

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES GLAST, GLT-1 Y
GLUTAMINA SINTETASA EN ASTROCITOS HIPOCAMPALES DE RATA
WISTAR EXPUESTOS A CONCENTRACIONES EXCITOTÓXICAS DE
GLUTAMATO RELACIONADAS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

ANNIE VILLEGAS DUQUE

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI

2018

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES GLAST, GLT-1 Y
GLUTAMINA SINTETASA EN ASTROCITOS HIPOCAMPALES DE
RATA WISTAR EXPUESTOS A CONCENTRACIONES
EXCITOTÓXICAS DE GLUTAMATO RELACIONADAS CON LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

ANNIE VILLEGAS DUQUE

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

TUTOR

ÁLVARO ANDRÉS BARRERA OCAMPO, Ph.D.

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

SANTIAGO DE CALI

2018



APROBADO POR:

Juliana Rengifo Gómez PhD
Evaluador

Alvaro Barrera Ocampo PhD
Tutor del Proyecto.

Contenido

1. Resumen	10
2. Introducción.....	12
3. Estado del Arte.....	14
3.1 Astrocitos.....	14
3.2 Excitotoxicidad.....	15
3.3 Ciclo Glutamina-Glutamato	15
3.4 Farmacología de la EA	16
4. Marco teórico.....	18
4.1 Posibles causas de la EA	18
4.2 El Hipocampo	19
4.3 Proteína tau y Ovillos Neurofibrilares	20
4.4 Péptido A β y Placas amiloide	21
5. Objetivos.....	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos específicos	23
6. Métodos y materiales	24
6.1 Materiales	24
6.2 Establecer las concentraciones tóxicas de glutamato	24
6.2.1 Cultivos de astrocitos hipocampales	24
6.2.2 Inducción de excitotoxicidad con glutamato	24
6.2.3 Evaluación de la viabilidad celular con MTT	25
6.2.4 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	25
6.3 Estandarización de las condiciones óptimas de PCR.....	26
6.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
6.4 Determinación de los cambios de la expresión de los genes GLAST, GLT-1 y GS	27
6.4.1 Método de obtención de datos	27
6.4.2 Estudio Estadístico	27
7. Resultados y Discusión	29
7.1 Establecer las concentraciones tóxicas de glutamato	29

7.2 Estandarización de las condiciones óptimas de PCR.....	33
7.3 Determinación de los cambios de la expresión de los genes GLAST, GLT-1 y GS.....	35
8. Conclusiones.....	38
9. Recomendaciones.....	39
10. Anexo.....	40
11. Bibliografía	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones para la síntesis de cDNA	26
Tabla 2. Condiciones para la PCR.....	26
Tabla 3. Primers utilizados en la PCR con temperatura teórica.....	27
Tabla 4. Diseño de primers para el gen a analizar.....	33
Tabla 5. Temperatura óptima de alineamiento de los primers utilizados en la PCR.	34
Tabla 6. Análisis estadístico de exposición a glutamato a 0,5h	40
Tabla 7. Test Dunnett para la comparación del vehículo con los tratamientos en las células expuestas a 0,5h	40

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Representación del aumento del número de personas con demencia en todo el mundo (2010-2050)(Alzheimer D. Internacional, 2013).....</i>	12
<i>Figura 2. Número de personas con demencia en países con ingresos bajos y medios comparándolos con los países de ingresos altos (Alzheimer D. Internacional, 2013).</i>	13
<i>Figura 3. Factores involucrados en la comunicación de célula a célula entre neuronas, astrocitos y microglia en enfermedades neurodegenerativas extraído de (Matthew Neal, 2018).....</i>	14
<i>Figura 4. Rol de los astrocitos en el ciclo glutamina-glutamato extraído del Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica 2007, Autor del Contenido y Actividades: Dr. Luis Fernando Pacheco B. Disponible en http://163.178.103.176/Fisiologia/neuro_prac_bas_p6_22.html</i>	16
<i>Figura 5. Diagrama algunas de las posibles causas de EA extraído de (Edwin L. Cooper & Melissa J. Ma, 2017).....</i>	18
<i>Figura 6. Anatomía del cerebro humano donde se puede observar la localización y el tamaño del hipocampo (verde) extraído de https://www.blogdefarmacia.com/el-cerebro-y-la-funcion-del-hipocampo-en-la-memoria/</i>	19
<i>Figura 7. Proceso de formación de ovillos neurofibrilares (Querfurth & LaFerla, 2010)</i>	21
<i>Figura 8. Procesamiento de proteína precursora amiloide extraído de (Querfurth & LaFerla, 2010).....</i>	21
<i>Figura 9. Estructura del MTT extraído de http://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm</i>	29
<i>Figura 10. Formación de formazano a partir de la sal de tetrazolino extraído de http://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm</i>	30
<i>Figura 11. Diseño experimental del ensayo de MTT en astrocitos hipocampales tratados con glutamato. Distribución de las muestras en el plato de 96 pozos: Células no tratadas (control positivo), células tratadas con Triton X-100 (control negativo), células tratadas con el vehículo (HBSS), células tratadas con glutamato (5 μM, 50 μM y 500 μM) y pozos sin células (blanco del ensayo de MTT). Esta configuración fue empleada para los tiempos evaluados de 0,5 h y 2 h.....</i>	30
<i>Figura 12. Histogramas de los promedios de la absorbancia obtenidas mediante el ensayo de MTT de las células tratadas a 0.5 h y 2.0 h.....</i>	32
<i>Figura 13. a) Perfil electroforético en geles de agarosa que reúne los resultados del proceso de estandarización de GLAST -1(Slc1a3), GLT-1(Slc1a2) y Glutamina Sintetasa (Glul) b) Electroforesis a partir de las cuales se obtuvo la temperatura óptima de alineamiento de cada gen de estudio.....</i>	34

Figura 14. Expresión de los genes GLAST, GLT-1 y GS en astrocitos de rata tratados con glutamato 50 μ M por 0.5 h. A) Esquema de comparación de la expresión de los genes de estudio en muestras obtenidas tras el tratamiento con el vehículo y las concentraciones de glutamato. b) Histogramas que permiten evidenciar la tendencia de expresión de los genes.....35

ABREVIATURAS

A β : Beta amiloide

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPA: Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

Ca: Calcio

cDNA: Cadena complementaria de ADN

EA: Enfermedad de Alzheimer

GD: Glutamato deshidrogenasa

GLAST: Transportador de Glutamato-Aspartato

GLT-1: Transportador de Glutamato 1

GS: Glutamina Sintetasa

IP3: Trifosfato de inositol

NMDA: N-metil-D-aspartato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLP: Potenciación a largo plazo

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SNC: Sistema nervioso Central

1. Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, plantea un importante problema para la salud pública y representa una alta carga económica para la sociedad. Actualmente su etiología es en gran medida indeterminada, pero existen factores de estrés, entre ellos la excitotoxicidad por glutamato, que empeoran los síntomas de la enfermedad. En el proyecto se evaluó la expresión de GLAST, GLT-1 (transportadores de glutamato) y de la enzima Glutamina Sintetasa de astrocitos hipocampales de ratas *Wistar* sometidos a diferentes concentraciones de glutamato. Se estableció el tiempo y la concentración necesarios para inducir toxicidad en los astrocitos mediante un ensayo de viabilidad celular con MTT. Para el ensayo de excitotoxicidad se utilizó 1 cultivo con 8 réplicas en cada tratamiento con glutamato (5, 50 y 500 μM), con dos tiempos de exposición (0,5 h y 2 h). Los datos presentaron una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y el análisis estadístico (ANOVA prueba post-hoc de Dunnett) reveló que la concentración y el tiempo adecuado para inducir estrés celular eran 50 μM y 0,5 h. Empleando estas condiciones en otra serie de experimentos se extrajo el RNA para realizar una RT-PCR. Los valores de densitometría de cada muestra fueron normalizados con respecto a un gen de expresión constitutiva. El análisis estadístico (prueba de Wilcoxon) reveló que no había diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes evaluados. No obstante se observó una tendencia a aumentar la expresión de los transportadores y una disminución de la expresión de la enzima glutamina sintetasa.

Palabras Claves: Enfermedad de Alzheimer, excitotoxicidad, glutamato, astrocitos.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, poses a major problem for public health and has a high financial burden for society. Currently, its etiology is largely indeterminate, but it has certain stress factors, including glutamate excitotoxicity, which worsen the symptoms of the disease. This project evaluated the gene expression of GLAST, GLT-1 (glutamate transporters) and the enzyme Glutamine Synthetase of hippocampal astrocytes from Wistar rats after treatment with toxic concentrations of glutamate. For the excitotoxicity test, 1 culture with 8 replicates was used in each treatment (5, 50 and 500 μM), with two exposure times (0.5h and 2h). Cell viability was evaluated by MTT and it was determined that the data had a normal distribution using the Shapiro-Wilk test, therefore an ANOVA and a Dunnett post-hoc test were applied to determine the differences between the treatments, the vehicle and the exposure time. A difference was observed after 0.5 h of treatment at a glutamate concentration of 50 μM . Next, the RNA was extracted to perform an RT-PCR. The densitometry values of each sample were used to calculate the average and standard deviation of each treatment to compare their means using the non-parametric Wilcoxon test. No statistically significant difference in the expression of the genes was obtained. However, a tendency to increase the expression of the transporters and a decrease in the expression of the enzyme can be observed.

Key words: Alzheimer's disease, excitotoxicity, glutamate, astrocytes.

2. Introducción

La demencia es considerada una epidemia mundial, que en 2010 afectó a 36 millones de personas y la cual se estima que duplique su incidencia cada 20 años, por lo que en 2030, afectará a 66 millones y en 2050 a 115 millones de personas (Figura 1) (Prince, Guerchet, & Prina, 2013).

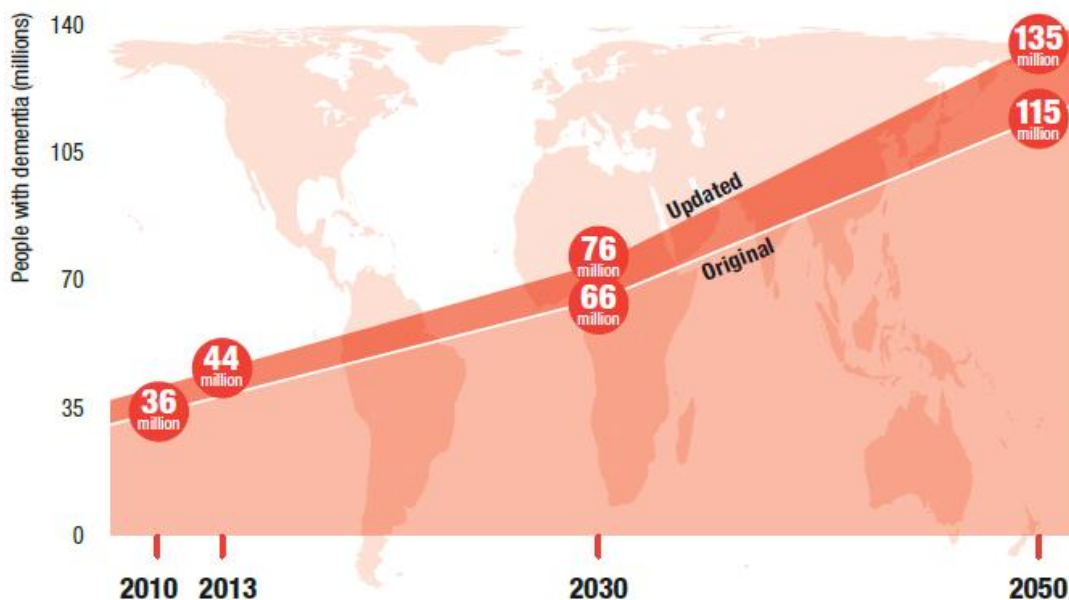


Figura 1. Representación del aumento del número de personas con demencia en todo el mundo (2010-2050)(Alzheimer D. Internacional, 2013)

Aunque una gran proporción de individuos con demencia se concentra en países de mayor ingreso económico y demográficamente más envejecidos (42%), el 58% restante vive en países de ingresos bajos y medios, donde es limitado el acceso a la protección social, servicios de salud, apoyo a los familiares y cuidado al paciente (Figura 2). Por eso, para el 2050 se estima que el 71% de los enfermos EA (enfermedad de Alzheimer) serán de países con ingresos bajos y medios, puesto que, además de las falencias en diagnosticar y tratar a los pacientes. Estos también presentan mayor prevalencia a factores de riesgo como son el tabaquismo, enfermedades cardiovasculares, hipoactividad, obesidad, hipertensión y diabetes (Alzheimer D. Internacional, 2013), por lo que aumenta su probabilidad de padecer dicha patología.

