



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Evaluación de la expresión y función de receptores
a histamina y a dopamina en astrocitos corticales
de la rata en cultivo primario**

T E S I S

Que presenta

Q. B. P. Carlos Alberto Almazán Gregorio

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Neurobiología Celular y Molecular

Director de tesis

Dr. José Antonio Arias Montaña

Ciudad de México

Agosto de 2022

Este proyecto fue realizado en el Laboratorio 37 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. José Antonio Arias Montaña, al cual agradezco por haberme aceptado en su grupo de trabajo y estar siempre dispuesto a resolver las dudas surgidas durante la realización de este proyecto, así como la asesoría de la Dra. Penélope Aguilera Hernández y el Dr. Benjamín Florán Garduño, a los cuales agradezco sus valiosos comentarios y sugerencias en la elaboración de este proyecto.

Se extiende un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para la realización de estudios de Maestría en Ciencias en la especialidad Neurobiología Celular y Molecular a través del identificador de becario No. CVU 1080756.



*Dedicado a todos los animales usados para fines de investigación,
sin ellos el conocimiento científico no progresaría,
un merecido y debido reconocimiento.*

Índice

I.	Introducción	1
1.	Astrocitos	1
2.	Sistema histaminérgico del SNC.....	3
	Receptores a histamina en el SNC	4
	Receptores a histamina en los astrocitos	6
	Receptor a histamina H ₁ en los astrocitos	6
	Receptor a histamina H ₂ en los astrocitos	7
	Receptor a histamina H ₃ en los astrocitos	8
3.	Sistema dopaminérgico del SNC	8
	Receptores a dopamina en el SNC	9
	Receptores tipo D ₁	10
	Receptores tipo D ₂	11
	Receptores a dopamina en los astrocitos.....	12
	Receptor a dopamina tipo D ₁ en los astrocitos.....	13
	Receptor a dopamina tipo D ₂ en los astrocitos.....	13
4.	Interacciones funcionales entre los receptores a HA y a DA.....	14
II.	Justificación	16
III.	Objetivos	17
IV.	Materiales y métodos	18
	Cultivo primario de astrocitos corticales de la rata.....	18
	Ensayo de unión de radioligando en membranas de astrocitos corticales	19
	Determinación de la formación de AMPc en astrocitos corticales de la rata.....	20
	Análisis estadístico.....	21
V.	Resultados	22
	Expresión de receptores a DA y HA en astrocitos corticales.....	22
	Ensayos de formación e inhibición de AMPc en los astrocitos corticales.....	22

Antagonismo de los D ₁ Rs por SCH-23390 en la formación de AMPc estimulado por DA o el agonista SKF-881297.....	25
Efecto del bloqueo de los adrenoceptores β por alprenolol en la formación de AMPc inducida por DA	26
Efecto de la histamina en la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D ₁ Rs.....	28
Antagonismo de los receptores H ₁ , H ₂ y H ₃ en el efecto aditivo de la HA en la acumulación de AMPc inducida por los D ₁ Rs.....	30
Efecto aditivo de agonistas de los D ₁ Rs y H ₂ Rs en la acumulación de AMPc.....	31
VI. Discusión.....	33
Cultivo primario de astrocitos cerebro-corticales	33
Los astrocitos corticales de la rata expresan receptores a DA y a HA.....	34
La activación de los D ₁ Rs induce acumulación de AMPc.....	35
Los H ₂ Rs son responsables del efecto aditivo de la HA en la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D ₁ Rs	37
VII. Conclusiones	39
VIII. Perspectivas.....	40
IX. Bibliografía	40

Índice de figuras

Figura 1. Astrocitos de la corteza cerebral.....	2
Figura 2. Metabolismo de la histamina.....	3
Figura 3. Expresión de los genes de los receptores a histamina por astrocitos primarios en cultivo.....	7
Figura 4. Sistema dopaminérgico.....	9
Figura 5. Distribución de la expresión de receptores a dopamina en el cerebro.....	12
Figura 6. Expresión de receptores a histamina y a dopamina en membrana de astrocitos corticales y corteza cerebral de la rata	23
Figura 7. Funcionalidad de los receptores a histamina y a dopamina expresados en astrocitos corticales en cultivo	24
Figura 8. Curso temporal de la acumulación de AMPc en respuesta al agonista selectivo de los D ₁ Rs SKF-81297 y a dopamina en astrocitos corticales	25
Figura 9. Antagonismo por el SCH-23390 de la acumulación de AMPc inducida por SKF-81297 o dopamina en astrocitos corticales.....	26
Figura 10. Bloqueo por alprenolol y SCH-23390 de la acumulación de AMPc estimulada por DA en astrocitos corticales en cultivo primario	27
Figura 11. Efecto de la histamina en la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D ₁ Rs	29
Figura 12. Efecto de los antagonistas de los receptores H ₁ , H ₂ y H ₃ en el efecto aditivo de la histamina en la acumulación de AMPc inducida por dopamina....	30
Figura 13. Efecto aditivo de agonistas selectivos de los receptores a histamina H ₂ y a dopamina D ₁ en la acumulación de AMPc	31
Figura 14. Astrocitos y células de la microglía y precursoras de oligodendrocitos en cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales	34

Índice de tablas

Tabla 1. Características moleculares y funcionales de los receptores a histamina expresados en el SNC.....	4
Tabla 2. Características moleculares y funcionales de los receptores a dopamina....	10
Tabla 3. Radioligandos y ligandos selectivos no marcados utilizados en los ensayos de unión.....	19
Tabla 4. Inhibición por alprenolol y SCH-23390 de la acumulación de AMPc inducida por DA.....	28
Tabla 5. Efecto de la histamina en la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D ₁ Rs	29
Tabla 6. Efecto aditivo de agonistas selectivos de los receptores a histamina H ₂ y a dopamina D ₁ en la acumulación de AMPc.	32

Abreviaturas

[Ca²⁺]_i	concentración intracelular de calcio
AADC	descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
ACs	adenilil ciclasas
Akt (PKB)	cinasa B de proteínas
ALDH	aldehído deshidrogenasa
AMPc	3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
COMT	catecol-O-metiltransferasa
CREB	proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
D₁R	receptor a dopamina D ₁
D₂R	receptor a dopamina D ₂
DA	dopamina
DAG	diacilglicerol
ERK-1/2	quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2
FGF-2	factor de crecimiento de fibroblastos 2
FSK	forskolina
GABA	ácido γ -aminobutírico
GDNF	factor neurotrófico derivado de células gliales
GLT-1	transportador de glutamato 1
GLUT-1	transportador de glucosa 1
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G (<i>G protein-coupled receptors</i>)
GSK3	3-cinasa de la sintasa de glucógeno
H₁R	receptor a histamina H ₁
H₂R	receptor a histamina H ₂
H₃R	receptor a histamina H ₃
HA	histamina
HBSS	solución de Hank
HVA	ácido homovanílico
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IFN-γ	interferón γ
IL-1β	interleucina 1 β

IL-6	interleucina 6
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IP₃R	receptor a IP ₃
JNK	cinasa N-terminal c-Jun
L-DOPA	L-hidroxifenilalanina
MAO	monoamino oxidasa
MAPKs	cinasas de proteínas activadas por mitógenos
MSNs	neuronas espinosas medianas
Nac	núcleo accumbens
NF-κB	factor nuclear kappa B
NGF	factor de crecimiento nervioso
NT-3	neurotrofina 3
PBS	solución salina amortiguada con fosfatos
PIP₂	4,5-bifosfato de fosfatidilinositol
PKA	cinasa A de proteínas
PKC	cinasa C de proteínas
PLC	fosfolipasa C
SNC	sistema nervioso central
SNr	sustancia negra <i>pars reticulata</i>
STAT3	transductor de señal y activador de transcripción 3
TH	hidroxilasa de tirosina
TM	núcleo tuberomamilar
TNF-α	factor de necrosis tumoral α
VMAT2	transportador vesicular de monoaminas tipo 2

Resumen

En astrocitos corticales se han identificado receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que responden a histamina (HA) y a dopamina (DA). En células neuronales, en particular en las neuronas espinosas medianas del neostriado, los receptores a HA y DA establecen interacciones funcionales. En consecuencia, el objetivo de este trabajo es evaluar la expresión y función de los receptores a HA y a DA en astrocitos de la corteza cerebral de la rata.

Se determinó la expresión de los receptores a HA (H_1 y H_3) y a DA (D_1 y D_2) en astrocitos corticales en cultivo primario con ensayos de unión de radioligando, y se evaluó su funcionalidad y posible interacción mediante ensayos de acumulación del segundo mensajero AMPc, en presencia de agonistas y antagonistas selectivos.

Las membranas de los astrocitos corticales en cultivo primario mostraron presencia de receptores a DA D_1 (D_1 Rs; 8.85 ± 0.90 fmol/mg de proteína) y D_2 (D_2 Rs; 4.07 ± 1.24 fmol/mg de proteína), así como a HA H_1 (H_1 Rs; 5.32 ± 0.84 fmol/mg de proteína), sin evidencia de la presencia de receptores H_3 (H_3 Rs). La activación de los D_1 Rs por el agonista selectivo SKF-81297 ($10 \mu\text{M}$) indujo un aumento significativo en la acumulación de AMPc, con un pico a los 5 min (~ 10 veces el valor basal), observándose posteriormente una meseta hasta los 30 min, el tiempo máximo evaluado, efecto mimetizado por el agonista endógeno DA. La activación de los D_1 Rs con SKF-81297 (5 min) en presencia de HA ($30 \mu\text{M}$) mostró un efecto aditivo en la acumulación de AMPc. La tiotidina ($10 \mu\text{M}$; antagonista selectivo de los receptores a HA H_2 , H_2 Rs) previno el efecto de la HA, el cual fue mimetizado por la amfetamina ($10 \mu\text{M}$), un agonista selectivo de los H_2 Rs.

Estos resultados muestran que: 1) Los astrocitos cerebro-corticales de la rata en cultivo expresan receptores a HA H_1 y H_2 , así como receptores a DA D_2 y D_1 , estos últimos funcionales; 2) La activación del D_1 R experimenta desensibilización homóloga rápida; y 3) Existe un efecto aditivo en la formación de AMPc entre la DA y la HA debido a la activación de los D_1 Rs y los H_2 Rs.

Abstract

Cortical astrocytes express G-protein-coupled receptors (GPCRs) that respond to histamine (HA) and dopamine (DA). In neuronal cells, particularly in the striatal medium spiny neurons, receptors to HA and DA establish functional interactions. Consequently, the aim of this work is to evaluate the expression and function of HA and DA receptors in astrocytes of the rat cerebral cortex.

In cortical astrocytes in primary culture, the expression of receptors for HA (H₁ and H₃) and DA (D₁ and D₂) was determined with radioligand binding assays, and their functionality and possible interactions were evaluated by the accumulation of the second messenger cAMP, in presence of selective agonists and antagonists.

Membranes of cortical astrocytes expressed receptors to DA D₁ (D₁Rs; 8.85 ± 0.90 fmol/mg protein) and D₂ (D₂Rs; 4.07 ± 1.24 fmol/mg protein), as well as receptors to HA H₁ (H₁Rs; 5.32 ± 0.84 fmol/mg protein), without evidence for the presence of H₃ receptors (H₃Rs). D₁R activation by the selective agonist SKF-81297 (10 μ M) induced a significant increase in cAMP accumulation, with a peak at 5 min (~10 times the baseline value), yielding afterwards a plateau up to 30 min, the maximum time evaluated, and the effect was mimicked by the endogenous agonist DA. HA (30 M) also stimulated cAMP accumulation and the effect was additive with that of D₁R activation by SKF-81297 (5 min). The HA effect was mimicked by the selective H₂R agonist amthamine (10 μ M) and prevented by the selective H₂R antagonist tiotidine (10 μ M).

These results show that: 1) Rat cerebro-cortical astrocytes express H₁Rs and H₂Rs, as well as D₂Rs and D₁Rs, the latter being functional; 2) D₁Rs experience rapid homologous desensitization; and 3) DA and HA exert an additive effect on cAMP formation mediated by D₁R and H₂R activation.

I. Introducción

1. Astrocitos

Los astrocitos (astroglía) son células de origen ectodérmico en forma de estrella que representan ~90% del número total de células en el sistema nervioso central (SNC) del humano (Herculano-Houzel, 2014). Los astrocitos del SNC se clasifican de acuerdo a criterios morfológicos en dos tipos principales: a) protoplasmáticos, localizados de manera predominante en la sustancia gris (neuropilo) y que poseen prolongaciones radiales ramificadas que se extienden para entrar en contacto con miles de sinapsis; y b) fibrosos, localizados en la sustancia blanca con procesos largos y delgados con ramificaciones menores cuyos extremos entran en contacto con los nodos de Ranvier (Sofroniew y Vinters, 2010). En el neuropilo de la corteza cerebral se han descrito, además de los astrocitos protoplasmáticos (láminas III y IV), astrocitos que difieren estructural y anatómicamente (figura 1): 1) astrocitos interlaminares, localizados en proximidad a la superficie cortical (láminas I) que originan prolongaciones que proyectan a la lámina IV; y 2) astrocitos con proyecciones largas con varicosidades no ramificadas (láminas V y VI) (Verkhratsky et al., 2016; Vasile et al., 2017).

Durante el desarrollo cerebral los astrocitos participan en la neurogénesis brindando apoyo trófico neuronal facilitando la formación y mantenimiento de vías neuronales (sinaptogénesis) (Christopherson et al., 2005, Ricci et al., 2009) y la maduración de la actividad sináptica (Pfrieger y Barres, 1997). En el cerebro maduro los astrocitos colaboran en la homeostasis cerebral al participar en la formación de la barrera hemato-encefálica, así como en el control del flujo sanguíneo para la captura de glucosa y su almacenamiento en forma de glucógeno (Shulman et al., 2001; Dienel y Cruz, 2015). Además, los astrocitos participan como componentes de las sinapsis tripartitas donde pueden detectar, responder y modular la señalización neuronal mediante la captura de neurotransmisores y la liberación de gliotransmisores como trifosfato de adenosina (ATP), glutamato y D-serina (Araque et al., 1999; Perdan et al., 2009; Hamilton y Attwell, 2010; Wahis et al., 2021).

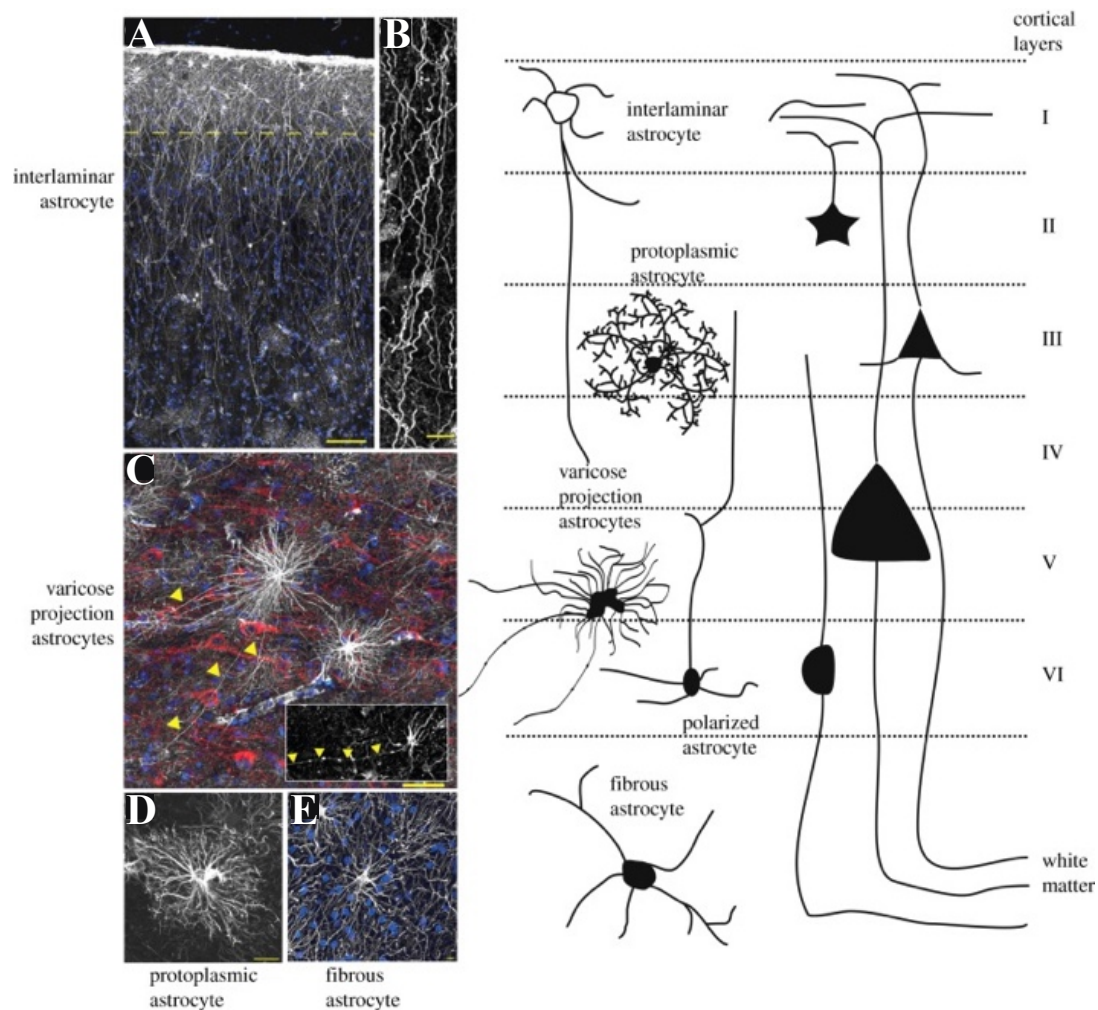


Figura 1. Astrocitos de la corteza cerebral. A-E. Inmunomarcaje con un anticuerpo anti-GFAP (blanco) de los astrocitos, y de los núcleos celulares con DAPI (azul). **A.** Astrocitos interlaminares localizados en la lámina I (la línea discontinua indica el límite de la lámina I). **B.** Ampliación de las proyecciones de los astrocitos interlaminares. **C.** Astrocitos de proyección varicosa representativos (láminas V y VI). Recuadro: vista ampliada de las varicosidades, las puntas de flecha amarillas indican las proyecciones varicosas. **D.** Astrocito protoplásmico con prolongaciones radiales ramificada (láminas III y IV). **E.** Astrocito fibroso, localizado en la sustancia blanca. (Verkhatsky et al., 2016).

