



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Modulación de la captura de glutamato
por la activación del receptor a histamina H₃
en astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario**

T E S I S

Que presenta

Lic. Biomed. Yrving Daniel Díaz De Lucio

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, 2024

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, bajo la dirección del Dr. José Antonio Arias Montaña. Se extiende un agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) 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 1240251.



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Cinvestav

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. José Antonio Arias Montaña, por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus enseñanzas y aportaciones a mi formación profesional, y por estar siempre dispuesto a resolver las dudas surgidas durante la realización de este proyecto.

Agradezco también a mis asesores de tesis, el Dr. Antonio Bueno Nava del Instituto Nacional de Rehabilitación y el Dr. Benjamín Florán Garduño del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, por sus aportaciones muy acertadas hacia mi proyecto, contribuyendo a mi formación académica y personal.

Un agradecimiento especial a mis padres Rubén Díaz y Vianey De Lucio, así como a mi hermana Lizeth Daniela, por la confianza que han depositado en mí, siendo un pilar fundamental de apoyo en todo momento.

Agradezco extensamente a Rina Merari, por su apoyo y motivación constantes durante momentos clave en el posgrado, y por celebrar conmigo cada pequeño logro en mi formación profesional.

También agradezco a Carlos Almazán, Fernanda Serrato, Oscar Núñez y Ariadna Cerezo por sus palabras de aliento y apoyo moral durante el posgrado.

Extiendo un agradecimiento al Dr. Juan Escamilla Sánchez y al técnico Raúl González Pantoja, por el apoyo que me brindaron durante la fase experimental de este proyecto.

CONTENIDO

<i>ÍNDICE</i>	<i>II</i>
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>IV</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>VI</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>VIII</i>

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. <i>Abstract</i>.....	2
3. Introducción	3
3.1. Astrocitos	3
3.2. Sistema glutamatérgico del sistema nervioso central (SNC).....	5
3.3. Sistema histaminérgico del SNC.....	6
4. Antecedentes generales	9
4.1. Receptores a glutamato.....	9
4.2. Regulación del metabolismo del glutamato por los astrocitos	11
4.3. Captura de glutamato por los astrocitos	16
4.4. Receptores a histamina en el SNC	19
5. Antecedentes específicos.....	24
5.1. Regulación de la expresión de los transportadores de glutamato en los astrocitos	24
5.2. H ₃ R en los astrocitos	26
6. Justificación.....	30
7. Hipótesis	32
8. Objetivos.....	33
8.1. Objetivo general	33
8.2. Objetivos específicos	33
9. Materiales y métodos	34
9.1. Animales	34
9.2. Obtención de cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales.....	34
9.3. Curso temporal de la captura de glutamato	35
9.4. Efecto en la captura de glutamato de inhibidores selectivos de los transportadores EAAT1 y EAAT2.....	36
9.5. Efecto de la activación aguda (15 min) del H ₃ R en la captura de glutamato	37
9.6. Efecto de la activación subaguda (1-4 días) del H ₃ R en la captura de glutamato.....	38
9.7. Análisis estadístico	39
10. Resultados	40
10.1. Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.....	40
10.2. La captura de glutamato por los astrocitos en cultivo primario es reducida significativamente por el inhibidor TFB-TBOA.....	41
10.3. La activación aguda del H ₃ R no modifica la captura de glutamato por los astrocitos en cultivo primario.....	44
10.4. La activación subaguda del H ₃ R aumenta la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.....	45
11. Discusión	48

11.1. Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario	48
11.2. Inhibición por TFB-TBOA y DHKA de la captura de glutamato por los astrocitos.....	48
11.3. Activación aguda del H ₃ R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario	49
11.4. Activación subaguda del H ₃ R y captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario	50
12. Conclusiones	52
13. Perspectivas.....	53
14. Referencias	54

ABREVIATURAS

α -KG	α -cetoglutarato
Akt/PKB	Cinasa B de proteínas
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc	3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina
AMPK	Cinasa de proteínas activada por AMP
APB	Bromhidrato de cloro-APB (SKF 82958)
A2AR	Receptor a adenosina A _{2A}
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CaMKII	Cinasa de proteínas dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
D ₁ R	Receptor a dopamina D ₁
D ₂ R	Receptor a dopamina D ₂
DAG	1,2-diacilglicerol
dbAMPc	Dibutilil 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
DHKA	Ácido dihidrokaínico
EAATs	Transportadores de aminoácidos excitadores de alta afinidad
EAAT1	Transportador de glutamato/aspartato (GLAST)
EAAT2	Transportador a glutamato 1 (GLT-1)
EAAT3	Acarreador de aminoácidos excitadores 1 (EAAC1)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de células gliales
GIRKs	Canales de K ⁺ rectificadores entrantes activados por proteínas G
GLUT-1	Transportador de glucosa 1
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GS	Sintasa de glutamina
GSK-3 β	3 β -Cinasa de la sintasa de glucógeno
H ₁ R	Receptor a histamina H ₁
H ₂ R	Receptor a histamina H ₂

H ₃ R	Receptor a histamina H ₃
H ₄ R	Receptor a histamina H ₄
HDC	Descarboxilasa de histidina
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
iGluRs	Receptores ionotrópicos de glutamato
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
MAPKs	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
mGluRs	Receptores metabotrópicos a glutamato
NF-κB	Factor nuclear-kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
PAG	Glutaminasa activada por fosfatos
PDGF	Factor neurotrófico derivado de plaquetas
PI3K	3-cinasa de fosfatidil inositol
PKA	Cinasa A de proteínas
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PKC	Cinasa C de proteínas
SNC	Sistema nervioso central
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TGFα	Factor de crecimiento transformante α
TMN	Núcleo tuberomamilar

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de algunas interacciones funcionales de los astrocitos bajo condiciones fisiológicas.....	4
Figura 2. Esquema representativo del sistema histaminérgico en el cerebro humano.....	6
Figura 3. Diagrama Richardson de la estructura general de los iGluRs.....	10
Figura 4. Transmisión sináptica y función mitocondrial en condiciones fisiológicas y de neurodegeneración.....	13
Figura 5. Ciclo glutamato-glutamina.....	14
Figura 6. Distribución de la radiactividad presente en glutamato (□), glutamina (▲), aspartato (X) y metabolitos desaminados de glutamato (○) en astrocitos en cultivo primario de rata, en función del tiempo de incubación.....	15
Figura 7. Neurotoxicidad por L-glutamato en cultivos neuronales pobres y ricos en astrocitos.....	16
Figura 8. Efectos intracelulares de la activación de los H ₃ Rs.....	21
Figura 9. Autoinhibición de la síntesis y liberación de histamina por la activación de H ₃ Rs presinápticos.....	22
Figura 10. El raloxifeno aumenta la expresión del EAAT2/GTL-1 y la fosforilación de ERK, Akt-PKB, EGFR y CREB.....	26
Figura 11. Expresión de las isoformas del rH ₃ R en tejido nativo y en cultivo primario de astrocitos de la rata.....	27
Figura 12. Mecanismos propuestos para el efecto estimulante de la activación de los H ₁ Rs y H ₃ Rs en la expresión de la proteína del transportador de glucosa GLUT-1.....	28
Figura 13. Inmunorreactividad a la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) en astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario.....	35
Figura 14. Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos corticales en cultivo primario.....	40
Figura 15. Efecto de inhibidores de los EAATs en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.....	42

Figura 16. Curvas concentración-respuesta de la inhibición de la captura de glutamato por TFB-TBOA y DHKA en astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario.43

Figura 17. La activación aguda de los receptores D₁, D₂ y H₃ no modifica la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.44

Figura 18. La activación subaguda del H₃R modifica captura de glutamato por los astrocitos en cultivo primario.....45

Figura 19. El yodofenpropit, antagonista selectivo del H₃R, previene el aumento en la captura de glutamato por astrocitos inducido por el agonista immepip.....46

Figura 20. Efecto de inhibidores selectivos de las MEK-1/2 o de las PKCs en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario47

Figura 21. Mecanismo propuesto para el efecto estimulador de la activación de los H₃Rs en la expresión del EAAT1 y EAAT2 por astrocitos cerebro-corticales.51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características moleculares y funcionales de los receptores a histamina expresados en el SNC.	8
Tabla 2. Expresión neuronal y astrocítica de los EAATs.	17

1. Resumen

El glutamato, como principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC), es fundamental en diversos procesos fisiológicos, incluida la transmisión de señales neuronales y la plasticidad sináptica. Sin embargo, su desregulación puede conducir a neurodegeneración por excitotoxicidad. Para controlar y contrarrestar los efectos nocivos del glutamato excedente, los transportadores de aminoácidos excitadores de alta afinidad (EAATs) capturan al glutamato del espacio sináptico, contribuyendo a la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica. Los astrocitos expresan altos niveles de EAATs, especialmente EAAT1 y EAAT2, responsables de ~90% de la captura del glutamato.

El receptor a histamina H₃ (H₃R) se expresa tanto en neuronas como en astrocitos, con una localización importante en regiones como el hipotálamo, la corteza cerebral y el neocórtex. Las vías de señalización activadas por el H₃R incluyen algunas que se han asociado con la modulación de la expresión de los EAATs, como las vías PLC /PKC y ERK; sin embargo, la información sobre la función del H₃R en astrocitos es todavía escasa. Por esta razón, este trabajo se centró en evaluar el efecto de la activación de los H₃Rs astrocíticos en la captura de glutamato utilizando cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales.

En astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario la captura de glutamato se debe principalmente al EAAT1, a diferencia del cerebro adulto donde participa mayormente el EAAT2. La activación aguda (15 min) del H₃R no modificó la captura de glutamato; sin embargo, la activación subaguda por 1, 2 y 3 días aumentó significativamente la captura del neurotransmisor, posiblemente por estimulación de las vías de señalización involucradas en la expresión de los EAATs. El antagonismo de los H₃Rs y la inhibición de las PKCs y de MEK-1/2 previno el aumento en la captura de glutamato inducido por la activación tónica del receptor en astrocitos cerebro-corticales, sugiriendo la participación de la vía H₃R → PKC → MEK-1/2.

2. Abstract

Glutamate, as the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS), plays a fundamental role in various physiological functions, including neurotransmission and synaptic plasticity. However, its dysregulation can lead to neurodegeneration through excitotoxicity. To counteract the harmful effects of the excess of glutamate, high-affinity excitatory amino acid transporters (EAATs) capture and recycle glutamate from the synaptic space, contributing to the modulation of glutamatergic neurotransmission. Astrocytes express high levels of EAATs, especially EAAT1 and EAAT2, responsible for ~90% of glutamate uptake.

The histamine H₃ receptor (H₃R) is expressed in both neurons and astrocytes, with a prominent localization in regions such as the hypothalamus, cerebral cortex, and striatum. Signaling pathways activated by the H₃R include some associated with the modulation of EAAT expression, such as PLC/PKC, ERK, and PI3K/Akt-PKB; however, information about the function of the H₃R in astrocytes is still scarce. Therefore, this study addressed the effect of H₃R activation on glutamate uptake by cerebro-cortical astrocytes in primary culture.

The results showed that in astrocytes glutamate uptake occurs mainly by the action of EAAT1, unlike the adult brain where EAAT2 is mostly involved. Acute (15 min) activation of the H₃R did not modify glutamate uptake. However, the subacute activation for 1, 2, and 3 days significantly increased neurotransmitter uptake, possibly through the signaling pathways reported to regulate EAAT expression.

The pharmacological blockade of H₃R and the inhibition of PKC and MEK-1/2 prevented the increase in glutamate uptake induced by the subacute activation of H₃R in cerebro-cortical astrocytes suggesting the involvement of the pathway H₃R → PKC → MEK-1/2.

3. Introducción

3.1. Astrocitos

La glía se constituye por células no neuronales especializadas que participan de manera importante en el desarrollo y función del sistema nervioso central (SNC) y en los procesos patológicos que lo afectan (Lee *et al.*, 2022). Estas células incluyen la microglía, los oligodendrocitos, las células progenitoras de oligodendrocitos, la glía radial y los astrocitos (Allen y Lyons, 2018; Lee *et al.*, 2022). Los astrocitos constituyen alrededor del 90% de la población celular del SNC humano (Herculano-Hozuel, 2014; Gorshkov *et al.*, 2018; Brazhe *et al.*, 2023) y poseen una citoarquitectura y distribución espacial (Fig. 1) que les permite percibir y responder a diversos estímulos del medio que los rodea (Gorshkov *et al.*, 2018; Tavares *et al.*, 2024).

De acuerdo con sus características morfofuncionales, los astrocitos se clasifican en dos tipos: a) protoplasmáticos, localizados principalmente en la materia gris, con extensiones radiales ramificadas que conectan con numerosas sinapsis; y b) fibrosos, ubicados en la materia blanca, con procesos largos y delgados que se ramifican y se conectan con los nodos de Ranvier (Sofroniew y Vinters, 2010; Gorshkov *et al.*, 2018).

Durante varias décadas, se consideró que la única función de los astrocitos era proporcionar soporte estructural a las neuronas, sin embargo, en la actualidad se reconoce que estas células participan en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Molofsky y Deneen, 2015; Olsen *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2022). Los astrocitos maduros participan en la regulación de la sinaptogénesis y de la transmisión sináptica, la homeostasis iónica, mantenimiento de la barrera hematoencefálica, modulación del metabolismo de glucosa, secreción de factores neurotróficos, provisión de nutrientes y oxígeno, disminución del estrés oxidativo y reparación tisular, entre otros procesos (Volterra y Meldolesi, 2005; Belmaati-Cherkaoui *et al.*, 2021; Wahis *et al.*, 2021; McNair *et al.*, 2023; Cantando *et al.*, 2024; Escalada *et al.*, 2024). Además, durante el neurodesarrollo participan en procesos como la neurogénesis,

brindando apoyo trófico a las neuronas para la formación y mantenimiento de los circuitos neuronales (Ricci *et al.*, 2009; Bartkoska *et al.*, 2024).

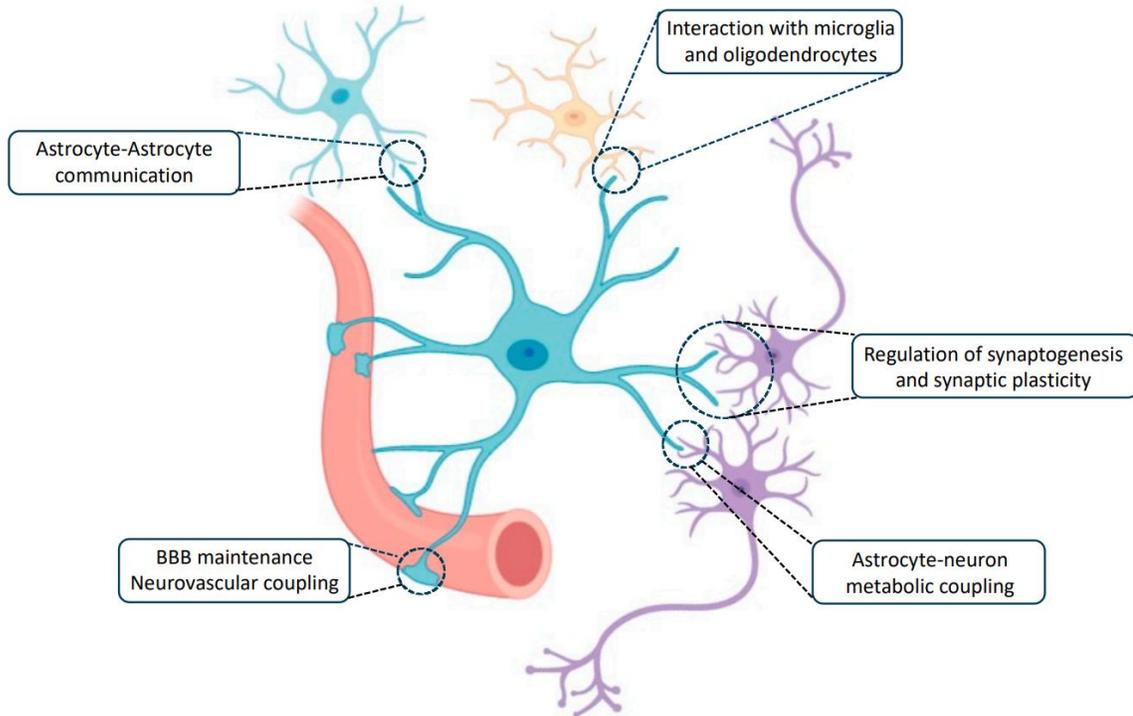


Figura 1. Representación esquemática de algunas interacciones funcionales de los astrocitos bajo condiciones fisiológicas. Se muestra la comunicación astrocito-astrocito, el mantenimiento neurovascular de la barrera hematoencefálica (BBB), la interacción de los astrocitos con la microglía y los oligodendrocitos, así como el acoplamiento metabólico astrocito-neurona, además de la regulación de la sinaptogénesis y de la plasticidad sináptica (Imagen tomada de Escalada *et al.*, 2024).

3.2. Sistema glutamatérgico del sistema nervioso central (SNC)

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC de los vertebrados y está presente en prácticamente todas las regiones del cerebro, estando implicado en procesos como la plasticidad sináptica, la neurogénesis, consolidación de la memoria, migración y diferenciación celulares, así como en la neurodegeneración (Birur *et al.*, 2017; Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021).

La mayor parte de glutamato en el cerebro procede de la síntesis local en las terminales sinápticas a partir del aminoácido L-glutamina debido al ciclo glutamato/glutamina; una vez sintetizado, se almacena en vesículas sinápticas hasta su liberación al espacio sináptico (Albarracin *et al.*, 2016).

Este neurotransmisor ejerce sus acciones mediante la activación de receptores ionotrópicos que producen una rápida despolarización de la membrana celular, y de receptores metabotrópicos (mGluRs, por *metabotropic Glutamate Receptors*) que pueden promover respuestas excitadoras o inhibitoras lentas, aunque más prolongadas, dependiendo del grupo de mGluR que activen, con ambos tipos de receptores ampliamente distribuidos tanto en neuronas como en astrocitos (Stanley *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2023).

Una vez que el glutamato lleva a cabo sus efectos fisiológicos, sus niveles extracelulares deben ser restablecidos a las concentraciones encontradas en condiciones de baja actividad sináptica, ya que la sobre-activación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos produce muerte neuronal, proceso denominado excitotoxicidad (Maragakis y Rothstein, 2004; Martínez-Lozada y Ortega, 2023).

La mayor parte de los trastornos neurodegenerativos se asocian con alteraciones en la concentración de ciertos neurotransmisores, entre ellos el glutamato (Pannasch *et al.*, 2014; Remahi *et al.*, 2024). Por esta razón, es necesaria una comunicación bidireccional glial/neuronal finamente coordinada para la adecuada transducción de señales por parte de este neurotransmisor

(Silva-Parra *et al.*, 2023). La regulación de la transmisión glutamatérgica se produce a nivel de su síntesis y liberación por las terminales glutamatérgicas, así como por su remoción del espacio sináptico mediante transportadores presentes principalmente en la membrana plasmática de astrocitos peri-sinápticos y, en menor proporción, en las mismas neuronas glutamatérgicas (Holmseth *et al.*, 2012; Jungblut *et al.*, 2012; Danbolt *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019; Das *et al.*, 2024).

