

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN  
DE SNAT2 EN UN MODELO MURINO  
TRANSGÉNICO DE ALZHEIMER, COMO  
POSIBLE MARCADOR DIAGNÓSTICO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN  
MAESTRO EN QUÍMICA CLÍNICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA**

**QFB. GABRIEL ELIUD FLORES GARCÍA**

**DIRIGIDO POR:**

**DRA. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES**

**QUERÉTARO, QRO. A OCTUBRE DE 2023**



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



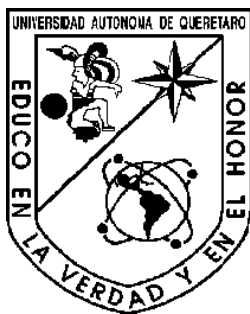
Evaluación de los niveles de expresión de SNAT2 en un  
modelo murino transgénico de Alzheimer como  
posible marcador diagnóstico

**por**

Gabriel Eliud Flores García

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** FQMAC-309165



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRÍA EN QUÍMICA CLÍNICA DIAGNÓSTICA**

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE SNAT2 EN UN  
MODELO MURINO TRANSGÉNICO DE ALZHEIMER COMO  
POSIBLE MARCADOR DIAGNÓSTICO”  
TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN QUÍMICA CLÍNICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA**

**QFB GABRIEL ELIUD FLORES GARCÍA**

**DIRIGIDO POR:**

**DRA. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES**

DRA. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES  
PRESIDENTE

\_\_\_\_\_  
FIRMA

DR. SIDDHARTA MONDRAGÓN RODRÍGUEZ  
SECRETARIO

\_\_\_\_\_  
FIRMA

DRA. KARLA ISABEL LIRA DE LEÓN  
VOCAL

\_\_\_\_\_  
FIRMA

DRA. BERTHA ISABEL CARVAJAL GAMEZ  
SUPLENTE

\_\_\_\_\_  
FIRMA

M. EN C. ADRIANA GONZÁLEZ GALLARDO  
SUPLENTE

\_\_\_\_\_  
FIRMA

CENTRO UNIVERSITARIO, QUERÉTARO, QRO.  
OCTUBRE 2023  
MÉXICO

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgarme la beca CVU 1143734.

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), principalmente a la Facultad de Química y a la Maestría en Química Clínica Diagnóstica por su labor docente y apoyo en mi formación académica. A la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, sobre todo a la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada por brindarme la infraestructura necesaria para mi capacitación e investigación.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM, esencialmente a la Unidad de Proteogenómica y a la M.C. Adriana González Gallardo por su invaluable apoyo en la realización de este trabajo. Al Laboratorio de Neuromorfometría y Desarrollo de la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda por facilitarme el acceso a los modelos animales. Al MVZ José Martín García Servín por la capacitación brindada.

## **DEDICATORIA**

Agradezco a mi familia, mis padres, Eliazar Flores y Gabriela García, por el amor y apoyo incondicional que me han brindado, siempre han sido mi fuente de inspiración. A Martín Flores, por su respaldo y compañía, manifestando su cariño de hermano de una manera única.

A Delia Cuevas, por ser mi acompañante día a día, siendo motivación y sustento para superarme siempre. Gracias por concederme ser parte de tu vida.

A mis compañeros de maestría, Josué, Daniela, Francisco y Laura, con los que compartí tantos buenos momentos y contribuyeron a mi crecimiento académico y personal.

A mis colegas tesisistas que se volvieron grandes amigas, a Fernanda y América, que hicieron más ameno y divertido este proceso.

A mi amigo de vida, Alan, tu lealtad y ayuda inquebrantable me hicieron sentir que nunca estaba solo.

A mi comité sinodal, al Dr. Siddhartha por el asesoramiento experto que fue crucial para mejorar mi trabajo. A la Dra. Karla por su capacidad de encontrar siempre una oportunidad de enriquecer y aumentar mis conocimientos sobre el tema. A la Dra. Bertha por sus críticas constructivas que incrementaron la calidad de mi investigación. A la M.C. Adriana por toda las dudas resueltas y consejos que perfeccionaron mi habilidad en el laboratorio. De forma especial, agradezco a la Dra. Angelina quien dirigió este trabajo, por su dedicación, paciencia y constante asesoría brindada durante todo este proceso académico.

Finalmente, quiero agradecerme por haber creído en mis capacidades y perseverar en este arduo trabajo. Agradezco a la persona que no se tomó días libres, que nunca abandonó, que siempre se esforzó por dar más de lo que recibe y por hacer más bien que mal. Agradezco esa parte de mí que en todo instante ha mantenido mi autenticidad.

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES .....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
1.1. Enfermedad de Alzheimer.....	4
1.2. Péptido Beta Amiloide.....	6
1.3. Proteína Tau .....	10
1.4. Transportadores de aminoácidos.....	13
1.5. Superfamilia SLC .....	14
1.6. Transportadores SLC38A .....	14
1.7. SNAT2 .....	16
1.8. Ciclo Glutamato-Glutamina.....	19
1.9. Trastornos del CGG.....	21
1.10. Ratones 3xTg-AD .....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1. General .....	25
2.2. Particulares .....	25



4.1.	Genotipificación .....	40
4.2.	Evaluación de la concentración, pureza e integridad del ARN total .....	41
4.3.	Estandarización de la amplificación de SNAT2 y 18S por PCR punto final .....	43
4.4.	Estandarización de amplificación por qPCR para 18S y SNAT2 .....	44
4.5.	Secuenciación de amplicones.....	46
4.6.	Elaboración y validación de curvas estándar 18S y SNAT2 ..	46
4.7.	Cuantificación de los niveles de expresión de 18S y SNAT2 en hipocampos murinos por qPCR .....	48
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>62</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Transportadores SNAT (SLC38A).....	15
Tabla 2. Unidades de medida, definición y grupos a evaluar.....	27
Tabla 3. Mezcla de reacción para amplificar los transgenes APP y Tau.....	31
Tabla 4. Programa de amplificación de los transgenes APP y Tau.....	31
Tabla 5. Mezcla de reacción para el tratamiento con ADNasa.....	33
Tabla 6. Mezcla de reacción y condiciones de síntesis para ADNc.....	33
Tabla 7. Secuencias de cebadores para amplificar 18S y SNAT2.....	34
Tabla 8. Programa de amplificación para la PCR punto final.....	35
Tabla 9. Mezcla de reacción PCR punto final .....	35
Tabla 10. Mezcla de reacción para amplificación de 18S y SNAT2 por qPCR.....	36
Tabla 11. Programa de amplificación de 18S y SNAT2 por qPCR.....	36
Tabla 12. Datos obtenidos del análisis cuantitativo de SNAT2 del ADNc de hipocampo.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías metabólicas de la PPA.....	7
Figura 2. Isoformas de la proteína Tau.....	10
Figura 3. Posibles sitios de fosforilación de Tau.....	11
Figura 4. Estructura topológica del transportador SNAT2.....	16
Figura 5. Esquematzación del Ciclo Glutamato-Glutamina.....	19
Figura 6. Amplificación de los transgenes <i>APP<sub>Swe</sub></i> y <i>Tau<sub>P301L</sub></i> en ratones 3xTg-AD.....	41
Figura 7. Evaluación de integridad del ARN total.....	43
Figura 8. Estandarización de la amplificación con los cebadores para 18S y SNAT2.....	44
Figura 9. Cinética de reacción de amplificación para SNAT2 y 18S por qPCR.....	45
Figura 10. Comparación de la secuencia del producto amplificado de 18S y SNAT2 con las bases de datos NCBI.....	46
Figura 11. Curvas estándar para SNAT2 y 18S en qPCR.....	47
Figura 12. Cinética de amplificación y curva de disociación de los amplicones 18S y SNAT2.....	49
Figura 13. Niveles de expresión génica de SNAT2.....	51
Figura 14. Análisis de expresión génica de SNAT2 en un curso temporal...52	
Figura 15. Cambios metabólicos en el CGG.....	58

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ARN	Ácido ribonucleico
$\beta$ A	Beta Amiloide
CGG	Ciclo glutamato-glutamina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatorios
EOAD	Enfermedad de Alzheimer de aparición temprana
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GS	Glutamina sintetasa
Gln	Glutamina
GLT	Transportador de glutamato
Glu	Glutamato
LOAD	Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío
NMDA	N-metil D-aspartato
PPA	Proteína precursora amiloide
PS1	Presenilina 1
PS2	Preselinina 2
pTau	Tau hiperfosforilada
SNAT	Transportador de aminoácidos neutros acoplados a sodio
vGLUT	Transportador vesicular de glutamato

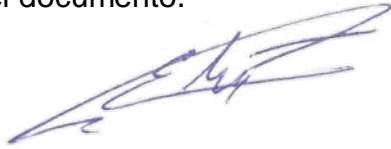
## RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer es una patología con alta prevalencia a nivel mundial. Causa una sintomatología progresiva asociada a la disfunción neural y consecuentemente neurodegeneración. Actualmente, su diagnóstico está basado en pruebas que evalúan el deterioro cognitivo, apoyado con estudios de imagen. Algunas terapias y tratamientos han sido eficientes al ralentizar la evolución del Alzheimer, principalmente al emplearse con pacientes en etapa inicial, previo a un daño cerebral avanzado. Por lo tanto, un diagnóstico temprano aumenta la posibilidad de mejorar su calidad de vida. Es por ello, que la búsqueda de biomarcadores específicos para la Enfermedad de Alzheimer en etapa media o inicial son prioridad en la investigación biomédica. Una aproximación, es la búsqueda de herramientas diagnósticas que reflejen alteraciones en el metabolismo de los neurotransmisores y su impacto en la disfunción sináptica. Principalmente las asociadas a enzimas y transportares de aminoácidos esenciales para el reciclaje y producción de neurotransmisores. Recientemente se ha reportado en pacientes en etapa tardía un aumento en la expresión de ARNm del transportador SNAT2. Este transportador es fundamental en el tráfico de aminoácidos precursores de glutamato, entre el espacio extracelular y la neurona presináptica. Desajustes en sus niveles de expresión o funcionalidad repercute en la concentración de glutamina neuronal, afectando el metabolismo celular y la síntesis de glutamato, alterando la sinapsis química provocando finalmente la muerte neuronal. Actualmente no se cuentan con suficientes datos sobre la expresión de SNAT2 en estadios incipientes de Alzheimer. No obstante, los cambios en sus patrones de expresión podrían correlacionarse con la evolución de la enfermedad. Por tal motivo, en este proyecto se planteó realizar la cuantificación del ARNm de SNAT2 en el ratón 3xTg-AD que desarrolla el fenotipo de Alzheimer. Se diseccionó el hipocampo del modelo murino y mediante RT-qPCR se realizó el análisis de la expresión génica de SNAT2 en tres edades distintas. Al 1.<sup>er</sup> mes donde no hay fenotipo patológico, al 3.<sup>er</sup> mes cuando inician las alteraciones histopatológicas y al 6.<sup>to</sup> mes cuando desarrollan cambios conductuales. Los resultados no revelaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de SNAT2, al comparar el modelo de Alzheimer 3xTg-AD y los ratones control de misma edad.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, SNAT2, biomarcador, ARNm

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and strokes, positioned below the declaration text.

## SUMMARY

Alzheimer's Disease is a pathology with high prevalence worldwide. It causes progressive symptoms associated with neural dysfunction and consequently neurodegeneration. Currently, its diagnosis is based on tests that evaluate cognitive impairment, supported by imaging studies. Some therapies and treatments have been efficient in slowing down the progression of Alzheimer's, mainly when used with patients in the initial stage, prior to advanced brain damage. Therefore, an early diagnosis increases the possibility of improving your quality of life. This is why the search for specific biomarkers for early or mid-stage Alzheimer's disease is a priority in biomedical research. One approach is the search for diagnostic tools that reflect alterations in the metabolism of neurotransmitters and their impact on synaptic dysfunction. Mainly those associated with enzymes and transporters of essential amino acids for the recycling and production of neurotransmitters. Recently, an increase in the mRNA expression of the SNAT2 transporter has been reported in late-stage patients. This transporter is essential in the trafficking of glutamate precursor amino acids between the extracellular space and the presynaptic neuron. Imbalances in their levels of expression or functionality impact the concentration of neuronal glutamine, affecting cellular metabolism and glutamate synthesis, altering the chemical synapse, ultimately causing neuronal death. Currently, there are not enough data on the expression of SNAT2 in early stages of Alzheimer's. However, changes in their expression patterns could be correlated with the evolution of the disease. For this reason, in this project we proposed to quantify the SNAT2 mRNA in the 3xTg-AD mouse that develops the Alzheimer's phenotype. The hippocampus of the murine model was dissected and the analysis of SNAT2 gene expression at three different ages was performed using RT-qPCR. At the 1st month where there is no pathological phenotype, at the 3rd month when histopathological alterations begin and at the 6th month when behavioral changes develop. The results did not reveal statistically significant changes in the expression of SNAT2, when comparing the 3xTg-AD Alzheimer model and control mice of the same age.

Keywords: Alzheimer's disease, SNAT2, biomarker, mRNA

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. Enfermedad de Alzheimer**

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una afección cerebral crónica que conlleva un deterioro cognitivo irreversible. Este deterioro se manifiesta a través de problemas en la memoria, la comprensión, el lenguaje y el juicio (Dening & Sandilyan, 2015; Weller & Budson, 2018). Forma parte de las múltiples enfermedades que provocan el síndrome de demencia, destacando sobre las demás por abarcar hasta el 70% de todos los casos de este síndrome, afectando principalmente a personas de la tercera edad (Morris, 1996; OMS, 2012).

Dado el estrecho vínculo de la patología con la edad, los modelos epidemiológicos predicen un aumento significativo de la frecuencia de la EA basados en el incremento en la expectativa de vida de la población mundial, triplicando el número de casos para el año 2050 (Mendiola-Precoma et al., 2016; United Nations et al., 2019). Esto generará un elevado costo de atención hospitalaria, llegando hasta los 1.1 trillones de dólares solamente para los Estados Unidos de América (Gaugler et al., 2021; Morris, 1996).

La EA fue descrita por primera vez en 1906 por Alois Alzheimer, describiendo en su diario, un conjunto de anormalidades histológicas cerebrales por microscopia e integrándolas con manifestaciones conductuales, mismo que aún sigue siendo trascendental en nuestros días, por su utilidad como referente diagnóstico, debido a la exiguas diferencias clínicas y sintomatológicas determinantes para la caracterización de la EA hasta nuestro días (Bondi et al., 2017; Contreras-Pulache, 2014). Debido a que la sintomatología de la EA se va desarrollando gradualmente, esta se ha catalogado en 3 etapas (Jack et al., 2018; Lanfranco G et al., 2012):

- a) Etapa inicial. El paciente presenta pérdida de orientación temporal y dificultad de retener nueva información, además se manifiesta una disminución de la memoria episódica. Existe deterioro neural en hipocampo inicialmente.
- b) Etapa media. El individuo exhibe alteraciones en el diálogo y la comprensión del lenguaje, los daños cerebrales se extienden a zonas corticales laterales.

- c) Etapa tardía. La facultad del habla está gravemente disminuida. A partir de este periodo la capacidad de leer y escribir se ve perjudicada y las actividades como el vestirse, comer o ir al baño presentan complicaciones de forma progresivas. La neurodegeneración implica prácticamente todo el cerebro.

Otra clasificación de la EA se basó en su etiología, dividiéndose en 2 tipos (Allegri et al., 2011). La primera es nombrada como Enfermedad de Alzheimer de aparición temprana o familiar (EOAD, por sus siglas en ingles), corresponde al 5% o menos de los casos totales. Su origen es hereditario y los pacientes presentan mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* ubicados en los cromosomas 21, 14 y 1 respectivamente (Mendiola-Precoma et al., 2016).

El segundo tipo es conocido como Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío o esporádico (LOAD, por sus siglas en ingles), corresponde a más del 95% de los casos. Su origen se ha atribuido a distintos factores de riesgo como los traumatismos craneoencefálicos, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y alteraciones genéticas somáticas espontáneas de algunas apolipoproteínas que impactan disminuyendo la función cognitiva (Armstrong, 2019; Terrado-Quevedo et al., 2018). En LOAD, el principal factor de riesgo que se ha descrito asociado al desarrollo de este tipo de EA, es la edad del paciente (Goldman & Van Deerlin, 2018; Mayeux & Stern, 2012; Rentería et al., 2020).

Sin importar el tipo de EA que presente el individuo, ya sea EOAD o LOAD, los pacientes exhiben las mismas alteraciones neurológicas, como neuritis distróficas, hilos de neuropilo y activación microglial. Aunadas al conjunto de características histopatológicas típicas para EA, como la formación de placa senil extracelular desarrollada por el péptido  $\beta A$  y la incidencia de ovillos neurofibrilares conformados por la proteína pTau (Karlavish et al., 2017; Lane et al., 2018).

Estas afecciones histológicas no son únicas para la EA, no obstante, son usadas como criterios fundamentales para poder dar el diagnóstico definitivo a pacientes, realizando una biopsia cerebral. Aunque es un procedimiento escasamente utilizado debido al riesgo que conlleva y al modesto beneficio que puede otorgar al individuo



(Eratne et al., 2018). Por lo tanto, el diagnóstico se realiza a través del historial clínico familiar y con estudios de imagen, como la tomografía por emisión de positrones o la resonancia magnética nuclear, mismos que permiten observar alteraciones en la masa cerebral (Frota et al., 2011). Los médicos, además utilizan pruebas tipo test, que evalúan el deterioro cognitivo como la memoria y razonamiento. Entre los más utilizados encontramos el mini examen del estado mental o el manual de diagnóstico y estadístico de trastornos mentales (López et al., 2018; Monczor, 2005). Sin embargo, estas pruebas carecen de precisión para poder diferenciar entre la EA y otras enfermedades neurodegenerativas.

Otra desventaja de los métodos de evaluación conductuales y de memoria es que, al estar basados en la sintomatología, el paciente ya cursa con neurodegeneración asociada a una etapa media o tardía de la EA, teniendo signos de detrimento físico o mental, disminuyendo la efectividad del tratamiento que busca ralentizar la evolución de los síntomas (McKhann et al., 2011; Scheltens et al., 2021). Por lo que una limitante que afronta la medicina moderna, es la falta de pruebas de laboratorio o de gabinete que ayuden a dar un dictamen de la enfermedad previo al daño cerebral (Atri, 2019).

Los avances en la tecnología y la investigación han tratado de mitigar estas problemáticas. Una aproximación es el descubrimiento de biomarcadores (Allinson, 2018). Se han identificado más de 50 genes o *loci* involucrados con la EA, entre los más estudiados encontramos al *BIN1*, *CLU*, *ABCA7*, *CR1* y el alelo *E4* del gen *ApoE* (Lashley et al., 2018). La presencia de estas variantes genéticas aumenta el riesgo de desarrollar EA o puede influir en la edad en la que se manifiesta los síntomas de la patología (Bagnoli et al., 2014; Robinson et al., 2017).

Otros marcadores no genéticos utilizados para el diagnóstico de la EA son el péptido Beta-Amiloide ( $\beta$ A) de 40 y 42 aa junto con la relación de la proteína Tau total y pTau en el residuo de treonina 181. Todos estos marcadores cuantificados a partir de líquido cefalorraquídeo (Mendez et al., 2019).

## 1.2. Péptido Beta Amiloide

El péptido beta amiloide, se origina a partir de la proteína precursora amiloide (PPA), misma que es sintetizada partiendo de la expresión del gen *APP*, ubicado en el cromosoma 21 en el brazo largo región 21.3 (21q21.3), este gen contiene 18 exones (Guo et al., 2021). Debido al corte y empalme que sufre el ARNm que codifica para la PPA, se conocen hasta 11 isoformas proteicas diferentes. Su longitud varía desde los 305 hasta los 770 aa. Entre las isoformas más estudiadas encontramos las de 751 y 770 aa, que se expresan en las células gliales y la isoforma PPA 695 que predomina en las neuronas (Wilkins & Swerdlow, 2017).

A pesar de que se ha estudiado por muchos años el rol fisiológico que puede tener la PPA, aún carecemos de información precisa que describa su función. Actualmente se conoce que una alteración en su expresión durante la sinaptogénesis posnatal perjudica la plasticidad sináptica y basal (Corbett & Hooper, 2018; Shen et al., 2018).

La proteína PPA se sintetiza en el retículo endoplásmico, posteriormente sufre un proceso de glicosilación en el aparato de Golgi, para finalmente translocarse a la membrana citoplasmática, expresando un dominio N-terminal extracelular, una región transmembranal y un dominio C-terminal intracelular. PPA requiere un procesamiento de incisión para su reciclaje y este es dependiente de la vía metabólica que se active, pudiendo efectuar un metabolismo amiloidogénico (patológico) o no amiloidogénico (fisiológico) (Sureda, 2014). En un metabolismo no amiloidogénico representado en la sección derecha de la Figura 1, se genera un corte en la PPA muy pegado a la membrana realizado por la  $\alpha$ -secretasa, que escinde un fragmento extracelular soluble conocido como sAPP $\alpha$ . Posteriormente la  $\gamma$ -secretasa corta en la región transmembranal residual de la PPA generando un péptido conocido como p3 y dejando un dominio intracelular unido a membrana, denominado C83. Las tres fracciones producidas de la proteína son de fácil metabolismo y eliminación (Lanau et al., 2005; Sureda, 2014).

El proceso amiloidogénico que se representa en la sección izquierda de la Figura 1, la  $\beta$ -secretasa realiza el corte en la PPA, liberando un fragmento amino-terminal más corto, conocido como sAPP $\beta$  soluble. El segmento residual es escindido por la  $\gamma$ -secretasa, generando un fragmento en la membrana conocido como C99, además

de un péptido anómalo de difícil eliminación nombrado  $\beta$ A. La longitud de este péptido varía de entre 39 a 43 aa. Debido a su baja solubilidad y alta capacidad de agregación, este fragmento, es el responsable de la formación de las placas seniles características en la EA (Serrano, 2016; Sureda, 2014; R. Zhou et al., 2020).

