



**Benemérita Universidad Autónoma  
de Puebla**

**Facultad de Medicina**

**Licenciatura en Biomedicina**

**Instituto de Fisiología**



**Efecto de la activación subaguda del receptor a histamina  
H<sub>3</sub> en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo  
primario**

**Tesis para obtener el título de**

**Licenciado en Biomedicina**

**Presenta**

**Yrving Daniel Díaz De Lucio**

**Director de tesis**

**Dr. José Antonio Arias Montaña**

**Codirectora de tesis**

**Dra. Ma. Del Carmen Cortés Sánchez**

**Puebla, Pue, julio de 2024**

*“El método de la investigación científica no es más que la expresión del modo necesario del funcionamiento de la mente humana”*

**Thomas Henry Huxley**

<b>ÍNDICE</b>	<b>II</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>VII</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VIII</b>

## Índice

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Abstract</b>	<b>2</b>
<b>3. Introducción</b>	<b>3</b>
3.1. Astrocitos	3
3.2. Sistema glutamatérgico en el sistema nervioso central (SNC)	4
3.3. Sistema histaminérgico del SNC	6
<b>4. Antecedentes generales</b>	<b>8</b>
4.1. Regulación del metabolismo del glutamato por astrocitos	8
4.2. Transportadores de aminoácidos excitadores de alta afinidad (EAATs)	11
4.3. Receptores a histamina en el SNC	15
4.3.1. Receptor a histamina H <sub>3</sub> (H <sub>3</sub> R)	17
<b>5. Antecedentes específicos</b>	<b>20</b>
5.1. Regulación de la expresión de los EAATs en astrocitos	20
5.2. H <sub>3</sub> R en astrocitos	23
<b>6. Planteamiento del problema</b>	<b>27</b>
<b>7. Hipótesis</b>	<b>28</b>
<b>8. Objetivos</b>	<b>29</b>
8.1. Objetivo general	29
8.2. Objetivos específicos	29
<b>9. Materiales y métodos</b>	<b>30</b>
9.1. Animales	30
9.2. Obtención de cultivos primarios de astrocitos	30
9.3. Curso temporal de la captura de glutamato	32
9.4. Efecto en la captura de glutamato de inhibidores selectivos de los transportadores EAAT1 y EAAT2	33
9.5. Efecto de la activación aguda (10 minutos) del H <sub>3</sub> R en la captura de glutamato	33

9.6. Efecto de la activación subaguda (1-4 días) del H <sub>3</sub> R en la captura de glutamato	34
9.7. Análisis estadístico	35
<b>10. Resultados</b>	<b>36</b>
10.1. Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario	36
10.2. La captura de glutamato por los astrocitos en cultivo primario es reducida significativamente por el inhibidor TFB-TBOA	37
10.3. La activación aguda del H <sub>3</sub> R no modifica la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario	40
10.4. La activación subaguda del H <sub>3</sub> R aumenta la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario	41
<b>11. Discusión</b>	<b>43</b>
11.1. Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario	43
11.2. Inhibición de la captura por astrocitos por TFB-TBOA y DHKA	43
11.3. Activación aguda del H <sub>3</sub> R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario	44
11.4. Activación subaguda del H <sub>3</sub> R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario	45
<b>12. Conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>13. Perspectivas</b>	<b>47</b>
<b>14. Referencias</b>	<b>48</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de algunas interacciones funcionales de los astrocitos bajo condiciones fisiológicas.	4
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo del sistema histaminérgico en el cerebro humano.	6
<b>Figura 3.</b> 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.	9
<b>Figura 4.</b> Ciclo glutamato-glutamina .	10
<b>Figura 5.</b> Transmisión sináptica y función mitocondrial en condiciones fisiológicas y de neurodegeneración.	11
<b>Figura 6.</b> Neurotoxicidad por L-glutamato en cultivos neuronales pobres y ricos en astrocitos.	13
<b>Figura 7.</b> Efectos intracelulares de la activación de los H <sub>3</sub> Rs.	17
<b>Figura 8.</b> Autoinhibición de la síntesis y liberación de histamina por la activación de H <sub>3</sub> Rs presinápticos.	18
<b>Figura 9.</b> El raloxifeno aumenta la expresión del EAAT2/GTL-1 y aumenta la fosforilación de ERK, Akt-PKB, EGFR y CREB.	23
<b>Figura 10.</b> Expresión de las isoformas del rH <sub>3</sub> R en tejido nativo y en cultivo primario de astrocitos.	24
<b>Figura 11.</b> Mecanismos propuestos para el efecto estimulante de la activación de los H <sub>1</sub> Rs y H <sub>3</sub> Rs en la expresión de la proteína del transportador de glucosa GLUT-1.	25
<b>Figura 12.</b> Inmunoreactividad a GFAP en astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario.	31
<b>Figura 13.</b> Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos corticales en cultivo primario.	36

<b>Figura 14.</b> Efecto de inhibidores de los EAATs en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.	38
<b>Figura 15.</b> Curvas concentración-respuesta de la inhibición de la captura de glutamato por TFB-TBOA y DHKA en astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario.	39
<b>Figura 16.</b> La activación aguda de los receptores D <sub>1</sub> , D <sub>2</sub> y H <sub>3</sub> no modifica la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.	40
<b>Figura 17.</b> La activación subaguda del H <sub>3</sub> R modifica captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.	41
<b>Figura 18.</b> El antagonista selectivo de los H <sub>3</sub> Rs yodofenpropit previene el aumento en la captura de glutamato por astrocitos provocado por immepip.	42

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Características moleculares y funcionales de los receptores a histamina expresados en el SNC.	7
<b>Tabla 2.</b> Expresión neuronal y astrocítica de los EAATs.	20

## Abreviaturas

$\alpha$ -KG	$\alpha$ -cetoglutarato
A <sub>2A</sub> R	Receptor a adenosina A <sub>2A</sub>
AC	Adenilato ciclasa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Akt/PKB	Cinasa B de proteínas
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc	3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina
AMPK	Cinasa de proteína activada por AMP
APB	Bromhidrato de cloro-APB (SKF 82958)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
CaMKII	Cinasa de proteína dependiente de Ca <sup>2+</sup> /calmodulina
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc
D <sub>1</sub> R	Receptor a dopamina D <sub>1</sub>
D <sub>2</sub> R	Receptor a dopamina D <sub>2</sub>
DAG	1,2-diacilglicerol
dbAMPc	Dibutilil 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
DHKA	Ácido dihidrokaínico
DMEM/F12	Medio de Eagle modificado por Dulbecco/medio F12
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
GDNF	Factor neurotrófico derivado de células gliales
GIRKs	Canales de K <sup>+</sup> rectificadores entrantes activados por proteínas G
GLUT-1	Transportador de glucosa 1
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GS	Sintasa de glutamina
GSK-3 $\beta$	3 $\beta$ -cinasa de la sintasa de glucógeno
H <sub>1</sub> R	Receptor a histamina H <sub>1</sub>

H <sub>2</sub> R	Receptor a histamina H <sub>2</sub>
H <sub>3</sub> R	Receptor a histamina H <sub>3</sub>
H <sub>4</sub> R	Receptor a histamina H <sub>4</sub>
HBSS	Solución salina de Hanks
HDC	Descarboxilasa de histidina
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IP3	1,4,5-trifosfato de inositol
JAK	Cinasa activada por Janus
KRH	Solución Krebs-Ringer-Hepes
MAPK	Cinasa de proteínas activada por mitógenos
mGluR	Receptores a glutamato metabotrópicos
NF-κB	Factor nuclear-kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
PACAP	Péptido pituitario activador de la adenilato ciclasa
PAG	Glutaminasa activada por fosfatos
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PDGF	Factor neurotrófico derivado de plaquetas
PI3K	3-cinasa de fosfatidil inositol
PIP2	4,5-bifosfato de fosfatidilinositol
PKA	Cinasa A de proteínas
PKC	Cinasa C de proteínas
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipasa C
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TGFα	Factor de crecimiento transformante α
TMN	Núcleo tuberomamilar del hipotálamo

## 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 de EAAT1 y EAAT2, responsables de ~90% de la captura del glutamato.

El receptor a histamina H<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>R) 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 H<sub>3</sub>R incluyen algunas de las que se han asociado con la modulación de la expresión de los EAATs, como las vías PLC/PKC, ERK y PI3K/Akt-PKB; sin embargo, la información sobre la función del H<sub>3</sub>R en astrocitos es todavía escasa. Por esta razón, este trabajo se centró en evaluar el efecto de la activación de los H<sub>3</sub>R astrocíticos en la captura de glutamato utilizando cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales.

Los resultados muestran que 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 (10 min) del H<sub>3</sub>R en astrocitos en cultivo primario no modifica la captura de glutamato; sin embargo, la activación subaguda por 1, 2 y 3 días aumenta significativamente la captura del neurotransmisor, posiblemente a partir de alguna de las vías de señalización involucradas en la expresión de los EAATs.

## **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, which are responsible for ~90% of glutamate uptake.

The histamine H<sub>3</sub> receptor (H<sub>3</sub>R) is expressed in both neurons and astrocytes, with a prominent localization in regions such as the hypothalamus, cerebral cortex, and striatum. Signalling pathways activated by H<sub>3</sub>R include some that have also been associated with the modulation of EAAT expression, such as PLC/PKC, ERK, and PI3K/Akt-PKB; however, little is known about the function of the H<sub>3</sub>R in astrocytes. Therefore, this study focused on the effect of H<sub>3</sub>R activation on glutamate uptake by cerebro-cortical astrocytes in primary culture.

The results show that in astrocytes, glutamate uptake occurs mainly by EAAT1, unlike the adult brain where EAAT2 is mostly involved. The acute (10 min) activation of H<sub>3</sub>R does not modify glutamate uptake. However, subacute activation for 1, 2, and 3 days significantly increases neurotransmitter uptake, possibly through one of the signalling pathways involved in the regulation of EAAT expression.