3.3. Sistema histaminérgico del SNC

La histamina es una amina biogénica endógena ampliamente presente en el cuerpo de los mamíferos. En el cerebro, se sintetiza a partir del aminoácido L-histidina por la acción de la enzima descarboxilasa de histidina (HDC, por *Histidine Descarboxylase*) expresada por neuronas del núcleo tuberomamilar (TMN, por *Tuberomamillary Nucleus*) localizado en el hipotálamo posterior (Panula y Nuutinen, 2013).

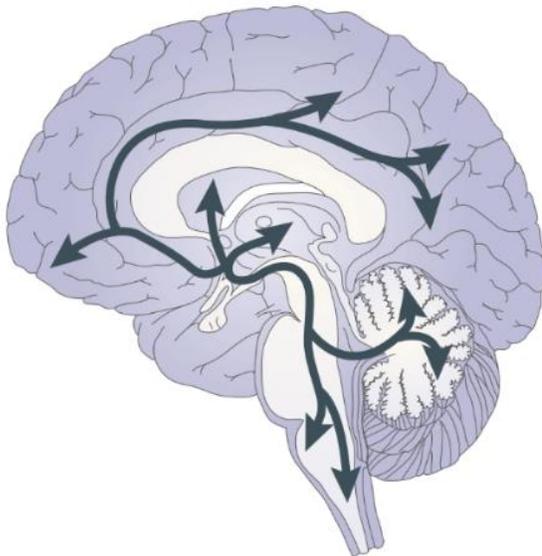


Figura 2. Esquema representativo del sistema histaminérgico en el cerebro humano. Corte sagital que muestra las principales vías histaminérgicas ascendentes y descendentes desde el hipotálamo posterior hacia la corteza, el neocórtex, el tálamo, el cerebelo, el tallo del encéfalo y la médula espinal (Imagen modificada de Panula y Nuutinen, 2013).

Con aproximadamente 65,000 neuronas histaminérgicas en el cuerpo humano, estas células proyectan sus axones amielínicos hacia diversas áreas del cerebro, donde regulan una amplia variedad de funciones como el ciclo sueño-vigilia, la temperatura corporal, la actividad motriz, procesos inflamatorios, la percepción del dolor, el comportamiento sexual, y la memoria y el aprendizaje, mediante la modulación de la excitabilidad neuronal y la transmisión de señales (Fig. 2) (Benarroch, 2010; Aquino-Miranda *et al.*, 2012; Panula y Nuutinen, 2013; Provensi *et al.*, 2020; Philippu, 2023). Sin embargo, la histamina también está implicada en diversos procesos patológicos relacionados con neurodegeneración (Xu *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2021).

Los efectos de la histamina se deben a la activación de cuatro receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por *G Protein-Coupled Receptor*): H₁R, H₂R, H₃R y H₄R, que activan o modulan diversas vías de señalización para generar respuestas celulares específicas (Tabla 1). En el SNC los efectos de la histamina en células neuronales se restringen a la activación de los receptores H₁R, H₂R y H₃R (Lin *et al.*, 2023; Xu y Pittenger, 2023).

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)
Aminoácidos	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, ↑ AMP _c , ↑ PKA	↓ AC, ↓ AMP _c , ↑ [Ca ²⁺] _i , ↑ MAPKs, ↑ Akt/GSK3 β
Agonistas selectivos	2-tiazoliletilamina Histaprodifeno	Dimaprit Amtamina	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]-tiotidina [¹²⁵ I]- yodoamino- potentidina	[³ H]-N- α - metilhistamina [³ H]-R- α - metilhistamina [¹²⁵ I]-yodoproxifan

Tabla tomada de Almazán-Gregorio, 2022.

4. Antecedentes generales

4.1. Receptores a glutamato

El glutamato ejerce su actividad excitadora en el SNC a partir de la activación de receptores pre y postsinápticos ionotrópicos o metabotrópicos (Birur *et al.*, 2017; Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021; Chen *et al.*, 2023).

La distinción entre receptores ionotrópicos y metabotrópicos fue introducida en 1979 (Eccles y McGeer, 1979), a partir de la señalización diferencial de los neurotransmisores por la activación de sus receptores (Brunetti *et al.*, 2024). Los receptores ionotrópicos (iGluRs) son proteínas transmembranales activadas por ligandos que modulan el flujo de iones al interior de la célula, promoviendo una excitación postsináptica rápida, mientras que los receptores metabotrópicos son GPCRs que inducen una respuesta celular excitadora o inhibitoria más lenta, aunque más prolongada, modulando la actividad de los canales iónicos de manera directa o indirecta mediante la acción de segundos mensajeros intracelulares (Chen *et al.*, 2023).

A inicios de la década de 1980 se identificaron los receptores ionotrópicos a glutamato (Belkacemi *et al.*, 2024). Los iGluRs son una familia de canales iónicos que comparten la conformación de tetrámeros de subunidades, y que están involucrados en procesos como la plasticidad y la transmisión sináptica (Wo y Oswald, 1995; González y Jayaraman, 2024). Esta familia incluye los receptores al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), al N-metil-D-aspartato (NMDA), y al kainato (Hansen *et al.*, 2021), inicialmente clasificados de acuerdo con sus propiedades farmacológicas y posteriormente por la clonación de sus respectivas subunidades, mostrando una gran correlación entre la identidad de sus secuencias y sus propiedades farmacológicas (Hollmann y Heinemann, 1994).

Las subunidades de los iGluRs se disponen como un receptor tetramérico con un dominio N-terminal en la región extracelular, que media el ensamblaje, tráfico y regulación funcional del receptor; un dominio de unión al ligando

compuesto por dos segmentos polipeptídicos S1 y S2, que se separan por dos hélices transmembrana M1 y M3, así como un bucle M3 que entra a la membrana, y que junto con la región M4, conforman un dominio transmembranal (Fig. 3); el dominio C-terminal se encuentra en el citoplasma y dirige la localización y regulación funcional de los iGluRs, al ser un sitio para modificaciones postraduccionales (González y Jayaraman, 2024).

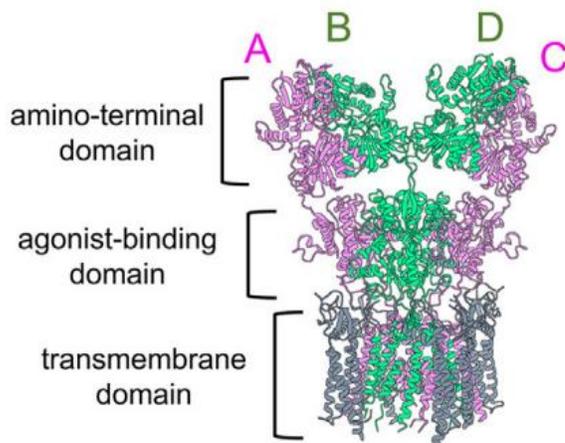


Figura 3. Diagrama Richardson de la estructura general de los iGluRs. Se muestra que cada subunidad (A, B, C y D) del receptor tetramérico posee un dominio amino-terminal extracelular, un dominio de unión al ligando, así como un dominio transmembranal (Imagen tomada de González y Jayaraman, 2024).

La liberación presináptica de vesículas que contienen glutamato da lugar a potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs por *Excitatory Postsynaptic Potentials*), que comprenden un componente de ascenso y decaimiento rápidos debidos a la activación de receptores AMPA, así como un componente con un curso temporal más lento, mediado por receptores NMDA, mientras que la activación de receptores postsinápticos al kainato produce EPSPs con un decaimiento temporal intermedio entre los de receptores AMPA y NMDA (Hansen *et al.*, 2021).

Los mGluRs se identificaron a mediados de la década de los 80 al observar que el glutamato también activaba la vía de la PLC (Sladeczek *et al.*, 1985). En 1991 se clonó el primer mGluR y posteriormente se identificaron otros siete genes que codifican otros mGluRs (Houamed *et al.*, 1991; Pin y Duvoisin, 1995).

Los mGluRs se clasifican en tres grupos, de acuerdo con la homología de sus secuencias, propiedades farmacológicas y su acoplamiento a distintas proteínas G (Belkacemi *et al.*, 2024). El grupo I (mGluR1 y mGluR5) está acoplado a proteínas $G_{q/11}$, y activa la vía de señalización PLC/IP₃/PKC y promueve respuestas generalmente excitatorias, mientras que los grupos II (mGluR2 y mGluR3) y III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) están acoplados a proteínas $G_{i/o}$, inhiben a las adenilil ciclasas (ACs), regulan la actividad de canales de Ca^{2+} y K^+ , y tienen mayoritariamente una acción inhibitoria (Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021; Kochoian *et al.*, 2023).

4.2. Regulación del metabolismo del glutamato por los astrocitos

Se ha descrito que los astrocitos pueden secretar citocinas, neurohormonas, neurotransmisores, nucleósidos, nucleótidos y aminoácidos mediante diversos mecanismos como la exocitosis, la difusión pasiva y el transporte activo (Verkhatsky *et al.*, 2016; Sidoryk-Węgrzynowicz *et al.*, 2024). Los astrocitos presentan diferentes perfiles metabólicos de acuerdo con la demanda energética local y el estado nutricional del organismo para promover una adecuada función neuronal, por lo que comprender su metabolismo ha tomado gran relevancia en las últimas décadas (Gorshkov *et al.*, 2018; Barros *et al.*, 2023).

Un desequilibrio en el metabolismo astrocítico se ha asociado con la fisiopatología de varios trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otros (Cohen *et al.*, 2024; Stoklund Dittlau y Freude, 2024; Yang *et al.*, 2024). Por tal motivo, las interacciones apropiadas entre astrocitos y neuronas son fundamentales para mantener la homeostasis de neurotransmisores como glutamato y el ácido γ -aminobutírico (GABA, por *gamma-Aminobutyric Acid* ; Allen *et al.*, 2002; Gavillet *et al.*, 2008; Sofroniew y Vinters, 2010; Lee *et al.*, 2022; Escalada *et al.*, 2024).

Por otra parte, desde hace más de 30 años se ha mostrado que la activación excesiva y prolongada de los iGluRs y los mGluRs puede ocasionar muerte neuronal por excitotoxicidad, como se ilustra en la Fig. 4 (Olney *et al.*, 1974; McDonald y Johnston, 1990; Swanson *et al.*, 1997; Danbolt, 2001; Martínez *et al.*, 2014) y que el bloqueo de dichos receptores en modelos *in vivo* atenúa el daño observado en animales con lesiones agudas (Faden *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 2024). Por esta razón, el glutamato debe estar presente en las concentraciones adecuadas en los lugares correctos y en el momento adecuado (Zhou y Danbolt, 2014; Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021).

La mayor parte de glutamato en el cerebro procede de la síntesis local en las terminales sinápticas por la enzima glutaminasa que transforma al aminoácido L-glutamina en L-glutamato (Vázquez-Durán *et al.*, 2024); la glutamina es el aminoácido más abundante en el espacio extracelular, lo que permite su biodisponibilidad para asegurar la síntesis *de novo* de glutamato por las neuronas (Albrecht *et al.*, 2010). En la década de 1980 se mostró que en presencia de fosfato la glutaminasa se activa por lo que se le conoce como glutaminasa activada por fosfatos (PAG) y esta enzima se encuentra tanto en los astrocitos como en las neuronas, aunque su actividad es mayor en estas últimas células (Hogstad *et al.*, 1988).

El glutamato puede ser también producido por los astrocitos, a partir de lactato o de glucosa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA, por *Tricarboxylic Acid Cycle*). El α -cetoglutarato (α -KG, por *α -ketoglutarate*), un intermediario metabólico en el TCA, se convierte en glutamato mediante transaminación por la enzima aminotransferasa de aspartato (Andersen y Schousboe, 2023). Esta capacidad de los astrocitos para sintetizar glutamato *de novo* proporciona una fuente adicional de este neurotransmisor (Vázquez-Durán *et al.*, 2024).

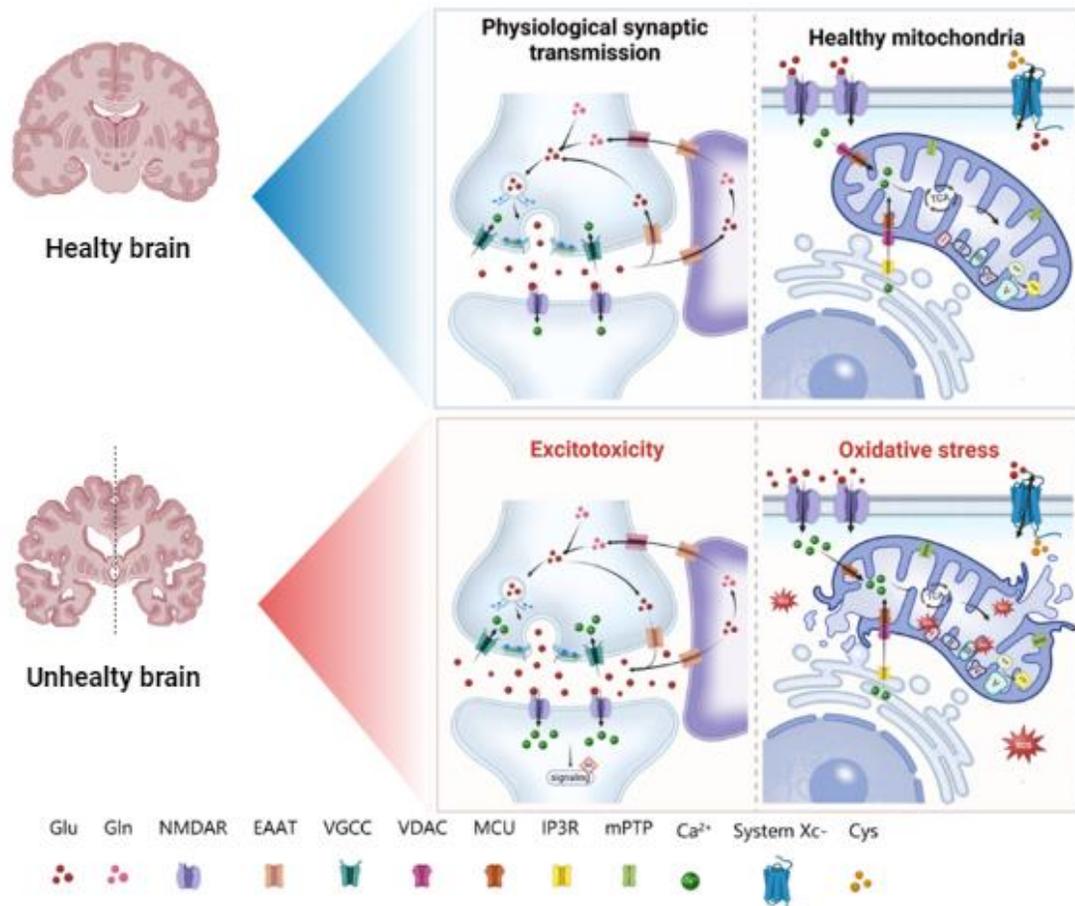


Figura 4. Transmisión sináptica y función mitocondrial en condiciones fisiológicas y de neurodegeneración. En condiciones fisiológicas el glutamato excedente es removido del espacio sináptico por los EAATs en astrocitos y terminales glutamatérgicas presinápticas previniendo la excitotoxicidad. Bajo condiciones fisiopatológicas, la acumulación excesiva de glutamato en el espacio sináptico conlleva a la sobre-activación de receptores glutamatérgicos postsinápticos AMPA Y NMDA, que a su vez resulta en un rápido y sostenido incremento de la concentración intracelular de Ca²⁺; esta desregulación contribuye a un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de la mitocondria (Imagen modificada de Yang *et al.*, 2024).

El ciclo glutamato-glutamina fue descrito en la década de 1960, como un mecanismo para la regulación de los niveles de glutamato y glutamina en el SNC, ilustrado en la Fig. 5 (Hong *et al.*, 1959; Salganicoff y Derobertis, 1965; Dixon y Severin, 1968; Regunathan y Sundaresan, 1985).

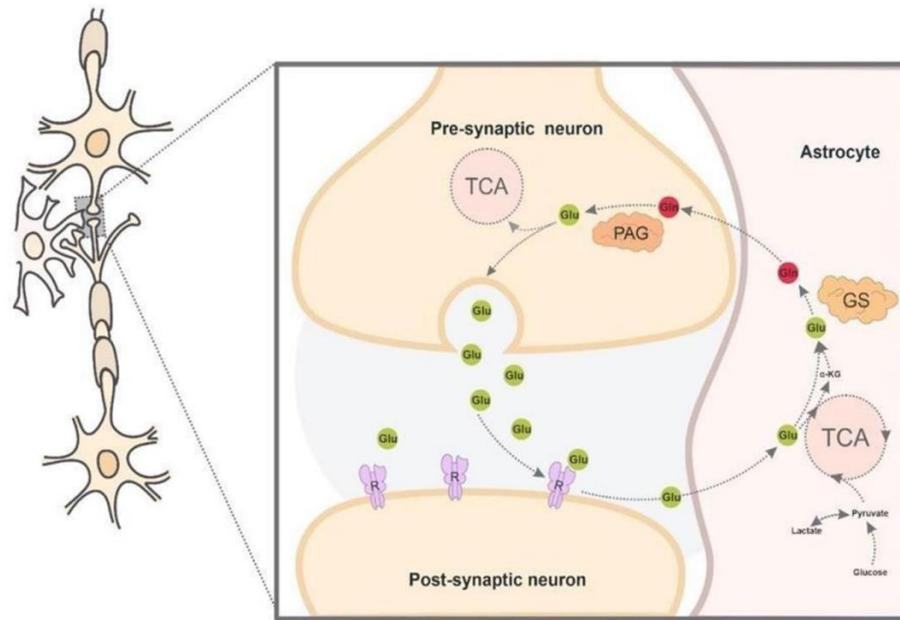


Figura 5. Ciclo glutamato-glutamina. Los astrocitos obtienen el glutamato por captura del espacio sináptico o mediante el ciclo de Krebs, en el que el intermediario metabólico α -cetoglutarato (KG) se transforma en glutamato mediante transaminación y el glutamato, por la acción de la enzima sintasa de glutamina (GS), se transforma en glutamina que es transportada al espacio extracelular para ser captada por las neuronas presinápticas. En la neurona, la glutamina se transforma en glutamato por acción de la enzima glutaminasa activada por fosfatos (PAG), para ser almacenado en vesículas sinápticas cuyo contenido se libera por exocitosis resultando en la activación de sus receptores. El glutamato liberado durante la sinapsis es capturado por los astrocitos mediante transportadores (Imagen tomada de Vázquez-Durán *et al.*, 2024).

