través de la supresión de adenilato ciclasa por proteínas Gi (Figura 11) (Tiligada et al., 2020). La histamina ha demostrado ser un modulador químico vagal excitatorio en donde su aplicación en condiciones experimentales ha evidenciado la

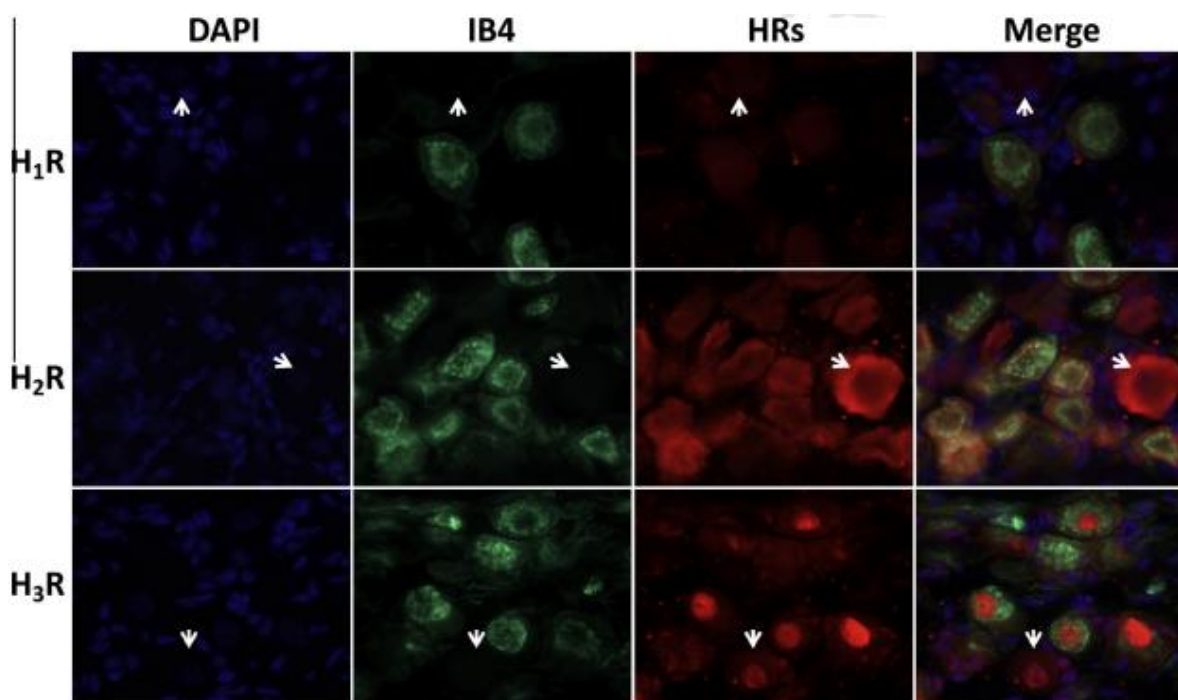


Figura 12. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos a receptores histaminérgicos en neuronas de ganglio nodoso de ratas adultas hembras. Las muestras de tejido de Gn se incubaron con diferentes anticuerpos: DAPI para identificar los núcleos (marcador para DNA de doble cadena, en la primera columna), Isolectina B4 (IB4, marcador de neuronas no mielinizadas, en la segunda columna, las flechas blancas representan células IB4-negativas), anticuerpos para receptores histaminérgicos (HR, tercera columna), así como una representación de imágenes superpuestas (cuarta columna). En la primera, segunda y tercera fila se evalúa la presencia de H1R, H2R y H3R, respectivamente (Li et al., 2015). Fuente: Li JN, Li XL, He J, Wang JX, Zhao M, et al. Sex- and afferent-specific differences in histamine receptor expression in vagal afferents of rats: A potential mechanism for sexual dimorphism in prevalence and severity of asthma. Neuroscience. 2015.

activación de corrientes despolarizantes y en la facilitación de un potencial de acción en el bloqueo de corrientes de recuperación e hiperpolarización (Jafri et al., 1997; Undem & Weinreich, 1993; Leal-Cardoso et al., 1993). Esta participación neuronal histaminérgica se asoció mediante la identificación de receptores histaminérgicos en la membrana neuronal vagal y la expresión transcripcional de H1R, H2R y H3R (Figura 12) (Kupari et al., 2019; Li et al., 2015).

La respuesta vagal histaminérgica ha sido versátil conforme a las propiedades biofísicas y pleiotrópicas de las fibras nerviosas que constituyen el nervio vago en los estudios más recientes (Li et al., 2015; Li et al., 2013). La actividad histaminérgica ha cambiado con base en la velocidad de conducción de la fibra nerviosa, la composición proteica, así como el género y edad de los sujetos estudiados. A continuación, se resumen los aportes obtenidos con respecto a los factores mencionados en las investigaciones de la aplicación de la histamina en neuronas de Gn de ratas adultas y neonatas:

Las fibras nerviosas vagales se clasificaron a partir del umbral del potencial de acción, velocidad de ascensión de la curva de despolarización y curva de repolarización en una prueba de patch-clamp de célula completa (Figura 13). Las subpoblaciones de neuronas identificadas de Gn se denominaron tipo A, Ah y C. Las neuronas tipo A en machos no se despolarizan mediante una inducción de histamina ni generan corrientes entrantes despolarizantes a comparación de neuronas tipo A de hembras, así como un aumento considerable del flujo entrante en ratas ovariectomizadas (Figura 14). Esto se relaciona con la localización de H1R como receptor activador en machos y hembras; y H3R como receptor regulador negativo en machos, aunque exista mayor expresión de H3R y H2R en hembras ya que son receptores modulados dependientes de la función hormonal femenina. Las neuronas tipo Ah se encuentran principalmente en ratas hembra y suprimen la actividad inducida por histamina cuando son ovariectomizadas. También se ha observado que en estas neuronas no se encuentra H1R y son las neuronas que más expresan H2R. Puede que la activación por histamina en neuronas vagales en hembras este a cargo de H2R, ya que disminuye su expresión en ratas ovariectomizadas (Edelsbrunner et al., 2009).

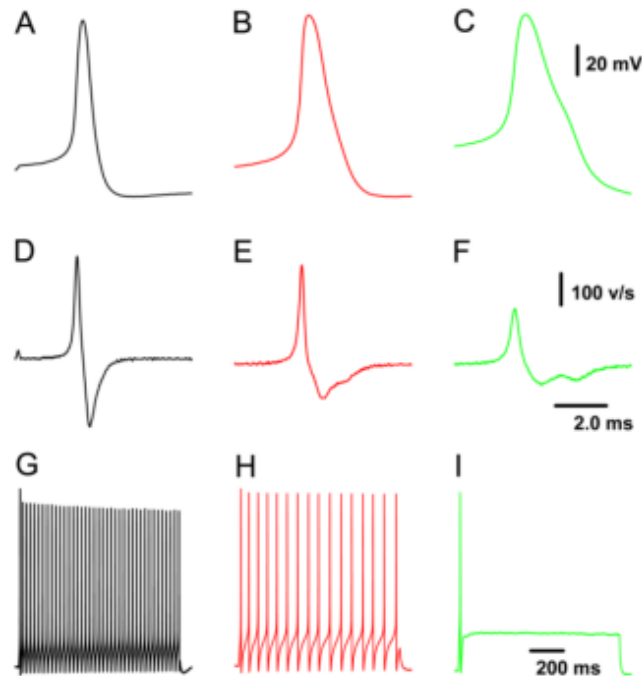


Figura 13. Trazos representativos de registros del potencial de acción (PA) de neuronas de ganglio nodoso viscerales de ratas adultas hembras. En el gráfico A se muestra un registro de PA de neuronas A (bajo umbral, despolarización y repolarización rápidas, un PA angosto sin “joroba” en la repolarización). En B se muestra un PA de neuronas Ah (bajo umbral, rápida despolarización, pero repolarización lenta). En C se muestra un PA de neuronas C (alto umbral, despolarización y repolarización lenta; así como un amplio PA con una “joroba en la repolarización). En D-F se muestran los potenciales de A-C en un curso temporal donde se visualiza mejor la amplitud del del voltaje dependiendo del tiempo. En G-I se muestra la descarga repetitiva de los tipos de neuronas (100 pA para G, 150 pA para H y 300 pA para I). Los trazos negros, rojos y verdes se designan a las neuronas A, Ah y C, respectivamente (J. N. Li et al., 2013). Fuente: Li JN, Qian Z, Xu WX, Xu B, Lu XL, Yan ZY, et al. Gender differences in histamine-induced depolarization and inward currents in vagal ganglion neurons in rats. *Int J Biol Sci.* 2013.

Las neuronas tipo C se encuentran mayormente activas por histamina en ratas macho a comparación de las hembras, así como un aumento en la actividad de las neuronas tipo C en hembras cuando son ovariectomizadas. Estas neuronas tienen muy poca expresión de H1R y la mayoría de las neuronas expresan H3R, así como una mayor expresión en neuronas de ratas hembra, regulando negativamente la despolarización. En ratas neonatas machos hay mayor presencia de neuronas tipo Ah con respecto a las adultas; no obstante, la actividad de la histamina en neuronas tipo C en machos probó aumentar las corrientes entrantes en comparación a las hembras evidenciando la quimio sensibilidad de las neuronas tipo C y la consistencia en el dimorfismo sexual con respecto a las neuronas Ah.

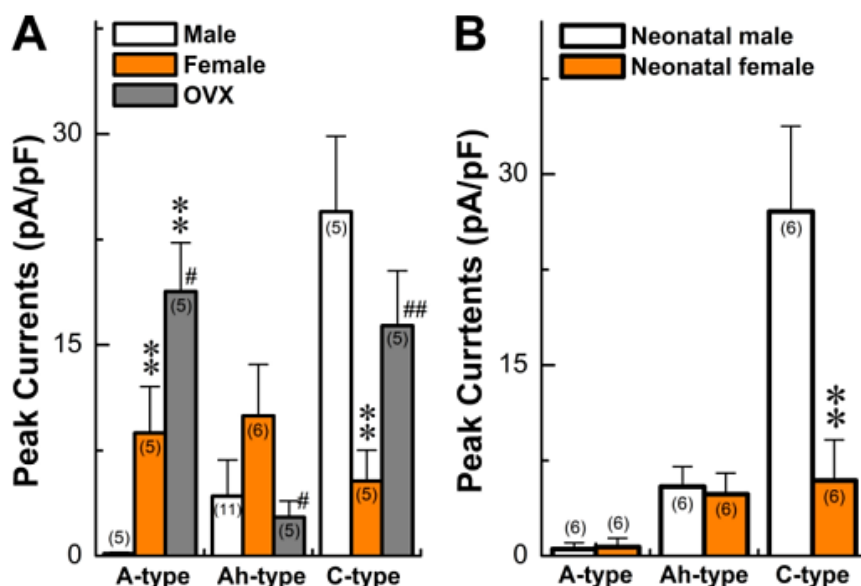


Figura 14. Corrientes entrantes identificadas en la inducción por la aplicación de histamina en neuronas de ganglio nodoso de ratas adultas y neonatas. Los grupos de ratas se dividieron en ratas hembra, machos y hembras ovariectomizadas como modelo análogo en condiciones menopáusicas, así como ratas neonatas hembras y machos. Se consideraron los tipos neuronales (número de células dentro de los paréntesis) A, Ah y C en los cuales se registró por medio de patch-clamp de célula completa y evaluar las corrientes entrantes catiónicas. La densidad de las corrientes se normalizó con respecto a la capacitancia (pA/pF) y comparadas estadísticamente con respecto a los resultados en machos (** para $p < 0.01$, # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$). Se observa que la respuesta excitatoria generada por la histamina depende de las neuronas Ah en mujeres y de las neuronas C en machos, además, se nota una sustitución de las corrientes en neuronas Ah en ratas ovariectomizadas por corrientes en neuronas A y C (J. N. Li et al., 2013). Fuente: Li JN, Qian Z, Xu WX, Xu B, Lu XL, Yan ZY, et al. Gender differences in histamine-induced depolarization and inward currents in vagal ganglion neurons in rats. *Int J Biol Sci.* 2013.

2.2.2 El Ca^{2+} citosólico en neuronas sensoriales vagales

El Ca^{2+} es un factor en la transmisión informática y equilibrio homeostático en las células eucariotas. Este ion juega un papel como segundo mensajero regulado por mecanismos conservados a través de la evolución como la autorregulación, el control homeostático de Ca^{2+} por el mismo Ca^{2+} , a nivel transcripcional como postranscripcional. Participa en el control metabólico mediante la activación enzimática, procesos de motilidad, exocitosis, transcripción génica y muerte celular programada (Brini et al., 2014; Gleichmann & Mattson, 2011). El Ca^{2+} en neuronas participa en la liberación de neurotransmisores, la despolarización neuronal, el aprendizaje y consolidación de la memoria asociado a la potenciación a largo plazo y depresión a largo plazo, entre otros mecanismos (Figura 8) (Lüscher & Malenka, 2012).

