



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



Alteraciones de los transportadores de aminoácidos neutros acoplados a sodio SNAT1 y SNAT2 en modelos transgénicos que desarrollan los marcadores de la patología de Alzheimer

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciada en Microbiología

Presenta:

Karen Rocío Villaseñor Zepeda

Dirigido por:

Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez

Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez

Presidente

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Secretario

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Vocal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Vocal

M. en C. José María Cornejo Montes de Oca

Vocal

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Marzo, 2019

México

Resumen

Los transportadores SNAT pertenecen a la familia SLC38 y participan en el cotransporte de aminoácidos neutros y sodio. Esta familia se divide en dos sistemas: el sistema A que es de tipo electrogénico y el sistema N que es de tipo electroneuro. Dentro del sistema A, se encuentra a los transportadores SNAT1 y SNAT2. Estos transportadores en el cerebro se localizan principalmente en neuronas. Su función radica en la internalización de glutamina, a partir de la cual se sintetizarán los neurotransmisores: glutamato y GABA. En la Enfermedad de Alzheimer la comunicación neuronal se encuentra alterada y la pérdida de sinapsis es el factor que mejor correlaciona con el grado de severidad de la patología. Debido a que la comunicación neuronal depende de la síntesis y la liberación de neurotransmisores, en este proyecto se estudió el estado de los transportadores SNAT1 y SNAT2 en las neuronas de los modelos transgénicos que desarrollan marcadores de la patología tipo Alzheimer, el ratón Tg4510 y el 3xTg-AD, en etapas iniciales de la patología (1 mes de edad). Mediante inmunohistoquímicas se evaluaron los niveles de expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la formación hipocampal y la corteza retrosplenial de ambos modelos. Los resultados revelaron una disminución significativa en los niveles de expresión del transportador SNAT1 y SNAT2, a lo largo de la formación hipocampal y en la corteza retrosplenial del ratón Tg4510. En el ratón 3xTg-AD detectamos un decremento significativo en los niveles de expresión de SNAT1 en la región del giro dentado, subíulum y en la corteza retrosplenial, mientras que los niveles de expresión del transportador SNAT2 se encontraron disminuidos en la región CA1, CA2, CA3 y giro dentado del hipocampo y en la corteza retrosplenial. Nuestros resultados sugieren que los transportadores SNAT1 y SNAT2 al estar disminuidos en etapas iniciales de la patología tipo Alzheimer, están asociados a un desbalance en los niveles de glutamina, lo que podría estar relacionado con alteraciones de la respuesta sináptica que se observa en etapas tempranas del desarrollo de la patología.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, SNAT1, SNAT2, hipocampo, corteza retrosplenial, Tg4510 y 3xTg-AD.

Summary

Sodium-coupled Neutral Amino acid Transporters, SNAT1 and SNAT2, are capable of transporting glutamine across the plasma membrane of neurons. Glutamine is the precursor of the two most important neurotransmitters: glutamate, an excitatory neurotransmitter, and GABA, an inhibitory neurotransmitter. Of relevance, neurotransmitter imbalance is one of the main hallmarks of Alzheimer's disease. In the present work we aim to evaluate the status of the transporters SNAT1 and SNAT2 in the hippocampal formation and retrosplenial cortex of 1-month-old Tg4510 and 3xTg-AD mice. We performed immunohistochemistry to detect intensity and distribution of SNAT1 and SNAT2 immunoreactivity. SNAT1 and SNAT2 were found in neuronal soma and proximal dendrites. Intensity was found significantly decreased in the hippocampal formation and retrosplenial cortex of 1-month-old-Tg4510 mice. In 3xTg-AD, dentate gyrus, subiculum and retrosplenial cortex exhibited lower levels of SNAT1, while SNAT2 showed lower levels in CA1, CA2, CA3, dentate gyrus and retrosplenial cortex. Collectively, our results showed that SNAT1 and SNAT2 are affected during early stages of Alzheimer's disease, which could contribute to the glutamine imbalance that could be associated with synapses disturbances seen in early stages of the disease.

Keywords: Alzheimer's disease, SNAT1, SNAT2, hippocampus, retrosplenial cortex, Tg4510 and 3xTg-AD.

Agradecimientos institucionales

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio C-01 de Circuitos Neuronales, a cargo del Dr. Fernando Peña Ortega, en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este proyecto fue financiado por CONACYT a través del proyecto 269021 (Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN202018 (Dr. Fernando Peña Ortega). También fue apoyado por el proyecto FOFIUAQ2018 FNB201802 (Dra. Angelina Rodríguez Torres).

De manera especial, agradezco al Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez, quien dirigió este trabajo. Agradezco la forma en la que siempre me apoyó en cualquier duda que tuviera. Gracias por su orientación y por su siempre pronta respuesta.

Agradezco al Dr. Fernando Peña Ortega por el apoyo prestado durante la estancia que realicé en su laboratorio. Al Dr. Benito Ordaz Sánchez por todo el apoyo técnico recibido durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Angelina Rodríguez Torres por el apoyo y la orientación prestado para la realización de este trabajo.

Al M. en C. José María Cornejo Montes de Oca por siempre haberme facilitado el tejido para trabajar, por todas las enseñanzas y el tiempo dedicado a discutir conmigo sobre mi proyecto.

A la Dra. Alejandra Castilla León, al M.V.Z. Martín García Servín y al Bioterio del Instituto de Neurobiología, por proveer los animales con los que se trabajó en este proyecto.

Agradecimientos personales

Agradezco a todas las personas que conocí en la Licenciatura en Microbiología y con las que compartí el tiempo de mi formación profesional. Entre ellas se encuentran los profesores que marcaron de forma especial mi vida, no sólo con la formación académica que recibí de ellos, sino con todas las impresiones e ideas que me compartieron. Gracias a la Dra. Karina Acevedo, al Dr. Roberto Álvarez, a la Dra. Angelina Rodríguez, al Dr. Fausto Arellano, al Dr. Antonio Cervantes, a la Dra. Etzel Garrido, al Dr. Carlos Saldaña y al Dr. Juan Malda.

De manera muy especial, agradezco a la Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse, quien es una fuente de inspiración para mí.

A mis amigos: Aline, Gibrán, Ivonne, Pacheco, Nallely, Dani y Carina.

Agradezco a mis padres por el apoyo y el amor que me han brindado siempre. A mis hermanos por demostrarme su amor, cada cual a su manera.

Gracias a Jairo, tu apoyo, compañía y amor, hace cualquier empresa realizable, además de que todo es más ameno, divertido y llevadero si cuento contigo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a todas aquellas personas que le dan vida. Me siento orgullosa de egresar de esta Universidad y de haberme formado dentro de esta casa, no sólo como profesionista sino como individuo.

Índice

Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos institucionales.....	iii
Agradecimientos personales	iv
Índice de figuras	vii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Enfermedad de Alzheimer	2
2.1.1 El péptido β A	3
2.1.2 Tau anormalmente fosforilada.....	4
2.2 Hipocampo y corteza retrosplenial.....	5
2.3 Hipótesis actuales	7
2.3.1 Hipótesis basada en β A.....	7
2.3.2 Hipótesis basada en pTau.....	8
2.4 Modelos transgénicos para el estudio de la patología de Alzheimer.....	9
2.5 Actividad cerebral.....	10
2.6 Ciclo Glutamato/GABA-Glutamina.....	12
2.7 Familia transportadora de solutos 38 (SLC38).....	13
2.7.1 Sistema N.....	13
2.7.2 Sistema A.....	14
2.8 Familia SLC38 y su participación en el ciclo Glutamato/GABA-Glutamina.....	15
3. Justificación	17
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos	17
5.1 Objetivo general	17
5.2. Objetivos particulares	18
6. Metodología	18
6.1 Sujetos.....	18
6.2 Inmunofluorescencia y caracterización por microscopía	19
6.3 Análisis estadístico	20
7. Resultados	20

7.1 Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón NT	20
7.2 Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón Tg4510	23
7.3 Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón 3xTg-AD	26
7.4 Comparación de la expresión del transportador SNAT1 en el hipocampo de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD	29
7.5 Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón no transgénico	32
7.6 Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón Tg4510	34
7.7 Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón 3xTg-AD	37
7.8 Disminución en la expresión del transportador SNAT2 en el hipocampo de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD	40
7.9 Distribución morfológica del transportador SNAT1 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD	42
7.10 Distribución morfológica del transportador SNAT2 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD	45
7.11 Disminución en la expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD	47
7.12 Distribución morfológica de la proteína pTau en el hipocampo de los ratones 3xTg-AD y Tg4510	49
7.13 Distribución morfológica de la proteína pTau en la RSC de los ratones 3xTg-AD y Tg4510	52
8. Discusión	54
8.1 Alteraciones en los transportadores de aminoácidos SNAT1 y SNAT2 en la formación del hipocampo	54
8.2 Alteraciones en los transportadores de aminoácidos SNAT1 y SNAT2 en la formación de la RSC	57
9. Conclusiones	59
10. Referencias	60

Índice de figuras

Figura 1. Hipocampo y neocorteza.....	4
Figura 2. Estructuras del hipocampo.....	5
Figura 3. Corteza retrosplenial (RSC).....	6
Figura 4. Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón NT.....	21
Figura 5. Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón Tg4510.....	24
Figura 6. Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón 3xTg-AD.....	27
Figura 7. Comparación de la expresión del transportador SNAT1 en el hipocampo de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD.....	30
Figura 8. Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón NT.....	32
Figura 9. Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón Tg4510.....	35
Figura 10. Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón 3xTg-AD.....	38
Figura 11. Disminución en la expresión del transportador SNAT2 en el hipocampo de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD.....	40
Figura 12. Distribución morfológica del transportador SNAT1 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD.....	42
Figura 13. Distribución morfológica del transportador SNAT2 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD.....	44
Figura 14. Disminución en la expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD.....	46
Figura 15. Distribución morfológica de la proteína pTau en el hipocampo de los ratones 3xTg-AD y Tg4510.....	48
Figura 16. Distribución morfológica de la proteína pTau en la RSC de los ratones 3xTg-AD y Tg4510.....	50

Índice de tablas

Tabla 1. Expresión de los transportadores SNAT1 ySNAT2 en el hipocampo de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD.....	42
Tabla 2. Expresión de los transportadores SNAT1 ySNAT2 en la RSC de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD.....	49

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las formas más comunes de demencia que representa hasta el 70% de todos los diagnósticos de demencia (Reitz y Mayeux, 2014). Es una enfermedad de tipo neurodegenerativa, progresiva e irreversible (Qiu *et al.*, 2009). A nivel neuropatológico los indicadores principales de la EA son las placas de beta amiloide (β A) y las marañas neurofibrilares (MNF) compuestas de la proteína tau anormalmente hiperfosforilada (Sun *et al.*, 2018). Diversas investigaciones han demostrado que tanto el β A como tau hiperfosforilada (pTau) afectan la transmisión sináptica y consecuentemente conducen a la pérdida de sinapsis (Canter *et al.*, 2016). De manera relevante se sabe que la pérdida de sinapsis es un factor que correlaciona fuertemente con la demencia y los síntomas que presentan los pacientes que desarrollan la EA (Spires-Jones y Hyman, 2014). En particular, se sabe que las regiones que presentan mayor pérdida de neuronas durante el curso de la EA son la neocorteza y el hipocampo, por lo que las funciones cognitivas asociadas a estas regiones, como lo son la memoria y el aprendizaje, se ven comprometidas (Arendt, 2009; Kandel *et al.*, 2014). Aunque no se conocen con precisión los mecanismos responsables de la pérdida de sinapsis que se observan en la EA, se ha reportado que el péptido β A puede aumentar la excitabilidad del circuito hipocampal (Palop *et al.*, 2007). Este aumento en la excitabilidad conduce a un desbalance en los niveles de neurotransmisores que afecta la respuesta neuronal (Palop *et al.*, 2007).