Mediante la expresión de receptores de una sola cadena polipeptídica de siete hélices transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs), los astrocitos responden a diversos neurotransmisores (glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA), adrenalina/noradrenalina, purinas, serotonina, acetilcolina, neuropéptidos) entre los que se encuentran las aminas biogénicas histamina (HA) y dopamina (DA) (Porter y McCarthy 1997; Carriba et al., 2012; Kofuji y Araque 2021). La activación de los GPCRs induce diversas vías de señalización intracelular en los astrocitos (Jurič et al., 2016; Corkrum y Araque, 2021).

2. Sistema histaminérgico del SNC

La HA es sintetizada por neuronas localizadas en el núcleo tuberomamilar (TM) del hipotálamo posterior, con ~64,000 de ellas en el humano (Panula y Costa, 1984; Bayliss et al., 1990), y que envían sus axones a diversas regiones del encéfalo, en particular a la corteza cerebral, el hipotálamo, los ganglios basales y la amígdala (Watanabe et al., 1984; Benarroch, 2010), donde regulan la excitabilidad neuronal, la neurotransmisión (Haas et al., 2008) y la plasticidad sináptica (Han et al., 2020).

La HA está compuesta por un anillo imidazólico y un grupo etilamino como cadena lateral; es sintetizada por descarboxilación del aminoácido L-histidina por la enzima descarboxilasa de L-histidina, utilizando 5'-fosfato de piridoxal -forma bioactiva de la vitamina B6- como cofactor (Huang et al., 2018; Moriguchi y Takai, 2020). La HA es almacenada en vesículas sinápticas y es liberada por exocitosis (Puttonen et al., 2017). El catabolismo de la HA implica su inactivación por la enzima N-metiltransferasa de histamina, que transfiere un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina a la HA, produciendo *tele-N*-metilhistamina y S-adenosil-L-homocisteína (Yoshikawa et al., 2019). La figura 2 ilustra la síntesis y metabolismo de la HA en el SNC.

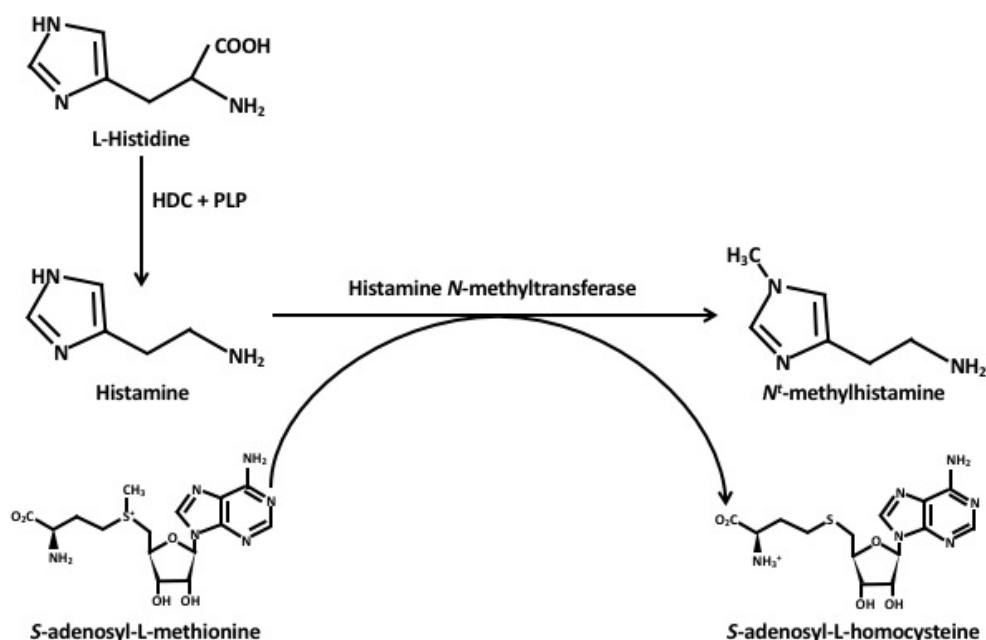


Figura 2. Metabolismo de la histamina. Representación de la vía de formación de la histamina en el SNC a partir de la descarboxilación de la L-histidina por la enzima descarboxilasa de L-histidina (HDC) y su catabolismo por la enzima metil-transferasa de histamina (Modificado de Yoshikawa et al., 2019).

Receptores a histamina en el SNC

Los efectos de la HA en los mamíferos se deben a la activación de cuatro GPCRs (H₁-H₄; Powell, 2007), los cuales difieren no solo en su estructura molecular y localización, sino también en su respuesta celular y su señalización intracelular (Leurs et al., 1995; Hill y Baker, 2004; Bongers et al., 2007; Panula et al., 2015; Hu y Chen, 2017). En el SNC la HA actúa sobre tres receptores (H₁, H₂ y H₃), cada uno con determinadas características moleculares y funcionales (Tabla 1; Alexander et al., 2017).

Tabla 1. Características moleculares y funcionales de los receptores a histamina expresados en el SNC.

	Receptores		
	H ₁ R	H ₂ R	H ₃ R
Ubicación cromosomal (humano)	3p25 (ID: 3269)	5q35.2 (ID: 3274)	20q13.33 (ID: 11255)
Amino ácidos	487 (56 kDa)	359 (40 kDa)	445 (49.4 kDa)
Proteína G	G $\alpha_{q/11}$	G α_s	G $\alpha_{i/o}$
Respuesta celular	↑ PLC: ↑ IP ₃ , ↑ [Ca ²⁺] _i , ↑ DAG (↑ PKC)	↑ AC, ↑ AMPc, ↑ PKA	↓ AC, ↓ AMPc, ↑ [Ca ²⁺] _i , ↑ MAPKs, ↑ Akt/GSK3
Agonistas selectivos	2-tiazoliletilamina Histaprodifeno	Dimaprit Antamina	R- α -metilhistamina Immepip Immetridina
Antagonistas	Pirilamina (mepiramina)	Ranitidina Zolantidina	Tioperamida Clobenpropit Ciproxifan
Afinidad por la histamina	Micromolar (μ M)	Micromolar (μ M)	Nanomolar (nM)
Radioligandos	[³ H]-pirilamina [³ H]-mepiramina	[³ H]-tiodidina [¹²⁵ I]-yodoaminopotentidina	[³ H]-N- α -metilhistamina [³ H]-R- α -metilhistamina [¹²⁵ I]-yodoproxifan

AC, adenilil ciclasa; AMPc, 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina; DAG, diacilglicerol; IP₃, 1,4,5-trifosfato de inositol; PKA, cinasa A de proteínas; PKC, cinasa C de proteínas; PLC, fosfolipasa C; ↑, activación o formación; ↓, inhibición o reducción. Elaborada con base en Hill et al., 1997; Haas et al 2008; Shahid et al., 2009; Leurs et al., 2012; y Panula et al., 2015.

El H₁R contiene en su estructura una tercera asa intracelular grande (208 aa), un extremo carboxilo (C-terminal) intracelular corto (17 aa) y se acopla a proteínas G $\alpha_{q/11}$, conduciendo a la activación de la fosfolipasa C (PLC), que cataliza la hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) a 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG), ambos con función de segundos mensajeros. Al unirse a receptores a IP₃ (IP₃Rs), ubicados en la membrana del retículo endoplásmico, el IP₃ induce la liberación del Ca²⁺ almacenado, mientras que el DAG activa, por sí mismo o en conjunto con iones Ca²⁺, a la cinasa C de proteínas (PKC), que fosforila residuos de Serina y Treonina de un número amplio de proteínas (Leurs et al., 1995; Panula et al., 2015).

El H₂R, expresado post-sinápticamente en el SNC, tiene una tercera asa intracelular corta (30 aa), un C-terminal largo (70 aa), y se acopla a proteínas G α_s , por lo que su activación por la HA estimula a las adenilil ciclasas (ACs) y la síntesis de AMPc, un segundo mensajero que activa a la cinasa A de proteínas (PKA) (Hill y Baker, 2004; Hu y Chen, 2017), misma que, entre otros efectos, estimula la función de la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), un regulador clave en la fisiología y plasticidad neuronales (Widnell et al., 1996).

El H₃R presenta múltiples isoformas derivado del empalme alternativo de dos o tres intrones; que varían principalmente en la longitud de la tercera asa intracelular y una expresión diferencial en el SNC. La isoforma más abundante (445 aa) y las demás isoformas están funcionalmente acopladas a proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Drutel et al., 2001) cuyas subunidades $\alpha_{i/o}$ inhiben a las ACs, reduciendo la síntesis de AMPc (Moreno-Delgado et al., 2006). Por otra parte, los complejos G $\beta\gamma$ liberados tras la activación de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ inhiben canales de Ca²⁺ activados por voltaje Cav₂ (N y P/Q) (Zamponi et al., 2013) y activan las vías de señalización de la cinasa B de proteínas (Akt ó PKB), la 3-cinasa de la sintasa de glucógeno (GSK3), y de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos, que comprende a las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) y las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK-1/2) (Bongers et al., 2007).

Receptores a histamina en los astrocitos

La expresión de receptores H₁, H₂ y H₃ se ha identificado en astrocitos de diferentes regiones del SNC de la rata (corteza cerebral, hipocampo, diencéfalo, cerebelo, tallo cerebral y médula espinal) (Hösli et al., 1984; Carman-Krzan et al., 2000; Mele y Jurič 2013). En el cerebro, la expresión del H₃R por los astrocitos está restringida a determinadas regiones (figura 3; Kárpáti et al., 2018). En cultivos enriquecidos de astrocitos corticales la densidad del H₃R es baja (5.63 ± 0.21 fmol/mg de proteína) en comparación con la expresión del H₁R (281 ± 53 fmol/mg proteína) y del H₂R (59 ± 5 fmol/mg proteína) (Lipnik-Štangelj y Čarman-Kržan, 2004; Jurič et al., 2011; Mele y Jurič 2013; Xu, et al., 2018).

Receptor a histamina H₁ en los astrocitos

La activación por la HA del H₁R en los astrocitos induce procesos mediados por el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (Kárpáti et al., 2018) que comprenden: neuroprotección contra la excitotoxicidad mediante la capturar de glutamato por regulación positiva de la expresión del transportador de glutamato 1 (GLT-1) (Fang et al., 2014); la homeostasis de la glucosa induciendo la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT-1) (Parra-Abarca et al., 2019) y la estimulación de la glucogenólisis (Arbonés et al., 1990); la síntesis y liberación de factores neutróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y la neurotrofina-3 (NT-3) que contribuyen a la sobrevivencia celular (Lipnik-Stangelj et al., 1998; Lipnik-Stangelj y Carman-Krzan, 2004; Jurič et al., 2011), y la regulación de la respuesta inmune de los astrocitos mediante el aumento de la expresión de las interleucinas 6 (IL-6) y 1 β (IL-1 β) (Ales y Lipnik-Stangelj, 2008; Lipnik-Stangelj y Carman-Krzan, 2006).

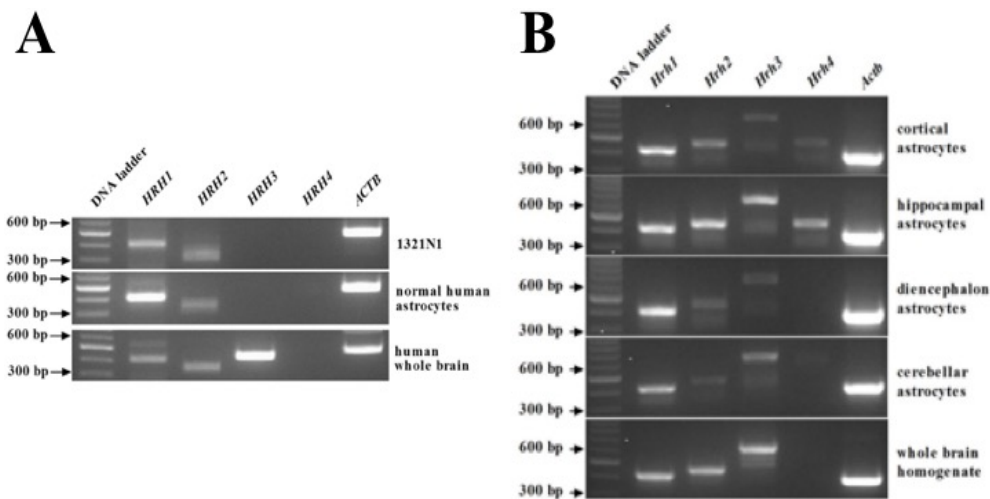


Figura 3. Expresión de los genes de los receptores a histamina por astrocitos primarios en cultivo. A. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN complementario (ADNc) de los receptores a partir de ARN total de células de astrocitoma humano 1321N1, astrocitos humanos en cultivo primario, y cerebro humano completo. B. Amplificación por PCR del ADNc de los receptores a partir de ARN total de astrocitos en cultivo de varias regiones cerebrales y del cerebro completo de la rata. La expresión refleja la concentración del ARNm de cada receptor a partir de la amplificación del ADNc. Hrh1-Hrh4, genes de los receptores a histamina H₁-H₄; ACTB o Actb, gen de la β-actina (Kárpáti et al., 2018).

En células de astrocitoma humano U373-MG, se ha reportado que la activación del H₁R estimula la formación de IP₃, la movilización de Ca²⁺ y la liberación de GABA presumiblemente por reversión del transportador de GABA provocada la activación del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (Soria-Jasso y Arias-Montaña, 1996), mecanismo que sugiere una regulación de la función neuronal por los astrocitos.

Receptor a histamina H₂ en los astrocitos

La activación del H₂R por HA induce un aumento en la formación de AMPc y la fosforilación de CREB mediada por la vía de señalización AMPc/PKA (Hu y Chen, 2017), vía que participa en la regulación de las funciones astrocíticas, entre las que se encuentra la liberación de gliotransmisores, por ejemplo glutamato (Kárpáti et al., 2018); la hidrólisis del glucógeno para el suministro de energía al SNC (Arbonés et al., 1990), y la estimulación de la expresión y síntesis de NT-3, importante para la regulación de la actividad neurotrófica astrocítica (Jurič et al., 2011).

Receptor a histamina H₃ en los astrocitos

En los astrocitos, la activación del H₃R por HA además de reducir la formación de AMPc, regula la expresión del GLUT-1 mediante la activación de la vía PLC/PKC/MAPK (Parra-Abarca et al., 2019); y de manera semejante a los H₁Rs y H₂Rs, mediante la vía PLC/PKC los H₃Rs tienen efectos neuroprotectores debidos a la síntesis y liberación de NT-3 (Jurič et al., 2011).

3. Sistema dopaminérgico del SNC

Los axones de las neuronas dopaminérgicas conforman cuatro vías principales: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal y tuberoinfundibular (figura 4) (McHugh et al., 2015). La DA es sintetizada en el citoplasma neuronal a partir del amino ácido no esencial L-tirosina mediante la enzima hidroxilasa de tirosina (TH) utilizando tetrahidrobiopterina, oxígeno (O₂) y ion ferroso (Fe²⁺) para catalizar la adición de un grupo hidroxilo a la posición meta de la L-tirosina formando así L-hidroxifenilalanina (L-DOPA), misma que es descarboxilada por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) para dar origen al transmisor (Smythies, 2005; Klein et al., 2019).

La DA es almacenada en vesículas sinápticas por el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2) y es liberada por exocitosis (Eiden y Weihe, 2011). El metabolismo e inactivación de la DA implica la acción secuencial de las enzimas monoamino oxidasa (MAO), catecol-O-metiltransferasa (COMT) y aldehído deshidrogenasa (ALDH), generando como producto final el ácido homovanílico (HVA), que carece de actividad biológica (Eisenhofer y Goldstein, 2004).

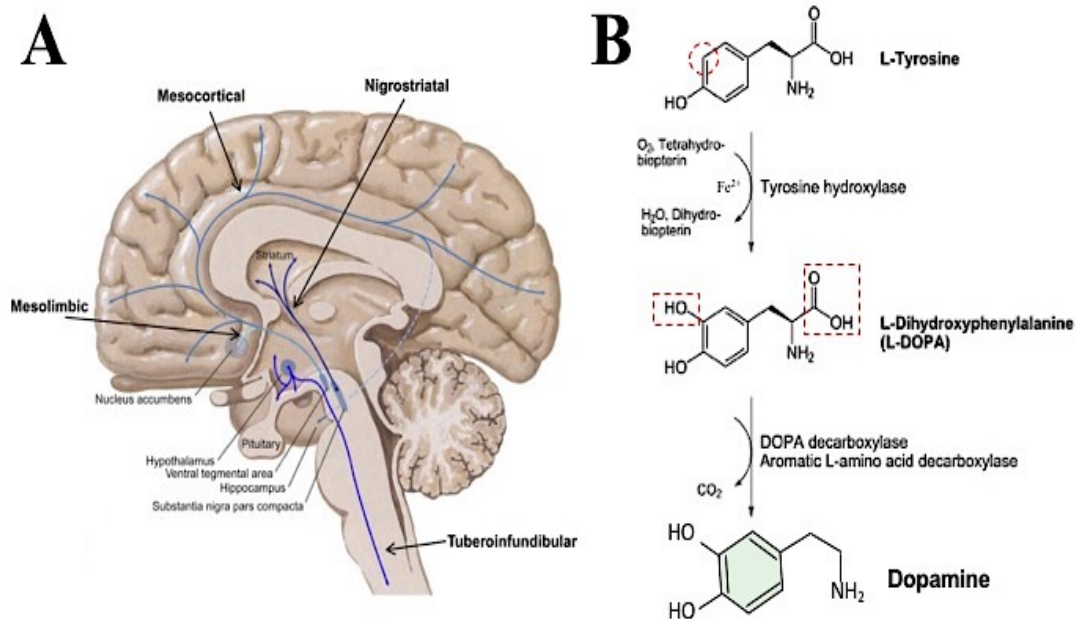


Figura 4. Sistema dopaminérgico. A. Esquema de las principales vías dopaminérgicas del sistema nervioso central (SNC). **B.** Representación de la vía de formación de la dopamina en el SNC a partir de la hidroxilación del amino ácido L-tirosina por la enzima hidroxilasa de L-tirosina formando L-hidroxfenilalanina (L-DOPA) que es descarboxilada para generar a la dopamina (DA) (Modificado de McHugh y Buckley, 2015).