### 3. Introducción

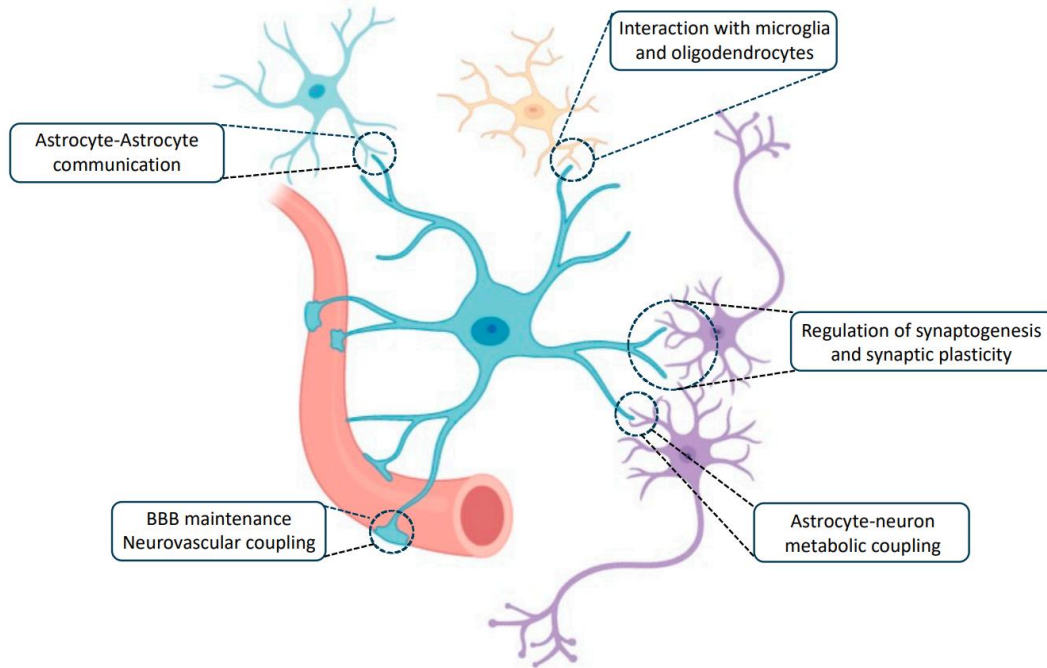
#### 3.1. Astrocitos

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 (Herculiano-Hozuel, 2014; Gorshkov *et al.*, 2018; Brazhe *et al.*, 2023) y poseen una citoarquitectura y distribución espacial que les permite percibir y responder a diversos estímulos del medio que los rodea (Fig. 1) (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 neuronal 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 en el 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 celular, 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 de L-glutamina debido al ciclo glutamato/glutamina; una vez sintetizado, se almacena en vesículas sinápticas hasta su liberación al espacio sináptico (Albarracín *et al.*, 2016).

Este neurotransmisor ejerce sus acciones mediante la activación de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato) que producen una rápida despolarización de la membrana celular, y de receptores metabotrópicos (mGluRs, por *metabotropic Glutamate Receptors*) que pueden promover respuestas excitadoras o inhibitorias 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). El grupo I (mGluR1 y mGluR5) promueve respuestas excitatorias, mientras que los grupos II (mGluR2 y mGluR3) y III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) son inhibitorios (Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021; Kochoian *et al.*, 2023).

La concentración basal de glutamato en el espacio sináptico varía entre 25 y 89 nM y puede alcanzar concentraciones en el rango milimolar cuando se libera de las vesículas sinápticas a la zona activa (Maragakis y Rothstein, 2004); por tal motivo, una vez que se activan los receptores a glutamato, los niveles extracelulares de este neurotransmisor deben ser restablecidas a la concentración basal, ya que la sobre-activación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos produce muerte neuronal, proceso denominado excitotoxicidad (Martínez-Lozada y Ortega, 2023).

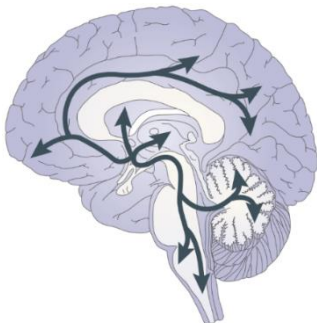
La mayor parte de los trastornos neurodegenerativos están asociados con alteraciones en la concentración de ciertos neurotransmisores, entre ellos el glutamato (Pannasch *et al.*, 2014; Remahi *et al.*, 2024). Por esta razón, es necesaria una comunicación bidireccional glial/neuronal finamente coordinada 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 en el 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).

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).



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

Los efectos de la histamina se deben a la activación de sus 4 receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por *G Protein-Coupled Receptor*): H<sub>1</sub>R, H<sub>2</sub>R, H<sub>3</sub>R y H<sub>4</sub>R, 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 H<sub>1</sub>R, H<sub>2</sub>R y H<sub>3</sub>R (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 <sub>1</sub> R	H <sub>2</sub> R	H <sub>3</sub> R
<b>Ubicación cromosomal (humano)</b>	3p25 (ID: 3269)	5q35.2 (ID: 3274)	20q13.33 (ID: 11255)
<b>Aminoácidos</b>	487 (56 kDa)	359 (40 kDa)	445 (49.4 kDa)
<b>Proteína G</b>	G $\alpha_{q/11}$	G $\alpha_s$	G $\alpha_{i/o}$
<b>Respuesta celular</b>	↑ PLC: ↑ IP <sub>3</sub> , ↑ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑ DAG (↑ PKC)	↑ AC, ↑ AMPc, ↑ PKA	↓ AC, ↓ AMPc, ↑ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑ MAPKs, ↑ Akt/GSK3 $\beta$
<b>Agonistas selectivos</b>	2-tiazoliletilamina Histaprodifeno	Dimaprit Amtamina	R- $\alpha$ -metilhistamina Immepip Immetridina
<b>Antagonistas</b>	Pirilamina (mepiramina)	Ranitidina Zolantidina	Tioperamida Clobenpropit Ciproxifan
<b>Afinidad por la histamina</b>	Micromolar ( $\mu$ M)	Micromolar ( $\mu$ M)	Nanomolar (nM)
<b>Radioligandos</b>	[ <sup>3</sup> H]-pirilamina [ <sup>3</sup> H]-mepiramina	[ <sup>3</sup> H]-tiotidina [ <sup>125</sup> I]-yodo- aminopotentidina	[ <sup>3</sup> H]-N- $\alpha$ -metil- histamina [ <sup>3</sup> H]-R- $\alpha$ -metil- histamina

Tabla tomada de Tesis de maestría de Almazán-Gregorio, 2022.

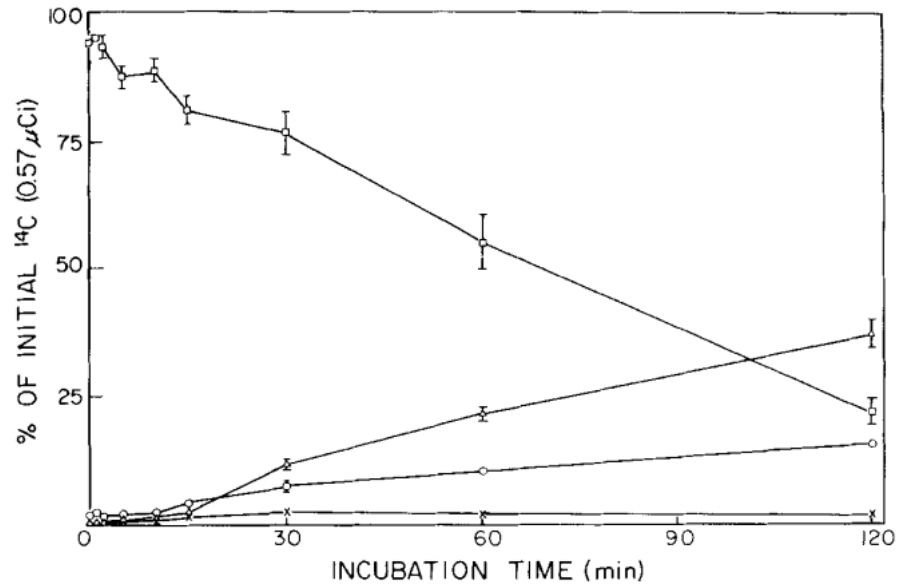
## 4. Antecedentes generales

### 4.1. Regulación del metabolismo del glutamato por astrocitos

Se ha descrito que los astrocitos pueden secretar quimiocinas, 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.*, 2014; Barros *et al.*, 2024).

Un desequilibrio en el metabolismo astrocítico se ha asociado con la fisiopatología de trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otros (Ahmad *et al.*, 2024; 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  $\gamma$ -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).

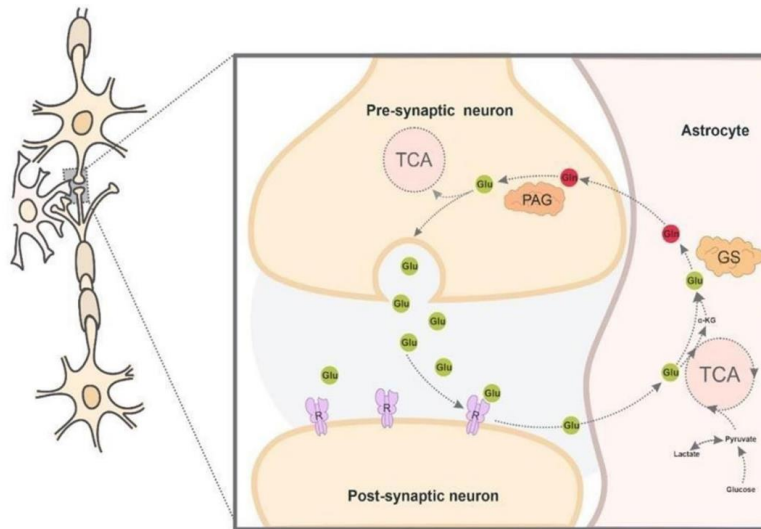
El glutamato es un excelente sustrato oxidativo para los astrocitos (McKenna, 2012; Dienel, 2013; Andersen y Schousboe, 2023). En la década de 1980, se aceptó que el glutamato funge como neurotransmisor por su efecto excitador en neuronas (Hayashi, 1954; Curtis *et al.*, 1959; Schousboe, 1981), y utilizando [<sup>14</sup>C]-glutamato se demostró que una gran parte del glutamato exógeno es transformado a glutamina y aspartato por astrocitos en cultivo primario (Fig. 3) (Yu *et al.*, 1982; Waniewsky y Martin, 1986), aunque una parte de este neurotransmisor también se pierde como [<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>] a partir de su oxidación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Yu *et al.*, 1982; McKenna *et al.*, 1996; Sonnewald *et al.*, 1996).



**Figura 3. 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.** Los astrocitos se incubaron con L-[U-<sup>14</sup>C]-glutamato (9 μM) 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 corresponden al promedio ± SEM de tres experimentos (Imagen tomada de Waniewski y Martin, 1986).

El exceso de glutamato liberado en una sinapsis es captado principalmente por astrocitos (Hertz *et al.*, 1999; Bak *et al.*, 2006; Guillem del Ángel, 2015; Andersen y Schousboe, 2023). Posteriormente, dentro del astrocito la sintasa de glutamina (GS) convierte el glutamato en glutamina, que se transporta al espacio extracelular y es captada por neuronas glutamatérgicas donde se vuelve a transformar en glutamato por la glutaminasa activada por fosfatos (Vázquez-Durán *et al.*, 2024). El transporte transcelular de glutamato neuronal, así como de glutamina astrocítica, constituye la base del reciclaje del glutamato, conocido colectivamente como ciclo glutamato/glutamina (Fig. 4), descrito desde la década de 1960, esencial para mantener los niveles adecuados de glutamato en el cerebro (Hong *et al.*, 1959;

Salganicoff y Derobertis, 1965; Dixon y Severin, 1968; Regunathan y Sundaresan, 1985).