El glutamato liberado en una sinapsis es captado principalmente por astrocitos (Hertz *et al.*, 1999; Bak *et al.*, 2006; Andersen y Schousboe, 2023), y en el interior del astrocito, la sintasa de glutamina (GS) convierte el glutamato en glutamina, que se transporta al espacio extracelular y es captada por las terminales glutamatérgicas donde se transforma en glutamato por acción de la PAG (Vázquez-Durán *et al.*, 2024). Una vez sintetizado, el glutamato se almacena en vesículas sinápticas hasta su liberación al espacio sináptico, y finalmente se repite el ciclo (Albarracín *et al.*, 2016). La transformación de L-glutamato a L-glutamina dentro de los astrocitos se describió en la década de

1980, utilizando [^{14}C]-glutamato, mostrando que en astrocitos en cultivo primario una gran parte del glutamato exógeno es transformado a glutamina y aspartato (Fig. 6) (Yu *et al.*, 1982; Waniewsky y Martin, 1986), aunque una parte de este neurotransmisor también se pierde como [$^{14}\text{CO}_2$] a partir de su oxidación en el TCA (Yu *et al.*, 1982; McKenna *et al.*, 1996; Sonnewald *et al.*, 1996).

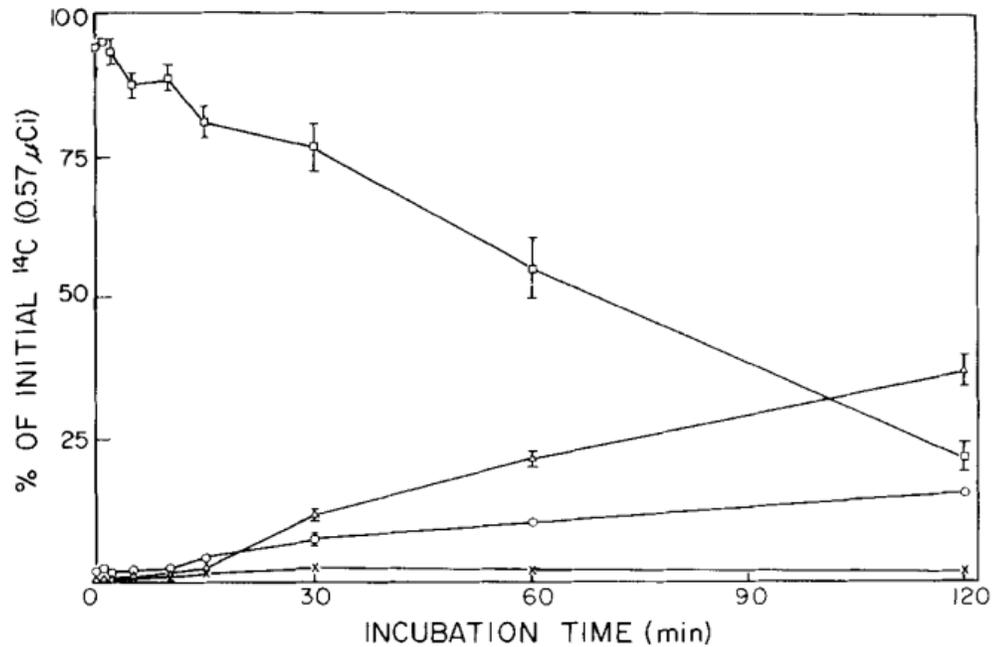


Figura 6. Distribución de la radiactividad presente en glutamato (\square), glutamina (\blacktriangle), aspartato (\times) y metabolitos desaminados de glutamato (\circ) en astrocitos en cultivo primario de rata, en función del tiempo de incubación. Los astrocitos se incubaron con L-[U- ^{14}C]-glutamato ($9\ \mu\text{M}$) por tiempos de 1-120 min. Se muestra la disminución de la radiactividad correspondiente a glutamato a lo largo del tiempo y un aumento en la radiactividad debida a la glutamina. Los resultados corresponden a la radiactividad presente en las fracciones correspondientes del análisis por HPLC. Los valores son el promedio \pm SEM de tres experimentos (Imagen tomada de Waniewski y Martin, 1986).

4.3. Captura de glutamato por los astrocitos

Desde la década de 1930 se describió que el glutamato participa importantemente en el metabolismo neuronal y que tanto los astrocitos como las neuronas poseen la capacidad de capturar grandes cantidades de glutamato del espacio extracelular, aunque la mayor parte de la captura (~90%) es debida a los astrocitos (Krebs, 1935; Stern *et al.*, 1949; Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021). La captura de glutamato es el único mecanismo capaz de restablecer los niveles basales de este neurotransmisor y proveer de protección a cultivos primarios de neuronas ante niveles altos de glutamato (Fig. 7). La actividad excitatoria en el cerebro depende por lo tanto de la actividad de los transportadores glutamato dependientes de Na^+ (Rosenberg *et al.*, 1992; Danbolt *et al.*, 2016), denominados transportadores de aminoácidos excitadores de alta afinidad (EAATs por *Excitatory Amino Acid Transporters*) (Danbolt, 2001; Kovermann *et al.*, 2022).

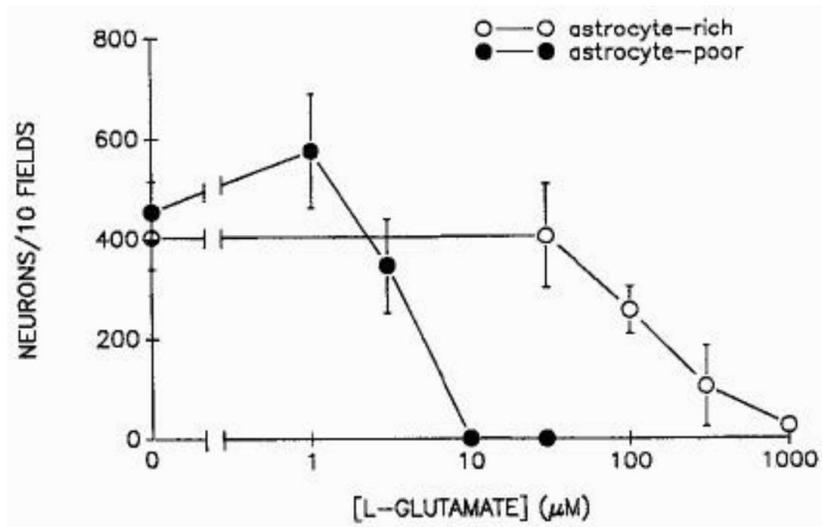


Figura 7. Neurotoxicidad por L-glutamato en cultivos neuronales pobres y ricos en astrocitos. Se muestra la relación concentración-respuesta de L-glutamato y muerte neuronal en cultivos pobres y ricos en astrocitos. La potencia de L-glutamato en cultivos pobres en astrocitos es ~34 veces la observada en cultivos ricos en astrocitos, resaltando la importancia de estas células para reducir la excitotoxicidad. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (Imagen modificada de Rosenberg *et al.*, 1992).

Los EAATs difieren en su expresión regional, celular y subcelular (Tabla 2), así como en sus características farmacológicas y moleculares (Zhou y Danbolt, 2013; Končeková *et al.*, 2023).

Tabla 2. Expresión neuronal y astrocítica de los EAATs.

	Expresión neuronal	Expresión en astrocitos
<i>EAAT1/GLAST</i>	No	Sí
<i>EAAT2/GLT-1</i>	Sí (terminales glutamatérgicas)	Sí
<i>EAAT3/EAAC1</i>	Sí (Soma y dendritas)	No

En la década de 1990, se identificaron los primeros EAATs, dos en el cerebro anterior de la rata y uno en el intestino delgado de conejo: 1) Transportador a glutamato 1 (GLT-1, por *Glutamate Transporter 1*); 2) Transportador de glutamato/aspartato (GLAST, por *Glutamate/Aspartate Transporter*), y 3) Acarreador de aminoácidos excitadores 1 (EAAC1, por *Excitatory Amino Acid Carrier 1*) (Kanai y Hediger, 1992; Pines *et al.*, 1992; Storck *et al.*, 1992; Swanson *et al.*, 1997). Para los transportadores homólogos del humano se utiliza la denominación EAAT1, EAAT2 y EAAT3 para GLAST, GLT-1 y EAAC1, respectivamente (Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021; Cortese *et al.*, 2023).

El EAAT2 se purificó mediante la solubilización de membranas cerebrales de rata con un detergente y fraccionamiento por cromatografía (Danbolt *et al.*, 1990); una vez purificada, se generaron anticuerpos contra dicha proteína que se utilizaron en ensayos de inmunocitoquímica, mostrando a los astrocitos

intensamente marcados mientras que las neuronas y terminales glutamatérgicas fueron marcados escasamente (Danbolt *et al.*, 1992; Lehre *et al.*, 1995). Estudios posteriores de hibridación *in situ* indican que el ARNm de este transportador también está presente en varias poblaciones neuronales (Berger y Hediger, 1998); sin embargo, el promotor del EAAT2 se encuentra altamente activo en los astrocitos, en contraste con dichas poblaciones neuronales (de Vivo *et al.*, 2010).

Simultáneamente, pero de manera independiente, otros equipos de investigación clonaron al EAAT1 y al EAAT3 utilizando enfoques completamente diferentes (Zhou y Danbolt, 2014). En 1992, al purificar una galactosiltransferasa del cerebro de rata, se observó que una glicoproteína hidrofóbica de 66 kDa co-purificaba con dicha proteína. Se obtuvieron secuencias parciales de los aminoácidos de la glicoproteína y se sintetizaron sondas de oligonucleótidos, resultando en la identificación de una proteína de 543 aminoácidos de longitud que corresponde al EAAT1 (Storck *et al.* 1992), de expresión exclusiva en astrocitos. Con respecto al EAAT3, este se aisló del yeyuno del conejo mediante clonación de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* (Kanai y Hediger, 1992). Este es un transportador neuronal que no se expresa en células de la glía (Holmseth *et al.*, 2012), y su localización en la neurona se limita selectivamente al soma y a las dendritas (Cheng *et al.*, 2002).

Finalmente se identificaron el EAAT4 en el soma y dendritas de neuronas de Purkinje (Fairman *et al.*, 1995) y el EAAT5 en la retina, detectados en otras regiones del SNC (Arriza *et al.*, 1997); ambos EAATs se caracterizan por un transporte más lento y altas conductancias de cloruro (Zhou y Danbolt, 2014; Kovermann *et al.*, 2022).

La actividad de los EAATs está condicionada por los gradientes de concentración a través de la membrana de los iones Na⁺, K⁺ y H⁺, así como por la fuerza impulsora (*driving force*) que revertiría la actividad transportadora (Olivares-Bañuelos *et al.*, 2019). La estequiometría del transporte es que por cada molécula de glutamato capturada los EAATs incorporan simultáneamente 3

Na⁺ y 1 H⁺, mientras liberan 1 K⁺ y 1 OH⁻ o HCO₃⁻. Este proceso está acompañado de un constante consumo de ATP, que en conjunto se conoce como el "mecanismo de transporte de los EAATs dependiente de Na⁺" (Yang et al., 2024).

4.4. Receptores a histamina en el SNC

La histamina es un neurotransmisor que regula una importante cantidad de funciones cerebrales mediante la activación alguno de los tres receptores (H₁R, H₂R, H₃R) acoplados a proteínas G que se expresan en el SNC (Panula *et al.*, 2015; Quian *et al.*, 2022). Los H₁Rs y H₂Rs se expresan tanto en neuronas como en células de la glía, mientras que el H₃R se encuentra principalmente en neuronas y en menor proporción en células gliales (Takumida *et al.*, 2016).

H₁R. Este receptor se expresa en el SNC, pulmones y vasos sanguíneos (Schneider *et al.*, 2014) y posee una estructura que incluye una tercera asa intracelular grande (208 aminoácidos), un extremo carboxilo (C-terminal) intracelular corto (17 aminoácidos), que se asocia con proteínas G $\alpha_{q/11}$ y lleva a la activación de la PLC promoviendo la hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂, por *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*) a 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃, por *inositol 1,4,5-trisphosphate*) y 1,2-diacilglicerol (DAG, por *diacylglycerol*), además de la activación de la cinasa C de proteínas (PKC, por *Protein Kinase C*) que cataliza la fosforilación de residuos de Serina y Treonina de proteínas efectoras (Panula *et al.*, 2015). El IP₃ induce la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares, pudiendo activar así a la mayoría de las neuronas en diversas áreas del cerebro, incluyendo el tallo encefálico, el hipotálamo, el hipocampo, el tálamo, el bulbo olfatorio, la amígdala, el septum y la corteza cerebral (Quian *et al.*, 2022).

Este receptor está implicado en la función motora, el estado de ánimo, la vigilia, el sueño, los ritmos circadianos, la cognición, la percepción del dolor, la termorregulación, la ingesta de alimentos y el gasto energético (Mochizuki, 2022). Se ha mostrado que los antagonistas del H₁R de primera generación aumentan

la susceptibilidad a la sedación, gracias a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que estos fármacos se utilizan en el tratamiento del insomnio (Porwal *et al.*, 2021).

H₂R. Este receptor, expresado en el estómago, corazón y post-sinápticamente en el SNC, tiene una tercera asa intracelular corta (30 aminoácidos), un C-terminal largo (70 aminoácidos) y se acopla a proteínas G α_s . En el cerebro humano, el H₂R está ampliamente distribuido en los ganglios basales, el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral (Quian *et al.*, 2022) y está implicado en la modulación del ritmo circadiano, los procesos cognitivos, la ingesta de alimentos y el metabolismo de la glucosa (Panula, 2021). La activación del H₂R estimula a las ACs y por lo tanto la síntesis del 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc, por *Cyclic Adenosine Monophosphate*), que a su vez activa a la cinasa A de proteínas (PKA, por *Protein Kinase A*) (Panula y Nuutinen, 2013). La PKA estimula la función de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB, por *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*), un regulador clave en la fisiología y plasticidad neuronales.

H₃R. El receptor presenta múltiples isoformas derivadas del *splicing* alternativo de dos o tres intrones, que varían principalmente en la longitud de la tercera asa intracelular y tienen una expresión diferencial en el SNC, con mayores niveles en la corteza cerebral, el neocórtex y el hipocampo (Drutel *et al.*, 2001).

Los H₃Rs se acoplan a proteínas G $\alpha_{i/o}$ y su activación (Fig. 8) resulta en: 1) disminución de la formación de AMPc, que a su vez conlleva a la reducción en la actividad de la PKA; 2) activación de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs, por *Mitogen-activated protein kinases*); 3) inhibición del intercambiador Na⁺/H⁺ neuronal; 4) activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂, por *Phospholipase A₂*) para la formación y liberación de ácido araquidónico, lisofosfolípidos y ácido decosahexaenoico; 5) activación de la vía de la 3-cinasa de fosfatidil inositol/cinasa de proteínas B (PI3K/Akt-PKB); 6) mediante los dímeros G $\beta\gamma$, inhibición de la apertura de los canales de Ca²⁺ activados por

voltaje N y P/Q, y activación de los canales de K⁺ rectificadores entrantes activados por proteínas G (GIRKs, por *G protein-gated inwardly rectifying channels*), conllevando a la disminución de la liberación de neurotransmisores (Aquino-Miranda *et al.*, 2012).

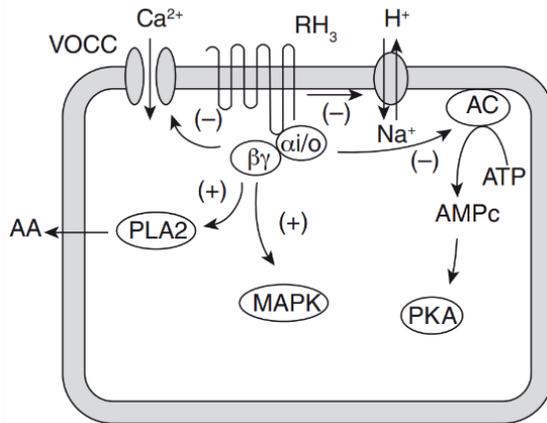


Figura 8. Efectos intracelulares de la activación de los H₃Rs. Se ilustran la disminución de la formación de AMPc, inhibición del intercambiador Na⁺/H⁺ neuronal, disminución de la corriente debida a los canales de Ca²⁺ activados por voltaje, activación de la vía de las MAPKs y activación de la fosfolipasa A₂ (Imagen tomada de Aquino-Miranda *et al.*, 2012).

4.4.1. Receptor a histamina H₃ (H₃R)

El H₃R se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, principalmente en las terminales sinápticas, aunque actualmente se acepta su expresión postsináptica, tanto en somas y dendritas, así como en astrocitos (Aquino-Miranda *et al.*, 2012; Riveros *et al.*, 2024). Este receptor se describió por primera vez en la década de 1980 (Arrang *et al.*, 1983; Arrang *et al.*, 1987) como un autorreceptor con capacidad de disminuir la liberación y la síntesis de histamina en rebanadas de la corteza cerebral (Fig. 9). Posteriormente se reportó su presencia como heterorreceptor en las terminales sinápticas de otras neuronas inhibiendo la liberación de diversos neurotransmisores como glutamato, GABA, dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina y sustancia P (Panula y Nuutinen, 2013).

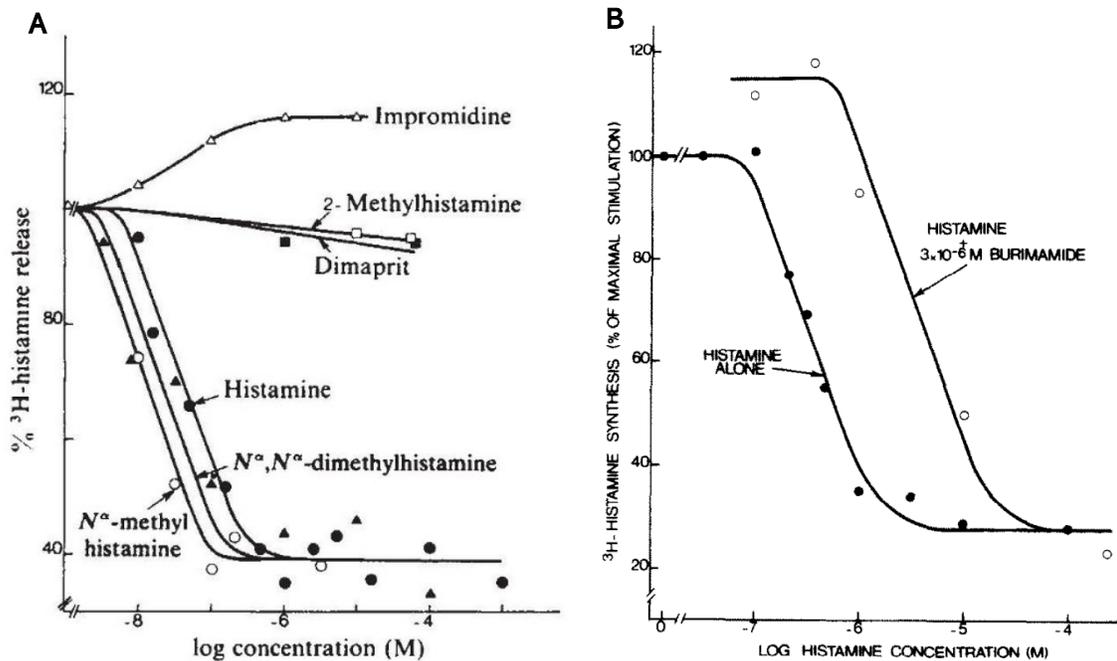


Figura 9. Autoinhibición de la síntesis y liberación de histamina por la activación de H_3Rs presinápticos. A) Efectos de agonistas de receptores a histamina en la liberación de ^3H -histamina inducida por K^+ en rebanadas de la corteza cerebral de rata. El efecto inhibitorio en la liberación de ^3H -histamina debido a la propia histamina dependió de la concentración, con una EC_{50} de 41 nM, y fue mimetizado por sus derivados N-metilhistamina y N,N-dimetilhistamina, con el mismo efecto máximo pero con potencias tres y dos veces mayores, respectivamente. La 2-metilhistamina (derivado de histamina, agonista del H_1R) y el dimaprit (agonista del H_2R) no modificaron significativamente la liberación de ^3H -histamina, mientras que la impromidina (agonista parcial del H_2R) aumentó en 20% la liberación. **B)** Efecto de la burimamida (antagonista del H_3R) en la inhibición por histamina exógena de la síntesis de ^3H -histamina en rebanadas de la corteza cerebral de la rata. La síntesis de ^3H -histamina se redujo en presencia de histamina de manera dependiente de la concentración con un valor de IC_{50} de $0.34 \pm 0.03 \mu\text{M}$, mientras que la burimamida indujo un desplazamiento paralelo hacia la derecha de la curva concentración-respuesta de la histamina. (Imágenes tomadas de Arrang *et al.*, 1983 y Arrang *et al.*, 1987).