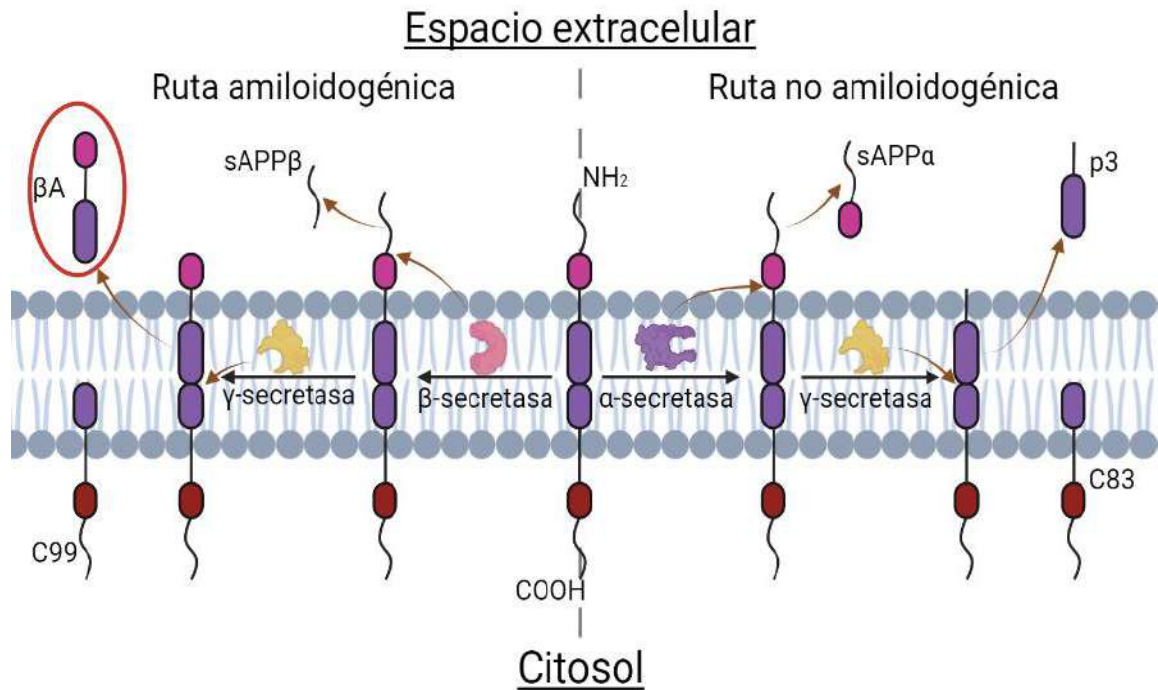


Figura 1. Vías metabólicas de la PPA. Representación de las dos rutas de metabolización de PPA. Vía no amiloidogénica (fisiológica), en donde todos los fragmentos generados son eliminados. Y la vía amiloidogénica (patológica), que produce el péptido  $\beta$ A, responsable de la formación de la placa senil. No se representan las distintas longitudes que puede tener el péptido  $\beta$ A (39 - 43 aa).

La  $\beta$ -secretasa es una enzima proteolítica cuya actividad esta mediada por 2 residuos de ácido aspártico en su sitio activo (Koelsch, 2017). Las diferencias en la longitud de los péptidos  $\beta$ A originados en la vía amiloidogénica se da gracias a los cortes intramembranales generados por la  $\gamma$ -secretasa, conformada por las proteínas nicastrina, presenilina 1 (PS1) y presenilina 2 (PS2) (Estrada Rodríguez & Zomosa Signoret, 2017). La PS1 y PS2 proporcionan el sitio catalítico a la enzima, escindiendo la PPA de forma más común en el residuo de valina ubicada en la

posición 40 o de alanina en la 42, generando las conformaciones peptídicas  $\beta$ A40 y  $\beta$ A42 respectivamente (Kirkitadze & Kowalska, 2005).

Los fragmentos del péptido  $\beta$ A, la  $\beta$ A40 y  $\beta$ A42 prevalecen en la formación de las placas seniles, siendo el de 42 aa el de mayor capacidad de agregación debido a la isoleucina y valina extra que presenta, concediéndole más hidrofobicidad y capacidad de oligomerización (Sureda, 2014). Si bien el péptido  $\beta$ A43 se considera el más perjudicial por contener una región hidrófoba mayor en la zona central, ya que se relaciona con un aumento de la insolubilidad. Proporcionalmente, la cantidad producida de este péptido, es mucho menor que los  $\beta$ A40 y  $\beta$ A42 (Arbor et al., 2016; Carvajal, 2016). Aunque aún no se comprende el rol exacto que pueden tener los péptidos  $\beta$ A, en individuos sanos, su eliminación se realiza antes de generar los conglomerados extracelulares. Por lo que el balance entre la producción y eliminación es fundamental (Behl et al., 2020).

Si bien es cierto que los agregados  $\beta$ A por si solos no generan toxicidad en el cerebro, se ha reportado que los oligómeros formados de estos péptidos, presentan cierta afinidad de interacción con distintos receptores ubicados en la membrana neuronal, como al N-metil-D-aspartato (NMDA), comprometiendo la neuroplasticidad (R. Zhou et al., 2020). Asimismo, se ha observado una correlación entre el aumento del péptido  $\beta$ A con una disminución de la concentración proteica de los transportadores de glutamato vesiculares (vGLUT), induciendo una desregulación de los niveles de Glu, alterando la sinapsis (J. Zhou et al., 2021). Aunado a esto, la hipótesis de la cascada amiloide sugiere que los altos niveles del péptido  $\beta$ A resultan en la formación de placas seniles, sobreactivación microglial y de quinasas que causan fosforilaciones excesivas en Tau. Lo que lleva a la acumulación progresiva intracelular de Tau formando ovillos neurofibrilares, provocando la muerte neuronal y pérdida de materia gris en el hipocampo. Como resultado, se produce una disminución del metabolismo de glucosa, déficit de memoria y finalmente demencia. (Barage & Sonawane, 2015; Panza et al., 2019).

### 1.3. Proteína Tau

La proteína Tau fue descubierta por Weingarten y colaboradores en 1975, se clasifica dentro de la familia de las proteínas asociadas a microtúbulo (Pîrșcoveanu et al., 2017). Su actividad está involucrada con la estabilidad de los microtúbulos dentro de las células eucariotas, incluyendo las neuronas. El microtúbulo, es una estructura intracelular, perteneciente a la red de polímeros que componen el citoesqueleto, está compuesto por heterodímeros de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ . Tiene capacidad para ensamblarse y desensamblarse en respuesta a cascadas de señalización, permitiendo la reorganización del citoesqueleto de acuerdo a los requerimientos estructurales de la célula. Por lo que Tau en conjunto con las proteínas Map2 y Map4 entre otras, interactúan con la estructura microtubular, generando estabilidad y permitiendo su función estructural y en el tráfico vesicular (Goodson & Jonasson, 2018). El microtúbulo es esencial en procesos celulares como: la mitosis, el transporte axónico y la conducción de señales intracelulares, así como el crecimiento axonal y dendrítico (Bodakuntla et al., 2019; Venkatramani & Panda, 2019).

El gen *MAPT* expresa a la proteína Tau, está ubicado en el cromosoma 17q21 (Caillet-Boudin et al., 2015). El transcrito primario de ARNm contiene 16 exones. El exón -1 funciona como promotor, los exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 y 13, que son expresados de forma continua, los exones 4A, 6 y 8 no son expresados en el cerebro humano, mientras que el corte y empalme de los exones 2, 3 y 10 dan lugar a las 6 isoformas diferentes conocidas de Tau (Gao et al., 2018; Wegmann et al., 2021). Las secuencias de estas 6 isoformas contienen de 352 hasta 441 aa, originadas por: la expresión contigua del exón 2 y 3, la eliminación del exón 3 o de ambos exones por el corte y empalme. Mientras que, el exón 10, encargado de codificar uno de los 4 dominios de unión a microtúbulo, conocidos como R1-R4, puede eliminarse por corte y empalme o expresarse generando específicamente el dominio R2 de 31 aa (Andorfer et al., 2003).

En la Figura 2 se esquematizan las isoformas de Tau y los cuatro dominios proteicos generales de dicha proteína. La región N-terminal es representada en negro, la región C-terminal mostrada en rojo al final de Tau, una región rica en prolina de gran longitud ubicada en la parte central representada en verde y los 4 dominios de unión a microtúbulo R1, R2, R3 y R4 exhibidos en color rosa (Martin et al., 2013). Además, se simbolizan las regiones codificadas por el exón 2 y 3 en color azul y amarillo respectivamente. El dominio R2 codificado por el exón 10 es circulado en amarillo.

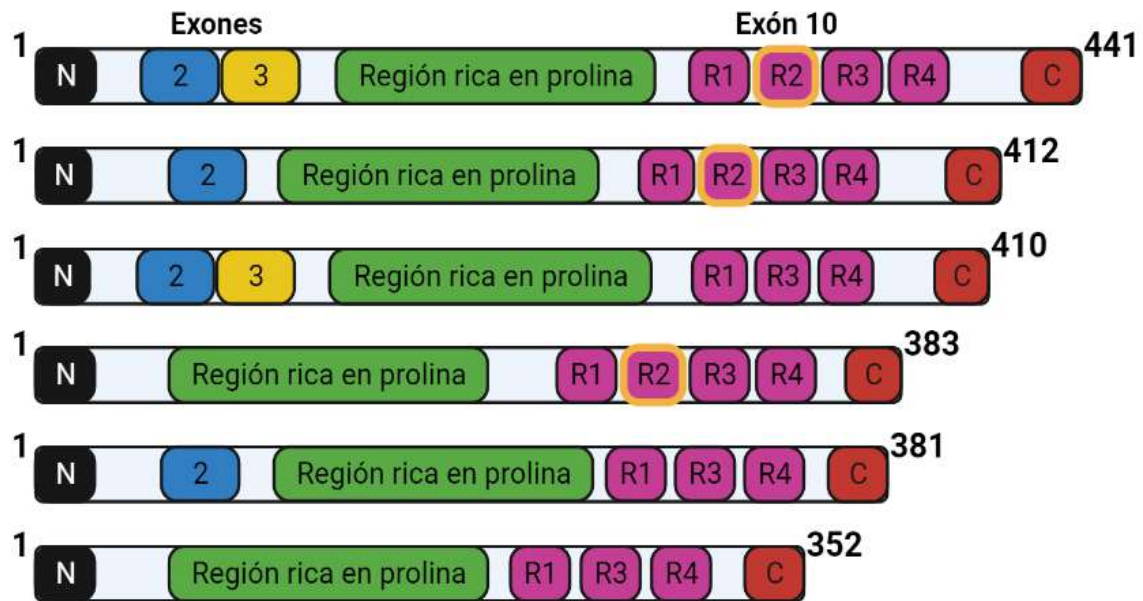


Figura 2. Isoformas de la proteína Tau. Representación de las posibles isoformas de Tau. La de mayor longitud y menor longitud ocupan 441 aa y 352 aa respectivamente. Las isoformas se dan por la expresión conjunta del exón 2, 3 y 10, o la eliminación por corte y empalme de uno, dos o todos los exones.

La funcionalidad de Tau es dependiente de la fosforilación y desfosforilación por quinasas y fosfatasas. Esto modera sus cambios conformacionales haciéndola susceptible de unión al microtúbulo, estabilizando la polimerización de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$  otorgando en consecuencia, la funcionalidad y estabilidad del microtúbulo. Un desequilibrio en su regulación postraducciona puede provocar que la proteína Tau sufra fosforilaciones excesivas en su estructura, cambiando su configuración tridimensional, ocasionando pérdida de su función y separación del microtúbulo, propiciándole a este, inestabilidad seguida de su despolimerización. A Tau

hiperfosforilada se le conoce como pTau, capaz de conglomerarse en el citosol formando depósitos proteicos intraneuronales y posteriormente los ovillos neurofibrilares que causan neurodegeneración en la EA (Crowe et al., 2020; Mandelkow & Mandelkow, 2012; Rösler et al., 2019).

Hasta el momento, se han reportado 85 sitios de fosforilación en Tau que pueden desembocar en la formación de pTau. Entre estos, 45 residuos corresponden a serina, 35 a treonina y 5 a tirosina, mismos que se representan en la Figura 3 (Arastoo et al., 2020). Interessantemente, los sitios Thr231, Ser235 y Ser262 fosforilados y circulados en rojo en la Figura 3, son los más estudiados, ya que se ha reportado una disminución de la afinidad de unión de Tau al microtúbulo en un 26, 9 y 33 % respectivamente. Además, se ha descrito que la fosforilación simultanea de los residuos Ser202/Thr205 y/o Thr231/Ser235 limitan la unión de Tau a tubulina, por lo que su determinación es usada como biomarcadores en el diagnóstico de la EA (Rani et al., 2020; Wang & Mandelkow, 2016).

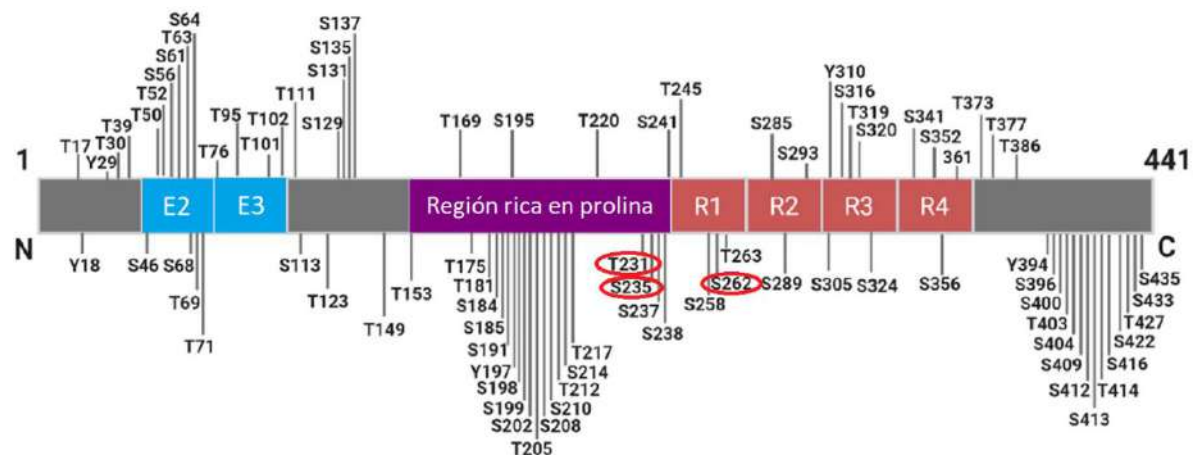


Figura 3. Posibles sitios de fosforilación de Tau. Se esquematiza la proteína Tau con sus dominios proteicos y los 85 residuos de aa susceptibles de fosforilación descritos hasta el momento. Los sitios circulados en rojo (Thr231, Ser235 y Ser262) han sido asociados a una disminución de la afinidad de Tau con el microtúbulo. Imagen modificada de Arastoo et al., 2020.

La desestabilización de los microtúbulos causada por la hiperfosforilación en Tau, propicia la disminución de las rutas de transito intracelular, para el desplazamiento

de vesículas citoplasmáticas, promoviendo un decremento en la translocación de transportadores de aa hacia la membrana citoplasmática de la neurona. Lo que predispone a una alteración de las concentraciones de los neurotransmisores y sus precursores, tanto dentro como fuera de la célula (Parato & Bartolini, 2021). Asociando los cambios en la concentración de aminoácidos reportados extracelularmente en etapas iniciales de la EA, en particular el aumento de Glu, en el microambiente sináptico (Gudimchuk & McIntosh, 2021; Siano et al., 2019).

#### 1.4. Transportadores de aminoácidos

Los aa son esenciales para mantener la homeostasis y supervivencia celular. Participan en la producción de energía, la síntesis de proteínas, además de regular el volumen, crecimiento y metabolismo celular. No obstante, es necesario que los aa sean desplazados dentro de la célula para poder ejercer estas funciones. Esta movilización se da gracias a los transportadores de aa (Escuer, 2004).

Los transportadores de aa se definen como proteínas integrales de membrana ancladas a la bicapa lipídica, responsables del tráfico de aa hacia dentro o fuera de la célula o entre el citosol y organelos (Javed & Fairweather, 2019). Estos pueden localizarse en la membrana plasmática, el aparato de Golgi, en las vesículas y la mitocondria. La capacidad para movilizar aa le permiten a los transportadores regular distintas funciones celulares, desde el equilibrio ácido-base, las reacciones anabólicas y catabólicas, el metabolismo energético y el reciclaje de neurotransmisores (Kandasamy et al., 2018).

Existe una gran diversidad de transportadores de aa repartidos en todo el organismo. Inicialmente se clasificaron con base a la cinética de transporte que presentaban, separándose en uniporte, simporte y antiporte. Actualmente la clasificación más utilizada está basada en las similitudes entre las secuencias genéticas que los codifican, agrupando a estas proteínas en grandes superfamilias (Choudhuri & Chanderbhan, 2016). En el humano las 2 superfamilias más estudiadas debido a la participación que tienen en diversos procesos metabólicos son: los transportadores "ABC", definidos como proteínas de transporte dependientes de la hidrólisis de ATP



y los transportadores "SLC", categorizados como proteínas de transporte facilitado y transportadores activos secundarios acoplados a iones (Cholkar et al., 2013).

### 1.5. Superfamilia SLC

La superfamilia de transportadores de solutos conocidos por sus siglas en inglés como SLC, engloban hasta 458 miembros, organizados en 65 subfamilias distintas, lo que los posiciona como la segunda superfamilia más grande de proteínas transportadoras ubicados en membrana (Pizzagalli et al., 2021).

Los miembros SLC usan diversos mecanismos para mediar el movimiento de compuestos a través de la membrana. Pueden emplear un transporte activo secundario, actuar como canales iónicos, formar heterodímeros capaces de transportar solutos o usar el transporte facilitado aprovechando el gradiente electroquímico de iones y sustratos (Colas et al., 2016). Los transportadores SLC son capaces de acarrear una gran diversidad de elementos esenciales para las neuronas, como iones inorgánicos, aa, azúcares, ácidos grasos y neurotransmisores. Se expresa una extensa cantidad y tipología de transportadores en la célula, su localización también es muy variable, aunque predominan sobre todo en la membrana plasmática (Fredriksson et al., 2008).

Otra clasificación de la superfamilia SLC es con base a su filogenia, separando a los transportadores en 4 grupos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Dentro del grupo  $\beta$  encontramos a las subfamilias SLC36A, SLC32A y SLC38A (Fredriksson et al., 2008). Diverso grupos de investigación, han centrado su estudio a la familia SLC38A, debido a que son proteínas altamente reguladas y sus alteraciones se han asociado con distintas patologías neurológicas (Choudhuri & Chanderbhan, 2016).

### 1.6. Transportadores SLC38A

La familia SLC38A, es integrada por transportadores de aa neutros acoplados a sodio, también conocidos por el acrónimo SNAT por sus siglas en inglés. Esta familia está constituida por 11 miembros (Pizzagalli et al., 2021), 7 de los cuales han sido caracterizados funcionalmente y se han subclasificado en 2 tipos, con base a su mecanismo de transporte. El sistema A, que está constituido por SNAT1, SNAT2,

SNAT4 y SNAT8, quienes presentan una alta afinidad para transportar prolina, serina, alanina y glutamina. Utilizan una cinética de transporte simporte, desplazando un catión de sodio junto con el aa en la misma dirección. Por otra parte, el sistema N, conformado por SNAT3, SNAT5 y SNAT7, estos transportadores muestran preferencia por glutamina, alanina, histidina y aspargina. La cinética de transporte que emplean es antiporte, movilizandoo el aa a la par con un catión sódico en la misma dirección e intercambiando un ion de hidrógeno en dirección contraria. Los transportadores SNAT6, SNAT9, SNAT10 y SNAT11 no se han asignado a un sistema, pues aún se desconoce la cinética de transporte que llevan a cabo, por lo que se les denomina transportadores huérfanos. Esta información se resume en la Tabla 1, en donde se muestran los 11 miembros de los SNAT, el sistema al que pertenecen, su cinética de transporte, sitio de expresión y el gen encargado de codificar a la proteína transportadora (Bröer, 2014; Chiu et al., 2020; Hägglund et al., 2015; Leke & Schousboe, 2016).

Los transportadores SNAT1 y SNAT2 desempeñan un papel crítico en el cerebro, participan en el reciclaje de la glutamina (Gln), precursor del glutamato Glu, el neurotransmisor excitatorio más importante en el cerebro, lo que los posiciona como dos transportadores fundamentales en la regulación de la sinapsis neuronal (Xie et al., 2014; Yoneda et al., 2020).

**Tabla1. Transportadores SNAT (SLC38A)**

Transportador	Gen	Sistema	Cinética de transporte	Localización
SNAT1	<i>Slc38a1</i>	A	Simporte	Ubicuo
SNAT2	<i>Slc38a2</i>	A	Simporte	Ubicuo
SNAT3	<i>Slc38a3</i>	N	Uniporte	Cerebro, hígado, páncreas
SNAT4	<i>Slc38a4</i>	A	Simporte	Placenta
SNAT5	<i>Slc38a5</i>	N	Uniporte	Pulmón, cerebro, intestino, riñón
SNAT6	<i>Slc38a6</i>	-	-	Pulmón, músculo
SNAT7	<i>Slc38a7</i>	N	Uniporte	Ubicuo
SNAT8	<i>Slc38a8</i>	A	Simporte	Cerebro, testículos
SNAT9	<i>Slc38a9</i>	-	-	Paratiroide, testículos, adrenal
SNAT10	<i>Slc38a10</i>	-	-	Ubicuo
SNAT11	<i>Slc38a11</i>	-	-	Médula, ojo, bazo

### 1.7. SNAT2

El transportador SNAT2 es expresado por el gen *Slc38a2* ubicado en el cromosoma 15. Consta de 15 intrones y 16 exones, teniendo su codón de inicio en el exón 2 y el de parada en el exón 16, codificando una proteína de 504 aa (Menchini & Chaudhry, 2019; Schiöth et al., 2013). Este transportador está conformado por 11 dominios transmembranales, ubicando la región N-terminal en citosol y la región C-terminal de forma extracelular, su estructura se esquematiza en la Figura 4. Asimismo, se han identificado 3 sitios de glicosilación Asn<sup>254</sup>, Asn<sup>258</sup> y Asn<sup>272</sup> asociadas a la translocación de la proteína hacia la membrana citoplasmática (Ge et al., 2018),

estos aa se resaltan en la Figura 4, en color verde. Además, se han descrito 2 residuos de cistina (Cys<sup>245</sup> y Cys<sup>279</sup>) que forman un puente disulfuro en el tercer bucle extracelular y otros 2 (Cys<sup>228</sup> y Cys<sup>303</sup>) situadas en el dominio 5 transmembranal. Estos residuos son altamente conservados y le otorgan a la proteína su estabilidad estructural y funcional (C. Chen et al., 2016). Aunado a esto, los residuos Asn<sup>82</sup> y Thr<sup>384</sup> ubicados en las regiones transmembranales 1 y 7 respectivamente, determinan la afinidad de unión al catión sódico para que SNAT2 sea funcional. Mientras que en color violeta se representan los residuos de lisina que se han asociado al proceso de ubiquitinación para la degradación de la proteína (Menchini & Chaudhry, 2019).