Una de las familias de transportadores involucrados en la regulación de los niveles de excitabilidad de los circuitos neuronales es la familia transportadora de solutos 38 (SLC38 por sus siglas en inglés) (Bröer, 2014). En las neuronas se encuentran dos transportadores miembros de esta familia SLC38, el transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 1 (SNAT 1 por sus siglas en inglés) y el transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 2 (SNAT2 por sus siglas en inglés) (Bröer, 2014). Estos transportadores tienen afinidad por distintos aminoácidos como alanina, asparagina, cisteína, glicina, metionina, serina y en

particular, por la glutamina (Mackenzie y Erickson, 2004). La glutamina es un aminoácido primordial para el Ciclo Glutamato/GABA-Glutamina (CGG) que regula la excitabilidad de los circuitos (Leke y Schousboe, 2016). Lo anterior debido a que en este ciclo la glutamina es transferida de los astrocitos hacia las neuronas, para que así éstas últimas puedan tener un abastecimiento adecuado de glutamina que les permita sintetizar a los principales neurotransmisores: GABA (ácido gamma amino-butírico) y glutamato (Bak *et al.*, 2006). Actualmente no se conoce el estado de los transportadores SNAT1 y SNAT2 durante el curso de la EA, se ha evaluado el efecto del péptido β A en cultivos neuronales *in vitro* y se observó un decremento en la expresión de SNAT1 (Buntup *et al.*, 2008). Sin embargo, no se ha estudiado a los transportadores SNAT en las neuronas de modelos transgénicos que desarrollan los marcadores histopatológicos de la EA.

2. Antecedentes

2.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA es un tipo de demencia, en el 2015 la prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial se estimaba en 46 millones de personas y se espera que aumente a 131.5 millones de personas para el 2050 (Reitz y Mayeux, 2014). Lo anterior, debido al incremento que se ha tenido en la esperanza de vida a nivel global (Alzheimer's Disease International, 2015). Por esta razón, la demencia es uno de los problemas de mayor importancia en los sistemas de salud pública.

El tipo de demencia que encontramos en la EA se caracteriza porque el paciente presenta dificultades en las capacidades asociadas a la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades cognitivas que incapacitan a las personas que las padecen (Gold, 2008). El diagnóstico de la EA se hace mediante evaluaciones clínicas, con las que el médico puede determinar si el paciente presenta o no demencia. Sin embargo, concluir si es demencia tipo EA es complicado debido a que actualmente no existen pruebas diagnósticas certeras (Alzheimer's Association, 2017). Se pueden distinguir dos tipos de EA, el primer tipo es el más común y ocurre principalmente en personas de edad avanzada, se

denomina de Inicio Tardío, mientras que, el segundo tipo de EA ocurre principalmente por mutaciones genéticas dominantes y se desarrolla antes de los 60 años, a éste se le conoce como de Inicio Temprano (Calderon-Garcidueñas y Duyckaerts, 2018). Adicionalmente, la EA se caracteriza por presentar dos fases, la primera fase es asintomática y se considera la fase preclínica. Posteriormente, se presenta la fase clínica, a partir de la cual se puede realizar un diagnóstico (Calderon-Garcidueñas y Duyckaerts, 2018).

Como previamente mencionamos, los indicadores principales de EA a nivel neuropatológico son las placas que se componen del péptido β A y se acumulan de manera extracelular, así como las MNF compuestas de la proteína pTau. También son indicadores de EA la sinaptopatía, la pérdida de neuronas y la angiopatía cerebral amiloide que ocurren debido a la acumulación de β A en las paredes de los vasos sanguíneos (Sun *et al.*, 2018).

2.1.1 El péptido β A

El péptido β A se forma después del corte de la Proteína Precursora Amiloide (APP por sus siglas en inglés), esta proteína es de tipo transmembranal y es escindida por la beta secretasa y el complejo gamma secretasa, en el que la proteína presenilina ocupa el sitio catalítico (Hardy y Selkoe, 2002). El extremo carboxilo de β A puede variar entre 36 a 43 aminoácidos de longitud. Sin embargo, los péptidos β A de 40 y 42 aminoácidos son los más frecuentemente encontrados (Thal *et al.*, 2015). La acumulación de β A se asocia ya sea a una sobreproducción por defectos en los genes que participan en su procesamiento o a problemas en el catabolismo de este péptido (Mawuenyega *et al.*, 2010). La acumulación de β A se ha correlacionado con la presencia de inflamación y estrés oxidante que podrían estar asociados a la sinaptopatía y a la pérdida de neuronas que caracterizan al desarrollo de la EA (Zhu *et al.*, 2018).

2.1.2 Tau anormalmente fosforilada

La proteína tau es parte de la familia de proteínas asociadas a los microtúbulos, esta proteína se une a la tubulina y así regula la polimerización y la estabilidad de los microtúbulos (Weingarten *et al.*, 1975). En la EA esta proteína se hiperfosforila y se acumula (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Una vez que tau es fosforilada en algunos sitios específicos como Ser³⁹⁶⁻⁴⁰⁴, Thr²³¹ y Ser²³⁵, se disocia de los microtúbulos y con esto provoca que éstos se desestabilicen (Cho y Johnson, 2004). A la pTau se le puede encontrar tanto en los axones como en las dendritas (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2012). De manera importante, se ha reportado que la acumulación de las lesiones constituidas por pTau en regiones específicas del cerebro, como neocorteza e hipocampo, se asocian a la sintomatología característica de la EA (Arendt, 2009) (Figura 1). En este sentido y para poder entender el desarrollo de la patología tipo Alzheimer, es de vital importancia comprender los cambios o alteraciones en las estructuras anatómicas mayormente afectadas como hipocampo y algunas regiones particulares de la neocorteza, tales como la corteza retrosplenial.

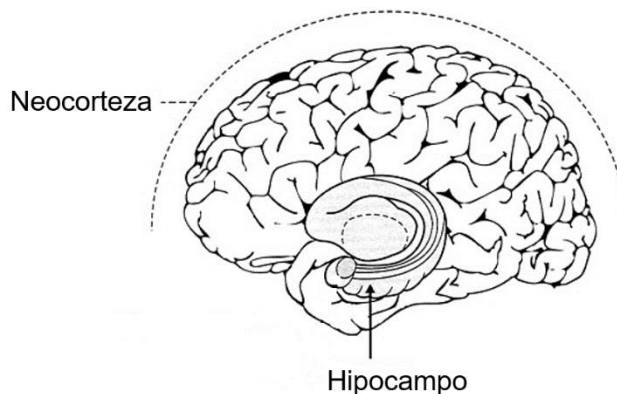


Figura 1. Hipocampo y neocorteza (Modificado de Ackerman, 1992).

2.2 Hipocampo y corteza retrosplenial

El hipocampo se asocia a procesos de almacenamiento de memoria y procesamiento de información (Teyler y DiScenna, 1985). Es una estructura en forma de C que se encuentra en el cuerno temporal del ventrículo lateral del cerebro (Figura 1) y se puede dividir en las regiones: CA1, CA2, CA3 y CA4. Además de que se comunica con las áreas del giro dentado y el subículum (Figura 2) (Schultz y Engelhardt, 2014).

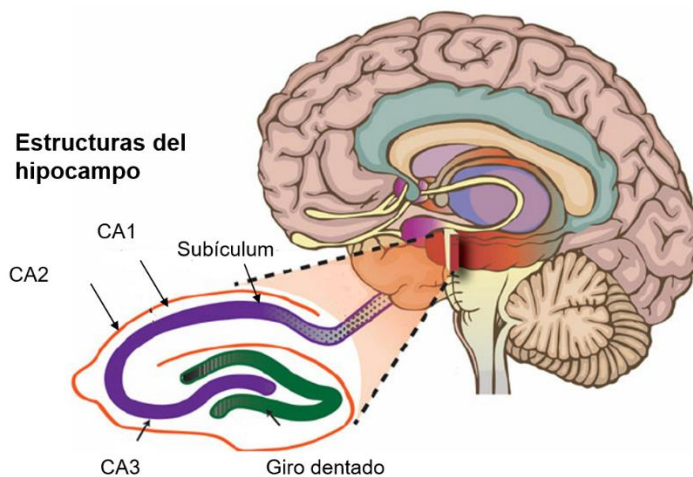


Figura 2. Estructuras del hipocampo (Modificado de Vineyard *et al*, 2012).

Las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo comprenden una única capa celular, que es la capa de células piramidales. La superficie que limita con la luz ventricular se compone de los axones de las células piramidales. Entre las células piramidales y la superficie que limita con el ventrículo, se encuentran una gran cantidad de interneuronas y de dendritas de las células piramidales (Schultz y Engelhardt, 2014).

El subículum y CA1 son regiones que se traslapan, por lo que forman una zona de transición. El subículum presenta una capa molecular donde se encuentran dendritas apicales provenientes de las células piramidales (Braak, 1972). Por su parte, el giro dentado se encuentra en la parte mayormente medial de la corteza

cerebral, además se encuentra separado de CA1 y del subículum por la fisura hipocampal (Andersen *et al*, 2007). La capa principal de células en el giro dentado se compone de somas neuronales y las dendritas de estas células proyectan hasta la capa llamada molecular (Braak, 1972). Por último, se encuentra la capa más interna del giro dentado, la capa polimórfica, que también se denomina como la región CA4 del hipocampo (Schultz y Engelhardt, 2014).