Los bancos celulares de Ca^{2+} más importantes son el espacio extracelular y organelos como sistemas de almacenamiento que incluyen el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias y complejos lisosomales (Brini et al., 2014) (Karagas & Venkatachalam, 2019). Estas fuentes de Ca^{2+} propagan flujos hacia el citoplasma por medio de transportadores y canales iónicos sensibles a la señalización a favor de su apertura y difusión de Ca^{2+} (Brini et al., 2014). Además, estos diversos procesos de transporte de Ca^{2+} en neuronas son susceptibles a los cambios de concentración en regiones específicas de acción para la amortiguación y activación de funciones celulares a través de su almacenamiento y captura evitando una disfunción y activación de mecanismos dependientes de Ca^{2+} como quinasas dependientes de la activación de calmodulina- Ca^{2+} , generando intercambios iónicos exactos para el buen funcionamiento celular (Gleichmann & Mattson, 2011).

En neuronas sensoriales vagales, el funcionamiento de Ca^{2+} citosólico refleja una forma primaria de transmisión excitatoria resultado de la activación de transitorios de Ca^{2+} y la señalización indirecta de estímulos químicos, mecánicos y nocivos a través de receptores metabotrópicos (Huerta et al., 2023). También, a través de diferentes niveles experimentales, los niveles de Ca^{2+} intracelular han mostrado procesos de adaptación a factores extrínsecos en neuronas del nervio vago (Huerta et al., 2023; Lancaster et al., 2002). La activación química en neuronas sensoriales vagales reflejada en un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular se ha observado en la señalización de receptores tirosina quinasas como es la insulina, induciendo despolarización y flujo de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Iwasaki et al., 2013), así como la leptina, la colecistoquinina (Peters et al., 2006) y el interferón- γ , como potenciadores y activadores de los transitorios de Ca^{2+} en la respuesta nociceptiva (Hu et al., 2010; Deng et al., 2018).

Los receptores acoplados a proteínas G también interactúan con el Ca^{2+} intracelular como los receptores del péptido similar a glucagón tipo 1 en una subpoblación de neuronas nodosas y potenciador de la señal excitadora (Iwasaki et al., 2017). Los receptores acoplados a Gi P2Y1 logran modular los niveles de Ca^{2+} dependientes de voltaje, así como la expresión y señalización de P2X3, sirviendo como

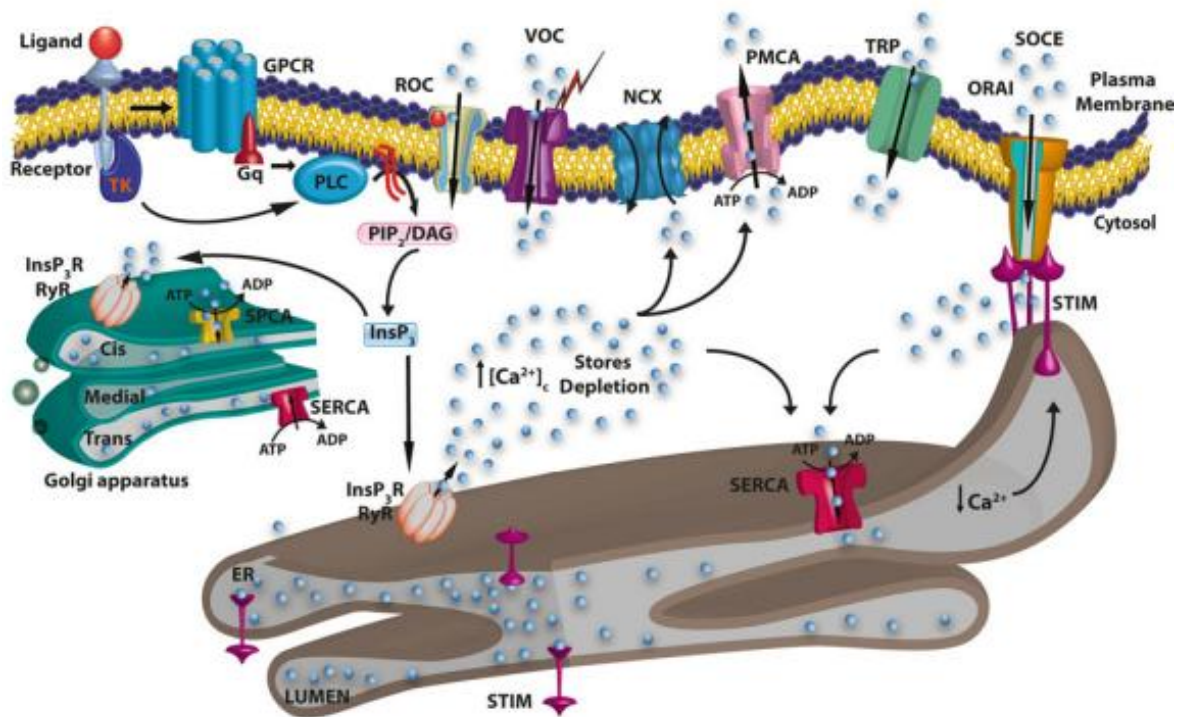


Figura 15. Mecanismos homeostáticos de Ca^{2+} intracelular. Los transportadores de Ca^{2+} se presentan en la membrana plasmática superficial y la que limita los organelos para movilizar una corriente a favor del gradiente electroquímico activados por procesos dependientes de un estímulo químico (canales operados por receptor, ROC en la imagen, aunque también se pueden englobar RyR y InsP3R), de un estímulo eléctrico (canales dependientes de voltaje; VOC en la imagen) o sensibilidad al Ca^{2+} (canales dependientes del almacenamiento, SOCE en la imagen y, receptores de potencial transitorio, TRP en la imagen). También existen otros mecanismos a favor del aumento de Ca^{2+} en el citoplasma como dependiente de la activación enzimática dependiente de ligando como las tirosina-quinazas (TK en la imagen) y los receptores acoplados a proteína G (GPCR en la imagen). Existen otro tipo de transportadores sensibles al cambio electroquímico en contra del gradiente como mecanismo homeostático responsable de la conservación de un ambiente controlado de Ca^{2+} como el transportador de $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (NCX en la imagen) y transportadores de difusión activa como bomba de Ca^{2+} (PMCA en la imagen), SERCA (en el retículo sarcoplásmico) o SPCA (en el aparato de Golgi) y MCU (en las mitocondrias) (Brini et al., 2013). Fuente: Brini M, Call T, Ottolini D, Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis and signaling. Met Ions Life Sci. 2013.

sensores de alteraciones del microambiente y conduciendo a cambios en la excitabilidad, remodelación, supervivencia y función de las neuronas sensoriales (Hanani, 2010; Blanke et al., 2019). El movimiento de Ca^{2+} en neuronas sensoriales viscerales por la acción de histamina mediante la acción de H1R han mostrado grandes cambios en la región citoplasmática, además de contribuir a procesos potenciadores nociceptivos y sensibilización de receptores TRP; por ejemplo, TRPV1, TRPV4 y TRPA1; esto como mecanismo de hipersensibilidad visceral y activación neuronal (Balemans et al., 2019; Wouters et al., 2016). Esto demuestra que la

inhibición de H1R y las corrientes de Ca^{2+} presentan una regulación terapéutica en estímulos nociceptivos, así como la inhibición de mecanismos potenciadores de excitabilidad y respuesta vagal.

3. Planteamiento del problema

Debido a que el cerebro detecta las reacciones inmunes a través del nervio vago (Jin et al., 2024), la estimulación del nervio vago (ENV) se ha propuesto como un abordaje alternativo a enfermedades resistentes a tratamientos de primera línea como la epilepsia y la depresión (Möbius & Welkoborsky, 2022). Este mecanismo de estimulación eléctrica permite la modulación de neuronas de segundo orden en núcleos del tallo cerebral, por ejemplo, en las neuronas del NTS se promueve un efecto neuro protector, así como una acción antiinflamatoria (Yuan & Silberstein, 2016b; Jin et al., 2023). Sin embargo, las vías de señalización celular asociadas a la modulación inflamatoria por la acción del nervio vago aún no han sido esclarecidas. La ENV por medio de citocinas o sustancias proinflamatorias *in vivo* e *in vitro* puede modular la neurotransmisión en las neuronas sensoriales vagales o de las neuronas de segundo orden de la medula oblonga (Borovikova et al., 2000; Steinberg et al., 2016; Jafri et al., 1997).

La histamina como modulador de la excitabilidad de las neuronas sensoriales vagales ha mostrado efectos variables, de lo cual es debido a diferentes subtipos de receptores y a que los receptores histaminérgicos tienen una localización específica de acuerdo con algunas subpoblaciones vagales (Li et al., 2015). Evaluar los cambios en el Ca^{2+} citosólico ante la estimulación de histamina es pertinente debido a que los receptores histaminérgicos están acoplados a mecanismos de señalización que regulan el Ca^{2+} citosólico proveniente del espacio extracelular y organelos como almacenes de Ca^{2+} (Branco et al., 2018).

El estudio del Ca^{2+} citosólico como mediador de excitabilidad, liberación de neurotransmisores y propagación del potencial de acción en neuronas permitirá esclarecer la funcionalidad de los receptores histaminérgicos en las neuronas sensoriales del nervio vago. Lo anterior nos llevó a plantear la pregunta: ¿La aplicación de histamina en neuronas sensoriales de los ganglios vagales producirá un cambio en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico?

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar el cambio en el nivel de Ca^{2+} citosólico ante la aplicación de histamina en las neuronas sensoriales vagales de ratas Long Evans cepa CII de 14 a 16 días de edad.

4.2 Objetivos Metodológicos

1. Realizar cultivos primarios de neuronas vagales sensoriales de ratas Long Evans cepa II de 14 ± 2 días.
2. Evaluar la viabilidad celular y/o activación metabólica de las células cultivadas a partir de los ganglios vagales mediante el ensayo de MTT.

4.3 Objetivos Experimentales

3. Evaluar la viabilidad celular y/o activación metabólica de neuronas vagales de cultivo primario ante la aplicación de histamina 10 nM a 3 μ M.
4. Determinar los cambios de Ca^{2+} citosólico en neuronas vagales de cultivo primario ante la aplicación de alto potasio.
5. Determinar los cambios de Ca^{2+} citosólico en neuronas vagales de cultivo primario ante la aplicación de histamina a 10 μ M.

5. Material y métodos

5.1 Bioética

Los experimentos que se realizaron bajo lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 acerca de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, tomando en consideración los apartados de movilización, técnicas experimentales, eutanasia y medidas de bioseguridad y salud ocupacional para el personal asociado con el cuidado y uso de los animales de laboratorio. También se consideró la Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993 que establece los medios de cultivo para la validación del medio, esterilización, especificaciones y etiquetado. Asimismo, se respetaron los lineamientos establecidos por el CICUAL (Comité Interno de para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la BUAP).

5.2 Disección de ganglios vagales y cultivo primario de neuronas vagales de ratas neonatas Long Evans cepa CII

Para la disección de los ganglios vagales se siguió la metodología sugerida por el artículo de Fernández et al. y en Han & de Araujo (W. Han & de Araujo, 2021; Fernández et al., 2017). A continuación, se describe brevemente: se anestesiaron ratas neonatas Long Evans cepa CII usando isoflurano al 4%, se realizó un corte medial desde la base del cuello hasta la boca con la finalidad de ver las glándulas submandibulares como referencia anatómica, se retiraron las glándulas y los músculos bilaterales esternocleidomastoideo y omohioideo para identificar en la parte inferior las arterias carótidas (Figura 13). Se separó el nervio vago de la arteria carótida, se retiró el ganglio superior cervical a nivel de la bifurcación carotídea y se desecharon, se retiraron los GNV y fueron transferidos a una caja Petri con medio L-15 100% frío. Para el cultivo de GNV se elaboraron las siguientes soluciones: un medio L-15: medio Leibovitz-15 al 100 % con pH ajustado a 7.4 con NaOH, y un medio L-15 modificado: medio Leibovitz-15 adicionado con HEPES, NaHCO₃, 300 µl de SBF al 100%, 60 µl de penicilina y estreptomicina con el pH ajustado a 7.7.