Receptores a dopamina en el SNC

La DA ejerce su función mediante la activación de cinco subtipos distintos de GPCRs, clasificados en dos familias que comparten un alto nivel de homología de sus dominios transmembranales, y que se diferencian en su estructura, señalización y propiedades farmacológicas (tabla 2): los tipo D_1 (subtipos D_1 y D_5), acoplados a proteínas $G\alpha_s$, que aumentan la síntesis de AMPc y la activación de la PKA, y los tipo D_2 (subtipos D_2 , D_3 y D_4), acoplados a proteínas $G\alpha_{i/o}$ y que inhiben la producción de AMPc (Missale et al., 1998; Beaulieu y Gainetdinov, 2011; tabla 2).

Tabla 2. Características moleculares y funcionales de los receptores a dopamina.

Familia	Tipo D ₁		Tipo D ₂		
	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
Receptores					
Ubicación cromosomal (humano)	5q35.1	4p16.1	11q23.1	3q13.3	11p15.5
Amino ácidos	446	477	D _{2S} : 414 D _{2L} : 443	400	387
Proteína G	G α_s	G α_s	G $\alpha_{i/o}$	G $\alpha_{i/o}$	G $\alpha_{i/o}$
Respuesta celular	↑ AC, ↑ AMPc, ↑ PKA		↓ AC, ↓ AMPc		
Agonistas selectivos	SKF-38393 SKF-81297	----	Quinpirole Bromocriptina Pergolida	7-OH-DPAT pramipexola	A-412997 ABT-670
Antagonistas	SCH-23390, SCH-39166	----	Espiperona Risperidona	Nafadotrida SB-277011 ^a	A-381393 FAUC 213
Afinidad por la dopamina	1–5 μ M	0.2–2 μ M	0.2–2 μ M	0.02–0.2 μ M	0.01–0.1 μ M
Radioligandos	[³ H]-SCH-23390	----	[³ H]-espiperona	[³ H]7-OH-DPAT	----

AC, adenilil ciclasa; AMPc, 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina; PKA, cinasa A de proteínas; ↑, activación o formación; ↓, inhibición o reducción. Elaborado con base en Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Tritsch y Sabatini, 2012.

Receptores tipo D₁

Los receptores D₁ y D₅ (identificados inicialmente como D_{1A} y D_{1B}, respectivamente) comparten un 80% de identidad en sus dominios transmembranales, pero muestran solo un 50% de homología general (Tiberi et al, 1991; Sidhu, 1998,) y comparten un 31% de identidad con los receptores tipo D₂ (Habibi, 2017). El asa extracelular entre las regiones transmembranales 4 (TM4) y 5 (TM5) es considerablemente diferente en los dos subtipos de receptores, siendo más corto (27 aa) en el receptor D₁ que en el receptor D₅ (41 aa); la primera y segunda asa intracelulares de los receptores D₁ y D₅ están conservadas, y la tercera asa intracelular entre TM5 y TM6 se caracteriza por ser corta, y acoplarse a proteínas G α_s que activan la vía AMPc/PKA; la región carboxilo

terminal (C-terminal) de los receptores D₁/D₅ es similar en tamaño, pero diferente en la secuencia rica en Serinas y Treoninas, y tiene un residuo de Cisteína que ancla la cola citoplasmática a la membrana (Missale et al., 1998; Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Tritsch y Sabatini, 2012; Habibi, 2017).

Los receptores D₁/D₅ presentan diferente distribución en el cerebro; los receptores D₁ se expresan predominante en la corteza cerebral, el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, el sistema límbico (tálamo, hipotálamo y amígdala cerebral) y el neostriado (caudado y putamen), donde desempeñan un papel en el control motor por los ganglios basales. La expresión de los receptores D₅ es menor y su distribución es más restringida, particularmente en el hipocampo, el tubérculo olfatorio y el hipotálamo (Richfield et al., 1989; Khan et al., 2000; Muly et al; 2010; Habibi, 2017).

Receptores tipo D₂

Los receptores D₂ y D₃ comparten una identidad del 75% en sus dominios TM, y los subtipos D₂ y D₄ muestran una identidad del 53-54%. En comparación con los receptores tipo D₁, los receptores tipo D₂ presentan una tercera asa intracelular larga que interactúan con proteínas G $\alpha_{i/o}$ para inhibir a las ACs (Missale et al., 1998; Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Tritsch y Sabatini, 2012).

Los receptores del subtipo D₂ se expresan de manera baja en la corteza cerebral, y de manera similar al subtipo D₁, presentan un grado mayor de expresión en el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, el sistema límbico (hipotálamo y amígdala cerebral), el hipocampo, la sustancia negra, el área tegmental ventral y el neostriado (caudado y putamen), donde participan en el control motor por los ganglios basales. También se expresan en alta densidad en las células lactotropas de la glándula pituitaria anterior, donde regulan la secreción de prolactina (Caron et al., 1978).

El receptor D₃ se expresa en niveles altos en el sistema límbico (hipotálamo y amígdala cerebral), incluyendo el núcleo accumbens y el tubérculo olfativo, mientras que la expresión de los receptores D₄ es alta en la corteza frontal, el sistema límbico (hipotálamo y amígdala cerebral), el hipocampo, el diencefalo y el tallo encefálico (Richfield et al., 1989; Feuerstein, 2008; Habibi, 2017). La figura 5 ilustra la distribución de la expresión de receptores a dopamina en el cerebro.

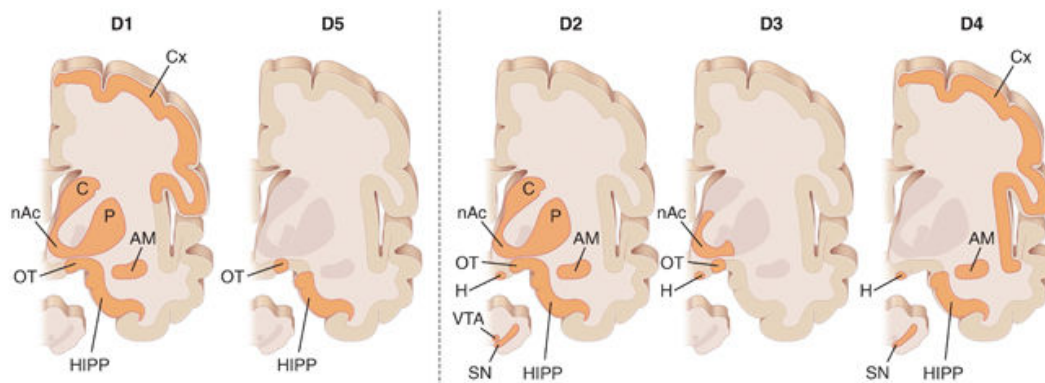


Figura 5. Distribución de la expresión de receptores a dopamina en el cerebro. Localización de los cinco subtipos de receptores a dopamina (D₁-like, subtipos D₁ y D₅, y D₂-like, subtipos D₂, D₃ y D₄) en el cerebro humano (secciones coronales). En naranja se representa el área cerebral predominante de cada receptor. AM, amígdala; C, caudado; Cx, corteza cerebral; H, hipotálamo; HIPP, hipocampo; nAc, núcleo accumbens; OT, tubérculo olfatorio; P, putamen; SN, sustancia negra; VTA, área tegmental (Standaert y Sung, 2016).

Receptores a dopamina en los astrocitos

Los astrocitos de diferentes áreas del cerebro están expuestos a la DA liberada por los axones que conforman las vías: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal y tuberoinfundibular (figura 4) (Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Se ha evidenciado que los astrocitos expresan varios subtipos de receptores a DA mediante diferentes técnicas (*Western blot*, inmunohistoquímica, microscopía electrónica) y cultivos primarios de astrocitos de diferentes regiones del cerebro (mesencéfalo, neostriado, corteza cerebral, sustancia negra pars reticulata, y núcleo accumbens) de distintas especies y la evaluación de las vías de señalización (Reuss et al., 2000; Khan et al., 2001; Khan et al., 2001; Liu et al., 2009; Corkrum y Araque, 2021).

En cultivos primarios de astrocitos se han descrito dos fenotipos celulares de acuerdo a las características morfológicas: células de apariencia poligonal plana con una "malla" de procesos finos entrelazados (células tipo I: astrocitos protoplasmáticos), y astrocitos "estrellados" con procesos más gruesos y definidos (células tipo II: astrocitos fibrosos) (Oberheim et al 2012). La exposición de los cultivos primarios de astrocitos a DA induce la vía de señalización AMPc/PKA (Beaulieu y Gainetdinov, 2011), aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ y desencadena la remodelación morfológica y genómica de las células astrocíticas (Galloway et al., 2018; Bazargani y Attwell, 2016).

Receptor a dopamina tipo D₁ en los astrocitos

En el cerebro de ratones adultos y con un ensayo de doble inmunomarcaje con anticuerpos anti-D₁R y anti-GFAP, Nagatomo y cols. (2017) evidenciaron que los D₁Rs se expresan en los procesos finos de los astrocitos. En concordancia con lo anterior, la exposición a DA estimula la formación de AMPc y la activación de la PKA mediadas por los receptores D₁/D₅ en cultivos primarios de astrocitos corticales (Zanassi et al., 1999; Li et al., 2006). En astrocitos del núcleo accumbens del ratón la estimulación optogenética de las neuronas del VTA induce la liberación de DA lo que resulta en un aumento importante en la $[Ca^{2+}]_i$ por activación de los D₁Rs y estimulación de la vía de señalización $G\alpha_q/PLC/IP_3$ (Corkrum et al 2020). Esta misma respuesta se ha observado en astrocitos en cultivo primario del hipocampo, el globo pálido (Cui et al., 2016; Jennings et al., 2017), y la corteza prefrontal de la rata (Liu et al., 2009), así como en los astrocitos presentes en rebanadas del bulbo olfatorio del ratón (Fischer et al., 2020).

La activación de los receptores D₁/D₅ también promueve la secreción por los astrocitos de sustancias neuroprotectoras como el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y los factores de crecimiento neural NGF (Ohta et al., 2010) y de fibroblastos 2 (FGF-2) mediante el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Vermeulen et al., 1994; Zhang et al., 2009), regula la expresión de IL-6 y la formación de procesos astrocíticos (Morimoto et al., 2022), activa a las cinasas ERK-1/2, induce la migración celular (Huang et al., 2012) y aumenta la fosforilación de la PKA (Li et al., 2006).

Receptor a dopamina tipo D₂ en los astrocitos

Se ha mostrado mediante doble inmunomarcaje con anticuerpos (anti-D₂R y anti-GFAP) e inmunorreacción con diaminobencidina (DAB) y acople a partículas de oro, que los procesos astrocíticos que rodean el cuerpo celular de las interneuronas de la corteza cerebral expresan ~35% del total de sitios de unión del D₂R (Khan et al., 2001).

A semejanza de los D₁Rs la activación de los receptores D₂/D₃ aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ mediante la vía PLC/IP_3 (Fischer et al., 2020), si bien otros estudios indican una disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ al inhibir canales de Ca^{2+} (Jennings et al., 2017). Además, la

activación de los D₂Rs promueve la liberación de neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), GDNF y NGF (Ohta et al., 2003; Imamura et al., 2008; Ohta et al., 2010), la biosíntesis y liberación de FGF-2 (Li et al., 2006) y la reducción de la neuroinflamación al promover respuestas anti-inflamatorias (Shao et al., 2013). Este último efecto se debe a la inhibición de la translocación nuclear y unión al ADN del factor nuclear kappa B (NF-κB) o del transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3), factores de transcripción que promueven la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1β, interferón γ (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) (Zhang et al., 2015; Qiu et al., 2016).

La activación de los D₂Rs promueve la vía de señalización de las MAPKs que incluye las cinasas ERK-1/2, p38 y la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) (Dai et al., 2016), y en astrocitos en cultivo del neostriado de la rata el quinpirole, un agonista de los D₂Rs, modula la liberación de gliotransmisores como glutamato (Cervetto et al., 2017), y reduce la proliferación astrocítica y la astrogliosis (Dominguez-Meijide et al., 2017).

4. Interacciones funcionales entre los receptores a HA y a DA

El estudio de las interacciones funcionales de los receptores a HA y DA se ha centrado en las células neuronales (Flik et al., 2015; Varaschin et al., 2018). Las neuronas espinosas medianas (MSNs, por sus siglas en inglés) que conforman las vías directas (estriado-nigral) e indirectas (estriado-palidal) de los ganglios basales expresan de manera preferencial D₁Rs o D₂Rs, respectivamente, y co-expresan H₁Rs, H₂Rs y H₃Rs cuya activación modula las respuestas funcionales a la DA (Molina-Hernández et al., 2000; González-Sepúlveda et al., 2013; Zhuang et al., 2018).

Un ejemplo de la interacción funcional entre los receptores a DA y HA, es la inhibición por la activación del H₃R de la formación de AMPc inducida por SKF-81297, agonista del D₁R, en rebanadas estriatales de la rata (Sánchez-Lemus y Arias-Montaña, 2004). Otro ejemplo de las interacciones funcionales descritas, es la regulación de la liberación de neurotransmisores como [³H]-GABA en rebanadas de la sustancia negra *pars reticulata* (SNr) y del neostriado de la rata, donde la activación del H₃R inhibe selectivamente la liberación de GABA dependiente de la activación del D₁R (García et al., 1997; Arias-Montaña et al 2001). Este efecto es mediado por la vía AMPc/PKA

y la activación de canales de Ca^{2+} tipo P/Q (Arias-Montaña et al., 2007). También se ha mostrado la regulación de la liberación de DA en el neostriado de la rata, evaluada *in vivo* mediante microdiálisis, en la que la activación del D₁R reduce la liberación de la amina, evento atenuado por la co-administración de immepip, agonista del H₃R (Alfaro-Rodríguez et al., 2013).

Por otra parte, mediante ensayos de unión de radioligandos y transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) en células HEK-293 transfectadas y en preparaciones de membranas estriatales, se ha identificado la existencia de heterodímeros del H₃R con el D₁R o el D₂R (Ferrada et al., 2008; Ferrada et al., 2009). Posteriormente, se identificó que el heterómero D₁R/H₃R presente en las neuronas estriatales de la vía directa (estriado-nigral) puede dirigir la señalización dopaminérgica e histaminérgica hacia la vía de señalización de las MAPKs de manera independiente de proteínas $G\alpha_s$ y dependiente de proteínas $G\alpha_{i/o}$, cuyos complejos $G\beta\gamma$ activan la vía de Akt, lo que conduce a la fosforilación de las cinasas ERK-1/2 y GSK-3 β (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011; Rapanelli et al., 2016; Manz et al 2021).

II. Justificación

El neostriado recibe una importante inervación dopaminérgica e histaminérgica, originada en la sustancia negra pars compacta y el núcleo TM del hipotálamo, respectivamente. Por lo anterior, el estudio de la co-expresión y las interacciones funcionales de los receptores a HA y DA se ha enfocado en las neuronas espinosas medianas estriatales que expresan receptores a HA (H_1 , H_2 y H_3), y a DA D_1 (neuronas estriado-nigrales que conforman la vía directa de los ganglios basales) o D_2 (neuronas estriado-palidales que forman la vía indirecta). Así, no se han abordado las interacciones funcionales de estos GPCRs en células gliales, específicamente en astrocitos, y también se ha omitido su estudio en otras regiones del cerebro con importante inervación dopaminérgica e histaminérgica, como la corteza cerebral.

Lo anterior genera puntos importantes en este tema; un primer aspecto es la expresión en astrocitos corticales de la rata de los receptores H_1 , H_2 y H_3 , así como de los D_1 y D_2 , acoplados a diferentes proteínas G (H_1 : $G\alpha_{q/11}$; H_2 y D_1 : $G\alpha_s$; H_3 y D_2 : $G\alpha_{i/o}$), lo que conduce a la formación de segundos mensajeros como el IP_3 (que estimula la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares), DAG (que induce la activación de la PKC) y el AMPc, involucrado en la activación de la PKA.

Un segundo punto relevante es la posibilidad de interacciones funcionales entre los receptores a HA y a DA, aspecto no evaluado en los astrocitos, pero sí en las neuronas espinosas medianas estriatales, en las que la activación de los receptores D_1 y H_3 modula la formación de AMPc y la liberación de neurotransmisores, en particular la DA y el GABA.

Por lo anterior, resulta importante evaluar la expresión y función de los receptores a HA y DA en astrocitos cerebro-corticales de la rata, así como las posibles interacciones funcionales de los receptores presentes.

III. Objetivos

Objetivo general

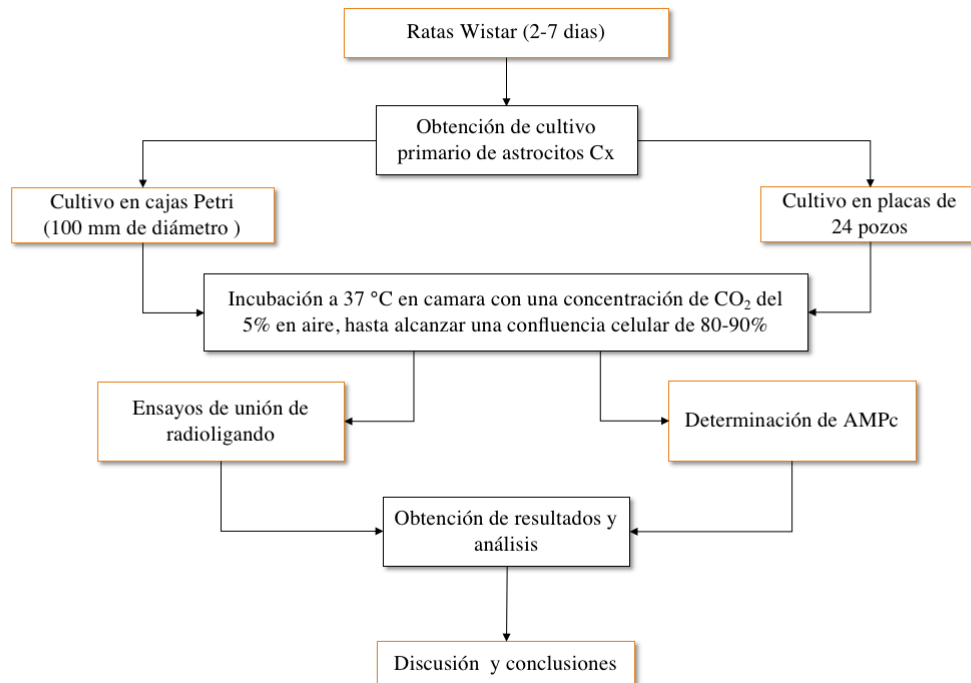
Evaluar la expresión, función y posible interacción funcional de los receptores a histamina y a dopamina en astrocitos corticales de la rata en cultivo primario.