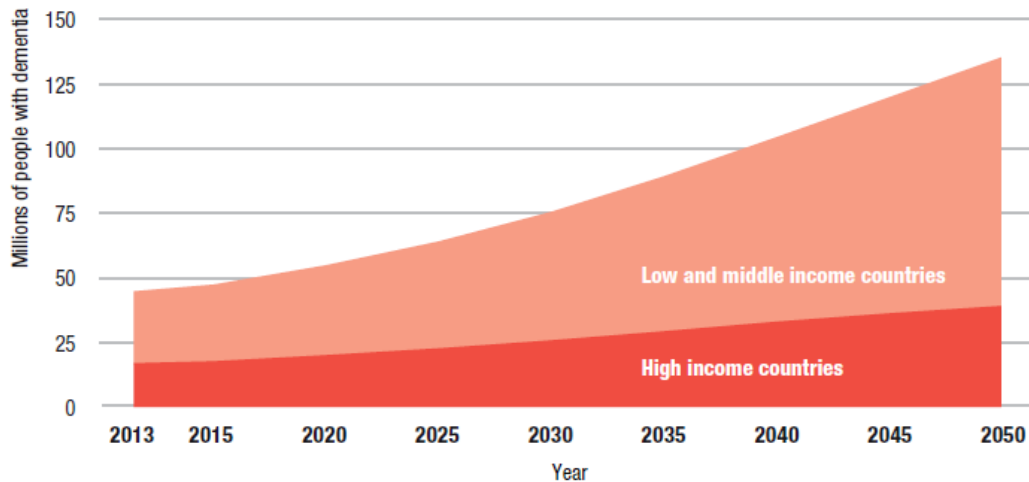


Figura 2. Número de personas con demencia en países con ingresos bajos y medios comparándolos con los países de ingresos altos (Alzheimer D. Internacional, 2013).

La EA es la causa más común de demencia en el mundo, pues, representa del 60 al 80 por ciento de los casos de demencia (Alzheimer’s Association, 2017). Además, plantea un importante problema de salud pública, ya que, genera una carga emocional y económica muy alta para la sociedad (Silvia Rios-Romenets et al., 2017) (Ułamek-Kozioł et al., 2016). La EA afecta la memoria, pensamiento, orientación, comprensión, cálculo, capacidad de aprendizaje, lenguaje y juicio. Así mismo, el desgaste de la función cognitiva suele ir acompañado y en ocasiones es precedido, por el deterioro del control emocional, el comportamiento social o la motivación (“OMS | Demencia,” 2017).

Además, se pueden observar dificultades en la planificación o resolución de problemas, la conexión de imágenes visuales y relaciones espaciales, la confusión con el tiempo o el lugar y el habla y la escritura (Association, 2017). Esto se debe a que el daño neuronal resulta ser masivo, lo que impide que una persona en etapas finales de la enfermedad pueda llevar a cabo funciones corporales básicas, como caminar y comer; lo que conlleva cuidado y atención las 24 horas del día, hasta que al final, la enfermedad desemboca en una conclusión fatal (Alzheimer’s Association, 2017) (Barrera-Ocampo & Lopera, 2016)(F. Bermejo-Pareja, S. Llamas-Velasco, 2016).

3. Estado del Arte

Con el rápido crecimiento de la población adulta mayor a nivel mundial, el número de enfermos de Alzheimer también muestra una tendencia creciente año tras año puesto que, la edad es el factor de riesgo principal para padecer la patología (Niu, Álvarez-Álvarez, Guillén-Grima, & Aguinaga-Ontoso, 2017) (Alzheimer's Association, 2017). El fracaso de las estrategias terapéuticas desarrolladas hasta hoy, se debe en parte al desconocimiento de una gran cantidad de eventos celulares y moleculares que se gestan en el cerebro antes de presentar algún síntoma. Los cuales se manifiestan en la vejez, relacionándose estrechamente con la disfunción de astrocitos hipocampales (F.Bermejo-Pareja, S.Llamas-Velasco, 2016). En esta etapa de vejez, las células presentan una disminución en la respuesta al daño celular, aumento de la concentración de glutamato, estrés oxidativo y los procesos de inflamación (Bellaver, Souza, Souza, & Quincozes-Santos, 2017)(Ota, Zanetti, & Hallock, 2013).

3.1 Astrocitos

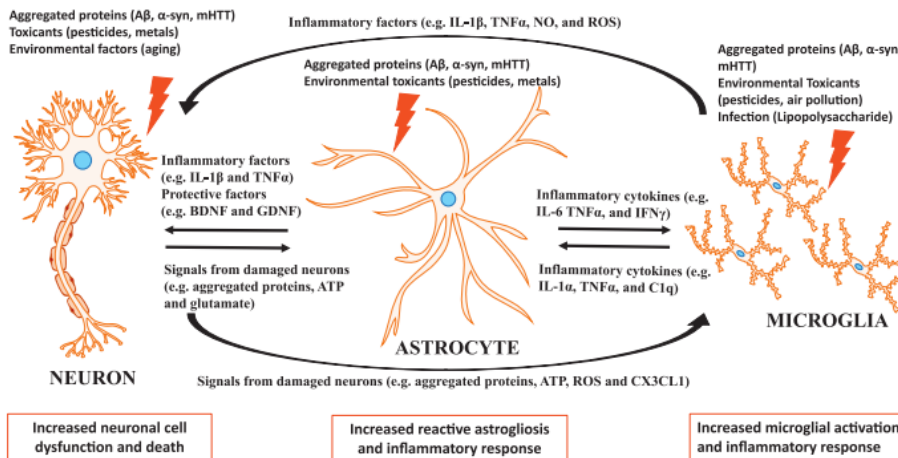


Figura 3. Factores involucrados en la comunicación de célula a célula entre neuronas, astrocitos y microglia en enfermedades neurodegenerativas extraído de (Matthew Neal, 2018).

En el cerebro los astrocitos realizan principalmente funciones homeostáticas y de apoyo celular a las neuronas (Latarjet & Ruiz Liard, 2004)(Yi et al., 2016). Pero, recientemente hay evidencias que sugieren que los astrocitos participan en la regulación de la sinapsis, la transmisión y la plasticidad. Lo cual, se consideran que forman parte de la infraestructura de información, el procesamiento, la formación y la estabilización de la memoria (Adar Adamsky & Inbal Goshen, 2017)(Ota et al., 2013).

La regulación de la actividad neuronal por parte de los astrocitos es posible dado que son capaces de modular o inducir la plasticidad por medio de la modulación del glutamato, GABA, ATP, varias citosinas y algunos factores de crecimiento (Nicola J.Allen & Cagla Eroglu, 2017). Pero estos procesos fisiológicos se ven afectados por agregados de proteínas o tóxicos ambientales (figura 3) (Matthew Neal, 2018).

En la EA, las propiedades de los astrocitos se modifican, pero su implicación en esta patología apenas comienza a apreciarse (Yi et al., 2016). Específicamente, con la edad, se observan cambios en los transportadores de glutamato (transportador de glutamato aspartato (GLAST), transportador de glutamato-1 (GLT-1) y en actividad de la glutamina sintetasa (Bellaver et al., 2017). Factores relacionados con el aumento del glutamato extracelular también llamado excitotoxicidad (Cooke & Bliss, 2006).

3.2 Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es un mecanismo fisiopatológico en el que el exceso de excitación de la neurona por niveles elevados de glutamato (principal neurotransmisor excitatorio del cerebro y la médula espinal), conduce a la muerte celular a través de las llamadas *cascadas de muerte celular* que son generadas por los segundos mensajeros, después de la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato (Nicholls, 2017)(Dong, Lin, Rattelle, Panzer, & Lynch, 2018).

El bloqueo de la excitotoxicidad tanto a nivel del receptor como en sitios específicos es una estrategia viable para la mejora de muchos trastornos neurológicos (Ota et al., 2013) (Galloway, Torres, Sebastián, & Fuxá, 2003).

3.3 Ciclo Glutamina-Glutamato

Una de las funciones principales de los astrocitos, además de las nombradas, es proteger las neuronas contra la excitotoxicidad al absorber el exceso de amoníaco y glutamato convirtiéndolos en glutamina a través de la enzima glutamina sintetasa (GS) (Rose, Verkhratsky, & Parpura, 2013). Este proceso se conoce como el ciclo glutamina-glutamato (figura 4).

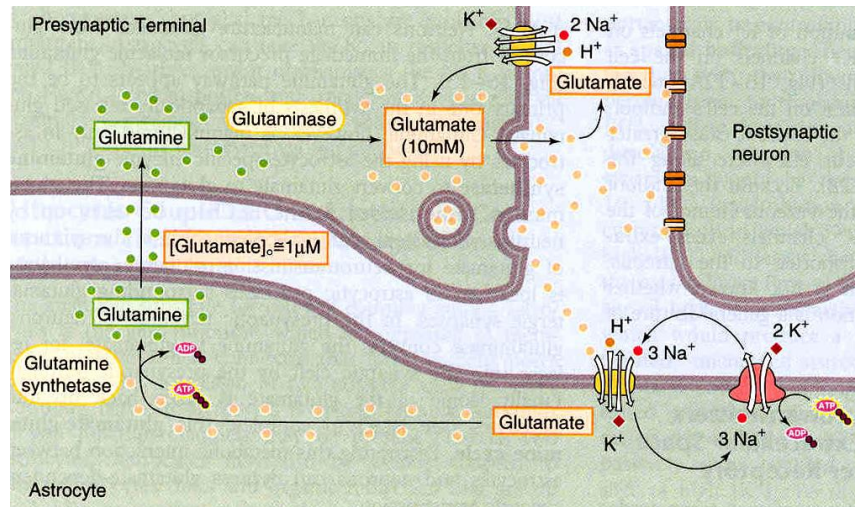


Figura 4. Rol de los astrocitos en el ciclo glutamina-glutamato extraído del Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica 2007, Autor del Contenido y Actividades: Dr. Luis Fernando Pacheco B. Disponible en http://163.178.103.176/Fisiologia/neuro_prac_bas_p6_22.html

Este ciclo comienza cuando los transportadores de glutamato de los astrocitos (GLAST y GLT-1) incorporan dentro de la célula el aminoácido, donde se encuentra presente la GS. Esta enzima, amida el glutamato a glutamina y lo libera al espacio intersticial para la absorción y la posterior desamidación por parte de las neuronas, así completando el ciclo Glutamato-Glutamina (Heather Scott Walton, 2007).