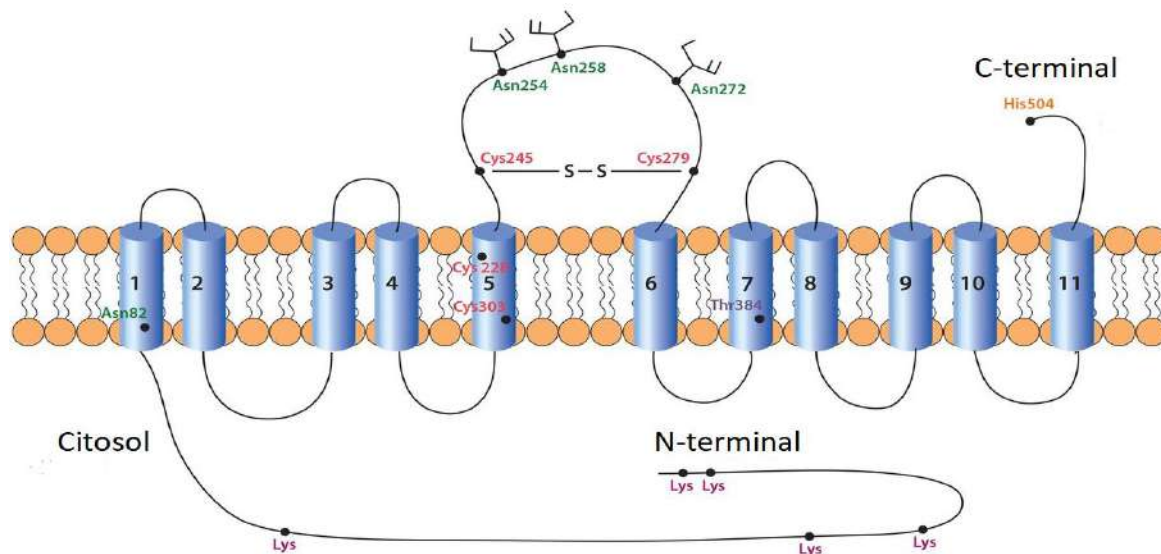


Figura 4. Estructura topológica del transportador SNAT2. Se esquematizan los 11 dominios transmembranales, los residuos de aspargina glicosilados en las posiciones 254, 258 y 272, así como los residuos altamente conservados de cistina en 245, 279, 228 y 303. Aspargina y treonina en posición 82 y 384 respectivamente asociados a la unión al sodio. Lisinas intracelulares en morado asociadas a la ubiquitinización para degradación (Imagen modificada de Menchini & Chaudhry, 2019).

El transportador SNAT2 está altamente regulado por estímulos intra y extracelulares a un nivel transcripcional y traduccional (Hundal & Taylor, 2009). Cuando se presenta un estrés osmótico por la pérdida de volumen celular, esto conlleva a un aumento de

la expresión de ARNm de SNAT2 seguido de su traducción a proteína y movilización hacia la membrana citosólica. Esto incrementa la captación de aa, contribuyendo a la respuesta osmoadaptativa de la célula, promoviendo su homeostasis (Krokowski et al., 2017). Otra característica de esta proteína, es su capacidad de respuesta ante la disponibilidad de aa. En condiciones de inanición, el exceso de ARNt no cargados provocan la activación de la quinasa GCN2 que fosforila al factor iniciador de la traducción eIF2 $\alpha$ , provocando el bloqueo de la síntesis de proteínas cap-dependientes. Esto promueve a su vez el aumento del factor ATF4, que al asociarse a los elementos de respuesta CAAT y AARE localizadas en el intrón 1 de *SLC38A2*, aumentan su expresión génica. Posteriormente la desfosforilación del factor eIF2 $\alpha$  permiten la traducción del ARNm de SNAT2 sintetizado, formando la proteína que será translocada hacia la membrana, generando la movilización de aa hacia el interior de la célula, aminorando los ARNt no cargados (Menchini & Chaudhry, 2019; Nardi et al., 2015).

Una característica importante de SNAT2 reportada por Grewal y colaboradores, fue a través de la privación de aa esenciales, esta modificación del entorno no alteraba la expresión de SNAT1, pero si aumentaba la expresión *de novo* de SNAT2, al encontrar un alza del factor ATF4. Estos datos se obtuvieron a partir de cultivos neuronales de ratón, en donde interesantemente, la actividad neuronal espontánea no se veía afectada cuando se acrecentaba la expresión de SNAT2 por la privación de aa. Sin embargo, al administrar Gln al cultivo, en condiciones basales, disminuían la síntesis de SNAT2 y la actividad neuronal aumentaba considerablemente. Lo que nos lleva a interpretar que tanto la concentración de aa asociados al sistema A como la expresión de SNAT2 repercute directamente en la actividad sináptica (Grewal et al., 2009). Asimismo, la evidencia científica propone que la regulación de la expresión de SNAT2 se ve modificada ante múltiples hormonas, como insulina, glucagón, estradiol, cortisol, entre otras (Kashiwagi et al., 2009; Velázquez-Villegas et al., 2014; Winther-Sørensen et al., 2020). No obstante, aún se desconocen a detalle algunos de los mecanismos involucrados en estos procesos. Además se ha descrito que SNAT2 funciona de forma sincrónica acoplada a canales de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> en

conjunto con otros transportadores ubicados en la membrana (Hundal & Taylor, 2009; Liu et al., 2013), lo que plantea la existencia de una regulación coordinada entre varios transportadores en las regiones en donde está expresado SNAT2, sugiriendo una red compleja de interacciones que permiten la eficiente captación y transporte de aa, contribuyendo a la homeostasis y el funcionamiento celular.

La regulación funcional de SNAT2, denota su importancia, principalmente ante condiciones de estrés celular y en la sinapsis química. Su participación en la movilización de aa implicados en el metabolismo es esencial para mantener la homeostasis del microambiente (Hoffmann et al., 2018). La función de SNAT2 asociada a la internalización de Gln ha sido ampliamente estudiada, ya que este aa participa en múltiples funciones celulares como: la síntesis de proteínas, nucleótidos y otros aa, el mantenimiento del equilibrio ácido-base, además de actuar como donador de carbonos para la generación de energía (Pochini et al., 2014; Yoo et al., 2020). Particularmente, en las neuronas, la internalización regulada de Gln asegura la biosíntesis de Glu o ácido gamma-amino butírico (Das et al., 2022; González-González et al., 2005), neurotransmisores excitatorios e inhibitorios por excelencia respectivamente, esenciales en diferentes tipos de sinapsis (Hamdani et al., 2021; Qureshi et al., 2019). El tráfico de Gln y Glu entre neuronas y astrocitos se lleva a cabo a través del Ciclo Glu-Gln.

#### 1.8. Ciclo Glutamato-Glutamina

El Ciclo Glu-Gln (CGG) se considera un mecanismo de protección neuronal preventivo contra la excitotoxicidad mediada por Glu, ya que realiza un eficiente reciclaje de Glu y Gln en el cerebro. Este proceso es fundamental en el organismo para mantener la homeostasis en el sistema nervioso (Eid et al., 2016).

Durante la sinapsis glutamatérgica, la liberación de Glu desde la neurona presináptica al espacio extracelular aumenta la concentración de este neurotransmisor a rangos mM en la hendidura sináptica. En la Figura 5, el Glu, representado en color rojo, es liberado durante la sinapsis, (A) e internalizado al astrocito por medio de los transportadores de glutamato de alta afinidad 1 (EAAT1)

y 2 (EAAT2). En el citoplasma del astrocito el Glu es convertido a Gln por medio de la enzima glutamina sintetasa (GS), para posteriormente desplazarse al espacio extracelular (B) mediante los transportadores SNAT3 o SNAT5 junto con un catión sódico intercambiado por un ion hidrógeno. A través de los transportadores SNAT1 o SNAT2 (C), la Gln liberada por el astrocito es internalizada a la neurona presináptica mediante un cotransporte con un catión de  $\text{Na}^+$ . Ya en la neurona presináptica, por acción de la glutaminasa dependiente de fosfato (PAG) la Gln es convertida a Glu. A partir de aquí el Glu dentro de la neurona puede ser utilizado como sustrato para el ciclo de Krebs o recapturarse en vesículas (D) por medio de los vGLUT ubicados en vesículas citosólicas, para posteriormente ser liberado al espacio sináptico, iniciando nuevamente el ciclo. El Glu como neurotransmisor, en el espacio sináptico interactúa con los receptores AMPA, NMDA o kainato ubicados en

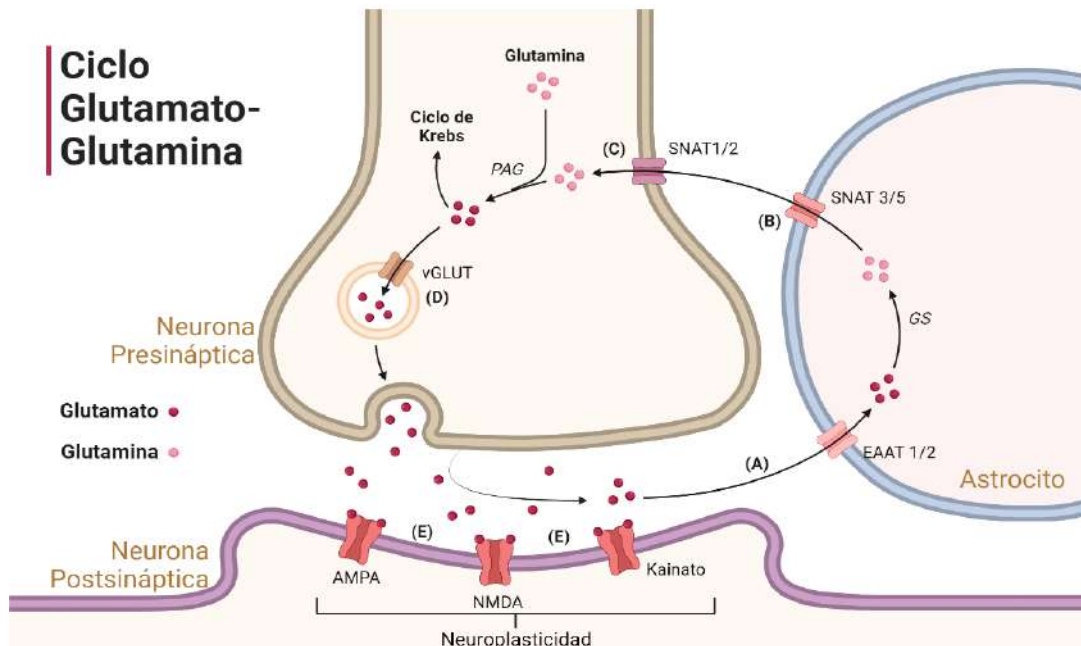


Figura 5. Esquemmatización del Ciclo Glutamato-Glutamina. La internalización de Glu al astrocito por EAAT1 o EAAT2 (A), la conversión de Glu a Gln por la GS y su exportación extracelular por el SNAT3/5 (B), su ingreso a la neurona pre-sináptica por SNAT1/2 (C), la síntesis a Glu por la PAG y su vesicularización por los vGLUT (D) para su liberación generando sinapsis, a través de los receptores ubicados en la neurona pre-sináptica (E).

la neurona postsináptica (E), desencadenando cascadas de señalización relacionadas con la neuroplasticidad y el aprendizaje (Hayashi, 2018; R. Zhou et al., 2020).

Un exceso de Glu en el espacio sináptico provoca excitotoxicidad debido a la sobreactivación de sus receptores, alterando la comunicación neuronal provocando finalmente neurodegeneración (Lau & Tymianski, 2010). Si bien, se conoce la capacidad del tejido cerebral para sintetizar, acumular y liberar neurotransmisores, es sumamente importante regular la concentración del Glu extracelular a niveles fisiológicos, ya sea por la síntesis y funcionalidad de PAG y GS o por la modulación de las proteínas transportadoras presentes en la membrana (Danbolt, 2001). Por lo tanto, los transportadores de aa son fundamentales para regular los niveles de este neurotransmisor, manteniendo la correcta funcionalidad del CGG reciclando el exceso de Glu evitando la neurocitotoxicidad (Leke & Schousboe, 2016).

#### 1.9. Trastornos del CGG

La coordinación entre transportadores y enzimas para el mantenimiento de las concentraciones de Glu y Gln en la sinapsis tripartita, han hecho que todas las moléculas que intervienen en CGG sean objeto de investigación en neuropatologías. Por ejemplo, Patel y colaboradores en el 2019 realizaron un estudio transcriptómico en pacientes asintomáticos y no asintomáticos con EA (diagnosticados *postmortem*), reportando un aumento en la expresión génica de SNAT2 en comparación con los sujetos control en una edad avanzada (Patel et al., 2019). Aunque hay grandes esfuerzos por estudiar la evolución de la EA, son complejas las aproximaciones metodológicas para su investigación en humanos. En su mayoría, reflejan los trastornos en estadios avanzados o en el mejor de los casos, cuando el paciente comienza a tener signos de daño cerebral, careciendo de información en una etapa incipiente. Por tal motivo y con la intención de poder estudiar todas las etapas de la enfermedad y su progresión, se han diseñado aproximaciones metodológicas como los modelos animales genéticamente modificados, que han sido alterados en genes relacionados con los principales marcadores histológicos de las enfermedades observadas en humanos (Navabpour et al., 2020).



Estos modelos han permitido generar datos que permiten integrar y contextualizar cambios bioquímicos y metabólicos en distintas etapas de la enfermedad y su progresión. Por ejemplo, Pajarillo y colaboradores en el 2019 asociaron una disminución de la expresión del transportador de Glu, GLT-1 (homólogo al EAAT2 de humanos) con una aceleración del deterioro cognitivo en ratones APP<sub>Sw,Ind</sub> de EA, mientras que su sobreexpresión atenuaba este deterioro, sugiriendo que EAAT2 juega un papel crítico en la función cognitiva y la neuroprotección (Pajarillo et al., 2019; Takahashi et al., 2015). Por otro lado, en nuestro laboratorio, Villaseñor evaluó la expresión proteica del transportador SNAT2 en el modelo de ratón transgénico 3xTgAD, a través del análisis inmunohistoquímico de distintas regiones hipocampales en ratones jóvenes de entre 30 y 45 días posnatales. Observando una disminución de la expresión proteica del SNAT2 en casi todas las regiones del hipocampo al compararlas con ratones control (datos no publicados). Esto podría asociar a la función de este transportador y su papel en el tráfico de aa, con alteraciones en la concentración de neurotransmisores, y el propio metabolismo neuronal, predisponiendo su muerte (Nunzi et al., 2003). El contar con el modelo murino transgénico 3xTg-AD, es una excelente alternativa para evaluar las variaciones del transportador SNAT2, ya que este animal, se ha caracterizado profusamente desde la perspectiva histológica y conductual, estableciendo patrones muy similares a la EA.

#### 1.10. Ratones 3xTg-AD

El uso de modelos animales configura una práctica histórica en investigación. Un animal de experimentación se define como todo ser vivo no humano dentro del reino animal usado para la experimentación con fines científicos (Neff, 2018). El uso de animales de laboratorio actualmente está regido por distintas leyes, normas y consideraciones éticas. Apegándonos a estos aspectos normativos, el investigador analiza la idoneidad de cada modelo, calcula el número de animales experimentales con base a un análisis bioestadístico y prioriza la atención en el cuidado animal evitando el sufrimiento, además de considerar los aspectos de bioseguridad en la disposición de cadáveres y RPBI (Romero-Fernandez et al., 2016).

La idoneidad en la elección del modelo animal para el estudio de patologías degenerativas como la EA está determinada por el conocimiento biológico, anatómico, metabólico y electrofisiológico del animal (Havekes & Abel, 2009; Vink, 2018). Algunos de los modelos de estudio más utilizados, son los roedores, principalmente las ratas y ratones, ya que están muy bien estandarizadas las técnicas de ingeniería genética en estos modelos. Esto se ha aceptado, con el objetivo de desarrollar animales transgénicos que presenten fenotipos de enfermedades cuya evaluación requiere un análisis integral sistémico. Existen varios modelos de ratones modificados genéticamente que tratan de simular el fenotipo de la EA, por ejemplo, los roedores de la línea APP23 y Tg2576, que expresan la PPA humana modificada, generando péptidos  $\beta$ A, con la intención de inducir la formación de la placa senil. Como resultado de su caracterización, se ha reportado que estos ratones muestran una pérdida significativa de neuronas del hipocampo (Inés et al., 2015). Los ratones identificados como JNPL3 expresan la proteína Tau humana mutada (P301L) propiciando la formación de depósitos intracelulares de pTau, causando degeneración tisular y desencadenando la aparición de los ovillos neurofibrilares (Manzano et al., 2009). El modelo murino 3xTg-AD a diferencia de los otros modelos, expone en conjunto las anormalidades en pTau y  $\beta$ A. Interesantemente aunado a los reportes histopatológicos, desarrollan alteraciones conductuales progresivas. Por tal motivo, los ratones 3xTg-AD son de gran interés para el estudio de esta enfermedad (Belfiore et al., 2019; Y. Chen et al., 2013).

La generación del modelo 3xTg-AD surgió a partir de la inserción de los transgenes *APP<sup>Swe</sup>* y *Tau<sup>P301L</sup>* al ratón transgénico con *PS1<sup>M146V</sup>* (Hoffman et al., 2019; Oddo et al., 2003). Este modelo murino, ha sido caracterizado histológica y fenotípicamente. En los 2 primeros meses de vida, los ratones 3xTg-AD presentan un desarrollo conductual y fisiológico indistinguible a los ratones silvestres, sin reportar alteraciones conductuales o histológicas. Sin embargo, a los 3 meses, es posible detectar péptidos  $\beta$ A en algunas regiones del cerebro, como amígdala y corteza. Finalmente, entre los 5 y 6 meses de edad, el péptido  $\beta$ A se localizan en el espacio extracelular en las regiones corticales e hipocampales formando la placa

senil. La presencia de pTau se determina a partir de los 6 meses en el hipocampo, mientras que los ovillos neurofibrilares son detectados hasta los 18-24 meses (Oddo et al., 2003; Sterniczuk, Antle, et al., 2010; Stover et al., 2015). Sugiriendo que el modelo 3xTg-AD presenta una evolución histopatológica similar a la EA en humanos, desarrollando inicialmente los péptidos  $\beta$ A y pTau en algunas regiones del cerebro asociadas a la cognición, para después formar la placa senil y los ovillos neurofibrilares, provocando neurodegeneración progresiva.

Además de las características histopatológicas, se reportó una disminución de la conducta exploratoria y un aumento en el comportamiento deambulatorio, en conjunto con alteraciones conductuales del ciclo circadiano, inquietud y ansiedad (Sterniczuk, Antle, et al., 2010; Sterniczuk, Dyck, et al., 2010). Las características conductuales que muestran los ratones 3xTg-AD en su mayoría no presentan distinción entre sexos, además de que estos cambios en el comportamiento son muy similares a las conductas que manifiestan los seres humanos que cursan con EA en estadios avanzados (González Pereyra, 2018).

Basados en las similitudes bioquímicas, histopatológicas, electrofisiológicas y conductuales que presenta el ratón 3xTg-AD y los humanos que desarrollan EA, junto con la evidencia descrita sobre las alteraciones a nivel transcripcional del transportador SNAT2 en pacientes con EA en etapa tardía y los cambios en la expresión proteica demostrada por nuestro equipo de trabajo en el modelo murino de 3xTgAD. Es que este proyecto se propuso estudiar las alteraciones en la expresión génica de SNAT2 en hipocampo de ratones 3xTg-AD, a la edad de: 1 mes, previo al desarrollo de las anormalidades histológicas y fenotípicas, a los 3 meses cuando inician los cambios histopatológicos, y a los 6 meses cuando ya ha desarrollado patología neuronal junto las alteraciones conductuales. Con el objetivo de analizar y conocer la evolución de las alteraciones de SNAT2 y correlacionar su impacto en el microambiente sináptico para ponderar su análisis y el de sus sustratos transportables como posibles marcadores de la enfermedad. Buscando que las intervenciones sean más oportunas y ayuden a detener la progresión de la enfermedad aumentando la calidad de vida de los pacientes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. General**

Evaluar los niveles de ARNm de SNAT2 en hipocampo de un modelo murino transgénico de Alzheimer (3xTg-AD), para establecer una correlación entre el patrón de expresión y la evolución de la patología valorando su posible utilidad diagnóstica.

### **2.2. Particulares**

- Cuantificar los niveles de expresión de ARNm de SNAT2 en hipocampo de ratones silvestres C57BL-6 y ratones transgénicos 3xTG-AD, a la edad de 1, 3 y 6 meses.
- Realizar un análisis comparativo del patrón de expresión del ARNm de SNAT2 en las distintas edades evaluadas de los ratones silvestres y transgénicos, para correlacionarlo con alteraciones conductuales e histopatológicas que presentan el modelo murino para Alzheimer.

### **2.3. Profecionalizantes**

- Conocer la participación de las biomoléculas y su relación con la respuesta celular en condiciones fisiológicas y patológicas para proponer métodos diagnósticos o alternativas terapéuticas que ayuden a mejorar la calidad de vida de los pacientes.
- Comprender los mecanismos fisiopatológicos que se relacionan con procesos neurodegenerativos como el Alzheimer, para desarrollar hipótesis y modelos que permitan el avance en su estudio y análisis.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Diseño

El diseño de este proyecto de investigación es de tipo longitudinal.

##### 3.1.1. Definición del universo

El modelo de experimentación está conformado por ratones de fondo genético C57/BL-6 silvestres y transgénicos 3xTg-AD en 1, 3 y 6 meses de edad.

##### 3.1.2. Definición de grupos

Los grupos se separarán de la siguiente forma:

- Ratones control. 9 ratones silvestres C57/BL-6. 3 ratones de 1 mes, 3 ratones de 3 meses y 3 ratones de 6 meses de edad.
- Ratones problema. 9 ratones triple transgénico 3xTg-AD. 3 ratones de 1 mes, 3 ratones de 3 meses y 3 ratones de 6 meses de edad.

##### 3.1.3. Definición de las unidades de observación

Las unidades de observaciones son los hipocampos extraídos de los ratones. Los experimentos se llevarán a cabo utilizando 3 ratones diferentes de cada condición, analizándose 3 veces cada una. Los grupos estarán conformados por 9 animales en total tanto para los modificados genéticamente como para el grupo control.

##### 3.1.4. Grupo control

El grupo control está conformado por ratones con fondo genético C57/BL-6 que no han sido modificados genéticamente. Respetando la misma edad que su par triple transgénico, el sexo es indistinto.

##### 3.1.5. Criterios de inclusión

- a) Ratones C57/BL-6 tipo salvaje y triple transgénico 3xTg-AD que son reproducidos y criados en el Bioterio de la UNAM del Instituto de Neurobiología, con una edad de 1, 3 y 6 meses, de sexo indistinto.
- b) Ratones genotipificados por PCR punto final para los genes *APP<sub>Swe</sub>* y

*Tau<sub>P301L</sub>*.