Existe una estrecha comunicación de los circuitos neuronales entre la corteza y el hipocampo (Preston y Eichenbaum, 2013). La corteza comprende diversas regiones involucradas en distintas funciones, pero hay una región en particular que se ha encontrado asociada a procesos de memoria, ésta es la corteza retrosplenial (RSC por sus siglas en inglés). La RSC es una región de la corteza cerebral que comprende a la corteza cingulada posterior en humanos (Figura 3) (Vogt y Peters, 1981). Se sabe que la integridad de esta región es necesaria para los procesos cognitivos de memoria que son dependientes del hipocampo (Keene y Bucci, 2008). Se ha observado que las lesiones en RSC resultan en deficiencias cognitivas asociadas particularmente a la memoria, similares a las que se encuentran en individuos con lesiones en el hipocampo (Iaria *et al.*, 2007). Por lo que, se considera que estas dos regiones, hipocampo y RSC, participan de manera conjunta en procesos cognitivos (Figura 2).

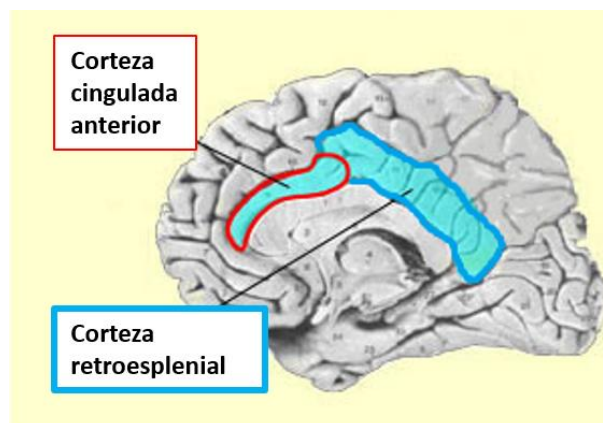


Figura 3. Corteza retrosplenial (RSC) (Modificado de Dubuc, 2018).

La RSC se encuentra directamente conectada al hipocampo, tanto por neuronas aferentes, como por neuronas eferentes (Todd y Bucci, 2015). Por lo que se cree que, adicionalmente a participar en tareas de almacenamiento de información asociada a la memoria, la RSC contribuye a comunicar al hipocampo información sensorial (Todd y Bucci, 2015). La asociación de estas estructuras en procesos cognitivos que involucran a la memoria, se ha podido observar en enfermedades neurológicas como la EA y la amnesia permanente, donde la función de la RSC se ve alterada, lo que se traduce en afectación de la memoria y en desregulación metabólica (Yasuno *et al.*, 1998; Aupeé *et al.*, 2001; Villain *et al.*, 2008; Pengas *et al.*, 2012). En este sentido, no es sorprendente que justamente estas regiones, hipocampo y corteza en general, son las áreas que presentan mayor daño por la pérdida neuronal que ocurre en la patología de la EA (Arendt, 2009).

2.3 Hipótesis actuales

2.3.1 Hipótesis basada en β A

A pesar, de que se conocen las lesiones histopatológicas que caracterizan a la EA, las placas de β A y las MNF, no se entiende totalmente la asociación entre estas lesiones y los síntomas clínicos que presentan los pacientes con la EA (Spires-Jones y Hyman, 2014). Adicionalmente, no se conoce con precisión cuál es el mecanismo de progresión de la patología de EA, cómo inicia y cómo se va desarrollando. Sin embargo, se tienen diversas hipótesis que tratan de explicar la patogénesis de la EA. Una de las primeras hipótesis que se tienen acerca de la enfermedad, surgió a raíz de lo observado en los casos de EA que son de Inicio Temprano, ya que en estos casos el factor genético juega un papel predominante en el desarrollo de la patología (Musiek y Holtzman, 2015). En estos individuos se asoció la presencia de mutaciones en la proteína APP y en las Presenilinas 1 y 2 (*PSEN1* y *PSEN2*) con la presencia de síntomas de la EA (Tanzi, 2012). Debido a que todos estos elementos participan en la producción de β A, se propuso que los efectos de la acumulación de β A son fenómenos clave en el surgimiento y aparición

de los síntomas característicos de la EA (Tanzi, 2012). De manera importante se ha observado que el péptido β A es citotóxico para las neuronas, por lo que éstas pierden su función y con ello se pierden las sinapsis (Hardy y Higgins, 1992). Adicionalmente, se ha propuesto que las placas de β A ocasionan cambios estructurales en el tejido cerebral que causan alteraciones a nivel de la transmisión sináptica (Le *et al.*, 2001). Se ha observado que la acumulación de placas de β A inicia en la neocorteza, a través de la allocorteza, hasta el diencéfalo, el cuerpo estriado y el núcleo basal colinérgico, hasta llegar a los núcleos en el tallo cerebral y hasta el cerebelo (Thal *et al.*, 2002).

En resumen, la hipótesis de la cascada amiloide propone que la acumulación de β A es un evento inicial durante el desarrollo de la EA, puede ocurrir incluso 20 años antes del inicio de los síntomas (Bateman *et al.*, 2012). Se propone entonces que la acumulación de β A induce y promueve la fosforilación anormal de la proteína tau, lo cual afecta la citoarquitectura de las neuronas y en etapas avanzadas las conduce a la muerte neuronal (Pooler *et al.*, 2013).

2.3.2 Hipótesis basada en pTau

La segunda hipótesis durante el desarrollo de la EA es la presencia de agregados compuestos por la proteína tau anormalmente fosforilada que dan lugar al desarrollo de las MNF. La acumulación de las MNF comienza en la corteza entorrinal, hasta el hipocampo y de ahí hacia las cortezas de asociación (Arnold *et al.*, 1991). La formación de estas MNF depende de que la proteína tau sufra modificaciones post traduccionales como: fosforilaciones, cambios conformacionales y escisiones (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2008; 2014). Sin embargo, la fosforilación de la proteína tau se ha validado como marcador neuropatológico de fases tempranas del desarrollo de la patología tipo Alzheimer (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha reportado que modificaciones en los niveles de fosforilación son capaces de alterar la respuesta sináptica produciendo alteraciones en los circuitos hipocampales y retroespleniales (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2018; Cornejo-Montes-de-Oca *et al.*, en preparación). Tales alteraciones establecen una

correlación funcional y podrían explicar el cuadro clínico observado en los pacientes que desarrollan la EA. Contrario a la presencia de las placas de β A, la presencia de lesiones histopatológicas se encuentra altamente correlacionada con el desarrollo de la EA (García-Sierra *et al.*, 2001; Basurto-Islas *et al.*, 2008).

2.4 Modelos transgénicos para el estudio de la patología de Alzheimer

Con el objetivo de entender el desarrollo de la patología tipo Alzheimer se han generado diversos modelos de ratones transgénicos que han permitido estudiar la evolución de los marcadores histopatológicos, así como la conducta y el estado de los circuitos neuronales (Spires y Hyman, 2005). Es necesario señalar que ningún modelo animal integra todo el espectro real de una enfermedad neurológica, particularmente una enfermedad compleja como la EA (Wong *et al.*, 2002). Sin embargo, los modelos animales de estas enfermedades son una buena aproximación para entender mejor estas patologías.

Uno de los modelos desarrollados para estudiar la patología tipo Alzheimer, es el ratón 3xTg-AD. Este ratón fue el primer modelo animal transgénico que desarrolló la formación de placas de β A y las MNF en las regiones cerebrales que se asocian al padecimiento de la EA (Oddo *et al.*, 2003). La aparición de las marcas neuropatológicas de la EA, está asociada a la edad y se manifiesta de manera progresiva, por lo que es un buen modelo de estudio de esta enfermedad (Kitazawa *et al.*, 2012). En este modelo, se reportó que la formación de depósitos de β A extracelular ocurre antes de la formación de las MNF, lo cual aportó evidencias importantes para el modelo de la hipótesis de la cascada amiloide (Oddo *et al.*, 2003). Un fenómeno interesante del 3xTg-AD es que la acumulación de β A y pTau ocurre desde los 4 meses de edad (Oddo *et al.*, 2003). No obstante, datos de nuestro laboratorio muestran que este modelo presenta acumulación de pTau desde los 30 días de edad en neuronas piramidales y en algunas interneuronas parvoalbúmina+ del hipocampo (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2018). Además, nuestros resultados demuestran que existen cambios en los niveles de actividad cerebral (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2018).

Por otro lado, existen otros modelos que permiten estudiar el efecto de la acumulación de tau hiperfosforilada en las patologías asociadas a demencia, como el ratón transgénico Tg4510 que sobreexpresa una versión mutante del gen humano (P301L) que codifica para una forma de proteína tau (Ramsden *et al.*, 2005). Esta mutante genera una hiperfosforilación de la proteína tau, que conlleva a la formación de las MNF, así como también se caracteriza por presentar problemas cognitivos que son dependientes de la edad y que concluyen en un patrón de neurodegeneración como el que observamos en la EA (Ramsden *et al.*, 2005). De manera relevante, mediante el estudio de los modelos animales se ha encontrado que, en etapas tempranas del desarrollo de la patología tipo Alzheimer, existe una disfunción a nivel de sinapsis, lo que se traduce en alteración de la plasticidad sináptica (Crimins *et al.*, 2013).

2.5 Actividad cerebral

La conectividad entre neuronas permite su comunicación y está asociada a las funciones cognitivas que conocemos (Halgren y Smith, 1987). De manera general, se considera que la fuerza con la que las neuronas establecen conexiones, podría estar asociada a la formación de la memoria (Ramón y Cajal, 1894). La conexión de las neuronas se fortalece cuando se activan de manera simultánea un grupo de neuronas, mientras que, una señal de comunicación es débil cuando la activación de neuronas ocurre de manera independiente y no de manera sincrónica (Hebb, 1949). El mecanismo mediante el cual se fortalecen o debilitan las conexiones neuronales se conoce como plasticidad sináptica, se caracteriza porque las neuronas pueden establecer distintos tipos de conexiones que se asocian a la formación de memoria y el aprendizaje (Ramón y Cajal, 1894). De manera particular las regiones cerebrales asociadas a estas funciones son el hipocampo y la neocorteza (Dudai y Morris, 2013).