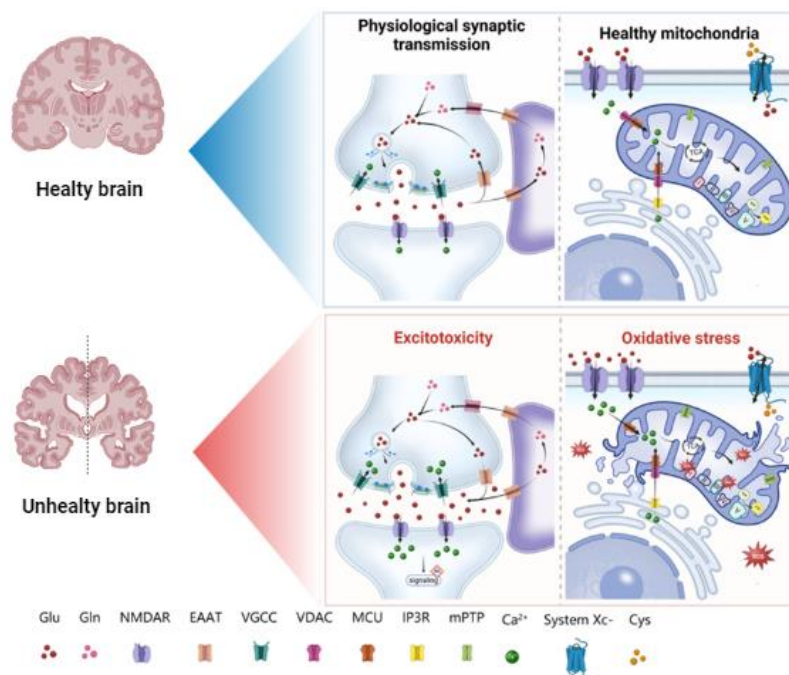


**Figura 4. Ciclo glutamato-glutamina.** Los astrocitos obtienen el glutamato a través de su captura desde el espacio sináptico o mediante el ciclo de Krebs, donde el intermediario metabólico  $\alpha$ -cetoglutarato (KG) se transforma en glutamato mediante transaminación, y el glutamato, por la acción 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 mediante la enzima glutaminasa activada por fosfatos (PAG), para ser almacenado en vesículas sinápticas cuyo contenido se libera por exocitosis para activar sus receptores. El exceso de glutamato liberado durante la sinapsis se internaliza en los astrocitos mediante transportadores (Imagen tomada de Vázquez-Durán *et al.*, 2024).

Además de su función en el reciclaje de glutamato, los astrocitos también pueden sintetizar glutamato *de novo* a partir de glucosa o lactato en el TCA. El  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG, por  *$\alpha$ -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 importante para las neuronas (Guillem del Ángel, 2015; Vázquez-Durán *et al.*, 2024).

#### 4.2. Transportadores de aminoácidos excitadores de alta afinidad (EAATs)

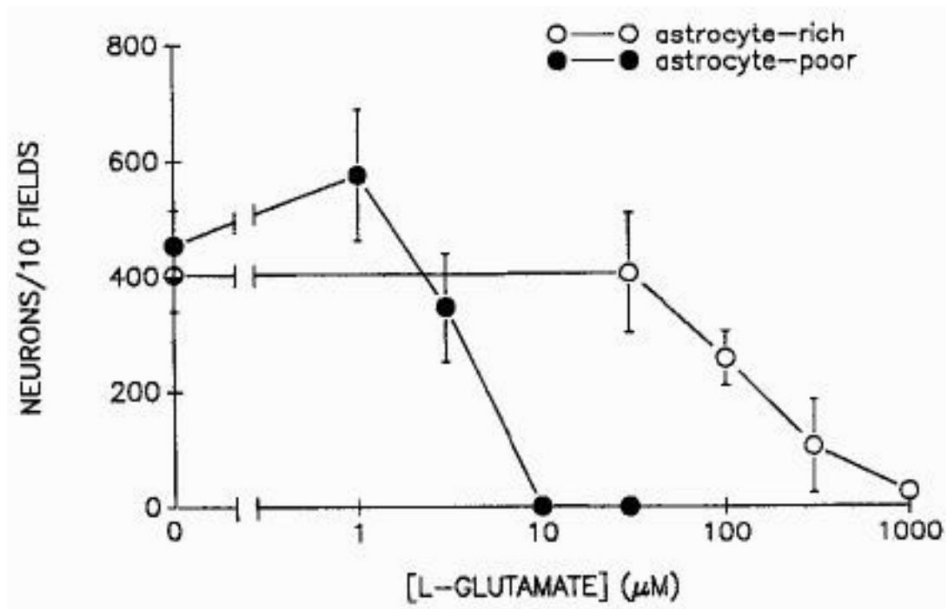
El glutamato es el principal mediador de señales excitatorias, así como de la plasticidad del SNC, incluida la eliminación celular (Zhou y Danbolt, 2014). Desde hace más de 30 años, se ha demostrado que la activación excesiva y prolongada de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato puede ocasionar muerte neuronal por excitotoxicidad (Fig. 5) (Swanson *et al.*, 1997; Olney *et al.*, 1974; McDonald y Johnston, 1990; 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).



**Figura 5. Transmisión sináptica y función mitocondrial en condiciones fisiológicas y de neurodegeneración.** En condiciones fisiológicas el glutamato excedente es capturado 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 como los NMDA, que a su vez resulta en un rápido y sostenido incremento de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>; esta desregulación contribuye a un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de la mitocondria (Imagen modificada de Yang *et al.*, 2024).

Por lo anterior, 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). Durante las décadas de 1930 y 1940 se describió que el glutamato participa de manera muy importante en el metabolismo neuronal y que las células del cerebro poseen la capacidad de capturar grandes cantidades de glutamato del espacio extracelular (Krebs, 1935; Stern *et al.*, 1949). Debido a que a la fecha no se ha descrito una enzima que sea capaz de degradar el exceso de glutamato en el espacio sináptico y que la captura de glutamato (principalmente por astrocitos) es el único mecanismo capaz de restablecer los niveles basales de este neurotransmisor y proveer de protección a cultivos primarios de neuronas a los niveles altos de glutamato (Fig. 6), se deduce que la actividad excitatoria en el cerebro depende de la actividad de los transportadores glutamato dependientes de Na<sup>+</sup> (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).

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).



**Figura 6. 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 aproximadamente 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).

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 marcadas 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 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 (sin reportarse en otras regiones del SNC) (Arriza *et al.*, 1997); ambos EAATs se caracterizan por un transporte más lento y altas conductancias a 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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  así como 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  $\text{Na}^+$  y 1  $\text{H}^+$ , mientras liberan 1  $\text{K}^+$  y 1  $\text{OH}^-$  o  $\text{HCO}_3^-$ . 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  $\text{Na}^+$ " (Yang et al., 2024).

### 4.3. Receptores a histamina en el SNC

La histamina es un neurotransmisor que regula una importante cantidad de funciones cerebrales a partir de la activación alguno de los tres receptores (H<sub>1</sub>R, H<sub>2</sub>R, H<sub>3</sub>R) acoplados a proteínas G expresados en el SNC (Panula *et al.*, 2015; Quian *et al.*, 2022). Los H<sub>1</sub>Rs y H<sub>2</sub>Rs se expresan tanto en neuronas como en células de la glía, mientras que el H<sub>3</sub>R se encuentra principalmente en neuronas y en menor proporción en células gliales (Takumida *et al.*, 2016).

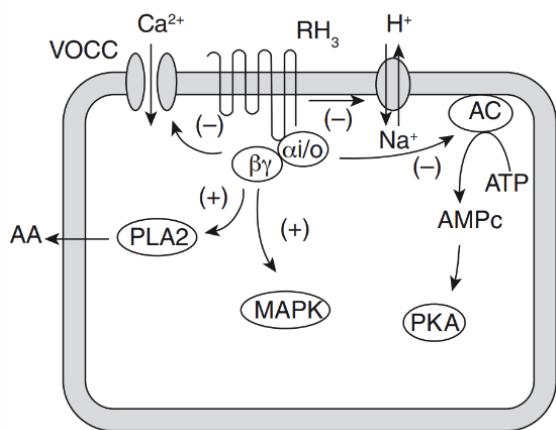
**H<sub>1</sub>R.** Este receptor se expresa en SNC, pulmones y vasos sanguíneos (Schneider *et al.*, 2014) y posee una estructura que incluye una tercera asa intracelular grande (208 aminoácidos), un extremo carboxilo (C-terminal) intracelular corto (17 aminoácidos), que se asocia con proteínas G $\alpha_{q/11}$ , lo que lleva a la activación de la fosfolipasa C (PLC, por *phospholipase C*) promoviendo la hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>, por *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*) a 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>, 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 IP<sub>3</sub> induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> 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 H<sub>1</sub>R 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).

**H<sub>2</sub>R.** 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 $\alpha_s$ . En el cerebro humano, el H<sub>2</sub>R 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 H<sub>2</sub>R estimula a las adenilil ciclasas (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 del AMPc (CREB, por *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*), un regulador clave en la fisiología y plasticidad neuronales.

**H<sub>3</sub>R.** 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 H<sub>3</sub>Rs se acoplan a proteínas G $\alpha_{i/o}$  y su activación (Fig. 7): 1) disminuye la formación de AMPc, que a su vez conlleva a la reducción en la actividad de la PKA; 2) inhibe el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> neuronal; 3) activa a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, por *Phospholipase A<sub>2</sub>*) para la formación y liberación de ácido araquidónico, lisofosfolípidos y ácido decosahexaenoico; 4) activa cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs, por *Mitogen-activated protein kinases*); 5) activa la vía de la 3-cinasa de fosfatidil inositol/ cinasa de proteínas B (PI3K/Akt-PKB); 6) mediante los dímeros G $\beta\gamma$  inhibe la actividad de los canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje y activa a los canales de K<sup>+</sup> 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).