**Tabla 2. Unidades de medida, definición y grupos a evaluar**

Grupo a evaluar	Definición	Unidades de medida	Edad
<b>C57/BL-6</b>	Ratones no modificados genéticamente. Ratones control	Unidades arbitrarias relativas de expresión del gen endógeno	1 mes
			3 meses
			6 meses
<b>3xTg-DA</b>	Ratón modificado genéticamente. Ratones problema	Unidades arbitrarias relativas de expresión del gen endógeno	1 mes
			3 meses
			6 meses

### 3.1.6. Criterios de exclusión

- Ratones problema cuyo genotipo no amplifiquen para alguno de los genes *APP<sub>Swe</sub>* y *Tau<sub>P301L</sub>*, o que no cumplan con la edad establecida.
- Ratones control que amplifiquen alguno de los genes *APP<sub>Swe</sub>* y *Tau<sub>P301L</sub>*, o que no cumplan con la edad establecida.

### 3.1.7. Criterios de eliminación

- Ratón control o transgénico con presencia de alguna lesión grave que cause estrés al animal y pueda modificar la química cerebral.

## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. Aspectos bioéticos en el manejo de animales y eutanasia

La producción, crecimiento y mantenimiento de los animales fue realizado por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, Querétaro. El manejo de los ratones para esta investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la UNAM. Además, este protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, debido a que el manejo y tratamiento de las muestras obtenidas se realizará en la UMBA-FCN-UAQ. Igualmente, el protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química, debido a que el estudiante que realiza

el proyecto pertenece al programa de Maestría en Química Clínica Diagnóstica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Las instalaciones del Bioterio del INB UNAM-Juriquilla están separadas en áreas, que mantienen su independencia física de otras zonas. El cuarto de alojamiento de los ratones oscila a una temperatura de entre 20 a 25 °C, considerando un porcentaje de humedad relativa entre 40 al 70 % y entre 16 a 18 recambios de aire ambiental por hora de forma ininterrumpida. La iluminación del área de alojamiento oscila en ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas, tomando en cuenta los periodos de actividad nocturna con una intensidad de ruido no mayor a 85 Db. Las jaulas de policarbonato donde se mantuvieron los ratones medían 25 x 30 x 12 cm. El fondo de la caja contenía una cama de aserrín para absorber la orina, excremento y desperdicio de agua cambiándose cada 48 horas. Los ratones recién nacidos se mantuvieron con la madre hasta los 21 días de edad, se destetaron posteriormente en macho y hembra para evitar su reproducción. El alimento proporcionado a los ratones fue Purina Chow 5001 y tanto este como el agua fue administrando *ad libitum*.

Debido a la necesidad de obtener un tejido cerebral integro libre de compuestos químicos, no fue posible la administración de anestesia o tranquilizantes para inducir la muerte a los ratones, por lo que el método de eutanasia seleccionado fue la decapitación con guillotina. Este procedimiento se realizó en el área de cirugía, una zona independiente al cuarto de alojamiento de los ratones para evitar su estrés al detectar el olor a sangre. En el cuarto de quirófano se limpió la zona y la guillotina utilizada durante la eutanasia entre ratón y ratón. Posteriormente se diseccionó el hipocampo y cola, extrayendo también hígado y corteza cerebral de los mismos animales para su análisis en futuros proyectos de investigación derivados de este. Todos los tejidos remanentes del ratón posterior a la eutanasia y la disección fueron retenidos en una bolsa de polietileno color amarillo con la leyenda "Residuos Patológicos" y el símbolo de riesgo biológico, conservándose en congelación hasta que la empresa Red Ambiental recolectó los cadáveres para su incineración de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Durante la manipulación de los ratones los investigadores portaron el equipo de protección personal, como son: bata,

guantes, mascarilla, lentes de seguridad y zapato cerrado, además de apegarse a las pautas adicionales descritas en las instalaciones del INB. Toda la producción, cuidado y disposición de los ratones fue de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

El estudiante de maestría responsable de esta investigación, tomó un curso de capacitación teórico-práctico donde un experto certificado en la UNAM en el manejo de animales de laboratorio explicó las conductas del ratón, enseñó la manipulación, inmovilización y ejecución de las técnicas de eutanasia. Además, se reafirmaron conceptos de bioética, de higiene personal y los métodos idóneos de desecho del material biológico-infeccioso y patológico.

### 3.2.2. Eutanasia del ratón y disección de muestras

Para la eutanasia del ratón se limpió la zona a trabajar, se comprobó que todo el material y equipo estuviera estéril. Se realizó un acercamiento cuidadoso y tranquilo al ratón a sacrificar. Se tomó de la base de la cola, levantando al ratón apoyándolo sobre una superficie rugosa o una rejilla, sin soltar la cola, con la otra mano se sujetó la zona posterior del cuello entre la nuca y la espalda del ratón inmovilizándolo, se posicionó la cabeza dentro del sitio de corte y con mucho cuidado de manera segura y en un solo movimiento se accionó la guillotina para realizar la división del cuerpo y la cabeza (Hedrich & Bullock, 2004).

Posterior a la decapitación por guillotina, a los ratones de experimentación se les realizó inmediatamente disecciones en el cuerpo y cerebro. Para la disección de hígado, se ejecutó un corte de la piel en la región abdominal del ratón, abriendo la piel en forma de "V" con dirección a la zona axilar. Realizando el mismo procedimiento de corte con el músculo liso exhibiendo los órganos del animal. Se ubicó el hígado y con mucho cuidado se extirpó. Asimismo, para la disección de cerebro se separó el tejido que envuelve al cráneo del animal. Se cortó el cráneo desde la región occipital hasta la frontal, seccionando el nervio óptico separando el cráneo del cerebro. A través de un corte sagital en el cerebro se separaron los hemisferios y ayuda del instrumental quirúrgico se diseccionó el hipocampo



cuidadosamente (Ortiz et al., 2020), extrayendo además la corteza cerebral. Los tejidos obtenidos fueron lavados con PBS 1X durante 2 minutos para después fragmentarse y homogeneizarse con trizol, ayudándose por una jeringa de 3 ml. Posteriormente las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su uso. Finalmente, un pedazo de la cola del murino eutanasiado fue cortado para realizar su genotipificación.

### 3.2.3. Genotipificación

Las colas diseccionadas se dispusieron en un vial de 2.0 ml por separado agregando 500 µl de NaOH al 0.05M. Posteriormente se calentó la solución a 95°C durante 15 min y se añadieron 50 µl de solución stop (Tris 1M, EDTA 10mM). El vial fue agitado mediante vórtex durante 1 min, el tejido no lisado fue traspasado a un vial nuevo y fueron almacenados a -20 °C. La solución restante de lisis, conteniendo al ADN se centrifugó a 2500 rpm durante 1 min, se recuperó el sobrenadante y se traspasó a un tubo nuevo. Este material genético se utilizó para amplificar por PCR punto final los transgenes de *APP<sub>Swe</sub>* y *Tau<sub>P301L</sub>*. La mezcla de reacción para cada vial se describe en la Tabla 3. Las condiciones de amplificación se estipulan en la Tabla 4. La reacción de PCR para los transgenes *APP<sub>Swe</sub>* y *Tau<sub>P301L</sub>* en conjunto, amplifica dos productos, de 500 y 350 pb respectivamente. Los cebadores fueron proporcionados por el laboratorio de Neuromorfometría y Desarrollo, dirigido por la Dra. Sofía Díaz Miranda en el INB-UNAM campus Juriquilla. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

**Tabla 3. Mezcla de reacción para amplificar los transgenes APP y Tau**

Elemento		Cantidad
Taq Buffer 10X		2.5 µl
dNTP's Mix [10 mM]		0.5 µl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]		1.0 µl
Taq Pol [5 U/µl] (Thermo Scientific)		0.4 µl
Mix Cebadores sentido y antisentido [10 µM]	APP	0.5 µl
	Tau	0.5 µl
	Thy	1.0 µl
ADNc		3.0 µl
H <sub>2</sub> O ultrapura		15.6 µl
<b>Volumen total</b>		<b>25 µl</b>

**Tabla 4. Programa de amplificación de los transgenes APP y Tau**

Etapa	Segmento	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	N/A	94°C	5 min	1
<b>Amplificación</b>	Desnaturalización	94°C	30 seg	25
	Alineamiento	53°C	30 seg	
	Elongación	72°C	1 min	
<b>Terminación</b>	N/A	72°C	3 min	1

#### 3.2.4. Extracción, análisis de integridad y evaluación de pureza del ARN

Los hipocampos disecados, homogeneizados con 500 µl del trizol y almacenados a -70°C se les realizó la extracción de ARN de acuerdo al manual de usuario del reactivo "TRIzol Reagent" (Invitrogen). Los tubos eppendorf conteniendo el hipocampo fueron mezclados hasta obtener una solución uniforme. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente añadiendo después 0.1 ml de cloroformo por cada ml

de trizol usado para la lisis. Se mezcló por agitación y se incubó durante 2 a 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra fue centrifugada durante 15 min/12,000 g/4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un vial nuevo, añadiendo 250 µl de isopropanol. El vial fue incubado durante 10 min/4 °C seguido de una centrifugación durante 10 min/12,000 g/4 °C. Se descartó el sobrenadante de la solución. La pastilla fue resuspendida en 500 µl de etanol al 70%. La muestra fue agitada en vórtex y se centrifugó durante 5 min/7500 g/4 °C. El sobrenadante fue desechado, la pastilla de ARN se secó a temperatura ambiente durante 5-10 min. Posteriormente se resuspendió en 15 µl de agua libre de ARNasas y fue almacenado a -70 °C (Rio et al., 2010).

La cuantificación de ARN se realizó utilizando el equipo NanoDrop™. La concentración de ARN total fue obtenida por la lectura a 260 nm, debiendo obtener como mínimo 0.5 µg/µl para poder proseguir con la síntesis de ADNc. La lectura a 280 nm valoró la cantidad de proteínas en la muestra. A partir del cociente 260/280 nm se obtuvo la pureza del ARN debiendo tener como mínimo un valor de normalización mayor o igual a 1.8 para continuar procesando la muestra. La integridad del ARN total fue verificada mediante la electroforesis de la muestra en un gel de agarosa al 1%. Un ARN total integro debe mostrar 2 bandas correspondientes al ARNr 28S y 18S, donde la banda del 28S debe ser igual o superior en intensidad al 18S (Fleige & Pfaffl, 2006).

### 3.2.5. Tratamiento con ADNasa y síntesis de ADNc

Al ARN total extraído de los hipocampos de los ratones se le realizó un tratamiento con ADNasa, en la Tabla 5 se describe la mezcla de reacción. La síntesis de ADNc se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el inserto de la casa comercial para la retrotranscriptasa "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit".

Al final de la retrotranscripción la muestra con el ADNc fue alicuotada y almacenada a -20°C. Los reactivos utilizados, así como las características del ciclo de amplificación se esquematizan en la Tabla 6.

**Tabla 5. Mezcla de reacción para el tratamiento con ADNasa**

Reacción	Reactivos	Condiciones de reacción
1	1 µl de buffer ADNasa 1 µg de ARN total 0.5 µl de ADNasa c.b.p. 10 µl con agua ultrapura	15 min a T° ambiente
2	1 µl EDTA 25 mM 0.5 µl Random Primers 0.5 µl Oligo dT	65°C por 10 minutos. Poner inmediatamente en hielo terminando el tiempo

**Tabla 6. Mezcla de reacción y condiciones de síntesis para ADNc**

Reacción	Reactivos	Características del ciclo
1	12 µl de ARN tratado con ADNasa 2 µl dNTP's [10 mM] 5 µl Buffer de Retrotranscriptasa 0.5 µl Inhibidor de ARNasa 1 µl Retrotranscriptasa RevertAid 0.5 µl Agua ultrapura	25°C por 5 minutos 42°C durante 60 min 70°C por 5 minutos

### 3.2.6. Diseño y estandarización de cebadores para SNAT2 y ARNr 18s por PCR punto final

Se amplificó una región del ARNr 18s, como gen de expresión constante, los cebadores utilizados para amplificar el 18S fueron descritos por Rho y colaboradores en el 2010. La secuencia de ADNc usada como referencia provienen del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). El código de referencia es NR\_003278.3, obteniendo un amplicón de 151 pb. Para amplificar una región del ARNm del transportador SNAT2, los cebadores fueron diseñados en nuestro grupo para esta investigación, con el programa "OligoAnalyzer™ Tool". La evaluación de la amplificación *in-silico* se llevó a cabo utilizando el programa "Amplifx". Es importante acotar que se han descrito dos isoformas para SNAT2 en ratones, en donde la isoforma 1 consta de una longitud de 504 aa presentando 11 dominios transmembranales y la isoforma 2 es más corta por un procesamiento de

corte y empalme generando un producto 425 aa, eliminando 3 dominios transmembranales en la región carboxi-terminal. Si bien se ha reportado que existen diferencias sutiles en su funcionalidad, los estudios demuestran que ambas isoformas presentan expresión génica constante. Por tal motivo se realizó un análisis de las secuencias para las dos isoformas con número de identificación NCBI NM\_001355633.1 (isoforma 2) y NM\_175121.4 (isoforma 1) decidiendo diseñar los cebadores para amplificar una región constante para ambas isoformas en la región comprendida entre las pares de bases 1166 - 1441 para la isoforma 1 y 1050-1325 para la isoforma 2, produciendo un amplicón final con una longitud final de 276 pb para ambas isoformas.

Las secuencias de los cebadores tanto para 18S como SANT2 se describen en la Tabla 7. Estos cebadores fueron utilizados en PCR punto final para probar distintas temperaturas de hibridación. Se utilizó la temperatura teórica obtenida *in-silico* y se evaluó a través de un gradiente de temperaturas. Las condiciones de amplificación para la PCR punto final analizadas se presentan en la Tabla 8. Las 3 temperaturas de alineamiento evaluadas se identifican como a, b y c. En la Tabla 9 se describe la mezcla de reacción.

**Tabla 7. Secuencias de los cebadores para amplificar 18S y SNAT2**

Región	Sentido	Antisentido	Longitud
18S	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	151 pb
SNAT2	5'-CCAACGAAACTGTGAACGGC-3'	5'-GGTATCCAAAGAGAGCAGCG-3'	276 pb

**Tabla 8. Programa de amplificación para la PCR punto final**

Etapa	Segmento		Temperatura	Tiempo	# Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	N/A		94°C	3 min	1
<b>Amplificación</b>	Desnaturalización		94°C	30 seg	35
	Alineamiento	A	62°C	45 seg	
		B	58°C	45 seg	
		C	52°C	45 seg	
	Elongación		72°C	1 min	
<b>Terminación</b>	N/A		72°C	10 min	1

**Tabla 9. Mezcla de reacción PCR punto final**

Elemento	Cantidad
Taq Buffer 10X	1 µl
dNTP's Mix [2 mM]	1 µl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	0.8 µl
Taq Pol [5 U/µl] (Thermo Scientific)	0.05 µl
Mix Cebadores [10 µM]	0.6 µl
ADNc	1 µl
H <sub>2</sub> O ultrapura	5.55 µl
<b>Volumen total</b>	<b>10 µl</b>

### 3.2.7. Estandarización de la qPCR

Una vez obtenida la temperatura de hibridación para los cebadores 18S y SNAT2 en la PCR punto final, se estandarizaron las condiciones de amplificación para la qPCR. Se utilizó el equipo QuantStudio 1 y las reacciones de qPCR se prepararon de acuerdo a las instrucciones del kit "Master Mix SYBRGreen/ROX - Thermo Scientific" (Tabla 10), con una concentración de ADNc de [10 ng/µl] y de cebadores de 1 µM.

**Tabla 10. Mezcla de reacción para amplificación de 18S y SNAT2 por qPCR**

Cada reacción = 10 µl		
Master Mix SYBRGreen/ROX [2x]		5 µl
Primer Mix	Primer Fw [10µM]	0.5 µl
	Primer Rv [10µM]	0.5 µl
ADNc [10 ng/µl]		3 µl
Agua ultrapura		1 µl
<b>Volumen total</b>		<b>10 µl</b>

El programa computacional usado para la programación y análisis en el termociclador fue el "QuantStudio Design and Analysis Software" versión 1.5.1. Las condiciones de amplificación de la qPCR se describen en la Tabla 11.

**Tabla 11. Programa de amplificación de 18S y SNAT2 por qPCR**

Segmento	T°	Tiempo	Etapas	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	95°C	10 min	Inicio	1
		15 seg	Amplificación	40
<b>Alineamiento</b>	52°C	15 seg		
<b>Elongación</b>	72°C	15 seg		
<b>Disociación</b>	60°C	1 min → ↑T° 0.15°C x seg	Melting	1
	90°C			

### 3.2.8. Secuenciación de amplicones

Los productos de amplificación obtenidos de la qPCR para SNAT2 y 18S fueron purificados y enviados a secuenciar a la unidad Langebio – Cinvestav, en donde se realizó la técnica de Sanger en capilar. La secuencia obtenida en Langebio se compararon con la secuencia de referencia para cada ARNm de NCBI usando las herramientas computacionales "BLAST® - National Library of Medicine" y LALIGN "EMBL-European Molecular Bioinformatic Institute".

### 3.2.9. Generación de curvas estándar para cuantificación absoluta por qPCR

La técnica utilizada para cuantificar el ARNm de SNAT2, fue mediante qPCR relativa normalizando respecto al gen endógeno de expresión constante 18S, realizando una corrección de eficiencia. Debido a que el análisis de la eficiencia de reacción no fue de 2 para 18S ni SNAT2, no se pudo utilizar directamente la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Por lo que se decidió realizar una cuantificación absoluta para cada uno de los genes a través de la generación de curvas estándar y posteriormente normalizar el valor respecto al gen endógeno.

Se realizó la amplificación de SNAT2 y 18S por qPCR y los productos de reacción fueron purificados utilizando el kit "QIAquick® PCR & Gel Cleanup Kit", eluyendo el amplicón de la columna con 15 µl de agua libre de nucleasas. Se cuantificó la concentración del amplicón en el equipo Nanodrop. Los productos de amplificación fueron diluidos hasta una concentración final de 0.01 µg/µl. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas para obtener una curva estándar de concentraciones conocidas de ADNc. Debido a la diferencia de la expresión entre 18S y SNAT2, se utilizaron distintos puntos de la curva para cada gen. Para la curva de 18S se usaron 5 puntos de la curva, desde  $[1 \times 10^{-5}]$  hasta  $[1 \times 10^{-9}]$  µg/µl. Para SNAT2 los puntos de la curva analizados fueron  $[1 \times 10^{-8}]$  hasta  $[1 \times 10^{-11}]$  µg/µl. La eficiencia de reacción se calculó con la fórmula  $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ . El valor del pendiente usado fue el reportado por el programa "QuantStudio™ Design & Analysis Software".

### 3.2.10. Cuantificación de 18S y SNAT2 por qPCR

Una vez obtenidas las curvas estándar para 18S y SNAT2, con una eficiencia superior a 1.8, se realizó la cuantificación de las muestras de ARNm obtenidas de los hipocampos de los ratones silvestres y transgénicos para el gen endógeno de expresión constante y para el gen problema. Las muestras fueron analizadas por triplicado tanto para 18S como para SNAT2. Los grupos fueron formados de acuerdo al modelo y a la edad evaluada. En cada amplificación se utilizaron tanto controles negativos, que son mezcla de reacción sin ADNc, así como dos puntos de la curva estándar, para posteriormente ajustar con base a la curva estándar almacenada

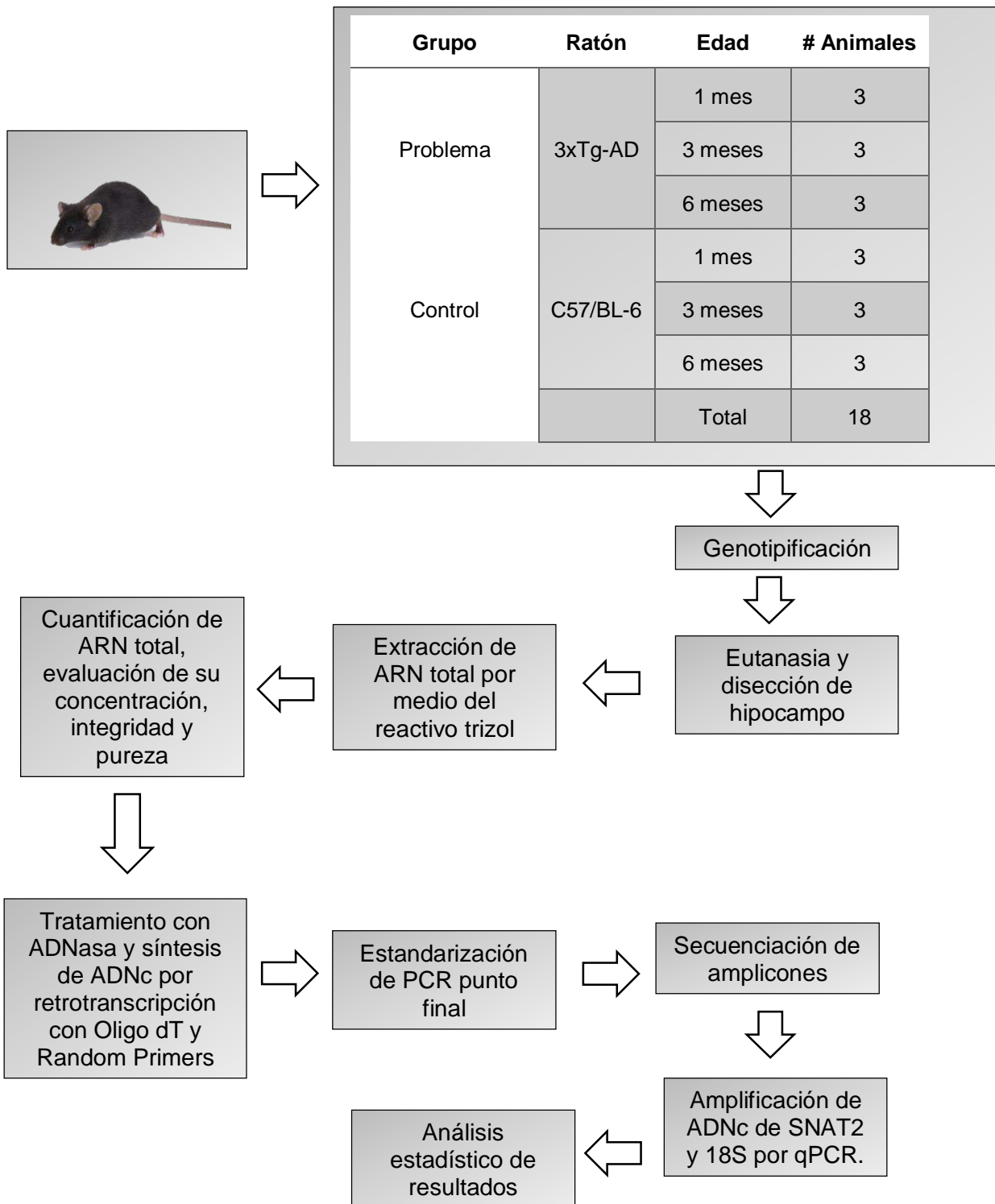


cuantificando las muestras problema.