Objetivos específicos

1. Determinar la expresión de receptores a histamina (H_1 y H_3) y a dopamina (D_1 y D_2) en astrocitos corticales de la rata en cultivo primario.
2. Evaluar la función de los receptores a histamina y a dopamina identificados, mediante el análisis de la formación de AMPc.
3. Iniciar el estudio de las posibles interacciones funcionales de los receptores a histamina y a dopamina identificados.

IV. Materiales y métodos

El abordaje experimental de esta tesis se ilustra en el siguiente diagrama.



Cultivo primario de astrocitos corticales de la rata

Los cultivos primarios de astrocitos corticales se obtuvieron a partir de cerebros de ratas Wistar macho de 2-7 días de vida posnatal. Los animales fueron decapitados con una guillotina, se extrajo el encéfalo sumergiéndolo en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) fría, se retiraron las meninges y se disecaron ambas cortezas cerebrales. Los tejidos se cortaron en trozos pequeños, los cuales se transfirieron a una solución de Hank (HBSS). En condiciones de esterilidad el tejido se lavó con HBSS a temperatura ambiente, y se sometió a tripsinización (solución de tripsina/EDTA, 0.25%/0.5 mM) por 15 min a 37 °C con agitación cada 5 min. La tripsinización se detuvo agregando medio de Eagle modificado por Dulbecco/medio F12 (DMEM/F12) suplementado con suero fetal bovino (10%), solución de antibióticos (1% de penicilina/estreptomicina) y glutamina (2.5 mM).

El tejido se disoció mecánicamente con una pipeta de vidrio estéril y una micropipeta de 1 ml, permitiendo posteriormente su sedimentación por 1 min para la obtención de las células disociadas presentes en el sobrenadante, el cual se transfirió a un tubo

Falcon y se centrifugó a 300xg por 3 min. El botón celular se resuspendió en medio DMEM/F12 suplementado y la suspensión se transfirió a botellas de cultivo celular (tratadas previamente con poli-L-lisina) conteniendo medio DMEM/F12 suplementado. Las botellas se colocaron en una cámara de incubación a 37 °C y una concentración de CO₂ del 5% en aire, hasta alcanzar una confluencia celular de 80-90%, con cambio del medio cada 2-3 días. Alcanzada esta densidad, la microglía y las células precursoras de oligodendrocitos fueron despegadas mediante agitación de los frascos de cultivo celular (250 rpm por 6 h) en un agitador orbital y 1 min de agitación vigorosa manual. Los astrocitos se cultivaron a 37 °C en placas de Petri (100 mm de diámetro) con medio DMEM/F12 suplementado (substituido cada 2-3 días) hasta alcanzar una confluencia de 80-90% (12-15 días de incubación).

Ensayo de unión de radioligando en membranas de astrocitos corticales

Las células fueron despegadas y lisadas con una solución hipotónica fría (Tris-HCl 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4). Los lisados se centrifugaron a 30,000xg por 20 min y el botón se resuspendió en una solución de Tris-HCl (50 mM, pH 7.4). La concentración proteica se cuantificó por el método de Pierce BCA (ácido bicinconínico).

Los ensayos de unión de radioligando se realizaron en un volumen de 100 µl: 40 µl de la suspensión membranal, 50 µl del radioligando correspondiente contenido en una solución de incubación (tabla 2) y 10 µl de H₂O o de una solución de ligandos selectivos no marcados para definir la unión total e inespecífica, respectivamente.

Tabla 3. Radioligandos y ligandos selectivos no marcados utilizados en los ensayos de unión.

Receptor	Radioligando	Unión inespecífica	Incubación 30°C
H₁R	[³ H]-mepiramina 1 nM	mepiramina 10 µM	60 min
H₃R	[³ H]-NMHA 4 nM	clobenpropit 10 µM	60 min
D₁R	[³ H]-SCH-23390 1 nM	SCH-23390 10 µM	30 min
D₂R	[³ H]-espiperona 2 nM	butaclamol 10 µM	90 min

Después de incubar a 30 °C por los tiempos correspondientes (tabla 2), las incubaciones se detuvieron mediante filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) tratados previamente con polietilenimina (PEI) al 0.3% (2 h). Los filtros se lavaron (3x1 ml) con una solución de Tris-HCl fría (50 mM, pH 7.4), y se transfirieron a viales para la cuantificación de la radioactividad retenida por centelleometría (Beckman Coulter LS 6500). La unión específica a cada receptor se determinó a partir de la diferencia entre la unión total y la unión inespecífica.

Determinación de la formación de AMPc en astrocitos corticales de la rata

Los astrocitos fueron cultivados en placas de 24 pozos; el día del experimento se retiró el medio de cultivo y se agregaron 250 µl de solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH: composición, en mM: NaCl 113, HEPES 20, NaHCO₃ 25, D-glucosa 15, KCl 4.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2, pH 7.4) conteniendo 1.1 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, inhibidor de fosfodiesterasas). Se incubó por 10 min a 37 °C antes de adicionar 11 µl de los agonistas selectivos de los receptores D₂ y H₃, y 5 min después 11 µl de una solución de forskolina (FSK; 3 µM) o del agonista del D₁R, SKF-81297. La incubación se continuó durante 30 min a 37 °C o por 2.5-30 min en los experimentos de curso temporal.

Cumplido el periodo de incubación, el medio se aspiró y se añadieron 250 µl de HCl (0.1 N) frío para detener la reacción y las placas se colocaron sobre hielo por 15 min, antes de agregar 25 µl de NaOH (1 M) y 100 µl de Tris-HCl (1 M, pH 7.0). La formación de AMPc se determinó mediante ensayos de inhibición de la unión de [³H]-AMPc a la subunidad reguladora de la PKA, mezclando muestras de 50 µl con 50 µl de una solución de [³H]-AMPc (10 nM) y 25 µl de la suspensión de PKA diluidos en la solución de incubación (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mg/ml albúmina sérica bovina (BSA), pH 7.0) e incubando a 4 °C por 2.5 h. Las reacciones se detuvieron mediante filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) tratados previamente con PEI al 0.3% (2 h). Los filtros se lavaron (3x1 ml) con agua desionizada fría, y se transfirieron a viales para la cuantificación de la radioactividad retenida por centelleometría. La cantidad de AMPc formado se determinó utilizando una curva estándar de AMPc y se expresó en pmol/pozo.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan con medias \pm error estándar (SEM). Los datos se analizaron con la prueba t de Student (comparación entre 2 grupos) o varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Tukey (comparaciones múltiples entre grupos) empleando el programa Graph Pad prism v9. Los valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

V. Resultados

Expresión de receptores a DA y HA en astrocitos corticales

Para la determinación de la expresión proteica de los receptores a HA y DA, se realizaron ensayos de unión radioligando a membranas celulares de astrocitos corticales en cultivo primario y de la corteza cerebral de ratas Wistar macho de 2-7 días de vida posnatal, utilizando radioligandos selectivos para el D₁R ([³H]-SCH-23390; 1 nM), el D₂R ([³H]-espiperona 2 nM), el H₃R ([³H]-NMHA; 4 nM) y el H₁R ([³H]-mepiramina; 1 nM).

La unión específica indicó densidades de 8.85 ± 0.90 fmol/mg para el D₁R, 4.07 ± 1.24 fmol/mg para el D₂R y 5.32 ± 0.84 fmol/mg para el H₁R en membranas de astrocitos corticales de la rata (figura 6A). No se detectó unión específica de [³H]-NMHA (4 nM), utilizada para determinar la presencia del H₃R. La unión específica en las membranas de la corteza cerebral de ratas de la misma edad (2-7 días) indicó densidades de 54.33 ± 1.15 fmol/mg para el D₁R, 16.69 ± 1.78 fmol/mg para el D₂R, 3.33 ± 2.52 fmol/mg para el H₃R y 4.58 ± 0.61 fmol/mg para el H₁R (figura 6B).

Ensayos de formación e inhibición de AMPc en los astrocitos corticales

Inicialmente se evaluó la función de los receptores a DA D₁ y D₂, identificados en los astrocitos corticales por los ensayos de unión de radioligando. Los D₁Rs están acoplados a proteínas G α_s que activan a las ACs generando el segundo mensajero AMPc. La incubación de los astrocitos corticales con el fármaco SKF-81297 (10 μ M), agonista selectivo de los D₁Rs, resultó en un aumento significativo en la acumulación de AMPc a 18.32 ± 4.04 pmol/pozo a partir de un valor basal de 2.66 ± 0.14 pmol/pozo (figura 7A).

Los D₂Rs se acoplan a proteínas G $\alpha_{i/o}$ por lo que inhibe a las ACs y consecuentemente la formación de AMPc. Por lo tanto, para evaluar la funcionalidad de los D₂Rs la formación del segundo mensajero fue estimulada con forskolina (FSK, 3 μ M), que activa directamente a las ACs (Yan et al., 1998; Defer et al., 2000) y por ende la formación de AMPc. La forskolina aumentó la acumulación de AMPc a 89.55 ± 24.35 pmol/pozo (acumulación basal, 2.66 ± 0.14 pmol/pozo, 4 experimentos); sin embargo,

la activación del D₂R por el agonista selectivo quinpirole (10 μ M) no modificó el efecto de la forskolina (figura 7B), como tampoco la formación de AMPc inducida por la activación de los D₁Rs con SKF-81297 (10 μ M; 26.00 ± 0.80 pmol/pozo; acumulación basal, 2.87 ± 0.33 pmol/pozo) en un solo experimento realizado (figura 7C).

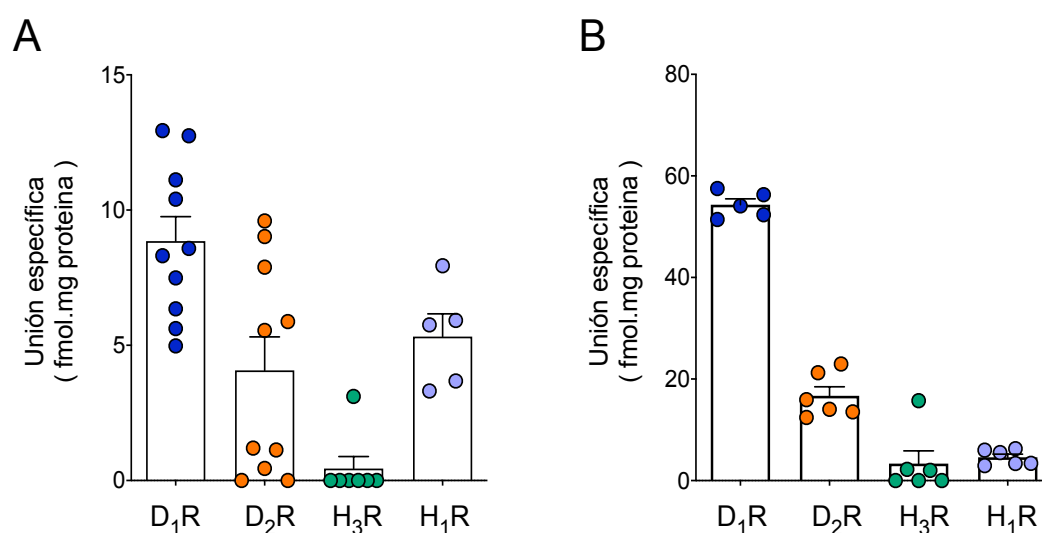


Figura 6. Expresión de receptores a histamina y a dopamina en membrana de astrocitos corticales y corteza cerebral de la rata. A, B. Unión específica de los radioligandos a membranas de astrocitos (A) y de la corteza cerebral (B). Para ambas determinaciones se utilizaron: D₁R, [³H]-SCH-23390 (1 nM) en ausencia o presencia de SCH-23390 (10 μ M); D₂R, [³H]-espiperona (2 nM) en ausencia o presencia de butaclamol (10 μ M); H₃R, [³H]-NMHA (4 nM) en ausencia o presencia de clobenpropit (10 μ M); H₁R, [³H]-mepiramina (1 nM) en ausencia o presencia de mepiramina (10 μ M). La unión específica a cada receptor se determinó a partir de la diferencia entre la unión total y la unión inespecífica. Los puntos corresponden a determinaciones individuales realizadas por cuadruplicado, y se indican también la media \pm SEM.

Los ensayos de unión de radioligando no detectaron en las membranas de los astrocitos corticales unión específica de [³H]-NMHA (4 nM), utilizada para evaluar la presencia del H₃R. Para corroborar la ausencia de expresión de los H₃Rs, acoplado a proteínas G $\alpha_{i/o}$, se evaluó el efecto del agonista selectivo immpip (1 μ M) en la acumulación de AMPc inducida por forskolina. Como se muestra en la figura 7D, el immpip no inhibió el efecto de la forskolina, apoyando la ausencia del receptor.

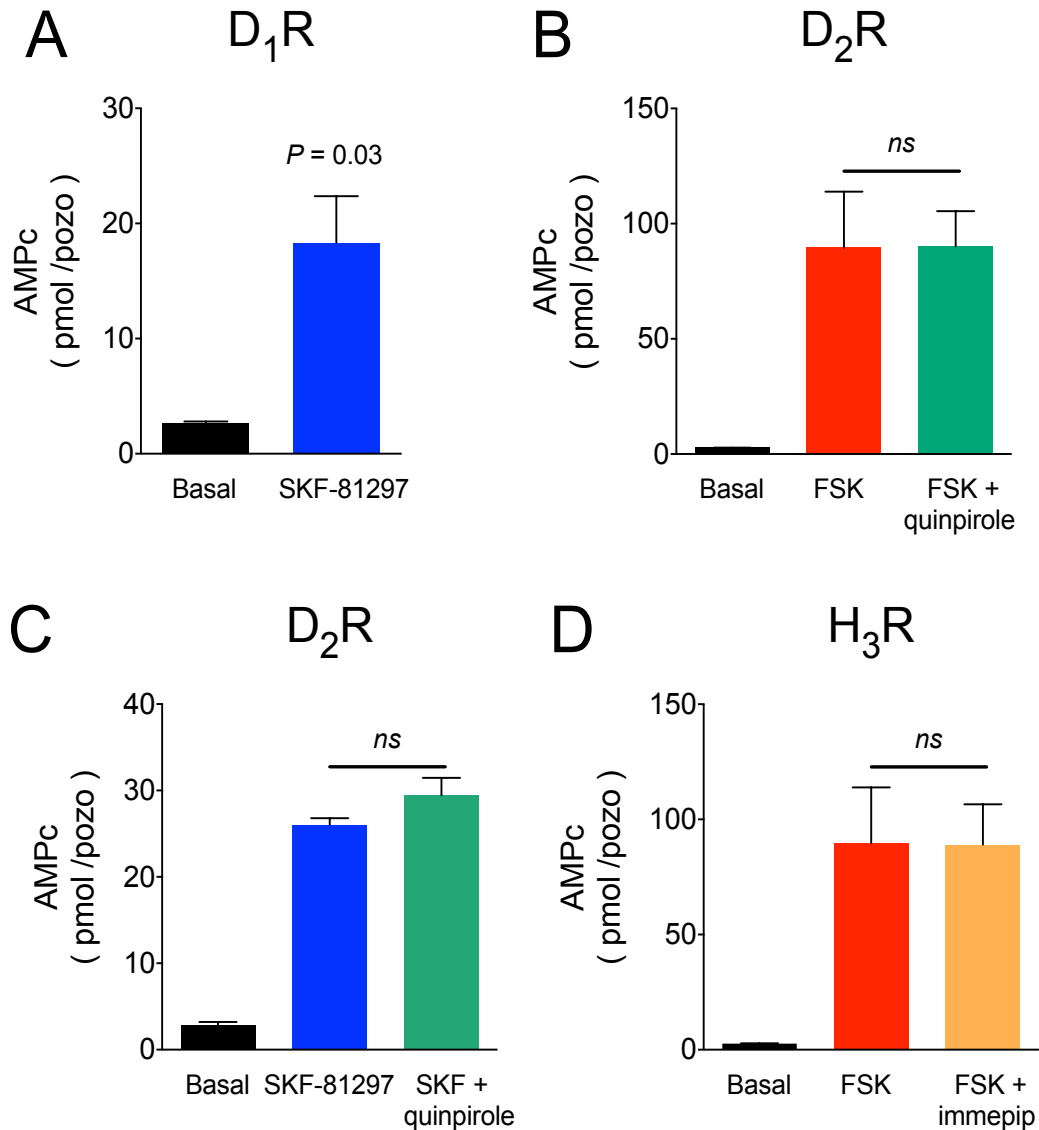


Figura 7. Funcionalidad de los receptores a histamina y a dopamina expresados en astrocitos corticales en cultivo. **A.** Acumulación de AMPc inducida por la activación de los D_1R s por el agonista selectivo SKF-81297 (10 μ M). **B.** Ausencia de inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina (FSK, 3 μ M) por activación de los D_2R s con el agonista selectivo quipirole (10 μ M). En los paneles A y B, los valores son medias \pm SEM de 4 experimentos con determinaciones por cuadruplicado. **C.** Ausencia de inhibición por activación de los D_2R s de la acumulación de AMPc inducida por la estimulación de los D_1R s con SKF-81297 (10 μ M) en un experimento realizado con determinaciones por triplicado. **D.** Ausencia de inhibición de la acumulación de AMPc inducida por FSK (3 μ M) por activación de los H_3R s con el agonista selectivo imiepip (1 μ M). Los valores son medias \pm SEM de 4 experimentos con determinaciones por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student pareada (paneles A y C) o varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey (panel B y D). *ns*, sin diferencia estadísticamente significativa.