Recientemente, Shuxuan Huang et al. evaluaron el efecto de oligómeros de beta-amiloide ($A\beta$) sobre la expresión de transportadores de glutamato en astrocitos de rata (Shuxuan Huang et al. 2018). Ellos observaron que los oligómeros de $A\beta$ disminuyen la expresión de los transportadores GLAST y GLT-1, afectando a la sinapsis neuronal ya que los oligómeros solubles de $A\beta$ alteran el potencial a largo plazo hipocámpal (LTP), afectando el aprendizaje y la memoria (Ota et al., 2013) Además, promoviendo la excitotoxicidad neuronal ya que los péptidos $A\beta$ son capaces de inhibir la captación de glutamato.

3.4 Farmacología de la EA

Actualmente, la gran mayoría de las terapias farmacológicas contra la EA están dirigidas contra la agregación de los péptidos $A\beta$. Esta estrategia terapéutica utiliza péptidos sintéticos o anticuerpos monoclonales (mAb) para disminuir la carga de $A\beta$ en el cerebro y ralentizar la progresión de la enfermedad (Barrera-Ocampo & Lopera, 2016).

Hasta el momento solo 4 medicamentos han sido aprobados para el tratamiento de la EA. Tres de estos actúan sobre las vías colinérgicas del sistema nervioso central (SNC), **donepezilo, galantamina y rivastigmina**. Cada uno está aprobado para la demencia de leve a grave, aunque a menudo se usan en pacientes en etapas tempranas de demencia o pre-demencia, asociadas con deterioro significativo de la memoria de acuerdo con resultados de pruebas cognitivas (Graham, Bonito-Oliva, & Sakmar, 2017).

El cuarto medicamento es la **memantina**, un antagonista de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) extrasináptico, el NMDAR pertenece a un subgrupo de los receptores ionotrópicos de glutamato presente en la sinapsis neuronal. Participa en la regulación del potencial excitatorio postsináptico, teniendo un rol preponderante en la plasticidad neuronal, el aprendizaje y la memoria (Bakota, Ussif, Jeserich, & Brandt, 2017). La memantina se usa actualmente con inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa demostrando que previene de manera preferente la activación excesiva de los NMDAR extrasinápticos y, por lo tanto, previene la muerte celular neuronal inducida por excitotoxicidad (niveles dañinos de glutamato) sin alterar la actividad sináptica fisiológica (Folch et al., 2017). No obstante, la memantina no ha mostrado efectos positivos claros en aplicaciones clínicas, solo en etapas preclínicas donde tuvo resultados muy prometedores (Bakota et al., 2017).

No hay pruebas claras de que alguno de los fármacos actualmente disponibles modifique la patología primaria que subyace a la enfermedad. Sin embargo, los medicamentos parecen proporcionar un alivio sintomático y generalmente se administran como terapia paliativa con el objetivo de frenar la disminución en la calidad de vida, incluso en pacientes que ya reciben atención por demencia en entornos institucionales (Graham et al., 2017). En la actualidad, no se ha encontrado una droga que tenga éxito para alterar el curso de la enfermedad, ya que la pérdida de memoria y el deterioro cognitivo están asociados con la muerte neuronal y la pérdida de la materia gris en la corteza frontal y el hipocampo (Barrera-Ocampo & Lopera, 2016).

4. Marco teórico

4.1 Posibles causas de la EA

Las enfermedades neurodegenerativas, como EA, son muy heterogéneas en cuanto a sus síntomas y hallazgos histopatológicos (Scheltens et al., 2016). Actualmente se relaciona con alteraciones genéticas, moleculares y celulares, siendo una patología multifactorial. Como se puede observar en la figura 5, cada nodo en ésta representa una posible causa de EA. Estos eventos pueden funcionar de forma concertada para producir la muerte neuronal en los pacientes (Edwin L. Cooper & Melissa J. Ma, 2017), no obstante estos no son los únicos eventos que desencadenan o empeoran la patología.

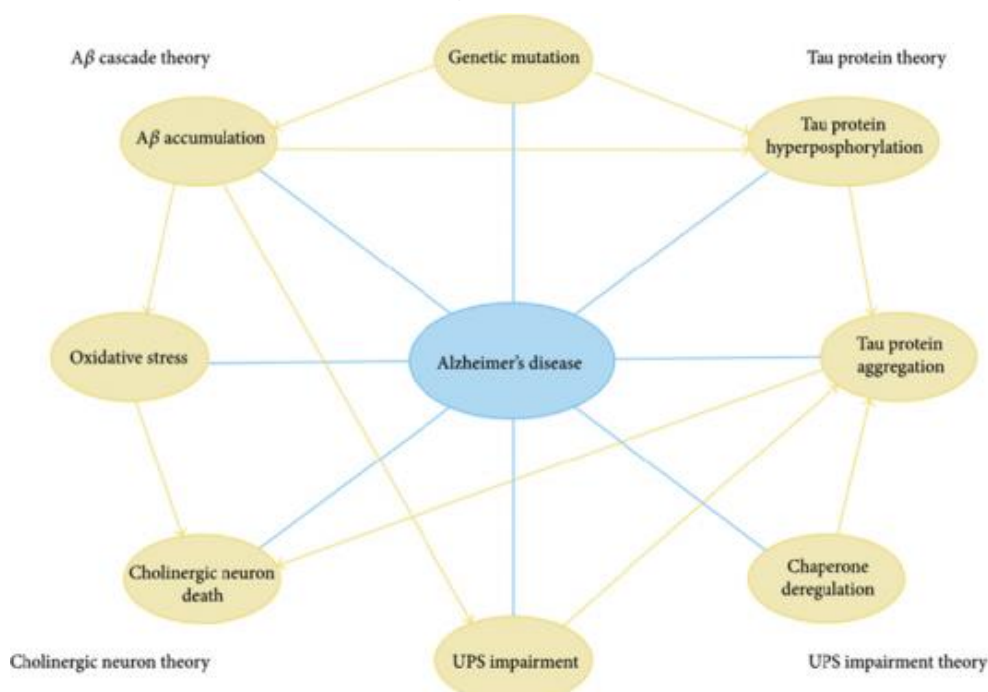


Figura 5. Diagrama algunas de las posibles causas de EA extraído de (Edwin L. Cooper & Melissa J. Ma, 2017).

Se estima que el 99% de los casos de EA son debidos a causas desconocidas (Alzheimer esporádico). Solo un pequeño porcentaje de casos de EA (<1%) se desarrolla como resultado de mutaciones en tres genes específicos (la proteína precursora amiloide “APP”, presenilina 1 y 2), estas mutaciones incrementan la probabilidad de desarrollar la enfermedad en el 95-100% de los casos, teniendo síntomas antes de los 65 años, incluso a edades tempranas (<45 años) (Alzheimer’s Association, 2017).

Los marcadores moleculares más característicos de la EA son las **placas beta-amiloide** y los **agregados de tau**, los cuales tienen patrones de progresión

espaciales y temporales discrepantes dentro de ciertas regiones vulnerables del cerebro (David T. Jones a,b et al., 2017). Estos son un indicador mensurable que se utilizan para diagnosticar la presencia o ausencia, evaluar el riesgo de desarrollar una enfermedad, o entender cómo un paciente ha respondido a un tratamiento (Karlavish, Jack, Rocca, Snyder, & Carrillo, 2017).

La agregación del péptido A β y la fosforilación de tau ocurren a lo largo de la vida del paciente, pueden ser utilizados para diagnosticar la enfermedad midiendo sus niveles en el líquido cefalorraquídeo (Marie Jouanne & Sylvain Rault, 2017). Sin embargo, la falta de antecedentes familiares o síntomas característicos evitan que se haga un diagnóstico temprano de la enfermedad.

Hasta el momento los únicos medios para evaluar la disposición del péptido A β era las tomografías por emisión de positrones (PET) o medición del A β en el fluido cerebroespinal, procedimientos invasivos y costosos, por lo que no toda la población puede acceder a ellos. Pero recientemente se ha validado un método por el cual se pueden determinar los niveles de A β plasmáticos y correlacionarlos con la presencia, ausencia y/o avance de la enfermedad, puesto que estos análisis se pueden realizar a etapas tempranas o leves de la EA, abriendo la oportunidad a que se implementen medidas para detener el progreso de la enfermedad (Nakamura et al., 2018).

4.2 El Hipocampo

El hipocampo como se puede observar en la figura 6, está situado en el lóbulo temporal medio, en la parte más baja de la corteza y toca el tronco del encéfalo (Florencia Zappa Villar et al., 2017).

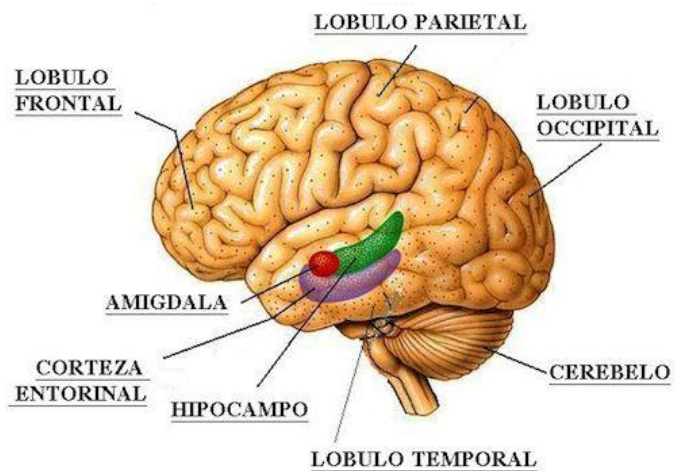


Figura 6. Anatomía del cerebro humano donde se puede observar la localización y el tamaño del hipocampo (verde) extraído de <https://www.blogdefarmacia.com/el-cerebro-y-la-funcion-del-hipocampo-en-la-memoria/>

Éste hace parte del sistema límbico, un conjunto de vías nerviosas involucradas en la génesis y creación de las emociones (Latarjet & Ruiz Liard, 2004), además, está

involucrada con la correcta formación, adquisición y consolidación de la memoria, así como para la orientación espacial y los procesos de aprendizaje.

Se compone de cuatro regiones morfológicamente diferentes DG (giro dentado), CA (Cornus Ammonis), presubiculum y subiculum. A su vez, el área CA se puede subdividir en otras dos regiones: CA1 y CA3 (Strien, Cappaert, & Witter, 2009). Hay estudios que reconocen una tercera región denominada CA2, no obstante esto no está generalizado (Aimone et al., 2014) (Noemí Rueda Revilla, 2016).