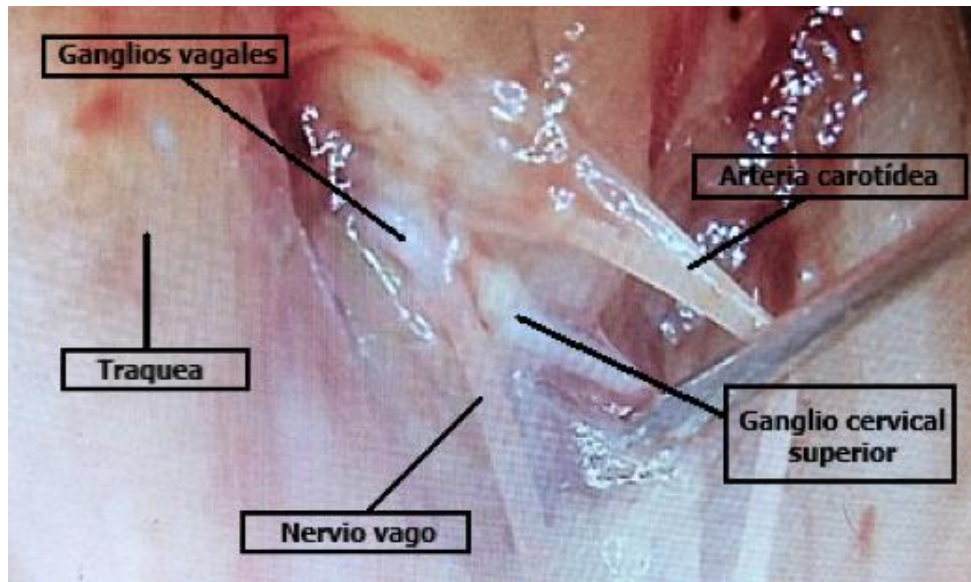


Figura 13. Macroestructuras en la disección de ganglios vagales. Después de la extracción de los músculos esternocleidomastoideo y omohioideo, se visualiza en una vaina única el nervio vago y la arteria carotídea; en la imagen se separan de tal manera que se definen el abultamiento nervioso del nervio vago y el ganglio cervical superior por medio del desplazamiento lateral de la arteria carotídea gracias al apoyo de un alfiler.

Los GNV se colocaron en un tubo Falcon con 3 ml de medio L-15 adicionado con collagenasa (1.25 mg/ml) y tripsina (1.25 mg/ml) y se incubaron por 30 min, se homogenizaron con ayuda de una pipeta Pasteur y la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. Se extrajo el sobrenadante y se agregó medio de cultivo L-15 al sedimento celular. Se recuperó el pellet de neuronas y se agregaron 3 ml de medio L-15 modificado. La mezcla celular final se vertió en recipientes especializados de cultivo explicados en las siguientes secciones.

5.3 Ensayo de MTT

Se sembraron 100 μ L de la mezcla final celular en 12 pocillos de fondo plano y se dejaron incubar 48 h a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. La incubación fue acompañada de la aplicación de histamina a 3, 1, 0.3, 0.1 y 0.01 μ M por duplicado.

Para seguir El ensayo de MTT se prepararon las siguientes soluciones: una solución de MTT: sales de MTT [bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5, -difetil

tetrazolio] al 10% en PBS a 5 mM y, una solución de SDS-HCl: SDS (sulfato dodecil-sódico) en HCl al 20 %. Se agregaron 50 μ l de solución de MTT a cada uno de los pocillos y se mezclaron, se dejaron incubar 2 h a una temperatura de 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente se agregaron 50 μ l de solución de SDS-HCl por 5 minutos a cada pocillo. Se realizaron dos mediciones de absorbancia con longitud de onda a 570 y 630 nm en un lector de microplacas Accuris SmartReader 96.

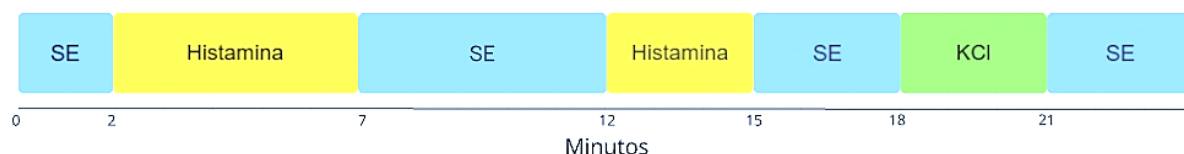
5.4 Medición de Ca^{2+} intracelular

Se utilizaron cajas Petri de 50 mm que contienen 3 cuadros fragmentados de cubreobjetos. Estos fueron previamente esterilizados y tratados con un sustrato de adhesión celular denominado poli-D-lisina. La mezcla celular final se agregó en forma de gotas en el centro de los vidrios sin derramarse y se incubaron por 30 minutos. Posteriormente, se agregó medio L-15 modificado de forma que se inundó la caja Petri y por capilaridad se unió a las gotas de la mezcla celular final colocadas en los cubreobjetos. Las cajas Petri se incubaron por 48 h a una temperatura de 37°C y 5% de CO_2 .

Para realizar las mediciones de calcio intracelular se utilizó un indicador de Ca^{2+} FURA-2/AM (Fura 2/ éster acetoximetilo). Se incubaron en un cuarto oscuro con 3 μ M de FURA-2/AM por 1 h. Se lavaron dos veces cambiando el medio y agregando solución extracelular (SE). La composición de la SE fue la siguiente, el valor de cada elemento representa la concentración en mM: 140 NaCl, 5 KCl, 1.2 $MgCl_2$, 1.8 $CaCl_2$, 10 HEPES y 10 glucosa. Cada lavado se dejó reposar por 30 min. Este procedimiento se realizó bajo un rango de temperatura entre 21°C y 23°C. Los vidrios se transportaron y se adhirieron con una gota de silicón a una caja Petri para su fijación. La caja Petri se montó en un microscopio epifluorescente Axiolab Zeiss equipado con objetivo 63X de inmersión acuosa, además de un sistema de control de filtros ópticos Lambda10-2 a una cámara de alta resolución Photonic Science para la captura de imágenes, lámpara de mercurio 100 W, y un sistema de succión para cambios de medio. Los experimentos se situaron en un cuarto en penumbra para evitar el *quenching* (blanqueamiento o inactivación de la fluorescencia).

Los cambios en la concentración de calcio citosólico fueron cuantificados mediante la captura de imágenes a 1/3 Hz a través de dos longitudes de onda: 340 y 380 nm. Las imágenes fueron almacenadas por un software especializado para la captura de las imágenes (Berra-Romani et al., 2022).

Los registros se realizaron de acuerdo con el siguiente protocolo: durante dos minutos se obtuvieron registros para tomar el control, en el minuto 2 se cambió el medio por una solución a 10 μ M de histamina y en el minuto 7 se lavó con solución extracelular (SE). Luego, se cambió la SE aplicando nuevamente la solución de histamina en el minuto 12 y se lavó con SE en el minuto 15. Por último, se aplicó solución alta en potasio (KCl 20 μ M) en el minuto 18 y se cambió por SE al minuto 21.



Gracias a los pluggins ROI Manager Tools y Ratio Plus de ImageJ, una herramienta para focalizar regiones de interés (ROI) se delimitaron las áreas de evaluación de la señal en una longitud de onda de 340 nm y 380 nm, en este caso, las regiones del campo muestral en donde se encuentran las células.

5.5 Análisis estadístico

5.5.1 Ensayo de MTT

Las dos mediciones de absorbancia en el ensayo de MTT-formazán se realizaron para determinar la razón 570nm/630nm, la cual es proporcional a las células vivas y/o metabólicamente activas en cada pocillo. Cada condición experimental se realizó por duplicado en cada experimento. Se obtuvieron los valores de media y desviación estándar para realizar gráficos de cajas y bigotes. Los datos se analizaron por medio una prueba ANOVA de un factor y el valor de α se estableció en 0.05. Si existió diferencia entre las varianzas entre los grupos con base en los resultados obtenidos en la prueba ANOVA, se aplicó una prueba post-hoc HSD de Tukey.

5.5.2 Medición de Ca^{2+} intracelular

La técnica de Fura 2/AM se midió en dos longitudes de onda para realizar una razón 340/380. Esto significa que un aumento de la razón es un aumento dinámico en las regiones de interés marcadas en ImageJ, *i. e.*, existe un cambio positivo en el calcio libre citosólico. Las mediciones obtenidas durante los protocolos fueron analizadas mediante una prueba t-Student de una cola entre los eventos controles y: los eventos con la aplicación de histamina a 10 μ M, los eventos con la aplicación de una solución alta en potasio y el lavado.

6. Resultados

6.1 El ensayo de MTT-formazán valida la viabilidad de las células vagales

Las células de los cultivos primarios de GNV se mantuvieron incubadas durante 48 h, tiempo suficiente para mostrar estructuras desarrolladas como neuritas, así como la delimitación morfológica de regiones citoplasmáticas. En la Figura 14, se evidencia un campo muestral analizado en la técnica con el indicador fluorescente FURA-2/AM que coincide con el mostrado en la Figura 18 e incluye las células 5 y 6. Se muestra la formación de regiones delimitadas por el cambio de intensidad en el citoplasma indicando mayor concentración de Ca^{2+} intracelular libre por la unión a FURA-2/AM, que coincide con almacenes naturales de Ca^{2+} citoplasmáticos. Sin embargo, en el proceso de elaboración de los cultivos primarios se logró una densidad celular baja.

La validación del cultivo primario de GNV se puso a prueba mediante la reducción de MTT a formazán reflejado en los niveles de absorbancia por medio de la razón 570/630. Este proceso es considerado una prueba de viabilidad del cultivo celular y evidencia el metabolismo activo (Ghasemi et al., 2021). Se probaron diferentes condiciones experimentales en pocillos de microplacas y estos resultados son mostrados en la Figura 15. Cada una de las mediciones fue realizada por triplicado en tres cultivos diferentes. Se consideró que todos los componentes vertidos en los pocillos pueden afectar potencialmente los valores de la absorbancia. El medio L-15 se utilizó con rojo fenol ya que así proviene de fábrica y se le agregó suero bovino fetal (SBF) en los grupos donde se encuentran las células del cultivo primario de GNV ya que podría afectar al metabolismo celular.

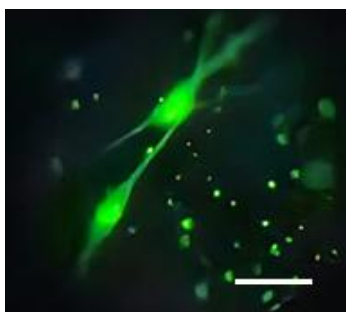


Figura 14. Células de cultivo primario de GNV. Las células son visualizadas por medio de la carga fluorescente de FURA-2/AM en un campo oscuro. Las células muestran neuritas bien estructuradas y regiones citoplasmáticas delimitadas. Los puntos identificados en el campo de visión son cristales conservados posteriormente a los lavados con solución extracelular. La línea blanca representa una escala de 20 μm . La imagen se logró obtener en un microscopio epifluorescente Axiolab Zeiss equipado con objetivo 63X de inmersión acuosa.

La razón 570/630 de la absorbancia en las muestras en condiciones de células con MTT y SDS (CMS) arrojó mediciones mayores que el resto de las condiciones experimentales y estadísticamente significativas con respecto a la media a través de una prueba t Student ($n = 12/13$, $p < 0.05$) con excepción del grupo con células e isopropanol ($p = 0.389$). Se consideró el grupo “Vacío” en donde se tomaron pocillos sin agregar ningún reactivo, esto probó que los componentes acuosos por sí solos no afectaban a la medición de la absorción de luz; se incluyó el grupo “Medio” en el cual solo se agregó medio L-15, donde se evaluó que el rojo fenol sin SBF ni células ejercieron cambios significativos en la absorbancia. El grupo “M” donde se incluyó solo solución de MTT al 10% y los grupos con disolventes de MTT: “D” (DMSO), “S” (SDS) e “I” (isopropanol) se incluyeron para evidenciar que estos reactivos de igual forma no afectaban los valores de la absorbancia *per se*.