En 1999 se clonó el ADN complementario (ADNc) del H₃R humano (Lovenberg *et al.*, 1999), mostrando la codificación de una proteína de 445 aminoácidos, y que por *splicing* alternativo se originan hasta 20 isoformas del ARNm correspondiente (Aquino-Miranda, 2020).

La presencia del H₃R en la postsinapsis está asociada con la modulación de la actividad neuronal y la subsecuente liberación de neurotransmisores, mientras que de manera presináptica modula directamente la exocitosis de vesículas sinápticas (Panula, 2021; Alhusaini *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2023). Su presencia en astrocitos está asociada principalmente a la actividad neurotrófica (Jurič *et al.*, 2016), así como a la modulación de la expresión de ciertas proteínas, por ejemplo, del transportador de glucosa 1 (GLUT-1, por *Glucose Transporter 1*) (Parra-Abarca *et al.*, 2019). En el SNC el H₃R se expresa con mayor densidad en el neocórtex, el núcleo accumbens y la corteza cerebral (Pillot *et al.*, 2002), mientras que expresión es menor en el sistema nervioso periférico (SNP), limitándose a las terminales nerviosas del sistema simpático cardíaco y del sistema parasimpático tracto gastrointestinal, así como en células pancreáticas (Aquino-Miranda, 2020).

Todo lo anterior ha generado interés en el estudio del H₃R como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de trastornos neurológicos y psiquiátricos como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, el síndrome de Tourette y adicciones (Nieto-Alamilla *et al.*, 2016).

5. Antecedentes específicos

5.1. Regulación de la expresión de los transportadores de glutamato en los astrocitos

Se han identificado diversos mecanismos a través de los cuales se puede modificar la actividad de los EAATs para capturar glutamato, como cambios en la expresión génica por la activación de distintas vías de señalización, direccionamiento y tráfico de las proteínas transportadoras y modificaciones post-traduccionales de estas mismas proteínas. Mientras que los eventos de transcripción del ADN y la expresión de proteínas requieren períodos de tiempo de varias horas para reflejar efectos en la actividad de los EAATs, las modificaciones post-traduccionales pueden ocurrir rápidamente, en minutos (Olivares-Bañuelos *et al.*, 2019).

En los astrocitos, los promotores del EAAT1 comparten sitios de unión putativos para diferentes factores de transcripción, como el factor nuclear-kappa B (NF- κ B, por *Nuclear Factor-Kappa B*), la homeoproteína de cartílago tipo 1, factores de unión a GATA, los factores homeodominio NKX y la proteína de unión a octámeros (Oct1), entre algunos otros (Unger *et al.*, 2012). Para el EAAT2, el análisis bioinformático del promotor muestra varios elementos de unión de factores de transcripción regulatorios (Su *et al.*, 2003) como el factor nuclear de células T activadas, la proteína N-myc, así como NF- κ B, lo cual contribuye a la expresión y regulación del transportador. En cultivos de astrocitos de ratón, se ha mostrado aumento de la expresión de EAAT1 y EAAT2 cuando se co-cultivan con neuronas (Ghosh *et al.*, 2016).

La regulación de ambos transportadores es multifactorial, y dependiente de la presencia de neurotransmisores, hormonas, péptidos, y factores de crecimiento, entre otros. Entre las moléculas reportadas que aumentan la expresión del EAAT1 en astrocitos están el dibutiril 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (dbAMPc, por *Dibuteryl 3',5'-cyclic Adenosine Monophosphate*), el factor de crecimiento transformante (TGF α , por *Transforming Growth Factor α*), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por *Epidermal Growth Factor*), estrógenos, el

péptido pituitario activador de la AC (PACAP, por *Piruitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*), el tamoxifeno, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1, por *Insulin-like Growth Factor 1*), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF, por *Glial-Derived Neurotrophic Factor*) y el mismo glutamato, mientras que las moléculas que aumentan la expresión del EAAT2 en astrocitos son dbAMPc, EGF, TGF- α , el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por *Platelet-Derived Growth Factor*), GDNF, PACAP, estrógenos, glucocorticoides y el trifosfato de adenosina (ATP) (Olivares-Bañuelos *et al.*, 2019).

La activación de distintas vías de señalización puede resultar en aumento o disminución de la expresión de cada transportador. Para el EAAT1, se ha reportado que las vías de señalización que están implicadas en el aumento de su expresión en astrocitos son AMPc/PKA (Unger *et al.*, 2012), PI3K/Akt-PKB (Zhou *et al.*, 2023), las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, por *Extracellular Signal Regulated Kinases*)/NF- κ B (Karki *et al.*, 2018), la cinasa activada por Janus/transductor de señales y activador de la transcripción (JAK/STAT, por *Janus Activated Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Meyer *et al.*, 2017). Las vías de señalización involucradas en el aumento en la expresión del EAAT2 en astrocitos son PI3K/Akt-PKB, (Zhang *et al.*, 2021), Akt-PKB/ERK (ver Fig. 10) (Karki *et al.*, 2014), PKC (Vizueté *et al.*, 2023).

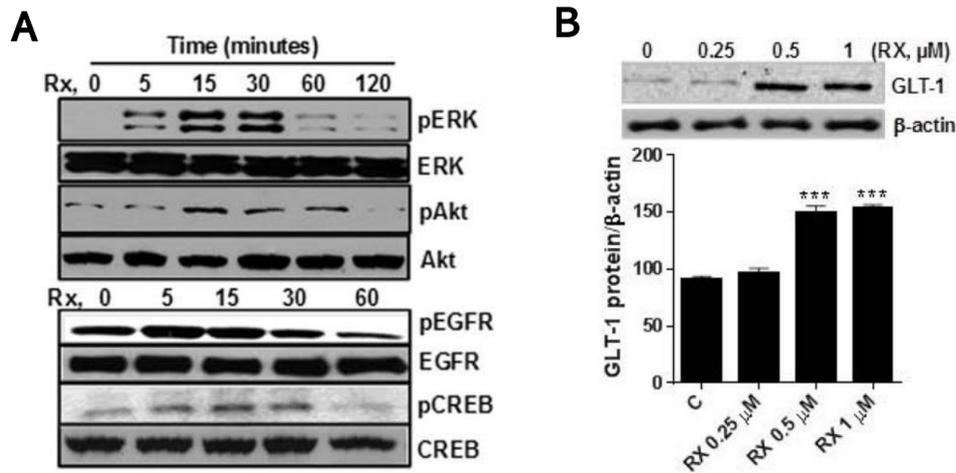


Figura 10. El raloxifeno aumenta la expresión del EAAT2/GTL-1 y la fosforilación de ERK, Akt-PKB, EGFR y CREB. A) Los astrocitos se expusieron a distintas concentraciones de raloxifeno (0, 0.25, 0.5 y 1 μ M), un modulador selectivo de los receptores a estrógenos. Las concentraciones de 0.5 y 1 μ M aumentaron significativamente la expresión del EAAT1/GLT-1. **B)** Curso temporal (5-120 min) del efecto del raloxifeno (1 μ M), observándose aumento en la fosforilación de ERK, Akt-PKB, EGFR y CREB (Imágenes modificadas de Karki *et al.*, 2014).

5.2. H₃R en los astrocitos

Tradicionalmente se consideró al H₃R con actividad exclusivamente presináptica regulando la liberación de la misma histamina, así como de otros neurotransmisores; no obstante, recientemente se ha reportado que el H₃R está altamente expresado en la corteza cerebral y el neocórtex de los roedores (Fig. 11A), primates humanos y no humanos, y que gran parte de los receptores en estas regiones se localizan post-sinápticamente, así como en los astrocitos, por lo que, se podría regular de forma importante la señalización glutamatérgica, como autorreceptores o heterorreceptores (Bolam y Ellender, 2016; Nieto-Alamilla *et al.*, 2016; Xu y Pittenger, 2023).

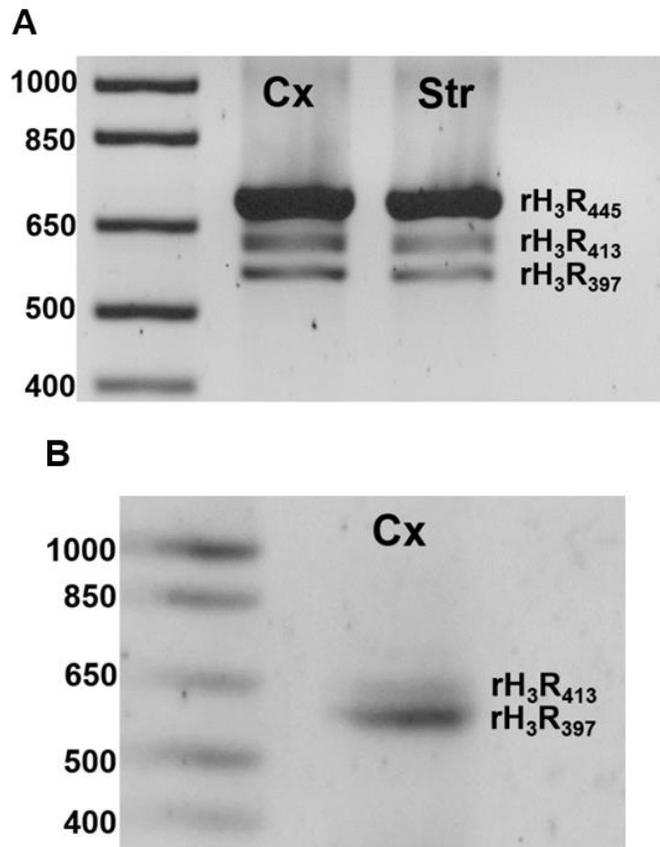


Figura 11. Expresión de las isoformas del rH₃R en tejido nativo y en cultivo primario de astrocitos de la rata. A) Expresión del ARNm de las isoformas rH₃R₄₄₅, rH₃R₄₁₃ y rH₃R₃₉₇ en tejido de la corteza cerebral y el neocórtex. **B)** Expresión del ARNm de las isoformas rH₃R₃₉₇ y rH₃R₄₁₃ por astrocitos de la corteza cerebral en cultivo primario (Imagen modificada de Villa-Maldonado *et al.*, 2020).

En 2020 se reportó la expresión de los ARNm de las isoformas del H₃R con 397 y 413 aminoácidos (rH₃R₃₉₇ y rH₃R₄₁₃) en astrocitos en cultivo primario de la corteza cerebral de rata (Fig. 11B). Dichas isoformas, además del receptor rH₃R₄₄₅, son funcionales en el cerebro de la rata (Rahman *et al.*, 2023).

A pesar de que se conoce que el H₃R se expresa en astrocitos, poco se sabe sobre su función en estas células. En 2011 se reportó la relación de la expresión del H₃R con la actividad neurotrófica en astrocitos en cultivo primario, con estimulación de la síntesis de neurotrofina 3 (Jurič *et al.*, 2011); en 2015 se

reportó que el H₃R astrocítico está implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria (Lida *et al.*, 2015); y en 2019, se mostró que la activación aguda (1 h) del H₃R y del H₁R aumenta la expresión del GLUT-1 en astrocitos en cultivo primario, obtenidos de corteza cerebral de rata, mediante la activación de la vía PLC/DAG/PKC (Fig. 12) (Parra-Abarca *et al.*, 2019).

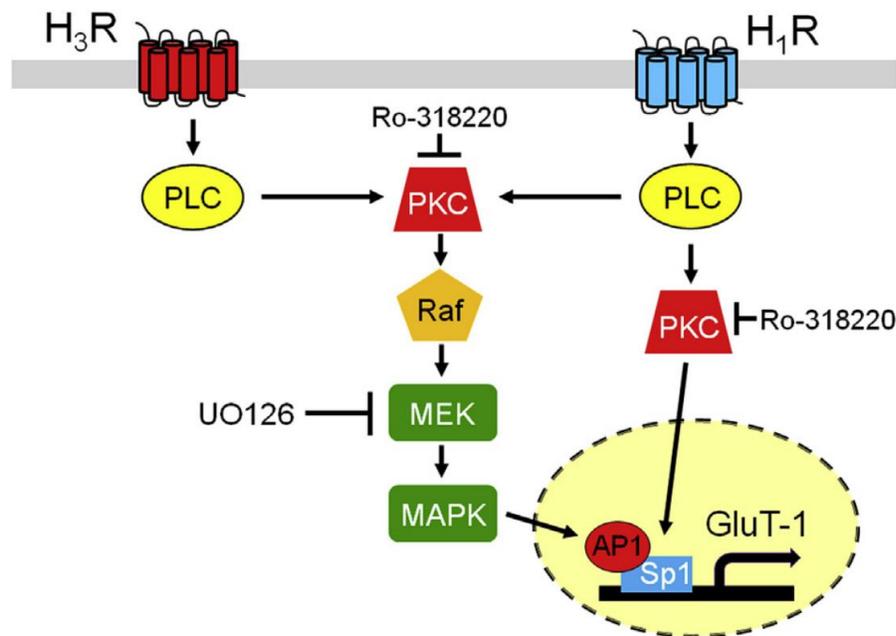


Figura 12. Mecanismos propuestos para el efecto estimulante de la activación de los H₁Rs y H₃Rs en la expresión de la proteína del transportador de glucosa GLUT-1. La histamina, actuando tanto en los H₁Rs como en los H₃Rs aumenta la expresión del GLUT-1 por los astrocitos cerebrocorticales de rata en cultivo primario. El efecto de la activación de H₁R implica las vías PLC → DAG/Ca²⁺ → PKC así como PLC → DAG/Ca²⁺ → PKC → MAPK, mientras que la acción mediada por H₃R depende solo de la vía PLC → DAG/Ca²⁺ → PKC → MAPK (Imagen tomada de Parra-Abarca *et al.*, 2019).

De manera semejante al receptor neuronal, el H₃R astrocítico está acoplado funcionalmente a la inhibición por proteínas G $\alpha_{i/o}$ de las ACs y a la modulación de las cascadas de señalización de la PKC, MAPKs y PI3K/Akt-PKB; sin embargo, a diferencia del receptor neuronal, no existe evidencia de actividad constitutiva que module la señalización de AMPc en astrocitos (Jurič *et al.*, 2016).

El H₃R puede regular algunas de las vías de señalización implicadas en la expresión de los transportadores de glutamato en astrocitos, especialmente del EAAT2 (Jurič *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021; Vizquete *et al.*, 2023), por lo que se propone que la activación de este receptor en astrocitos podría regular la señalización por glutamato en la corteza cerebral al aumentar la expresión del EAAT2 y con esto la captura de glutamato por los astrocitos.

6. Justificación

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC y desempeña un papel crucial en la transmisión de señales neuronales, así como en la plasticidad sináptica, la neurogénesis y la proliferación celular, entre otros procesos (Cantando *et al.*, 2024; Escalada *et al.*, 2024). Sin embargo, su acumulación excesiva en el espacio sináptico puede conllevar a la excitotoxicidad, un fenómeno en el que la sobre-estimulación de los receptores a glutamato conduce al daño y muerte neuronal (Olney *et al.*, 1974; Danbolt, 2001; Martínez *et al.*, 2014). Este proceso ha sido asociado a trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otros (Cohen *et al.*, 2024). Para evitarlo, se requiere la captura del glutamato excedente por los EAATs (Danbolt *et al.*, 2016); los EAATs se expresan en neuronas y en astrocitos, pero estas últimas células son las responsables de más del 90% de la captura de glutamato por el EAAT1 y EAAT2 (Danbolt *et al.*, 2016; Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021).

Por otra parte, el H₃R es un componente clave en la señalización tanto neuronal como astrocítica, ya que se expresa en ambos tipos celulares (Xu y Pittenger, 2023). Aunque su función en astrocitos es poco conocida en comparación con su papel en las neuronas (presinapsis y postsinapsis) (Jurič *et al.*, 2011; Iida *et al.*, 2015; Parra-Abarca *et al.*, 2019), se conoce que desencadena varias vías de señalización canónicas del receptor. Estas vías incluyen PLC/DAG/PKC, MAPKs y PI3K-Akt-PKB, las cuales pueden estar involucradas en la regulación de la expresión de los EAATs (Jurič *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021; Vizueté *et al.*, 2023). Este hallazgo sugiere una posible participación no estudiada del H₃R en la modulación de la captura de glutamato por parte de los astrocitos a través de la regulación de los EAATs, lo que podría tener importantes implicaciones en la homeostasis del glutamato y la función neuronal en el SNC.

Por lo anterior, este trabajo pretende determinar si la activación del H₃R modula la captura de glutamato por astrocitos cerebro-corticales de la rata en cultivo primario.

7. Hipótesis

La activación del receptor a histamina H₃ (H₃R) modula la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.

8. Objetivos

8.1. Objetivo general

Determinar si la activación del H₃R modula la captura de glutamato por astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario.

8.2. Objetivos específicos

1. Determinar el curso temporal de la captura de glutamato por los astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario.
2. Evaluar el efecto de inhibidores de los EAATs en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.
3. Determinar el efecto de la activación aguda (15 min) del H₃R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.
4. Determinar el efecto de la activación subaguda (1-4 días) del H₃R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.
5. Corroborar la participación del H₃R en la captura de glutamato mediante el uso de antagonistas selectivos del receptor.

9. Materiales y métodos

9.1. Animales

Para la obtención de cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales se utilizaron ratas Wistar de 2-7 días de vida postnatal (sexo indistinto), proporcionadas por el Bioterio del Cinvestav. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los lineamientos establecidos por los Institutos Nacionales de Salud de los EUA (*NIH Publications* 8023, 1978) y las Normas Oficiales de México, de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité para el Uso y Cuidado de Animales del Cinvestav con el número 94-14. Se tuvo especial cuidado en reducir al mínimo el sufrimiento de los animales y en utilizar el número mínimo requerido para un análisis estadístico adecuado de las muestras.