Los D₁Rs presentes en los astrocitos corticales mostraron funcionalidad en los ensayos de formación de AMPc, por lo que se evaluó el curso temporal del efecto del agonista SKF-81297 (10 μ M), en periodos de 2.5 a 30 min. La activación de los D₁Rs indujo una acumulación máxima de AMPc a los 5 min (~10 veces el valor basal), misma que se mantuvo sin cambio significativo hasta los 30 min, el tiempo máximo evaluado (figura 8A). Un comportamiento similar se observó de manera similar al utilizar el agonista endógeno DA (10 μ M) (figura 8B).

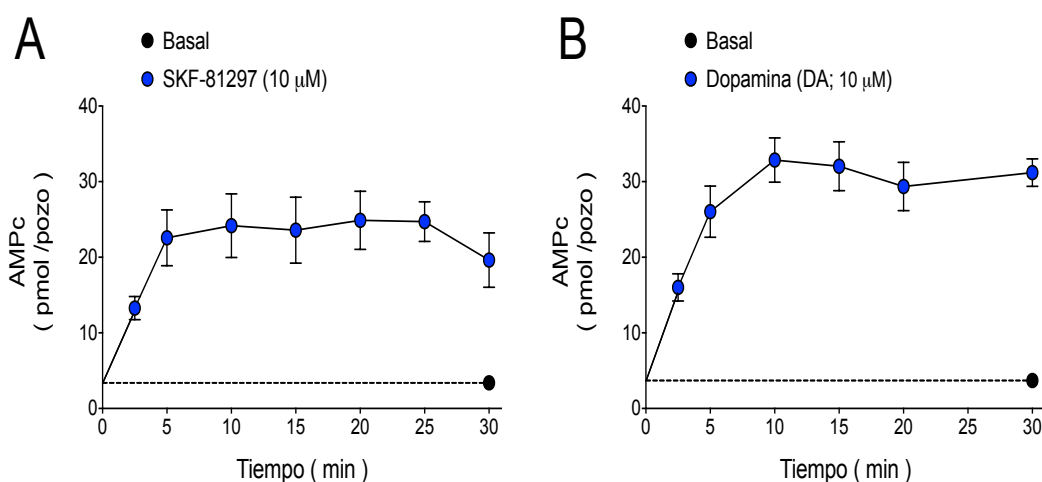


Figura 8. Curso temporal de la acumulación de AMPc en respuesta al agonista selectivo de los D₁Rs SKF-81297 y a dopamina en astrocitos corticales. **A.** Curso temporal de la acumulación de AMPc inducida por SKF-81297 (10 μ M). Los valores son promedios \pm SEM de 7 experimentos con determinaciones por triplicado. **B.** Curso temporal de la acumulación de AMPc inducida por dopamina (10 μ M). Los valores son promedios \pm SEM de 3 experimentos con determinaciones por triplicado.

Antagonismo de los D₁Rs por SCH-23390 en la formación de AMPc estimulado por DA o el agonista SKF-81297

Para confirmar la participación de los D₁Rs en la formación de AMPc inducida por SKF-81297 y DA en los cultivos primarios de astrocitos corticales, se evaluó la acumulación del segundo mensajero estimulada por ambos fármacos (10 μ M) en presencia o ausencia del SCH-23390 (1 μ M), un antagonista selectivo de los D₁Rs.

La incubación de los astrocitos corticales con SKF-81297 o DA (ambos a 10 μ M) resultó en un aumento significativo en la formación de AMPc (21.84 ± 1.31 y 26.37 ± 2.17 pmol/pozo, respectivamente), a partir de un valor basal de 4.38 ± 0.44 pmol/pozo (figura 9). El antagonista SCH-23390 (1 μ M) inhibió la respuesta a SKF-81297 y DA en 99.83% y 82.35%, respectivamente, sin afectar por sí solo la formación basal de AMPc (3.92 ± 0.88 pmol/pozo, figura 9).

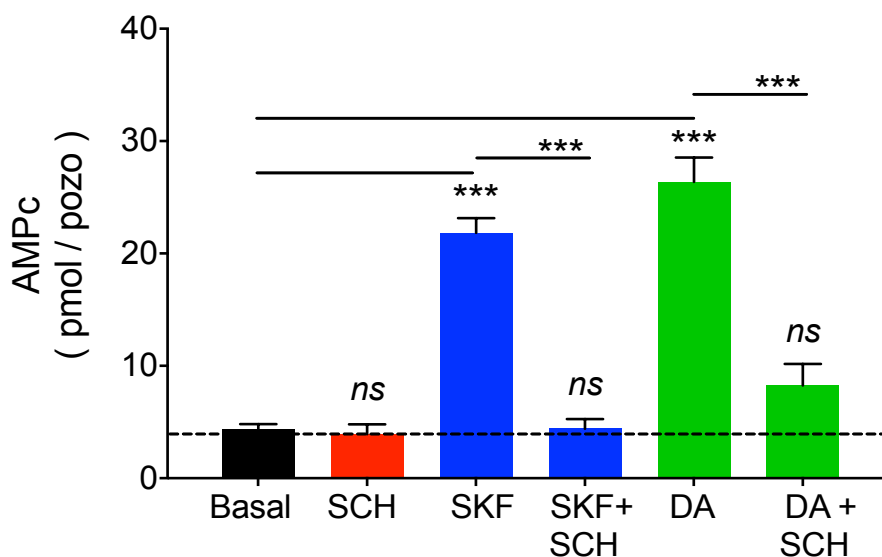


Figura 9. Antagonismo por el SCH-23390 de la acumulación de AMPc inducida por SKF-81297 o dopamina en astrocitos corticales. Las concentraciones utilizadas fueron: SCH-23390 (1 μ M), SKF-81297 (10 μ M), DA (10 μ M). Los valores son promedios \pm SEM de 5 experimentos con determinaciones por cuadruplicado. *ns*, sin diferencia significativa; *** $P < 0.001$, ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Efecto del bloqueo de los adrenoceptores β por alprenolol en la formación de AMPc inducida por DA

Se ha reportado que los astrocitos corticales en cultivo primario expresan adrenoceptores β funcionales (Koppel et al., 2018), los cuales se acoplan a proteínas $G\alpha_s$ (Hertz et al., 1984; Sutin y Shao, 1992), y que la dopamina puede unirse a estos receptores, aunque con baja afinidad (constante de disociación, K_d , 79.4 μ M; Del Carmine et al., 2002). Por ello, se evaluó la formación de AMPc inducida por la DA bloqueando a los D_1 Rs con SCH-23390, o en presencia de alprenolol, un antagonista no selectivo de los adrenoceptores β .

La figura 10 muestra que el SCH-23390 previno completamente las respuestas inducidas por 10 nM, 100 nM y 1 μ M de DA, con bloqueo parcial y decreciente de las concentraciones de 3 a 100 μ M. El alprenolol no modificó la respuesta DA en el rango de 10 nM a 1 μ M, pero disminuyó de manera creciente la respuesta a concentraciones mayores a 3 μ M.

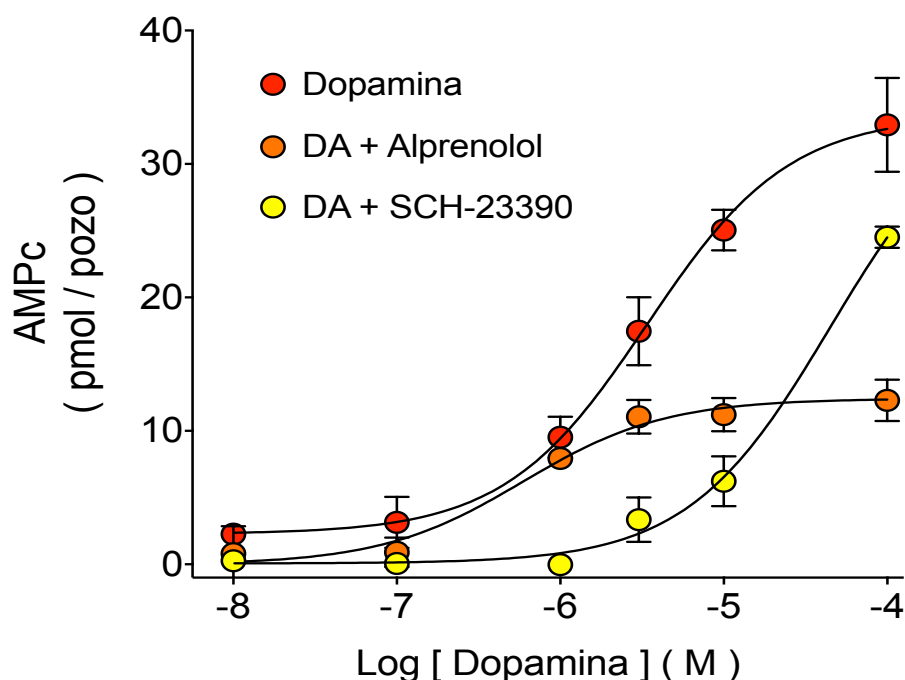


Figura 10. Bloqueo por alprenolol y SCH-23390 de la acumulación de AMPc estimulada por DA en astrocitos corticales en cultivo primario. Se presentan las curvas concentración-respuesta de DA en ausencia de antagonistas y en presencia de alprenolol (10 μ M), antagonista no selectivo de los adrenoceptores β , o SCH-23390 (10 μ M), antagonista selectivo de los D_1 Rs. Los puntos son los promedios \pm SEM de 3-4 experimentos con determinaciones por cuadruplicado. Las líneas indican el ajuste a una ecuación logística. Los valores del efecto máximo (E_{max}) y el Log_{10} de la concentración efectiva media (EC_{50}) se comparan en la Tabla 3.

El análisis de las curvas se presenta en la Tabla 3. La respuesta máxima (E_{max}) a la DA (33.66 ± 2.01 pmol/pozo) no fue modificada significativamente por el SCH-23390 (35.38 ± 4.37 pmol/pozo, pero sí por el alprenolol (12.42 ± 1.00 pmol/pozo; -63%). En relación a la potencia, la EC_{50} para DA (3.71 μ M, pEC_{50} 5.43 ± 0.25) disminuyó significativamente en presencia de alprenolol (EC_{50} 0.6 μ M, pEC_{50} 6.22 ± 0.15) y aumentó también significativamente en presencia de SCH-23390 (EC_{50} 33.88 μ M,

pEC₅₀ 4.47 ± 0.13). Estos resultados indican que dependiendo de la concentración presente la formación de AMPc inducida por DA se debe a la activación de D₁Rs (≤ 1 μM) o a la estimulación adicional de adrenoceptores β a concentraciones mayores a 1 μM.

Tabla 4. Inhibición por alprenolol y SCH-23390 de la acumulación de AMPc inducida por DA.

	E_{max} (pmol/pozo)	pEC₅₀	EC₅₀ (μM)	n
Dopamina	33.66 ± 2.01	5.43 ± 0.25	3.71 ± 0.56	3
Dopamina + alprenolol	12.42 ± 1.00 ^{a,b}	6.22 ± 0.15 ^{c,d}	0.60 ± 0.70	4
Dopamina + SCH-23390	35.38 ± 4.37	4.47 ± 0.13 ^{c,e}	33.88 ± 0.74	3

Los valores son promedios ± SEM del número de experimentos indicado, con determinaciones por cuadruplicado. E_{max}, formación máxima de AMPc; EC₅₀, concentración efectiva media. pEC₅₀; Log₁₀ de la EC₅₀. ^a P < 0.01 con respecto a dopamina, ^b P < 0.001 con respecto a dopamina más SCH-23390, ^c P < 0.05 con respecto a dopamina, ^d P < 0.05 con respecto a dopamina, ^e P < 0.001 con respecto a dopamina más alprenolol; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Efecto de la histamina en la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D₁Rs

Para iniciar el estudio de las posibles interacciones funcionales de los receptores a HA y a DA en los astrocitos corticales de la rata, se evaluó la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D₁Rs en ausencia y presencia de histamina (30 μM). La figura 11A muestra que el agonista de los D₁Rs SKF-81297 (10 μM) indujo la acumulación de AMPc de los 2.5 hasta los 30 min, el tiempo máximo evaluado. En presencia de HA, la acumulación de AMPc fue mayor en todos los tiempos (figura 11A). A los 5 min, la HA aumentó por sí misma la acumulación de AMPc a 8.82 ± 0.76 pmol/pozo (basal, 3.52 ± 0.50 pmol/pozo); el SKF-81297 aumentó la formación del segundo mensajero a 16.02 ± 1.64 pmol/pozo, y en presencia de ambos fármacos la acumulación de AMPc fue 23.42 ± 1.91 pmol/pozo (figura 11B).

Al sustraer la acumulación basal de AMPc en cada caso los valores correspondieron a: HA, 5.29 ± 1.0 pmol/pozo; SKF-81297, 12.49 ± 2.15 pmol/pozo; SKF-81297 + HA, 19.89 ± 2.36 pmol/pozo), y la suma de los efectos individuales de la HA y el SKF-81297 no fue estadísticamente diferente del valor obtenido en la presencia de ambos fármacos (Tabla 5), lo que es consistente con un efecto aditivo.

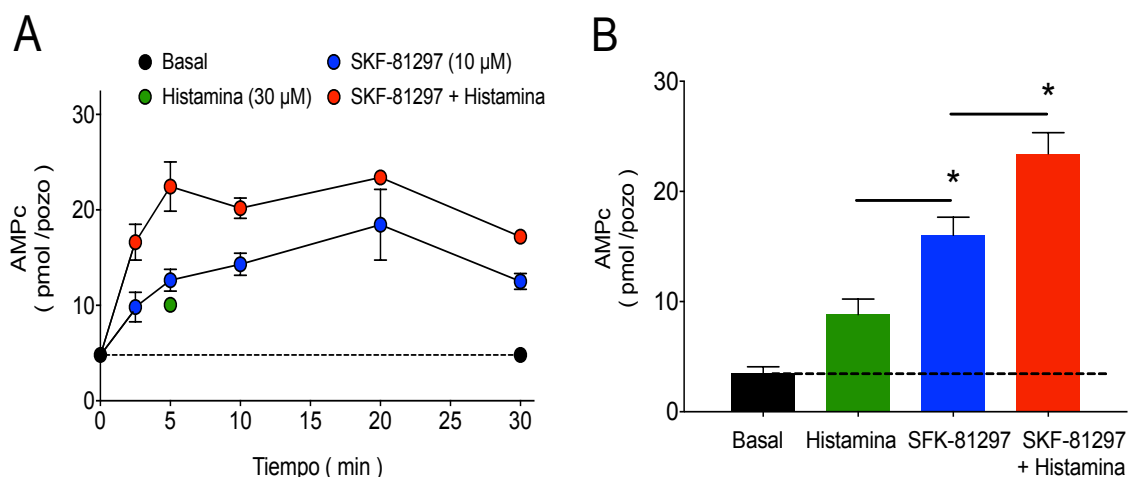


Figura 11. Efecto de la histamina en la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D₁Rs. **A.** Curso temporal de la activación de los D₁Rs por SKF-81297 (10 μM) en ausencia o presencia de histamina (30 μM). Los valores son promedios ± SEM de determinaciones por triplicado de un experimento representativo, repetido 6 veces con resultados similares. **B.** Análisis de los efectos del SKF-81297, histamina y su combinación a los 5 min. Los valores son promedios ± SEM de 4 experimentos. * P < 0.05, ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Tabla 5. Efecto de la histamina en la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D₁Rs

Agonistas	AMPc (pmol/pozo)	Suma (pmol/pozo)
Histamina	5.29 ± 1.0	17.78 ± 2.37^a
SKF-81297	12.49 ± 2.15	
SKF-81297 + Histamina	19.89 ± 2.36	19.89 ± 2.36

Los valores muestran el efecto de los fármacos después de la substracción de la acumulación basal, y son promedios ± SEM de 4 experimentos, ^aP = 0.551 comparado con el valor de SKF-81297 más histamina; prueba t de Student.

Antagonismo de los receptores H₁, H₂ y H₃ en el efecto aditivo de la HA en la acumulación de AMPc inducida por los D₁Rs

Para este análisis se utilizaron los agonistas endógenos HA y DA, así como antagonistas selectivos de los receptores H₁ (mepiramina), H₂ (tiotidina) y H₃ (clobenpropit). La figura 12 muestra que la co-incubación con HA y DA resultó en un efecto aditivo en la acumulación de AMPc en los astrocitos corticales (figura 12; basal, 3.15 ± 0.49 pmol/pozo; HA, 8.79 ± 0.71 pmol/pozo; DA, 14.65 ± 0.68 pmol/pozo; DA + HA, 23.24 ± 1.42 pmol/pozo).

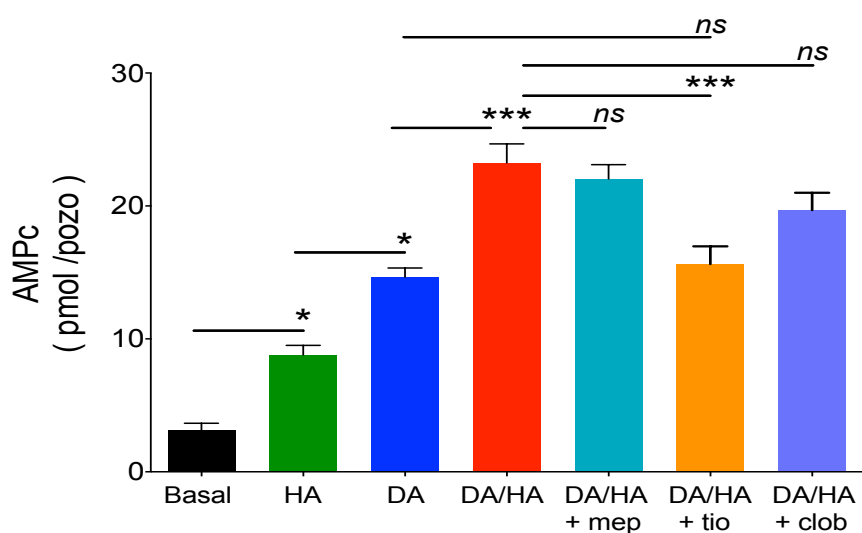


Figura 12. Efecto de los antagonistas de los receptores H₁, H₂ y H₃ en el efecto aditivo de la histamina en la acumulación de AMPc inducida por dopamina. Se utilizaron los agonistas endógenos histamina (HA, 30 μ M) y dopamina (DA), 10 μ M, y los antagonistas selectivos mepiramina (mep; H₁R, 10 μ M), tiotidina (tio; H₂R, 10 μ M), y clobenpropit (clob, H₃R, 10 μ M). Los valores son promedios \pm SEM de 4 experimentos con determinaciones por triplicado. *P < 0.05; ***P < 0.0001; ns, sin diferencia significativa. ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

La figura 12 muestra también que la incubación con mepiramina (10 μ M), antagonista selectivo de los H₁Rs o clobenpropit (10 μ M), antagonista selectivo de los receptores H₃Rs, no modificó el efecto de la co-incubación con DA + HA. Sin embargo, la tiotidina, antagonista selectivo de los H₂Rs, redujo el efecto de la co-incubación con DA y HA a valores no significativamente diferentes de los observados en presencia de DA.