4.3 Proteína tau y Ovillos Neurofibrilares

En 1907, la hipótesis de los ovillos neurofibrilares que provienen de la fosforilación de la proteína tau fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer, pero no fue hasta 1968 y 1988 que se caracterizó la composición de estos y se relacionó con la EA (Bakota et al., 2017). La proteína tau forma parte importante del citoesqueleto en las neuronas; estabilizando microtúbulos, manteniendo la forma celular y como vía de transporte axonal (Kumar, Kumar, Keegan, & Deshmukh, 2018). Diversas quinasas (y algunas fosfatasas) juegan un papel importante en la fosforilación de tau en el cerebro (Marie Jouanne & Sylvain Rault, 2017), afectando su función biológica normal. Las quinasas con actividad excedida, las fosfatasas con actividad reducida o ambas causan la hiperfosfolización de tau, lo que conlleva a su autoagregación y a la consecuente desestabilización de los microtúbulos (Querfurth & LaFerla, 2010).

Bajo estas circunstancias, tau comienza a agregarse originando complejos proteicos denominados ovillos neurofibrilares (Figura 7), (NFT por sus siglas en inglés). Estos agregados forman filamentos insolubles que provocan pérdida de conexiones neuronales y destruyen el sistema de transporte y comunicación de las neuronas constituido por los microtúbulos (Braak & Del Tredici, 2010)(Merle Christine Hoenig et al., 2017).

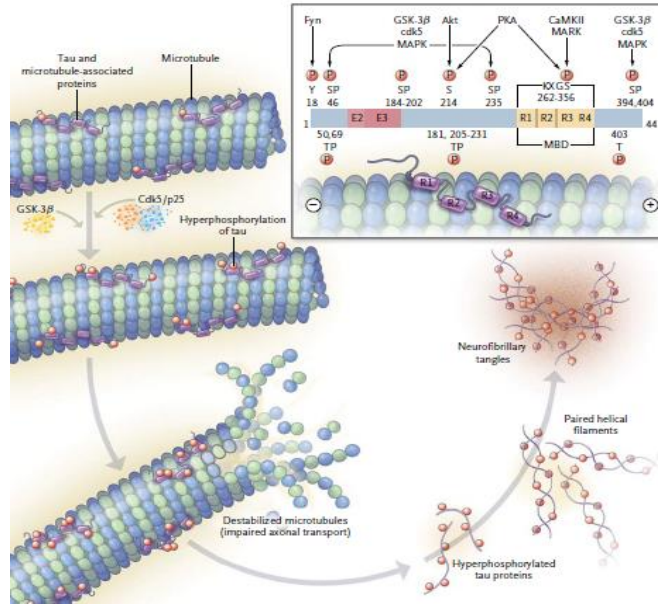


Figura 7. Proceso de formación de ovillos neurofibrilares (Querfurth & LaFerla, 2010)

Estos ovillos sobreviven incluso después de la muerte neuronal, donde pueden ser liberados al espacio extracelular. Los ovillos son degradados por los astrocitos y la microglia que generalmente se encuentran dentro del hipocampo, la corteza entorrinal, la amígdala, el núcleo dorsal de rafé y el núcleo basal de Meynert (Kumar et al., 2018), estructuras afectadas por la neurodegeneración que se presenta en EA.

4.4 Péptido A β y Placas amiloide

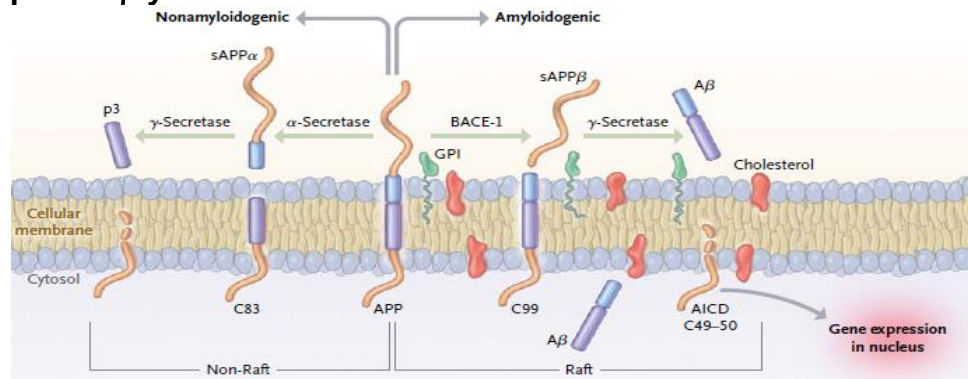


Figura 8. Procesamiento de proteína precursora amiloide extraído de (Querfurth & LaFerla, 2010)

La proteína integral de membrana denominada APP (Proteína precursora amiloidea), se sintetiza en el retículo endoplásmico, se transporta por vesículas secretoras, y se procesa por diferentes enzimas que están en la bicapa lipídica (Figura 8)(Kumar et al., 2018), APP es la precursora de los péptidos A β . La hipótesis

amiloidea de la EA sostiene que la acumulación del péptido A β conduce a una sinapsis disfuncional y una neurodegeneración relacionada con los síntomas más característicos de demencia (Christopher H. van Dyck, 2017).

Esta producción de péptido A β se debe a la degradación de la proteína APP por ciertas enzimas, pero este procesamiento celular tiene dos vías. La primera vía, lado izquierdo de la figura 8, no es dañino para el organismo, se denomina procesamiento no amiloidogénico y tiene un efecto neuroprotector. La segunda vía, lado derecho de la figura 8, es el procesamiento amiloidogénico el cual crea los péptidos A β , estos son muy insolubles y suelen agregarse en el espacio extracelular (Querfurth & LaFerla, 2010).

Recientemente se ha descubierto un nuevo subproducto de la escisión de APP, denominado A β 1-43, el cual se ha informado que contribuye potencialmente a la formación de las placas amiloide. Curiosamente, A β 1-43 es altamente amiloidogénico, neurotóxico y se agrega antes que los otros dos productos de la escisión. A β 1-43 interactúa con las membranas neuronales, lo que resulta en la formación de poros y una afluencia excesiva de iones que conducen a la muerte neuronal y la progresión de la EA (Kumar et al., 2018).

Además, los péptidos A β afectan la función de la enzima GS Sonia Luz Rodríguez L , Pérez G & Gerardo Reyes (2012) pudieron observar que la interacción de GS con el péptido A β puede explicar la reducción de la actividad de la enzima en pacientes con EA, alterando el ciclo glutamato-glutamina y generando cambios en el entorno celular que favorecen la excitotoxicidad por glutamato típica de los procesos de neurodegeneración. Este aumento de glutamato y la falta de absorción de éste por parte de los astrocitos, los cuales controlan el curso temporal del glutamato en el espacio extracelular, afecta la neurotransmisión, la sinaptogénesis (formación de sinapsis) y el desarrollo del ciclo glutamina-glutamato (Mortimer Mamelak, 2017).

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la expresión de los genes GLAST, GLT-1 y Glutamina sintetasa que codifican los transportadores y la enzima que degrada el glutamato en astrocitos hipocampales de rata Wistar tratados con glutamato a concentraciones excitotóxicas.

5.2 Objetivos específicos

- Establecer las concentraciones tóxicas de glutamato en cultivos de astrocitos hipocampales de rata.
- Estandarizar la metodología para la amplificación de los genes de interés mediante RT-PCR
- Determinar por RT-PCR si existen cambios en la expresión de los genes de interés en cultivos de astrocitos tratados con glutamato.

6. Métodos y materiales

6.1 Materiales

Hipocampos de ratas Wistar recién nacidas (P0-P2) fueron empleados para hacer los cultivos de astrocitos. La disociación del tejido se hizo mediante digestión con DNAsa (0,1 mg/mL) y tripsina (0.25%). Las células fueron sembradas en medio mínimo esencial (MEM). La inducción de la excitotoxicidad se produjo con Glutamato y la viabilidad de las células se verificó con el kit Vybrant® MTT, este implica la conversión del MTT soluble en agua (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) a un formazano insoluble. Luego se solubilizó el formazano en DMSO y la concentración se determinó por densidad óptica a 570 nm. Para la extracción de RNA se utilizó el kit E.Z.N.A Total RNA de Omega bio-tek, y para cDNA se utilizó la enzima transcriptasa inversa con 500 ng de RNA y 0.5 µg de oligo (dt). Para la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se tomaron 60 ng de cDNA previamente sintetizado y se amplificaron con la enzima Taq polimerasa, dNTPs, magnesio, primers y buffer de la enzima.

6.2 Establecer las concentraciones tóxicas de glutamato

6.2.1 Cultivos de astrocitos hipocampales

Los cultivos de astrocitos se realizaron con hipocampo de rata Wistar posnatal de 0-2 días. Se separaron las células del tejido evitando la autoagregación con DNAsa (0,1 mg/mL) y tripsina (0.25%).

Posteriormente se sembraron las células en botellas de poliestireno de 25 cm² con medio mínimo esencial (MEM), que contenía glucosa (20 mM), piruvato de sodio (1 mM) y suero de caballo (10%). El MEM fue remplazado al día siguiente para descartar las células muertas que no se habían adherido. Una vez alcanzado la confluencia del 90% se realizó un subcultivo, removiendo el MEM y lavando los astrocitos con PBS (1X) y tripsina (0.025%). Seguidamente se las células se incubaron a 37°C por 5 min y se centrifugaron a 1000 x g por 4 min. El pellet obtenido se resuspendió en MEM, se contaron las células empleando una cámara de Neubauer, y se sembraron 2 x 10⁵ células por pozo.

6.2.2 Inducción de excitotoxicidad con glutamato

Al día siguiente de la siembra, las células se trataron con glutamato a diferentes concentraciones (5, 50 y 500 µM) y se incubaron durante un tiempo establecido (0,5 y 2,0 h) a 37°C y 5% de CO₂. Después de este tiempo se retiró el tratamiento y se adicionó nuevamente MEM suplementado.

6.2.3 Evaluación de la viabilidad celular con MTT

La viabilidad celular se realizó a astrocitos de 8 DIV (días *in vitro*) mediante el kit Vybrant® MTT. Esta viabilidad se realizó ya que se quise observar el estrés celular, más no la muerte por la excitotoxicidad, y así, poder analizar si tras estos tratamientos con glutamato hay alguna modificación de los genes de interés y poder asociar este evento a dicha modificación genética. Para este ensayo los astrocitos fueron tratados con vehículo (HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution) o glutamato (5 μ M, 50 μ M y 500 μ M); cada una de ellos contenía además glicina (10 μ M) y CaCl₂ (0.8 mM). Además, había células tratadas con Triton X-100 (0.1%), como control negativo, y células sin tratamiento alguno como control positivo. Después de 24 h se adicionó medio fresco y 10 μ L de la solución de MTT (12 mM). Para posteriormente incubar las células a 37°C por 4.0 h.

Por último, se retiró 85 μ L de medio y se agregó 50 μ L de DMSO como disolvente orgánico, para que se diluyan los cristales de formazano, Se incubaron a 37°C por 10 min y luego se midió la absorbancia en un lector de platos a 570 nm.

6.2.4 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Después de determinar la concentración y el tiempo óptimo de tratamiento, se procedió a sembrar astrocitos hipocampales en platos de 6 pozos en una densidad de 1×10^6 células por pozo. Al día siguiente, se trataron con glutamato a la concentración y tiempo determinados en el ensayo de excitotoxicidad.