Los grupos donde se agregaron células; “CD”, “CS” y “CI”; se tomaron en cuenta para evidenciar la interacción con cada disolvente de MTT; sin embargo, no se encontró diferencia significativa con base en los grupos disolventes ($p > 0.05$). Esto no aplicó en el grupo con células y MTT ($p < 0.05$), lo que demuestra que el MTT en

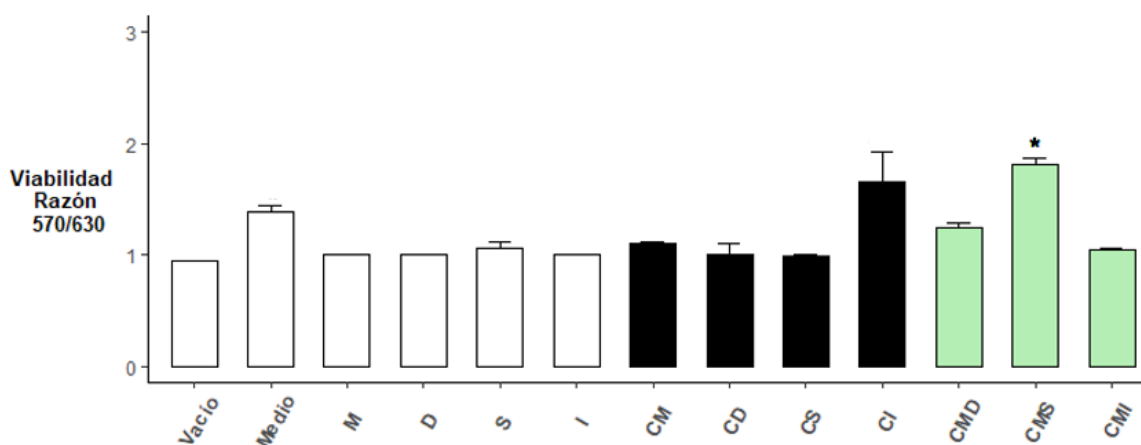


Figura 15. Mediciones obtenidas de los controles considerados en la validación del cultivo primario de células de GNV de ratas neonatas Long Evans cepa C-II. Se muestra un diagrama de barras representando la media y complementado con una barra de error que representa el error estándar, estos valores fueron alcanzados por la razón 570/630 en la evaluación de los grupos control. Se muestra el resultado de una prueba t Student con respecto al grupo CMS (* $p < 0.05$). Vacío, pozos vacíos; C, células de GNV; Medio, medio L-15; M, MTT; D, dimetilsulfóxido; S, dodecilsulfato sódico; I, isopropanol; CM, células de GNV con MTT; CD, células de GNV con DMSO; CS, células de GNV con SDS; CI, células de GNV con isopropanol; CMD, células de GNV con MTT y DMSO; CMS, células de GNV con MTT y SDS; CMI, células de GNV con MTT e isopropanol.

presencia de células, se reduce a formazán y hay un cambio en los valores de absorbancia. Por último, los valores obtenidos en las condiciones de las células con MTT y un disolvente determinaron el uso de SDS para los siguientes estudios ya que este complejo de reactivos muestra un aumento en la lectura en comparación a los otros disolventes, *i.e.*, un aumento de la razón 570/630 en las CMS muestra que las células de cultivo primario de GNV sí se encuentran metabólicamente activas con respecto a la mayoría de los grupos control.

6.2 El efecto de la aplicación de histamina en la actividad metabólica de las células cultivadas a partir de ganglios vagales

Las células de cultivo primario de GNV se sembraron en microplacas de cultivo de 96 pocillos para el ensayo colorimétrico de reducción MTT-formazán y se incubaron con histamina a diferentes concentraciones: 0.01, 0.1, 0.3, 1 y 3 μM . La incubación tuvo una duración de 48 h y 2 h. Se evaluó la actividad metabólica de las células en cada pocillo mediante el cambio de la absorbancia bajo dos mediciones con longitud de onda de 570 nm y 630 nm (Figura 16 y 17). La evaluación con una prueba ANOVA de

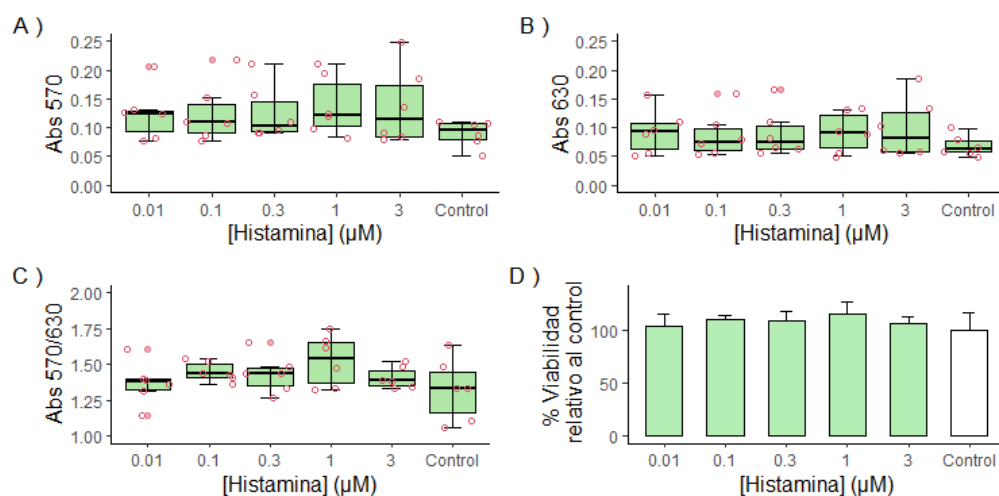


Figura 16. Mediciones de absorbancia por medio del ensayo de MTT en células de cultivo primario de GNV después de 48 horas de la aplicación de histamina. A los grupos se les aplicó histamina en diferentes concentraciones: 0.01, 0.1, 0.3, 1 y 3 μM . A) Se representan los valores obtenidos de la absorbancia con una longitud de onda de 570 nm, 630 nm en B) y la razón 570 nm / 630 nm en C) en gráficas de cajas y bigotes las cuales también incluyen los valores de cada muestra observada (puntos rojos, $n = 6$). D) Los valores mostrados en C) son normalizados al control porcentualmente, representados en una gráfica de barras y evaluados por medio de una prueba post-hoc HSD de Tukey con respecto al control ($p > 0.05$).

de un factor seguida de una prueba post-hoc HSD de Tukey mostró que la aplicación de histamina en las diferentes concentraciones consideradas no modifica la viabilidad celular con respecto al grupo control ($n = 6$, $p = 0.29$) en cultivos primarios con 48 h después de la aplicación de histamina. Lo anterior nos muestra que la histamina no afecta a la viabilidad celular y/o la actividad metabólica en las células de cultivo primario del nervio vago a largo plazo.

A diferencia de los resultados obtenidos en los cultivos primarios de células GNV después de 48 h de la aplicación de histamina, la incubación de histamina con duración de 2 h mostró un nivel de significancia a través de la prueba ANOVA de un factor ($n = 2$, $p = 0.03$) seguida de una prueba post- hoc HSD de Tukey al comparar los pares de medias Control-3 μM ($p = 0.034$), Control-0.3 μM ($p = 0.044$) y Control-0.01 μM ($p = 0.038$). Esto evidencia el efecto modulador de la histamina a corto plazo principalmente en concentraciones 3, 0.3 y 0.01 μM en la viabilidad celular y la actividad metabólica de las células de cultivos primarios de GNV.

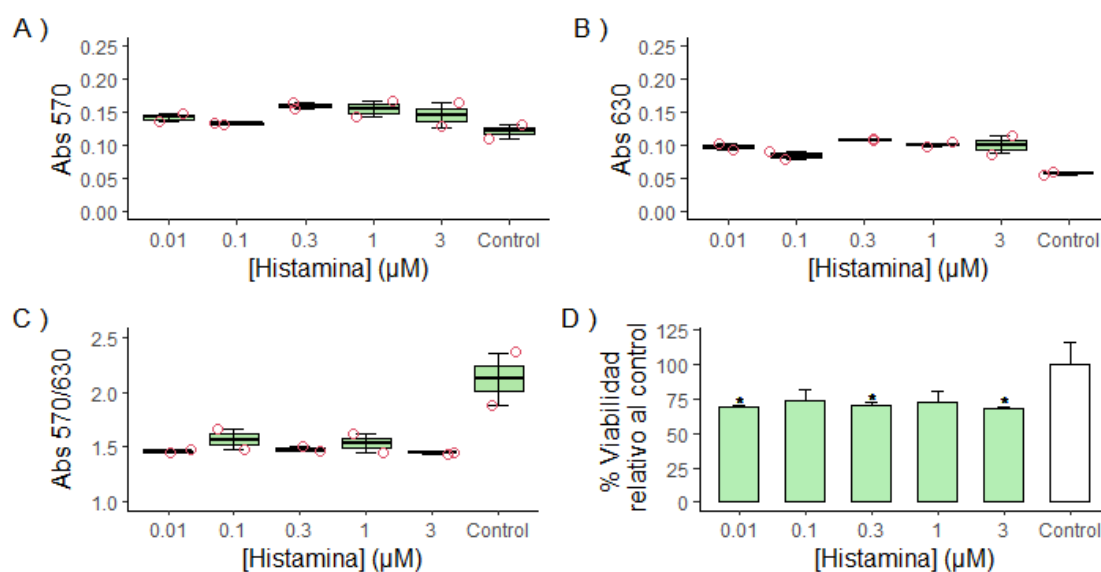


Figura 17. Mediciones de absorbancia por medio del ensayo de MTT en células de cultivo primario de GNV después de 2 h de la aplicación de histamina. A) Los valores obtenidos en la medición de la absorbancia con una longitud de onda de 570 nm agrupados en diferentes concentraciones de histamina. B) Valores obtenidos en mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 630 nm. C) Razón de los valores obtenidos en la medición de la absorbancia en las longitudes de onda de 570 nm sobre 630 nm. D) La razón mostrada en C) se normalizó con respecto al control y se representa porcentualmente. Se evaluó con una prueba ANOVA de un solo factor ($p < 0.05$) y una prueba post-hoc HSD de Tukey (* $p < 0.05$).

6.3 La excitabilidad a la aplicación de solución con alto K^+ como indicador celular neuronal modula el nivel de Ca^{2+} citosólico.

Los cultivos primarios neuronales de GNV fueron sembrados en cubreobjetos tratados con poli-D-lisina en cajas Petri e incubados por 48 h. Se eligió un campo muestral favorable para su estudio considerando una mayor densidad celular y enfoque de las células. Las 12 células consideradas se eligieron con base en la morfología neuronal desarrollada en el lapso de la incubación como son las neuritas y la delimitación membranal (Figura 18).

Las imágenes de la razón 340/380 se evaluaron a través del plugin ROI's Manager Tools de ImageJ que definió el área específica del campo muestral donde se localizaban las células (Figura 19). El retiro y aplicación de las soluciones a través del protocolo de aplicación alteraba el campo muestral desplazando las células, por lo tanto, los ROI's no se establecieron justos y se designó un área aumentada por donde se movían las células a lo largo del protocolo de aplicación. Esto no afectó a las mediciones ya que los valores obtenidos toman en cuenta el ROI completo y la diferencia de fluorescencia se dispone exclusivamente en las células y no en el espacio extracelular.

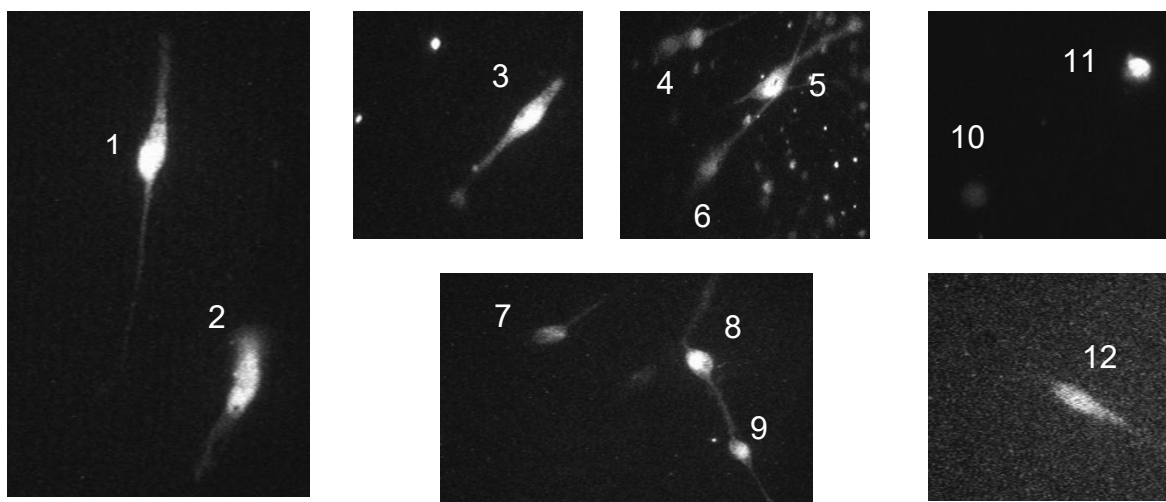


Figura 18. Células de cultivo primario de GNV en campo oscuro y fluorescencia de FURA-2/AM. Las fotografías se aprecian a través del software captador bajo un filtro de intensidad perceptible a los cambios de fluorescencia. La resolución de las imágenes se intensifica a 380 nm, por lo que se prefirió mostrar los campos muestrales obtenidos bajo este parámetro. Las células se enumeran del 1 al 12 y esta misma asignación corresponde a la numeración en las siguientes figuras.