En la EA se ha encontrado que los circuitos neuronales que comunican a estas regiones del cerebro se encuentran afectados (Arendt, 2009). Particularmente, se ha observado que los mecanismos que potencian la fuerza y el aumento de la

transmisión sináptica, como el de Potenciación a Largo Plazo (LTP por sus siglas en inglés) se encuentran afectados (Lei *et al.*, 2016; Salgado-Puga *et al.*, 2017). La LTP es un mecanismo que puede activarse a través de las sinapsis excitatorias, principalmente transmitidas por el neurotransmisor glutamato (Bliss y Gardner-Medwin, 1973; Cormier y Kelly, 1996). La LTP presenta dos fases, la fase temprana depende de la activación de cinasas que modifican a los receptores AMPA (Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico). Mientras que, en la fase tardía de la LTP se encuentran aumentados los niveles de calcio en los sitios postsinápticos y se promueve la activación de algunas cinasas que participan en la síntesis de proteínas involucradas en la formación de nuevas espinas dendríticas (Harris *et al.*, 2003; Frey y Morris, 1997; Redondo y Morris, 2011; Sanhueza y Lisman, 2013).

De manera contraria a la LTP se tiene el fenómeno de Depresión a Largo Plazo (LTD por sus siglas en inglés) que es un mecanismo que debilita la fuerza con la que un conjunto de neuronas se comunica (Fujii *et al.*, 1991). Esto se consigue mediante diversos mecanismos, en los que participan los receptores glutamatérgicos AMPA y N-metil D-aspartato (NMDA por sus siglas en inglés) (Collingridge *et al.*, 2010). En el caso de la EA se ha observado que la LTD asociada a los receptores NMDA es la que se encuentra mayormente afectada (Mota *et al.*, 2014). Este mecanismo de LTD depende del flujo de calcio, la activación de calcineurina y la activación de caspasas no apoptóticas (Li *et al.*, 2010). En modelos experimentales de la EA se ha observado que incrementos en los niveles de pTau mediados por la acumulación de β A está asociada a una disminución de la función del receptor NMDA lo cual conduce a LTD (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2012).

Se cree que la LTD es importante para poder eliminar algunos elementos de la memoria y así tener la capacidad de olvidar (Tsumoto, 1993). Debido a que en EA se tiene una pérdida de la memoria se cree que la LTD podría estar asociada en la degeneración que se observa en las sinapsis (Spires-Jones y Hyman, 2014). Además de que a la LTD se le ha asociado con un encogimiento y pérdida de las espinas dendríticas (Bastrikova *et al.*, 2008).

De manera que, los mecanismos de potenciación y depresión de la actividad sináptica, están regulados por distintas vías moleculares que dependen de la

excitabilidad de los circuitos (O'Leary *et al.*, 2010). Lo anterior debido a que, el glutamato, uno de los neurotransmisores excitatorios por excelencia, puede promover la LTP, pero también al permitir la entrada de calcio y activar distintas cinasas puede conducir a la LTD (Emptage *et al.*, 2003; Stanton *et al.*, 2003). Por otro lado, la excitabilidad de los circuitos se encuentra altamente regulada por la disponibilidad de aminoácidos que participan como neurotransmisores excitatorios como: el glutamato y el aspartato, además de aquellos aminoácidos que están involucrados en la síntesis de neurotransmisores, principalmente la glutamina (Dingledine y McBain, 1999; Hertz, 1979).

En la EA se ha observado que el péptido β A puede aumentar la excitabilidad del circuito hipocampal, lo que conduce a un aumento en la excitación de los circuitos involucrados, afectando procesos como el aprendizaje y la memoria (Palop *et al.*, 2007). Mediante el uso del ratón triple transgénico (3xTg-AD), datos de nuestro laboratorio reportan que la excitabilidad del circuito hipocampal se encuentra alterada en una fase muy temprana durante el desarrollo de la patología tipo Alzheimer (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2018). Adicionalmente, se encontró que las alteraciones moleculares y eléctricas a nivel del hipocampo se extienden a la RSC (Cornejo-Montes de Oca *et al.*, en preparación). En resumen, todos estos datos sugieren que los mecanismos encargados de regular los niveles de excitabilidad se encuentran alterados.

2.6 Ciclo Glutamato/GABA-Glutamina

La conexión neuronal ocurre a través de las sinapsis que pueden ser de tipo eléctrico o de tipo químico (Fonnum, 1984). Para el caso de las sinapsis de tipo químico, la transmisión de información se conduce a través de neurotransmisores, principalmente el glutamato y GABA (ácido gamma amino-butírico) (Kandel *et al.*, 2013). El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia, su actividad es importante en la corteza cerebral y en el hipocampo, dicha actividad excitatoria está directamente asociada a las capacidades cognitivas que resultan de los circuitos neuronales de esas regiones: el aprendizaje y la memoria (Fonnum, 1984). Sin

embargo, a pesar de la importancia del glutamato en los circuitos neuronales en general, las neuronas no poseen la maquinaria enzimática para sintetizar glutamato *de novo*, por lo que dependen de los astrocitos para poder sintetizar al glutamato (Yu *et al.*, 1983; Schousboe *et al.*, 1997; Hertz *et al.*, 1999). Para esto, las neuronas reciben glutamina principalmente de los astrocitos y es a partir de este aminoácido que pueden sintetizar al glutamato, todo este proceso forma parte del CGG (Bröer y Brookes, 2001).

2.7 Familia transportadora de solutos 38 (SLC38)

Existen distintas familias de transportadores de glutamina y otros aminoácidos, que se expresan en el tejido cerebral y tienen la capacidad de participar en la provisión de glutamina a las neuronas (Erecinska y Silver, 1990). Una de estas familias de transportadores es la familia transportadora de solutos 38 (SLC38), los transportadores de esta familia se caracterizan porque son dependientes de sodio (Na^+) y pueden transportar aminoácidos con carga neutra (Bröer, 2002). La familia SLC38 comprende a dos grupos de transportadores: el Sistema A y el Sistema N (Christensen, 1990).

2.7.1 Sistema N

El Sistema N se compone de transportadores tipo simporte de Na^+ y aminoácidos como glutamina, asparagina e histidina, acoplados a un transporte tipo antiporte de protones (H^+), por lo que son transportadores de tipo electroneutro (Chaudhry *et al.*, 1999). Los miembros del Sistema N tienen la particularidad de ser inhibidos a pH bajo (Kilberg *et al.*, 1980). Además de que el transporte puede cambiar su dirección dependiendo del estado metabólico de la célula en cuestión (Bhutia y Ganapathy, 2016). Dentro de este grupo de transportadores encontramos a SNAT3, SNAT5 y SNAT7. En el cerebro, el transportador SNAT3 se encuentra en la neocorteza, el cerebelo, el bulbo olfatorio y el tallo cerebral (Boulland *et al.*, 2002). Se encuentra abundantemente en astrocitos, mientras que no se encuentra en neuronas ni en

oligodendrocitos (Boulland *et al.*, 2003). SNAT5 se expresa en la neocorteza, el hipocampo, el cuerpo estriado y se expresa exclusivamente en astrocitos (Cubelos *et al.*, 2005). Por último, SNAT7 se expresa principalmente en el hipocampo, el hipotálamo, la amígdala, el área tegmental ventral y el locus cerúleo, además se identifica de forma exclusiva en neuronas (Hägglund *et al.*, 2011).

2.7.2 Sistema A

Los transportadores de Sistema A introducen Na⁺ y un aminoácido sin intercambio de H⁺, por lo que son transportadores electrogénicos (Oxender y Christensen, 1963; Collarini y Oxender, 1987). Los miembros del Sistema A tienen afinidad por alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, metionina y serina (Mackenzie y Erickson, 2004). En general, estos transportadores son regulados tanto por la suplementación, como por la depleción de aminoácidos (Christensen, 1990; Hyde *et al.*, 2007; Grewal *et al.*, 2009). Además de que pueden ser inducidos por estrés osmótico y hormonas, entre ellas, la insulina y el glucagón (Kletzien *et al.*, 1976; Cariappa y Kilberg, 1990; Mailliard *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1998; McDowell *et al.*, 1998). Una particularidad de los miembros de este sistema es que son inhibidos por el ácido N-metil-aminoisobutírico (MeAIB) que es un sustrato análogo de estos transportadores y no es metabolizado por las células (Freeman *et al.*, 1999).

Dentro del Sistema A encontramos a SNAT1, SNAT2, SNAT4 y SNAT8 (Bröer, 2014). El transportador SNAT1, en el sistema nervioso central, se encuentra principalmente en el cerebelo, el tálamo, el tallo cerebral, la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado (Varoqui *et al.*, 2000; Melone *et al.*, 2004). Se expresa en neuronas, aunque también se ha observado en células endoteliales y en astrocitos (Varoqui *et al.*, 2000; Melone *et al.*, 2004; Mackenzie *et al.*, 2003). SNAT1 es un transportador con una preferencia marcada hacia la glutamina, aunque también puede transportar alanina, cisteína y asparagina (Varoqui *et al.*, 2000).

El transportador SNAT2, por otro lado, presenta menor afinidad a glutamina en comparación con SNAT1 (Reimer *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2000). SNAT2 se expresa

principalmente en neuronas, aunque también se tiene evidencia de haberse encontrado en células gliales y en células que conforman la barrera hematoencefálica (Reimer *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2000). Este transportador se caracteriza por presentar una capacidad de respuesta adaptativa a diversos factores ambientales como depleción de aminoácidos y estrés osmótico (Franchi-Gazzola *et al.*, 2001; Franchi-Gazzola *et al.*, 2004; Iresjo *et al.*, 2005).

El transportador SNAT4 no se expresa en el sistema nervioso central, sino en otros tejidos, principalmente en el hígado y la vejiga (Hatanaka *et al.*, 2001). Por último, SNAT8 se encuentra principalmente en el tálamo, el hipotálamo, la amígdala y el puente tronco encefálico, mientras que, su expresión se limita a identificarse en neuronas (Hägglund *et al.*, 2015). Este transportador presenta una preferencia hacia el transporte de glutamina, alanina, arginina y aspartato (Hägglund *et al.*, 2015).

2.8 Familia SLC38 y su participación en el ciclo Glutamato/GABA-Glutamina

Los transportadores de la familia SLC38 son capaces de transportar distintos aminoácidos con una afinidad distinta entre ellos (Bröer, 2014). Sin embargo, una de las funciones principales de estos transportadores en el cerebro, consiste en su participación en el transporte de glutamina (Leke y Schousboe, 2016). La glutamina, como se mencionó anteriormente, participa en el CGG.