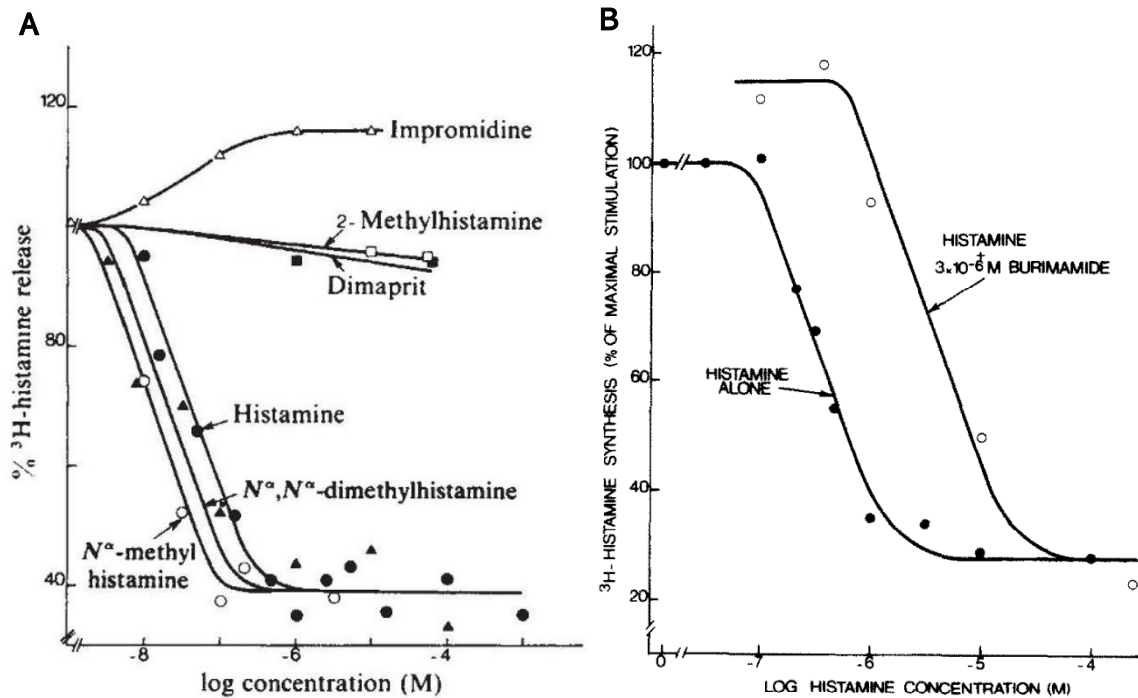


**Figura 7. Efectos intracelulares de la activación de los H<sub>3</sub>Rs.** Se ilustran la disminución de la formación de AMPc, inhibición del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> neuronal, disminución de la corriente debida a los canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje, activación de la vía de las MAPKs y activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Imagen tomada de Aquino-Miranda *et al.*, 2012).

#### 4.3.1. Receptor a histamina H<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>R)

El H<sub>3</sub>R 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 como un autorreceptor con capacidad de disminuir la liberación y la síntesis de histamina en rebanadas de la corteza cerebral (Fig. 8) (Arrang *et al.*, 1983; Arrang *et al.*, 1987). Posteriormente se reportó su presencia como heteroreceptor en terminales sinápticas de otras neuronas inhibiendo la liberación de otros neurotransmisores como glutamato, GABA, dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina y sustancia P, entre otros (Panula y Nuutinen, 2013).

En 1999 se clonó el ADN complementario (ADNc) del H<sub>3</sub>R 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).



**Figura 8. Autoinhibición de la síntesis y liberación de histamina por la activación de H<sub>3</sub>Rs presinápticos. A)** Efectos de agonistas de receptores a histamina en la liberación de [<sup>3</sup>H]-histamina inducida por K<sup>+</sup> en rebanadas de la corteza cerebral de rata. El efecto inhibitorio en la liberación de [<sup>3</sup>H]-histamina debido a la propia histamina dependió de la concentración, con una EC<sub>50</sub> de  $4.1 \pm 0.8 \times 10^{-8}$  M, y fue mimetizado por sus derivados N-metilhistamina y N,N-dimetilhistamina, con el mismo efecto máximo pero potencias tres y dos veces mayores, respectivamente. La 2-metilhistamina (derivado de histamina, agonista del H<sub>1</sub>R) y el dimaprit (agonista del H<sub>2</sub>R) no modificaron significativamente la liberación de [<sup>3</sup>H]-histamina, mientras que la impromidina (agonista parcial del H<sub>2</sub>R) aumentó en 20% la liberación. **B)** Efecto de la burimamida (antagonista del H<sub>3</sub>R) en la inhibición por histamina exógena de la síntesis de [<sup>3</sup>H]-histamina en rebanadas de la corteza cerebral de la rata. La síntesis de [<sup>3</sup>H]-histamina se redujo en presencia de histamina de manera concentración-dependiente con un valor de IC<sub>50</sub> de  $0.34 \pm 0.03$  μM, 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).

La presencia del H<sub>3</sub>R 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 H<sub>3</sub>R se expresa con mayor densidad en el neocórtex, el núcleo accumbens y la corteza cerebral (Pillot *et al.*, 2002), mientras que la 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 H<sub>3</sub>R 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 del EAAT1 y EAAT2 en los astrocitos

La mayor parte de la captura de glutamato en el SNC es debida a los astrocitos (Rodríguez-Campuzano y Ortega, 2021). 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). El EAAT2/GLT-1 se encuentra altamente expresado en células de la glía en todo el cerebro y la médula espinal, con niveles más altos en el hipocampo y la neocorteza, y en una menor proporción en células neuronales, principalmente en las terminales sinápticas (Danbolt *et al.*, 1992; Lehre *et al.*, 1995; Danbolt *et al.*, 2016). El EAAT1/GLAST es el único transportador que parece expresarse selectivamente en células de la glía en el SNC (Swanson *et al.*, 1997; Jungblut *et al.*, 2012; Danbolt *et al.*, 2016). Por su parte, el EAAT3/EAAC1 es un transportador exclusivamente neuronal que se expresa en la mayoría de las neuronas del SNC, en los cuerpos celulares y dendritas, sin expresarse en las terminales axonales (Holmseth *et al.*, 2012; Danbolt *et al.*, 2016).

**Tabla 2. Expresión neuronal y astrocítica de los EAATs.**

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

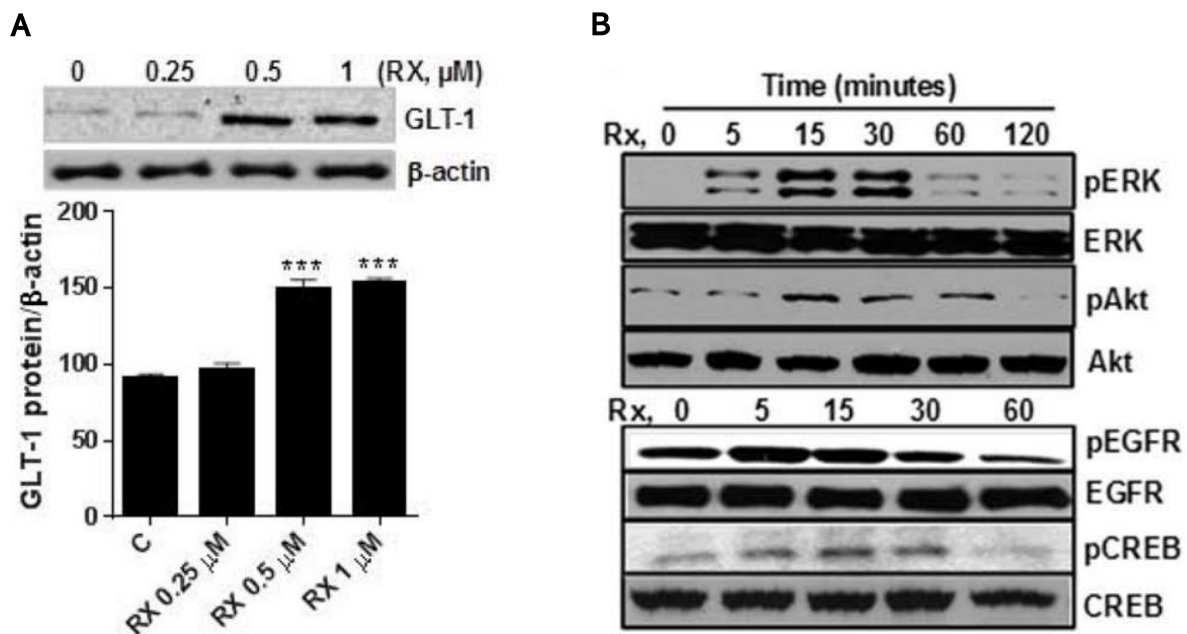
Se han identificado diversos mecanismos a través de los cuales se puede modificar la actividad de los EAATs para capturar glutamato, como cambios en la expresión génica por la activación de distintas vías de señalización, direccionamiento y tráfico de las proteínas transportadoras y modificaciones post-traduccionales 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 (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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 cocultivan 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 dibutilil 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (dbAMPC, por *Dibutyl 3',5'-cyclic Adenosine Monophosphate*), el factor de crecimiento transformante (TGF $\alpha$ , por *Transforming Growth Factor  $\alpha$* ), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por *Epidermal Growth Factor*), estrógenos, el péptido pituitario activador de la adenilato ciclasa (PACAP, por *Pituitary 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- $\alpha$ , 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- $\kappa$ 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; Zhou *et al.*, 2023), Akt-PKB/ERK (Fig. 9) (Karki *et al.*, 2014), PKC (Vizuite *et al.*, 2023), y ERK/NF- $\kappa$ B (Karki *et al.*, 2014).

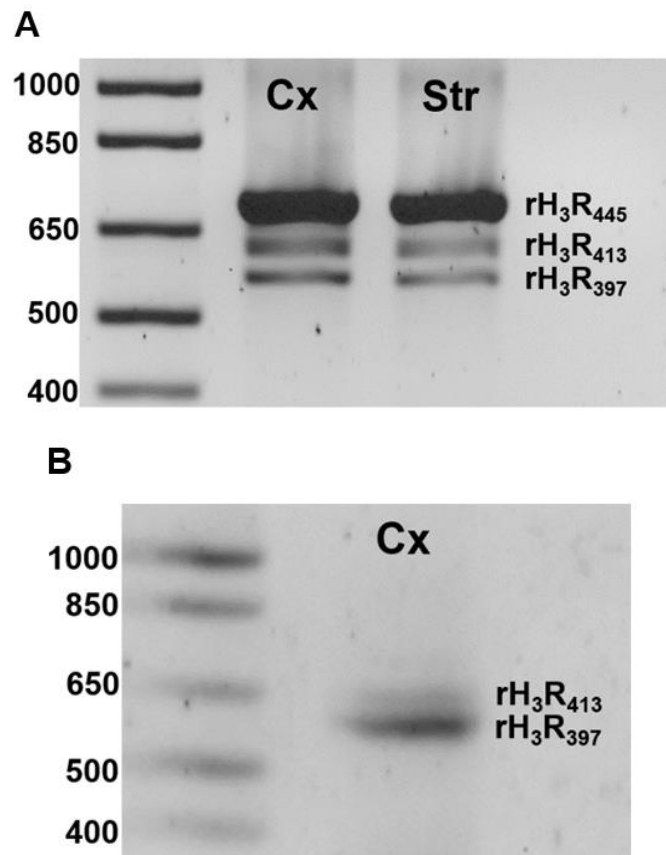


**Figura 9. El raloxifeno aumenta la expresión del EAAT2/GLT-1 y aumenta la fosforilación de ERK, Akt-PKB, EGFR y CREB. A)** Los astrocitos se expusieron a distintas concentraciones de raloxifeno (0, 0.25, 0.5 y 1  $\mu$ M), un modulador selectivo de los receptores a estrógenos. Las concentraciones de 0.5 y 1  $\mu$ M aumentaron significativamente la expresión del EAAT1/GLT-1. **B)** Los astrocitos fueron incubados con raloxifeno (1  $\mu$ M) por 5-120 min, observándose aumento en la fosforilación de ERK, Akt-PKB, EGFR y CREB (Imágenes modificadas de Karki *et al.*, 2014).