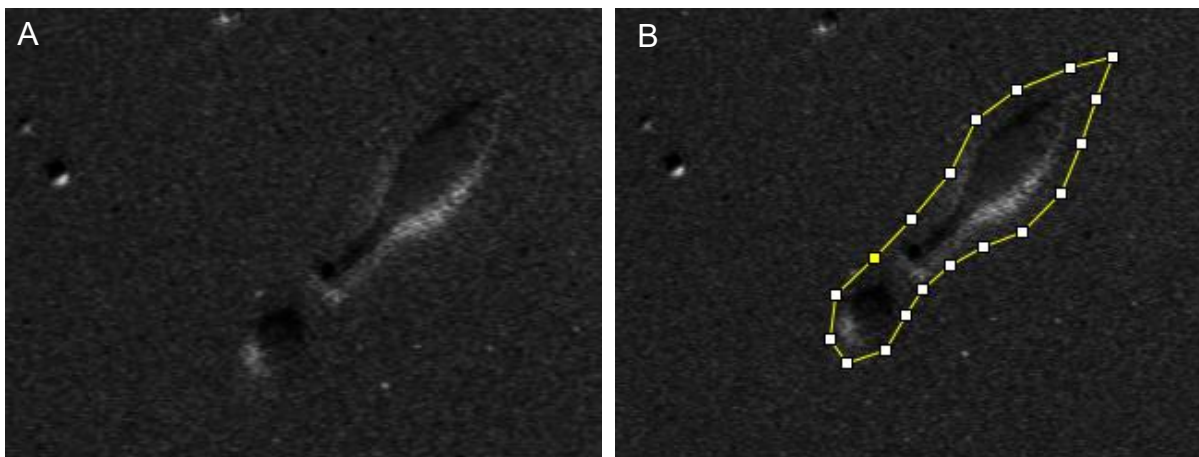


Figura 19. Regiones de interés para las mediciones de Ca^{2+} en las imágenes generadas de la razón 340/380. A) Se analizaron las capturas con longitud de onda 340 nm y 380 nm a través del plugin Ratio Plus para generar un nuevo conjunto de imágenes denominado razón 340/380. Se muestra una imagen como ejemplo donde se aprecia la razón 340/380 de la célula 3 en la aplicación de la solución alta en K^+ . B) La delimitación de la región de interés para las mediciones de los cambios de fluorescencia de las células en el campo muestral se realizó a través del plugin ROI Manager Tools, en la cual la intensidad se cuantifica y se compara con respecto a las otras imágenes a lo largo del protocolo de aplicación.

Los valores obtenidos de las ROI's se analizaron con el programa Clampfit 10.6 para determinar el pico de la respuesta, el control y el lavado; se tomaron dos valores contiguos y se calculó la media. Antes de la aplicación de la solución alta en K^+ los datos se consideraron como el control y después de retirar la solución se estableció como el lavado (Figura 20). Todas las células aumentaron la fluorescencia en la aplicación de la solución alta en K^+ (20 μ M) y obtuvieron un descenso en el lavado (34.5 %). El 41.6 % de las células mostró un aumento menor al 10% de la fluorescencia (célula 4, 2.2 %; célula 5, 2.9 %; célula 6, 7.3 %; célula 7, 9.9 %; célula 12, 5.9 %), el 33.3 % mostró un aumento mayor al 10% (célula 3, 14.3 %; célula 8, 21.7 %; célula 10, 17.4 %) y en el 25 % se obtuvo un aumento mayor del 36 % (célula 1, 87.3 %, célula 2, 36.1 %; célula 9, 54 %). Además, se observó un aumento del volumen intracelular de 41% en la célula 3. La media de los picos de la intensidad de la fluorescencia del control y la respuesta a la solución alta en K^+ se analizaron mediante una prueba t-Student con nivel de significancia de 0.05 ($p < 0.01$).

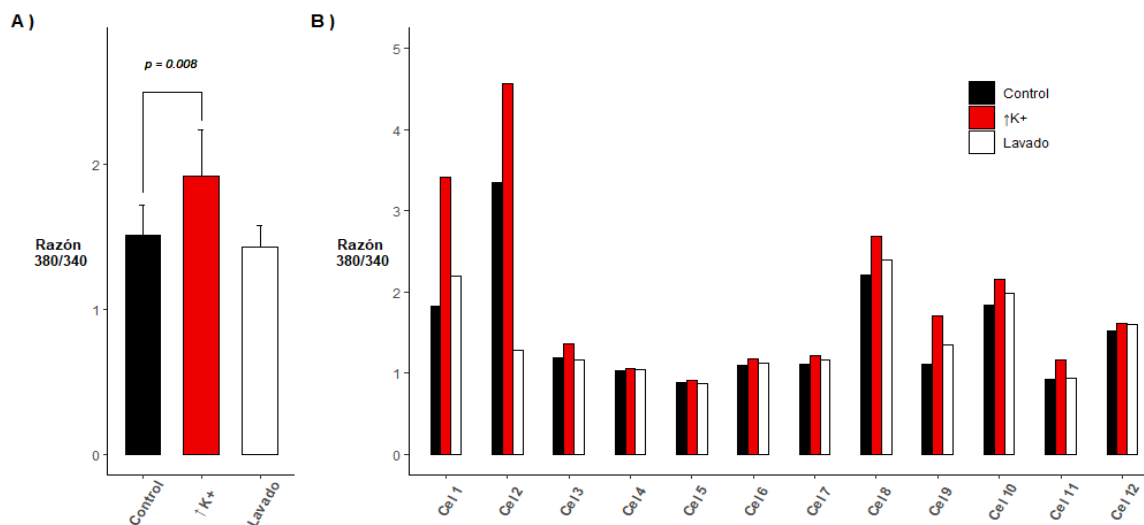


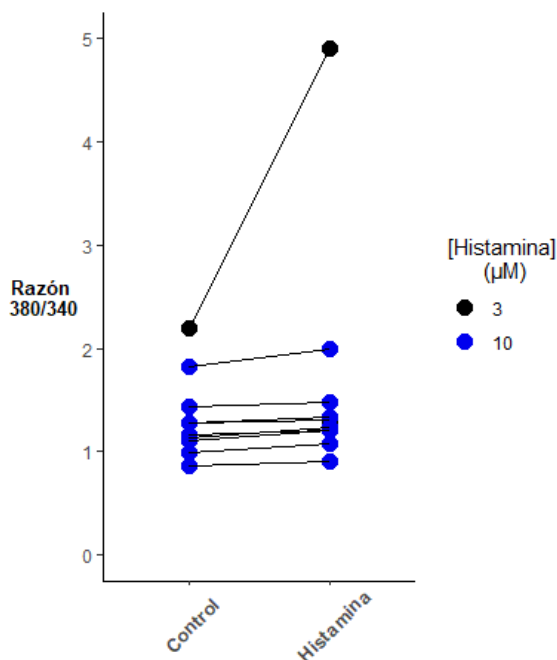
Figura 20. Mediciones de cambio en el Ca^{2+} citosólico a través de la fluorescencia en células de cultivo primario GNV durante la aplicación de solución alta en K^+ . A) La media obtenida en el protocolo estipulado para la técnica de FURA-2/AM en el periodo previo (estipulado como "Control"), durante (" $\uparrow K^+$ ") y posterior ("Lavado") a la aplicación de la solución alta en K^+ , los cuales son representados a través de la razón 340/380. Se aplicó una prueba t Student de una cola para la media de los valores control y altos en K^+ ($p = 0.008$). B) Se muestran los valores de cada célula considerada en los campos visuales del estudio de los cultivos primarios.

Las células de cultivo primario de GNV se sometieron a la exposición de K^+ posterior a la aplicación histaminérgica evaluando la capacidad de respuesta, así como comprobar que el gradiente electrofisiológico no fue alterado. Esto implica que el cambio en los niveles de Ca^{2+} intracelular a causa de la histamina previamente aplicada, responde a una modulación fundada en la actividad histaminérgica en células viables a través de la solución alta en K^+ mostrando un comportamiento neuronal activo en la aplicación de un estímulo excitador, *i. e.*, los campos muestrales contenían células excitables.

6.4 La histamina modula los niveles de Ca^{2+} citosólico reflejado en el cambio de fluorescencia en neuronas de los ganglios vagales

Para obtener las mediciones de Ca^{2+} citosólico a consecuencia de la aplicación de histamina en las células de cultivo primario de GNV, se sometieron a una técnica con el indicador fluorescente FURA-2/AM. Todas las células obtenidas en la incubación de 48 horas del cultivo primario de GNV mostraron una respuesta a la aplicación de la so-

Figura 21. Mediciones de Ca^{2+} citosólico en neuronas de cultivo primario de GNV. Los valores presentados se obtuvieron en el periodo previo y posterior a la aplicación de histamina. Se subdividen en muestras donde se aplicó histamina con concentración de 3 y 10 μM . La célula con aplicación de histamina 3 μM que mostró un valor duplicado encaja con las propiedades de una fibra tipo C de rata macho neonata, la otra célula no se muestra (Li et al., 2013). Los valores asociados con una línea representan los datos obtenidos en una sola célula.



lución alta en K^+ , estas se incluyeron en la evaluación de la respuesta a histamina. En dos células se aplicó histamina 3 μM y posteriormente se modificó en el resto a 10 μM (Figura 21). Se registraron 12 células en las cuales se observó un aumento en el pico de la concentración de Ca^{2+} citosólico ubicado en el periodo de aplicación de histamina ($17.6\% \pm 11.7$ de aumento, $n = 10/12$, $p = 0.116$) con respecto a la media de valores previos de cada aplicación, un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico en la aplicación de histamina 10 μM ($6.4\% \pm 1$ de aumento, $n = 8/12$, $p = 0.001$), una disminución (23.2% de disminución, $n = 1/12$, célula 6) y un caso donde no se produjo efecto alguno ($n = 1/12$, célula 11). Una de las 12 células murió tras la primera aplicación de solución alta en K^+ (célula 2). El lavado recuperó parcialmente la concentración de Ca^{2+} basal ($3.5\% \pm 1.16$ de recuperación, $n = 12/12$) (Figura 22 y 23). En algunos casos, después del lavado se hizo una segunda aplicación de histamina, pero se prefirió no sujetar a las células a dos periodos de histamina y preservar la respuesta en una sola administración (datos no mostrados). Los trazos obtenidos se ubicaron en diferentes rangos de absorbancia; sin embargo, esto no logra afectar la media de la muestra (Figura 24).

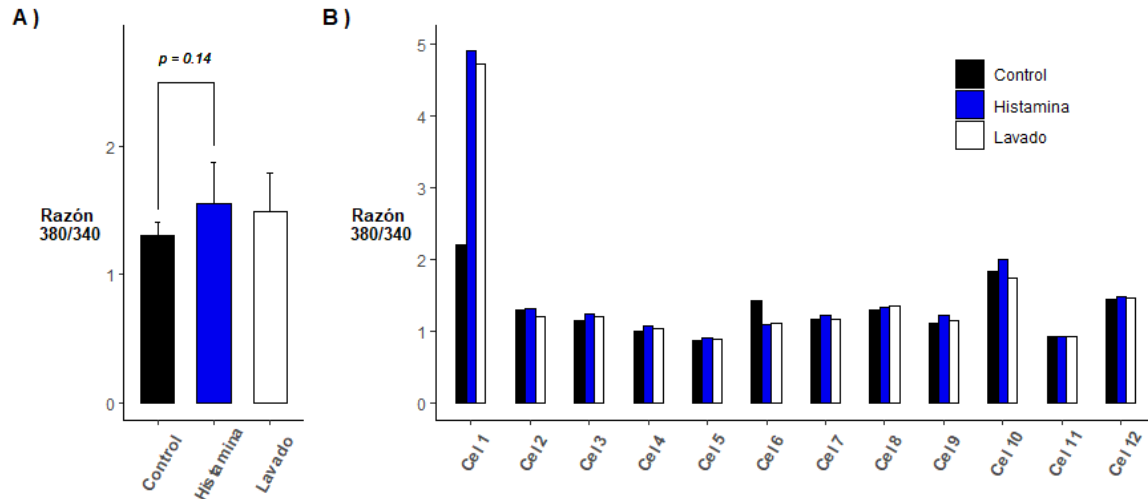


Figura 22. Mediciones de cambio en el Ca^{2+} citosólico a través de la fluorescencia en neuronas de cultivo primario GNV durante la aplicación de histamina. A) Los valores obtenidos en el periodo previo (estipulado como “Control”), durante (“Histamina”) y posterior (“Lavado”) a la aplicación de histamina, los cuales son representados a través de la razón 340/380. Se aplicó una prueba t de Student de una cola para la media de los valores control y tratados con histamina ($p = 0.14$). B) Se muestran los valores de cada célula considerada en los campos visuales seleccionados.