Efecto aditivo de agonistas de los D₁Rs y H₂Rs en la acumulación de AMPc.

Para confirmar la participación de los H₂Rs en el efecto aditivo de la HA en la acumulación de AMPc inducida por activación de los D₁Rs, se utilizaron agonistas selectivos de ambos receptores. La incubación de los astrocitos con antamina (10 μM), un agonista selectivo de los H₂Rs, indujo una formación de AMPc modesta; la activación de los D₁Rs por SKF-81297 (10 μM) indujo una mayor acumulación de AMPc y la co-incubación con ambos agonistas indujo una respuesta aún mayor y significativamente diferente de la inducida por la activación de los D₁Rs por el SKF-81297 (figura 13). El análisis indicó un efecto aditivo de ambos agonistas selectivos (basal, 2.55 ± 0.16 pmol/pozo; antamina, 6.61 ± 0.50 pmol/pozo; SKF-81297, 20.66 ± 1.40 pmol/pozo; SKF-81297 + antamina, 27.81 ± 2.99 pmol/pozo).

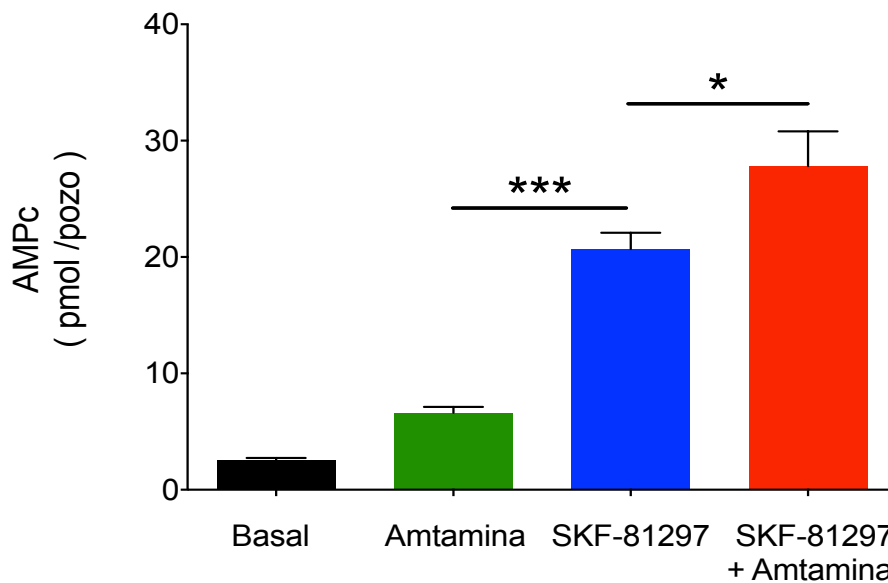


Figura 13. Efecto aditivo de agonistas selectivos de los receptores a histamina H₂ y a dopamina D₁ en la acumulación de AMPc. Se muestran los efectos de la incubación (5 min) con antamina (10 μM, agonista selectivo de los H₂Rs), SKF-81297 (10 μM, agonista selectivo de los D₁Rs) y su combinación. Los valores son promedios ± SEM de 4 experimentos. * P < 0.05, ***P < 0.001, ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Al sustraer la acumulación basal de AMPc de las incubaciones individuales y con ambos fármacos (amtamina, 4.06 ± 0.39 pmol/pozo; SKF-81297, 18.11 ± 1.29 pmol/pozo; amtamina + SKF-81297, 25.26 ± 3.02 pmol/pozo), la suma teórica de los efectos individuales de la amtamina y el SKF-81297 no es estadísticamente diferente del valor obtenido en la co-incubación con ambos fármacos, lo que es indicativo de un efecto aditivo (Tabla 5), semejante al observado para el SKF-81297 y la HA (figura 11 y Tabla 5).

Tabla 6. Efecto aditivo de agonistas selectivos de los receptores a histamina H₂ y a dopamina D₁ en la acumulación de AMPc.

Agonistas	AMPc (pmol/pozo)	Suma (pmol/pozo)
Amtamina	4.06 ± 0.39	22.17 ± 1.34^a
SKF-81297	18.11 ± 1.29	
SKF-81297 + Amtamina	25.26 ± 3.02	25.26 ± 3.02

Los valores muestran el efecto de los fármacos (ambos a $10 \mu\text{M}$) después de la substracción de la acumulación basal, y son promedios \pm SEM de 4 experimentos. ^a $P = 0.386$ comparado con el valor de SKF-81297 más amtamina; prueba *t* de Student.

VI. Discusión

Cultivo primario de astrocitos cerebro-corticales

Numerosos estudios han mostrado que los astrocitos participan de manera fundamental en la homeostasis del SNC al desempeñar diversas funciones como la generación y mantenimiento de vías sinápticas neuronales, aporte nutrimental a las neuronas, y modulación de la eficacia sináptica mediante la liberación de gliotransmisores (Pfrieger y Barres, 1997; Araque et al., 1999; Shulman et al., 2001; Christopherson et al., 2005; Ricci et al., 2009; Perdan et al., 2009; Hamilton y Attwell, 2010; Dienel y Cruz, 2015; Wahis et al., 2021). Así, el estudio de los astrocitos y sus funciones siguen siendo motivo de gran interés.

La implementación de cultivos primarios ha facilitado el estudio de la señalización y la respuesta celular de los astrocitos de diferentes regiones del cerebro en respuesta a diferentes estímulos farmacológicos (Zhou et al., 2019); sin embargo, un aspecto muy relevante concierne la pureza de los cultivos primarios de astrocitos con respecto a otras células gliales, específicamente la microglía y oligodendrocitos. Este aspecto generalmente se aborda mediante inmunodetección (inmunocitoquímica con fluorescencia) de las proteínas ácido fibrilar glial fibrilar (GFAP) específica de los astrocitos, CD11b/c (OX42) o IBA-1, específica de la microglía, y O4, específica de oligodendrocitos (Lange et al., 2012; Schildge et al., 2013).

En este estudio, los cultivos primarios de astrocitos corticales se obtuvieron a partir de la corteza cerebral de ratas Wistar macho de 2-7 días de vida posnatal, sembrados de manera inicial en botellas de cultivo, y sometidos a un protocolo de agitación para eliminar la microglía y las células precursoras de oligodendrocitos (Schildge et al., 2013), con el fin de obtener un cultivo de astrocitos lo más puro posible. Datos previos del laboratorio mostraron que los cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales obtenidos sin el protocolo de agitación contenían $95.0 \pm 0.6\%$ de células inmuno-reactivas a la proteína GFAP, característica de los astrocitos, con presencia -aunque mínima- de microglía y células precursoras de oligodendrocitos (figura 14; Parra-Abarca et al., 2019). Por lo tanto, se espera que la fracción de astrocitos en los cultivos primarios utilizados en este trabajo sea mayor con el protocolo de agitación empleado, aunque se requiere determinar, mediante inmunodetección de las proteínas

GFAP (astrocitos), CD11b/c (OX42; microglía) y O4 (oligodendrocitos), la pureza de estos cultivos. Sin embargo, con base en los resultados de Parra-Abarca y cols. (2019) es razonable asumir que los astrocitos conforman > 95% de las células presentes.

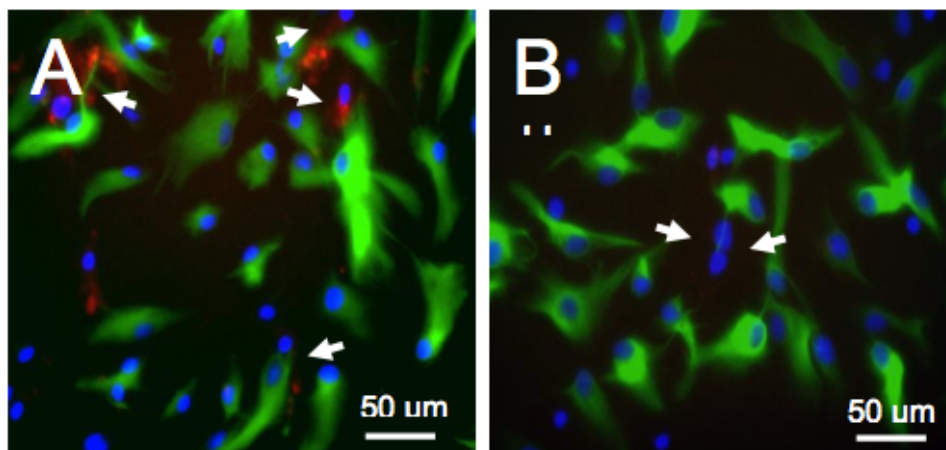


Figura 14. Astrocitos y células de la microglía y precursoras de oligodendrocitos en cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales. A) Inmuno-reactividad a CD11b/c (OX42; microglía; rojo y flechas) y a GFAP (astrocitos; verde). B) Inmuno-reactividad a O4 (oligodendrocitos; rojo y flechas). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul). Tomado de Parra-Abarca et al., 2019.

Los astrocitos corticales de la rata expresan receptores a DA y a HA

Estudios previos mediante ensayos de inmunocitoquímica, *Western blot*, microscopia electrónica, técnicas de hibridación *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), evaluación de vías de señalización, y ensayos de unión de radioligandos han sugerido que los astrocitos responden a neurotransmisores mediante la expresión de GPCRs, entre ellos receptores a HA (H₁, H₂ y H₃) y a DA (tipos D₁ y D₂) (Xu et al., 2018; Jurič et al., 2016; Corkrum y Araque, 2021; Kofuji y Araque 2021).

En este trabajo los ensayos de unión de radioligando con membranas celulares de astrocitos corticales indicaron la expresión de receptores a dopamina D₁ (D₁Rs, 8.85 ± 0.90 fmol/mg) y D₂ (D₂Rs, 4.07 ± 1.24 fmol/mg), así como receptores a histamina H₁ (H₁Rs, 5.32 ± 0.84 fmol/mg) pero no se detectó la presencia de receptores a histamina H₃ (H₃Rs). En contraste, estudios de amplificación por PCR del ADNc de

los receptores a partir de ARNm obtenido de astrocitos corticales de la rata en conjunto con ensayos de unión de radioligando, realizados por Mele y Jurič (2013), indicaron la expresión de H₃Rs, aunque con baja densidad proteica (5.63 ± 0.21 fmol/mg), y los ensayos de PCR con ARNm de astrocitos de diferentes regiones del cerebro de la rata, realizados por Kárpáti y cols. (2018), indican que la expresión de H₃Rs se restringe a determinadas regiones del cerebro. En este trabajo los ensayos de unión de radioligandos con membranas de la corteza cerebral de rata de la misma edad posnatal (2-7 días), mostró expresión de D₁Rs (54.33 ± 1.15 fmol/mg) y D₂Rs (16.69 ± 1.78 fmol/mg), así como H₁Rs (4.58 ± 0.61 fmol/mg). En comparación con las membranas de los astrocitos de la corteza cerebral, estas densidades son 6 y 4 veces mayores para los D₁Rs y D₂Rs, y similares para los H₁Rs, indicando una expresión más abundante por neuronas de los receptores a dopamina.

En contraste con la ausencia de unión específica en membranas de los astrocitos corticales, con la misma concentración de [³H]-NMHA (4 nM) se detectó expresión del H₃R en membranas de la corteza cerebral, aunque con una densidad mínima y altamente variable (3.33 ± 2.52 fmol/mg). Estos resultados indican una baja expresión del receptor en esta etapa de la vida, que puede atribuirse a células neuronales.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que bajo las condiciones experimentales de este estudio los astrocitos corticales de la rata en cultivo primario expresan D₁Rs y D₂Rs, así como H₁Rs.

La activación de los D₁Rs induce acumulación de AMPc

Los receptores a DA tipo D₁ y D₂ son GPCRs acoplados a diferentes proteínas G que influyen en la formación de AMPc. Los D₁Rs se acoplan a proteínas G α_s y su activación induce la formación de AMPc y la activación de la PKA, mientras que los D₂Rs se acoplan a proteínas G $\alpha_{i/o}$ que inhiben la producción de AMPc (Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

En este estudio, los ensayos de unión de radioligando identificaron la expresión de D₁Rs y D₂Rs por los astrocitos corticales. Sin embargo, solo los D₁Rs mostraron funcionalidad en los ensayos de acumulación de AMPc, al ser estimulados por el

agonista selectivo SKF-81297 (figura 7), efecto prevenido por el antagonista selectivo SCH-23390 (figura 9), confirmando la participación de dichos receptores.

Además, y de manera interesante, el curso temporal de la acumulación de AMPc inducido por la activación de los D₁Rs tanto por el agonista selectivo SKF-81297 o como por DA mostró una fase lineal en la acumulación de AMPc hasta los 5 min, alcanzándose posteriormente una meseta hasta los 30 min, tiempo máximo evaluado (figura 8). Un fenómeno común a un gran número de GPCRs es la desensibilización homóloga, es decir la pérdida de la respuesta funcional por exposición prolongada al agonista. Este proceso involucra la activación del receptor, la fosforilación del mismo en residuos de Serina por cinasas de GPCRs (GRKs), el reclutamiento de las proteínas adaptadoras multifuncionales β -arrestinas y eventualmente la internalización del receptor (Pitcher et al., 1998).

Un estudio realizado por Tiberi y cols. (1996) en células HEK-293 transfectadas mostró que la fosforilación del D₁R se debe a las isoformas 2, 3 y 5 de las GRKs, con un efecto máximo a los 5 min, observándose en paralelo una reducción en la formación de AMPc inducida por la DA (10 μ M). En los astrocitos se ha identificado mediante inmuno-detección (*Western blot*) la expresión de las GRKs 2, 3, 5 y 6 (Lipfert et al., 2013); por lo tanto, para los astrocitos corticales la meseta observada en el curso temporal de la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D₁Rs sugiere desensibilización homóloga rápida del receptor D₁ que puede atribuirse a la fosforilación del mismo por GRKs y el reclutamiento de β -arrestinas (Pitcher et al., 1998).

Como se mencionó antes, el antagonista selectivo de los D₁Rs SCH-23390 (1 μ M) inhibió la acumulación de AMPc inducida por SKF-81297 (10 μ M) o por DA (10 μ M). Sin embargo, un aspecto de interés fue que el antagonismo por el SCH-23390 fue menor para la DA que para el SKF-81297 (- 82.35% y - 99.83%, respectivamente; figura 9). Este resultado indicó que la DA podría activar otros GPCRs aminérgicos. En este contexto, se conoce que los astrocitos expresan receptores β -adrenérgicos (β ARs) vinculados a la formación de AMPc (Hertz et al., 1984; Sutin y Shao, 1992). Por otra parte, evidencias farmacológicas y moleculares indican que la DA puede unirse a los β ARs aunque con baja afinidad (Kd, 79.4 μ M; Del Carmine et al., 2002).y activarlos (Zanassi et al., 1999; Koppel et al., 2018; Morimoto et al., 2022).

Por lo anterior, en este estudio se evaluó el efecto del SCH-23390 y del alprenolol, un antagonista no selectivo de los β ARs, en la acumulación de AMPc estimulada por concentraciones crecientes de DA (10 nM – 100 μ M). Se observó que en presencia de alprenolol la DA induce acumulación de AMPc con $EC_{50} = 0.6 \mu$ M, y que en presencia de SCH-23390 la EC_{50} de la DA correspondió a 33.60 μ M. Lo anterior indica que en el rango de concentraciones de 10 nM a 1 μ M la DA activa selectivamente a los D_1 Rs, y que a concentraciones mayores estimula también a β ARs. Este resultado concuerda con lo reportado para astrocitos estriatales en cultivo primario por Zanassi y cols. (1999), quienes mostraron que el propranolol, antagonista no selectivo de los β ARs, inhibió en 35.3% la formación de AMPc inducida por DA. El análisis de las curvas concentración-respuesta de este estudio (figura 10 y tabla 4) mostró también que la activación de los D_1 Rs contribuye con el 37% de la respuesta máxima que puede ser inducida por la DA y que representaría la activación conjunta de los D_1 Rs y los β ARs.

Una publicación reciente de Morimoto y cols. (2022) reporta que en astrocitos en cultivo primario de la rata la expresión de interleucina 6 (IL-6) y la formación de procesos astrocíticos inducidas por una concentración baja de DA (1 μ M), fueron inhibidas por un antagonista de los D_1 Rs, mientras que los efectos de una alta concentración de DA (100 μ M) fueron inhibidos al antagonizar a los β ARs (Morimoto et al., 2022).

Los H_2 Rs son responsables del efecto aditivo de la HA en la acumulación de AMPc inducida por la activación de los D_1 Rs

Se ha mostrado que la HA induce la acumulación de AMPc en astrocitos en cultivo primario (Kubo et al., 1991). En este estudio la HA (30 μ M) aumentó la acumulación de AMPc inducida por la activando de los D_1 Rs con SKF-81297 desde los 5 min hasta los 30 min, tiempo máximo evaluado. Al evaluar el efecto a los 5 min, la suma de los efectos individuales de la HA y el SKF-81297 no fue estadísticamente diferente de la acumulación de AMPc originada por la presencia de ambos fármacos (tabla 5), sugiriendo un efecto aditivo de la HA en la formación del segundo mensajero inducida por la activación de los D_1 Rs.