## 5.2. H<sub>3</sub>R en astrocitos

Tradicionalmente se consideró al H<sub>3</sub>R con actividad exclusivamente presináptica regulando la liberación de la misma histamina, así como de otros neurotransmisores; no obstante, recientemente se ha reportado que el H<sub>3</sub>R está altamente expresado en la corteza cerebral y el neocórtex de los roedores (Fig. 10A), 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).

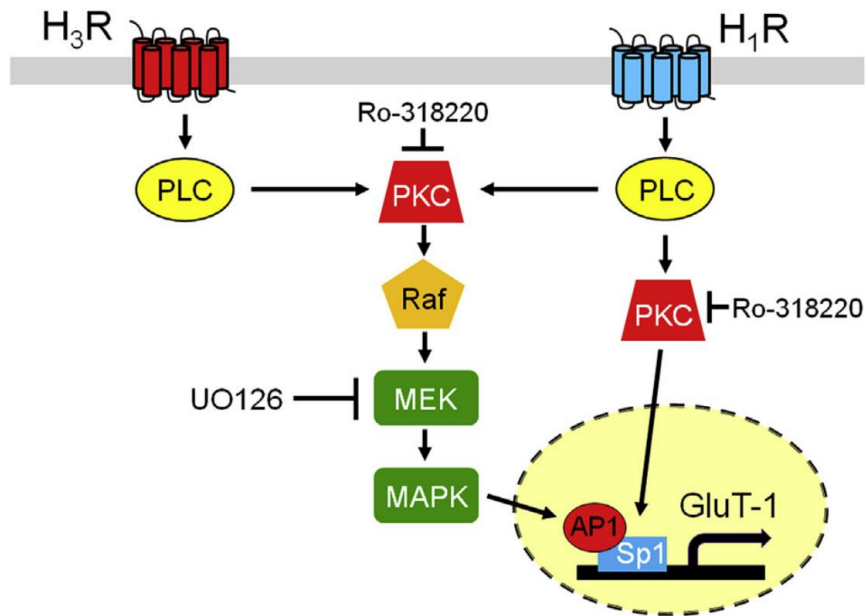


**Figura 10. Expresión de las isoformas del rH<sub>3</sub>R en tejido nativo y en cultivo primario de astrocitos de la rata. A)** Expresión del ARNm de las isoformas rH<sub>3</sub>R<sub>445</sub>, rH<sub>3</sub>R<sub>413</sub> y rH<sub>3</sub>R<sub>397</sub> en tejido de la corteza cerebral y el neocórtex. **B)** Expresión del ARNm de las isoformas rH<sub>3</sub>R<sub>397</sub> y rH<sub>3</sub>R<sub>413</sub> 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 H<sub>3</sub>R con 397 y 413 aminoácidos (rH<sub>3</sub>R<sub>397</sub> y rH<sub>3</sub>R<sub>413</sub>) en astrocitos en cultivo primario de la corteza cerebral de rata (Fig. 10B). Dichas isoformas, además del receptor rH<sub>3</sub>R<sub>445</sub>, son funcionales en el cerebro de la rata (Rahman *et al.*, 2023).

A pesar de que se conoce que el H<sub>3</sub>R se expresa en astrocitos, poco se sabe sobre su función en estas células. En 2011 se reportó la relación de la expresión del

H<sub>3</sub>R 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 H<sub>3</sub>R astrocítico está implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria (Iida *et al.*, 2015); y en 2019, se mostró que la activación aguda (1 h) del H<sub>3</sub>R y del H<sub>1</sub>R aumenta la expresión del GLUT-1 en astrocitos en cultivo primario, obtenidos de corteza cerebral de rata, posiblemente mediante la activación de la vía PLC/DAG/PKC (Fig. 11) (Parra-Abarca *et al.*, 2019).



**Figura 11. Mecanismos propuestos para el efecto estimulante de la activación de los H<sub>1</sub>Rs y H<sub>3</sub>Rs en la expresión de la proteína del transportador de glucosa GLUT-1.** La histamina, actuando tanto en los receptores H<sub>1</sub> como en los H<sub>3</sub>, aumenta la expresión del GLUT-1 por los astrocitos cerebro-corticales de rata en cultivo primario. El efecto de la activación de H<sub>1</sub>R parece implicar las vías PLC → DAG/Ca<sup>2+</sup> → PKC y PLC → DAG/Ca<sup>2+</sup> → PKC → MAPK, mientras que la acción mediada por H<sub>3</sub>R parece depender solo de la vía PLC → DAG/Ca<sup>2+</sup> → PKC → MAPK (Imagen tomada de Parra-Abarca *et al.*, 2019).

De manera semejante al receptor neuronal el H<sub>3</sub>R 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 H<sub>3</sub>R 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 astrocitos en cultivo primario.

## 6. Planteamiento del problema

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 sobreestimulación 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 (Ahmad *et al.*, 2024; 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 otro lado, el H<sub>3</sub>R 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/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 H<sub>3</sub>R en la modulación de la captura de glutamato por parte de los astrocitos a través de la regulación de los EAATs, principalmente del EAAT2, lo que podría tener importantes implicaciones en la homeostasis del glutamato y la función neuronal en el SNC. Por ello, este trabajo pretende determinar si la activación del H<sub>3</sub>R modula la captura de glutamato por astrocitos cerebro-corticales de la rata en cultivo primario.

## **7. Hipótesis**

La activación del H<sub>3</sub>R por immepip aumenta la captura de glutamato por astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario.

## **8. Objetivos**

### **8.1. Objetivo general**

Determinar si la activación del H<sub>3</sub>R 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 (10 min) del H<sub>3</sub>R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.
4. Determinar el efecto de la activación subaguda (1-4 días) del H<sub>3</sub>R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.
5. Corroborar la participación del H<sub>3</sub>R en la captura de glutamato mediante el uso de antagonistas selectivos del receptor.

## **9. Materiales y métodos**

### **9.1. Animales**

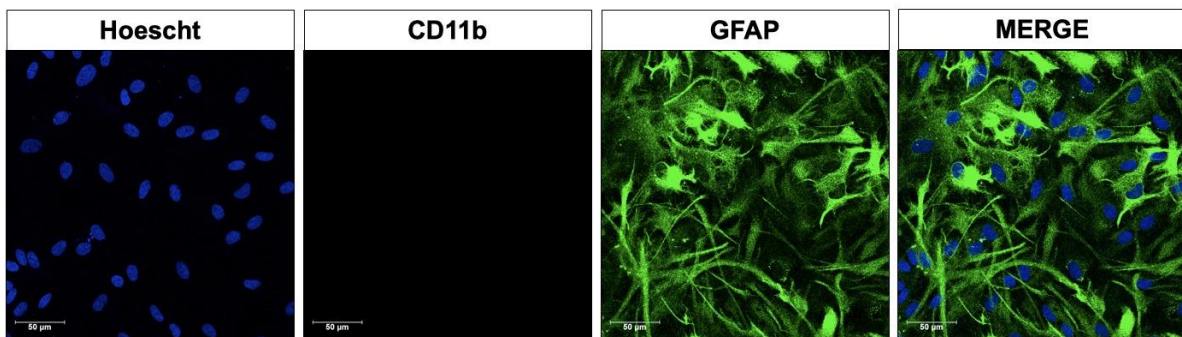
Para la obtención de cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales se utilizaron ratas Wistar de 2-7 días de vida postnatal (sexo indistinto), proporcionadas por el Bioterio del Cinvestav. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los lineamientos establecidos por los Institutos Nacionales 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 (Protocolo 94-14) y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la BUAP, así como el principio de las 3 Rs (Russell y Burch, 1959). 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 medio de Eagle modificado por Dulbecco/medio F12 (DMEM/F12) suplementado con suero fetal bovino (10%), solución de antibióticos (1% de penicilina/estreptomina) 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 CO<sub>2</sub> 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 90% de astrocitos en los cultivos (Fig. 12). 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 12. 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 tiñieron 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  $\mu$ l de solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH: composición, en mM: NaCl 130, HEPES 20, D-glucosa 11, KCl 3.7, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.18, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4 con NaOH) y se les añaden 200  $\mu$ l de la misma solución, mientras que las dos filas de pozos restantes se someten a un lavado con 400  $\mu$ l de una solución modificada de KRH, donde se substituye equimolarmente LiCl por NaCl, y se les añaden 200  $\mu$ l 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<sup>+</sup>. Se incuba por 15 min a 37 °C antes de adicionar 11  $\mu$ l de una solución que contiene [<sup>3</sup>H]-glutamato (250 nM) y glutamato (5  $\mu$ M) u 11  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O (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  $\mu$ l de solución KRH o KRH modificada frías (4 °C) para detener la reacción, se aspira y se añaden 300  $\mu$ l 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  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O 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 misma solución y se agregan 11 µl de los fármacos inhibidores a los pozos correspondientes: TFB-TBOA (inhibidor selectivo de los EAAT1 y EAAT2, IC<sub>50</sub> 17 y 22 nM, respectivamente) a una concentración de final de 10 µM, o ácido dihidrokaínico (DHKA, inhibidor selectivo del transporte de L-glutamato y L-aspartato por el EAAT2, K<sub>i</sub> 23 µM) a una concentración final de 100 µM. Se incuba por 15 min a 37 °C antes de adicionar 11 µl de solución de [<sup>3</sup>H]-glutamato/glutamato u 11 µl de H<sub>2</sub>O, con un intervalo de 10 s entre cada adición y se incuba 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 (10 min) del H<sub>3</sub>R en la captura de glutamato**

Para evaluar y comparar el efecto de la activación aguda del H<sub>3</sub>R en la captura de glutamato con el de TFB-TBOA y de agonistas de los receptores a dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (expresados en astrocitos), a los pozos se les retira el medio de cultivo, se realiza un lavado con 400 µl de solución KRH y se les añade 200 µl de la misma solución. Enseguida se agregan 11 µl de H<sub>2</sub>O al grupo control y 11 µl de TFB-TBOA (200 µM, para una concentración final de 10 µM) al grupo correspondiente y se incuba durante 10 minutos a 37 °C. Cumplido ese tiempo se adicionan 11 µl de los siguientes fármacos a los pozos correspondientes: 1) APB (SKF 82958), agonista selectivo de los D<sub>1</sub>Rs (1 µM como concentración final), 2)

quinpirol, agonista selectivo de los receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> (1 µM), y 3) immpip, agonista selectivo de los H<sub>3</sub>Rs (100 nM). Las células se incuban por 5 min a 37 °C y posteriormente se añaden 11 µl de solución [<sup>3</sup>H]-glutamato (250 nM) / glutamato (5 µM) u 11 µl de H<sub>2</sub>O, 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 H<sub>3</sub>R en la captura de glutamato**

El efecto de la activación prolongada del H<sub>3</sub>R 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 [<sup>3</sup>H]-glutamato (250 nM)/glutamato (5 µM) u 11 µl de H<sub>2</sub>O. 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 H<sub>3</sub>R en la modulación de la captura de glutamato, los astrocitos se incubaron con el antagonista selectivo del H<sub>3</sub>R 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 [<sup>3</sup>H]-glutamato (250 nM)/glutamato (5 µM) u 11 µl de H<sub>2</sub>O. 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.