9.2. Obtención de cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales

Los animales son decapitados con una guillotina, se extrae el encéfalo sumergiéndolo en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) fría, se retiran las meninges y se disecan ambas cortezas cerebrales. El tejido se corta en trozos pequeños, que se transfirieren a una solución de Hank (HBSS) y en condiciones de esterilidad se lavan con HBSS a temperatura ambiente y se someten a tripsinización (Tripsina/EDTA, 0.25%/0.5 mM) por 15 min a 37 °C con agitación cada 5 min. La tripsinización se detiene agregando una mezcla (50% v:v) de medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio F12 (DMEM/F12) suplementada con suero fetal bovino (10%), solución de antibióticos (1% de penicilina/estreptomicina) y glutamina (2.5 mM).

El tejido se disocia 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 transfiere a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifuga a 300xg por 3 min. El botón celular se re-suspende en medio DMEM/F12 suplementado y la suspensión se transfiere a botellas de cultivo celular (tratadas previamente con poli-L-lisina) conteniendo medio DMEM/F12 suplementado. Las botellas se colocan en una cámara de incubación a 37 °C y una atmósfera 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 se despegan mediante agitación de los frascos de cultivo celular (250 rpm por 6 h) en un agitador orbital y 1 min de agitación vigorosa manual, asegurando con esto una pureza de más de 95% de astrocitos en los cultivos (Fig. 13). Los astrocitos se cultivan a 37 °C en placas de 24 pozos con medio DMEM/F12 suplementado (sustituido cada 2-3 días) hasta alcanzar una confluencia de 80-90% (12-15 días de incubación).

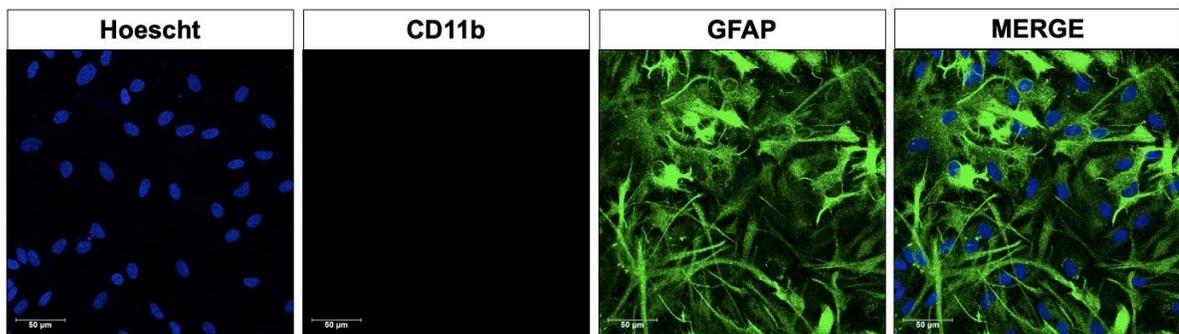


Figura 13. Inmunorreactividad a la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) en astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario. Siguiendo el protocolo experimental descrito se obtienen cultivos celulares con una alta pureza de astrocitos. La inmunorreactividad a CD11b (microglía) se muestra en color rojo y la inmunorreactividad a GFAP (astrocitos) en color verde. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoescht (azul). Barra de escala, 50 µm (Figura de Almazán Gregorio; datos no publicados).

9.3. Curso temporal de la captura de glutamato

Los astrocitos se cultivan en placas de 24 pozos. El día del experimento se retira el medio de cultivo de la placa, y las primeras dos filas de pozos se someten a un lavado con 400 µl de solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH: composición, en mM: NaCl 130, HEPES 20, D-glucosa 11, KCl 3.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.18, K₂HPO₄, pH 7.4 con NaOH) y se les añaden 200 µl de la misma

solución, mientras que las dos filas de pozos restantes se someten a un lavado con 400 µl de una solución modificada de KRH, donde se substituye equimolarmente LiCl por NaCl, y se les añaden 200 µl de esta misma solución modificada. La primera mitad de los pozos corresponde a la captura total, y la segunda mitad a la captura no específica, ya que los transportadores de glutamato son dependientes de Na⁺.

Se incuba por 15 min a 37 °C antes de adicionar 11 µl de una solución que contiene [³H]-glutamato (250 nM) y glutamato (5 µM) u 11 µl de H₂O (pozos destinados a determinación de proteínas) y se continua la incubación por 2.5, 5, 10, 15 o 30 min. Posteriormente el medio se aspira y se realizan dos lavados con 400 µl de solución KRH o KRH modificada frías (4 °C) para detener la reacción, se aspira y se añaden 300 µl de una solución de Tritón X-100 al 1%. Las placas se mantienen a 4 °C por 15 h para asegurar la lisis de los astrocitos. La concentración proteica se cuantifica por el método de Pierce BCA (ácido bicinconínico) en los lisados celulares.

Los lisados se transfieren a viales individuales, y los pozos se lavan con 400 µl de H₂O mismos que se colectan y añaden al vial correspondiente. A cada muestra se le agregan 3 ml de líquido de centelleo y se determina el contenido de tritio por centellometría en un contador Beckman Coulter LS 6500. La cantidad de glutamato capturado se normalizó con la cantidad de proteína determinada en los pozos, expresándose en pmol/mg de proteína.

9.4. Efecto en la captura de glutamato de inhibidores selectivos de los transportadores EAAT1 y EAAT2

Después de retirar el medio las células se lavan con 400 µl de solución KRH para los pozos destinados a los grupos control y a los fármacos inhibidores y con 400 µl de solución KRH modificada (NaCl sustituido por LiCl) para determinar la captura no específica. Posteriormente se añaden 200 µl de la solución correspondiente y se agregan 11 µl de las soluciones de los fármacos inhibidores a los pozos correspondientes: TFB-TBOA (inhibidor selectivo de los

EAAT1 y EAAT2, IC_{50} 17 y 22 nM, respectivamente) a una concentración de final de 10 μ M, o ácido dihidrokaínico (DHKA, inhibidor selectivo del transporte de L-glutamato y L-aspartato por el EAAT2, K_i 23 μ M) a una concentración final de 100 μ M.

Se incubó por 15 min a 37 °C antes de adicionar 11 μ l de solución de [³H]-glutamato/glutamato u 11 μ l de H₂O, con un intervalo de 10 s entre cada adición y se incubó durante 5 min a 37 °C. La reacción se detiene utilizando solución de ensayo tal como se indica previamente, así como el lisado celular y la determinación por centellometría de la radiactividad capturada por los astrocitos.

9.5. Efecto de la activación aguda (15 min) del H₃R en la captura de glutamato

Para evaluar y comparar el efecto de la activación aguda del H₃R en la captura de glutamato con el de TFB-TBOA y de agonistas de los receptores a dopamina D₁R y D₂R (expresados en astrocitos), a los pozos se les retira el medio de cultivo, se realiza un lavado con 400 μ l de solución KRH y se les añade 200 μ l de la misma solución. Enseguida se agregan 11 μ l de H₂O al grupo control y 11 μ l de TFB-TBOA (200 μ M, para una concentración final de 10 μ M) al grupo correspondiente y se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Cumplido ese tiempo se adicionan 11 μ l de los siguientes fármacos a los pozos correspondientes: 1) APB (SKF 82958), agonista selectivo de los D₁Rs (1 μ M como concentración final), 2) quinpirole, agonista selectivo de los receptores D₂/D₃ (1 μ M), y 3) immpip, agonista selectivo de los H₃Rs (100 nM). Las células se incuban por 5 min a 37 °C y posteriormente se añaden 11 μ l de solución [³H]-glutamato (250 nM)/glutamato (5 μ M) u 11 μ l de H₂O, incubando por 5 min adicionales. La reacción se detiene utilizando solución de ensayo tal como se indica previamente, y el lisado celular y la determinación por centellometría de la radiactividad capturada por los astrocitos se realizan como se describe antes.

9.6. Efecto de la activación subaguda (1-4 días) del H₃R en la captura de glutamato

El efecto de la activación prolongada del H₃R se evalúa en grupos de astrocitos cultivados en placas de 24 pozos que se exponen al agonista immpip (100 nM, concentración final) durante 1, 2, 3 o 4 días. Una vez terminado cada tratamiento, se retira el medio de cultivo, las células se lavan con solución KRH, y se agregan 11 µl de TFB-TBOA (10 µM) a un pozo por cada grupo experimental. Se incuba por 15 min a 37 °C y se agregan 11 µl de solución de [³H]-glutamato (250 nM)/glutamato (5 µM) u 11 µl de H₂O. La reacción se detiene utilizando solución de ensayo tal como se indica previamente, y el lisado celular y la determinación por centellometría de la radiactividad capturada por los astrocitos se realizan como se describe antes.

Para corroborar la participación del H₃R en la modulación de la captura de glutamato, los astrocitos se incubaron con el antagonista selectivo del H₃R yodofenpropit (3 µM, concentración final) 15 min antes de adicionar el agonista immpip (100 nM) durante 1 día. Transcurrido el mismo tiempo para cada grupo experimental, se retira el medio de cultivo y las células se lavan con solución KRH. Las células se incuban por 15 min a 37 °C y se agregan 11 µl de solución [³H]-glutamato (250 nM)/glutamato (5 µM) u 11 µl de H₂O. La reacción se detiene utilizando solución de ensayo como se indicó previamente, y el lisado celular y la determinación por centellometría de la radiactividad capturada por los astrocitos se realizan como se describió antes.

Para iniciar el estudio de la participación de las vías de señalización asociadas al H₃R en la modulación de la captura de glutamato, los astrocitos se incubaron con los inhibidores selectivos de las PKCs (Gö-6983; 1 µM), de la PI3K (LY-294,002; 10 µM) y de MEK-1/2 (PD-98,059; 1 µM) por 30 min antes de adicionar el agonista immpip (100 nM) durante 1 día. Transcurrido el mismo tiempo para cada grupo experimental, se evalúa la captura de glutamato como se describió antes.

9.7. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medias \pm rango (duplicados) o error estándar (SEM) de 3 o 4 replicados. 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 v8.0. Los valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

10. Resultados

10.1. Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario

La captura de glutamato ($[^3\text{H}]$ -glutamato/glutamato) se determinó a los 2.5, 5, 10, 15 y 30 min, observándose aumento de la captura específica hasta los 10 min y posteriormente disminución, aunque modesta, entre los 15 y 30 min (Fig. 14A). En los experimentos posteriores, la captura del neurotransmisor fue evaluada a los 5 min, lo que permitiría determinar posibles efectos de inhibición o estimulación.

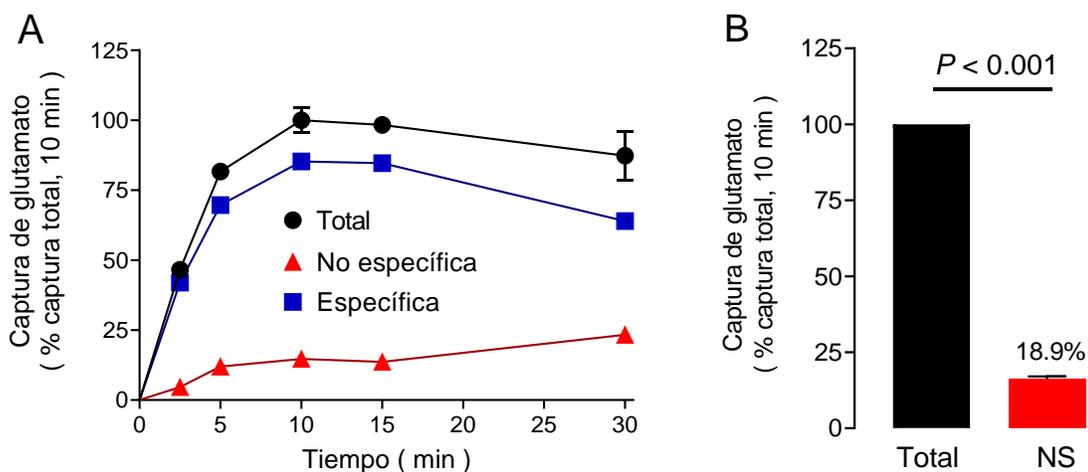


Figura 14. Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos corticales en cultivo primario. A) Cinética. Los astrocitos se incubaron con $[^3\text{H}]$ -glutamato/glutamato (250 nM/5 μM) por los tiempos indicados. La captura no-específica se determinó en muestras en paralelo incubando en solución KRH a la que se le sustituyó equimolarmente el NaCl por LiCl. La captura específica corresponde a la resta de la captura no específica de la captura total. Los valores corresponden al promedio \pm rango de duplicados de un experimento representativo, expresados como porcentaje de la captura total a los 10 min; el ensayo fue repetido 8 veces con resultados similares. **B)** Captura total y no específica a los 10 min. Los valores se expresan como porcentaje de la captura total y corresponden al promedio \pm SEM de los 8 experimentos realizados. El análisis estadístico se realizó con una prueba t de Student pareada.

Los transportadores de glutamato dependen de Na^+ , por lo que se utilizó una solución KRH en la que se sustituyó equimolarmente el NaCl por LiCl para evaluar la captura no específica de glutamato (transporte pasivo no dependiente de transportadores) (Fig. 14A, color rojo). La Figura 14B compara la captura total y no específica a los 10 min.

10.2. La captura de glutamato por los astrocitos en cultivo primario es reducida significativamente por el inhibidor TFB-TBOA

Posteriormente se realizaron ensayos de inhibición de la captura de glutamato en presencia de TFB-TBOA (10 μM) o ácido dihidrokaínico (DHKA; 100 μM) así como en solución KRH sin NaCl. La Fig. 15 muestra que la captura de glutamato se reduce significativamente (-93.1%) por el TFB-TBOA, que inhibe selectivamente a los transportadores EAAT1/GLAST y EAAT2/GLT-1, pero no por el DHKA (-10.8%), inhibidor selectivo del EAAT2/GLT-1, lo que sugiere una mayor participación del EAAT1/GLAST. La Fig. 15 muestra también que la inhibición de la captura de glutamato por el TFB-TBOA no fue significativamente diferente de la observada en medio sin NaCl (-87.8%), indicando que el TFB-TBOA también define la captura no específica.

De acuerdo con Schreiner *et al.* (2014) y Hanson *et al.* (2015), la expresión del EAAT1/GLAST es mayor durante los primeros días de vida postnatal y el aumento en la expresión del EAAT2/GLT-1 ocurre entre los días 20 y 25 de vida postnatal, lo cual es consistente con lo obtenido en estos ensayos.

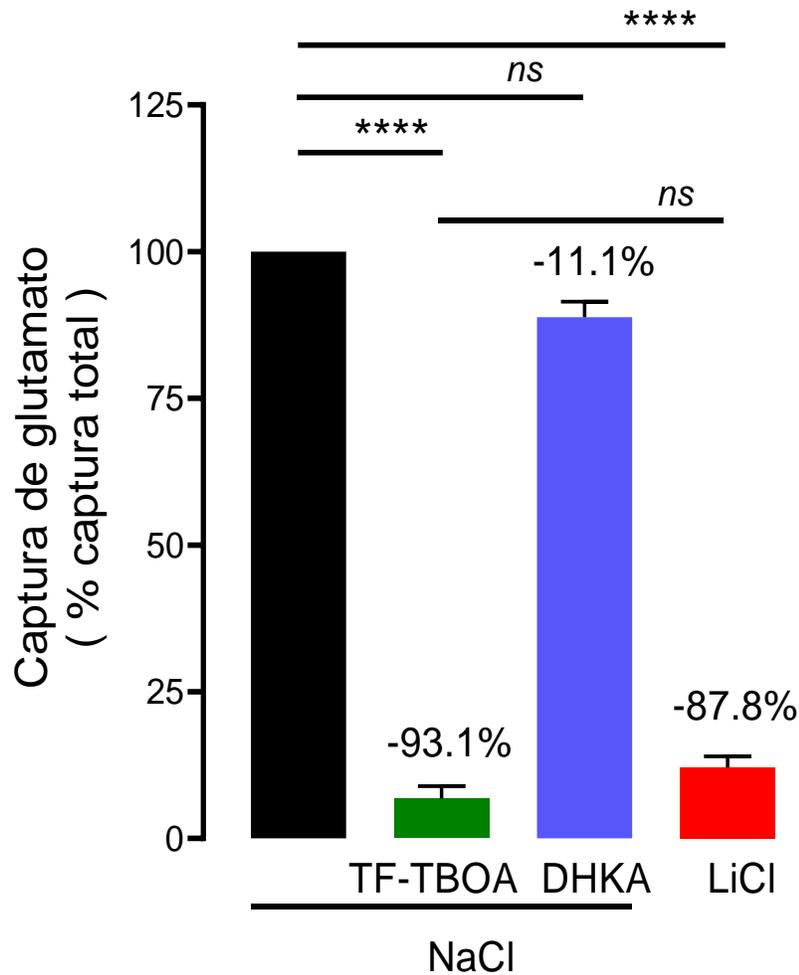


Figura 15. Efecto de inhibidores de los EAATs en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos fueron incubados con [³H]-glutamato (250 nM)/glutamato (5 μM) durante 5 min en presencia y ausencia de TFB-TBOA (10 μM) o DHKA (100 μM), así como en solución sin NaCl. Los fármacos se agregaron 15 min antes de la mezcla [³H]-glutamato/glutamato. Los valores se expresan como porcentaje de la captura total y corresponden al promedio ± SEM de 4 experimentos. *****P* < 0.0001; *ns*, no significativo; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

La Fig. 16 muestra las curvas concentración-respuesta para la inhibición de la captura de glutamato por TFB-TBOA y DHKA. El TFB-TBOA inhibió la captura de glutamato de manera dependiente de la concentración con un valor de IC_{50} de 21.1 nM (pIC_{50} -7.69) y un efecto máximo de inhibición alcanzado a 10 μ M. En contraste, la inhibición por DHKA fue parcial, con un efecto máximo de $-24.9 \pm 4.8\%$ a una concentración de 100 μ M.

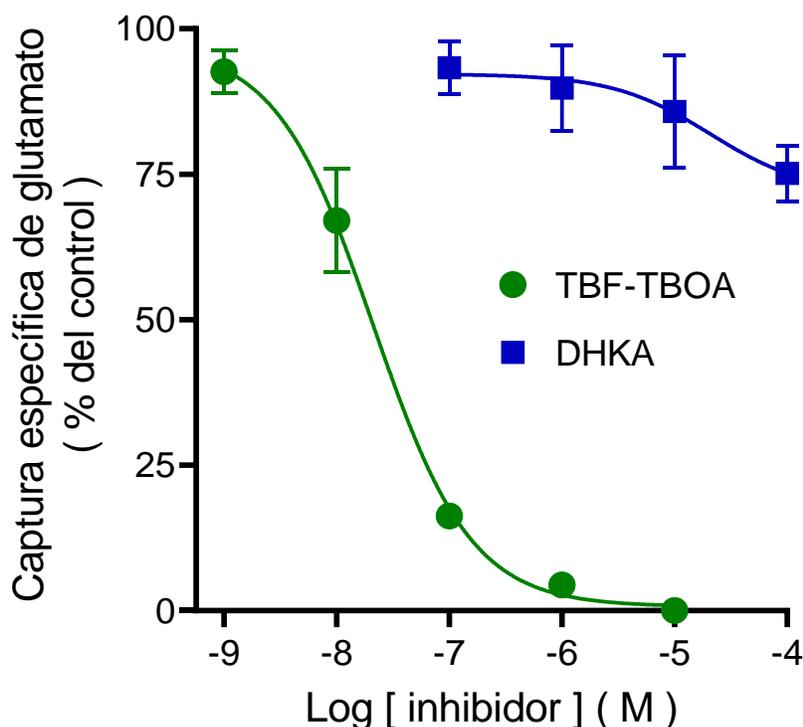


Figura 16. Curvas concentración-respuesta de la inhibición de la captura de glutamato por TFB-TBOA y DHKA en astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario. Los astrocitos se incubaron con TFB-TBOA o DHKA a las concentraciones indicadas por 15 min antes de la adición por 5 min de [3 H]-glutamato/glutamato (250 nM/5 μ M). Los valores se expresan como porcentaje de la captura específica control (captura en presencia de 10 μ M de TFB-TBOA sustraída de la captura total) y corresponden al promedio \pm SEM de 4 experimentos. Las líneas indican el mejor ajuste a una ecuación de Hill.