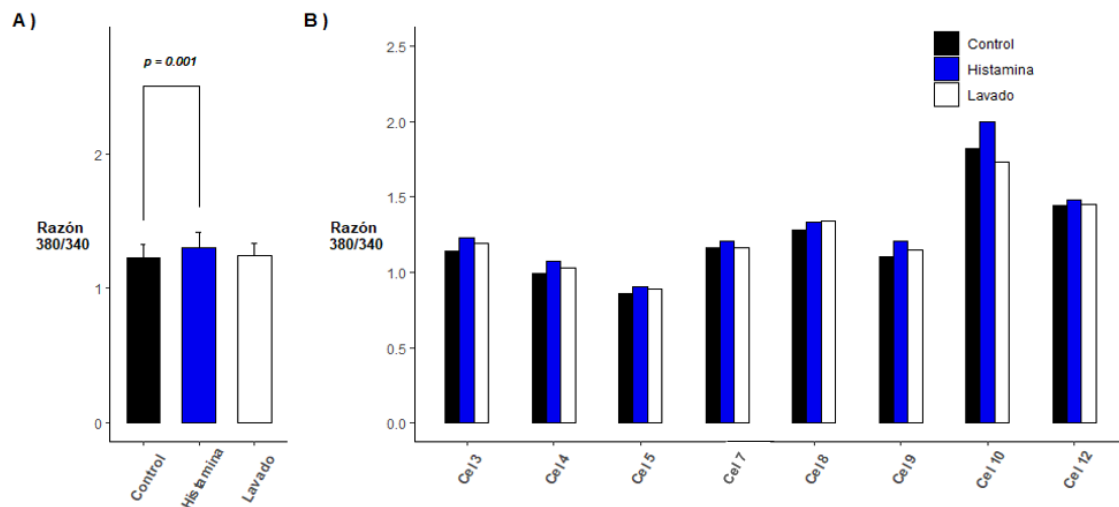


Figura 23. Mediciones de cambio en el Ca^{2+} citosólico en neuronas de cultivo primario GNV durante la aplicación de histamina a $10 \mu\text{M}$. A) Media y desviación estándar de los valores representados en B). Los resultados obtenidos previos a la aplicación de histamina (estipulado como “Control”) y en la aplicación de histamina (“Histamina”) se sometieron a una prueba t-Student de una cola para varianzas desiguales ($p = 0.001$). B) Se muestran los valores obtenidos de las células en la Figura 20 identificadas como neuronas que aumentan el Ca^{2+} citosólico por la aplicación de histamina.

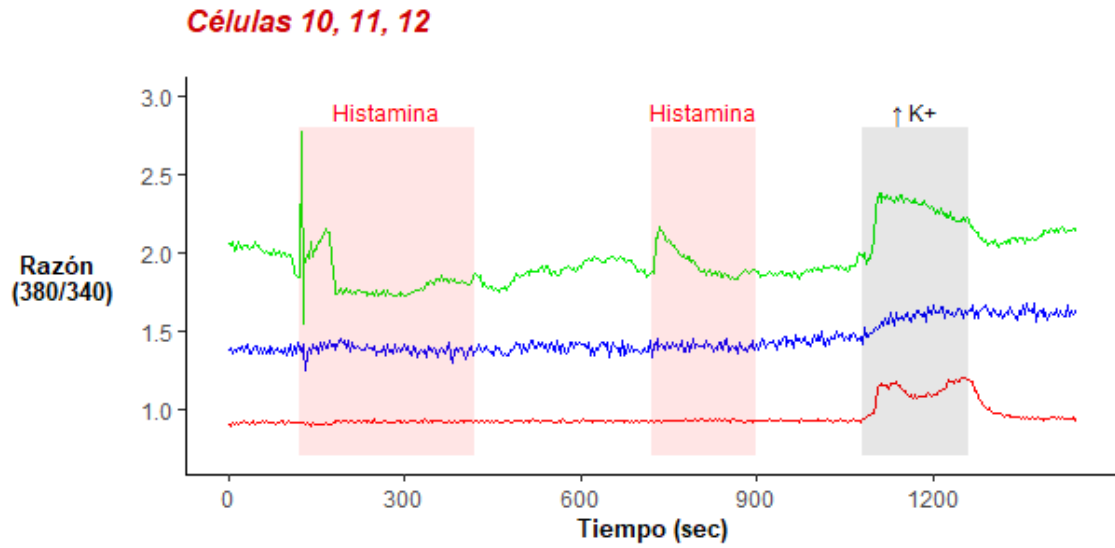


Figura 24. Cambio en la concentración de Ca^{2+} citosólico en neuronas de cultivo primario GNV durante la aplicación de histamina 10 μM . Se muestran trazos representativos de las fluctuaciones en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico en la célula 10 (verde), célula 11 (rojo) y célula 12 (azul) a través de los intervalos de tiempo en la aplicación de histamina 10 μM y solución alta en K^+ .

7. Discusión

La propuesta de estos experimentos nos ha llevado a sumar en el esclarecimiento de la función interrelacionada de la generación de estímulos excitatorios evocados por una señal inmunológica. Las neuronas aferentes vagales contribuyen en la señalización y transmisión de factores constitutivos en el funcionamiento homeostático visceral y somatosensorial. En este estudio, los estímulos extracelulares se establecieron a través de un cambio electroquímico conferido a la solución de alto K^+ y la histamina.

Gracias al ensayo colorimétrico de la reducción MTT-formazán aplicado posterior al cultivo de las células de GNV, se validó la integridad metabólica y la viabilidad de los cultivos primarios (Ghasemi et al., 2021). Por otro lado, la aplicación de histamina al cultivo primario de GNV no aportó evidencia de regular la actividad metabólica y/o la viabilidad celular con una incubación de 48 h; en cambio, la función mitocondrial se redujo en múltiples concentraciones de histamina cuando se incubó por 2 h, demostrando que la aplicación aguda puede modular el metabolismo celular del cultivo primario. Esta disminución en la lectura concuerda con una inhibición de la función mitocondrial que se ha evaluado anteriormente en regiones corticales (Malagelada et al., 2004). Este efecto se ha bloqueado por el papel de la ranitidina en condiciones patológicas, un antagonista de H_2R ; la thioperamida, un antagonista selectivo de H_3R , así como la actividad de los receptores H_1R y H_3R (Shen et al., 2007), demostrando mecanismos neuro protectores y potenciadores neurogénicos de la aplicación de dichos antagonistas histaminérgicos (Wang et al., 2020). Este efecto se enmascara en la incubación de 48 h, ya que las células pueden aumentar la función mitocondrial por la misma aplicación de la histamina descrito en fibroblastos (Wolak et al., 2017), esto último no fue puesto a prueba en nuestro trabajo.

En los experimentos de fluorescencia utilizamos la aplicación de la solución alta en K^+ , como un control que definiera si la célula registrada era una neurona o no, ya que dicha solución puede evocar el aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico

solo en células neuronales (Greffrath et al., 2001; Lu & Gold, 2008), esto debido a que los GNV están constituidos por neuronas, células de Schwann, células gliales satélite, células endoteliales y microglía (Waise et al., 2018; Kajihara et al., 2010).

La modulación generada por la aplicación de histamina y la presencia de receptores histaminérgicos en neuronas sensoriales periféricas favorecen la teoría de una actividad excitatoria a través del nervio vago evocando una respuesta antiinflamatoria (Jin et al., 2023; Li et al., 2015). Encontramos que el 92 % (11 de 12) de las células evaluadas responden a la aplicación de histamina, así como un 83 % (10 de 12) del total de células mostraban patrones excitatorios y/o de una potenciación excitatoria reflejado en el aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico con base en los resultados obtenidos en trabajos previos en neuronas sensoriales vagales (Jafri et al., 1997; Udem & Weinreich, 1993; Leal-Cardoso et al., 1993; Li et al., 2013).

En el primer experimento realizado con fluorescencia se aplicó histamina a 3 μ M, esto provocó un efecto en la neurona que tardo mucho tiempo en establecerse y adicionalmente provocó la muerte de una de las células registradas. Por tal motivo se cambió la concentración a 10 μ M. Se observó que la aplicación de histamina 10 μ M evocó un aumento del Ca^{2+} citosólico en el 80 % de neuronas aferentes de cultivo primario de GNV y no propició mecanismos apoptóticos. El aumento de Ca^{2+} intracelular es consistente con la aplicación de histamina en neuronas aferentes de los ganglios de la raíz dorsal que presentan propiedades genotípicas similares a subgrupos como JG3, NG13, NG15, NG17, NG18 y neuronas vagales susceptibles a capsaicina (Su et al., 2019; Cenac et al., 2010; Nicolson et al., 2002); sin embargo, el aumento que obtuvimos en la aplicación de histamina fue de 6.4%, este cambio en el Ca^{2+} citosólico no había sido observado anteriormente. Existen factores que atenúan los mecanismos intracelulares en el aumento del Ca^{2+} citosólico, esto depende de la distribución de los receptores histaminérgicos, ya que se ha demostrado que las vías de señalización desencadenadas por la activación de dichos receptores son heterogéneas y logran inhibir el transporte axonal a través de la activación de H1R y H3R, o un descenso en la concentración de Ca^{2+} citosólico como sucedió en la célula 7 (Amano et al., 2001; García et al., 2016). Para esclarecer dicha modulación se pudo

evidenciar por medio de antagonistas selectivos de receptores histaminérgicos, pero no se incluyen en este trabajo.

El conocimiento de los procesos intracelulares en la activación de los receptores histaminérgicos nos permitió comprender el funcionamiento de las vías de señalización asociadas en las neuronas aferentes vagales. La expresión de H1R acoplado a proteínas G_q se encontró en el 4.3 % de neuronas aferentes vagales en ratas hembra adultas Sprague Dawley (SD), implicando que el aumento observado en las células de este estudio probablemente no provino de la actividad de PLC en los almacenes de Ca^{2+} intracelular sosteniendo la validez de la actividad de H2R (Li et al., 2015), esto refuerza los resultados obtenidos en Kupari et al., ya que encontró la expresión del gen *Hrh1* en los grupos yugulares JG2-JG6, en los grupos nodosos NG4, NG5 y NG7-NG18 en ratones C57BL/6JRj y *VGlut2-Cre^{TdTomato}* (Kupari et al., 2019). Se ha observado que la quimio sensibilidad hacia histamina cambia con respecto al género y la edad, ratas macho neonatas SD muestran corrientes entrantes 5 veces más grandes en comparación a ratas hembra neonatas cuando se aplica histamina en neuronas de GNV de fibras tipo C, compartiendo gran similitud con el patrón de respuesta observado en la célula 1 y 2; sin embargo, en el presente estudio no se hizo distinción de género ni distinción de fibras nerviosas. Asimismo, las neuronas yugulares presentan características funcionales semejantes a las neuronas de fibras nociceptivas tipo C de los ganglios de la raíz dorsal, en las cuales se ha observado que la activación de H1R muestra una respuesta selectiva de la fosfolipasa $C\beta$ tipo 3 y la señalización PLA2/lipoxigenasa/TRPV1 aumentando los niveles de Ca^{2+} citosólico (Han et al., 2006; Kim et al., 2004), sensibilizando mecanismos de activación neuronal (Cenac et al., 2010; Galeotti et al., 2004), por lo que se necesita más información acerca de la señalización de H1R y H2R con respecto a la función del Ca^{2+} intracelular.

El aumento de Ca^{2+} citosólico por medio de la señalización de H2R, H3R y H4R no se ha identificado en cultivos primarios de neuronas aferentes periféricas (Kajihara et al., 2010). Las neuronas aferentes vagales de fibras tipo Ah presentan una expresión de H2R en ratas SD adultas hembra (Li et al., 2013), por lo tanto, el aumento de Ca^{2+} citosólico definido en las células de este estudio se vio reflejado por la actividad de las

proteínas G_s que ha demostrado ser un modulador de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en neuronas vagales (Rogers & Hermann, 2008) y neuronas sensoriales periféricas (Distler et al., 2003).

8. Conclusiones

La histamina participa a nivel periférico en la respuesta proinflamatoria y con el presente trabajo hemos mostrado que existe una detección de esta a través de las neuronas aferentes del GNV. Las células del cultivo primario de GNV mostraron la poca influencia de la aplicación de histamina en los procesos metabólicos a largo plazo, no así ante la aplicación a corto plazo. Las neuronas vagales también mostraron su capacidad de responder excitatoriamente ante la estimulación aguda de histamina. Esta modulación de la respuesta vagal se reflejó en el cambio del nivel de Ca^{2+} intracelular. La diversidad neuronal que existe en el nervio vago ha demostrado una respuesta variable a la aplicación de histamina. Sin embargo, la información obtenida en esta investigación da cabida a impulsar un mayor estudio de los circuitos nerviosos viscerales con enfoque a la interacción histaminérgica y enfatizar en la participación del sistema sensorial parasimpático vagal a través de mecanismos regulatorios como el reflejo inflamatorio para evidenciar el papel antiinflamatorio del nervio vago a nivel *in vivo* por estímulos inmunológicos.