Después de 24 h del tratamiento se realizó la extracción de RNA empleando el kit E.Z.N.A Total RNA de Omega bio-tek, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Omega bio-tek, 2012). Las células fueron tripsinizadas y se agregaron a un tubo de 1.5 mL para su lisis con 700 μ L del buffer de lisis TRK. Se centrifugaron las células a 10.000 x *g* durante 1 minuto. La muestra se agregó a una columna de RNA HiBind para luego centrifugar a 10.000 x *g* por 30 segundos. Las células se lavaron con 500 μ L de buffer el cual era RNA Wash Buffer II. Este se pipeteo directamente sobre la columna, luego se centrifugó nuevamente a 10.000 x *g* durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Se transfirió la columna a un tubo de centrifuga de plástico de 1.5 mL limpio y se le adicionó agua libre de nucleasas y se centrifugó a 13.000 x *g* por 2 minutos. La muestra se almacenó a -80°C en un ultra-congelador hasta realizar la RT-PCR.

A partir del RNA extraído, se obtuvo el cDNA por medio de la acción de la enzima transcriptasa inversa. Para esto se tomaron 500 ng de RNA, 0.5 μ g de oligo (dt) y agua, se incubaron a 70°C por 5 minutos y luego se colocaron en hielo por otros 5

minutos. A continuación, se tomaron 5 μL y se adicionaron a la mezcla descrita en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones para la síntesis de cDNA

RT-PCR [μf	1 Muestra (uL)
GS 1X Buffer	4,0
MgCl ₂ (2,0 mM)	1,6
dNTPs (0,5 mM)	1,0
GS Rev Trans	1,0
H ₂ O	7,4
Total	15,0
RNA	5,0

6.3 Estandarización de las condiciones óptimas de PCR

6.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR se tomaron 60 ng de cDNA sintetizado previamente y se adicionaron a la mezcla descrita en la tabla 2. Las muestras se llevaron al termociclador donde se incubaron a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C-65°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Las secuencias de los primers utilizados aparecen en la tabla 3.

Los fragmentos amplificados en la PCR se separaron en un gel de agarosa (1.5%) a 120 V por 90 min. Luego de esto los geles fueron fotografiados y a partir de estas imágenes se hizo el análisis densitométrico.

Tabla 2. Condiciones para la PCR.

PCR	1 Muestra (uL)
Buffer 10X	2,0
10 mM dNTPs	0,4
25 mM MgCl ₂	1,5
Fprimer	0,4
Rprimer	0,4
Taq	0,3
H ₂ O	14,0
Total	19,0
Muestra	1,0

En la tabla 3 aparece la información sobre las secuencias, las temperaturas de alineación teóricas y estandarizadas para los primers que se emplearon para amplificar los genes GLAST -1, GLT-1, Glutamina Sintetasa.

Tabla 3. Primers utilizados en la PCR con temperatura teórica.

Proteína	Primer	Secuencia (5'...3')	Longitud (pb)	Tm (°C) TEORICO
GLAST-1	Slc1a3 1F	GGATGGAAAGATTCCAGCAA	20	60.01
	Slc1a3 1R	CCATCTTCCCAGATGCCTTA	20	60.03
GLT-1	Slc1a2 1F	ATTGGTGCAGCCAGTATTCC	20	59.96
	Slc1a2 1R	TGCGGCATAGACACATTGAT	20	60.10
Glutamina sintetasa	Glul 1F	TGAACAAAGGCATCAAGCAG	20	59.99
	Glul 1R	GCCATAAGCCTTGTCAGCTC	20	59.99
GAPDH	GPDH 1 F	ATGGGAAGCTGGTCATCAAC	20	59.93
	GPDH 1 R	GGATGCAGGGATGATGTTCT	20	59.89

6.4 Determinación de los cambios de la expresión de los genes GLAST, GLT-1 y GS

6.4.1 Método de obtención de datos

A partir de las fotografías de los geles que contenían los fragmentos de los genes amplificados, se determinó la intensidad de las bandas y esta se cuantificó con el programa ImageJ (NIH), el cual es un programa que utiliza el procesamiento de imagen digital, para calcular la intensidad de cada banda que equivale a píxeles por área para determinar el nivel de expresión de genes que hay en cada muestra. Los valores de intensidad de cada gen se normalizaron con los valores de intensidad del gen de expresión constitutiva GAPDH.

6.4.2 Estudio Estadístico

Durante el proyecto se realizaron diferentes pruebas estadísticas para determinar el comportamiento de los datos. La primera prueba se realizó al ensayo de excitotoxicidad, el cual se llevó a cabo con un (1) cultivo (empleando 2 animales) con 8 réplicas por cada tratamiento. Los valores de absorbancia de cada muestra fueron empleados para calcular el promedio y la desviación estándar de cada tratamiento para aplicarle la prueba de Shapiro-Wilk, la cual es una prueba de normalidad, que determinó que los datos tenían una distribución normal. Por lo tanto, para se aplicó una ANOVA, en este caso el tiempo de exposición (0,5 h y 2,0

h) y las concentraciones de glutamato están relacionadas con la supervivencia celular.

Posterior a esto se realizó una prueba post-hoc de Dunnett, ya que una vez que se ha determinado que existen diferencias entre las medias, esta identifica los subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí, en este caso buscar para determinar si existían diferencias entre los tratamientos y el vehículo.

Con el fin de establecer si las diferencias eran estadísticamente significativas se asumió un intervalo de confianza del 95% y una $p < 0.05$. Para los análisis de expresión de genes se realizó 1 cultivo (empleando 4 animales) con 3 réplicas en cada tratamiento. Los valores de densitometría, correspondientes a la expresión de cada gen en los grupos experimentales, fueron empleados para calcular el promedio y la desviación estándar de cada tratamiento. A estos datos se les realizó una prueba no paramétrica de Wilcoxon, la cual se utiliza para comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas. Para esta se asumió que había significancia estadística cuando $p < 0.05$.

7. Resultados y Discusión

7.1 Establecer las concentraciones tóxicas de glutamato

Para la estimación de las concentraciones tóxicas de glutamato se realizaron los cultivos de astrocitos de hipocampo de rata wistar los cuales fueron tratados con diferentes concentraciones de glutamato. Una vez se realizaron las evaluaciones a los dos tiempos (0,5 h y 2 h) y las concentraciones propuestas (5 μM , 50 μM y 500 μM); se evaluó la viabilidad celular mediante MTT.

Este método, MTT, está basado en la actividad metabólica de las células, estimada por la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. Se considera que la acción sobre el MTT se debe principalmente a la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. Las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT en su formazano (Gold et al., 2015).

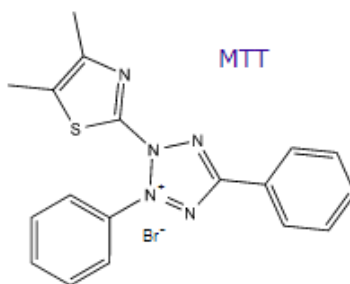


Figura 9. Estructura del MTT extraído de <http://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>

El MTT (figura 9) es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo. Al reducirse (figura 10), el MTT se convierte en un compuesto de la familia de formazanos, de color violeta e insoluble en agua. Para cuantificarlo se suele emplear un disolvente orgánico, como el DMSO (dimetilsulfóxido) para disolver la sal de formazano y así determinar la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm, la cual representa el máximo de absorbancia del MTT.

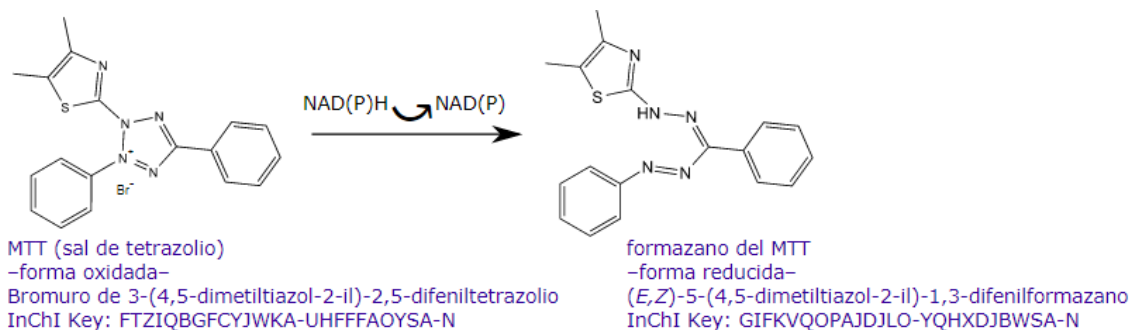


Figura 10. Formación de formazano a partir de la sal de tetrazolino extraído de <http://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>

El ensayo de MTT fue realizado para establecer la concentración y los tiempos óptimos para inducir estrés celular sin alcanzar niveles citotóxicos pues últimos estos causan lisis celular impidiendo el análisis de expresión de genes. La figura 11 muestra una imagen representativa de los resultados del ensayo de MTT.

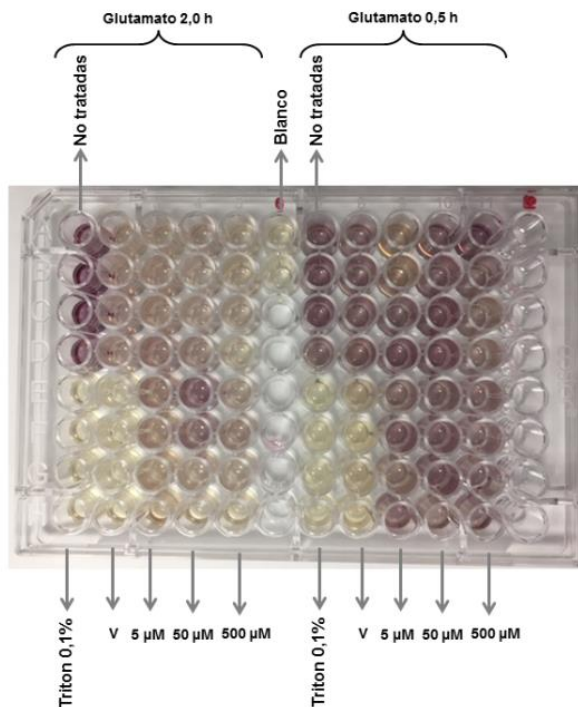


Figura 11. Diseño experimental del ensayo de MTT en astrocitos hipocampales tratados con glutamato. **Distribución de las muestras en el plato de 96 pozos:** Células **no tratadas (control positivo)**, células tratadas con Triton X-100

(control negativo), células tratadas con el vehículo (HBSS), células tratadas con glutamato (5 μ M, 50 μ M y 500 μ M) y pozos sin células (blanco del ensayo de MTT). Esta configuración fue empleada para los tiempos evaluados de 0,5 h y 2 h.

Actualmente hay métodos más sensibles que el ensayo MTT para determinar la actividad metabólica celular, ya que el MTT no siempre cuantifica correctamente la proliferación y citotoxicidad celular y por lo tanto, no cuantifica de manera precisa la supervivencia celular de los astrocitos tratados con glutamato (Lobner, 2000).

Esto se puede observar en la figura 11 donde muestras de las mismas células, con el mismo tiempo y concentración de tratamiento, sufren variaciones de color y por lo tanto arrojan resultados heterogéneos. Esto podría afectar la distribución de los datos y alterar los resultados de los análisis estadísticos. Por lo tanto, se necesitaría un ensayo más sensible, confiable y rápido como LDH y WST-1.