Los ensayos de unión de radioligando a membranas de astrocitos corticales de la rata permitieron la detección de H_1 Rs en este estudio, y trabajos previos han mostrado que

los astrocitos expresan también H₂Rs (Lipnik-Stangelj y Carman-Krzan, 2004; Kržan et al., 2016) cuya activación estimula la acumulación de AMPc (Hu y Chen, 2017). Los H₁Rs, aunque se acoplan preferencialmente a proteínas G $\alpha_{q/11}$, y por lo tanto a la movilización de Ca²⁺ y la activación de la PKC, inducen la acumulación de AMPc mediante la activación de las ACs por los complejos G $\beta\gamma$ (Maruko, 2005), mediante la unión del complejo Ca²⁺-calmodulina (ACs 1, 3 y 8) o la fosforilación por la PKC (ACs 5 y 6) (Defer et al., 2000). La acumulación de AMPc inducida por la co-incubación con HA y DA no fue afectada por los antagonistas mepiramina (H₁Rs) o clobenpropit (H₃Rs), pero fue inhibida a valores no diferentes de los observados con la DA por la tiotidina, antagonista selectivo de los H₂Rs (figura 12). Este resultado indicó que el efecto se debía a la activación de los H₂Rs.

La co-incubación con SKF-81297 (agonista selectivo de los D₁Rs) y amfetamina (agonista selectivo de los H₂Rs), aumentó la acumulación de AMPc a valores no diferentes de la suma de los efectos individuales de los fármacos (figura 13), apoyando que los H₂Rs son responsables del efecto aditivo de la HA en la formación de AMPc inducida por la activación de los D₁Rs por la DA.

Recientemente se ha descrito que la formación de AMPc afecta ampliamente al fosfoproteoma celular inducido por la señalización AMPc/PKA al evaluar la fosforilación de proteínas que poseen el motivo RR/KX-(S/T), sustrato de la PKA (Tsvetanova et al., 2021). Por lo tanto, resulta de interés estudiar si el efecto aditivo de la DA y la HA en la formación de AMPc debido a la activación de los D₁Rs y los H₂Rs, respectivamente, se traduce en una mayor fosforilación de proteínas por la PKA en los astrocitos cerebro-corticales de la rata en cultivo.

Se ha mostrado que el AMPc regula funciones de los astrocitos como el suministro de energía a las neuronas, el mantenimiento del entorno extracelular, la respuesta inmunitaria y la liberación de factores tróficos (Zhou et al., 2019), y en consecuencia el efecto aditivo de la DA y la HA aquí descrito podría ser relevante para estas funciones.

VII. Conclusiones

1. En las condiciones experimentales utilizadas, los astrocitos cerebro-corticales de la rata en cultivo expresan receptores a histamina H₁ y H₂, así como receptores a dopamina D₁ y D₂.
2. Los D₁Rs presentes en los astrocitos corticales están acoplados de manera importante a la formación de AMPc y experimentan desensibilización homóloga rápida.
3. Existe un efecto aditivo en la formación de AMPc entre la DA y la HA debido a la activación de los D₁Rs y los H₂Rs, respectivamente.

VIII. Perspectivas

1. Determinar mediante inmunodetección con anticuerpos contra las proteínas GFAP (astrocitos), CD11b/c (OX42; microglía) y O4 (oligodendrocitos), la pureza de los cultivos primarios de astrocitos corticales de la rata.
2. Estudiar si el efecto aditivo de la activación de los D₁Rs y H₂Rs en la formación de AMPc se traduce en una mayor fosforilación de proteínas por la PKA.
3. Evaluar la posible desensibilización homóloga rápida de los D₁Rs presentes en los astrocitos corticales y la participación de la fosforilación de los receptores por cinasas de GPCRs (GRKs) y las proteínas β -arrestinas.
4. Determinar si el efecto aditivo de los D₁Rs y H₂Rs en la formación de AMPc modifica algunas funciones de los astrocitos cerebro-corticales (por ejemplo, suministro de energía, mantenimiento del entorno extracelular, la respuesta inmunitaria y liberación de factores tróficos).

IX. Bibliografia

Airaksinen, M. S., Paetau, A., Paljärvi, L., Reinikainen, K., Riekkinen, P., Suomalainen, R., & Panula, P. (1991). Histamine neurons in human hypothalamus: anatomy in normal and Alzheimer diseased brains. *Neuroscience*, 44(2), 465–481. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90070-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90070-5)

Ales, K., Wraber, B., & Lipnik-Stangelj, M. (2008). The synergistic effect of histamine and IL-6 on NGF secretion from cultured astrocytes is evoked by histamine stimulation of IL-6 secretion via H₁-receptor-PKC-MAPK signalling pathway. *Inflammation research: Official Journal of the European Histamine Research Society ...* [et al.], 57 Suppl 1, S33–S34. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-0617-z>

Alexander, S. P., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Marrion, N. V., Peters, J. A., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., & CGTP Collaborators (2017). The concise guide to pharmacology 2017/18: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 174 (Suppl 1), S17–S129. <https://doi.org/10.1111/bph.13878>

Alfaro-Rodriguez, A., Alonso-Spilsbury, M., Arch-Tirado, E., Gonzalez-Pina, R., Arias-Montaño, J. A., & Bueno-Nava, A. (2013). Histamine H₃ receptor activation prevents dopamine D₁ receptor-mediated inhibition of dopamine release in the rat striatum: a microdialysis study. *Neuroscience Letters*, 552, 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.07.026>

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6)

Arbonés, L., Picatoste, F., & García, A. (1990). Histamine stimulates glycogen breakdown and increases 45Ca²⁺ permeability in rat astrocytes in primary culture. *Molecular Pharmacology*, 37(6), 921–927. <https://molpharm.aspetjournals.org/content/37/6/921>

Arias-Montaño, J. A., Floran, B., Floran, L., Aceves, J., & Young, J. M. (2007). Dopamine D₁ receptor facilitation of depolarization-induced release of γ -amino-butyric acid in rat striatum is mediated by the cAMP/PKA pathway and involves P/Q-type calcium channels. *Synapse* (New York, N.Y.), 61(5), 310–319. <https://doi.org/10.1002/syn.20372>

Arias-Montaño, J. A., Floran, B., Garcia, M., Aceves, J., & Young, J. M. (2001). Histamine H₃ receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D₁ receptor-dependent release of [³H]- γ -aminobutyric acid from rat striatal slices. *British Journal of Pharmacology*, 133(1), 165–171. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704053>

Bal, A., Bachelot, T., Savasta, M., Manier, M., Verna, J. M., Benabid, A. L., & Feuerstein, C. (1994). Evidence for dopamine D₂ receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: in situ hybridization and polymerase chain reaction studies. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 23(3), 204–212. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90227-5](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90227-5)

- Bayliss, D. A., Wang, Y. M., Zahnow, C. A., Joseph, D. R., & Millhorn, D. E. (1990). Localization of histidine decarboxylase mRNA in rat brain. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 1(1), 3–9. [https://doi.org/10.1016/1044-7431\(90\)90036-4](https://doi.org/10.1016/1044-7431(90)90036-4)
- Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nature Neuroscience*, 19(2), 182–189. <https://doi.org/10.1038/nn.4201>
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182–217. <https://doi:10.1124/pr.110.002642>
- Benarroch E. E. (2010). Histamine in the CNS: multiple functions and potential neurologic implications. *Neurology*, 75(16), 1472–1479. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f884b1>
- Bongers, G., Sallmen, T., Passani, M. B., Mariottini, C., Wendelin, D., Lozada, A., Marle, A. v., Navis, M., Blandina, P., Bakker, R. A., Panula, P., & Leurs, R. (2007). The Akt/GSK-3beta axis as a new signaling pathway of the histamine H₃ receptor. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), 248–258. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04752.x>
- Carman-Krzan, M., & Lipnik-Stangelj, M. (2000). Molecular properties of central and peripheral histamine H₁ and H₂ receptors. *Pflügers Archives: European Journal of Physiology*, 439 (3 Suppl), R131-R132. <https://doi:10.1007/s004240000117>
- Caron, M. G., Beaulieu, M., Raymond, V., Gagné, B., Drouin, J., Lefkowitz, R. J., & Labrie, F. (1978). Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. Correlation of [³H]-dihydroergocryptine binding with the dopaminergic control of prolactin release. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(7), 2244–2253. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/416027/>
- Carriba, P., Pardo, L., Parra-Damas, A., Lichtenstein, M. P., Saura, C. A., Pujol, A., Masgrau, R., & Galea, E. (2012). ATP and noradrenaline activate CREB in astrocytes via noncanonical Ca²⁺ and cyclic AMP independent pathways. *Glia*, 60(9), 1330–1344. <https://doi.org/10.1002/glia.22352>
- Carthy, E., & Ellender, T. (2021). Histamine, Neuroinflammation and Neurodevelopment: A review. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 680214. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.680214>
- Cervetto, C., Venturini, A., Passalacqua, M., Guidolin, D., Genedani, S., Fuxe, K., Borroto-Esqueda, D. O., Cortelli, P., Woods, A., Maura, G., Marcoli, M., & Agnati, L. F. (2017). A_{2A}-D₂ receptor-receptor interaction modulates gliotransmitter release from striatal astrocyte processes. *Journal of Neurochemistry*, 140(2), 268–279. <https://doi.org/10.1111/jnc.13885>
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Moshier, D. F., Bornstein, P., & Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120(3), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>

- Corkrum, M., & Araque, A. (2021). Astrocyte-neuron signaling in the mesolimbic dopamine system: the hidden stars of dopamine signaling. *Neuropsychopharmacology*, 46(11), 1864–1872. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01090-7>
- Corkrum, M., Covelo, A., Lines, J., Bellocchio, L., Pisansky, M., Loke, K., Quintana, R., Rothwell, P. E., Lujan, R., Marsicano, G., Martin, E. D., Thomas, M. J., Kofuji, P., & Araque, A. (2020). Dopamine-evoked synaptic regulation in the nucleus accumbens requires astrocyte activity. *Neuron*, 105(6), 1036–1047.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.12.026>
- Cui, Q., Pitt, J. E., Pamukcu, A., Poulin, J. F., Mabrouk, O. S., Fiske, M. P., Fan, I. B., Augustine, E. C., Young, K. A., Kennedy, R. T., Awatramani, R., & Chan, C. S. (2016). Blunted mGluR activation disinhibits striatopallidal transmission in Parkinsonian mice. *Cell reports*, 17(9), 2431–2444. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.087>
- Dai, W. L., Xiong, F., Yan, B., Cao, Z. Y., Liu, W. T., Liu, J. H., & Yu, B. Y. (2016). Blockade of neuronal dopamine D₂ receptor attenuates morphine tolerance in mice spinal cord. *Scientific reports*, 6, 38746. <https://doi.org/10.1038/srep38746>
- De Backer, M. D., Gommeren, W., Moereels, H., Nobels, G., Van Gompel, P., Leysen, J. E., & Luyten, W. H. (1993). Genomic cloning, heterologous expression and pharmacological characterization of a human histamine H₁ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197(3), 1601–1608. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2662>
- Del Carmine, R., Ambrosio, C., Sbraccia, M., Cotecchia, S., Ijzerman, A. P., & Costa, T. (2002). Mutations inducing divergent shifts of constitutive activity reveal different modes of binding among catecholamine analogues to the β_2 -adrenergic receptor. *British Journal of Pharmacology*, 135(7), 1715–1722. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704622>
- Defer, N., Best-Belpomme, M., & Hanoune, J. (2000). Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 279(3), F400–F416. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.3.F400>
- Dienel, G. A., & Cruz, N. F. (2015). Contributions of glycogen to astrocytic energetics during brain activation. *Metabolic Brain Disease*, 30(1), 281–298. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9493-8>
- Dominguez-Mejide, A., Rodriguez-Perez, A. I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2017). Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain, behavior, and immunity*, 62, 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.02.013>
- Drutel, G., Peitsaro, N., Karlstedt, K., Wieland, K., Smit, M. J., Timmerman, H., Panula, P., & Leurs, R. (2001). Identification of rat H₃ receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Molecular Pharmacology*, 59(1), 1–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11125017/>

- Eiden, L. E., & Weihe, E. (2011). VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216, 86–98. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05906.x>
- Eisenhofer, G., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (2004). Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 331–349. <https://doi.org/10.1124/pr.56.3.1>
- Fang, Q., Hu, W. W., Wang, X. F., Yang, Y., Lou, G. D., Jin, M. M., Yan, H. J., Zeng, W. Z., Shen, Y., Zhang, S. H., Xu, T. L., & Chen, Z. (2014). Histamine up-regulates astrocytic glutamate transporter 1 and protects neurons against ischemic injury. *Neuropharmacology*, 77, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.012>
- Ferrada, C., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Justinova, Z., Barnes, C., Canela, E. I., Goldberg, S. R., Leurs, R., Lluís, C., & Franco, R. (2008). Interactions between histamine H₃ and dopamine D₂ receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology*, 55(2), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.008>
- Ferrada, C., Moreno, E., Casadó, V., Bongers, G., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E. I., Leurs, R., Ferré, S., Lluís, C., & Franco, R. (2009). Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D₁ and histamine H₃ receptors. *British Journal of Pharmacology*, 157(1), 64–75. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00152.x>
- Feuerstein, T. J. (2008). Presynaptic receptors for dopamine, histamine, and serotonin. *Pharmacology of Neurotransmitter release*, 289–338. https://doi:10.1007/978-3-540-74805-2_10
- Fischer, T., Scheffler, P., & Lohr, C. (2020). Dopamine-induced calcium signaling in olfactory bulb astrocytes. *Scientific reports*, 10(1), 631. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57462-4>
- Flik, G., Folgering, J. H., Cremers, T. I., Westerink, B. H., & Dremencov, E. (2015). Interaction between brain histamine and serotonin, norepinephrine, and dopamine systems: in vivo microdialysis and electrophysiology study. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 56(2), 320–328. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0536-3>
- Galloway, A., Adeluyi, A., O'Donovan, B., Fisher, M. L., Rao, C. N., Critchfield, P., Sajish, M., Turner, J. R., & Ortinski, P. I. (2018). Dopamine triggers CTCF-dependent morphological and genomic remodeling of astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 38(21), 4846–4858. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3349-17.2018>
- García, M., Floran, B., Arias-Montaña, J. A., Young, J. M., & Aceves, J. (1997). Histamine H₃ receptor activation selectively inhibits dopamine D₁ receptor-dependent [³H]-GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*, 80(1), 241–249. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00100-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00100-0)
- González-Sepúlveda, M., Rosell S., Hoffmann H. M., Castillo-Ruiz M^a del M., Mignon V., Moreno-Delgado D., Vignes M., DíazJ., Sabriá J., Ortiz J. (2013). Cellular distribution of the

histamine H₃ receptor in the basal ganglia: functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia*; 3: 109-121 <https://doi.org/10.1016/j.baga.2012.12.001>

Haas, H. L., & Reiner, P. B. (1988). Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurones of the rat hypothalamus in vitro. *The Journal of Physiology*, 399, 633–646. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017100>

Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews*, 88(3), 1183–1241. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007>

Habibi, M. (2017). Dopamine Receptors, Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology; Elsevier: Amsterdam, *The Netherlands*,; ISBN 9780128093245, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.00551-4>.

Hamilton, N. B., & Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters?. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(4), 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrn2803>

Han, S., Márquez-Gómez, R., Woodman, M., & Ellender, T. (2020). Histaminergic control of corticostriatal synaptic plasticity during early postnatal development. *The Journal of Neuroscience*, 40(34), 6557–6571. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0740-20.2020>

Herculano-Houzel S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62(9), 1377–1391. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>

Hertz, L., Schousboe, I., Hertz, L., & Schousboe, A. (1984). Receptor expression in primary cultures of neurons or astrocytes. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 8(4-6), 521–527. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(84\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0278-5846(84)90010-1)

Hill S. J. & Baker J. G. (2004). Histamine receptors. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, 378-383. <https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00309-4>.