#### 3.2.11. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico por medio ANOVA de dos vías usando un valor de  $p=0.05$ , confianza del 95% con el programa GraphPad Prism versión 8.0.1, donde se compararon los distintos grupos de ratones con base a su edad y línea genética.

### 3.2.12. Diseño experimental



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Genotipificación

Los tejidos de los ratones problema fueron obtenidas a partir de animales modificados genéticamente 3xTg-AD, por lo que es fundamental garantizar la identificación de los transgenes *APP<sub>Swe</sub>*, *TauP301L*. Se tomó un fragmento de la cola de cada animal, mismo que fue digerido para aislar el ADN genómico. Este ADN obtenido, fue utilizado posteriormente para amplificar los genes mediante PCR punto final como se describe en el apartado de materiales y métodos "3.2.3 Genotipificación".

Consecuente a la reacción por PCR, los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1% durante 60 min a 60V, teñido con "Gel Red" y visualizado a través de una cámara de luz ultravioleta. En la Figura 6 se muestran los amplicones de 350 pb y 500 pb que corresponden a los transgenes *APP<sub>Swe</sub>* (azul) y *TauP301L* (rojo) respectivamente. En el carril 1 se observa la escalera de 100 pb. En los carriles del 2 al 4 se presentan las muestras de los tres ratones 3xTg-AD de 1 mes, del 5 al 7 los tres ratones 3xTg-AD de 3 meses y del 8 al 10 los últimos 3 ratones 3xTg-AD de 6 meses. El carril 11 corresponde al ratón control C57/BL-6 de 3 meses y el carril 12, al control negativo de la reacción, sin ADNc.

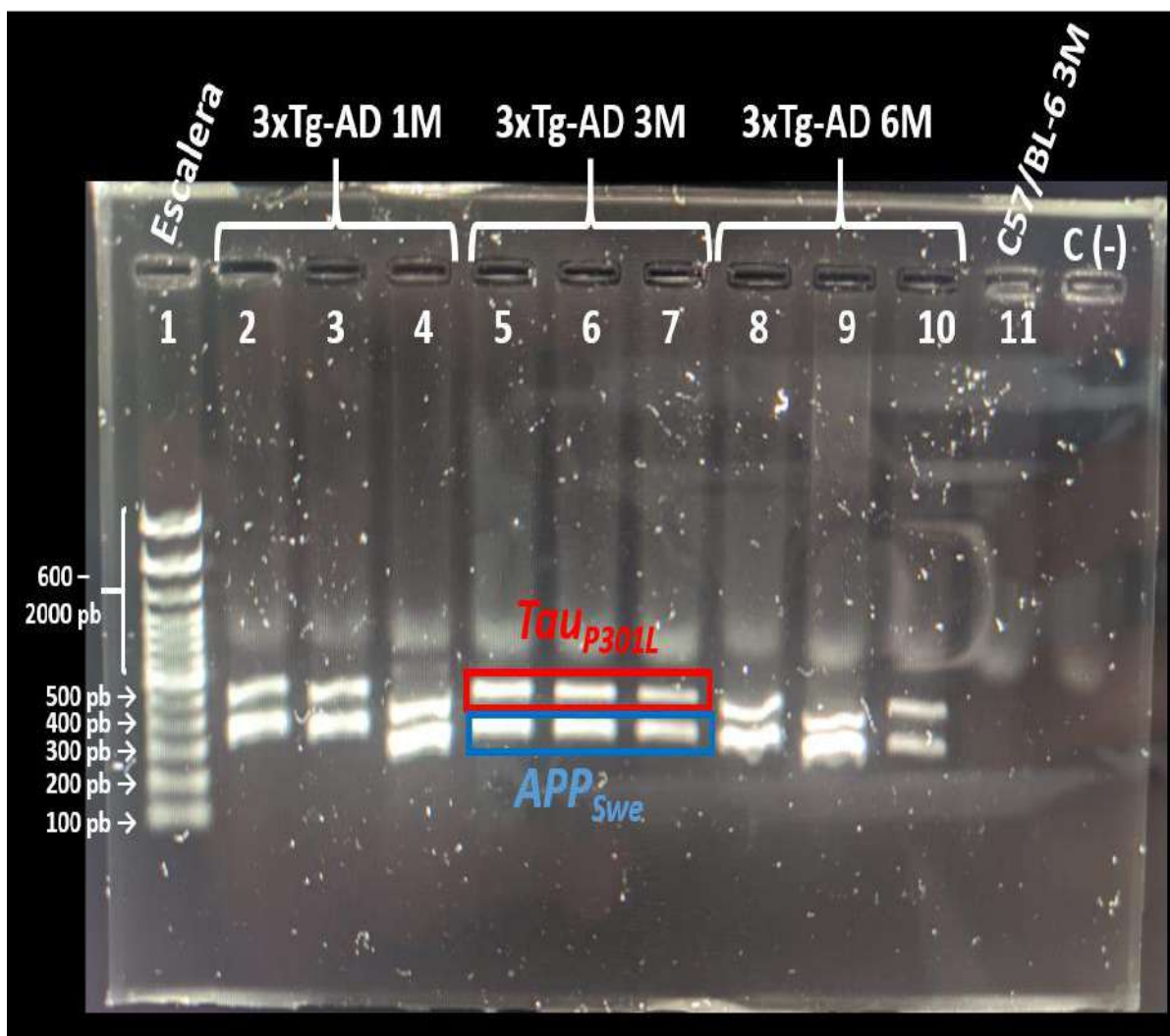


Figura 6. Amplificación de los transgenes *APP<sub>Swe</sub>* y *Tau<sub>P301L</sub>* en ratones 3xTg-AD. Producto de amplificación por PCR punto final de los transgenes *APP<sub>Swe</sub>* y *Tau<sub>P301L</sub>* observados en gel de agarosa al 1%. En el carril 1 se muestra la escalera. Carriles 2 al 10 los ratones 3xTg-AD de 1, 3 y 6 meses. Carril 11 para el ratón control C57/BL-6 silvestres de 3 meses y el carril 12 para el control negativo de reacción C(-), sin ADNc. Amplicón para *APP<sub>Swe</sub>* de 500 pb encerrados en rojo y para *Tau<sub>P301L</sub>* de 350 pb en azul.

#### 4.2. Evaluación de la concentración, pureza e integridad del ARN total

Los hipocampos fueron disecados de ratones 3xTg-AD y C57/BL-6 a las edades de 1,3 y 6 meses. Cada tejido fue homogenizado con trizol y almacenado a -70°C hasta su uso. Teniendo todos los hipocampos de las dos líneas murinas a distintas edades

se procedió a la extracción del ARN total. Se realizó la extracción por edad en simultaneo de los dos genotipos, con la finalidad de mantener las mismas condiciones en el procesamiento de las muestras. El procedimiento fue realizado siguiendo el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos "3.2.4 Extracción, análisis de integridad y pureza del ARN". El ARN total de cada muestra fue reconstituido en 15 µl de agua libre de nucleasas y cuantificado por Nanodrop. Las muestras fueron ajustadas a una concentración final de 1000 ng/µl y separadas en alícuotas de 5 µl. A cada muestra se les asigna un código de identificación (ID), iniciando con el modelo animal, siendo 3x para los transgénicos y C57 para los controles, seguido de la edad, teniendo 1M para 1 mes, 3M para 3 meses y 6M los de 6 meses. Finalmente se añadió el número de ratón. Ejemplo: del modelo triple transgénico 3xTg-AD de 3 meses siendo el ratón #2 es identificado como "3x-3M-2".

La integridad del ARN fue valorada por electroforesis en un gel de agarosa al 1% añadiendo 2 µg de ARN total a cada pocillo, asegurando la visualización de las bandas. En la Figura 7 se presenta la electroforesis de las muestras para ambos modelos murinos de 1, 3 y 6 meses. Se presenta una tabla por gel que identifica individualmente cada carril, el ID de la muestra, la concentración de ARN total en ng/µl y el valor OD 260/280. En los geles se observan las bandas 28S y 18S, como marcadores de la integridad del ARN. En el inciso (A), el gel y tabla para los ratones 1, 2 y 3 de 1 mes de fondo genético 3xTg-AD y C57/BL-6. El inciso (B) para los ratones 1, 2 y 3 3xTg-AD y 1 C57/BL-6 de 3 meses. Por último, el inciso (C) para los ratones 1, 2 y 3 3xTg-AD y C57/BL-6 de 6 meses de edad. En los tres geles se observa la primer banda correspondiente a la subunidad ribosomal 28S, muestra una intensidad mayor o igual que la segunda respectiva a la subunidad 18S, con esta relación 28S/18S, podemos proponer que el ARN total obtenido presenta una integridad idónea para continuar con el análisis.

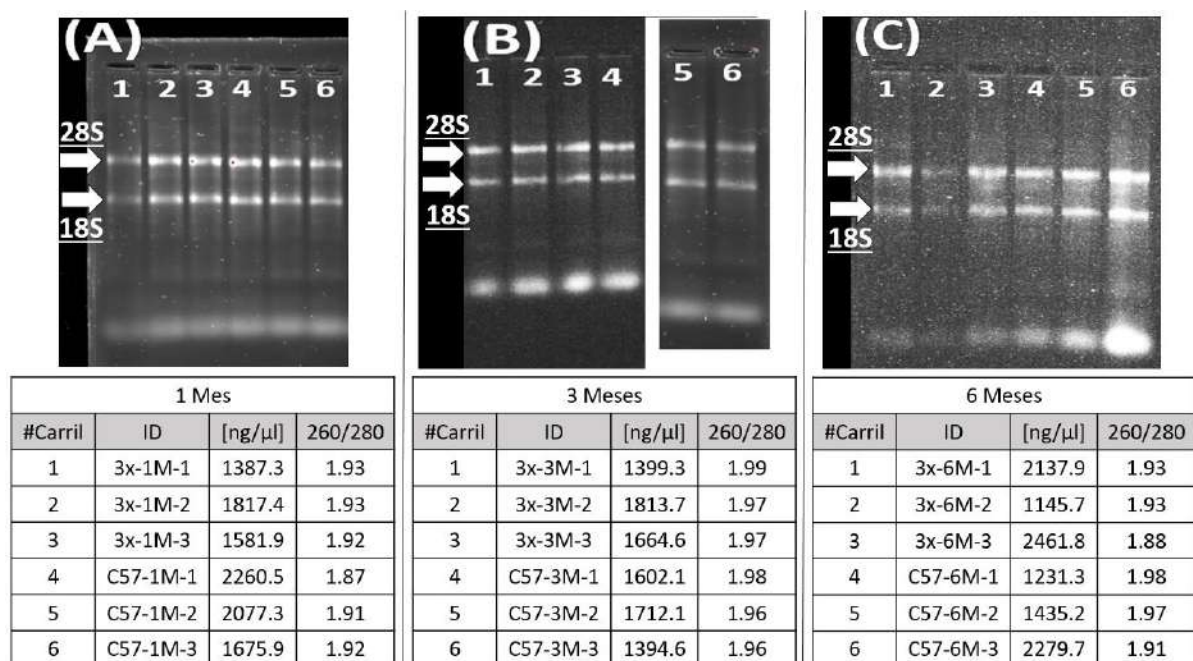


Figura 7. Evaluación de integridad del ARN total. En la imagen se muestra el análisis de integridad del ARN total extraído para los ratones 3xTg-AD y C57/BL-6 de 1 (A), 3 (B) y 6 (C) meses de edad. La primera y segunda banda en cada gel corresponden a las subunidades ribosomales 28S y 18S respectivamente. En las tablas debajo de cada gel, se identifican individualmente el # de carril, con el ID, de la muestra correspondiente a cada ratón, concentración del ARN total en ng/ $\mu$ l y OD 260/280.

#### 4.3. Estandarización de la amplificación de SNAT2 y 18S por PCR punto final

Se seleccionó un ADNc del hipocampo de un ratón C57/BL-6 al azar, y fue usado como material genético de partida para realizar PCR punto final con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de amplificación con los cebadores para 18S y SNAT2. El diseño de los cebadores para SNAT2, se realizó tomando en cuenta la temperatura de hibridación del gen endógeno 18S, anteriormente estandarizado y publicado. Con base a las temperaturas de hibridación calculadas *in-silico* se seleccionaron las temperaturas del ciclo de alineamiento a 53 °C, 58 °C y 63 °C. Una vez finalizada la amplificación por PCR punto final, los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 % durante 60 min a 60V.

En la Figura 8 se muestran los productos de amplificación para la subunidad ribosomal 18S (A) y SNAT2 (B). Es importante destacar que no se generó un amplicón en su control negativo (CN) para ninguna de las reacciones de ambos transcritos. En los geles se cargaron 5  $\mu$ l de la escalera de ADN que en este caso es de 100 pb(E). Asimismo, se puede ver claramente, los amplicones para 18S (151 pb) y SNAT2 (276 pb), como una única banda para cada producto de amplificación. Es importante resaltar que se observa el mismo amplicón con características muy similares a las distintas temperaturas de 53 °C, 58 °C y 63 °C en los carriles 2, 3 y 4 respectivamente.

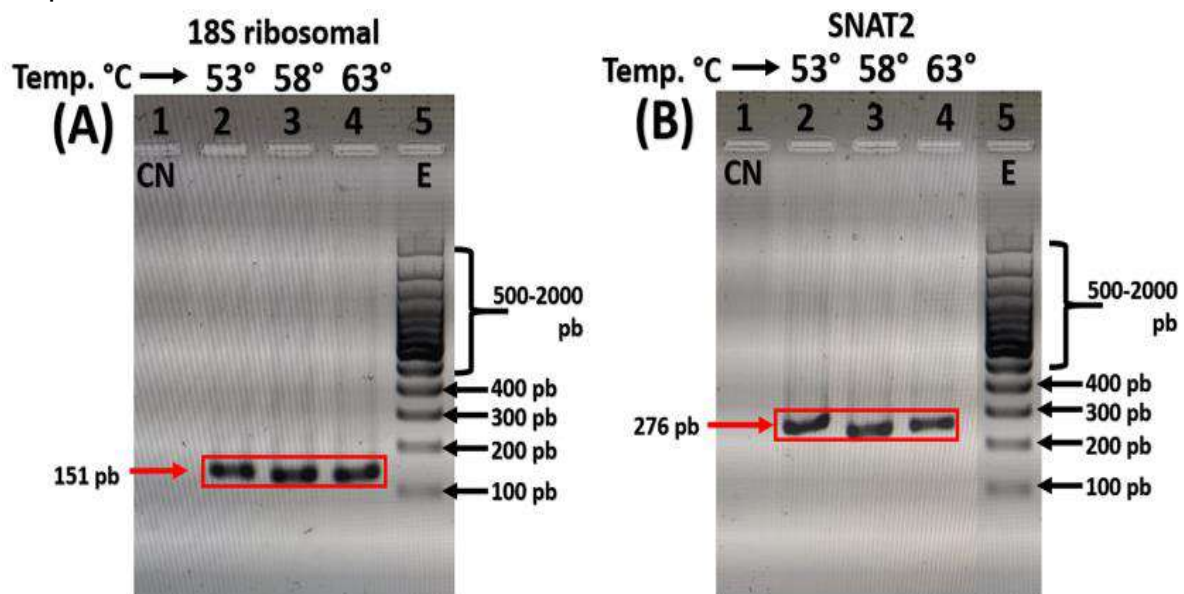


Figura 8. Estandarización de la amplificación con los cebadores para 18S y SNAT2. Se evaluó un gradiente de temperaturas por PCR punto final. (A) Amplicón de 18S de 151 pb. (B) Amplicón de SNAT2 de 276 pb. En ambos geles se usaron los carriles 2, 3 y 4 a las temperaturas de: 53 °C, 58 °C y 63 °C respectivamente. Carril 1 es el control negativo. Carril 5 corresponde a la escalera de 100 pb.

#### 4.4. Estandarización de amplificación por qPCR para 18S y SNAT2

Partiendo de las temperaturas de hibridación de los cebadores 18S y SNAT2 en la reacción de PCR punto final, se realizó la amplificación de los mismo amplicones por



qPCR buscando encontrar las condiciones óptimas de reacción con la máxima eficiencia. Se utilizó el kit "Master Mix SYBRGreen/ROX – Thermo Scientific".

En la Figura 9 se observa la gráfica de la cinética de reacción de amplificación por qPCR. Esta cinética, es el resultado de graficar la cantidad de fluorescencia capturada en el eje de las Y, por ciclo de reacción en el eje de las X. Se observa la fase inicial, logarítmica y de plateau por reacción. Las muestras amplificadas y los controles negativos sin ADNc fueron analizadas por duplicado. En azul y rojo, en el ciclo 10, se observa el punto de inflexión, en donde comienza la fase logarítmica de amplificación para 18S, mientras que, en gris y naranja, el punto de inflexión para la amplificación de SNAT2 en el ciclo 18. Los controles negativos de distintos colores sin ADNc, pero con los mismos componentes de reacción, se observan en la base de la gráfica sin mostrar amplificación.

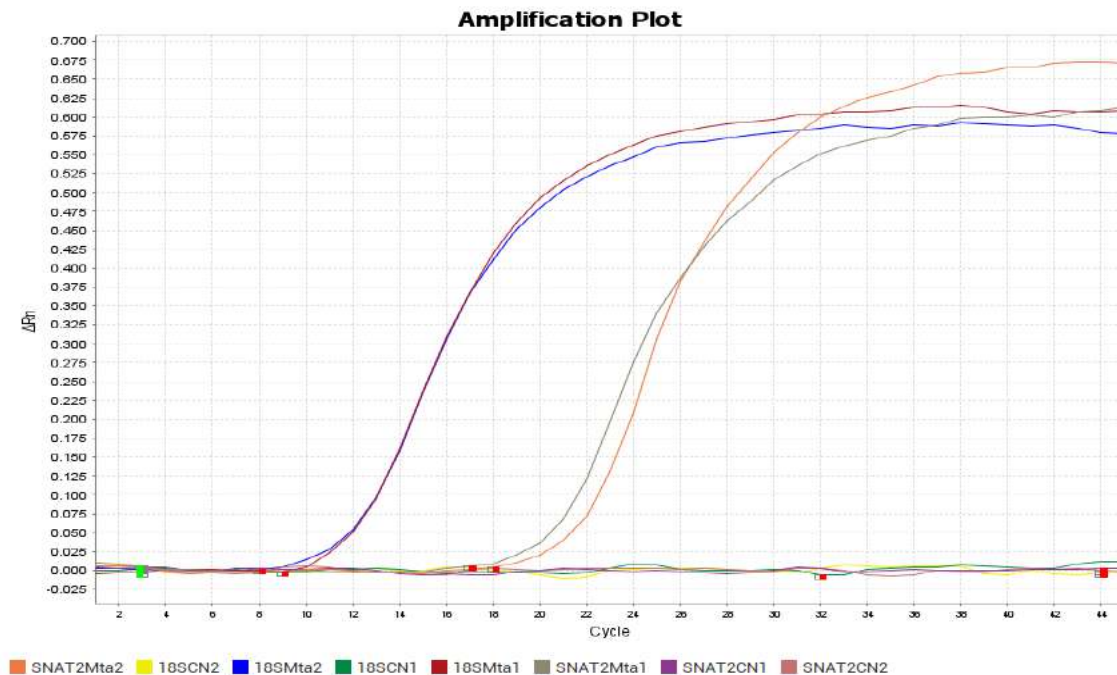


Figura 9. Cinética de reacción de amplificación para SNAT2 y 18S por qPCR. Muestras y controles negativos fueron analizados por duplicado utilizando una Tm de 52°C. Las curvas de la gráfica, representan la amplificación de SNAT2 y 18S. Las muestras se analizaron por duplicado así como las reacciones del control negativo correspondiente a cada par de cebadores.



4.5. Secuenciación de amplicones

Con la finalidad de verificar que el amplicón generado es realmente la secuencia esperada, los productos de amplificación para SNAT2 y 18S, fueron purificados y enviados a secuenciar a la unidad de Langebio – Cinvestav – Irapuato, México. Las secuencias enviadas por Langebio fueron comparadas con las secuencias de referencia de la base de datos del NCBI. En la Figura 10 se observan los resultados del análisis con el BLAST – NCBI. El inciso (A) muestra la correlación obtenida para SNAT2 de ratón con la secuencia identificada como NM\_175151.4, teniendo una identidad del 99%. El inciso (B) presenta los resultados para 18S, comparando con la secuenciación identificada como OW971800.1, que corresponde al cromosoma 17 de *Mus musculus* donde se presenta el gen que codifica para la subunidad 18S ribosomal, obteniendo una identidad del 98%.

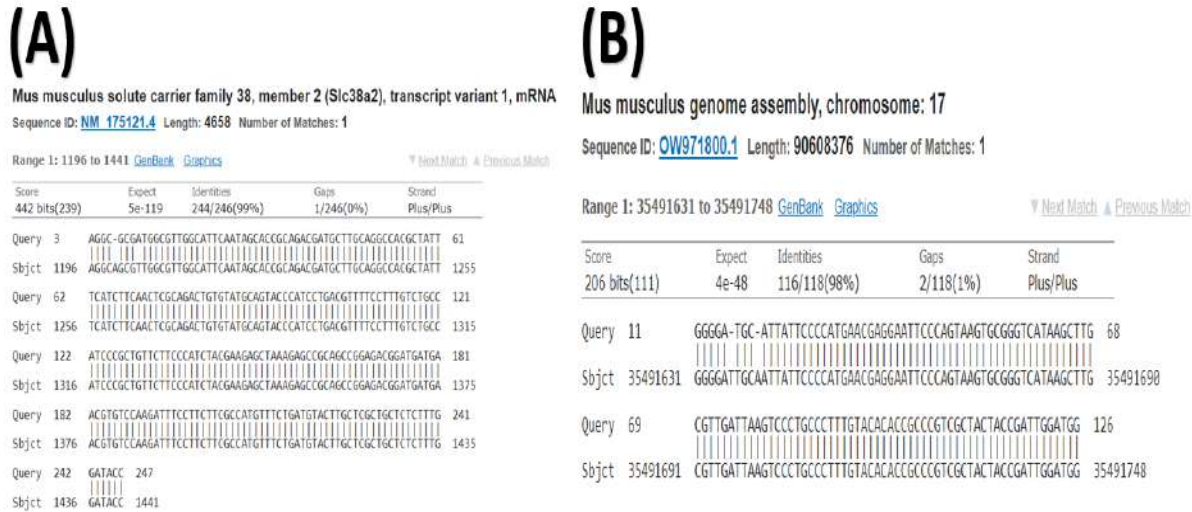


Figura 10. Comparación de la secuencia del producto amplificado de 18S y SNAT2 con las bases de datos NCBI. En la imagen se puede observar el análisis de identidad entre la secuencia amplificada por qPCR con las secuencias de referencia de la base de datos NCBI. Para SNAT2 (A) se obtuvo una identidad del 99% con la secuencia NM\_175152.4. Para 18S (B) fue del 98% comparándose con la secuencia OW971800.1.