Esta falta de eficacia, sensibilidad y confiabilidad del ensayo de MTT se puede observar en el estudio de Liu, Peterson, Kimura, & Schubert, el cual sugiere que las mitocondrias no participan de manera exclusiva en la reducción del MTT sino que otros organelos como endosomas, lisosomas o mitocondrias libres también puede reducirlo (Liu, Peterson, Kimura, & Schubert, 2002).

Uno de los ensayos que se podría utilizar en remplazo del MTT es el ensayo de proliferación celular WST-1. Esta técnica no requiere ni lavar ni recolectar células y desde el inicio del cultivo el análisis de datos por lector de ELISA se realiza en la misma placa (Roche, 2007).

Otra alternativa al MTT es evaluar la apoptosis celular inducida por las altas concentraciones de glutamato mediante una técnica denominada LDH que analiza la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Esta se detecta en el espacio extracelular después de la muerte celular y su presencia está siempre relacionada con la necrosis y lesiones tisulares (Lobner, 2000)(Laborí Puentes, 2016). No obstante, lo más conveniente sería utilizar en concomitante el análisis de la liberación de LDH y la reducción de MTT, para determinar con precisión la muerte apoptótica de los astrocitos. Ya que el MTT carece de sensibilidad, como se demostró en cultivos de células primarias cuando fueron tratadas con diferentes concentraciones de péptidos A β (Mozes, Hunya, Posa, Penke, & Datki, 2012).

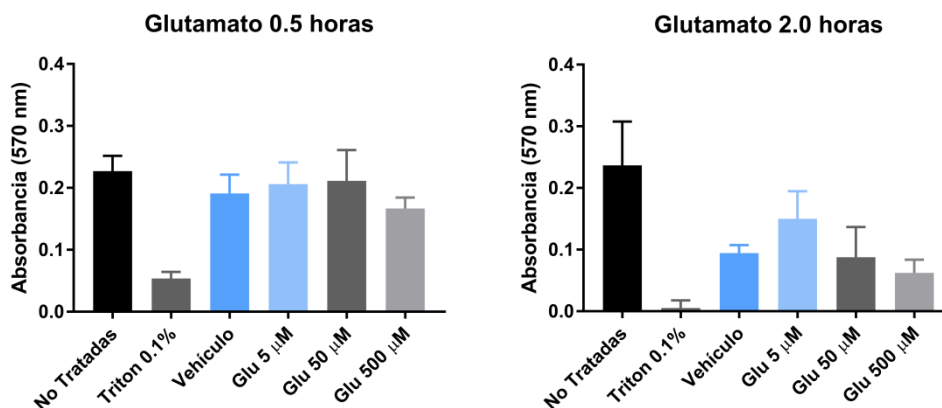


Figura 12. Histogramas de los promedios de la absorbancia obtenidas mediante el ensayo de MTT de las células tratadas a 0.5 h y 2.0 h

El análisis estadístico realizado a los datos obtenidos de las absorbancias no fue estadísticamente significativo. Esto se podría deber a que solo fue un solo experimento, y habría que realizar más repeticiones para evaluar si otros experimentos si arrojan algún resultado estadísticamente significativo. No obstante, sí se muestran ciertas tendencias cuando estos fueron tratados con los diferentes tratamientos.

En la figura 12 se puede observar los datos de las absorbancias en un diagrama de barras. Este diagrama se separó en dos gráficos que corresponden a los tiempos trabajados, estos además, se separaron en 6 barras diferentes.

Las dos primeras barras (células No tratadas y Triton 0,1%) solo se emplearon como los controles positivos y negativos respectivamente y no se utilizaron para el análisis de las tendencias de los resultados. Posterior a estas, está el vehículo contra el cual se compararon los diferentes tratamientos.

A las dos horas de tratamiento (2.0 h) hay menos viabilidad celular. Esto se debe a que el vehículo (HBSS) solo es un buffer que no tiene ni nutrientes ni condiciones aptas para las células. Por lo que un tiempo tan prolongado sin alimento, produce fuerte condiciones de estrés metabólico que causan la muerte.

En el tiempo 0.5 h hay más viabilidad celular en todas las concentraciones que al tiempo 2.0 h, esto se refleja en el tamaño de las barras que representan los niveles de absorbancia y en este caso son muy parecidas a la del vehículo. No obstante, se puede apreciar a la concentración de 500 µM empieza a disminuir de manera evidente la absorbancia, lo que se puede asociar con muerte celular. Debido a la magnitud de la muerte celular causada en tan poco tiempo de exposición, se puede inferir que a una concentración de 500 µM de glutamato no solo produce estrés

celular, sino necrosis. Por esta razón se descartó esta concentración (500 μM) para realizar los estudios posteriores.

Dado que a 5 μM y a 50 μM de glutamato se observa un alto nivel de viabilidad celular, se seleccionó el tratamiento con 50 μM de glutamato durante 0.5 h como las condiciones óptimas para inducir estrés sobre los astrocitos sin producir muerte celular necrótica ya que estudios de Abe & Saito (2000) confirmaron que concentraciones de 10-100 μM de glutamato producen modificaciones en el NMDAR produciendo un aumento en la concentración de calcio intracelular en células de hipocampo de rata cultivadas.

7.2 Estandarización de las condiciones óptimas de PCR

Para la estandarización de las condiciones óptimas de la PCR solo se utilizó como parámetro a evaluar la temperatura de hibridación de los primers, ya que esta era esencial para una correcta amplificación de los genes.

Estos primers fueron diseñados bioinformáticamente y se obtuvo una temperatura de hibridación teórica la cual se puede observar en la tabla 6. A parte de los genes a analizar también se diseñó un primer para el gen constitutivo GAPDH. Este gen también denominado gen *housekeeping* se expresa de manera constante en todos los astrocitos y se utiliza como referencia para normalizar los niveles de expresión de los genes de interés.

Tabla 4. Diseño de primer para la proteína a analizar.

Proteína	Primer	Secuencia (5'...3')	Longitud	Tm (°C)	pb
GLAST	Slc1a3 1F	GGATGGAAAGATTCCAGCAA	20	60.01	318
GLAST	Slc1a3 1R	CCATCTTCCCAGATGCCTTA	20	60.03	
GLT-1	Slc1a2 1F	ATTGGTGCAGCCAGTATTCC	20	59.96	315
GLT-1	Slc1a2 1R	TGCGGCATAGACACATTGAT	20	60.10	
Glut Syn	Glul 1F	TGAACAAAGGCATCAAGCAG	20	59.99	491
Glut Syn	Glul 1R	GCCATAAGCCTTGTCAGCTC	20	59.99	
GAPDH	GPDH 1F	ATGGGAAGCTGGTCATCAAC	20	54.0	440
GAPDH	GPDH 1R	GGATGCAGGGATGATGTTCT	20	54.0	

En la figura 13 se muestran fotografías de los geles de agarosa donde se separaron los productos de PCR correspondientes a los genes de interés. En los geles no se observan bandas inespecíficas en los rangos de temperatura evaluados (53 a 65°C). Experimentalmente se determinó que la temperatura óptima de alineamiento

para los genes era de 61.3°C (figura 13a y 13b).

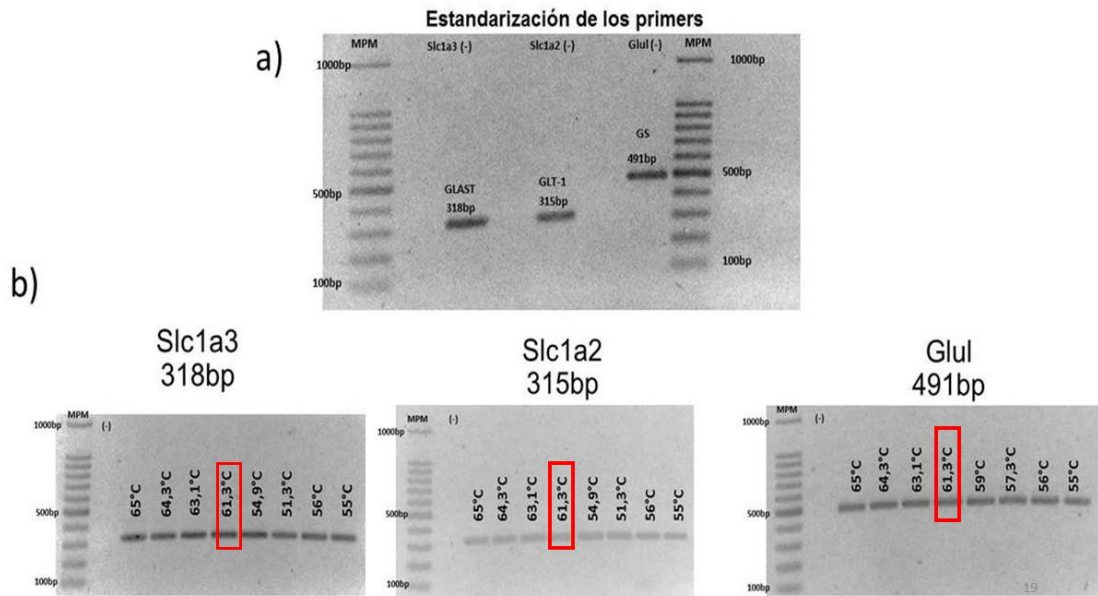


Figura 13. a) Perfil electroforético en geles de agarosa que reúne los resultados del proceso de estandarización de GLAST -1(Slc1a3), GLT-1(Slc1a2) y Glutamina Sintetasa (Glut) b) Electroforesis a partir de las cuales se obtuvo la temperatura óptima de alineamiento de cada gen de estudio.

Tabla 5. Temperatura óptima de alineamiento de los primers utilizados en la PCR.

Proteína	Primer	Tm (°C)
GLAST	Slc1a3 1F	60.01
GLAST	Slc1a3 1R	60.03
GLT-1	Slc1a2 1F	59.96
GLT-1	Slc1a2 1R	60.10
Glut Syn	Glut 1F	59.99
Glut Syn	Glut 1R	59.99
GAPDH	GPDH 1F	54.0
GAPDH	GPDH 1R	54.0

Además, se determinó que la cantidad de muestra óptima a llevar a cabo la PCR fue de 60 ng/ μ L, ya que a concentraciones mayores se evidencia una cantidad importante de cDNA sin amplificar y la aparición de bandas inespecíficas que alteran la calidad de los resultados.

7.3 Determinación de los cambios de la expresión de los genes GLAST, GLT-1 y GS

El análisis de los genes de estudio se llevó a cabo mediante la amplificación de GLAST, GLT-1 y GS de los astrocitos tratados con 50 μ M de glutamato por 0,5 h. A partir de las imágenes de los geles de agarosa de los productos de la PCR, se realizó un análisis densitométrico, el cual, determinó los niveles de expresión relativa mediante el software ImageJ (figura 14). Estos valores fueron comparados con la expresión del gen constitutivo GAPDH para su análisis.