El ciclo CGG permite que la glutamina se transfiera desde los astrocitos hacia las neuronas, para que así éstas últimas a partir de glutamina, puedan sintetizar GABA y glutamato (Hertz, 1979). Todo este ciclo funciona gracias a la acción de diversos transportadores que se encuentran tanto en las neuronas como en los astrocitos (Leke y Schousboe, 2016). Algunos de los sistemas de transportadores involucrados en el funcionamiento del CGG, son tanto el sistema A, como el sistema N de la familia SLC38 (Bak *et al.*, 2006).

Cuando ocurre la neurotransmisión, el glutamato debe ser internalizado por los astrocitos para finalizar la estimulación excitatoria (Schousboe, 2003). Dentro de los astrocitos la glutamina se produce a partir del glutamato internalizado o a partir de glutamato sintetizado *de novo* (Shousboue, 2013). La síntesis de glutamina a partir

de glutamato depende de la actividad de la enzima glutamina sintetasa, que se expresa únicamente en los astrocitos (Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979). La glutamina entonces es liberada de los astrocitos hacia el espacio extracelular a través de los transportadores SNAT3 y SNAT5, para después ser internalizada por las neuronas a través de los transportadores SNAT1 y SNAT2 (Schousboe *et al.*, 2013). Ya dentro de las neuronas, la glutamina es utilizada para la síntesis de glutamato o GABA, por medio de la actividad enzimática de la glutaminasa fosfato activada (Bak *et al.*, 2006).

SNAT1 se encuentra en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas (Mackenzie *et al.*, 2003), sin embargo, se encuentra más asociado a sinapsis GABAérgicas (Leke y Schousboe, 2016), particularmente en interneuronas GABAérgicas de la neocorteza y el hipocampo (Jenstad *et al.*, 2009). El transportador SNAT1 se expresa principalmente en el soma neuronal, axones y cerca de las terminales sinápticas (Weiss *et al.*, 2003). Por otro lado, SNAT2 se encuentra esencialmente en neuronas glutamatérgicas y específicamente en el compartimento somatodendrítico, por lo que parece que SNAT1 y SNAT2 tienen roles complementarios (González-González *et al.*, 2005). De manera particular, SNAT2 se ha asociado a la señalización retrógrada de glutamato, por lo que se cree que podría estar involucrado en la plasticidad sináptica, al regular la neurotransmisión (Jenstad *et al.*, 2009).

Al participar en la regulación de los niveles de neurotransmisores involucrados en la excitación e inhibición neuronal, los transportadores del sistema A y N pueden estudiarse en modelos de enfermedades neurológicas, debido a que en este tipo de enfermedades se ha encontrado un desequilibrio en las funciones excitatorias e inhibitorias de las neuronas (Leke y Schousboe, 2016). Por lo que, una aproximación para estudiar estos modelos de neuropatología, podría ser el estudiar la participación de los transportadores involucrados en estas funciones en condiciones fisiológicas, para así entender qué ocurre con estos transportadores en casos patológicos.

Se ha encontrado que la función del CGG se encuentra afectada en algunas enfermedades neurológicas como epilepsia, EA y en infartos cerebrales (Walton y

Dodd, 2007; Coulter y Eid, 2012 y Jeitner *et al.*, 2015). En el caso de epilepsia se ha observado un decremento en la afinidad de los transportadores de glutamato, así como en la expresión y actividad de la enzima glutamina sintetasa (Mathern *et al.*, 1999). Para el caso de la EA, se han encontrado alteraciones en la actividad de la glutamina sintetasa en los astrocitos y en la región cortical del cerebro (Robinson, 2001). Sin embargo, a pesar de su importancia en el CGG, los transportadores de glutamina han sido subestimados en cuando a su implicación en enfermedades neurológicas (Leke y Schousboe, 2016). En particular, no se ha estudiado la presencia de transportadores SNAT en condiciones patológicas como la que ocurre en la EA.

3. Justificación

Basados en lo anterior, es claro que los transportadores SNAT juegan un papel importante en el CGG y en el abastecimiento de glutamina para las neuronas. De esta forma, los transportadores SNAT se encuentran involucrados en la regulación de la actividad neuronal. Sin embargo, no existen datos experimentales que evalúen si los transportadores SNAT se encuentran alterados en modelos transgénicos que desarrollan los marcadores histopatológicos de la patología tipo Alzheimer. En este contexto, estos datos serán de gran importancia para comprender el mecanismo de patogénesis en el desarrollo de padecimientos de tipo neurodegenerativo.

4. Hipótesis

Los transportadores de aminoácidos neutros acoplados a sodio SNAT1 y SNAT2 se encuentran alterados en los modelos Tg4510 y 3xTg-AD durante etapas tempranas del desarrollo de los procesos neurodegenerativos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Estudiar las potenciales alteraciones en los transportadores de aminoácidos neutros acoplados a sodio SNAT1 y SNAT2 en los modelos de ratones transgénicos 3xTg-

AD y Tg4510 durante etapas tempranas del desarrollo de la patología tipo Alzheimer.

5.2. Objetivos particulares

1. Evaluar las potenciales alteraciones a nivel del transportador de aminoácidos neutros SNAT1 en los modelos de ratones transgénicos 3xTg-AD y Tg4510 durante etapas iniciales del desarrollo de la patología.
2. Evaluar las potenciales alteraciones a nivel del transportador de aminoácidos neutros SNAT2 en los modelos de ratones transgénicos 3xTg-AD y Tg4510 durante etapas iniciales del desarrollo de la patología.
3. Evaluar los niveles de fosforilación de la proteína tau en los modelos de ratones transgénicos 3xTg-AD y Tg4510 durante etapas iniciales del desarrollo de la patología.

6. Metodología

6.1 Sujetos

Todos los procedimientos fueron realizados bajo las normas del Comité de Bioética de la Universidad Nacional Autónoma México y de la Universidad Autónoma de Querétaro. El uso de los animales se realizó conforme a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales del laboratorio.

En este estudio se utilizaron ratones machos y hembras 3xTg-AD homocigotos de 30 - 45 días de edad generados a partir de un fondo híbrido B6129S. También se utilizaron ratones machos y hembras Tg4510 de 30 - 45 días de nacidos fondo Tg (Camk2a-tTA)1Mmay Fgf14Tg(tetO-MAPT*P301L) 4510Kha/J (The Jackson Laboratory, E.U.A.). De igual forma, se utilizaron ratones no transgénicos (NT) C57BL/6J de 30 - 45 días de nacidos. Todos los animales fueron reproducidos y criados en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, en cajas de policarbonato (12 x 12 x 25 cm) y en condiciones óptimas de alimentación (dieta

para ratón del laboratorio Purina Chow fórmula 5001 y agua ad libitum) y de ambientación constante (temperatura entre 20° 25°C; humedad 40 - 70%) en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, iniciando la luz a las 8:00.

6.2 Inmunofluorescencia y caracterización por microscopía

Ratones 3xTg-AD, Tg4510 y NT de las edades previamente mencionadas, fueron sacrificados con sobredosis de pentobarbital sódico para posteriormente ser perfundidos con paraformaldehído (PFA) al 4%. Después se extrajo el cerebro y se colocó en almacenamiento en sacarosa al 30% y PFA al 4%. El tejido fue seccionado por medio de un criostato, para obtener rebanadas de 50 µm de grosor. Todo el material biológico fue tratado de acuerdo a protocolos internos (INB) de manejo que incluyen incineración. Para la caracterización *in situ* mediante microscopía se utilizaron los anticuerpos: pTau que reconoce a la proteína tau fosforilada en el sitio S³⁹⁶ (Santa Cruz Biotechnology, Inc., E.U.A.), el anticuerpo monoclonal que reconoce al transportador SNAT1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., E.U.A.) y el suero de conejo inmunizado contra el transportador SNAT2 (hecho por América Conejo, Laboratorio Neurobiología Molecular, UAQ). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron específicos para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de ratón o conejo (Anti Mo IgG µ específico, Anti Rb IgG) acoplados a distintos fluoróforos: FITC/alexa 488, color verde (Invitrogen, E.U.A.), TRITC/alexa 568 color rojo (Invitrogen, E.U.A.) y DAPI, color azul (Invitrogen, E.U.A.).

El tejido seleccionado fue lavado con buffer salino de fosfatos al 0.1 M (PBS por sus siglas en inglés) en tres ocasiones por 10 minutos cada lavado. Se aplicó buffer de bloqueo (10% de albúmina de suero bovino + 1% de Triton X-100 en PBS 0.1 M) por tres horas. Se incubó el tejido durante toda la noche con los anticuerpos primarios en dilución con 3% de albúmina de suero bovino + 0.3% de Triton X-100 en PBS 0.1 M. Posteriormente se realizaron tres lavados de PBS por 10 minutos cada uno, para después incubar con los anticuerpos secundarios por 2 horas. El tejido fue lavado tres veces por 10 minutos cada uno y después fue incubado con DAPI por 15 minutos. Por último, el tejido fue lavado por tres veces durante cinco

minutos cada uno. Después se procedió a montar el tejido en laminillas, cada rebanada fue cubierta con VectaShield (Vector Laboratories, Inc, E.U.A.). Las laminillas preparadas se observaron en el microscopio de fluorescencia Axio Imager 2 Zeiss (Alemania). Las imágenes de fluorescencia colectadas se procesaron para su presentación y cuantificación con el programa ZEN Blue, (Zeiss, Alemania).

6.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GRAPH PAD Prism 6 Software (E.U.A.). Inicialmente, se analizó la distribución de los datos mediante la prueba de Kolmogorov y Shapiro Wilk. Posteriormente, de acuerdo a la distribución no paramétrica de los datos se realizó la Prueba Mann-Whitney, para el caso de los datos que eran de tipo no pareados o independientes. Mientras que para los datos pareados se realizó una Prueba de Wilcoxon. En cada caso se realizaron siempre las pruebas post-hoc correspondientes. Se estableció un nivel de significancia del 95% en todas las pruebas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

7. Resultados

7.1 Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón NT

Para estudiar los niveles de expresión del transportador SNAT1 en el hipocampo de ratones C57BL/6 (NT) de un mes de edad, se realizaron inmunofluorescencias utilizando un anticuerpo específico que reconoce a SNAT1 (ver metodología). Nuestros datos mostraron la expresión del transportador SNAT1 en la región CA1 del hipocampo (Fig. 4A). Se observaron principalmente somas neuronales y en menor medida procesos dendríticos (Fig. 4A, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa = 1.039 ± 0.118 u. a.). El patrón de expresión de SNAT1 se preservó en la región CA2 del hipocampo, donde se observa marca principalmente en somas (Fig. 4B, ver flechas, media de fluorescencia relativa de

1.049 ± 0.103 u.a.). En la región CA3 del hipocampo se observó marca de manera dispersa (Fig. 4C, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 1.006 ± 0.15 u.a.). En la región del giro dentado (DG), se distinguieron somas en la capa de células granulares, así como también en la región del hilus (Fig. 4D, ver flechas, media de fluorescencia relativa = 1.019 ± 0.084 u.a.). Finalmente, en la región del subículum (SUB) los niveles de expresión de SNAT1 denotaron somas neuronales (Fig. 4E, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 1.016 ± 0.115 u.a.). El análisis estadístico no detectó diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión a lo largo de la formación hipocampal de ratones jóvenes NT (Fig. 5F). En resumen, los niveles máximos de expresión del transportador SNAT1 se situaron en la región del soma (Fig. 4G y 1H, ver flechas) y en menor medida en procesos dendríticos (Fig. 4G y 1H, ver cabezas de flecha).