4.6. Elaboración y validación de curvas estándar 18S y SNAT2

Partiendo del amplicón purificado y secuenciado, se realizaron diluciones seriadas

de concentraciones conocidas de los amplicones para los ARNm de interés, con la finalidad de realizar una curva estándar para SNAT2 y 18S. Al ser el 18S un gen de expresión constante, el número de copias de ARNm codificante será mayor en comparación al SNAT2, por lo tanto, requiere de un menor número de ciclos para ser detectable, dando un valor de  $C_T$  cercano a los 10 ciclos. En cambio, el SNAT2 al tener menos número de copias de ARNm, necesita más ciclos para que la señal pueda ser detectable, dando un  $C_T$  próximo a los 20 ciclos. Debido a esta diferencia en los niveles de expresión, se realizaron curvas de distintas concentraciones en cada gen tomando en cuenta los valores de  $C_T$  esperados para cada uno. En la Figura 11 (A) se observan las cinéticas de reacción para 18S en concentraciones [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]; [ $1 \times 10^{-5}$ ] en rojo, [ $1 \times 10^{-6}$ ] en azul, [ $1 \times 10^{-7}$ ] en verde, [ $1 \times 10^{-8}$ ] en amarillo, [ $1 \times 10^{-9}$ ] en gris y en naranja los controles negativos de amplificación sin ADNc. En todos los casos, las reacciones se realizaron por duplicado. En la Figura 11 (B) se muestran las cinéticas de reacción para SNAT2 a las concentraciones; [ $1 \times 10^{-8}$ ] en rojo, [ $1 \times 10^{-9}$ ] en azul, [ $1 \times 10^{-10}$ ] en verde, [ $1 \times 10^{-11}$ ] en amarillo y en naranja el control negativo, igualmente en todos los casos las reacciones se realizaron por duplicado. En la tabla inferior de cada gráfica se muestran los valores de  $C_T$  para cada punto de la curva, así como la eficiencia de reacción. Se calculó la eficiencia de reacción con la fórmula  $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ , sustituyendo en la fórmula el valor de la pendiente reportado por el programa "QuantStudio™ Design & Analysis Software" de qPCR. Las eficiencias de reacción fueron de 1.87 y 1.90 para la curva de 18S y SNAT2 respectivamente.

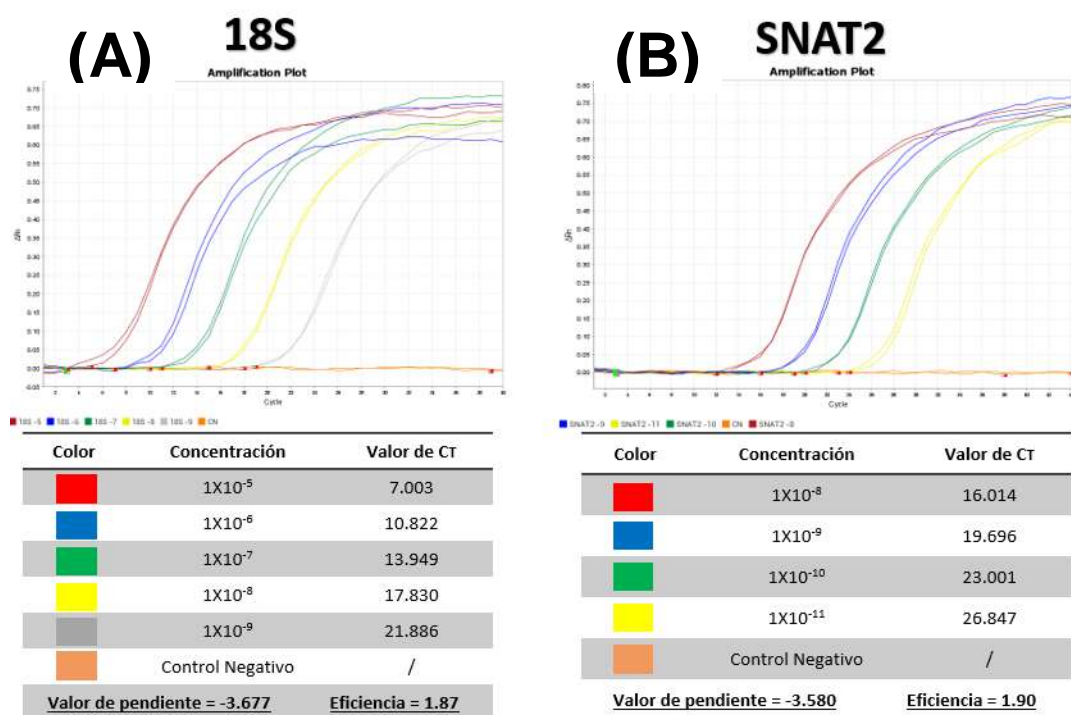


Figura 11. Curvas estándar para SNAT2 y 18S en qPCR. Cada punto de la curva analizado se realizó por duplicado, así como el control negativo. (A) Curva obtenida para 18S de concentraciones [ $1 \times 10^{-5}$ ] hasta [ $1 \times 10^{-9}$ ]. (B) Curva obtenida para SNAT2 de concentraciones [ $1 \times 10^{-8}$ ] hasta [ $1 \times 10^{-11}$ ]. Los valores de eficiencia obtenidos son de 1.87 y 1.90 para 18S y SNAT2 respectivamente.

Con los valores de  $C_T$  obtenidos con cada punto de la de la curva estándar, se graficó: la concentración base al LOG10 del punto de la curva en [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ], frente al valor de  $C_T$  obtenido para cada punto. Partiendo de la gráfica se realizó una línea de tendencia para calcular la ecuación de la recta, con el objetivo de posteriormente con esa ecuación, sustituir el  $C_T$  de las muestras problema y calcular la concentración de ARNm en el hipocampo del ratón. La ecuación de la curva para 18S fue:  $y = -3.6774x - 11.444$  y para SNAT2  $y = -3.5804x - 12.624$ .

#### 4.7. Cuantificación de los niveles de expresión de 18S y SNAT2 en hipocampus murinos por qPCR

Se analizaron las muestras de ADNc, de cada uno de los ratones por triplicado, para evaluar la expresión del gen endógeno 18S, así como el gen problema SNAT2. Los

animales fueron separados en distintos grupos con base al modelo murino y la edad. Los 6 grupos formados fueron los siguientes:

Grupo 1: 3xTg-AD de 1 mes

Grupo 2: 3xTg-AD de 3 meses

Grupo 3: 3xTg-AD de 6 meses

Grupo 4: C57/BL-6 de 1 mes

Grupo 5: C57/BL-6 de 3 meses

Grupo 6: C57/BL-6 de 6 meses

En cada medición se analizó un punto de la curva estándar original, tanto para 18S como para SNAT2, con la finalidad de realizar un ajuste interno del software con base a la curva original generada con antelación y así cuantificar las muestras problema. En la Figura 12 se representa las cinéticas de reacción y la curva de disociación, para el gen 18S (A) y para SNAT2 (B). En color azul para la línea murina C57/BL-6, en color rojo para los ratones 3xTg-AD, en color verde el punto de la curva analizado y en gris el control negativo.

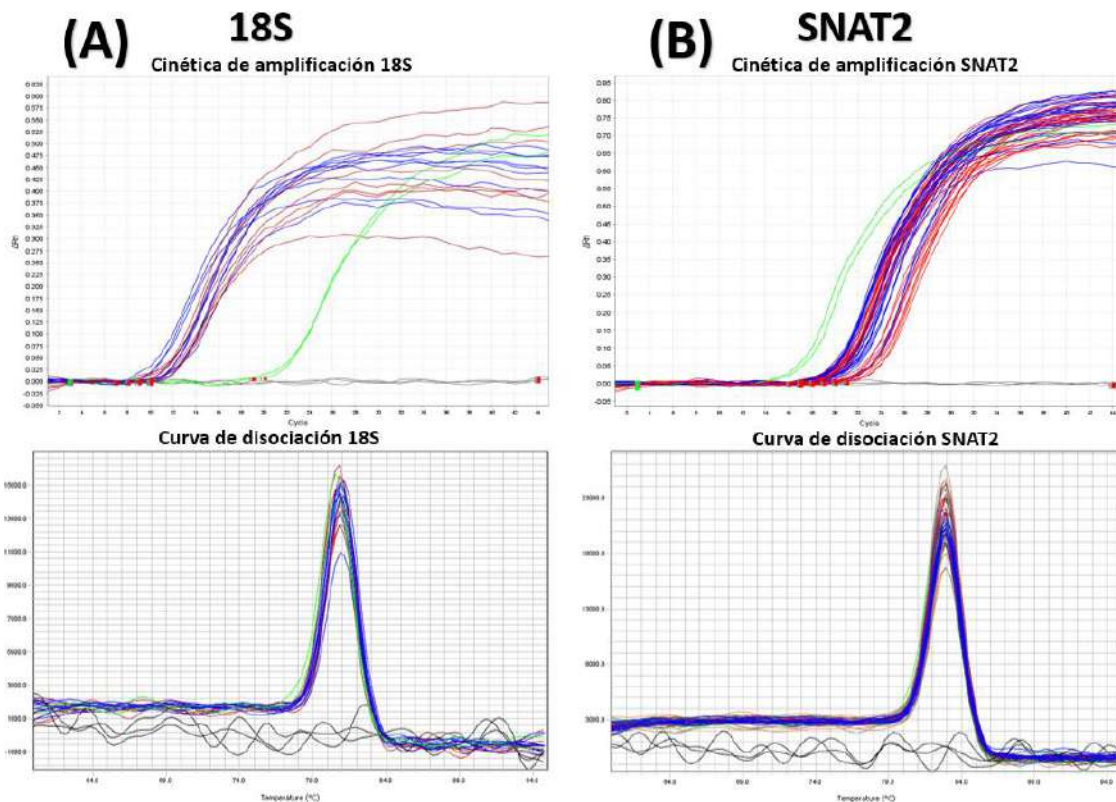


Figura 12. Cinética de amplificación y curva de disociación de los amplicones para 18S y SNAT2. En la imagen se observan las cinéticas de reacción y las curvas de disociación para 18S (A) y SNAT2 (B). Las líneas en color azul corresponden a los ratones de fondo genético C57/BL-6, las líneas en color rojo al modelo 3xTg-AD, las líneas en color verde se presentan los puntos de la curva estándar analizados previamente para ambos genes y en color gris se muestran los controles negativos de cada reacción.

Después de analizar por qPCR las muestras de los ratones 3xTg-AD y C57/BL-6 de 1, 3 y 6 meses de edad, se despejó  $x$  de las ecuaciones de la recta para cada gen. En el caso de 18S el despeje de la ecuación fue  $x = \frac{y+11.444}{-3.6774}$  y para SNAT2  $x = \frac{y+12.624}{-3.5804}$ . Los valores de  $C_T$  obtenidos para cada muestra analizada por triplicado fueron promediados. Se sustituyó el valor promediado en  $y$  para cada ecuación, pudiendo de esta forma cuantificar los niveles de expresión de SNAT2 y 18S. Se

normalizó el valor de SNAT2 con respecto al gen endógeno 18S en cada una de las muestras analizadas, obteniendo un valor conocido como ratio. Posteriormente los valores ratio obtenidos de los 3 ratones de cada grupo fueron promediados, calculando además su desviación estándar, como se muestra en la Tabla 12.

**Tabla 12. Datos obtenidos del análisis cuantitativo de SNAT2 del ADNc de hipocampo**

<b>Grupo</b>	$\bar{X}$ Ratio (SNAT2/18S)	Desviación estándar
<b>3xTg-AD 1M</b>	1.417	0.027
<b>3xTg-AD 3M</b>	1.401	0.030
<b>3xTg-AD 6M</b>	1.448	0.089
<b>C57/BL-6 1M</b>	1.429	0.067
<b>C57/BL-6 3M</b>	1.452	0.069
<b>C57/BL-6 6M</b>	1.502	0.030

Con los valores ratio obtenidos en cada grupo se realizó un análisis estadístico por ANOVA usando un valor de  $p=0.05$ , confianza del 95%. En la Figura 13 se representa un gráfico con los valores. En el eje de las "x" se grafica cada ratón, de acuerdo a su grupo y edad, y en el eje de las "y" se grafica el valor ratio obtenido al normalizar la cuantificación de SNAT2 respecto al gen endógeno 18S. Los puntos en color rojo corresponden a los ratones 3xTg-AD y en negro los ratones control C57/BL-6, todos los puntos con su desviación estándar. No se encontró diferencia estadística significativa al comparar las medias entre todos los grupos.

## Niveles de expresión génica de SNAT2

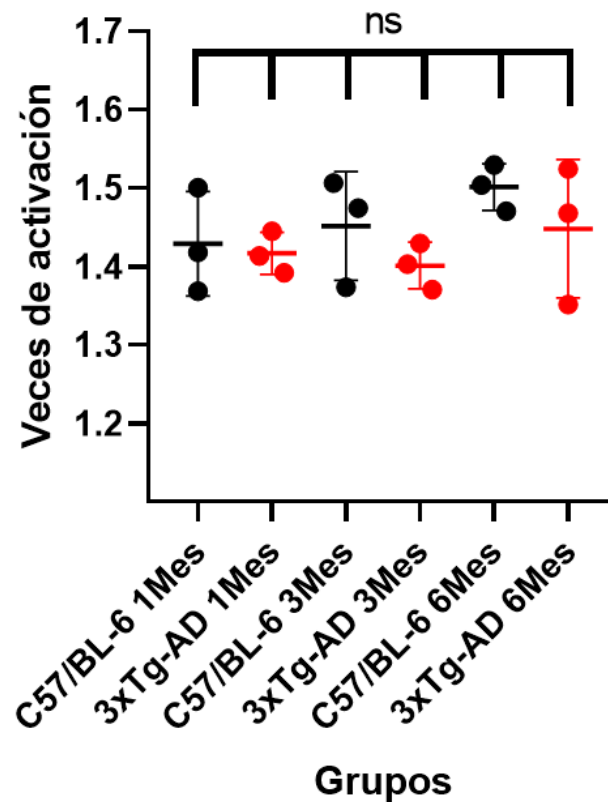


Figura 13. Niveles de expresión génica de SNAT2. En color rojo se representan los 3 grupos de los ratones 3xTg-AD. En negro se muestran los ratones control C57/BL-6. Las líneas en cada grupo corresponden a la media con su desviación estándar, en todos los casos se representa la desviación estándar.

En la Figura 14 se representan las veces de activación de SNAT2 a través de un gráfico de dispersión. En este caso se comparó en una línea de tiempo en meses, en el eje de las "x", frente a los niveles de expresión en cada animal del transportador con sus respectivas desviaciones estándar, en el eje de las "y". En color rojo se muestra la expresión de SNAT2 para los ratones 3xTg-AD, mientras que en color negro los valores de los ratones C57/BL-6, en todos los casos con sus respectivas desviaciones estándar. Mediante este gráfico es posible comparar la tendencia de expresión de SNAT2 a lo largo del tiempo entre los dos genotipos. Los ratones control C57/BL-6 muestran un aumento de forma progresiva con la edad. Mientras que en los ratones 3xTg-AD no se observan diferencias significativas en la expresión de

SNAT2 en el primer mes de vida, mientras que en el tercero, hay una clara disminución en la tendencia de expresión de SNAT2, que se recupera paulatinamente hacia el sexto mes de vida de los animales, recuperando la expresión de forma significativa, aunque manteniendo una disminución respecto al modelo C7BL6 de la misma edad.

### Análisis de expresión génica de SNAT2 en un curso temporal

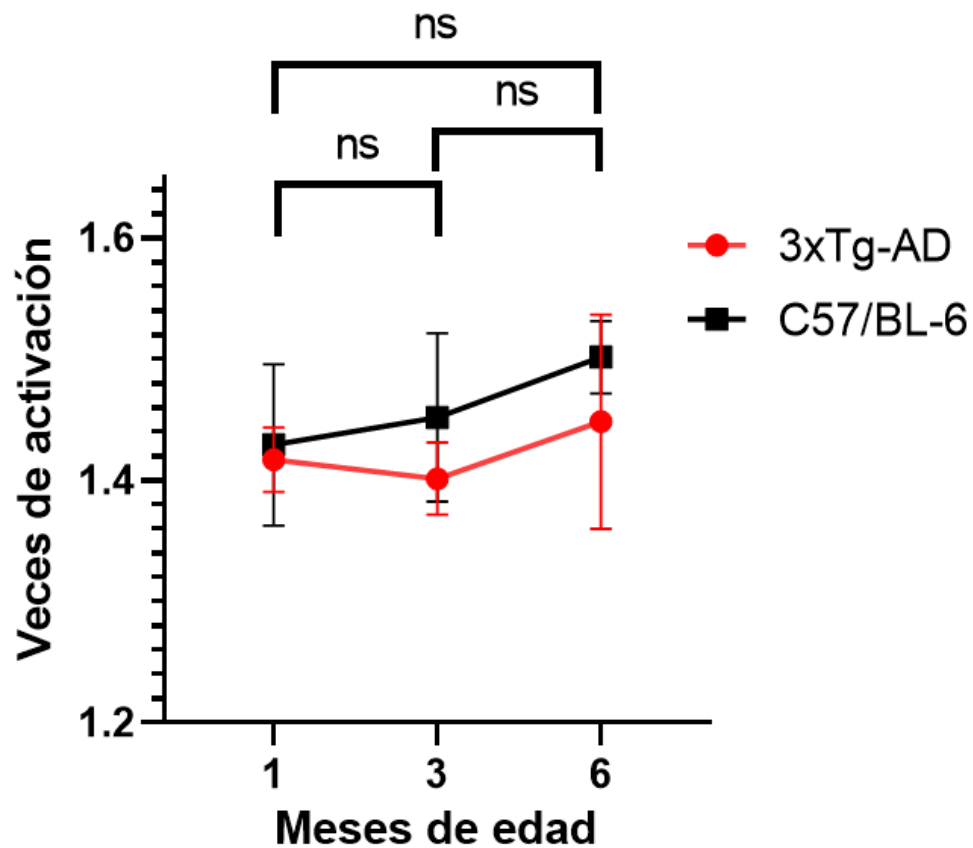


Figura 14. Análisis de expresión génica de SNAT2 en un curso temporal. La línea en color negro representa los valores de los ratones de fondo genético C57/BL-6. La línea en color rojo muestra los valores del modelo 3xTg-AD.



## 5. DISCUSIÓN

El estudio del cerebro, la interconexión entre sus estructuras y el metabolismo, son aspectos esenciales para comprender a detalle su funcionamiento en condiciones fisiológicas y esclarecer el origen de las patologías que conllevan a un proceso crónico neurodegenerativo. Entre las distintas estructuras críticas para la función cerebral, el hipocampo juega un rol crucial por su participación en la formación de nuevos recuerdos, la memoria y el pensamiento espacio-temporal (Sridhar et al., 2023). La importancia del hipocampo resalta aún más, cuando consideramos su relación con la EA. Es en esta región que se describe con mayor frecuencia afectaciones durante las primeras etapas de esta patología, asociándose directamente con la pérdida de memoria y déficit cognitivo que incrementa gradualmente (Whitfield et al., 2023).

Las conexiones sinápticas que establecen las neuronas hipocampales con otras neuronas de distintas regiones cerebrales es inmensa. Sin embargo, son de particular atención aquellas que se asocian con la corteza cerebral en donde se controlan funciones vitales del organismo. Estas sinapsis operan de forma sincrónica, integrando distintos estímulos con la finalidad de recibir, procesar y enviar señales de respuesta entre una neurona a otra (Y. Yu et al., 2023). La comunicación interneuronal es inducida mediante neurotransmisores a través de la denominada sinapsis tripartita. En particular en el hipocampo, son preponderantes las sinapsis glutamatergicas, denominadas así debido a que el neurotransmisor partícipe de dicha sinapsis es el Glu. El mecanismo a través del cual el Glu realiza su función señalizadora es a través de su liberación desde la neurona presináptica, este Glu localizado en la hendidura sináptica, está a una concentración tan alta, que es capaz de activar a los receptores glutamatergicos localizados en la neurona postsináptica. Finalmente, el astrocito es el encargado de internalizar y metabolizar el Glu excedente, evitando la sobreexcitación de los receptores y consecuentemente una neurocitotoxicidad. Por lo tanto, la regulación de la concentración del Glu espacio-temporal, es esencial para mantener funcional la sinapsis química y evitar la sobreactivación de los receptores NMDA, AMPA y Kainato (Kritis et al., 2015).

Bajo condiciones fisiológicas, esta homeostasis se mantiene, gracias a la acción coordinada de los transportadores, enzimas y iones, asociados al reciclaje y biosíntesis del Glu y su precursor la Gln, en el CGG. En contraparte, en condiciones patológicas, se han descrito alteraciones en la función o expresión de los componentes que integran el CGG (Andersen et al., 2022). Estas modificaciones implican un déficit en el metabolismo celular que impacta en la sinapsis neuronal participando de esta forma en la neurodegeneración. Incluso se han detallado cambios severos presentes tanto en pacientes con EA como en modelos murinos transgénicos con fenotipo histopatológico tipo EA.

Una molécula clave del CGG es el transportador de aa dependiente de  $\text{Na}^+$  SNAT2. Esta proteína se ubica en la membrana citoplasmática de las neuronas presinápticas, en donde junto con el SNAT1 son los encargados de internalizar la Gln del espacio extracelular, para ser convertida posteriormente a Glu, regulando la homeostasis de aa y la síntesis de neurotransmisores (Nardi et al., 2015). Interesantemente, Patel y colaboradores en el 2019 reportaron en hipocampo un aumento en la expresión génica de SNAT2 en pacientes *postmortem* con EA de edad avanzada (Patel et al., 2019). Resultados también encontrados por Crist y colaboradores en el 2021 usando un modelaje metodológico similar (Crist et al., 2021). No obstante, aún se desconocen los cambios en los patrones de expresión de SNAT2 previo y durante el desarrollo de la EA.