Hill, S. J., Ganellin, C. R., Timmerman, H., Schwartz, J. C., Shankley, N. P., Young, J. M., Schunack, W., Levi, R., & Haas, H. L. (1997). International union of pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 49(3), 253–278. <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/49/3/253.long>

Hösli, L., Hösli, E., Schneider, U., & Wiget, W. (1984). Evidence for the existence of histamine H₁- and H₂ - receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neuroscience Letters*, 48(3), 287–291. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(84\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(84)90052-1)

Hu, W., & Chen, Z. (2017). The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: an update. *Pharmacology & Therapeutics*, 175, 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.039>

Huang, C., Wu, J., Liao, R., & Zhang, W. (2012). SKF83959, an agonist of phosphatidylinositol-linked D₁-like receptors, promotes ERK1/2 activation and cell migration

in cultured rat astrocytes. *PloS One*, 7(11), e49954.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049954>

Huang, H., Li, Y., Liang, J., & Finkelman, F. D. (2018). Molecular regulation of histamine synthesis. *Frontiers in Immunology*, 9, 1392. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01392>

Imamura, K., Takeshima, T., Nakaso, K., Ito, S., & Nakashima, K. (2008). Pramipexole has astrocyte-mediated neuroprotective effects against lactacystin toxicity. *Neuroscience Letters*, 440(2), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.067>

Jennings, A., Tyurikova, O., Bard, L., Zheng, K., Semyanov, A., Henneberger, C., & Rusakov, D. A. (2017). Dopamine elevates and lowers astroglial Ca²⁺ through distinct pathways depending on local synaptic circuitry. *Glia*, 65(3), 447–459. <https://doi.org/10.1002/glia.23103>

Jurič, D. M., Kržan, M., & Lipnik-Stangelj, M. (2016). Histamine and astrocyte function. *Pharmacological Research*, 111, 774–783. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.035>

Jurič, D. M., Mele, T., & Carman-Kržan, M. (2011). Involvement of histaminergic receptor mechanisms in the stimulation of NT-3 synthesis in astrocytes. *Neuropharmacology*, 60(7-8), 1309–1317. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.019>

Kárpáti, A., Yoshikawa, T., Nakamura, T., Iida, T., Matsuzawa, T., Kitano, H., Harada, R., & Yanai, K. (2018). Histamine elicits glutamate release from cultured astrocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137(2), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.05.002>

Khan, Z. U., Gutiérrez, A., Martín, R., Peñafiel, A., Rivera, A., & de la Calle, A. (2000). Dopamine D₅ receptors of rat and human brain. *Neuroscience*, 100(4), 689–699. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00274-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00274-8)

Khan, Z. U., Koulen, P., Rubinstein, M., Grandy, D. K., & Goldman-Rakic, P. S. (2001). An astroglia-linked dopamine D₂-receptor action in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1964–1969. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1964>

Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, 39(1), 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>

Kofuji, P., & Araque, A. (2021). G-protein-coupled receptors in astrocyte-neuron communication. *Neuroscience*, 456, 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.025>

Koppel, I., Jaanson, K., Klasche, A., Tuvikene, J., Tiirik, T., Pärn, A., & Timmusk, T. (2018). Dopamine cross-reacts with adrenoreceptors in cortical astrocytes to induce BDNF expression, CREB signaling and morphological transformation. *Glia*, 66(1), 206–216. <https://doi.org/10.1002/glia.23238>

- Kržan, M., Vianello, R., Maršavelski, A., Repič, M., Zakšek, M., Kotnik, K., Fijan, E., & Mavri, J. (2016). The quantum nature of drug-receptor interactions: deuteration changes binding affinities for histamine receptor ligands. *PloS One*, 11(5), e0154002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154002>
- Kubo, A., Fukui, H., Inagaki, N., Kanamura, A., & Wada, H. (1991). Histamine-induced cyclic AMP accumulation in type-1 and type-2 astrocytes in primary culture. *European Journal of Pharmacology*, 208(3), 249–253. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(91\)90102-n](https://doi.org/10.1016/0922-4106(91)90102-n)
- Lange, S. C., Bak, L. K., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., & Norenberg, M. D. (2012). Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochemical Research*, 37(11), 2569–2588. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0868-0>
- Leurs, R., Hough, L. B., Blandina, P., & Haas, H. L. (2012). Histamine. Basic Neurochemistry (Eighth Edition). *Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*, 323–341. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374947-5.00016-x>
- Leurs, R., Traffort, E., Arrang, J. M., Tardivel-Lacombe, J., Ruat, M., & Schwartz, J. C. (1994). Guinea pig histamine H₁ receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways. *Journal of Neurochemistry*, 62(2), 519–527. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62020519.x>
- Li, A., Guo, H., Luo, X., Sheng, J., Yang, S., Yin, Y., Zhou, J., & Zhou, J. (2006). Apomorphine-induced activation of dopamine receptors modulates FGF-2 expression in astrocytic cultures and promotes survival of dopaminergic neurons. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(8), 1263–1265. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5510fje>
- Lipfert, J., Ödemis, V. & Engele, J. (2013). Grk2 is an essential regulator of CXCR7 signalling in astrocytes. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 33, 111–118 <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9876-5>
- Lipnik-Štangelj, M., & Čarman-Kržan, M. (2004). Activation of histamine H₁-receptor enhances neurotrophic factor secretion from cultured astrocytes. *Inflammation Research*, 53(6), 245–252. <https://doi.org/10.1007/s00011-004-1247-3>
- Lipnik-Stangelj, M., & Carman-Krzan, M. (2006). Effects of histamine and IL-1 β on PKC-stimulated nerve growth factor secretion from glial cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society...* [et al.], 55 Suppl 1, S34–S35. <https://doi.org/10.1007/s00011-005-0030-4>
- Lipnik-Stangelj, M., Juric, D. M., & Carman-Krzan, M. (1998). Histamine-induced synthesis and secretion of nerve growth factor from astrocytes. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society...* [et al.], 47 (S1), S34–S35. <https://doi.org/10.1007/s000110050255>

- Liu, J., Wang, F., Huang, C., Long, L. H., Wu, W. N., Cai, F., Wang, J. H., Ma, L. Q., & Chen, J. G. (2009). Activation of phosphatidylinositol-linked novel D₁ dopamine receptor contributes to the calcium mobilization in cultured rat prefrontal cortical astrocytes. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(3), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9323-9>
- Manz, K. M., Becker, J. C., Grueter, C. A., & Grueter, B. A. (2021). Histamine H₃ receptor function biases excitatory gain in the nucleus accumbens. *Biological Psychiatry*, 89(6), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.07.023>
- Maruko, T., Nakahara, T., Sakamoto, K., Saito, M., Sugimoto, N., Takuwa, Y., & Ishii, K. (2005). Involvement of the $\beta\gamma$ subunits of G proteins in the cAMP response induced by stimulation of the histamine H₁ receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 372(2), 153–159. <https://doi.org/10.1007/s00210-005-0001-x>
- McHugh, P. C., & Buckley, D. A. (2015). The structure and function of the dopamine transporter and its role in CNS diseases. *Vitamins and Hormones*, 98, 339–369. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.12.009>
- Mele, T., & Jurič, D. M. (2013). Identification and pharmacological characterization of the histamine H₃ receptor in cultured rat astrocytes. *European Journal of Pharmacology*, 720(1–3), 198–204.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F. J., Miyoshi, K., & Ogawa, N. (2004). Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Research*, 1029(1), 120–123. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.09.014>
- Molina-Hernández, A., Nuñez, A., & Arias-Montaña, J. A. (2000). Histamine H₃-receptor activation inhibits dopamine synthesis in rat striatum. *Neuroreport*, 11(1), 163–166. <https://doi.org/10.1097/00001756-200001170-00032>
- Moreno-Delgado, D., Torrent, A., Gómez-Ramírez, J., de Esch, I., Blanco, I., & Ortiz, J. (2006). Constitutive activity of H₃ autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway. *Neuropharmacology*, 51(3), 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.010>
- Moreno, E., Hoffmann, H., Gonzalez-Sepúlveda, M., Navarro, G., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Vignes, M., McCormick, P. J., Canela, E. I., Lluís, C., Moratalla, R., Ferré, S., Ortiz, J., & Franco, R. (2011). Dopamine D₁-histamine H₃ receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5846–5854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161489>

- Moriguchi, T., & Takai, J. (2020). Histamine and histidine decarboxylase: immunomodulatory functions and regulatory mechanisms. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 25(7), 443–449. <https://doi.org/10.1111/gtc.12774>
- Morimoto, K., Ouchi, M., Kitano, T., Eguchi, R., & Otsuguro, K. I. (2022). Dopamine regulates astrocytic IL-6 expression and process formation via dopamine receptors and adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*, 928, 175110. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175110>
- Muly, E. C., Maddox, M., & Khan, Z. U. (2010). Distribution of D₁ and D₅ dopamine receptors in the primate nucleus accumbens. *Neuroscience*, 169(4), 1557–1566. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.025>
- Nagatomo, K., Suga, S., Saitoh, M., Kogawa, M., Kobayashi, K., Yamamoto, Y., & Yamada, K. (2017). Dopamine D₁ receptor immunoreactivity on fine processes of GFAP-positive astrocytes in the substantia nigra pars reticulata of adult mouse. *Frontiers in neuroanatomy*, 11, 3. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00003>
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 814, 23–45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Ohta, K., Kuno, S., Inoue, S., Ikeda, E., Fujinami, A., & Ohta, M. (2010). The effect of dopamine agonists: the expression of GDNF, NGF, and BDNF in cultured mouse astrocytes. *Journal of the Neurological Sciences*, 291(1-2), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.01.013>
- Ohta, K., Kuno, S., Mizuta, I., Fujinami, A., Matsui, H., & Ohta, M. (2003). Effects of dopamine agonists bromocriptine, pergolide, cabergoline, and SKF-38393 on GDNF, NGF, and BDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Life Sciences*, 73(5), 617–626. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00321-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00321-7)
- Panula, P., Chazot, P. L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W. L., Stark, H., Thurmond, R. L., & Haas, H. L. (2015). International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 67(3), 601–655. <https://doi.org/10.1124/pr.114.010249>
- Panula, P., Yang, H. Y., & Costa, E. (1984). Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(8), 2572–2576. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.8.2572>
- Parra-Abarca, J., Rivera-Ramírez, N., Villa-Maldonado, L. F., García-Hernández, U., Aguilera, P., & Arias-Montaña, J. A. (2019). Histamine H₁ and H₃ receptor activation increases the expression of glucose transporter 1 (GLUT-1) in rat cerebro-cortical astrocytes in primary culture. *Neurochemistry International*, 131, 104565. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104565>

- Perdan, K., Lipnik-Štangelj, M., & Kržan, M. (2009). Chapter 8. The impact of astrocytes in the clearance of neurotransmitters by uptake and inactivation. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 211–235. [https://doi.org/10.1016/s1554-4516\(09\)09008-5](https://doi.org/10.1016/s1554-4516(09)09008-5)
- Pfriege, F. W., & Barres, B. A. (1997). Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science*, 277(5332), 1684–1687. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1684>
- Pitcher, J. A., Freedman, N. J., & Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptor kinases. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 653–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.653>
- Porter, J. T., & McCarthy, K. D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Progress in Neurobiology*, 51(4), 439–455. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(96\)00068-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(96)00068-8)
- Powell, K. (2007). Histamine receptors. *Pharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–2. <https://doi.org/10.1016/b978-008055232-3.60127-8>
- Puttonen, H., Semenova, S., Sundvik, M., & Panula, P. (2017). Storage of neural histamine and histaminergic neurotransmission is VMAT2 dependent in the zebrafish. *Scientific Reports*, 7(1), 3060. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02981-w>
- Qiu, J., Yan, Z., Tao, K., Li, Y., Li, Y., Li, J., Dong, Y., Feng, D., & Chen, H. (2016). Sinomenine activates astrocytic dopamine D₂ receptors and alleviates neuroinflammatory injury via the CRYAB/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 263. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0739-8>
- Rapanelli, M., Frick, L. R., Horn, K. D., Schwarcz, R. C., Pogorelov, V., Nairn, A. C., & Pittenger, C. (2016). The histamine H₃ receptor differentially modulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt Signaling in striatonigral and striatopallidal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(40), 21042–21052. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.731406>
- Reuss, B., Leung, D. S., Ohlemeyer, C., Kettenmann, H., & Unsicker, K. (2000). Regionally distinct regulation of astroglial neurotransmitter receptors by fibroblast growth factor-2. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 16(1), 42–58. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0857>
- Ricci, G., Volpi, L., Pasquali, L., Petrozzi, L., & Siciliano, G. (2009). Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders. *Journal of Biological Physics*, 35(4), 317–336. <https://doi.org/10.1007/s10867-009-9157-9>
- Richfield, E. K., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). Comparative distributions of dopamine D₁ and D₂ receptors in the cerebral cortex of rats, cats, and monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*, 286(4), 409–426. <https://doi.org/10.1002/cne.902860402>

- Sánchez-Lemus, E., & Arias-Montaña, J. A. (2004). Histamine H₃ receptor activation inhibits dopamine D₁ receptor-induced cAMP accumulation in rat striatal slices. *Neuroscience Letters*, 364(3), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.04.045>
- Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K., & Schachtrup, C. (2013). Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (71), 50079. <https://doi.org/10.3791/50079>
- Schwartz, J. C., Arrang, J. M., Garbarg, M., Pollard, H., & Ruat, M. (1991). Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiological Reviews*, 71(1), 1–51. <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.1.1>
- Shahid M, Tripathi T, Sobia F, Moin S, Siddiqui M, Ali Khan R (2009). Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: an updated systematic review. *Open Immunology Journal*, 2: 9–41. <https://doi.org/10.2174/1874226200902010009>
- Shao, W., Zhang, S. Z., Tang, M., Zhang, X. H., Zhou, Z., Yin, Y. Q., Zhou, Q. B., Huang, Y. Y., Liu, Y. J., Wawrousek, E., Chen, T., Li, S. B., Xu, M., Zhou, J. N., Hu, G., & Zhou, J. W. (2013). Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D₂ receptors via αB-crystallin. *Nature*, 494(7435), 90–94. <https://doi.org/10.1038/nature11748>
- Shulman, R. G., Hyder, F., & Rothman, D. L. (2001). Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 6417–6422. <https://doi.org/10.1073/pnas.101129298>
- Sidhu A. (1998). Coupling of D₁ and D₅ dopamine receptors to multiple G proteins: implications for understanding the diversity in receptor-G protein coupling. *Molecular Neurobiology*, 16(2), 125–134. <https://doi.org/10.1007/BF02740640>
- Smythies J. (2005). Section II. The dopamine system. *International Review of Neurobiology*, 64, 123–172. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(05\)64002-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)64002-0)
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Soria-Jasso, L. E., & Arias-Montaña, J. A. (1996). Histamine H₁ receptor activation stimulates [³H]-GABA release from human astrocytoma U373 MG cells. *European Journal of Pharmacology*, 318(1), 185–192. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(96\)00782-0](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(96)00782-0)
- Standaert D. G. & Sung V W. (2016). Pharmacology of Dopaminergic Neurotransmission: Biochemistry and cell biology of dopaminergic neurotransmission. *Basicmedical KeyFastest Basicmedical Insight Engine*.
- Sutin, J., & Shao, Y. (1992). Resting and reactive astrocytes express adrenergic receptors in the adult rat brain. *Brain Research Bulletin*, 29(3-4), 277–284. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90057-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90057-5)

- Tiberi, M., Jarvie, K. R., Silvia, C., Falardeau, P., Gingrich, J. A., Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Feng, T. L., Fremeau, R. T., Jr, & Caron, M. G. (1991). Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D₁ dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D_{1A} receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7491–7495. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7491>
- Tiberi, M., Nash, S. R., Bertrand, L., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (1996). Differential regulation of dopamine D_{1A} receptor responsiveness by various G protein-coupled receptor kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3771–3778. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3771>
- Tritsch, N. X., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*, 76(1), 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.023>
- Tsvetanova, N. G., Trester-Zedlitz, M., Newton, B. W., Peng, G. E., Johnson, J. R., Jimenez-Morales, D., Kurland, A. P., Krogan, N. J., & von Zastrow, M. (2021). Endosomal cAMP production broadly impacts the cellular phosphoproteome. *The Journal of Biological Chemistry*, 297(1), 100907. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100907>
- Valko, P. O., Gavrilov, Y. V., Yamamoto, M., Reddy, H., Haybaeck, J., Mignot, E., Baumann, C. R., & Scammell, T. E. (2013). Increase of histaminergic tuberomammillary neurons in narcolepsy. *Annals of Neurology*, 74(6), 794–804. <https://doi.org/10.1002/ana.24019>
- Varaschin, R. K., Osterstock, G., Ducrot, C., Leino, S., Bourque, M. J., Prado, M., Prado, V. F., Salminen, O., Rannanpää Née Nuutinen, S., & Trudeau, L. E. (2018). Histamine H₃ receptors decrease dopamine release in the ventral striatum by reducing the activity of striatal cholinergic interneurons. *Neuroscience*, 376, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.027>
- Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure & Function*, 222(5), 2017–2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2016). The homeostatic astroglia emerges from evolutionary specialization of neural cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 371(1700), 20150428. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0428>
- Vermeulen, R. J., Jongenelen, C. A., Langeveld, C. H., Wolters, E. C., Stoof, J. C., & Drukarch, B. (1994). Dopamine D₁ receptor agonists display a different intrinsic activity in rat, monkey and human astrocytes. *European Journal of Pharmacology*, 269(1), 121–125. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(94\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90034-5)
- Wada, H., Inagaki, N., Itowi, N., & Yamatodani, A. (1991). Histaminergic neuron system in the brain: distribution and possible functions. *Brain Research Bulletin*, 27(3-4), 367–370. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90126-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90126-5)

Wahis, J., Hennes, M., Arckens, L., & Holt, M. G. (2021). Star power: the emerging role of astrocytes as neuronal partners during cortical plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 67, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.12.001>

Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M., & Wada, H. (1984). Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Research*, 295(1), 13–25. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90811-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90811-4)

Widnell, K. L., Chen, J. S., Iredale, P. A., Walker, W. H., Duman, R. S., Habener, J. F., & Nestler, E. J. (1996). Transcriptional regulation of CREB (cyclic AMP response element-binding protein) expression in CATH.a cells. *Journal of Neurochemistry*, 66(4), 1770–1773. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66041770.x>

Xu, J., Zhang, X., Qian, Q., Wang, Y., Dong, H., Li, N., Qian, Y., & Jin, W. (2018). Histamine upregulates the expression of histamine receptors and increases the neuroprotective effect of astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1068-x>

Yan, S. Z., Huang, Z. H., Andrews, R. K., & Tang, W. J. (1998). Conversion of forskolin-insensitive to forskolin-sensitive (mouse-type IX) adenylyl cyclase. *Molecular Pharmacology*, 53(2), 182–187. <https://doi.org/10.1124/mol.53.2.182>

Yoshikawa, T., Nakamura, T., & Yanai, K. (2019). Histamine N-methyltransferase in the brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 737. <https://doi.org/10.3390/ijms20030737>

Zamponi, G. W., & Currie, K. P. (2013). Regulation of Ca_v2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(7), 1629–1643. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.004>

Zanassi, P., Paolillo, M., Montecucco, A., Avvedimento, E. V., & Schinelli, S. (1999). Pharmacological and molecular evidence for dopamine D₁ receptor expression by striatal astrocytes in culture. *Journal of Neuroscience Research*, 58(4), 544–552. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4547\(19991115\)58:4<544::aid-jnr7>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4547(19991115)58:4<544::aid-jnr7>3.0.co;2-9)

Zhang, X., Zhou, Z., Wang, D., Li, A., Yin, Y., Gu, X., Ding, F., Zhen, X., & Zhou, J. (2009). Activation of phosphatidylinositol-linked D₁-like receptor modulates FGF-2 expression in astrocytes via IP₃-dependent Ca²⁺ signaling. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(24), 7766–7775. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0389-09.2009>

Zhang, Y., Chen, Y., Wu, J., Manaenko, A., Yang, P., Tang, J., Fu, W., & Zhang, J. H. (2015). Activation of dopamine D₂ receptor suppresses neuroinflammation through αB-Crystalline by inhibition of NF-κB nuclear translocation in experimental ICH mice model. *Stroke*, 46(9), 2637–2646. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.009792>

Zhou, Z., Ikegaya, Y., & Koyama, R. (2019). The astrocytic cAMP pathway in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 779. <https://doi.org/10.3390/ijms20030779>

Zhuang, Q. X., Xu, H. T., Lu, X. J., Li, B., Yung, W. H., Wang, J. J., & Zhu, J. N. (2018). Histamine excites striatal dopamine D₁ and D₂ receptor-expressing neurons via postsynaptic H₁ and H₂ receptors. *Molecular Neurobiology*, 55(10), 8059–8070. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0976-1>