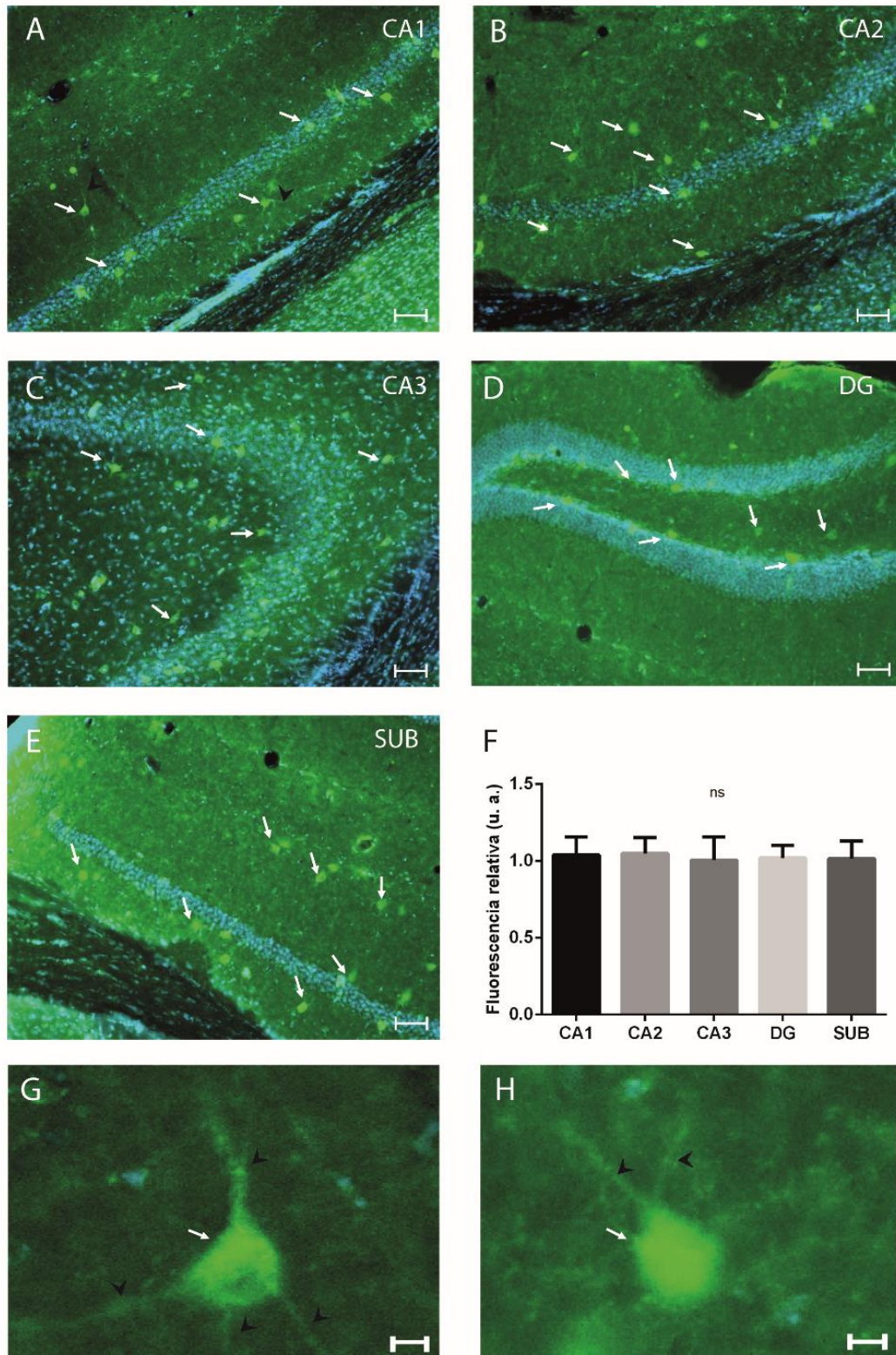


Figura 4. Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón NT. (A) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región CA1 del

hipocampo. Se observan somas y procesos dendríticos (Flechas y cabezas de flechas). **(B)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región CA2 del hipocampo. Se observan principalmente somas (Flechas). **(C)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región CA3 del hipocampo. **(D)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región del giro dentado del hipocampo. Se distinguen somas con expresión de SNAT1, tanto en la capa de células granulares como en la región del hilus. **(E)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región del subículum del hipocampo. **(F)** Expresión relativa del transportador SNAT1 evaluada en cada región del hipocampo (Prueba de Wilcoxon, $ns = p > 0.05$). **(G)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en una neurona del hipocampo. Se distingue el soma y procesos dendríticos (Flecha y cabezas de flechas). **(H)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en neurona del hipocampo (escala A – E = 50 μm , G - H = 5 μm , n = 3).

7.2 Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón Tg4510

Para estudiar los niveles de expresión del transportador SNAT1 en el hipocampo de ratones Tg4510 de un mes de edad, nuevamente se realizaron inmunodetecciones utilizando el anticuerpo contra la proteína SNAT1. Nuestros datos mostraron la expresión del transportador SNAT1 en la región CA1 del hipocampo (Fig. 5A). Se observaron somas cercanos a la capa de células piramidales (Fig. 5A, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.852 ± 0.104 u.a.). La expresión de SNAT1 en la región de CA2 mostró un patrón de expresión perinuclear (Fig. 5B, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.833 ± 0.080 u.a.). El patrón de expresión se preservó en la región CA3 del hipocampo (Fig. 5C, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.848 ± 0.090 u.a.). En el mismo sentido, en la región del giro dentado se observaron somas neuronales que se caracterizaron por expresar SNAT1 (Fig. 5D, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.766 ± 0.111 u.a.). La expresión de SNAT1 en la región del subículum se distinguió en somas y en procesos dendríticos (Fig. 5E, ver flechas y cabezas de flechas, media de

fluorescencia relativa de 0.774 ± 0.118 u.a.). El análisis estadístico mostró que CA2, giro dentado y subículum tienen una menor expresión de SNAT1 cuando se compara contra CA1, CA2 y CA3 (Fig. 4F).

En resumen, las neuronas del ratón joven Tg4510 se caracterizaron por expresar al transportador SNAT1 preferentemente en la región del soma (Fig. 5G, 5H y 5I, ver flechas) y en menor medida en los procesos dendríticos (Fig. 5G, 5H y 5I, ver cabezas de flecha).

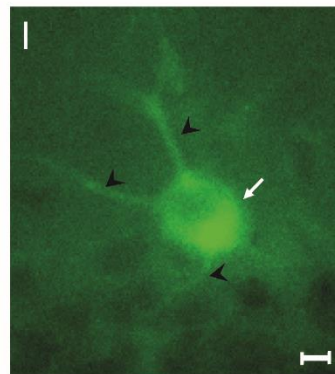
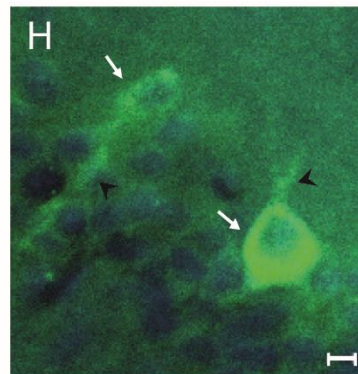
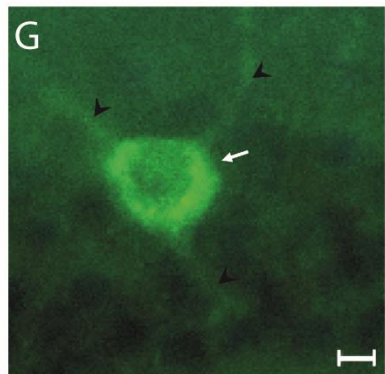
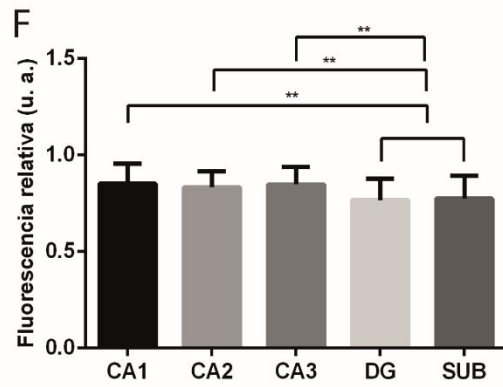
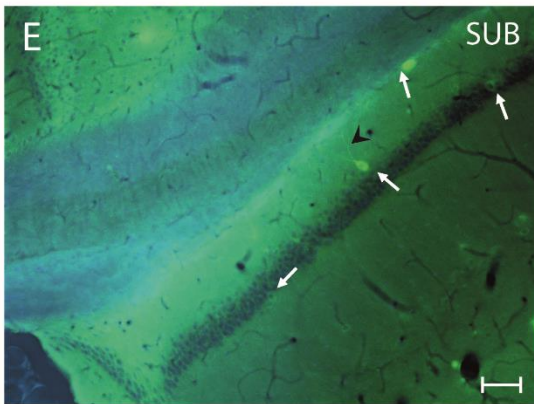
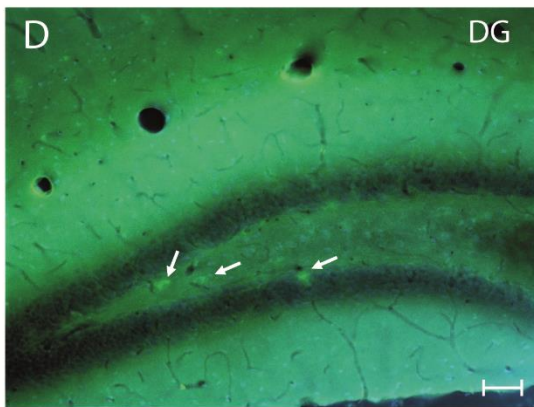
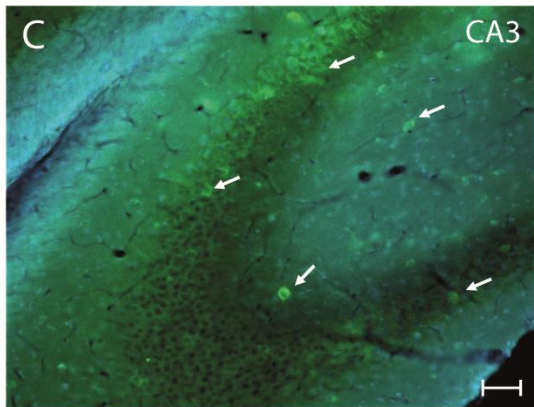
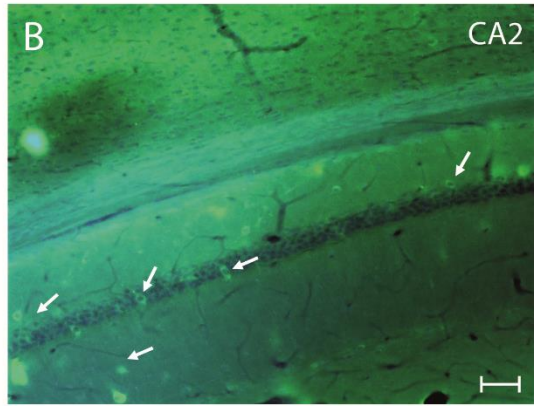
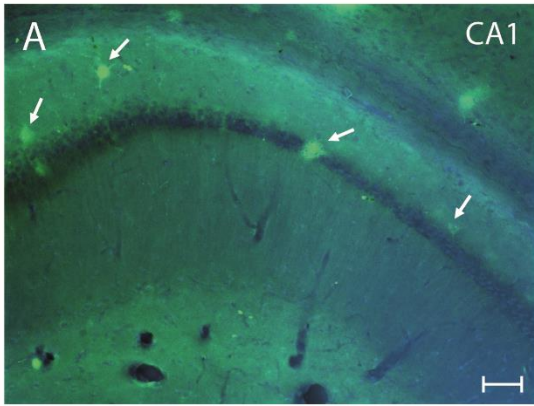