9. Bibliografía

- Amano, R., Hiruma, H., Nishida, S., Kawakami, T., & Shimizu, K. (2001). Inhibitory effect of histamine on axonal transport in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Research*, 41, 201–206.
- Andersson, U., & Tracey, K. J. (2012). Neural reflexes in inflammation and immunity. *J Exp Med*, 209(6), 1057–1068.
- Balemans, D., Aguilera-Lizarraga, J., Florens, M. V., Jain, P., Denadai-Souza, A., Viola, M. F., Alpizar, Y. A., Van Der Merwe, S., Vanden Berghe, P., Talavera, K., Vanner, S., Wouters, M. M., & Boeckxstaens, G. E. (2019). Histamine-mediated potentiation of transient receptor potential (TRP) ankyrin 1 and TRP vanilloid 4 signaling in submucosal neurons in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 316, G338–G349.
- Barraco, R., El-Ridi, M., Ergene, E., Parizon, M., & Bradley, D. (1992). An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Research Bulletin*, 29, 703–765.
- Berra-Romani, R., Vargaz-Guadarrama, A., Sánchez-Gómez, J., Coyotl-Santiago, N., Hernández-Arambide, E., Avelino-Cruz, J. E., García-Carrasco, M., Savio, M., Pellavio, G., Laforenza, U., Lagunas-Martínez, A., & Moccia, F. (2022). Histamine activates an intracellular Ca²⁺ signal in normal human lung fibroblast WI-38 cells. *Front Cell Dev Biol*, 10, 991659.
- Berthoud, H.-R., & Neuhuber, W. L. (2000). Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 85, 1–17.
- Blanke, E. N., Stella, S. L., Ruiz-Velasco, V., & Holmes, G. M. (2019). Purinergic receptor expression and function in rat vagal sensory neurons innervating the stomach. *Neurosci Lett*, 706, 182–188.
- Bonaz, B., Sinniger, V., & Pellissier, S. (2016). Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J Physiol*, 594(20), 5781–5790.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W., & Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405(6785), 458–462.
- Branco, A. C. C. C., Yoshikawa, F. S. Y., Pietrobon, A. J., & Sato, M. N. (2018). Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. *Mediators Inflamm*, 2018, 1–10.
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2013). Intracellular calcium homeostasis and

- signaling. *Met Ions Life Sci*, 12, 119–168.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2014). Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. In *Cell Mol Life Sci* (Vol. 71, Issue 15, pp. 2787–2814). Birkhauser Verlag AG.
- Cailotto, C., Gomez-Pinilla, P. J., Costes, L. M., Van Der Vliet, J., Di Giovangiulio, M., Némethova, A., Matteoli, G., & Boeckxstaens, G. E. (2014). Neuro-anatomical evidence indicating indirect modulation of macrophages by vagal efferents in the intestine but not in the spleen. *PLOS ONE*, 9(1), e87785.
- Cain, D. W., & Cidlowski, J. A. (2017). Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*, 17(4), 233–247.
- Câmara, R., & Griessenauer, C. J. (2015). Anatomy of the vagus nerve. In *Nerves and Nerve Injuries* (Vol. 1, pp. 385–397).
- Cavanaugh, D. J., Lee, H., Lo, L., Shields, S. D., Zylka, M. J., Basbaum, A. I., & Anderson, D. J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *PNAS*, 106(22), 9075–9080.
- Cenac, N., Altier, C., Motta, J. P., d'Aldebert, E., Galeano, S., Zamponi, G. W., & Vergnolle, N. (2010). Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: An important mechanism for visceral hypersensitivity. *Gut*, 59, 481–488.
- Chambers, A. P., Sandoval, D. A., & Seeley, R. J. (2013). Integration of satiety signals by the central nervous system. *Curr Biol*, 23(9), R379–R388.
- Chang, R. B., Storchlic, D. E., Williams, E. K., Umans, B. D., & Liberles, S. D. (2015). Vagal sensory neuron subtypes that differentially control breathing. *Cell*, 161(3), 622–633.
- Chazot, P. (2022). Molecular biology of histamine system, volume 1. *Int J Mol Sci*, 23, 5026.
- Craig, A. D. (2002). How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Perspectives*, 3, 655–666.
- Cranfill, S. L., & Luo, W. (2021). The development of somatosensory neurons: Insights into pain and itch. In *Curr Top Dev Biol* (Vol. 142, pp. 443–475).
- D'Autréaux, F., Coppola, E., Hirsch, M. R., Birchmeier, C., & Brunet, J. F. (2011). Homeoprotein Phox2b commands a somatic-to-visceral switch in cranial sensory pathways. *PNAS*, 108(50), 20018–20023.
- Deng, Z., Zhou, W., Sun, J., Li, C., Zhong, B., & Lai, K. (2018). IFN- γ enhances the cough reflex sensitivity via calcium influx in vagal sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med*, 198(7), 868–879.

- Distler, C., Rathee, P. K., Lips, K. S., Obreja, O., Neuhuber, W., & Kress, M. (2003). Fast Ca^{2+} -induced potentiation of heat-activated ionic currents requires cAMP/PKA signaling and functional AKAP anchoring. *J Neurophysiol*, 89, 2499–2505.
- Driessen, A. K. (2019). Vagal afferent processing by the paratrigeminal nucleus. *Front Physiol*, 10, 1110.
- Edelsbrunner, M. E., Nakano, M., & Holzer, P. (2009). Afferent signalling from the acid-challenged rat stomach is inhibited and gastric acid elimination is enhanced by lafutidine. *BMC Gastroenterology*, 9, 40.
- Emery, E. C., & Ernfors, P. (2018). Dorsal root ganglion neuron types and their functional specialization. *The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain*, 129–155.
- Fernández-Fernández, D., Cadaveira, A., Reboreda, A., Rivas-Ramírez, P., & Lamas, J. A. (2017). Primary culture of nodose ganglion neurons from mouse. *PLOS One*.
- Ferrigno, A., Berardo, C., Di Pasqua, L. G., Siciliano, V., Richelmi, P., & Vairetti, M. (2017). Localization and role of metabotropic glutamate receptors subtype 5 in the gastrointestinal tract. In *World J Gastroenterol* (Vol. 23, Issue 25, pp. 4500–4507).
- Frisby, C. L., Mattsson, J. P., Jensen, J. M., Lehmann, A., Dent, J., & Blackshaw, L. A. (2005). Inhibition of transient lower esophageal sphincter relaxation and gastroesophageal reflux by metabotropic glutamate receptor ligands. *Gastroenterology*, 129(3), 995–1004.
- Galeotti, N., Malmberg-Aiello, P., Bartolini, A., Schunack, W., & Ghelardini, C. (2004). H1-receptor stimulation induces hyperalgesia through activation of the phospholipase C-PKC pathway. *Neuropharmacology*, 47, 295–303.
- García, M., García-Pedraza, J. Á., Villalón, C. M., & Morán, A. (2016). Pharmacological evidence that histamine H3 receptors mediate histamine-induced inhibition of the vagal bradycardic out-flow in pithed rats. *Basic Clin Pharma Tox*, 118(2), 113–121.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci*, 22(23), 12827.
- Gleichmann, M., & Mattson, M. P. (2011). Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid Redox Signal*, 14(7), 1261–1273.
- González, H. F. J., Yengo-Kahn, A., & Englot, D. J. (2019). Vagus nerve stimulation for the treatment of epilepsy. *Neurosurg Clin N Am*, 30(2), 219–230.
- Greffrath, W., Kirschstein, T., Nawrath, H., & Treede, R.-D. (2001). Changes in

- cytosolic calcium in response to noxious heat and their relationship to vanilloid receptors in rat dorsal root ganglion neurons. In *Neuroscience* (Vol. 104, Issue 2). www.elsevier.com/locate/neuroscience
- Han, L., Ma, C., Liu, Q., Weng, H.-J., Cui, Y., Tang, Z., Kim, Y., Nie, H., Qu, L., Patel, K. N., Li, Z., McNeil, B., He, S., Guan, Y., Xiao, B., LaMotte, R. H., & Dong, X. (2013). A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nat Neurosci*, 16(2), 174–182.
- Han, S. K., Mancino, V., & Simon, M. I. (2006). Phospholipase C β 3 mediates the scratching response activated by the histamine H1 receptor on C-fiber nociceptive neurons. *Neuron*, 52, 691–703.
- Han, W., & de Araujo, I. E. (2021). Dissection and surgical approaches to the mouse jugular-nodose ganglia. *STAR Protocols*, 2(2), 100474.
- Hanani, M. (2010). Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: In search of function. *Brain Research Reviews*, 64, 304–327.
- Hu, Y., Gu, Q., Lin, R.-L., Kryscio, R., & Lee, L.-Y. (2010). Calcium transient evoked by TRPV1 activators is enhanced by tumor necrosis factor- α in rat pulmonary sensory neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299, L483–L492.
- Huerta, T. S., Haider, B., Adamovich-Zeitlin, R., Chen, A. C., Chaudhry, S., Zanos, T. P., Chavan, S. S., Tracey, K. J., & Chang, E. H. (2023). Calcium imaging and analysis of the jugular-nodose ganglia enables identification of distinct vagal sensory neuron subsets. *J Neural Eng*, 20(2), 026014.
- Iwasaki, Y., Goswami, C., & Yada, T. (2017). Glucagon-like peptide-1 and insulin synergistically activate vagal afferent neurons. *Neuropeptides*, 65, 77–82.
- Iwasaki, Y., Shimomura, K., Kohno, D., Dezaki, K., Ayush, E. A., Nakabayashi, H., Kubota, N., Kadowaki, T., Kakei, M., Nakata, M., & Yada, T. (2013). Insulin activates vagal afferent neurons including those innervating pancreas via insulin cascade and Ca²⁺ influx: its dysfunction in IRS2-KO mice with hyperphagic obesity. *PLOS ONE*, 8(6), e67198.
- Jafri, M. S., Moore, K. A., Taylor, G. E., & Weinreich, D. (1997). Histamine H1 receptor activation blocks two classes of potassium current, I_{K(rest)} and I_{AHP} to excite ferret vagal afferents. *J Physiol*, 503(3), 533–546.
- Jia, L., Lee, S., Tierney, J. A., Elmquist, J. K., Burton, M. D., & Gautron, L. (2021). TLR4 signaling selectively and directly promotes CGRP release from vagal afferents in the mouse. *ENeuro*, 8(1), 1–16.
- Jin, H., Li, M., Jeong, E., Castro-Martinez, F., & Zuker, C. S. (2024). A body–brain circuit that regulates body inflammatory responses. *Nature*, 630, 695–703.

- Jin, Z., Dong, J., Wang, Y., & Liu, Y. (2023). Exploring the potential of vagus nerve stimulation in treating brain diseases: a review of immunologic benefits and neuroprotective efficacy. *Eur J Med Res*, 28(1), 444.
- Kajihara, Y., Murakami, M., Imagawa, T., Otsuguro, K., Ito, S., & Ohta, T. (2010). Histamine potentiates acid-induced responses mediating transient receptor potential V1 in mouse primary sensory neurons. *Neuroscience*, 166, 292–304.
- Karagas, N. E., & Venkatachalam, K. (2019). Roles for the endoplasmic reticulum in regulation of neuronal calcium homeostasis. *Cells*, 8, 1232.
- Kaur, S., Selden, N. R., & Aballay, A. (2023). Anti-inflammatory effects of vagus nerve stimulation in pediatric patients with epilepsy. *Front Immunol*, 14, 1093574.
- Kim, B. M., Lee, S. H., Shim, W. S., & Oh, U. (2004). Histamine-induced Ca²⁺ influx via the PLA2/ lipoxygenase/TRPV1 pathway in rat sensory neurons. *Neurosci Lett*, 361, 159–162.
- Kiss, R., & Keserű, G. M. (2016). Structure-based discovery and binding site analysis of histamine receptor ligands. *Expert Opin Drug Discov*, 11(12), 1165–1185.
- Kollarik, M., Carr, M. J., Ru, F., Ring, C. J. A., Hart, V. J., Murdock, P., Myers, A. C., Muroi, Y., & Undem, B. J. (2010). Transgene expression and effective gene silencing in vagal afferent neurons in vivo using recombinant adeno-associated virus vectors. *J Physiol*, 588(21), 4303–4315.
- Komegae, E. N., Farmer, D. G. S., Brooks, V. L., McKinley, M. J., McAllen, R. M., & Martelli, D. (2018). Vagal afferent activation suppresses systemic inflammation via the splanchnic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*, 73, 441–449.
- Koopman, F. A., Chavan, S. S., Miljko, S., Grazio, S., Sokolovic, S., Schuurman, P. R., Mehta, A. D., Levine, Y. A., Faltys, M., Zitnik, R., Tracey, K. J., & Tak, P. P. (2016). Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in Rheumatoid arthritis. *PNAS*, 113(29), 8284–8289.
- Kumaria, A., & Ashkan, K. (2023). Neuromodulation as an anticancer strategy. *Cancer Medicine*, 12, 20521–20522.
- Kumaria, A., Basu, S., & Tolia, C. M. (2022). Vagus nerve stimulation in ischaemic stroke: further possibilities. *Br J Neurosurg*, 36(4), 425–426.
- Kupari, J., Häring, M., Agirre, E., Castelo-Branco, G., & Ernfors, P. (2019). An atlas of vagal sensory neurons and their molecular specialization. *Cell Reports*, 27, 2508–2523.
- Lancaster, E., Oh, E. J., Gover, T., & Weinreich, D. (2002). Calcium and calcium-activated currents in vagotomized rat primary vagal afferent neurons. *J Physiol*,

540(2), 543–556.