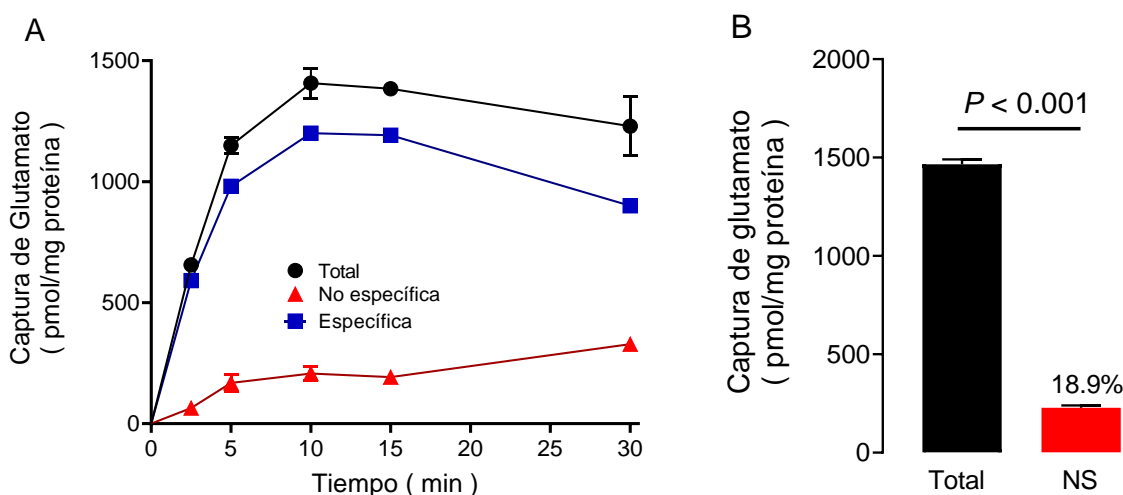
### **9.7. Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como medias  $\pm$  rango (duplicados) o error estándar (SEM). Los datos se analizaron con la prueba t de Student (comparación entre 2 grupos) o varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Tukey (comparaciones múltiples entre grupos) empleando el programa *Graph Pad Prism 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. 13A). En los experimentos posteriores, la captura del neurotransmisor fue evaluada a los 5 min, lo que permitiría determinar posibles efectos de inhibición o estimulación.

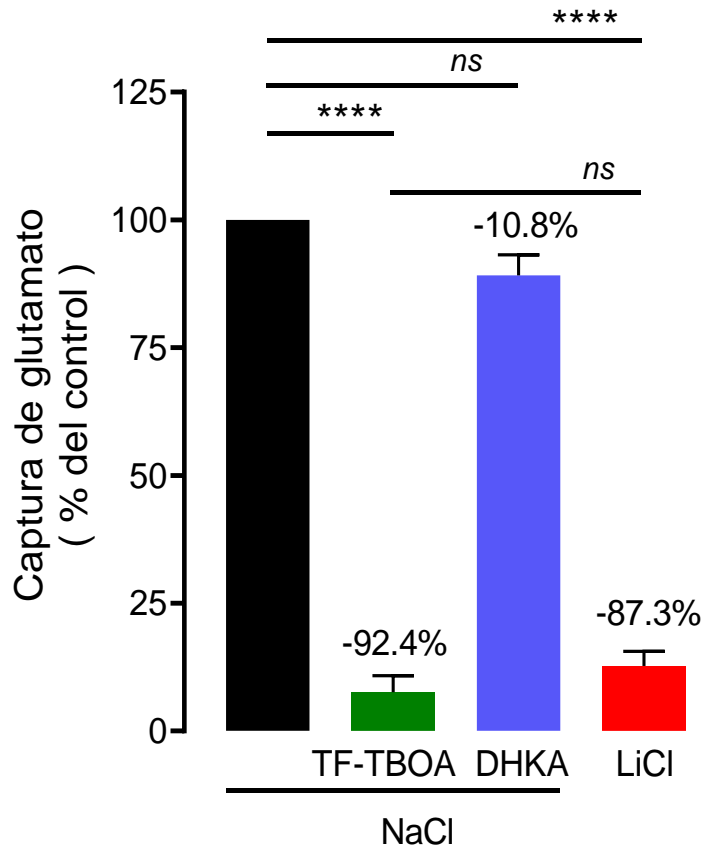


**Figura 13. Curso temporal de la captura de glutamato por astrocitos corticales en cultivo primario.** **A)** Cinética. Los astrocitos se incubaron con  $[^3\text{H}]$ -glutamato/glutamato (250 nM/5  $\mu\text{M}$ ) por los tiempos indicados. La captura no-específica se determinó en muestras en paralelo incubadas en solución KRH sin  $\text{Na}^+$  (sustitución de  $\text{NaCl}$  por  $\text{LiCl}$ ). 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; el ensayo fue repetido 4 veces con resultados similares. **B)** Comparación de la captura total y no específica a los 10 min. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM de los 4 experimentos realizados.  $P < 0.001$ . El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student pareada.

Los transportadores de glutamato dependen de  $\text{Na}^+$ , 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. 13A, color rojo). La Figura 13B 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**

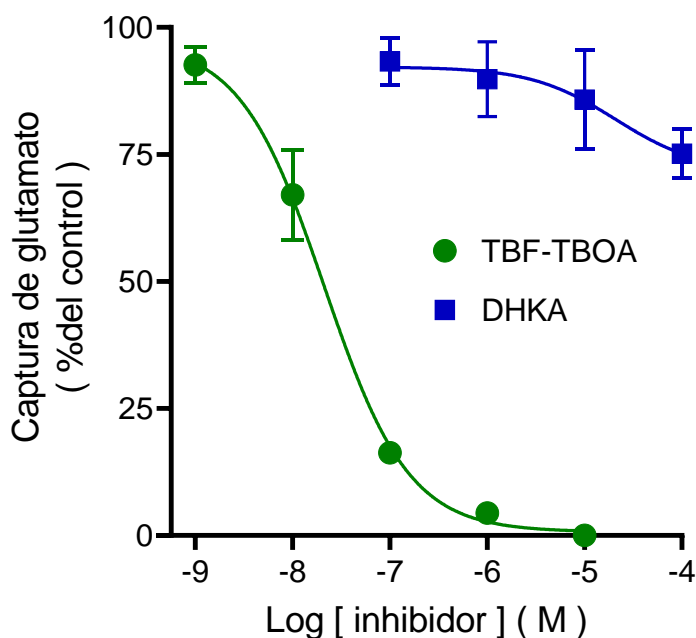
Posteriormente se realizaron ensayos de inhibición de la captura de glutamato en presencia de TFB-TBOA (10  $\mu\text{M}$ ) o ácido dihidrokaínico (DHKA; 100  $\mu\text{M}$ ) así como en solución KRH sin NaCl. La Fig. 14 muestra que la captura de glutamato se reduce significativamente (-92.4%) por el 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. 14 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 (-87.3%), indicando que el TFB-TBOA también define la captura no específica.



**Figura 14. Efecto de inhibidores de los EAATs en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.** Los astrocitos fueron incubados con glutamato (250 nM)/glutamato (5  $\mu$ M) durante 5 min en presencia y ausencia de TFB-TBOA (10  $\mu$ M) o DHKA (100  $\mu$ M), así como en solución sin NaCl (substitución por LiCl). Los fármacos se agregaron 15 min antes del [ $^3$ H]-glutamato/glutamato. Los valores se expresan como porcentaje de la captura total y corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos. \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns, no significativo; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

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.

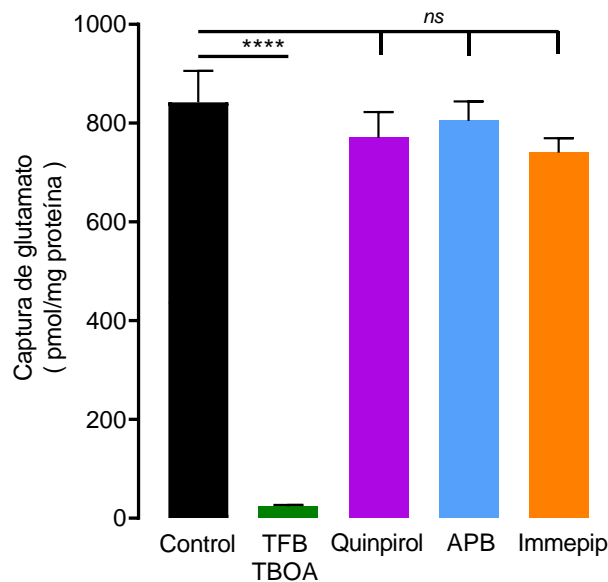
La Fig. 15 muestra las curvas concentración-respuesta para la inhibición de la captura de glutamato por TFB-TBOA y DHKA. El TFB-TBOA inhibió la captura de glutamato de manera dependiente de la concentración con un valor de  $IC_{50}$  de  $21.1 \pm 4.5$  nM y un efecto máximo de inhibición alcanzado a  $10 \mu\text{M}$ . En contraste, la inhibición por DHKA fue parcial, con un efecto máximo de  $-24.9 \pm 4.8$  % a una concentración de  $100 \mu\text{M}$ .