Figura 5. Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón Tg4510. (A) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región CA1 del hipocampo. Se observan principalmente somas (Flechas). (B) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región CA2 del hipocampo, (C) en la región CA3 del hipocampo y (D) en la región del giro dentado. (E) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región del subículum. (F) Expresión relativa del transportador SNAT1 de cada región del hipocampo (Prueba de Wilcoxon, $** p < 0.01$). (G - I) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en neuronas del hipocampo (escala A – E = 50 μ m, G y H = 5 μ m, n = 3).

7.3 Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón 3xTg-AD

Para estudiar los niveles de expresión del transportador SNAT1 en el hipocampo de ratones 3xTg-AD de un mes de edad, nuevamente se realizó inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo que reconoce al transportador de aminoácidos SNAT1. Nuestros datos evidenciaron la expresión del transportador SNAT1 en la región CA1 del hipocampo, se observaron somas y procesos dendríticos (Fig. 6A, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 1.002 ± 0.126 u.a.). El patrón de expresión de SNAT1 se preservó en la región CA2 del hipocampo (Fig. 6B, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 1.006 ± 0.148 u.a.). En la región CA3 del hipocampo se observó expresión preferentemente en somas (Fig. 6C, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.998 ± 0.112 u.a.). En la región del giro dentado se distinguió marca en somas cercanos a la capa de células granulares, así como también en la región del hilus (Fig. 6D, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.913 ± 0.168 u.a.). En la región del subículum la expresión de SNAT1 se caracterizó por presentar un patrón de distribución puntillado (Fig. 6E, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.951 ± 0.126 u.a.). En el ratón 3xTg-AD, el análisis estadístico evidenció que nuevamente la región del giro dentado y el subículum tienen un menor nivel de expresión de SNAT1 cuando se compara con la región de CA1 (Fig. 6F).

A diferencia de los modelos anteriores, el ratón 3xTg-AD presentó un patrón de distribución puntillado que se observa tanto en somas como en procesos dendríticos (Fig. 6G, 6H y 6I, ver flechas y cabezas de flechas).

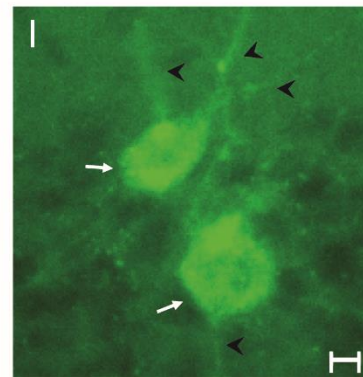
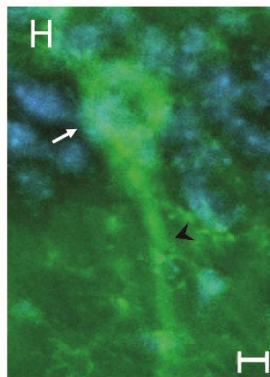
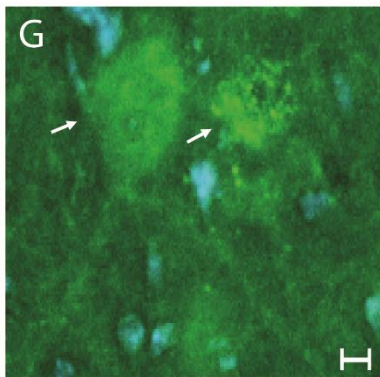
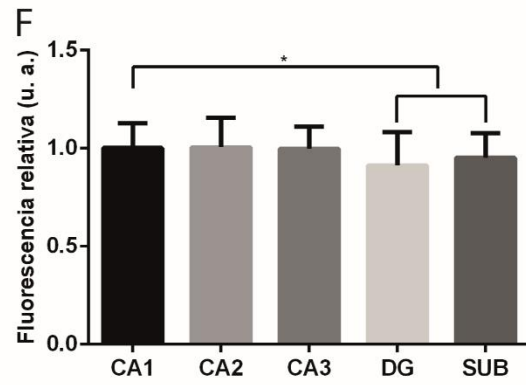
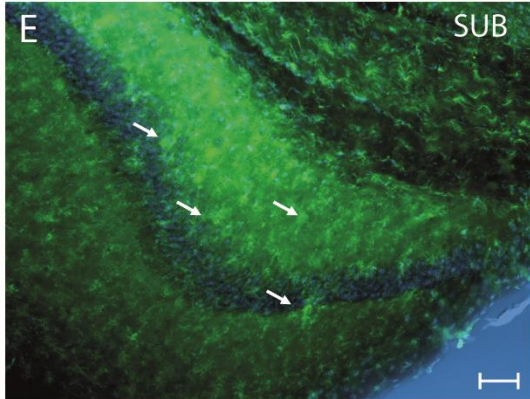
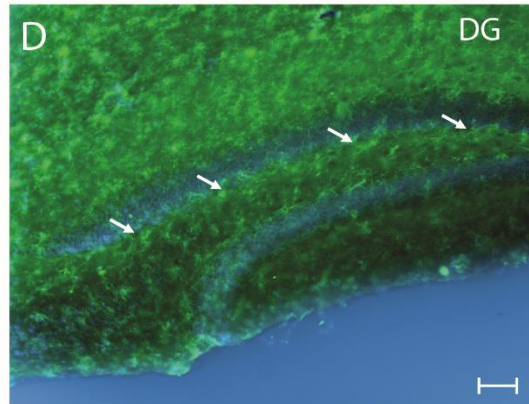
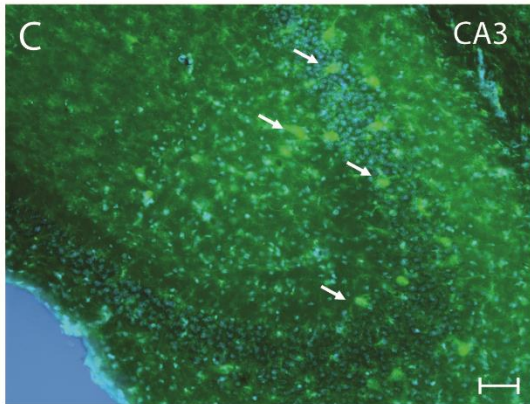
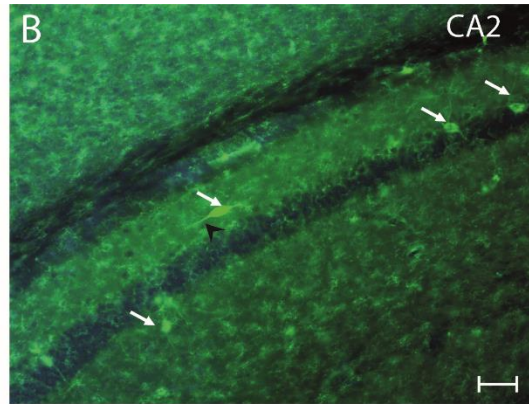
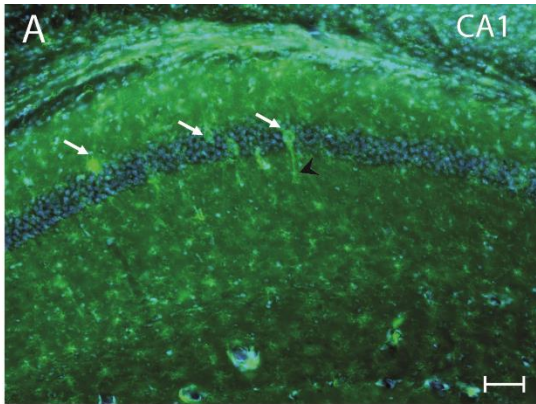


Figura 6. Distribución morfológica del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón 3Tg-AD. (A) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región CA1 del hipocampo. Se observan somas y procesos dendríticos (Flechas y cabezas de flechas). (B) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la región CA2, (C) en la región CA3, (D) en la región del giro dentado y (E) en la región del subículum. (F) Expresión relativa del transportador SNAT1 de cada región del hipocampo (Prueba de Wilcoxon, * $p < 0.05$). (G - I) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en neuronas del hipocampo (flechas = somas y cabezas de flecha = dendritas), escala A – E = 50 μm , G y H = 5 μm , n = 3.