10.3. La activación aguda del H₃R no modifica la captura de glutamato por los astrocitos en cultivo primario

La Fig. 17 muestra que la incubación con el agonista del H₃R immeipip (100 nM) por 15 min no afectó la captura de [³H]-glutamato/glutamato. Los astrocitos en cultivo primario también expresan receptores a dopamina D₁R y D₂R; sin embargo, la incubación con agonistas selectivos (APB y quinpirol, respectivamente) tampoco modificó la captura de glutamato.

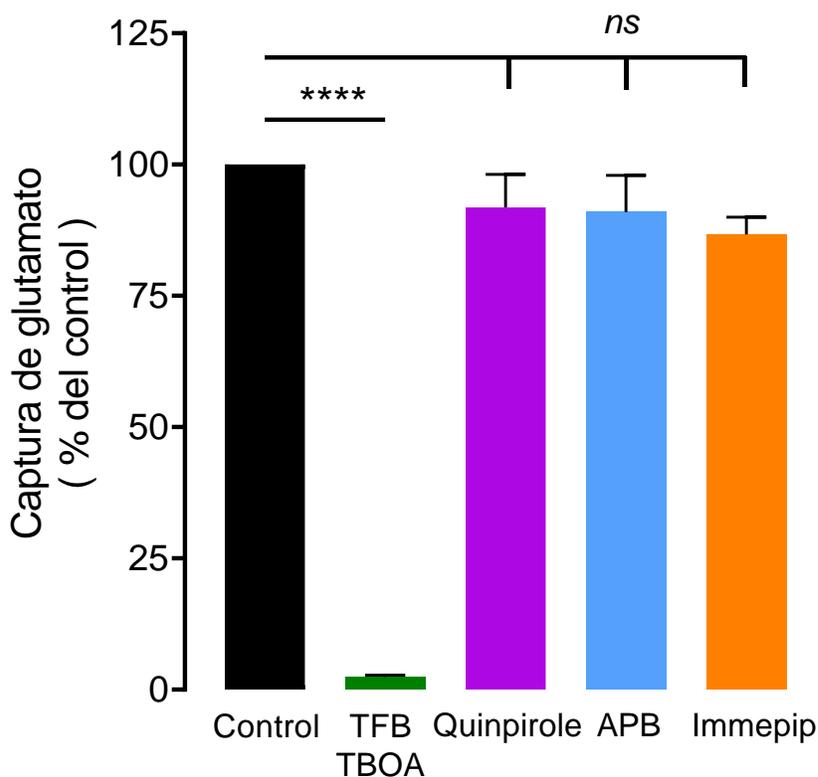


Figura 17. La activación aguda de los receptores D₁, D₂ y H₃ no modifica la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos fueron incubados con [³H]-glutamato (250 nM)/glutamato (5 μM) durante 5 min en presencia y ausencia de los agonistas quinpirol (D₂Rs), APB (SKF 82958; D₁Rs) e immeipip (H₃Rs), adicionados 10 min antes. Los valores se expresan como porcentaje de la captura basal de glutamato y corresponden a los promedios ± SEM de 6 experimentos. *****P* <0.0001; *ns*, no significativo; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

10.4. La activación subaguda del H₃R aumenta la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario

Para evaluar el efecto de la activación subaguda del H₃R los astrocitos se incubaron por 1, 2, 3 o 4 días con immpip (100 nM). La Fig. 18 muestra un incremento estadísticamente significativo en la captura de glutamato después de 1, 2 y 3 días de exposición al agonista. La incubación por 4 días también aumentó la captura del neurotransmisor, pero el efecto no fue significativo, probablemente por la desensibilización del propio receptor, como ha sido reportado por Marchese *et al.* (2008) y Osorio-Espinoza *et al.* (2014).

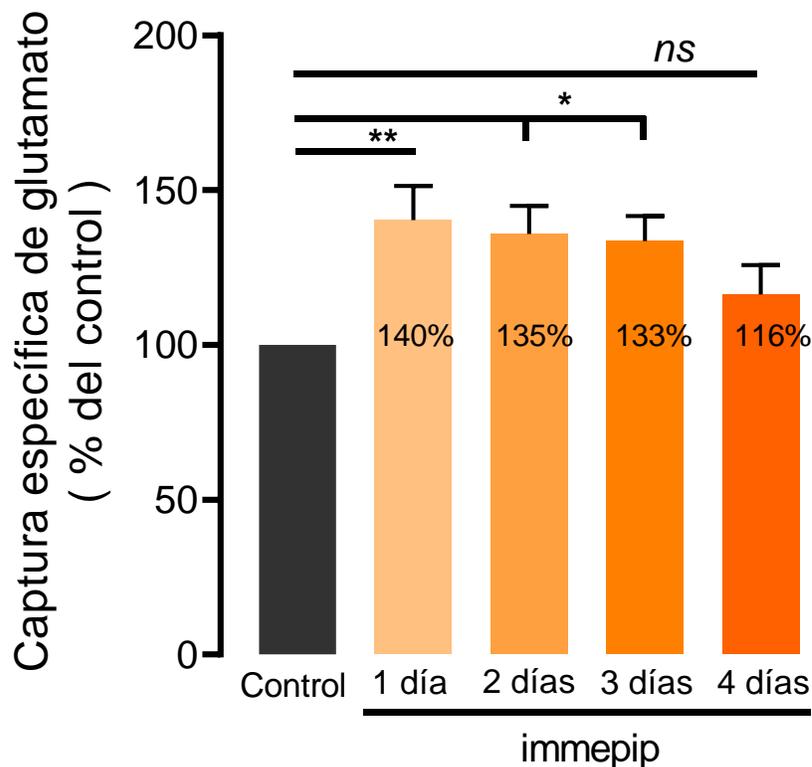


Figura 18. La activación subaguda del H₃R modifica captura de glutamato por los astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos fueron incubados con el agonista del H₃R immpip (100 nM) por los días indicados. Los valores se expresan como porcentaje de la captura específica control y corresponden a los promedios \pm SEM de 6 experimentos realizados por triplicado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *ns*, no significativo; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Para corroborar la participación del H₃R en el aumento en la captura de glutamato, los astrocitos se incubaron por 24 h con immpip (100 nM) en presencia o ausencia del antagonista selectivo del H₃R yodofenpropit (3 μM). La Fig. 19 muestra que la incubación con yodofenpropit no modifica por sí misma la captura de glutamato con respecto al grupo control, y que la co-incubación en presencia de immpip y yodofenpropit previene de manera significativa el aumento en la captura de glutamato observado cuando solo se incubaba con immpip. Esto confirma el efecto del H₃R astrofítico en la captura de glutamato al activarse de manera subaguda.

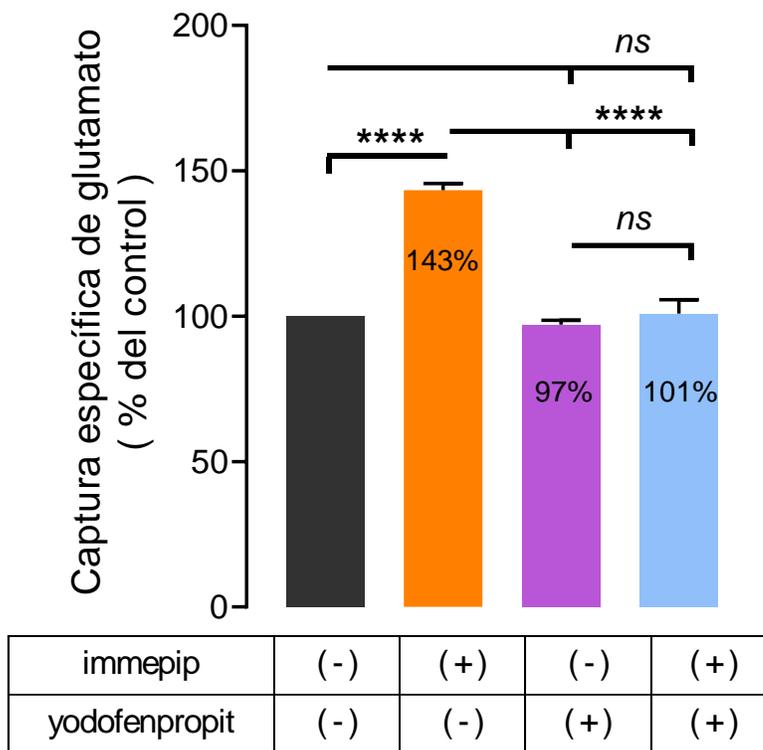


Figura 19. El yodofenpropit, antagonista selectivo del H₃R, previene el aumento en la captura de glutamato por astrocitos inducido por el agonista immpip. Los astrocitos fueron incubados por 24 h con immpip (100 nM) en presencia o ausencia del antagonista selectivo del H₃R yodofenpropit (3 μM), adicionado 15 min antes. Los valores se expresan como porcentaje de la captura específica control y corresponden al promedio ± SEM de 6 experimentos. *****P* <0.0001, *ns*, no significativo; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Para iniciar el estudio de las vías de señalización inducidas o reguladas por la activación de los H₃R y que podrían estar implicadas en el aumento de la captura de glutamato, los astrocitos se incubaron durante 24 h con immepip (100 nM) en presencia o ausencia de inhibidores selectivos de las MEK-1/2 (PD-98,059; 1 μM; Fig. 20A) o de las PKCs (Gö-6983; 1 μM; Fig. 20B).

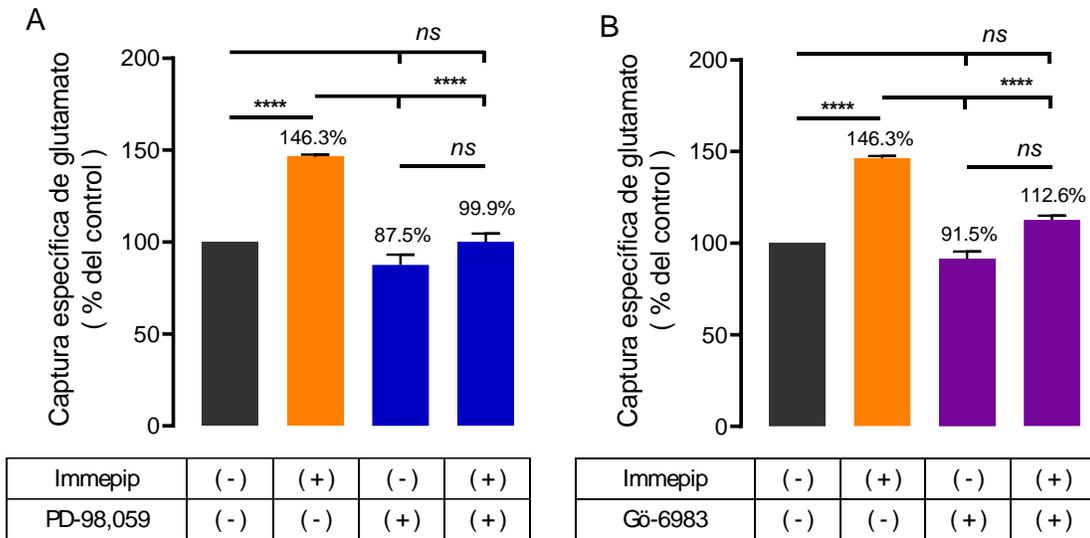


Figura 20. Efecto de inhibidores selectivos de las MEK-1/2 o de las PKCs en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario. Los astrocitos fueron incubados por 24 h con immepip (100 nM) en presencia o ausencia de los inhibidores selectivos de las MEK-1/2 (PD-98,059; 1 μM; A) o de las PKCs (Gö-6983; 1 μM; B), adicionados 15 min antes. Los valores se expresan como porcentaje de la captura específica control de glutamato y corresponden al promedio ± SEM de 4 experimentos. *****P* < 0.0001; *ns*, no significativo; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

En las Figuras 20A y 20B se observa que la incubación con ambos inhibidores no modifica por sí sola la captura de glutamato con respecto al grupo control, pero tanto el fármaco PD-98,059 como el Gö-6983 previenen el aumento en la captura de glutamato inducido por el immepip, sugiriendo que las vías de señalización PKC y MEK/ERK participan en la estimulación de la captura de glutamato inducida por la activación subaguda del H₃R.

11. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la activación subaguda, pero no aguda, del H₃R aumenta la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario, y sugieren que este efecto involucra la vía de señalización PLC → PKC → MEK/ERK.

11.1. Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario

Un enfoque ampliamente utilizado para estudiar el transporte de glutamato es determinar la captura de [³H]-glutamato o [³H]-aspartato por células en cultivo (Parsons *et al.*, 2016). En este trabajo se observó un aumento significativo en la captura específica de glutamato por los astrocitos durante los primeros 10 min; por esta razón se decidió evaluar los siguientes experimentos a los 5 min, para determinar posibles efectos de inhibición o estimulación. Esto es consistente con estudios previos que han utilizado periodos de 1-5 min para determinar la captura de [³H]-glutamato (Petr *et al.*, 2015; Parsons *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019; Dąbrowska-Bouta, *et al.*, 2023).

Es probable que la disminución modesta en la captura de glutamato que se observa en tiempos posteriores corresponda al aumento en la concentración intracelular de glutamato que reduce la captura por disminución del *driving force* de los EAATs (potencial de inversión -80 mV) (Trabelsi *et al.*, 2017; Flanagan *et al.*, 2018; Verkhratsky y Nedergaard, 2018), debido a que por cada molécula de glutamato se co-transportan tres iones de Na⁺, uno de H⁺ y se intercambia un K⁺ y 1 OH⁻ o HCO₃⁻ (Alleva *et al.*, 2020; Flanagan *et al.*, 2021; Cortese *et al.*, 2023).

11.2. Inhibición por TFB-TBOA y DHKA de la captura de glutamato por los astrocitos

La captura de glutamato por los EAATs es necesaria para controlar la actividad excitatoria del neurotransmisor (Raiteri y Raiteri, 2000; Vandenberg y Ryan, 2013; Zhou y Danbolt, 2014; Danbolt *et al.*, 2016; Trabelsi *et al.*, 2017; Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021). Los resultados con inhibidores en los ensayos con astrocitos corticales en cultivo primario mostraron que el TFB-TBOA

reduce significativamente la captura, no así el DHKA. El valor de IC₅₀ obtenido para el TFB-TBOA (21.1 nM) corresponde a lo reportado previamente para la inhibición por TFB-TBOA del transporte por el EAAT1 (IC₅₀ 22 nM) y por el EAAT2 (IC₅₀ 17 nM) (Suchak *et al.*, 2003; Shimamoto *et al.*, 2004). En conjunto, estos resultados indican una participación importante del EAAT1 y que la contribución del EAAT2 no es significativa.

En el SNC adulto, los astrocitos expresan tanto el EAAT2 como el EAAT1, responsables de gran parte de la captura de glutamato, con mayor actividad del EAAT2 (Hanson *et al.*, 2015; Končeková *et al.*, 2023). Sin embargo, la expresión diferencial de los EAATs varía a lo largo del neurodesarrollo siendo mayor la presencia de EAAT1 en el cerebro de ratas neonatas, en el que los niveles de expresión del EAAT2 son muy bajos y aumentan después del día 20 de vida postnatal (Voutsinos-Porche *et al.*, 2003; Benediktsson *et al.*, 2012; Schreiner *et al.*, 2014; y Hanson *et al.*, 2015). Lo anterior es consistente con lo obtenido en este trabajo, considerando que los cultivos de astrocitos se obtuvieron de ratas Wistar de 2-7 días de vida postnatal y la captura obtenida se debió primordialmente al EAAT1.

11.3. Activación aguda del H₃R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario

Los complejos Gβγ de las proteínas G pueden inhibir la captura de neurotransmisores como se ha reportado para la captura de dopamina por el transportador DAT (Garcia-Olivares *et al.*, 2013). El H₃R se encuentra altamente expresado en regiones como la corteza cerebral y el neostriado (Pillot *et al.*, 2002; Bolam y Ellender, 2016) y se ha descrito que su activación modula la transmisión glutamatérgica córtico-estriatal (Ellender *et al.*, 2011). Por estas razones, se consideró que la activación del H₃R y la subsecuente generación de complejos Gβγ podía modificar la captura de glutamato por los astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario. Sin embargo, los resultados mostraron que la activación aguda del H₃R por immepip no tuvo efecto significativo en la captura de glutamato.

Algunos de los receptores más abundantes en los astrocitos son los D₂Rs (Sočan *et al.*, 2024), los cuales a semejanza del H₃R activan proteínas G $\alpha_{i/o}$. La activación de los D₂Rs con quinpirol en astrocitos en cultivo primario no tuvo un efecto estadísticamente significativo en la captura de glutamato, sugiriendo que no es suficiente la cantidad de complejos G $\beta\gamma$ que se producen cuando se aplica immepip o quinpirol para afectar al transportador. La activación aguda de los D₁Rs, acoplados a las proteínas G α_s y expresados en astrocitos corticales tampoco modificó la captura de glutamato.

11.4. Activación subaguda del H₃R y captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario

La activación subaguda del H₃R en astrocitos en cultivo primario aumentó significativamente la captura de glutamato después de 1, 2 y 3 días de incubación; aunque la activación del H₃R por 4 días también aumentó la captura del neurotransmisor, el efecto no fue significativo. Esto último podría explicarse por la desensibilización homóloga del receptor, reportada por Marchese *et al.* (2008) y Osorio-Espinoza *et al.* (2014). Además, se propone que el H₃R pudiera modular la captura de glutamato en este marco temporal, posiblemente por efectos no inmediatos asociados a la activación sostenida de proteínas G $\alpha_{i/o}$, de manera similar a como se ha demostrado la regulación de la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 mediante la activación del H₃R y en particular, de la vía PLC/PKC/MAPK (Parra-Abarca *et al.*, 2019).

Por su parte, la co-incubación de astrocitos con immepip y yodofenpropit, un antagonista selectivo del H₃R, previno de manera significativa el aumento en la captura de glutamato inducido por la activación subaguda del H₃R (Fig. 19). Este hallazgo apoya un efecto específico del receptor y sugiere que su activación modula la captura de glutamato por los astrocitos. Al evaluar la participación de algunas de las principales vías de señalización del H₃R que podrían estar involucradas en la modulación de la expresión y/o actividad de los EAATs se encontró evidencia de la participación secuencial de las vías PLC → DAG → PKC y MEK-1/2 → ERK-1/2 (Lortet *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 2014; Chawla *et al.*,

2017) para promover la captura de glutamato debida a la activación subaguda del H₃R, como se esquematiza en la Fig. 21.