**Figura 15. 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 [<sup>3</sup>H]-glutamato/glutamato (250 nM/5  $\mu\text{M}$ ). Los valores se expresan como porcentaje de la captura específica control (en ausencia de inhibidores) 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 H<sub>3</sub>R no modifica la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario

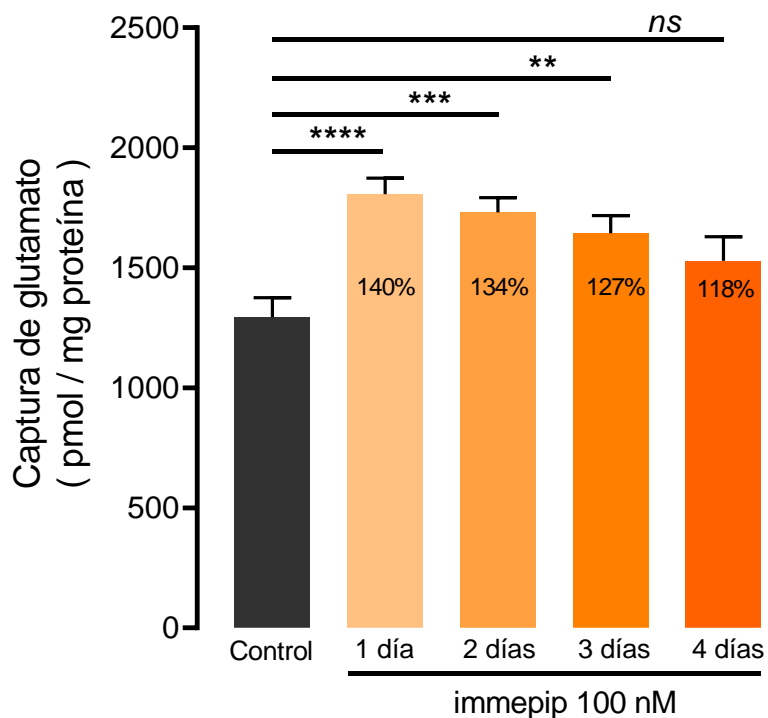
La Fig. 16 muestra que la incubación con el agonista del H<sub>3</sub>R immepip (100 nM) por 10 min no afectó la captura de [<sup>3</sup>H]-glutamato/glutamato. Los astrocitos en cultivo primario también expresan receptores a dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>; sin embargo, la incubación con agonistas selectivos (APB y quinpirol, respectivamente) tampoco modificó la captura de glutamato.



**Figura 16. La activación aguda de los receptores a histamina H<sub>3</sub> y a dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> y no modifica la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.** Los astrocitos fueron incubados con [<sup>3</sup>H]-glutamato (250 nM)/glutamato (5 μM) durante 5 min en ausencia y presencia de los agonistas quinpirol (D<sub>2</sub>Rs), APB (SKF 82958; D<sub>1</sub>Rs) e immepip (H<sub>3</sub>Rs), adicionados 5 min antes. Los valores son los promedios ± SEM de 3 experimentos. \*\*\*\**P* < 0.0001; *ns*, no significativo; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

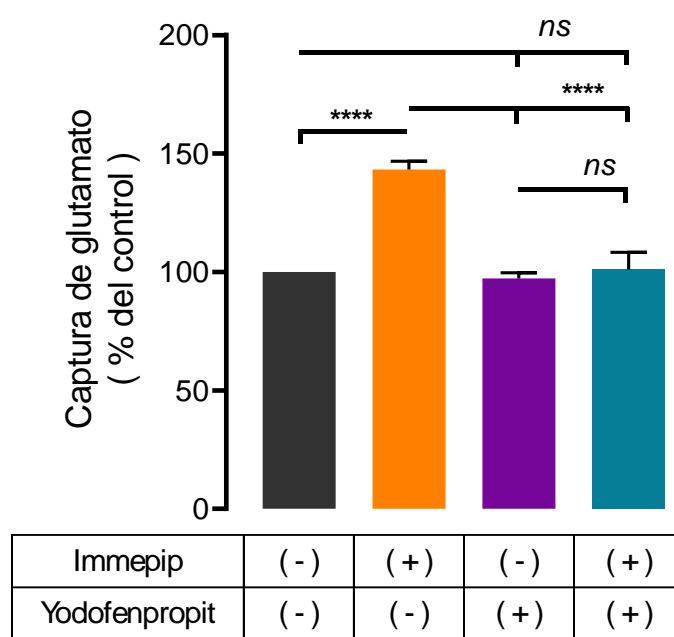
#### 10.4. La activación subaguda del H<sub>3</sub>R aumenta la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario

Para evaluar el efecto de la activación subaguda del H<sub>3</sub>R los astrocitos se incubaron por 1, 2, 3 o 4 días con imepip (100 nM). La Fig. 17 muestra un incremento estadísticamente significativo en la captura de glutamato después de 1, 2 y 3 días. 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 17. La activación subaguda del H<sub>3</sub>R modifica captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.** Los astrocitos fueron incubados con el agonista del H<sub>3</sub>R imepip (100 nM) por los días indicados. Los valores son el promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; ns, no significativo; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Para corroborar la participación del H<sub>3</sub>R en el aumento en la captura de glutamato, los astrocitos se incubaron por 24 h con immepip (100 nM) en presencia o ausencia del antagonista selectivo del H<sub>3</sub>R yodofenpropit (3 μM). La Fig. 18 muestra que la sola incubación con yodofenpropit no modifica la captura de glutamato con respecto al grupo control, y que la co-incubación en presencia de immepip y yodofenpropit previene de manera significativa el aumento en la captura de glutamato observado cuando solo se incubaba con immepip. Esto confirma el efecto del H<sub>3</sub>R astrocítico en la captura de glutamato al activarse de manera subaguda.



**Figura 18. El antagonista selectivo de los H<sub>3</sub>Rs yodofenpropit previene el aumento en la captura de glutamato por astrocitos inducido por el agonista immepip.** Los astrocitos fueron incubados por 24 h con immepip (100 nM) en presencia o ausencia del antagonista selectivo del H<sub>3</sub>R yodofenpropit (3 μM), adicionado 15 min antes. Los valores se expresan como porcentaje de la captura basal de glutamato y corresponden al promedio ± SEM de 4 experimentos. \*\*\*\**P* <0.0001; *ns*, no significativo; ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

## **11. Discusión**

### **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 [<sup>3</sup>H]-glutamato o [<sup>3</sup>H]-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 utilizaron 1-5 min para determinar la captura de [<sup>3</sup>H]-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; Verkhatsky y Nedergaard, 2018), debido a que por cada molécula de glutamato se co-transportan tres iones de Na<sup>+</sup>, uno de H<sup>+</sup> y se intercambia un ión K<sup>+</sup> (Alleva *et al.*, 2020; Flanagan *et al.*, 2021; Cortese *et al.*, 2023).

### **11.2. Inhibición de la captura por astrocitos por TFB-TBOA y DHKA**

La captura de glutamato por parte de 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 en cultivo primario mostraron que el TFB-TBOA reduce significativamente la captura, no así el DHKA. El valor de IC<sub>50</sub> obtenido para el TFB-

TBOA ( $21.1 \pm 4.5$  nM) corresponde a lo reportado previamente para la inhibición por TFB-TBOA del transporte por el EAAT1 ( $IC_{50}$  22 nM) y por el EAAT2 ( $IC_{50}$  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, mientras 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 casi por completo al EAAT1.

### **11.3. Activación aguda del H<sub>3</sub>R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario**

Los complejos G $\beta\gamma$  de las proteínas G pueden inhibir la captura de neurotransmisores como se ha reportado para el transporte de dopamina (García-Olivares *et al.*, 2013). El H<sub>3</sub>R se encuentra altamente expresado en regiones como la corteza cerebral y el neocórtex (Pillot *et al.*, 2002; Bolam y Ellender, 2016) y se ha descrito que su activación modula la transmisión glutamatérgica cortico-estriatal (Ellender *et al.*, 2011). Por estas razones, se consideró que la activación del H<sub>3</sub>R y la generación de complejos G $\beta\gamma$  podía modificar la captura de glutamato por astrocitos cerebro-corticales en cultivo primario. Sin embargo, los resultados mostraron que la activación aguda del H<sub>3</sub>R por immpip no tuvo efecto significativo en la captura de glutamato en ambos casos.

Algunos de los receptores más abundantes en los astrocitos son los D<sub>2</sub>Rs (Sočan *et al.*, 2024), los cuales al ser activados también liberan complejos Gβγ. La activación de los D<sub>2</sub>Rs 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 Gβγ que se producen cuando se aplica immpip o quinpirol para afectar al transportador. La activación aguda de los D<sub>1</sub>Rs, acoplados a proteínas Gα<sub>s</sub> y expresados en astrocitos corticales tampoco modificó la captura de glutamato.

#### **11.4. Activación subaguda del H<sub>3</sub>R en la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario**

La activación subaguda del H<sub>3</sub>R en astrocitos de cultivo primario aumentó significativamente la captura de glutamato después de 1, 2 y 3 días. Esto sugiere que el H<sub>3</sub>R podría modular la captura de glutamato en este marco temporal, posiblemente por efectos no inmediatos asociados a la activación sostenida de proteínas Gα<sub>i/o</sub>. Por ejemplo, en astrocitos la activación del H<sub>3</sub>R regula la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 mediante la activación de la vía PLC/PKC/MAPK (Parra-Abarca *et al.*, 2019); por ello, es posible que la actividad de los EAATs pueda aumentar con la activación de la misma vía, debido a que Vizuet *et al.* (2023) reportan que la metformina, que activa a la cinasa de proteína activada por AMP (AMPK, por *AMP-activated protein kinase*) que a su vez fosforila y activa a la PKC, aumenta la captura de glutamato. Otros trabajos también han reportado que la actividad de los EAATs puede ser modulada por fosforilación por las cinasas GSK3β, CaMKII y PKC (Lortet *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 2014; Chawla *et al.*, 2017). La activación del H<sub>3</sub>R con immpip por 4 días también aumentó la captura del neurotransmisor, pero el efecto no fue significativo; esto podría explicarse por la desensibilización del propio receptor, como ha sido reportado por Marchese *et al.* (2008) y Osorio-Espinoza *et al.* (2014).

Además, la co-incubación de astrocitos con immepip y yodofenpropit, un antagonista selectivo del H<sub>3</sub>R previno de manera significativa el aumento en la captura de glutamato inducido por la activación subaguda del H<sub>3</sub>R (Fig. 18). Este hallazgo apoya un efecto específico del receptor y sugiere que su activación modula la captura de glutamato por astrocitos. Las principales vías de señalización del H<sub>3</sub>R que podrían estar involucradas en la modulación de la expresión de los EAATs incluyen PLC/PKC, MAPKs y PI3K-Akt-PKB (Jurič *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021; Vizuite *et al.*, 2023). En experimentos posteriores se iniciará el estudio de la participación de estas vías de señalización utilizando inhibidores selectivos de cada una de ellas.

## 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 H<sub>3</sub>R no modifica la captura de glutamato por astrocitos en cultivo primario.
- La activación subaguda del H<sub>3</sub>R 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.

## 13. Perspectivas

Los resultados de este trabajo contribuyen a comprender el papel de los H<sub>3</sub>Rs astrocíticos en la modulación de la captura de glutamato por los astrocitos; sin embargo, aún se requiere de un estudio más profundo que permita explorar las siguientes perspectivas:

- Evaluar el efecto de la activación subaguda del H<sub>3</sub>R en la expresión proteica del EAAT1 y EAAT2 en cultivos primarios de astrocitos cerebro-corticales, utilizando *Western blot*.
- Explorar los mecanismos de señalización intracelular desencadenados por la activación subaguda del H<sub>3</sub>R y su influencia en la expresión y actividad de los EAATs. Para ello se utilizarán inhibidores de las vías de señalización PLC/PKC, MAPKs, y PI3K/Akt-PKB.
- Estudiar el efecto de la activación subaguda del H<sub>3</sub>R en la captura de glutamato en preparaciones de sinaptosomas (terminales nerviosas aisladas) que también presentan algunos EAATs, así como en astrocitos en cultivo primario de regiones cerebrales distintas a la corteza cerebral.