En este contexto, los modelos transgénicos como el 3xTg-AD que ha demostrado desarrollar marcadores histológicos y conductas similares a la EA, son relevantes y útiles para analizar la expresión génica de SNAT2 en hipocampo. Dando oportunidad a entender la contribución de este transportador sobre procesos biológicos y posibles mecanismos moleculares subyacentes a la neurodegeneración. En el presente estudio, se valoró la expresión de SNAT2 a la edad de 1 mes previo a un daño neuronal, al 3<sup>er</sup>. mes cuando desarrolla alteraciones histológicas y al 6<sup>to</sup>. mes cuando se perciben cambios conductuales y daño patológico tipo EA. Los resultados obtenidos en este estudio no mostraron cambios estadísticamente significativos al comparar la expresión de SNAT2 en los ratones 3xTg-AD y C57/BL-6 (modelo

control) de la misma edad. Aunque los hallazgos obtenidos mostraron un patrón de expresión génica intrigante a lo largo del tiempo para los ratones transgénicos a diferencia de los ratones control (Figura 14).

De manera interesante, en el 1er mes ambos modelos murinos presentaron niveles de expresión similares, no fue hasta el 3er mes donde se observó una disminución de SNAT2 en los 3xTg-AD en comparación a los controles. Interesantemente, estos resultados están en línea con los obtenidos por Villaseñor en el 2019, quien reportó una disminución en la expresión proteica de SNAT2 en hipocampo de ratones 3xTg-AD de 30 - 45 días postnatales (datos no publicados), proponiendo una desregulación transcripcional/proteica que puede impactar en el metabolismo y sinapsis neuronal previo a los daños histológicos cerebrales tipo EA. La disminución de la expresión transcripcional/proteica del SNAT2 observada en esta edad, nos indica una desregulación metabólica previo a los daños histológicos, impactando en la captación de aa, síntesis de neurotransmisores y la sinapsis neuronal. Estas variaciones bioquímicas podrían estar generando una respuesta adaptativa de las células, alterando la expresión de SNAT2, sugiriendo su correlación con eventos tempranos que desencadenan la patología. Asimismo, al 6to mes ambos modelos mostraron un aumento en la expresión de SNAT2, aunque en menor proporción en el modelo transgénico. Este aumento en los 3xTg-AD podría deberse a una respuesta compensatoria antes los cambios histológicos predominantes en el cerebro de los ratones, principalmente del péptido  $\beta$ A, que generan un descontrol metabólico de la glucosa y sinapsis, en conjunto con estrés oxidativo (Allaman et al., 2010). Esto provocaría en las neuronas una activación de mecanismos de regulación ante periodos de estrés. La síntesis *de novo* y la translocación hacia la membrana de la proteína SNAT2 previamente formada, en respuesta a estímulos intracelulares y extracelulares, insinúan un papel multifacético por parte del transportador (Menchini & Chaudhry, 2019). Siendo pieza clave para la regulación en los procesos cerebrales.

La respuesta compensatoria de SNAT2 puede entenderse mejor si lo comparamos contra el SNAT1, proteína transportadora también presente en hipocampo con gran homología estructural y secuencial (Pizzagalli et al., 2021). Ambos transportadores

son expresados fisiológicamente de forma similar. No obstante, SNAT2 es capaz de aumentar su expresión ante condiciones de estrés osmótico, hipertonicidad (Alfieri et al., 2001; Menchini & Chaudhry, 2019) y cuando existe privación de aa, principalmente de la Glu (Grewal et al., 2009; Novak et al., 2006). En cambio, la expresión de SNAT1 permanece constante durante periodos largos ante la falta de aa (Grewal et al., 2009; Hellsten et al., 2018). Entendiendo que a través de SNAT2, las células son capaces de adquirir una respuesta adaptativa ante cambios perjudiciales.

Un comportamiento similar en los niveles de expresión génica, también puede observarse con los transportadores encargados de exportar Gln del astrocito, el SNAT3 y SNAT5. Bajo condiciones fisiológicas, muestran una expresión similar, indicando una regulación equilibrada (Rodríguez et al., 2014). Pero, cuando las neuronas corticales de ratón experimentan privación de aa, se reportó una divergencia en su expresión: SNAT3 disminuye, mientras que SNAT5 aumenta radicalmente (Hellsten et al., 2018). Esto sugiere una respuesta adaptativa dependiendo de la disponibilidad de nutrientes como lo observado por SNAT2, resaltando su capacidad para ajustarse a las necesidades metabólicas.

Otros transportadores que han revelado una dinámica similar a los SNAT además de ser importantes para el CGG y la regulación del metabolismo, son las proteínas responsables de internalizar el Glu al astrocito, el GLT-1 (EAAT2) y el GLAST (EAAT1). Zumkehr y colaboradores reportaron una disminución significativa de expresión génica y proteica en hipocampo en ratones 3xTg-AD de GLT-1, pero no así de GLAST, durante los meses 2, 6 y 23 de edad (Zumkehr et al., 2015). Utilizando como base estos resultados reportados, complementado con las distintas alteraciones en expresión de los componentes que integran el CGG, nos permiten proponer un mecanismo que busca clarificar el papel de los transportadores en los cambios bioquímicos antes y durante el desarrollo patológico, como se representa en la Figura 15 (A). Estas variaciones en expresión sugieren que debido a la falta de proteínas transportadores de Glu, este neurotransmisor aumenta su concentración en la hendidura sináptica, generando la sobreactivación de los receptores NMDA,

AMPA y Kainato, teniendo implicaciones en la excitotoxicidad asociada a la neurodegeneración observada en la EA (S. P. Yu et al., 2023), Figura 15 (B). Un claro ejemplo que respalda esta observación además de mostrar resultados similares a los de Zumkher y colaboradores, fue determinado a partir del ratón transgénico A $\beta$ PP23, que ha sido objeto de estudio por desarrollar patología  $\beta$ A tipo EA. A la edad de 8 meses el ratón presentó una disminución de la expresión proteica en hipocampo de GLT-1 y GLAST, lo que coincide con el incremento del Glu extracelular determinado en los ratones (Schallier et al., 2011), Figura 15 (B). Divergente a estos resultados, Kulijewics-Nawrot y colaboradores no determinaron cambios en la expresión glial de GLT-1 entre el 1er y 9no mes de los ratones 3xTg-AD. Sin embargo, si reportaron un decrecimiento significativo en la GS, encargada de convertir el Glu a Gln en el astrocito, al 1er mes en un 17% y al 6to mes en un 27% (Kulijewicz-Nawrot et al., 2013), Figura 15 (E). Este hallazgo cobra más relevancia si consideramos los estudios realizados en cultivos neuronales murinos. Donde se demostró que los oligómeros  $\beta$ A<sub>1-42</sub> impiden la recaptura del Glu presente en el espacio extracelular, bloqueando los receptores GLAST y GLT-1 ubicados en el astrocito (Tong et al., 2017), Figura 15 (C). Esta interferencia en el reciclaje, en conjunto con la disminución en la expresión de los transportadores GLAST, GLT-1 y la enzima convertidora GS, podría ser desencadenante de la baja del Glu dentro del astrocito, reduciendo la síntesis de Gln, disminuyendo su exportación al espacio extracelular, percibido tanto por SNAT2 como por SNAT5, aumentando así su expresión como lo observado ante periodos de privación de aa (Grewal et al., 2009; Hellsten et al., 2018), Figura 15 (D).

Si bien la mayoría de estos cambios ocurren en el astrocito, en las neuronas se ven alterados tanto el SNAT2 como los transportadores vesiculares de Glu (vGLUT) también, encargados de internalizar el Glu sintetizado en la neurona hacia las vesículas que lo almacenan, para posteriormente ser liberados en la sinapsis glutamatergica. El transportador principalmente afectado es el vGLUT1, presente en hipocampo y corteza cerebral (Freneau et al., 2004). Cassano y colaboradores reportaron la disminución en la expresión proteica de vGLUT1 en células

hipocampales y corticales del ratón 3xTg-AD a la edad de 18 meses (Cassano et al., 2012). Estos resultados pueden asociarse a un mecanismo que busca contrarrestar los altos niveles de Glu extracelular, reduciendo su cantidad internalizada en vesículas limitando su liberación neuronal, siendo un elemento de respuesta o

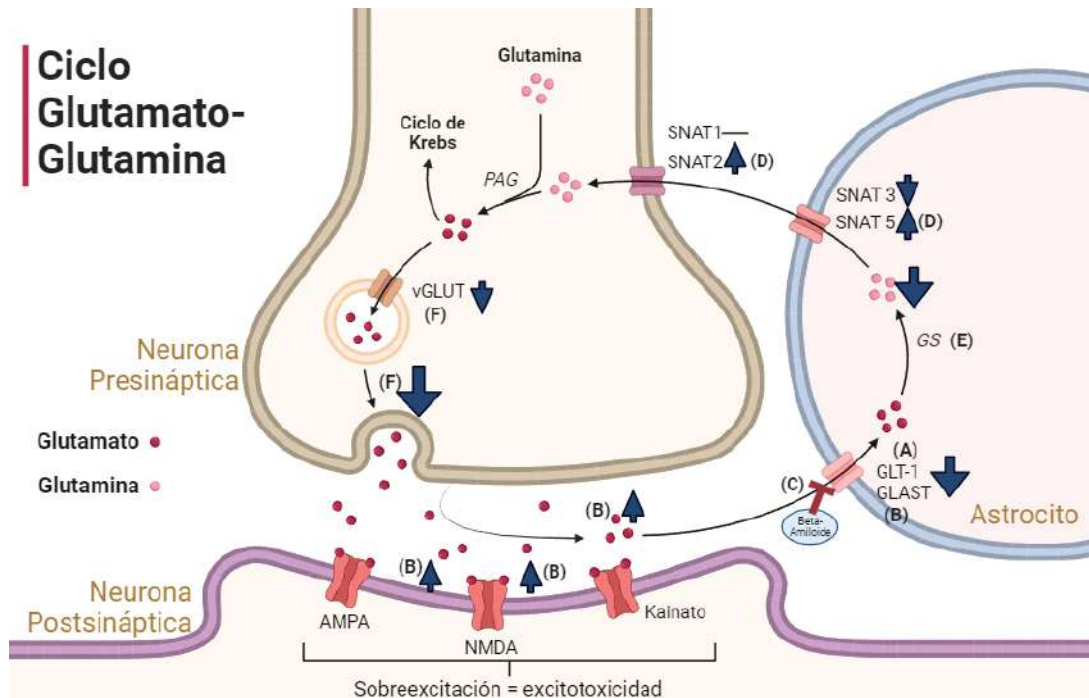


Figura 15. Cambios metabólicos en el CGG. Mecanismo propuesto de los cambios observados en el CGG durante el desarrollo neuropatológico. Las alteraciones abarcan desde un aumento en la expresión génica y/o proteica de SNAT5 y SNAT2 (D), hasta disminución de GLT-1, GLAST (B), GS (E), SNAT3 (D), Vglut (F) y sobreexcitación de los receptores de Glu (B) causando protección Figura 15 (F).

Los hallazgos, en su mayoría procedentes de modelos murinos transgénicos como el 3xTg-AD que reproducen rasgos vinculados a la enfermedad de Alzheimer, coinciden con las observaciones efectuadas en investigaciones que utilizaron muestras postmortem de individuos con Alzheimer. En ambas situaciones, se han descubierto perturbaciones similares en la expresión de los elementos del CGG. Por ejemplo, existe una reducción en la expresión proteica de GLT-1 en corteza cerebral (Garcia-Esparcia et al., 2018). Algo reportado en el 3xTg-AD en hipocampo (Schallier et al., 2011; Zumkehr et al., 2015). También se ha reportado la reducción de la

expresión proteica del vGLUT1 en diferentes regiones del cerebro, como la corteza (Rodríguez-Perdigon et al., 2016), corteza prefrontal (Kashani et al., 2008) y regiones occipitales y parietales (Kirvell et al., 2006). Incluyendo el aumento de la expresión génica de SNAT2 en hipocampo (Crist et al., 2021; Patel et al., 2019).

Si bien en este proyecto no se encontraron diferencias estadísticas significativas, si se perciben como una tendencia en el patrón de expresión génica de SNAT2 a través del tiempo, comparando al ratón 3xTg-AD tipo EA con su control, esto puede deberse al limitado número de muestras analizadas. Cabe destacar que, aunque los ratones transgénicos han sido sometidos a una caracterización histológica y conductual exhaustiva en estudios previos (Sterniczuk, Antle, et al., 2010; Sterniczuk, Dyck, et al., 2010), aún persisten sutiles variaciones temporales en la aparición de las anomalías cerebrales entre murinos de la misma edad. Este fenómeno refleja la complejidad de la patología tipo EA y la variabilidad en la respuesta individual. A pesar de esto, los cambios en los patrones de expresión sugieren una posible implicación del transportador SNAT2 con el desarrollo neuropatológico. El mecanismo propuesto en esta investigación busca comprender mejor los cambios metabólicos que se dan antes y durante las alteraciones histopatológicas tipo EA. Es evidente que aún queda mucho por descubrir ante la complejidad de un mecanismo de este tipo. Futuros estudios serán esenciales para proporcionar datos que complementan nuestra información, siendo cruciales en la comprensión de la evolución patológica, buscando finalmente identificar marcadores tempranos de la EA.

## **6. CONCLUSIONES**

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de SNAT2 entre los hipocampos del modelo murino 3xTg-AD y C57/BL-6 a las edades de 1, 3 y 6 meses.

Al comparar los ratones transgénicos 3xTg-AD y los controles C57/BL-6 a los 3 meses de edad, se observaron cambios en los patrones de expresión génica del transportador SNAT2.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alfieri, R. R., Petronini, P.-G., Bonelli, M. A., Caccamo, A. E., Cavazzoni, A., Borghetti, A. F., & Wheeler, K. P. (2001). Osmotic Regulation of ATA2 mRNA Expression and Amino Acid Transport System A Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(1), 174-178. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4729>
- Allaman, I., Gavillet, M., Bélanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H. A., & Magistretti, P. J. (2010). Amyloid- $\beta$  Aggregates Cause Alterations of Astrocytic Metabolic Phenotype: Impact on Neuronal Viability. *The Journal of Neuroscience*, 30(9), 3326-3338. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010>
- Allegri, R. F., Arizaga, R. L., Bavec, C. V., Colli, L. P., Demey, I., Fernández, M. C., Frontera, S. A., Garau, M. L., Jiménez, J. J., Golimstok, Á., Kremer, J., Labos, E., Mangone, C. A., Ollari, J. A., Rojas, G., Salmini, O., Ure, J. A., & Zuin, D. R. (2011). Enfermedad de Alzheimer. Guía de práctica clínica. *Neurología Argentina*, 3(2), 120-137. [https://doi.org/10.1016/S1853-0028\(11\)70026-X](https://doi.org/10.1016/S1853-0028(11)70026-X)
- Allinson, J. L. (2018). Clinical biomarker validation. *Bioanalysis*, 10(12), 957-968. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0061>
- Andersen, J., Schousbe, A., & Verkhratsky, A. (2022). Astrocyte energy and neurotransmitter metabolism in Alzheimer's disease: Integration of the glutamate/GABA-glutamine cycle,. *Progress in Neurobiology*, 217.
- Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., De Silva, R., Tucker, K. L., Barde, Y.-A., Duff, K., & Davies, P. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms: Pathology of non-mutant tau in transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*, 86(3), 582-590. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01879.x>
- Arastoo, M., Lofthouse, R., Penny, L. K., Harrington, C. R., Porter, A., Wischik, C. M., & Palliyil, S. (2020). Current progress and future directions for Tau-based fluid biomarker diagnostics in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8673. <https://doi.org/10.3390/ijms21228673>
- Arbor, S. C., LaFontaine, M., & Cumbay, M. (2016). Amyloid-beta Alzheimer targets—Protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. 5-21.
- Armstrong, R. A. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 57(2), 87-105. <https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 263-293. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
- Bagnoli, S., Piaceri, I., Sorbi, S., & Nacmias, B. (2014). Advances in imaging–genetic relationships for Alzheimer's disease: Clinical implications. *Neurodegenerative Disease Management*, 4(1), 73-81. <https://doi.org/10.2217/nmt.13.68>
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 52, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Behl, T., Kaur, I., Fratila, O., Brata, R., & Bungau, S. (2020). Exploring the Potential of Therapeutic Agents Targeted towards Mitigating the Events Associated with Amyloid- $\beta$  Cascade in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7443. <https://doi.org/10.3390/ijms21207443>
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*, 18(1), e12873. <https://doi.org/10.1111/accel.12873>
- Bodakuntla, S., Jijumon, A. S., Villablanca, C., Gonzalez-Billault, C., & Janke, C. (2019). Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 29(10), 804-819. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.07.004>
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. (2017). Alzheimer's Disease: Past, Present,

and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 23(9-10), 818-831. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>

Bröer, S. (2014). The SLC38 family of sodium–amino acid co-transporters. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 466(1), 155-172. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1393-y>

Caillet-Boudin, M.-L., Buée, L., Sergeant, N., & Lefebvre, B. (2015). Regulation of human MAPT gene expression. *Molecular Neurodegeneration*, 10(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0025-8>

Carvajal, C. C. (2016). Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Medicina Legal de Costa Rica*, 33, 19.

Cassano, T., Serviddio, G., Gaetani, S., Romano, A., Dipasquale, P., Cianci, S., Bellanti, F., Laconca, L., Romano, A. D., Padalino, I., LaFerla, F. M., Nicoletti, F., Cuomo, V., & Vendemiale, G. (2012). Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 33(6), 1121.e1-1121.e12. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.021>

Chen, C., Wang, J., Cai, R., Yuan, Y., Guo, Z., Grewer, C., & Zhang, Z. (2016). Identification of a Disulfide Bridge in Sodium-Coupled Neutral Amino Acid Transporter 2 (SNAT2) by Chemical Modification. *PLOS ONE*, 11(6), e0158319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158319>

Chen, Y., Liang, Z., Blanchard, J., Dai, C.-L., Sun, S., Lee, M. H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Liu, F., & Gong, C.-X. (2013). A Non-transgenic Mouse Model (icv-STZ Mouse) of Alzheimer's Disease: Similarities to and Differences from the Transgenic Model (3xTg-AD Mouse). *Molecular Neurobiology*, 47(2), 711-725. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8375-5>

Chiu, M., Taurino, G., Bianchi, M. G., Dander, E., Fallati, A., Giuliani, N., D'Amico, G., & Bussolati, O. (2020). Functional Consequences of Low Activity of Transport System A for Neutral Amino Acids in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1899. <https://doi.org/10.3390/ijms21051899>

Cholkar, K., Ray, A., Agrahari, V., Pal, D., & Mitra, A. K. (2013). Transporters and receptors in the anterior segment of the eye. En *Ocular Transporters and Receptors* (pp. 115-168). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781908818317.115>

Choudhuri, S., & Chanderbhan, R. F. (2016). The Biology of Nutrients. En *Nutraceuticals* (pp. 209-225). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00017-6>

Colas, C., Ung, P. M.-U., & Schlessinger, A. (2016). SLC transporters: Structure, function, and drug discovery. *MedChemComm*, 7(6), 1069-1081. <https://doi.org/10.1039/C6MD00005C>

Contreras-Pulache, H. (2014). Esbozo de Alois Alzheimer. *Revista Peruana de Epidemiología*, 18(1), 1-5.

Corbett, N. J., & Hooper, N. M. (2018). Soluble Amyloid Precursor Protein  $\alpha$ : Friend or Foe? En K. Chattopadhyay & S. C. Basu (Eds.), *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules* (Vol. 1112, pp. 177-183). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3065-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3065-0_13)

Crist, A. M., Hinkle, K. M., Wang, X., Moloney, C. M., Matchett, B. J., Labuzan, S. A., Frankenhauser, I., Azu, N. O., Liesinger, A. M., Lesser, E. R., Serie, D. J., Quicksall, Z. S., Patel, T. A., Carnwath, T. P., DeTure, M., Tang, X., Petersen, R. C., Duara, R., Graff-Radford, N. R., ... Murray, M. E. (2021). Transcriptomic analysis to identify genes associated with selective hippocampal vulnerability in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 12(1), 2311. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22399-3>

Crowe, A., Henderson, M. J., Anderson, J., Titus, S. A., Zakharov, A., Simeonov, A., Buist, A., Delay, C., Moechars, D., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M.-Y., & Brunden, K. R. (2020).

Compound screening in cell-based models of tau inclusion formation: Comparison of primary neuron and HEK293 cell assays. *Journal of Biological Chemistry*, 295(12), 4001-4013. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010532>

Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65(1), 1-105. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)

Das, A., Gauthier-Coles, G., Bröer, S., & Rae, C. D. (2022). Impact of Inhibition of Glutamine and Alanine Transport on Cerebellar Glial and Neuronal Metabolism. *Biomolecules*, 12(9), 1189. <https://doi.org/10.3390/biom12091189>

Eid, T., Gruenbaum, S. E., Dhaher, R., Lee, T.-S. W., Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2016). The Glutamate–Glutamine Cycle in Epilepsy. En A. Schousboe & U. Sonnewald (Eds.), *The Glutamate/GABA–Glutamine Cycle* (Vol. 13, pp. 351-400). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_14)

Eratne, D., Loi, S. M., Farrand, S., Kelso, W., Velakoulis, D., & Looi, J. C. (2018). Alzheimer's disease paper 1: Clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australasian Psychiatry*, 11. <https://doi.org/10.1177/1039856218762308>

Escuer, E. G. (2004). *Transportador de aminoácidos heteromérico xCT. Identificación, caracterización funcional y topología* [Doctorado en Bioquímica, Universidad de Barcelona]. [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2993/Tesi\\_Emma\\_Gasol.pdf;jsessionid=A539FF10316EEE16F6B7EB72717F29FB?sequence=1](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2993/Tesi_Emma_Gasol.pdf;jsessionid=A539FF10316EEE16F6B7EB72717F29FB?sequence=1)

Estrada Rodríguez, A. E., & Zomosa Signoret, V. C. (2017). Papel de la agregación del péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Educación Bioquímica*, 2-11.

Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>

Fredriksson, R., Nordström, K. J. V., Stephansson, O., Hägglund, M. G. A., & Schiöth, H. B. (2008). The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Letters*, 582(27), 3811-3816. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.016>

Fremeau, R. T., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D. R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A., & Edwards, R. H. (2004). Vesicular Glutamate Transporters 1 and 2 Target to Functionally Distinct Synaptic Release Sites. *Science*, 304(5678), 1815-1819. <https://doi.org/10.1126/science.1097468>

Frota, N. A. F., Nitrini, R., Damasceno, B. P., Forlenza, O. V., Dias-Tosta, E., Silva, A. B. da, Herrera Junior, E., & Magaldi, R. M. (2011). Criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: Recommendations of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. *Dementia & Neuropsychologia*, 5(3), 146-152. <https://doi.org/10.1590/S1980-57642011DN05030002>

Gao, Y., Tan, L., Yu, J.-T., & Tan, L. (2018). Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Current Alzheimer Research*, 15(3), 283-300. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170417111859>

Garcia-Esparcia, P., Diaz-Lucena, D., Ainciburu, M., Torrejón-Escribano, B., Carmona, M., Llorens, F., & Ferrer, I. (2018). Glutamate Transporter GLT1 Expression in Alzheimer Disease and Dementia With Lewy Bodies. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 122. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00122>

Gaugler, J., James, B., Johnson, T., Reimer, J., & Weuve, J. (2021). *2021 Alzheimer's disease facts and figures* (p. 104). Alzheimer's Association. <https://www.alz.org/alzheimer-dementia/datos-y-cifras#:~:text=An%20estimated%206.2%20million%20Americans,Americans%20with%20Alzheimer's%20are%20women.>

Ge, Y., Gu, Y., Wang, J., & Zhang, Z. (2018). Membrane topology of rat sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(7), 1460-1469. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.04.005>

Goldman, J. S., & Van Deerlin, V. M. (2018). Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia: The Current State of Genetics and Genetic Testing Since the Advent of Next-Generation Sequencing. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 22(5), 505-513. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0347-7>

González Pereyra, P. (2018). *Alteraciones de los circuitos neuronales en un modelo de ratón transgénico que desarrolla marcadores de la enfermedad de Alzheimer* [Tesis para Maestría en Ciencias (Neurobiología), Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820390906>

González-González, I. M., Cubelos, B., Giménez, C., & Zafra, F. (2005). Immunohistochemical localization of the amino acid transporter SNAT2 in the rat brain. *Neuroscience*, 130(1), 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.023>

Goodson, H. V., & Jonasson, E. M. (2018). Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(6), a022608. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022608>

Grewal, S., Defamie, N., Zhang, X., De Gois, S., Shawki, A., Mackenzie, B., Chen, C., Varoqui, H., & Erickson, J. D. (2009). SNAT2 Amino Acid Transporter Is Regulated by Amino Acids of the SLC6  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Transporter Subfamily in Neocortical Neurons and May Play No Role in Delivering Glutamine for Glutamatergic Transmission. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), 11224-11236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806470200>

Gudimchuk, N. B., & McIntosh, J. R. (2021). Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(12), 777-795. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00399-x>

Guo, Y., Wang, Q., Chen, S., & Xu, C. (2021). Functions of amyloid precursor protein in metabolic diseases. *Metabolism*, 115, 154454. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154454>

Hägglund, M. G. A., Hellsten, S. V., Bagchi, S., Philippot, G., Löfqvist, E., Nilsson, V. C. O., Almkvist, I., Karlsson, E., Sreedharan, S., Tafreshiha, A., & Fredriksson, R. (2015). Transport of L-Glutamine, L-Alanine, L-Arginine and L-Histidine by the Neuron-Specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS. *Journal of Molecular Biology*, 427(6), 1495-1512. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.10.016>

Hamdani, E. H., Popek, M., Frontczak-Baniewicz, M., Utheim, T. P., Albrecht, J., Zielińska, M., & Chaudhry, F. A. (2021). Perturbation of astroglial Slc38 glutamine transporters by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contributes to neurophysiologic manifestations in acute liver failure. *The FASEB Journal*, 35(7). <https://doi.org/10.1096/fj.202001712RR>

Havekes, R., & Abel, T. (2009). Chapter 1 Genetic Dissection of Neural Circuits and Behavior in *Mus musculus*. En *Advances in Genetics* (Vol. 65, pp. 1-38). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(09\)65001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(09)65001-X)

Hayashi, M. (2018). Structure-Function Relationship of Transporters in the Glutamate–Glutamine Cycle of the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1177. <https://doi.org/10.3390/ijms19041177>

Hedrich, H. J., & Bullock, G. R. (Eds.). (2004). *The laboratory mouse*. Elsevier Academic Press.

Hellsten, S. V., Tripathi, R., Ceder, M. M., & Fredriksson, R. (2018). Nutritional Stress Induced by Amino Acid Starvation Results in Changes for Slc38 Transporters in Immortalized Hypothalamic Neuronal Cells and Primary Cortex Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 45. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00045>

Hoffman, J. L., Faccidomo, S., Kim, M., Taylor, S. M., Agoglia, A. E., May, A. M., Smith, E. N., Wong, L. C., & Hodge, C. W. (2019). Alcohol drinking exacerbates neural and behavioral pathology in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. En *International Review of Neurobiology* (Vol. 148, pp. 169-230). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/bs.irm.2019.10.017>

Hoffmann, T. M., Cwiklinski, E., Shah, D. S., Stretton, C., Hyde, R., Taylor, P. M., & Hundal, H. S. (2018). Effects of Sodium and Amino Acid Substrate Availability upon the Expression and Stability of the SNAT2 (SLC38A2) Amino Acid Transporter. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 63. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00063>

Hundal, H. S., & Taylor, P. M. (2009). Amino acid transceptors: Gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(4), E603-E613.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.91002.2008>

Inés, M., Londra, Franco, Grasso, & Lina. (2015). Revisión de modelos en roedores para la investigación en enfermedades de Alzheimer y Parkinson: Su importancia en la psicología comparada. *VII Congreso Internacional de Investigación y Práctica Profesional en Psicología*, 6.

Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., ... Silverberg, N. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535-562.  
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>

Javed, K., & Fairweather, S. J. (2019). Amino acid transporters in the regulation of insulin secretion and signalling. *Biochemical Society Transactions*, 47(2), 571-590.  
<https://doi.org/10.1042/BST20180250>

Kandasamy, P., Gyimesi, G., Kanai, Y., & Hediger, M. A. (2018). Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(10), 752-789. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.05.003>

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 & Dementia*, 13(4), 374-380.  
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.006>

Kashani, A., Lepicard, E., Poirel, O., Videau, C., David, J. P., Fallet-Bianco, C., Simon, A., Delacourte, A., Giros, B., Epelbaum, J., Betancur, C., & El Mestikawy, S. (2008). Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 29(11), 1619-1630.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.010>

Kashiwagi, H., Yamazaki, K., Takekuma, Y., Ganapathy, V., & Sugawara, M. (2009). Regulatory mechanisms of SNAT2, an amino acid transporter, in L6 rat skeletal muscle cells by insulin, osmotic shock and amino acid deprivation. *Amino Acids*, 36(2), 219-230.  
<https://doi.org/10.1007/s00726-008-0050-9>

Kirkitadze, M. D., & Kowalska, A. (2005). *Molecular mechanisms initiating amyloid  $\beta$ -fibril formation in Alzheimer's disease*. 52, 7.

Kirvell, S. L., Esiri, M., & Francis, P. T. (2006). Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 939-950. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03935.x>

Koelsch, G. (2017). BACE1 Function and Inhibition: Implications of Intervention in the Amyloid Pathway of Alzheimer's Disease Pathology. *Molecules*, 22(10), 20.  
<https://doi.org/10.3390/molecules22101723>

Kritis, A. A., Stamoula, E. G., Paniskaki, K. A., & Vavilis, T. D. (2015). Researching

glutamate induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00091>

Krokowski, D., Guan, B.-J., Wu, J., Zheng, Y., Pattabiraman, P. P., Jobava, R., Gao, X.-H., Di, X.-J., Snider, M. D., Mu, T.-W., Liu, S., Storrie, B., Pearlman, E., Blumental-Perry, A., & Hatzoglou, M. (2017). GADD34 Function in Protein Trafficking Promotes Adaptation to Hyperosmotic Stress in Human Corneal Cells. *Cell Reports*, 21(10), 2895-2910. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.027>

Kulijewicz-Nawrot, M., Syková, E., Chvátal, A., Verkhatsky, A., & Rodríguez, J. J. (2013). Astrocytes and Glutamate Homeostasis in Alzheimer's Disease: A Decrease in Glutamine Synthetase, But Not in Glutamate Transporter-1, in the Prefrontal Cortex. *ASN Neuro*, 5(4), AN20130017. <https://doi.org/10.1042/AN20130017>

Lanau, C. A. V., Berrío, G. B., Castaño, M. F. T., Madrigal, L., & Restrepo, F. L. (2005). Evaluación de la expresión de la proteína precursora de amiloide en células sanguíneas de pacientes con la mutación E280A en el gen de la presenilina. 18(1), 14.

Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 25(1), 59-70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>

Lanfranco G, R., Manríquez-Navarro, P., Avello G, L., & Canales-Johnson, A. (2012). Evaluación de la enfermedad de Alzheimer en etapa temprana: Biomarcadores y pruebas neuropsicológicas. *Revista médica de Chile*, 140(9), 1191-1200. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872012000900014>

Lashley, T., Schott, J. M., Weston, P., Murray, C. E., Wellington, H., Keshavan, A., Foti, S. C., Foiani, M., Toombs, J., Rohrer, J. D., Heslegrave, A., & Zetterberg, H. (2018). Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: Progress and prospects. *Disease Models & Mechanisms*, 11(5), dmm031781. <https://doi.org/10.1242/dmm.031781>

Lau, A., & Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 460(2), 525-542. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0809-1>

Leke, R., & Schousboe, A. (2016). The Glutamine Transporters and Their Role in the Glutamate/GABA–Glutamine Cycle. En A. Schousboe & U. Sonnewald (Eds.), *The Glutamate/GABA–Glutamine Cycle* (Vol. 13, pp. 223-257). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_8)

Liu, Z., Xiang, Y., & Sun, G. (2013). The KCTD family of proteins: Structure, function, disease relevance. *Cell & Bioscience*, 3(1), 45. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-45>

López, F. J. B., Beltrán, E. A. L., Hurtado, B., Álvarez, I. V. M., López-Moraila, M. A., & Murillo-Bonilla, L. M. (2018). *Diagnóstico Actual de la Enfermedad de Alzheimer*. 2(2), 17.

Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), a006247-a006247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006247>

Manzano, S., González, J. L., Marcos, A., Payno, M., Villanueva, C., & Matías-Guiu, J. (2009). Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer. *Neurología*, 24(4), 255-262.

Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M.-L., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 289-309. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003>

Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), a006239-a006239. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006239>

McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor,

M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>

Menchini, R. J., & Chaudhry, F. A. (2019). Multifaceted regulation of the system A transporter Slc38a2 suggests nanoscale regulation of amino acid metabolism and cellular signaling. *Neuropharmacology*, 161, 107789. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107789>

Mendez, P. C., Surace, E., Bérnago, Y., Calandri, I., Vazquez, S., Seveler, G., & Allegri, R. F. (2019). *Biomarcadores de Enfermedad de Alzheimer, dónde estamos y hacia dónde vamos*. 6.

Mendiola-Precoma, J., Berumen, L. C., Padilla, K., & Garcia-Alcocer, G. (2016). Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2016, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2016/2589276>

Monczor, M. (2005). *Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease*. 5, 10.

Morris, J. C. (1996). Classification of dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 94(S165), 41-50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1996.tb05871.x>

Nardi, F., Hoffmann, T. M., Stretton, C., Cwiklinski, E., Taylor, P. M., & Hundal, H. S. (2015). Proteasomal Modulation of Cellular SNAT2 (SLC38A2) Abundance and Function by Unsaturated Fatty Acid Availability. *Journal of Biological Chemistry*, 290(13), 8173-8184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.625137>

Navabpour, S., Kwapis, J. L., & Jarome, T. J. (2020). A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 108, 732-748. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.013>

Neff, E. P. (2018). What is a lab animal? *Lab Animal*, 47(9), 223-227. <https://doi.org/10.1038/s41684-018-0135-3>

Novak, D., Quiggle, F., & Haafiz, A. (2006). Impact of forskolin and amino acid depletion upon System A activity and SNAT expression in BeWo cells. *Biochimie*, 88(1), 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.07.002>

Nunzi, M. G., Russo, M., & Mugnaini, E. (2003). Vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 define two subsets of unipolar brush cells in organotypic cultures of mouse vestibulocerebellum. *Neuroscience*, 122(2), 359-371. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00568-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00568-2)

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron*, 39, 409-421.

Ortiz, C., Fernandez-Navarro, J., Jurek, A., Martín, A., Lundeberg, J., & Meletis, K. (2020). Molecular atlas of the adult mouse brain. *Science Advances*, 6, 14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb3446>

Pajarillo, E., Risor, A., Lee, J., Aschner, M., & Lee, E. (2019). The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*, 161, 107559. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.002>

Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., & Imbimbo, B. P. (2019). A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(2), 73-88. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>

Parato, J., & Bartolini, F. (2021). The microtubule cytoskeleton at the synapse. *Neuroscience Letters*, 753, 135850. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135850>

Patel, H., Hodges, A. K., Curtis, C., Lee, S. H., Troakes, C., Dobson, R. J. B., & Newhouse, S. J. (2019). Transcriptomic analysis of probable asymptomatic and symptomatic alzheimer brains. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80, 644-656.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.009>

Pîrșcoveanu, D. F. V., Pirici, I., & Tudoric, V. (2017). Tau protein in neurodegenerative diseases – a review. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*, 58(4), 10.

Pizzagalli, M. D., Bensimon, A., & Superti-Furga, G. (2021). A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *The FEBS Journal*, 288(9), 2784-2835.  
<https://doi.org/10.1111/febs.15531>

Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., & Indiveri, C. (2014). Membrane transporters for the special amino acid glutamine: Structure/function relationships and relevance to human health. *Frontiers in Chemistry*, 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00061>

Qureshi, T., Sørensen, C., Berghuis, P., Jensen, V., Dobszay, M. B., Farkas, T., Dalen, K. T., Guo, C., Hassel, B., Utheim, T. P., Hvalby, Ø., Hafting, T., Harkany, T., Fyhn, M., & Chaudhry, F. A. (2019). The Glutamine Transporter Slc38a1 Regulates GABAergic Neurotransmission and Synaptic Plasticity. *Cerebral Cortex*, 29(12), 5166-5179.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhz055>

Rani, L., Mittal, J., & Mallajosyula, S. S. (2020). Effect of Phosphorylation and O-GlcNAcylation on Proline-Rich Domains of Tau. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(10), 1909-1918. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b11720>

Rentería, M. E., Mitchell, B. L., & de Lara, A. M. (2020). Genetic testing for Alzheimer's disease: Trends, challenges and ethical considerations. *Current Opinion in Psychiatry*, 33(2), 136-140. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000573>

Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439-pdb.prot5439.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>

Robinson, M., Lee, B. Y., & Hane, F. T. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(2), 317-330. <https://doi.org/10.3233/JAD-161149>

Rodríguez, A., Ortega, A., Berumen, L. C., García-Alcocer, M. G., Giménez, C., & Zafra, F. (2014). Expression of the System N transporter (SNAT5/SN2) during development indicates its plausible role in glutamatergic neurotransmission. *Neurochemistry International*, 73, 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.11.011>

Rodríguez-Perdigon, M., Tordera, R. M., Gil-Bea, F. J., Gerenu, G., Ramirez, M. J., & Solas, M. (2016). Down-regulation of glutamatergic terminals (VGLUT1) driven by Aβ in Alzheimer's disease: Aβ and VGLUT1 in Alzheimer's Disease. *Hippocampus*, 26(10), 1303-1312. <https://doi.org/10.1002/hipo.22607>

Romero-Fernandez, W., Batista-Castro, Z., De Lucca, M., Ruano, A., García-Barceló, M., Rivera-Cervantes, M., García-Rodríguez, J., & Sánchez-Mateos, S. (2016). El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33(2), 288. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.332.2169>

Rösler, T. W., Tayanian Marvian, A., Brendel, M., Nykänen, N.-P., Höllerhage, M., Schwarz, S. C., Hopfner, F., Koeglsperger, T., Respondek, G., Schwyer, K., Levin, J., Villemagne, V. L., Barthel, H., Sabri, O., Müller, U., Meissner, W. G., Kovacs, G. G., & Höglinger, G. U. (2019). Four-repeat tauopathies. *Progress in Neurobiology*, 180, 101644. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101644>

Schallier, A., Smolders, I., Michotte, A., Michotte, Y., & Massie, A. (2011). Region- and Age-Specific Changes in Glutamate Transport in the A $\beta$ PP23 Mouse Model for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24, 287-300.

Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E.,



Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 397(10284), 1577-1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)

Schiöth, H. B., Roshanbin, S., Hägglund, M. G. A., & Fredriksson, R. (2013). Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 571-585. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.012>

Serrano, M. P. (2016). *Mecanismos bioquímicos de la Enfermedad de Alzheimer: Aproximaciones terapéuticas*. Universidad Complutense.

Shen, Y., Liang, L., Zhang, S., Huang, D., Zhang, J., Xu, S., Liang, C., & Xu, W. (2018). Organelle-targeting surface-enhanced Raman scattering (SERS) nanosensors for subcellular pH sensing. *Nanoscale*, 10(4), 1622-1630. <https://doi.org/10.1039/C7NR08636A>

Siano, G., Caiazza, M. C., Varisco, M., Calvello, M., Quercioli, V., Cattaneo, A., & Di Primio, C. (2019). Modulation of Tau Subcellular Localization as a Tool to Investigate the Expression of Disease-related Genes. *Journal of Visualized Experiments*, 154, 59988. <https://doi.org/10.3791/59988>

Sridhar, S., Khamaj, A., & Asthana, M. K. (2023). Cognitive neuroscience perspective on memory: Overview and summary. *Frontiers in Human Neuroscience*, 17, 1217093. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2023.1217093>

Sterniczuk, R., Antle, M. C., LaFerla, F. M., & Dyck, R. H. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Research*, 1348, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.011>

Sterniczuk, R., Dyck, R. H., LaFerla, F. M., & Antle, M. C. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 1. Circadian changes. *Brain Research*, 1348, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.013>

Stover, K. R., Campbell, M. A., Van Winssen, C. M., & Brown, R. E. (2015). Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 289, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.012>

Sureda, D. G. (2014). *Escritura de una revisión sobre las Bases Moleculares de la Enfermedad de Alzheimer*. Universitat de les Illes Balears.

Takahashi, K., Kong, Q., Lin, Y., Stouffer, N., Schulte, D. A., Lai, L., Liu, Q., Chang, L.-C., Dominguez, S., Xing, X., Cuny, G. D., Hodgetts, K. J., Glicksman, M. A., & Lin, C.-L. G. (2015). Restored glial glutamate transporter EAAT2 function as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Journal of Experimental Medicine*, 212(3), 319-332. <https://doi.org/10.1084/jem.20140413>

Terrado-Quevedo, S. P., Serrano Durán, C., Galano Guzmán, Z. G., Betancourt Pulsán, A., & Jimenez de Castro Morgado, M. Í. (2018). *Enfermedad de Alzheimer, alguno factores de riesgo modificables*. 97(5). <http://scielo.sld.cu/pdf/ric/v97n5/1028-9933-ric-97-05-1031.pdf>

Tong, H., Zhang, X., Meng, X., Xu, P., Zou, X., & Qu, S. (2017). Amyloid-beta peptide decreases expression and function of glutamate transporters in nervous system cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 85, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.01.017>

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, & Population Division. (2019). *World population prospects 2019*.

Velázquez-Villegas, L. A., Ortiz, V., Ström, A., Torres, N., Engler, D. A., Matsunami, R., Ordaz-Rosado, D., García-Becerra, R., López-Barradas, A. M., Larrea, F., Gustafsson, J.-Å., & Tovar, A. R. (2014). Transcriptional regulation of the sodium-coupled neutral amino acid transporter (SNAT2) by 17 $\beta$ -estradiol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11443-11448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412099111>

Venkatramani, A., & Panda, D. (2019). Regulation of neuronal microtubule dynamics by tau: Implications for tauopathies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 473-

483. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.120>

Vink, R. (2018). Large animal models of traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research*, 96(4), 527-535. <https://doi.org/10.1002/jnr.24079>

Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 22-35. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>

Wegmann, S., Biernat, J., & Mandelkow, E. (2021). A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 69, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.03.003>

Whitfield, J. F., Rennie, K., & Chakravarthy, B. (2023). Alzheimer's Disease and Its Possible Evolutionary Origin: Hypothesis. *Cells*, 12(12), 1618. <https://doi.org/10.3390/cells12121618>

Wilkins, H. M., & Swerdlow, R. H. (2017). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Research Bulletin*, 133, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.009>

Winther-Sørensen, M., Galsgaard, K. D., Santos, A., Trammell, S. A. J., Sulek, K., Kuhre, R. E., Pedersen, J., Andersen, D. B., Hassing, A. S., Dall, M., Treebak, J. T., Gillum, M. P., Torekov, S. S., Windeløv, J. A., Hunt, J. E., Kjeldsen, S. A. S., Jepsen, S. L., Vasilopoulou, C. G., Knop, F. K., ... Wewer Albrechtsen, N. J. (2020). Glucagon acutely regulates hepatic amino acid catabolism and the effect may be disturbed by steatosis. *Molecular Metabolism*, 42, 101080. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101080>

Xie, J., Li, P., Gao, H., Qian, J., Yuan, L.-Y., & Wang, J. (2014). Overexpression of SLC38A1 is associated with poorer prognosis in Chinese patients with gastric cancer. *BMC Gastroenterology*, 14(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-14-70>

Yoneda, Y., Kawada, K., & Kuramoto, N. (2020). Selective Upregulation by Theanine of Slc38a1 Expression in Neural Stem Cell for Brain Wellness. *Molecules*, 25(2), 347. <https://doi.org/10.3390/molecules25020347>

Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., & Han, J. M. (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(9), 1496-1516. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8>

Yu, S. P., Jiang, M. Q., Shim, S. S., Pourkhodadad, S., & Wei, L. (2023). Extrasynaptic NMDA receptors in acute and chronic excitotoxicity: Implications for preventive treatments of ischemic stroke and late-onset Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 18(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00636-1>

Yu, Y., Chen, R., Mao, K., Deng, M., & Li, Z. (2023). The Role of Glial Cells in Synaptic Dysfunction: Insights into Alzheimer's Disease Mechanisms. *Aging and Disease*, 0. <https://doi.org/10.14336/AD.2023.0718>

Zhou, J., Zhao, M., Rang, W., Zhang, X., Liu, Z., Zhang, L., Wang, T., Wu, C.-T., Cheng, X., & Zhou, W. (2021). Proteome Profiling Identified Amyloid- $\beta$  Protein Precursor as a Novel Binding Partner and Modulator of VGLUT1. *Journal of Alzheimer's Disease*, 81(3), 981-1038. <https://doi.org/10.3233/JAD-210117>

Zhou, R., Yang, G., & Shi, Y. (2020). Macromolecular complex in recognition and proteolysis of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Structural Biology*, 61, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.09.004>

Zumkehr, J., Rodriguez-Ortiz, C. J., Cheng, D., Kieu, Z., Wai, T., Hawkins, C., Kilian, J., Lim, S. L., Medeiros, R., & Kitazawa, M. (2015). Ceftriaxone ameliorates tau pathology and cognitive decline via restoration of glial glutamate transporter in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 36(7), 2260-2271. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.04.005>