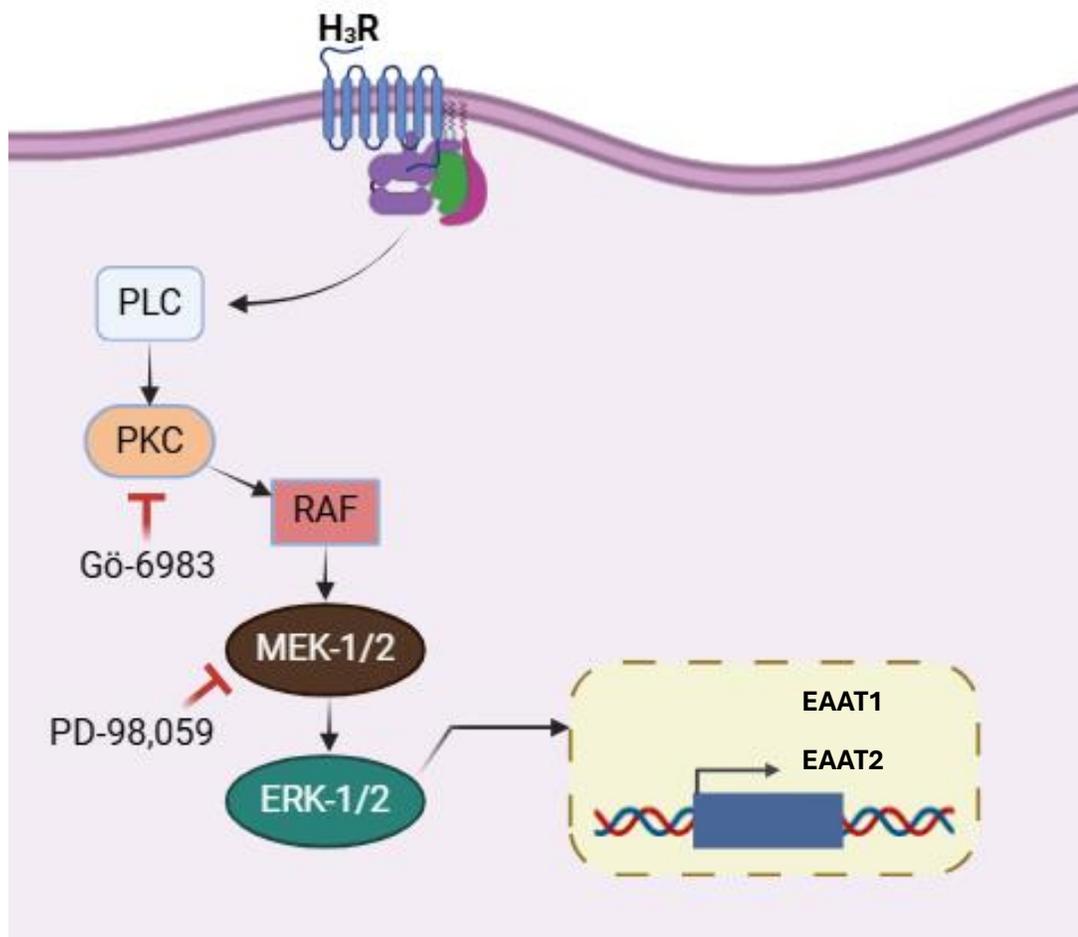


Figura 21. Mecanismo propuesto para el efecto estimulador de la activación de los H₃Rs en la expresión del EAAT1 y EAAT2 por astrocitos cerebro-corticales. Se ilustran las vías de señalización presumiblemente involucradas, así como el sitio de acción de los inhibidores farmacológicos utilizados.

12. Conclusiones

- En los astrocitos cerebro-corticales de ratas neonatales, la captura de glutamato se debe principalmente al EAAT1 y no al EAAT2 como ocurre en el cerebro adulto.
- La activación aguda del H₃R no modifica la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.
- La activación subaguda del H₃R por 1, 2 y 3 días aumenta significativamente la captura de glutamato posiblemente a partir del aumento de la actividad y/o expresión del EAAT2.
- La vía de señalización PKC / MEK-1/2 participa importantemente en el incremento en la captura de glutamato observado con la activación subaguda (1 día) del H₃R.

13. Perspectivas

- Evaluar el efecto de la activación subaguda del H₃R en la expresión proteica del EAAT1 y EAAT2 en cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales, utilizando *Western blot*.
- Evaluar la participación de la vía PLC/PKC/MAPKs en el posible efecto de la activación subaguda del H₃R en la expresión proteica de EAAT1 y EAAT2 en cultivos primarios de astrocitos.
- Evaluar el efecto de la activación subaguda del H₃R en la captura de glutamato en preparaciones de sinaptosomas (terminales sinápticas aisladas).
- Evaluar el efecto de la activación subaguda del H₃R en la liberación de glutamato por sinaptosomas (determinación de la fluorescencia de NADPH), así como en la síntesis de glutamato, evaluando los niveles de glutaminasa (*Western blot*) y de glutamato (HPLC).

14. Referencias

1. Albarracin SL, Baldeon ME, Sangronis E, Petruschina AC, Reyes FGR. L-glutamate: a key amino acid for sensory and metabolic functions. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2016; 66(2): 101-112.
2. Albrecht J, Zielińska M, Norenberg MD. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochemical Pharmacology*. 2010; 80(9), 1303–1308. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.024
3. Alhusaini M, Eissa N, Saad AK, Beiram R, Sadek B. Revisiting Preclinical Observations of Several Histamine H₃ Receptor Antagonists/Inverse Agonists in Cognitive Impairment, Anxiety, Depression, and Sleep–Wake Cycle Disorder. *Frontiers in Pharmacology*. 2022; 13, 861094. doi:10.3389/fphar.2022.861094
4. Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, *et al*. Abundant Tau Filaments and Nonapoptotic Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Human P301S Tau Protein. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22(21): 9340-9351. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-21-09340.2002
5. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*. 2018; 362(6411); 181–185. doi:10.1126/science.aat0473
6. Alleva C, Kovalev K, Astashkin R, Berndt MI, Baeken C, Balandin T, *et al*. Na⁺-dependent gate dynamics and electrostatic attraction ensure substrate coupling in glutamate transporters. *Science Advances*. 2020; 6(47): eaba9854. doi:10.1126/sciadv.aba9854
7. Andersen J, Schousboe A. Milestone Review: Metabolic dynamics of glutamate and GABA mediated neurotransmission — The essential roles of astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 2023; 166(2): 109–137. doi:10.1111/jnc.15811
8. Aquino-Miranda G, Molina-Hernández A, Arias-Montaña JA. Regulación por receptores H₃ a histamina de la liberación de neurotransmisores en los ganglios basales: implicaciones para la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. *Gaceta Médica de México*. 2012; 148(5): 467-475.

9. Aquino-Miranda G, Rivera-Ramírez N, Márquez-Gómez R, Escamilla-Sánchez J, González-Pantoja R, Ramos-Languren LE, *et al.* Histamine H₃ receptor activation reduces the impairment in prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle response and Akt phosphorylation induced by MK-801 (dizocilpine), antagonist at N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2020; 94, 109653. doi:10.1016/j.pnpbp.2019.109653
10. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature*. 1983; 302(5911): 832–837. doi:10.1038/302832a0
11. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H₃-receptors. *Neuroscience*. 1987; 23(1): 149-157. doi:10.1016/0306-4522(87)90279-x
12. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94(8): 4155–4160. doi:10.1073/pnas.94.8.4155
13. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*. 2006; 98(3): 641–653. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x
14. Barros LF, Ruminot I, Sotelo-Hitschfeld T, Lerchundi R, Fernández-Moncada I. Metabolic Recruitment in Brain Tissue. *Annual Review of Physiology*. 2023; 85, 115–135. doi:10.1146/annurev-physiol-021422-091035
15. Bartkowska K, Koguc-Sobolewska P, Djavadian R, Turlejski K. Astrocytes of the Anterior Commissure Regulate the Axon Guidance Pathways of Newly Generated Neocortical Neurons in the Opossum. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(3), 1476. doi:10.3390/ijms25031476

16. Belkacemi K, Rondard P, Pin JP, Prézeau L. Heterodimers revolutionize the field of metabotropic glutamate receptors. *Neuroscience*. 2024; S0306-4522(24)00270-7. Advance online publication. doi:10.1016/j.neuroscience.2024.06.013
17. Belmaati-Cherkaoui M, Vacca O, Izabelle C, Boulay AC, Boulogne C, Gillet C, *et al.* Dp71 contribution to the molecular scaffold anchoring aquaporine-4 channels in brain macroglial cells. *Glia*. 2021; 69(4): 954–970. doi:10.1002/glia.23941
18. Benarroch EE. Histamine in the CNS: multiple functions and potential neurologic implications. *Neurology*. 2010; 75(16): 1472–1479. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f884b1
19. Benediktsson AM, Marrs GS, Tu JC, Worley PF, Rothstein JD, Bergles DE, *et al.* Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia*. 2012; 60(2): 175–188. doi:10.1002/glia.21249
20. Berger UV, Hediger MA. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anatomy and Embryology*. 1998; 198(1): 13–30. doi:10.1007/s004290050161
21. Birur B, Kraguljac NV, Shelton RC, Lahti AC. Brain structure, function, and neurochemistry in schizophrenia and bipolar disorder-a systematic review of the magnetic resonance neuroimaging literature. *NPJ Schizophrenia*. 2017; 3, 15. doi:10.1038/s41537-017-0013-9
22. Bolam JP, Ellender TJ. Histamine and the striatum. *Neuropharmacology*. 2016; 106: 74–84. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.08.013
23. Brazhe A, Verisokin A, Vervejko D, Postnov D. Astrocytes: new evidence, new models, new roles. *Biophysical Reviews*. 2023; 15(5): 1303–1333. doi:10.1007/s12551-023-01145-7
24. Brunetti V, Soda T, Berra-Romani R, De Sarro G, Guerra G, Scarpellino G, *et al.* Two Signaling Modes Are Better than One: Flux-Independent Signaling by

- Ionotropic Glutamate Receptors Is Coming of Age. *Biomedicines*. 2024; 12(4), 880. doi:10.3390/biomedicines12040880
25. Cantando I, Centofanti C, D'Alessandro G, Limatola C, Bezzi P. Metabolic dynamics in astrocytes and microglia during post-natal development and their implications for autism spectrum disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2024; 18, 1354259. doi:10.3389/fncel.2024.1354259
 26. Chawla AR, Johnson DE, Zybura AS, Leeds BP, Nelson RM, Hudmon A. Constitutive regulation of the glutamate/aspartate transporter EAAT1 by Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Journal of Neurochemistry*. 2017; 140(3): 421–434. doi:10.1111/jnc.13913
 27. Chen TS, Huang TH, Lai MC, Huang CW. The role of glutamate receptors in epilepsy. *Biomedicines*. 2023; 11(3), 783. doi:10.3390/biomedicines11030783
 28. Cheng C, Glover G, Banker G, Amara SG. A novel sorting motif in the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 3 directs its targeting in Madin-Darby canine kidney cells and hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22(24): 10643–10652. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-24-10643.2002
 29. Cohen J, Mathew A, Dourvetakis KD, Sanchez-Guerrero E, Pangen RP, Gurusamy N, *et al.* Recent research trends in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders. *Cells*. 2024; 13(6), 511. doi:10.3390/cells13060511
 30. Cortese K, Gagliani MC, Raiteri L. Interactions between glycine and glutamate through activation of their transporters in hippocampal nerve terminals. *Biomedicines*. 2023; 11(12), 3152. doi:10.3390/biomedicines11123152
 31. Dąbrowska-Bouta B, Strużyńska L, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Sulkowski G. Memantine improves the disturbed glutamine and γ -amino butyric acid homeostasis in the brain of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(17), 13149. doi:10.3390/ijms241713149

32. Danbolt NC, Pines G, Kanner BI. Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain. *Biochemistry*. 1990; 29(28): 6734–6740. doi:10.1021/bi00480a025
33. Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI. An $[\text{Na}^+ + \text{K}^+]$ -coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience*. 1992; 51(2): 295–310. doi:10.1016/0306-4522(92)90316-t
34. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. 2001; 65(1): 1-105. doi:10.1016/s0301-0082(00)00067-8
35. Danbolt NC, Furness DN, Zhou Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochemistry International*. 2016; 98: 29–45. doi:10.1016/j.neuint.2016.05.009
36. Das N, Dhamija R, Sarkar S. The role of astrocytes in the glymphatic network: a narrative review. *Metabolic Brain Disease*. 2024; 39(3): 453–465. doi:10.1007/s11011-023-01327-y
37. de Vivo L, Melone M, Rothstein JD, Conti F. GLT-1 Promoter Activity in Astrocytes and Neurons of Mouse Hippocampus and Somatic Sensory Cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2010; 3, 31. doi:10.3389/neuro.05.031.2009
38. Dixon HB, Severin ES. Dissociation of the prosthetic group of aspartate aminotransferase. *Biochemical Journal*. 1968; 110(2): 18–19. doi:10.1042/bj1100018p
39. Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H, *et al.* Identification of rat H_3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Molecular Pharmacology*. 2001; 59(1): 1–8. doi:10.1124/mol.59.1.1
40. Eccles JC, McGeer PL. Ionotropic and metabotropic neurotransmission. *Trends in Neuroscience*. 1979; 2, 39–40. doi:10.1016/0166-2236(79)90017-1
41. Ellender TJ, Huerta-Ocampo I, Deisseroth K, Capogna M, Bolam JP. Differential modulation of excitatory and inhibitory striatal synaptic transmission by

- histamine. *Journal of Neuroscience*. 2011; 31(43): 15340–15351. doi:10.1523/JNEUROSCI.3144-11.2011
42. Escalada P, Ezkurdia A, Ramírez MJ, Solas M. Essential Role of Astrocytes in Learning and Memory. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(3), 1899. doi:10.3390/ijms25031899
43. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*. 1989; 244(4906): 798–800. doi:10.1126/science.2567056
44. Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*. 1995; 375(6532): 599–603. doi:10.1038/375599a0
45. Flanagan B, McDaid L, Wade JJ, Wong-Lin K, Harkin J. A computational study of astrocytic glutamate influence on post-synaptic neuronal excitability. *PLoS Computational Biology*. 2018; 14(4), e1006040. doi:10.1371/journal.pcbi.1006040
46. Flanagan B, McDaid L, Wade JJ, Toman M, Wong-Lin K, Harkin J. A computational study of astrocytic GABA release at the glutamatergic synapse: EAAT-2 and GAT-3 coupled dynamics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021; 15, 682460. doi:10.3389/fncel.2021.682460
47. Garcia-Olivares J, Torres-Salazar D, Owens WA, Baust T, Siderovski DP, Amara SG, *et al.* Inhibition of dopamine transporter activity by G protein $\beta\gamma$ subunits. *PloS One*. 2013; 8(3), e59788. doi:10.1371/journal.pone.0059788
48. Gavillet M, Allaman I, Magistretti PJ. Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia*. 2008; 56(9): 975–989. doi:10.1002/glia.20671
49. Ghosh M, Lane M, Krizman E, Sattler R, Rothstein JD, Robinson MB. The transcription factor Pax6 contributes to the induction of GLT-1 expression in astrocytes through an interaction with a distal enhancer element. *Journal of Neurochemistry*. 2016; 136(2): 262–275. doi:10.1111/jnc.13406

50. González CU, Jayaraman V. Structural dynamics in α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor gating. *Current Opinion in Structural Biology*. 2024; 87, 102833. Advance online publication. doi:10.1016/j.sbi.2024.102833
51. Gorshkov K, Aguisanda F, Thorne N, Zheng, W. Astrocytes as targets for drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2018; 23(3): 673–680. doi:10.1016/j.drudis.2018.01.011
52. Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, Furukawa H, Menniti FS, Sobolevsky AI, *et al.* Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*. 2021; 73(4), 298–487. doi:10.1124/pharmrev.120.000131
53. Hanson E, Armbruster M, Cantu D, Andresen L, Taylor A, Danbolt NC, *et al.* Astrocytic glutamate uptake is slow and does not limit neuronal NMDA receptor activation in the neonatal neocortex. *Glia*. 2015; 63(10): 1784–1796. doi:10.1002/glia.22844
54. Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*. 2014; 62(9): 1377–1391. doi:10.1002/glia.22683
55. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 1999; 57(4): 417–428. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990815)57:4<417::AID-JNR1>3.0.CO;2-N
56. Hogstad S, Svenneby G, Torgner IA, Kvamme E, Hertz L, Schousboe A. Glutaminase in neurons and astrocytes cultured from mouse brain: Kinetic properties and effects of phosphate, glutamate, and ammonia. *Neurochemical Research*. 1988; 13(4), 383–388. doi:10.1007/bf00972489
57. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience*. 1994; 17, 31–108. doi:10.1146/annurev.ne.17.030194.000335

58. Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, Follin-Arbelet VV, Grutle NJ, Mylonakou MN, *et al.* The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *The Journal of Neuroscience*. 2012; 32(17): 6000–6013. doi:10.1523/JNEUROSCI.5347-11.2012
59. Hong MM, Shen SC, Braunstein AE. Distribution of L-alanine dehydrogenase and L-glutamate dehydrogenase in Bacilli. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1959; 36: 288–289. doi:10.1016/0006-3002(59)90111-8
60. Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, *et al.* Cloning, Expression, and Gene Structure of a G Protein-Coupled Glutamate Receptor from Rat Brain. *Science*. 1991; 252, 1318–132. doi:10.1126/science.1656524
61. Iida T, Yoshikawa T, Matsuzawa T, Naganuma F, Nakamura T, Miura Y, *et al.* Histamine H₃ receptor in primary mouse microglia inhibits chemotaxis, phagocytosis, and cytokine secretion. *Glia*. 2015; 63(7): 1213–1225. doi:10.1002/glia.22812
62. Jiménez E, Núñez E, Ibáñez I, Draffin JE, Zafrá F, Giménez C. Differential regulation of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST by GSK3 β . *Neurochemistry International*. 2014; 13: 33–43. doi:10.1016/j.neuint.2014.10.003
63. Jungblut M, Tiveron MC, Barral S, Abrahamsen B, Knöbel S, Pennartz S, *et al.* Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia*. 2012; 60(6): 894–907. doi:10.1002/glia.22322
64. Jurič DM, Mele T, Carman-Kržan M. Involvement of histaminergic receptor mechanisms in the stimulation of NT-3 synthesis in astrocytes. *Neuropharmacology*. 2011; 60(7-8): 1309–1317. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.01.019