## 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. Alhusaini M, Eissa N, Saad AK, Beiram R, Sadek B. Revisiting Preclinical Observations of Several Histamine H<sub>3</sub> 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
3. 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
4. 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
5. Alleva C, Kovalev K, Astashkin R, Berndt MI, Baeken C, Balandin T, *et al.* Na<sup>+</sup>-dependent gate dynamics and electrostatic attraction ensure substrate coupling in glutamate transporters. *Science Advances*. 2020; 6(47): eaba9854. doi:10.1126/sciadv.aba9854
6. Almazán-Gregorio CA. *Evaluación de la expresión y función de receptores a histamina y a dopamina en astrocitos corticales de la rata en cultivo primario*. [Tesis de maestría]. Ciudad de México: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2022.
7. Andersen J v., 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 H<sub>3</sub> 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. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H<sub>3</sub>) of histamine receptor. *Nature*. 1983; 302(5911): 832–837. doi:10.1038/302832a0
10. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H<sub>3</sub>-receptors. *Neuroscience*. 1987; 23(1): 149-157. doi:10.1016/0306-4522(87)90279-x
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. Benarroch EE. Histamine in the CNS: multiple functions and potential neurologic implications. *Neurology*. 2010; 75(16): 1472–1479. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f884b1
16. 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

17. 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
18. 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
19. Bolam JP, Ellender TJ. Histamine and the striatum. *Neuropharmacology*. 2016; 106: 74–84. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.08.013
20. 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
21. 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
22. 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
23. Chen TS, Huang TH, Lai MC, Huang CW. The role of glutamate receptors in epilepsy. *Biomedicines*. 2023; 11(3), 783. doi:10.3390/biomedicines11030783
24. 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
25. 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

26. 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
27. Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. Chemical excitation of spinal neurons. *Nature*. 1959. 183(4661): 611–612. doi:10.1038/183611a0
28. Dąbrowska-Bouta B, Strużyńska L, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Sulkowski G. Memantine improves the disturbed glutamine and  $\gamma$ -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
29. 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
30. 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
31. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. 2001; 65(1): 1-105. doi:10.1016/s0301-0082(00)00067-8
32. 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
33. 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
34. 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

35. Dienel GA. Astrocytic energetics during excitatory neurotransmission: What are contributions of glutamate oxidation and glycolysis? *Neurochemistry International*. 2013; 63(4): 244–258. doi:10.1016/j.neuint.2013.06.015
36. Dixon HB, Severin ES. Dissociation of the prosthetic group of aspartate aminotransferase. *Biochemical Journal*. 1968; 110(2): 18–19. doi:10.1042/bj1100018p
37. Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H, *et al.* Identification of rat H<sub>3</sub> receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Molecular Pharmacology*. 2001; 59(1): 1–8. doi:10.1124/mol.59.1.1
38. 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
39. 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
40. 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
41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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
46. 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
47. 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
48. Hayashi T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *The Keio Journal of Medicine*. 1954; 3(4): 183-192.
49. 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
50. 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
51. 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

52. 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
53. Iida T, Yoshikawa T, Matsuzawa T, Naganuma F, Nakamura T, Miura Y, *et al*. Histamine H<sub>3</sub> receptor in primary mouse microglia inhibits chemotaxis, phagocytosis, and cytokine secretion. *Glia*. 2015; 63(7): 1213–1225. doi:10.1002/glia.22812
54. Jiménez E, Núñez E, Ibáñez I, Draffin JE, Zafra F, Giménez C. Differential regulation of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST by GSK3 $\beta$ . *Neurochemistry International*. 2014; 13: 33–43. doi:10.1016/j.neuint.2014.10.003
55. 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
56. 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
57. 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
58. 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
59. 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
60. 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- $\kappa$ B Pathways. *Molecular Neurobiology*. 2018; 55(6): 5031–5046. doi:10.1007/s12035-017-0709-x

61. Kochoian BA, Bure C, Papa SM. Targeting striatal glutamate and phosphodiesterases to control L-DOPA-induced dyskinesia. *Cells*. 2023; 12(23), 2754. doi:10.3390/cells12232754
62. 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
63. 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
64. 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
65. 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
66. 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
67. 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
68. 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
69. Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, *et al.* Cloning and functional expression of the human histamine H<sub>3</sub> receptor. *Molecular Pharmacology*. 1999; 55(6): 1101–1107. doi:10.1124/mol.55.6.1101
70. 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
71. 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
72. 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
73. 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
74. McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research. Brain Research Reviews*. 1990; 15(1): 41-70. doi:10.1016/0165-0173(90)90011-c
75. 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
76. McKenna MC. Substrate competition studies demonstrate oxidative metabolism of glucose, glutamate, glutamine, lactate and 3-hydroxybutyrate in cortical

- astrocytes from rat brain. *Neurochemical Research*. 2012; 37(11): 2613–2626. doi:10.1007/s11064-012-0901-3
77. 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
78. Meyer LC, Paisley CE, Mohamed E, Bigbee JW, Kordula T, Richard H, *et al.* Novel role of the nociceptin system as a regulator of glutamate transporter expression in developing astrocytes. *Glia*. 2017; 65(12): 2003–2023. doi:10.1002/glia.23210
79. 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
80. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*. 2015; 63(8): 1320–1329. doi:10.1002/glia.22836
81. Nieto-Alamilla G, Márquez-Gómez R, García-Gálvez AM, Morales-Figueroa GE, Arias-Montaño JA. The histamine H<sub>3</sub> receptor: structure, pharmacology, and function. *Molecular Pharmacology*. 2016; 90(5): 649–673. doi:10.1124/mol.116.104752
82. 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
83. 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
84. 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

85. Osorio-Espinoza A, Escamilla-Sánchez J, Aquino-Jarquín G, Arias-Montaño JA. Homologous desensitization of human histamine H<sub>3</sub> receptors expressed in CHO-K1 cells. *Neuropharmacology*. 2014; 77: 387–97. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.09.011
86. 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
87. 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
88. 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
89. 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
90. Parra-Abarca J, Rivera-Ramírez N, Villa-Maldonado LF, García-Hernández U, Aguilera P, Arias-Montaño JA. Histamine H<sub>1</sub> and H<sub>3</sub> 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
91. 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
92. 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
93. 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
94. Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, *et al.* A detailed mapping of the histamine H<sub>3</sub> receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*. 2002; 114(1): 173–193. doi:10.1016/s0306-4522(02)00135-5
95. 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
96. 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
97. 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
98. 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
99. 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 H<sub>3</sub> Receptor Isoforms. *ACS Chemical Neuroscience*. 2023; 14(4): 645-656. doi:10.1021/acscchemneuro.2c00425
100. 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

101. 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
102. 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
103. 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
104. 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
105. Rodríguez-Campuzano AG, Ortega A. Glutamate transporters: Critical components of glutamatergic transmission. *Neuropharmacology*. 2021; 192, 108602. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108602
106. 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
107. 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
108. Schousboe A. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons are glial cells. *International Review of Neurobiology*. 1981; 22: 1–45. doi:10.1016/s0074-7742(08)60289-5
109. Schneider EH, Neumann D, Seifert R. Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from H<sub>(1)</sub>R- and H<sub>(2)</sub>R-deficient mice. *Neuroscience and*

*Biobehavioral Reviews.* 2014; 42: 252–266.  
doi:10.1016/j.neubiorev.2014.03.009

110. 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
111. Sharma A, Muresanu DF, Patnaik R, Menon PK, Tian ZR, Sahib S, *et al.* Histamine H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> 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
112. 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
113. 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
114. 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
115. 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
116. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica.* 2010; 119(1): 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8

117. 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
118. 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 <sup>1</sup>H functional magnetic resonance spectroscopy. *NeuroImage*. 2017; 153: 189–197. doi:10.1016/j.neuroimage.2017.03.051
119. Stern JR, Eggleston LV, Hems R, Krebs HA. Accumulation of glutamic acid in isolated brain tissue. *Biochemical Journal*. 1949; 44(4): 410–418.
120. Stoklund Dittlau K, Freude K. Astrocytes: The Stars in Neurodegeneration?. *Biomolecules*. 2024; 14(3), 14030289. doi:10.3390/biom14030289
121. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>(+)</sup>-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. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10955>
122. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0136555100>
123. Suchak SK, Baloyianni NV, Perkinson 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
124. 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

125. Takumida M, Takumida H, Anniko M. Localization of histamine (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub>) receptors in mouse inner ear. *Acta Oto-laryngologica*. 2016; 136(6): 537–544. doi:10.3109/00016489.2015.1136433
126. 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
127. 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): 401–15. doi:10.1002/glia.23099
128. 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
129. Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of glutamate transport. *Physiological Reviews*. 2013; 93(4): 1621–57. doi:10.1152/physrev.00007.2013
130. 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
131. Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, Mothet JP, Zorec R. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *EMBO Journal*. 2016; 35(3): 239–257. doi:10.15252/embj.201592705
132. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*. 2018; 98(1): 239–389. doi:10.1152/physrev.00042.2016
133. Villa-Maldonado LF. *Identificación de las isoformas del receptor a histamina H<sub>3</sub> expresadas por astrocitos de la rata en cultivo primario*. [Tesis de maestría]. Ciudad de México: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2020.

134. 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
135. 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
136. 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
137. 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
138. 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
139. Xu J, Pittenger C. The histamine H<sub>3</sub> receptor modulates dopamine D<sub>2</sub> receptor-dependent signaling pathways and mouse behaviors. *Journal of Biological Chemistry*. 2023; 299(4), 104583. doi:10.1016/j.jbc.2023.104583
140. 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
141. Yang K, Liu Y, Zhang M. The Diverse Roles of Reactive Astrocytes in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Sciences*. 2024; 14(2), 1420158. doi:10.3390/brainsci14020158
142. 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

143. Yu AC, Schousboe A, Hertz L. Metabolic fate of <sup>14</sup>C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *Journal of Neurochemistry*. 1982; 39(4): 954–960. doi:10.1111/j.1471-4159.1982.tb11482.x
144. 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
145. Zheng Y, Fan L, Fang Z, Liu Z, Chen J, Zhang X, *et al.* Postsynaptic histamine H<sub>3</sub> receptors in ventral basal forebrain cholinergic neurons modulate contextual fear memory. *Cell Reports*. 2023; 42(9), 113073. doi:10.1016/j.celrep.2023.113073
146. 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
147. 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
148. 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