- Larsson, M., & Broman, J. (2019). Synaptic organization of VGLUT3 expressing low-threshold mechanosensitive C fiber terminals in the rodent spinal cord. *ENeuro*, 6(1), 1–17.
- Leal-Cardoso, H., Koschorke, G. M., Taylor, G., & Weinreich, D. (1993). Electrophysiological properties and chemosensitivity of acutely isolated nodose ganglion neurons of the rabbit. *J Auton Nerv Syst*, 45(1), 29–39.
- Lee, L.-Y., & Pisarri, T. E. (2001). Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. *Respir Physiol*, 125(1–2), 47–65.
- Li, C. L., Li, K. C., Wu, D., Chen, Y., Luo, H., Zhao, J. R., Wang, S. S., Sun, M. M., Lu, Y. J., Zhong, Y. Q., Hu, X. Y., Hou, R., Zhou, B. B., Bao, L., Xiao, H. S., & Zhang, X. (2016). Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell Res*, 26(1), 83–102.
- Li, C., Wang, S., Chen, Y., & Zhang, X. (2018). Somatosensory neuron typing with high-coverage single-cell RNA sequencing and functional Analysis. *Neuroscience Bulletin*, 34(1), 200–207.
- Li, J. N., Li, X. L., He, J., Wang, J. X., Zhao, M., Liang, X. B., Zhao, S. Y., Ma, M. N., Liu, Y., Wang, Y. B., Chen, H., Qiao, G. F., & Li, B. Y. (2015). Sex- and afferent-specific differences in histamine receptor expression in vagal afferents of rats: a potential mechanism for sexual dimorphism in prevalence and severity of asthma. *Neuroscience*, 303, 166–177.
- Li, J. N., Qian, Z., Xu, W. X., Xu, B., Lu, X. L., Yan, Z. Y., Han, L. M., Liu, Y., Yuan, M., Schild, J., Qiao, G. F., & Li, B. Y. (2013). Gender differences in histamine-induced depolarization and inward currents in vagal ganglion neurons in rats. *Int J Biol Sci*, 9(10), 1079–1088.
- Li, Y. (2007). Sensory signal transduction in the vagal primary afferent neurons. *Curr Med Chem*, 14, 2554–2563.
- Lieberman, P. (2011). The basics of histamine biology. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 106, S2–S5.
- Liljencrantz, J., Strigo, I., Ellingsen, D. M., Krämer, H. H., Lundblad, L. C., Nagi, S. S., Leknes, S., & Olausson, H. (2017). Slow brushing reduces heat pain in humans. *Eur J Pain*, 21(7), 1173–1185.
- Lovelace, J. W., Ma, J., Yadav, S., Chhabria, K., Shen, H., Pang, Z., Qi, T., Sehgal, R., Zhang, Y., Bali, T., Vaissiere, T., Tan, S., Liu, Y., Rumbaugh, G., Ye, L., Kleinfeld, D., Stringer, C., & Augustine, V. (2023). Vagal sensory neurons mediate the

- Bezold–Jarisch reflex and induce syncope. *Nature*, 623(7986), 387–396.
- Lu, S.-G., & Gold, M. S. (2008). Inflammation-Induced Increase in Evoked Calcium Transients in Subpopulations of Rat DRG Neurons. *Neuroscience*, 153(1), 279–288.
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(6), 1–15.
- Malagelada, C., Xifró, X., Badiola, N., Sabrià, J., & Rodríguez-Álvarez, J. (2004). Histamine H₂-receptor antagonist ranitidine protects against neural death induced by oxygen-glucose deprivation. *Stroke*, 35(10), 2396–2401.
- Mazzone, S. B., & Udem, B. J. (2016). Vagal afferent innervation of the airways in health and disease. *Physiol Rev*, 96, 975–1024.
- McGovern, A. E., Driessen, A. K., Simmons, D. G., Powell, J., Davis-Poynter, N., Farrell, M. J., & Mazzone, S. B. (2015). Distinct brainstem and forebrain circuits receiving tracheal sensory neuron inputs revealed using a novel conditional anterograde transsynaptic viral tracing system. *Journal of Neuroscience*, 35(18), 7041–7055.
- Mei, N., Condamin, M., & Boyer, A. (1980). Cell and tissue research the composition of the vagus nerve of the cat. *Cell Tissue Res*, 209, 423–431.
- Miller, R. J., Jung, H., Bhangoo, S. K., & White, F. A. (2009). Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. *Handb Exp Pharmacol*, 194, 417–449.
- Möbius, H., & Welkoborsky, H. J. (2022). Vagus nerve stimulation for conservative therapy-refractive epilepsy and depression. *Laryngorhinootologie*, 101(S 01), S114–S143.
- Moody, S. A., & LaMantia, A. S. (2015). Transcriptional regulation of cranial sensory placode development. *Curr Top Dev Biol*, 111, 301–350.
- Moriguchi, T., & Takai, J. (2020). Histamine and histidine decarboxylase: immunomodulatory functions and regulatory mechanisms. *Genes Cells*, 25(7), 443–449.
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, 14(10), 667–685.
- Nagy, V., Cole, T., Van Campenhout, C., Khoung, T. M., Leung, C., Vermeiren, S., Novatchkova, M., Wenzel, D., Cikes, D., Polyansky, A. A., Kozieradzki, I., Meixner, A., Bellefroid, E. J., Neely, G. G., & Penninger, J. M. (2015). The evolutionarily conserved transcription factor PRDM12 controls sensory neuron development and pain perception. *Cell Cycle*, 14(12), 1799–1808.
- Neuhuber, W. L., & Berthoud, H. R. (2021). Functional anatomy of the vagus system – Emphasis on the somato-visceral interface. *Auton Neurosci*, 236, 102887.

- Nicolson, T. A., Bevan, S., & Richards, C. D. (2002). Characterisation of the calcium responses to histamine in capsaicin-sensitive and capsaicin-insensitive sensory neurones. *Neuroscience*, 110(2), 329–338.
- Obara, I., Telezhkin, V., Alrashdi, I., & Chazot, P. L. (2019). Histamine, histamine receptors, and neuropathic pain relief. *Br J Pharmacol*, 177, 580–599.
- Ottaviani, M. M., & Macefield, V. G. (2022). Structure and functions of the vagus nerve in mammals. *Compr Physiol*, 12(4), 3989–4037.
- Peters, J. H., Ritter, R. C., & Simasko, S. M. (2006). Leptin and CCK selectively activate vagal afferent neurons innervating the stomach and duodenum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(6), 1544–1549.
- Powley, T. L., & Phillips, R. J. (2011). Vagal intramuscular array afferents form complexes with interstitial cells of Cajal in gastrointestinal smooth muscle: analogues of muscle spindle organs? *Neuroscience*, 186, 188–200.
- Prescott, S. L., & Liberles, S. D. (2022). Internal senses of the vagus nerve. *Neuron*, 110(4), 579–599.
- Rogers, R. C., & Hermann, G. E. (2008). Mechanisms of action of CCK to activate central vagal afferent terminals. *Peptides*, 29(10), 1716–1725.
- Ruffoli, R., Giorgi, F. S., Pizzanelli, C., Murri, L., Paparelli, A., & Fornai, F. (2011). The chemical neuroanatomy of vagus nerve stimulation. *J Chem Neuroanat*, 42(4), 288–296.
- Shen, Y., Hu, W. wei, Fan, Y. yin, Dai, H. bing, Fu, Q. li, Wei, E. Q., Luo, J. hong, & Chen, Z. (2007). Carnosine protects against NMDA-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells through carnosine-histidine-histamine pathway and H1/H3 receptors. *Biochem Pharmacol*, 73(5), 709–717.
- Sousa, L. O., & Lindsey, C. J. (2009). Discharge rate profiles of paratrigeminal nucleus neurons throughout a pressor event in non-anaesthetized rats. *Auton Neurosci*, 147(1–2), 20–26.
- Steinberg, B. E., Silverman, H. A., Robbiati, S., Gunasekaran, M. K., Tsaava, T., Battinelli, E., Stiegler, A., Bouton, C. E., Chavan, S. S., Tracey, K. J., & Huerta, P. T. (2016). Cytokine-specific neurograms in the sensory vagus nerve. *Bioelectron Med*, 3, 7–17.
- Su, X. Y., Chen, M., Yuan, Y., Li, Y., Guo, S. S., Luo, H. Q., Huang, C., Sun, W., Li, Y., Zhu, M. X., Liu, M. G., Hu, J., & Xu, T. Le. (2019). Central processing of itch in the midbrain reward center. *Neuron*, 102(4), 858–872.
- Thayer, J. F., Loerbroks, A., & Sternberg, E. M. (2011). Inflammation and cardiorespiratory control: the role of the vagus nerve. *Respir Physiol Neurobiol*, 178(3), 387–394.

- Tiligada, E., & Ennis, M. (2020). Histamine pharmacology: from Sir Henry Dale to the 21st century. *British Journal of Pharmacology*, 177, 469–489.
- Undem, B. J., & Weinreich, D. (1993). Electrophysiological properties and chemosensitivity of guinea pig nodose ganglion neurons in vitro. *J Auton Nerv Syst*, 44(1), 17–34.
- Waise, T. M. Z., Dranse, H. J., & Lam, T. K. T. (2018). The metabolic role of vagal afferent innervation. *Nat Rev Gastroenterol and Hepatol*, 15(10), 625–636.
- Wang, J., Kollarik, M., Ru, F., Sun, H., McNeil, B., Dong, X., Stephens, G., Korolevich, S., Brohawn, P., Kolbeck, R., & Undem, B. (2017). Distinct and common expression of receptors for inflammatory mediators in vagal nodose versus jugular capsaicin-sensitive/TRPV1-positive neurons detected by low input RNA sequencing. *PLOS ONE*, 12(10), e0185985.
- Wang, N., Ma, J., Liu, J., Wang, J., Liu, C., Wang, H., Liu, Y., Yan, H., & Jiang, S. (2020). Histamine H3 receptor antagonist enhances neurogenesis and improves chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive impairments. *Front Pharmacol*, 10, 3389.
- Watkins, L. R., Goehler, L. E., Relton, J. K., Tartaglia, N., Silbert, L., Martin, D., & Maier, S. F. (1995). Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett*, 183(1–2), 27–31.
- Williams, E. K. K., Chang, R. B. B., Storchlic, D. E. E., Umans, B. D. D., Lowell, B. B. B., & Liberles, S. D. D. (2016). Sensory neurons that detect stretch and nutrients in the digestive system. *Cell*, 166(1), 209–221.
- Wolak, M., Bojanowska, E., Staszewska, T., Ciosek, J., Juszczak, M., & Drobnik, J. (2017). The role of histamine in the regulation of the viability, proliferation and transforming growth factor β 1 secretion of rat wound fibroblasts. *Pharmacol Rep*, 69(2), 314–321.
- Wouters, M. M., Balemans, D., Van Wanrooy, S., Dooley, J., Cibert-Goton, V., Alpizar, Y. A., Valdez-Morales, E. E., Nasser, Y., Van Veldhoven, P. P., Vanbrabant, W., Van Der Merwe, S., Mols, R., Ghesquière, B., Cirillo, C., Kortekaas, I., Carmeliet, P., Peetermans, W. E., Vermeire, S., Rutgeerts, P., ... Boeckxstaens, G. E. (2016). Histamine receptor H1-mediated sensitization of TRPV1 mediates visceral hypersensitivity and symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 150(4), 875–887.
- Yuan, H., & Silberstein, S. D. (2016a). Vagus nerve and vagus nerve stimulation, a comprehensive review: part I. *Headache*, 56(1), 71–78.
- Yuan, H., & Silberstein, S. D. (2016b). Vagus nerve and vagus nerve stimulation, a comprehensive review: part III. *Headache*, 56(3), 479–490.

- Zanos, T. P. (2019). Recording and decoding of vagal neural signals related to changes in physiological parameters and biomarkers of disease. *Cold Spring Harbor Perspect Med*, 9(12), a034157.
- Zhou, Y., Sun, B., Li, Q., Luo, P., Dong, L., & Rong, W. (2011). Sensitivity of bronchopulmonary receptors to cold and heat mediated by transient receptor potential cation channel subtypes in an ex vivo rat lung preparation. *Respir Physiol Neurobiol*, 177(3), 327–332.