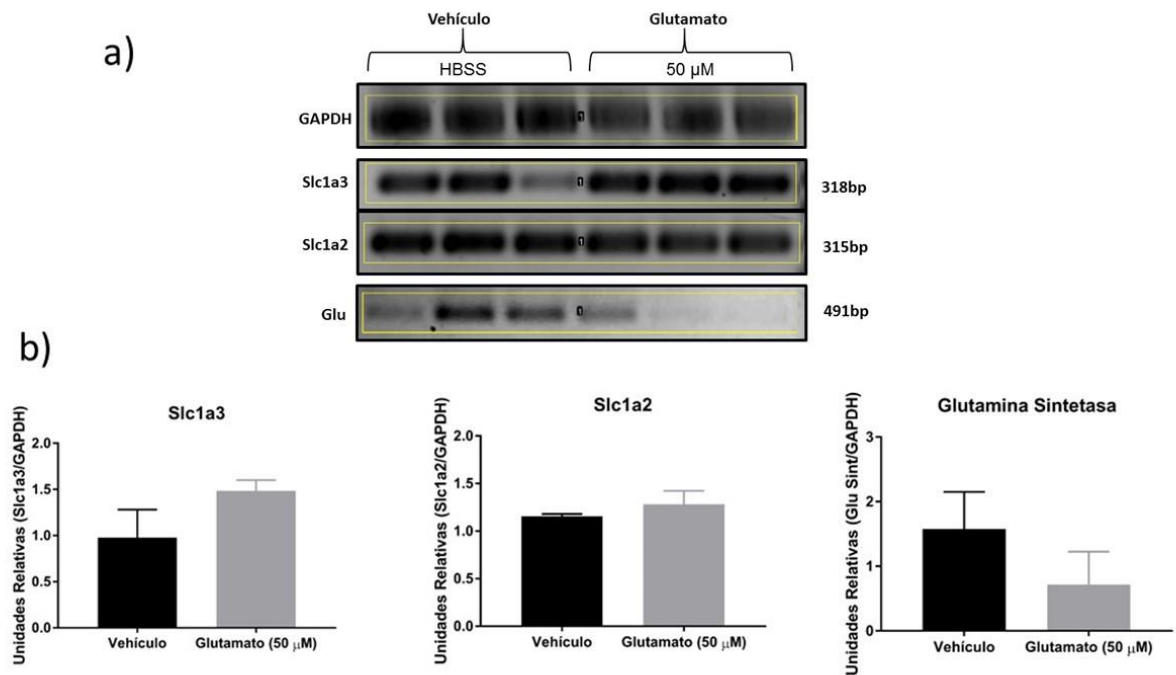


Figura 14. Expresión de los genes GLAST, GLT-1 y GS en astrocitos de rata tratados con glutamato. A) Esquema de comparación de la expresión de los genes de estudio en muestras obtenidas tras el tratamiento con el vehículo y las concentraciones de glutamato. b) Histogramas que permiten evidenciar la tendencia de expresión de los genes a 50 μ M por 0.5 h

El estudio de los resultados evidenció que las diferencias en la expresión de los genes no era estadísticamente significativa. Sin embargo, se encuentra que la expresión de los transportadores GLAST y GLT-1 muestran una tendencia a la alza, mientras que la expresión de la enzima GS tiende a disminuir por el tratamiento del glutamato.

Los transportadores de glutamato en los astrocitos son importantes para mantener la especificidad espacial y temporal de la transmisión sináptica. La eficiencia de esto se basa en poder captar y transportar glutamato del espacio extracelular al intracelular, pero esto depende de varios parámetros, en los que se incluye la elevada concentración de sodio y glutamato dentro del astrocito, los cuales, pueden ralentizar la velocidad de transporte. En astrocitos, el glutamato se mantiene a baja concentración debido a la presencia de enzimas específicas tales como GS (Al Awabdh et al., 2016)

El aumento de la expresión de los transportadores, se puede interpretar como una respuesta protectora que tienen los astrocitos para una mayor captación de glutamato de la hendidura sináptica, y así, disminuir la concentración de glutamato en el espacio extracelular, lo cual, podría causar muerte por excitotoxicidad a través de la activación de los receptores de glutamato (Heather Scott Walton, 2007). Estudios revelan que la movilidad de la superficie GLT-1 y otros transportadores (GlyT1, GAT-1 y GAT-3) de astrocitos, se debe a la actividad neuronal, la cual, modula la actividad del transportador durante la sinapsis glutamatérgica, siendo un proceso clave para el aclaramiento del glutamato (Al Awabdh et al., 2016). Además, se demuestra que la expresión de estos es heterogénea en las diferentes áreas del cerebro, observando variación de la captación de glutamato (Ghirardini et al., 2018).

La inhibición del transporte de glutamato, que a veces se observa en las enfermedades neurodegenerativas, conduce a una muerte neuronal lenta que podría ser prevenida por antagonistas de receptores de glutamato. Por ejemplo, la memantina, un fármaco con propiedades neuroprotectoras, parece potenciar la cognición junto con otros tratamientos contra la EA para proteger el cerebro de los niveles tóxicos de calcio y glutamato, permitiendo una transmisión normal de señales entre las neuronas (A. Tanovic, 2006).

Por otro lado, la disminución en la expresión de la enzima GS puede interpretarse como una respuesta celular a las altas concentraciones de glutamato con la cual se previene la conversión de glutamato a glutamina en los astrocitos. De esta forma se reduce el suministro de este precursor a las neuronas como una respuesta

protectora. Esta inhibición produce una acumulación citosólica de glutamato, esto sugiere que la conversión de glutamato por GS es importante para operación de EAAT (Trabelsi, Amri, Becq, Molinari, & Aniksztejn, 2017).

En la EA, la severidad de la demencia se correlaciona con la disminución de la sinapsis en el hipocampo y la corteza cerebral. Los estudios en roedores han establecido que en el hipocampo la LTP es inhibida por oligómeros solubles de A β (Shuxuan Huang et al., 2018). En experimentos con cultivos de astrocitos de rata se observó que el tratamiento con oligómeros de A β disminuye la expresión de transportadores de glutamato astrocíticos y su actividad, por lo tanto, perjudicando la plasticidad sináptica (Shuxuan Huang et al., 2018). La relación entre la proteína A β y el glutamato se ha estudiado en neuronas, pero se sabe muy poco sobre la interacción entre A β y el glutamato en astrocitos, por ello, cuando se estudiaron los efectos de A β y el glutamato sobre la morfología de los astrocitos, los resultados sugirieron que la estelación de los astrocitos (cambio morfológico) inducida por A β es suprimida por un mecanismo relacionado con un transportador de glutamato aún desconocido (Abe & Saito, 2000).

Aunque la relación precisa entre la excitotoxicidad, los astrocitos, los oligómeros A β y la EA no está clara, la evidencia apunta a que la combinación de estos factores juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Por ello, es necesario investigar la contribución astrogliar en la EA para obtener nuevas estrategias para reducir la sintomatología característica de la enfermedad, desarrollar un tratamiento neuroprotector y conocer las modificaciones a nivel genético, molecular y celular para comprender la mecánica de la EA.

8. Conclusiones

- Se determinó las condiciones de excitotoxicidad óptimas para la realización del experimento sin causar muerte celular, las cuales fueron 50 μ M a 0,5 h.
- Se establecieron las condiciones óptimas de PCR para la hibridación de los primers, las cuales fueron de 61.3°C para los transportadores GLAST y GLT-1 y la enzima la Glutamina Sintetasa.
- Se determinó la expresión de los genes, la cual permitió observar en los histogramas de análisis de los genes de interés una superposición de las barras de tendencia. Las cuales podrían sugerir una tendencia al aumento de la expresión de transportadores GLAST y GLT-1 y una disminución de la expresión de la enzima Glutamina Sintetasa.

9. Recomendaciones

Dado que los resultados del proyecto no arrojaron resultados estadísticamente significativos, se recomienda ampliar el número de experimentos ya que este ensayo solo se realizó una vez con sus correspondientes repeticiones. Si dado el caso, no se logran obtener datos estadísticamente relevantes, se recomienda buscar otro evento biológico, como la evaluación de la expresión de otros genes implicados en el transporte de glutamato como son el EAAC 1, EAAT 4 o EAAT 5, nuevas rutas de muerte y/o estrés celular como la activación de caspasas o el estrés oxidativo (ROS), ya que significaría que este no es lo suficientemente fuerte como para apreciar una diferencia significativa. Además, se aconseja que cuando se esté realizando el ensayo de viabilidad celular por MTT, el vehículo, en nuestro caso HBSS, sea complementado con glucosa o con suero fetal bovino ya que se presenta muerte celular por falta de nutrientes después de una hora. Finalmente, se recomienda utilizar ensayos de viabilidad más sensibles como el WST-1 o LDH.

10. Anexo

Tabla 6. Análisis estadístico de exposición a glutamato a 0,5 h

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tratamiento	0,008534	3	0,002845	F (3, 22) = 2,243	P=0,1117
Residuos	0,0279	22	0,001268		
Total	0,03644	25			

Tabla 7. Test Dunnett para la comparación del vehículo con los tratamientos en las células expuestas a 0,5 h

TEST DE COMPARACIÓN DUNNETT	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant	Summary	Adjusted P Value	C	Columna1
Vehículo vs. Glu 5 mM	-0,015	-0,07001 to 0,04001	No	ns	0,8323	D	Glu 5 mM
Vehículo vs. Glu 50 mM	-0,02032	-0,07662 to 0,03598	No	ns	0,6922	E	Glu 50 mM
Vehículo vs. Glu 500 mM	0,02439	-0,03191 to 0,08069	No	ns	0,5698	F	Glu 500 mM

11. Bibliografía

- Abe, K., & Saito, H. (2000). L-glutamate suppresses amyloid beta-protein-induced stellation of cultured rat cortical astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *74*(1), 280–286. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740280.x>
- ADAR ADAMSKY AND INBAL GOSHEN. (2017). ASTROCYTES IN MEMORY FUNCTION: PIONEERING FINDINGS AND FUTURE DIRECTIONS. *Neuroscience*. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S0306452217303676/1-s2.0-S0306452217303676-main.pdf?_tid=fad8deec-d4b1-11e7-af6f-00000aacb361&acdnat=1511924843_ccc6b12877b12ff85f599c035931ff9b
- Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., & Gage, F. H. (2014). Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiological Reviews*, *94*(4), 991–1026. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2014>
- Al Awabdh, S., Gupta-Agarwal, S., Sheehan, D. F., Muir, J., Norkett, R., Twelvetrees, A. E., ... Kittler, J. T. (2016). Neuronal activity mediated regulation of glutamate transporter GLT-1 surface diffusion in rat astrocytes in dissociated and slice cultures. *Glia*, *64*(7), 1252–1264. <https://doi.org/10.1002/glia.22997>
- Alzheimer's Association. (2017). 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, *13*, 325–373. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S1552526017300511/1-s2.0-S1552526017300511-main.pdf?_tid=1de09494-d1eb-11e7-a9d5-00000aacb362&acdnat=1511619521_597787d66a1500337a10d90c30dd677c
- Alzheimer D. Internacional. (2013). The Global Impact of Dementia 2013 – 2050 Policy Brief for Heads of Government. *Policy Brief for Heads of Government*, 1–8.
- Association, A. (2017). 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, *13*(4), 325–373. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.001>
- Bakota, L., Ussif, A., Jeserich, G., & Brandt, R. (2017). Systemic and network functions of the microtubule-associated protein tau: Implications for tau-based therapies. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.03.003>
- Barrera-Ocampo, A., & Lopera, F. (2016). Amyloid-beta immunotherapy: the hope for Alzheimer disease? *Colombia Medica (Cali, Colombia)*, *47*(4), 203–212. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28293044>
- Bellaver, B., Souza, D. G., Souza, D. O., & Quincozes-Santos, A. (2017). Hippocampal Astrocyte Cultures from Adult and Aged Rats Reproduce Changes in Glial Functionality Observed in the Aging Brain. *Molecular Neurobiology*, *54*(4), 2969–2985. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9880-8>
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2010). Neurofibrillary Tangles. In *Encyclopedia of Movement Disorders* (pp. 265–269). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374105-9.00269-0>
- Christopher H. van Dyck. (2017). Anti-Amyloid-b Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. [https://doi.org/\(http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/](https://doi.org/(http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)
- Cooke, S. F., & Bliss, T. V. P. (2006). Plasticity in the human central nervous system.