65. Jurič DM, Kržan M, Lipnik-Stangelj M. Histamine and astrocyte function. *Pharmacological Research*. 2016; 111: 774–783. doi:10.1016/j.phrs.2016.07.035
66. Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*. 1992; 360(6403): 467–471. doi:10.1038/360467a0
67. Karki P, Webb A, Zerguine A, Choi J, Son DS, Lee E. Mechanism of raloxifene-induced upregulation of glutamate transporters in rat primary astrocytes. *Glia*. 2014; 62(8): 1270–1283. doi:10.1002/glia.22679
68. Karki P, Hong P, Johnson JJ, Pajarillo E, Son DS, Aschner M, *et al.* Arundic acid increases expression and function of astrocytic glutamate transporter EAAT1 via the ERK, Akt, and NF- κ B pathways. *Molecular Neurobiology*. 2018; 55(6): 5031–5046. doi:10.1007/s12035-017-0709-x
69. Končeková J, Kotorová K, Gottlieb M, Bona M, Bonová P. Changes in excitatory amino acid transporters in response to remote ischaemic preconditioning and glutamate excitotoxicity. *Neurochemistry International*. 2023; 173, 105658. doi:10.1016/j.neuint.2023.105658
70. Kovermann P, Engels M, Müller F, Fahlke C. Cellular physiology and pathophysiology of EAAT anion channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2022; 15, 815279. doi:10.3389/fncel.2021.815279
71. Krebs HA. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochemical Journal*. 1935; 29(8): 1951–1969. doi:10.1042/bj0291951
72. Lee HG, Wheeler MA, Quintana FJ. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nature Reviews*. 2022; 21(5): 339–358. doi:/10.1038/s41573-022-00390-x
73. Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and

- immunocytochemical observations. *Journal of Neuroscience*. 1995; 15: 1835–1853. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-03-01835.1995
74. Lin W, Xu L, Zheng Y, An S, Zhao M, Hu W, *et al*. Whole-brain mapping of histaminergic projections in mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2023; 120(14), e2216231120. doi:10.1073/pnas.2216231120
75. Lortet S, Samuel D, Had-Aissouni L, Masméjean F, Kerkerian-Le Goff L, Pisano P. Effects of PKA and PKC modulators on high affinity glutamate uptake in primary neuronal cell cultures from rat cerebral cortex. *Neuropharmacology*. 1999; 38(3): 395–402. doi:10.1016/s0028-3908(98)00193-2
76. Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, *et al*. Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Molecular Pharmacology*. 1999; 55(6): 1101–1107. doi:10.1124/mol.55.6.1101
77. Maragakis NJ, Rothstein JD. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiology of Disease*. 2004; 15(3): 461–473. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.007
78. Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2008; 48: 601–629. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094646
79. Martínez D, García L, Aguilera J, Ortega A. An acute glutamate exposure induces long-term down regulation of GLAST/EAAT1 uptake activity in cultured Bergmann glia cells. *Neurochemical Research*. 2014; 39(1): 142–149. doi:10.1007/s11064-013-1198-6
80. Martínez-Lozada Z, Ortega A. Milestone Review: Excitatory amino acid transporters - Beyond their expected function. *Journal of Neurochemistry*. 2023; 165(4): 457–466. doi:10.1111/jnc.15809
81. McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research*. 1990; 15(1): 41-70. doi:10.1016/0165-0173(90)90011-c

82. McKenna MC, Tildon JT, Stevenson JH, Huang X. New insights into the compartmentation of glutamate and glutamine in cultured rat brain astrocytes. *Developmental Neuroscience*. 1996; 18(5-6): 380–390. doi:10.1159/000111431
83. McNair LM, Andersen JV, Waagepetersen HS. Stable isotope tracing reveals disturbed cellular energy and glutamate metabolism in hippocampal slices of aged male mice. *Neurochemistry International*. 2023; 171, 105626. doi:10.1016/j.neuint.2023.105626
84. Mochizuki T. Histamine as an Alert Signal in the Brain. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2022; 69: 413–425. doi:10.1007/7854_2021_249
85. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*. 2015; 63(8): 1320–1329. doi:10.1002/glia.22836
86. Nieto-Alamilla G, Márquez-Gómez R, García-Gálvez AM, Morales-Figueroa GE, Arias-Montaño JA. The histamine H₃ receptor: structure, pharmacology, and function. *Molecular Pharmacology*. 2016; 90(5): 649–673. doi:10.1124/mol.116.104752
87. Olivares-Bañuelos TN, Chí-Castañeda D, Ortega A. Glutamate transporters: Gene expression regulation and signaling properties. *Neuropharmacology*. 2019; 161, 107550. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.02.032
88. Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Research*. 1974; 77(3): 507–512. doi:10.1016/0006-8993(74)90640-4
89. Olsen ML, Khakh BS, Skatchkov SN, Zhou M, Lee CJ, Rouach N. New insights on astrocyte ion channels: critical for homeostasis and neuron-glia signaling. *Journal of Neuroscience*. 2015; 35(41): 13827–13835. doi:10.1523/JNEUROSCI.2603-15.2015
90. Osorio-Espinoza A, Escamilla-Sánchez J, Aquino-Jarquín G, Arias-Montaño JA. Homologous desensitization of human histamine H₃ receptors expressed in CHO-K1 cells. *Neuropharmacology*. 2014; 77: 387–97. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.09.011

91. Pannasch U, Freche D, Dallérac G, Ghézali G, Escartin C, Ezan P, *et al.* Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nature Neuroscience*. 2014; 17(4): 549–558. doi:10.1038/nn.3662
92. Panula P, Nuutinen S. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013; 14(7): 472–487. doi:10.1038/nrn3526
93. Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WL, *et al.* International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacological Reviews*. 2015; 67(3): 601–655. doi:10.1124/pr.114.010249
94. Panula P. Histamine receptors, agonists, and antagonists in health and disease. *Handbook of Clinical Neurology*. 2021; 180: 377–387. doi:10.1016/B978-0-12-820107-7.00023-9
95. Parra-Abarca J, Rivera-Ramírez N, Villa-Maldonado LF, García-Hernández U, Aguilera P, Arias-Montaña JA. Histamine H₁ and H₃ receptor activation increases the expression of Glucose Transporter 1 (GLUT-1) in rat cerebrocortical astrocytes in primary culture. *Neurochemistry International*. 2019; 131, 104565. doi:10.1016/j.neuint.2019.104565
96. Parsons MP, Vanni MP, Woodard CL, Kang R, Murphy TH, Raymond LA. Real-time imaging of glutamate clearance reveals normal striatal uptake in Huntington disease mouse models. *Nature Communications*. 2016; 7. 11251. doi:10.1038/ncomms11251
97. Petr GT, Sun Y, Frederick NM, Zhou Y, Dhamne SC, Hameed MQ, *et al.* Conditional deletion of the glutamate transporter GLT-1 reveals that astrocytic GLT-1 protects against fatal epilepsy while neuronal GLT-1 contributes significantly to glutamate uptake into synaptosomes. *Journal of Neuroscience*. 2015; 35(13): 5187–51201. doi:10.1523/JNEUROSCI.4255-14.2015
98. Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 1995; 34(1), 1–26. doi:10.1016/0028-3908(94)00129-g

99. Philippu A. Brain mapping: topography of neurons and their transmitters involved in various brain functions. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2023; 396(7): 1415–1422. doi:10.1007/s00210-023-02523-4
100. Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, *et al*. A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*. 2002; 114(1): 173–193. doi:10.1016/s0306-4522(02)00135-5
101. Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, *et al*. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 1992; 360(6403): 464-467. doi:10.1038/360464a0
102. Porwal A, Yadav YC, Pathak K, Yadav R. An Update on Assessment, Therapeutic Management, and Patents on Insomnia. *BioMed Research International*. 2021; 2021, 6068952. doi:10.1155/2021/6068952
103. Provensi G, Passani MB, Costa A, Izquierdo I, Blandina P. Neuronal histamine and the memory of emotionally salient events. *British Journal of Pharmacology*. 2020; 177(3): 557–569. doi:10.1111/bph.14476
104. Qian H, Shu C, Xiao L, Wang G. Histamine and histamine receptors: Roles in major depressive disorder. *Frontiers in Psychiatry*. 2022; 13, 825591. doi:10.3389/fpsy.2022.825591
105. Rahman SN, McNaught-Flores DA, Huppelschoten Y, da Costa Pereira D, Christopoulos A, Leurs R, *et al*. Structural and Molecular Determinants for Isoform Bias at Human Histamine H₃ Receptor Isoforms. *ACS Chemical Neuroscience*. 2023; 14(4): 645-656. doi:10.1021/acscchemneuro.2c00425
106. Raiteri L, Raiteri M. Synaptosomes still viable after 25 years of superfusion. *Neurochemical Research*. 2000; 25(9-10): 1265–1274. doi:10.1023/a:1007648229795
107. Regunathan S, Sundaresan R. Glutamate metabolism in the brain of young rats exposed to organic and inorganic lead. *Neurochemistry International*. 1985; 7(3): 429–434. doi:10.1016/0197-0186(85)90165-2

108. Remahi S, Mabika M, Côté S, Iorio-Morin C, Near J, Hui SCN, *et al.* Neurotransmitter levels in the basal ganglia are associated with intracortical circuit activity of the primary motor cortex in healthy humans. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2024; 129, 110892. doi:10.1016/j.pnpbp.2023.110892
109. Ricci G, Volpi L, Pasquali L, Petrozzi L, Siciliano G. Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders. *Journal of Biological Physics*. 2009; 35(4): 317–336. doi:10.1007/s10867-009-9157-9
110. Riveros ME, Leibold NK, Retamal MA, Ezquer F. Role of histaminergic regulation of astrocytes in alcohol use disorder. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2024; 133, 111009. doi:10.1016/j.pnpbp.2024.111009
111. Rodríguez-Campuzano AG, Ortega A. Glutamate transporters: Critical components of glutamatergic transmission. *Neuropharmacology*. 2021; 192, 108602. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108602
112. Rosenberg PA, Amin S, Leitner M. Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *Journal of Neuroscience*. 1992; 12(1): 56–61. doi:10.1523/JNEUROSCI.12-01-00056.1992
113. Salganicoff L, Derobertis E. Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and gamma-aminobutyric acid cycles in rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 1965; 12: 287–309. doi:10.1111/j.1471-4159.1965.tb06766.x
114. Schneider EH, Neumann D, Seifert R. Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from H₍₁₎R- and H₍₂₎R-deficient mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2014; 42: 252–266. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.03.009
115. Schreiner AE, Durry S, Aida T, Stock MC, Rütther U, Tanaka K, *et al.* Laminar and subcellular heterogeneity of GLAST and GLT-1 immunoreactivity in the

- developing postnatal mouse hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*. 2014; 522(1): 204–224. doi:10.1002/cne.23450
116. Sharma A, Muresanu DF, Patnaik R, Menon PK, Tian ZR, Sahib S, *et al.* Histamine H₃ and H₄ receptors modulate Parkinson's disease induced brain pathology. Neuroprotective effects of nanowired BF-2649 and clobenpropit with anti-histamine-antibody therapy. *Progress in Brain Research*. 2021; 266: 1–73. doi:10.1016/bs.pbr.2021.06.003
117. Shimamoto K, Sakai R, Takaoka K, Yumoto N, Nakajima T, Amara SG, *et al.* Characterization of novel L-threo-beta-benzyloxyaspartate derivatives, potent blockers of the glutamate transporters. *Molecular Pharmacology*, 2004; 65(4): 1008–1015. doi:10.1124/mol.65.4.1008
118. Sidoryk-Węgrzynowicz M, Adamiak K, Strużyńska L. Astrocyte-Neuron Interaction via the Glutamate-Glutamine Cycle and Its Dysfunction in Tau-Dependent Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(5), 25053050. doi:10.3390/ijms25053050
119. Silva-Parra J, Sandu C, Felder-Schmittbuhl MP, Hernández-Kelly LC, Ortega A. Aryl Hydrocarbon Receptor in Glia Cells: A Plausible Glutamatergic Neurotransmission Orchestrator. *Neurotoxicity Research*. 2023; 41(1): 103–117. doi:10.1007/s12640-022-00623-2
120. Sladeczek F, Pin JP, Récasens M, Bockaert J, Weiss S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*. 1985; 317(6039), 717–719. doi:10.1038/317717a0
121. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 2010; 119(1): 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
122. Sočan V, Dolinar K, Kržan M. Transporters involved in adult rat cortical astrocyte dopamine uptake: Kinetics, expression and pharmacological modulation. *European Journal of Neuroscience*. 2024; 59(6): 1296–1310. doi:10.1111/ejn.16202

123. Sonnewald U, White LR, Odegård E, Westergaard N, Bakken IJ, Aasly J, *et al.* MRS study of glutamate metabolism in cultured neurons/gli. *Neurochemical Research*. 1996; 21(9): 987–93. doi:10.1007/BF02532408
124. Stanley JA, Burgess A, Khatib D, Ramaseshan K, Arshad M, Wu H, *et al.* Functional dynamics of hippocampal glutamate during associative learning assessed with in vivo ¹H functional magnetic resonance spectroscopy. *NeuroImage*. 2017; 153: 189–197. doi:10.1016/j.neuroimage.2017.03.051
125. Stern JR, Eggleston LV, Hems R, Krebs HA. Accumulation of glutamic acid in isolated brain tissue. *Biochemical Journal*. 1949; 44(4): 410–418.
126. Stoklund Dittlau K, Freude K. Astrocytes: The Stars in Neurodegeneration?. *Biomolecules*. 2024; 14(3), 14030289. doi:10.3390/biom14030289
127. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁽⁺⁾-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89(22): 10955–10959. doi:10.1073/pnas.89.22.10955
128. Su ZZ, Leszczyniecka M, Kang DC, Sarkar D, Chao W, Volsky DJ, *et al.* Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100(4): 1955–1960. doi:10.1073/pnas.0136555100
129. Suchak SK, Baloyianni NV, Perkinton MS, Williams RJ, Meldrum BS, Rattray M. The 'glial' glutamate transporter, EAAT2 (Glt-1) accounts for high affinity glutamate uptake into adult rodent nerve endings. *Journal of Neurochemistry*. 2003; 84(3): 522–532. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01553.x
130. Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, *et al.* Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *Journal of Neuroscience*. 1997; 17(3): 932–940. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-03-00932.1997

131. Takumida M, Takumida H, Anniko M. Localization of histamine (H₁, H₂, H₃ and H₄) receptors in mouse inner ear. *Acta Oto-laryngologica*. 2016; 136(6): 537–544. doi:10.3109/00016489.2015.1136433
132. Tavares MR, Wasinski F, Metzger M, Donato JJ. Impact of Growth Hormone on Microglial and Astrocytic Function. *Journal of Integrative Neuroscience*. 2024; 23(2), 2302032. doi:10.31083/j.jin2302032
133. Trabelsi Y, Amri M, Becq H, Molinari F, Aniksztejn, L. The conversion of glutamate by glutamine synthase in neocortical astrocytes from juvenile rat is important to limit glutamate spillover and peri/extrasynaptic activation of NMDA receptors. *Glia*. 2017; 65(2), 401–415. doi:10.1002/glia.23099
134. Unger T, Lakowa N, Bette S, Engele J. Transcriptional regulation of the GLAST/EAAT-1 gene in rat and man. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2012; 32(4): 539–547. doi:10.1007/s10571-011-9790-2
135. Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of glutamate transport. *Physiological Reviews*. 2013; 93(4): 1621–57. doi:10.1152/physrev.00007.2013
136. Vázquez-Durán DL, Ortega A, Rodríguez A. Amino Acid Transporters Proteins Involved in the Glutamate-Glutamine Cycle and Their Alterations in Murine Models of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*. 2024; 10.1007/s12035-024-03966-3. Advance Online Publication. doi:10.1007/s12035-024-03966-3
137. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*. 2018; 98(1): 239–389. doi:10.1152/physrev.00042.2016
138. Vizuite AFK, Fróes F, Seady M, Hansen F, Ligabue-Braun R, Gonçalves CA, *et al*. A mechanism of action of metformin in the brain: prevention of methylglyoxal-induced glutamatergic impairment in acute hippocampal slices. *Molecular Neurobiology*, 2023; 61(6): 3223-3239. doi:10.1007/s12035-023-03774-1
139. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews*. 2005; 6(8): 626–640. doi:10.1038/nrn1722

140. Voutsinos-Porche B, Knott G, Tanaka K, Quairiaux C, Welker E, Bonvento G. Glial glutamate transporters and maturation of the mouse somatosensory cortex. *Cerebral Cortex*. 2003; 13(10), 1110–1121. doi:10.1093/cercor/13.10.1110
141. Wahis J, Hennes M, Arckens L, Holt MG. Star power: the emerging role of astrocytes as neuronal partners during cortical plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. 2021; 67: 174–182. doi:10.1016/j.conb.2020.12.001
142. Waniewski RA, Martin DL. Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *Journal of Neurochemistry*. 1986; 47(1): 304–313. doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb02863.x
143. Wo ZG, Oswald RE. Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends in Neurosciences*. 1995; 18(4), 161–168. doi:10.1016/0166-2236(95)93895-5
144. Xu J, Pittenger C. The histamine H₃ receptor modulates dopamine D₂ receptor-dependent signaling pathways and mouse behaviors. *Journal of Biological Chemistry*. 2023; 299(4), 104583. doi:10.1016/j.jbc.2023.104583
145. Xu J, Zhang X, Qian Q, Wang Y, Dong H, Li N, *et al.* Histamine upregulates the expression of histamine receptors and increases the neuroprotective effect of astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*. 2018; 15(1), 41. doi:10.1186/s12974-018-1068-x
146. Yang XM, Yu H, Li JX, Li N, Li C, Xu DH, *et al.* Excitotoxic Storms of Ischemic Stroke: A Non-neuronal Perspective. *Molecular Neurobiology*. 2024; 10.1007/s12035-024-04184-7. Advance Online Publication. doi:10.1007/s12035-024-04184-7
147. Yu AC, Schousboe A, Hertz L. Metabolic fate of ¹⁴C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *Journal of Neurochemistry*. 1982; 39(4): 954–960. doi:10.1111/j.1471-4159.1982.tb11482.x
148. Zhang WD, Li N, Du ZR, Zhang M, Chen S, Chen WF. IGF-1 receptor is involved in the regulatory effects of icariin and icaritin in astrocytes under basal conditions

- and after an inflammatory challenge. *European Journal of Pharmacology*. 2021; 906, 174269. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174269
149. Zheng Y, Fan L, Fang Z, Liu Z, Chen J, Zhang X, *et al.* Postsynaptic histamine H₃ receptors in ventral basal forebrain cholinergic neurons modulate contextual fear memory. *Cell Reports*. 2023; 42(9), 113073. doi:10.1016/j.celrep.2023.113073
150. Zhou Y, Danbolt NC. GABA and glutamate transporters in brain. *Frontiers in Endocrinology*. 2013; 4, 165. doi:10.3389/fendo.2013.00165
151. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission*. 2014; 121(8): 799–817. doi:10.1007/s00702-014-1180-8
152. Zhou Y, Hassel B, Eid T, Danbolt NC. Axon-terminals expressing EAAT2 (GLT-1; Slc1a2) are common in the forebrain and not limited to the hippocampus. *Neurochemistry International*. 2019; 123, 101–113. doi:10.1016/j.neuint.2018.03.006
153. Zhou ZX, Xu LJ, Wang HN, Cheng S, Li F, Miao Y, *et al.* EphA4/ephrinA3 reverse signaling mediated downregulation of glutamate transporter GLAST in Müller cells in an experimental glaucoma model. *Glia*. 2023; 71(3): 720–741. doi:10.1002/glia.24307