- Brain*, 129(7), 1659–1673. <https://doi.org/10.1093/brain/awl082>
- David T. Jones a,b, *, Jonathan Graff-Radford a, Val J. Lowe b, Heather J. Wiste c, Jeffrey L. Gunter b, d, Matthew L. Senjem b, d, ... Ronald C. Petersen a and Clifford R. Jack Jr. (2017). Tau, amyloid, and cascading network failure across the Alzheimer's disease spectrum. *Cortex*, 30, 1–17. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S0010945217303246/1-s2.0-S0010945217303246-main.pdf?_tid=763129f8-d207-11e7-bf46-00000aab0f6c&acdnat=1511631703_ba6237f44694bb0d4cec795e1fd9272b
- Dong, Y. N., Lin, H., Rattelle, A., Panzer, J., & Lynch, D. R. (2018). Excitotoxicity ☆. In *Comprehensive Toxicology* (pp. 70–100). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65836-1>
- Edwin L. Cooper & Melissa J. Ma. (2017). Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7, 380e385. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S2225411016303030/1-s2.0-S2225411016303030-main.pdf?_tid=73263668-d207-11e7-a843-00000aab0f27&acdnat=1511631689_118301e8abac0367a8712805b0a50ee5
- F. Bermejo-Pareja, S. Llamas-Velasco, A. V.-G. (2016). Alzheimer's disease prevention: A way forward. *Revista Clínica Española*, 216, 495---503. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S2254887416300376/1-s2.0-S2254887416300376-main.pdf?_tid=3a8b916c-d38e-11e7-9362-00000aacb35d&acdnat=1511799528_0dfe4f510d1b8dd08e8bca00c482e6c9
- F. Bermejo-Pareja, S. Llamas-Velasco, A. V.-G. (2016). Prevención de la enfermedad de Alzheimer: un camino a seguir. *Revista Clínica Española*, 216(9), 495–503. <https://doi.org/10.1016/J.RCE.2016.05.010>
- Florencia Zappa Villar, M., López Hanotte, J., Pardo, J., Crespo, R., Ramón Morel, G., Soledad Trípodí, L., ... Rodolfo Brenner, D. R. (n.d.). ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL HIPOCAMPO CEREBRAL DE ANIMALES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/63194/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1
- Folch, J., Busquets, O., Ettcheto, M., Sánchez-López, E., Castro-Torres, R. D., Verdaguer, E., ... Camins, A. (2017). Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *Journal of Alzheimer's Disease, Preprint*(Preprint), 1–18. <https://doi.org/10.3233/JAD-170672>
- Galloway, E. G., Torres, I., Sebastián, A., & Fuxá, P. (2003). MUERTE NEURONAL EXCITOTÓXICA: INTERACCIÓN ENTRE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL IGF-I Y EL GLUTAMATO MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID . Retrieved from <http://biblioteca.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26955.pdf>
- Ghirardini, E., Wadle, S. L., Augustin, V., Becker, J., Brill, S., Hammerich, J., ... Stephan, J. (2018). Expression of functional inhibitory neurotransmitter transporters GlyT1, GAT-1, and GAT-3 by astrocytes of inferior colliculus and hippocampus. *Molecular Brain*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0346-y>
- Gold, M., Koczulla, A.-R., Mengel, D., Koepke, J., Dodel, R., Dontcheva, G., ... Bach,

- J.-P. (2015). Reduction of glutamate-induced excitotoxicity in murine primary neurons involving calpain inhibition. *Journal of the Neurological Sciences*, 359(1–2), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.11.016>
- Graham, W. V., Bonito-Oliva, A., & Sakmar, T. P. (2017). Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annual Review of Medicine*, 68(1), 413–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042915-103753>
- Heather Scott Walton, P. R. D. (2007). Glutamate–glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 50, 1052–1066. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S0197018606003299/1-s2.0-S0197018606003299-main.pdf?_tid=6a13d304-d51e-11e7-b36a-00000aab0f6b&acdnat=1511971406_99cc641648b1116b8999e7f915dcbd9e
- Karlawish, J., Jack, C. R., Rocca, W. A., Snyder, H. M., & Carrillo, M. C. (2017). Alzheimer's disease: The next frontier—Special Report 2017. *Alzheimer's and Dementia*, 13(4), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.006>
- Kumar, K., Kumar, A., Keegan, R. M., & Deshmukh, R. (2018). Biomedicine & Pharmacotherapy Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98(December 2017), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.053>
- Laborí Puentes, N. (2016). *Revista de ciencias médicas de Pinar del Río. Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río* (Vol. 20). 1999, Editorial Ciencias Médicas. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942016000600004
- Latarjet, M., & Ruiz Liard, A. (2004). *Anatomía humana*. Edit. Médica Panamericana.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., & Schubert, D. (2002). Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69(2), 581–593. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>
- Lobner, D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: Validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, 96(2), 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(99\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(99)00193-4)
- Marie Jouanne, Sylvain Rault, A.-S. V.-C. (2017). Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 153–167. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S0223523417305925/1-s2.0-S0223523417305925-main.pdf?_tid=8cdaac7e-d392-11e7-8ba3-00000aab0f02&acdnat=1511801384_2738cef8868c7f0dafc017479c2460e7
- Matthew Neal, J. R. R. (2018). Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1864, 432–443. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S0925443917304180/1-s2.0-S0925443917304180-main.pdf?_tid=0eef054a-d4b3-11e7-a64a-00000aacb361&acdnat=1511925297_aa084bc46e9b455b3b6672ccb4b68c0f
- Merle Christine Hoenig, Gérard Nisal Bischof, Jochen Hammes, J. F., & Klaus Fließbach, Thilo van Eimeren, A. D. (2017). Tau pathology and cognitive reserve in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 57, 1–7. Retrieved from <https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S0197458017301598/1-s2.0->

- S0197458017301598-main.pdf?_tid=8f7890e0-d392-11e7-a804-0000aacb35d&acdnat=1511801389_0cce2797adc4da0c7beb67f84567efd0
- Mortimer Mamelak. (2017). Energy and the Alzheimer brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 75, 297–313. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S014976341630690X/1-s2.0-S014976341630690X-main.pdf?_tid=27135596-d1f1-11e7-afdb-0000aacb361&acdnat=1511622121_4e84031dfe557952c1cf9d67abd9d4a
- Mozes, E., Hunya, A., Posa, A., Penke, B., & Datki, Z. (2012). A novel method for the rapid determination of beta-amyloid toxicity on acute hippocampal slices using MTT and LDH assays. *Brain Research Bulletin*, 87(6), 521–525. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.02.005>
- Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V. L., Kato, T., Doecke, J., Doré, V., ... Yanagisawa, K. (2018). High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature25456>
- Nicholls, D. G. (2017). Brain mitochondrial calcium transport: Origins of the set-point concept and its application to physiology and pathology. *Neurochemistry International*, 109, 5–12. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2016.12.018>
- Nicola J.Allen & Cagla Eroglu. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron*, 96(3), 697–708. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.09.056>
- Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*, 32(8). <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016>
- Noemí Rueda Revilla. (2016). *Trabajo fin de Grado: Neurogénesis en el cerebro adulto*. Universidad de Cantabria. Retrieved from <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/8736/ValdeolivasUrbelzE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Omega bio-tek. (2012). *E.Z.N.A.®Total RNA Kit I*. Retrieved from <http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/04/R6834-Total-RNA-Mini-Kit-I-Combo-Online.pdf>
- OMS | Demencia. (2017). WHO. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
- Ota, Y., Zanetti, A. T., & Hallock, R. M. (2013). The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plasticity*, 2013, 185463. <https://doi.org/10.1155/2013/185463>
- Prince, M., Guerchet, M., & Prina, M. (2013). The Global Impact of Dementia 2013 – 2050 Policy Brief for Heads of Government. *Policy Brief for Heads of Government*, 1–8.
- Querfurth, H., & LaFerla, F. (2010). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 56–67. <https://doi.org/citeulike-article-id:6600078> <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- Roche. (2007). Cell Proliferation Reagent WST-1. *Cell Proliferation*, 1(11), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.050>
- Rose, C. F., Verkhratsky, A., & Parpura, V. (2013). Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1518–24. <https://doi.org/10.1042/BST20130237>
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., De Strooper, B., Frisoni, G. B.,

- Salloway, S., & Van Der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *www.thelancet.com*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1)
- Shuxuan Huang, Huichun Tong, Ming Lei, Miaomiao Zhou, Wenyuan Guo, Guihua Li, Xiaolu Tang, Zhe Li, Mingshu Mo, Xiuping Zhang, Xiang Chen, Luan Cen, Lei Weif, Yousheng Xiao, Kaiping Li, Qinghui Huang, Xinling Yang, Weiguo Li, P. X. (2018). Astrocytic glutamatergic transporters are involved in A β -induced synaptic dysfunction. *Brain Research*, 1678, 129–137. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2017.10.011>
- Silvia Rios-Romenets, Hugo Lopez, Liliana Lopez, Liliana Hincapie, Amanda Saldarriaga, Lucia Madrigal, Francisco Piedrahita, Alex Navarro, Juliana Acosta-Urbe, Laura Ramirez, Margarita Giraldo, N. A.-B., & Sebastian Sánchez, Claudia Ramos, Claudia Muñoz, Ana Baena, Diana Alzate, Paula Ospina, Jessica B. Langbaum, William Cho, Pierre N. Tariot, Robert Paul, Eric M. Reiman, F. L. (2017). The Colombian Alzheimer's Prevention Initiative (API) Registry. *Alzheimer's & Dementia*, 13, 602–605. Retrieved from https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S155252601632965X/1-s2.0-S155252601632965X-main.pdf?_tid=21d6250e-d1f1-11e7-bf46-00000aab0f6c&acdnat=1511622104_93b780798b8947bbc00576c93cb42537
- Sonia Luz Rodríguez L, E. A., & Pérez G, Gerardo Reyes, E. A. (2012). *Revista colombiana de química. Revista Colombiana de Química* (Vol. 41). Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042012000200002
- Strien, N. M. Van, Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal – hippocampal network, 10(APRIL), 272–282. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>
- Trabelsi, Y., Amri, M., Becq, H., Molinari, F., & Aniksztejn, L. (2017). 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*, 65(2), 401–415. <https://doi.org/10.1002/glia.23099>
- Ułamek-Kozioł, M., Pluta, R., Januszewski, S., Kocki, J., Bogucka-Kocka, A., & Czuczwar, S. J. (2016). Expression of Alzheimer's disease risk genes in ischemic brain degeneration. *Pharmacological Reports*, 68, 1345–1349. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.09.006>
- Yi, C., Mei, X., Ezan, P., Mato, S., Matias, I., Giaume, C., & Koulakoff, A. (2016). Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death and Differentiation*, 23(10), 1691–701. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.63>