7.4 Comparación de la expresión del transportador SNAT1 en el hipocampo de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD

Para evaluar la expresión del transportador SNAT1 en el hipocampo de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD se compararon los valores de fluorescencia relativa de cada grupo para las distintas regiones del hipocampo que fueron evaluadas (Fig. 7). Nuestros datos estadísticos evidenciaron un decremento significativo de los niveles de expresión del transportador SNAT1 en la región de CA1 del ratón Tg4510 cuando se comparó con el ratón NT (Fig.7A). Mientras que para el ratón 3xTg-AD no existió una disminución de la expresión de SNAT1 cuando se comparó con el ratón NT (Fig. 7A, $p=0.43$). Nuevamente, en la región de CA2 se observó que el ratón Tg4510 muestra un decremento significativo en la expresión de SNAT1 cuando se comparó con el ratón NT (Fig.7B). Por el contrario, el ratón 3xTg-AD no presentó una disminución significativa en la expresión de SNAT1 cuando se comparó con el ratón NT (Fig.7B, $p=0.26$). El nivel de expresión de SNAT1 para la región CA3 del ratón Tg4510 muestra un decremento en relación con el ratón NT (Fig. 7C). De nueva cuenta, no se detectó una disminución significativa en la región CA3 del ratón 3xTg-AD cuando se comparó contra el NT (Fig.7C, $p=0.71$). En el giro dentado la expresión de SNAT1 evidenció que existe una disminución en la expresión de este transportador en ambos modelos, cuando se compara con el ratón NT (Fig. 7D). Por último, en la región del subículum los datos mostraron que el ratón Tg4510 y el

3xTg-AD presentaron una disminución significativa de la expresión de SNAT1 en relación con el ratón NT (Fig.7E).

En resumen, nuestros resultados evidenciaron que a lo largo de la formación hipocampal del ratón Tg4510, los niveles de expresión del transportador SNAT1 se encuentran disminuidos, cuando se comparan con lo encontrado en el ratón NT. Mientras que en el hipocampo del ratón 3xTg-AD, los niveles de expresión de SNAT1 sólo se encontraron disminuidos en la región del giro dentado y subículum.

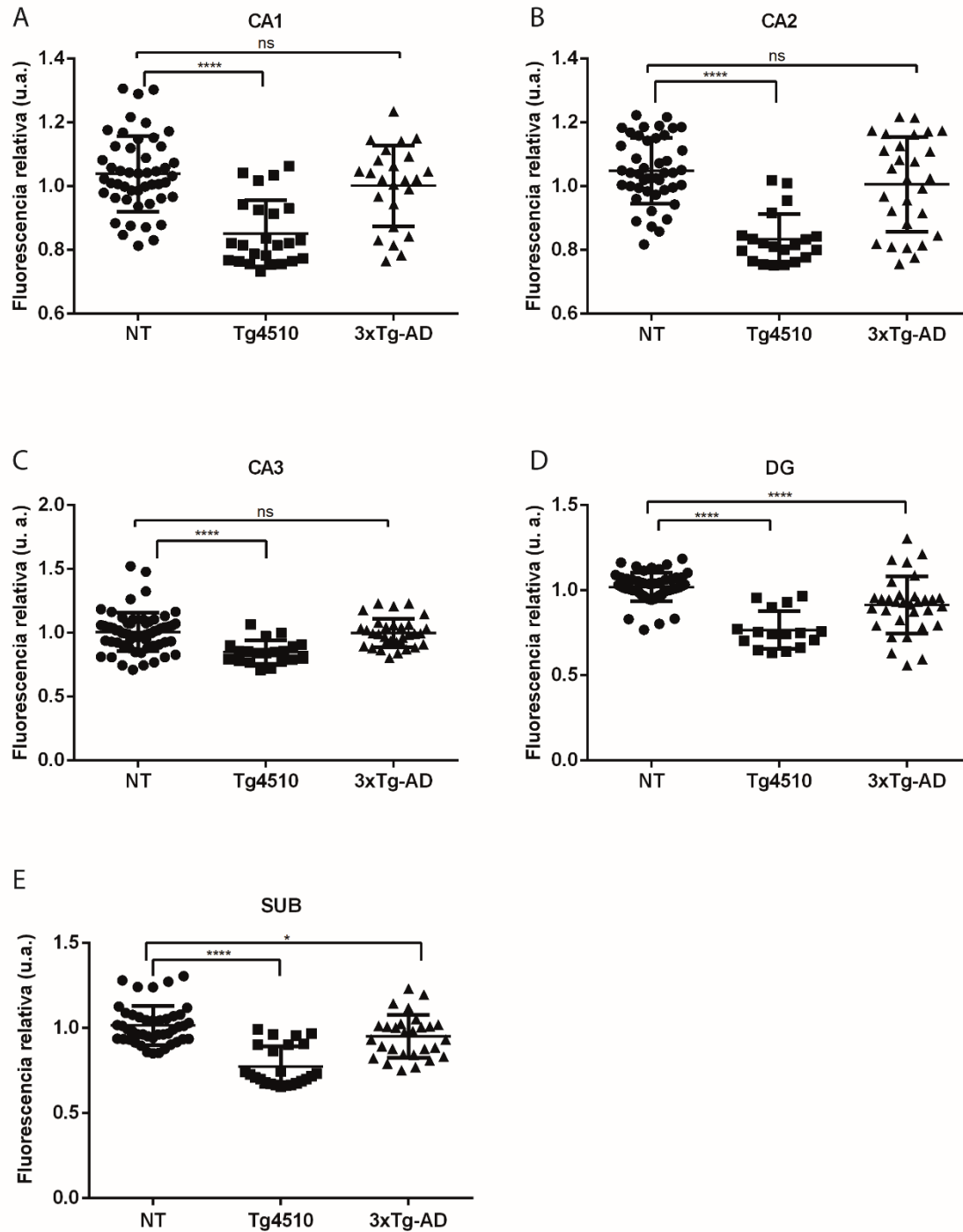


Figura 7. Comparación de la expresión del transportador SNAT1 en el hipocampo de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD. (A) Expresión del transportador SNAT1 en la región de CA1, (B) CA2, (C) CA3, (D) DG y (E) SUB para el ratón NT, Tg4510 y 3xTg-AD (n=3, Mann-Whitney, ns= $p > 0.05$, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$).

7.5 Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón no transgénico

Para estudiar los niveles de expresión del transportador SNAT2 en el hipocampo de ratones C57BL/6 (NT) de un mes de edad, se realizaron nuevamente inmunohistoquímicas (ver métodos). Nuestros resultados evidenciaron la expresión del transportador SNAT2 en la región CA1 del hipocampo (Fig. 8A). Similar a lo observado previamente, se distinguieron principalmente somas neuronales y procesos dendríticos (Fig. 8A, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 1.073 ± 0.162 u.a.). El patrón de expresión observado en la región CA1 se mantuvo en la región CA2 (Fig. 8B, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 1.037 ± 0.106 u.a.). Los niveles de expresión en la región CA3 se distinguieron preferentemente en somas neuronales (8C, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 1.022 ± 0.089 u.a.). En la región del giro dentado, se observó mayor densidad en los niveles de expresión de SNAT2, se distinguieron somas neuronales en la región del hilus (Fig. 8D, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 1.005 ± 0.110 u.a.). La expresión de SNAT2 en la región del subículum se identificó en somas neuronales y en procesos dendríticos (Fig. 8E, flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 1.006 ± 0.139 u.a.). El análisis estadístico no detectó diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión de SNAT2 a lo largo de la formación hipocampal de ratones jóvenes NT (Fig. 8F).

En resumen, se observó que a diferencia de lo observado con el transportador SNAT1, los niveles de expresión de SNAT2 se distinguieron no sólo en el soma neuronal sino en procesos dendríticos proximales y distales (Fig. 8G, H, I, ver flechas y cabezas de flechas).

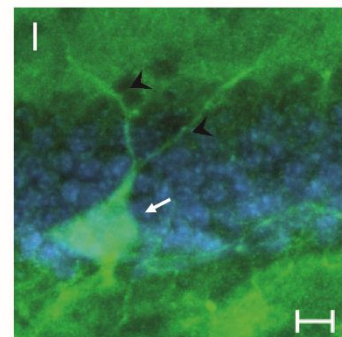
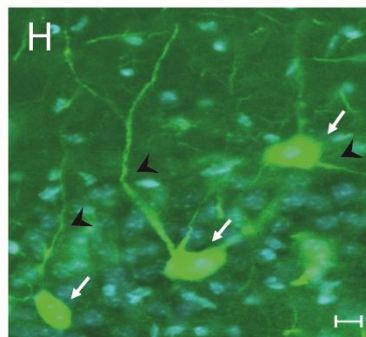
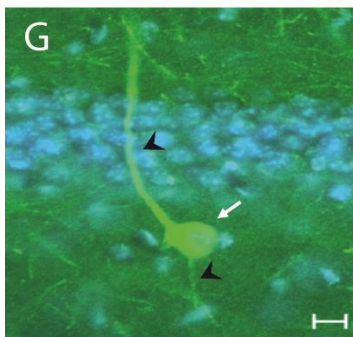
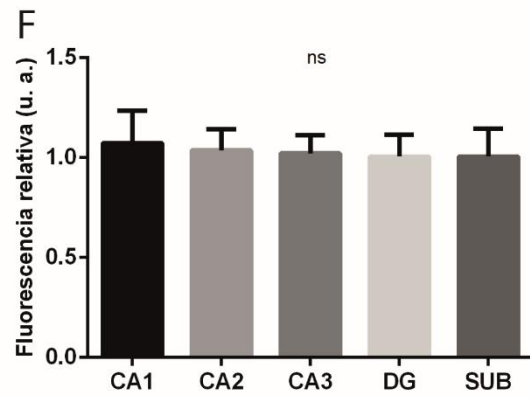
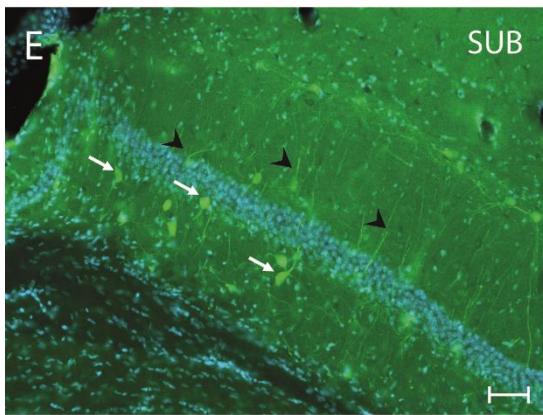
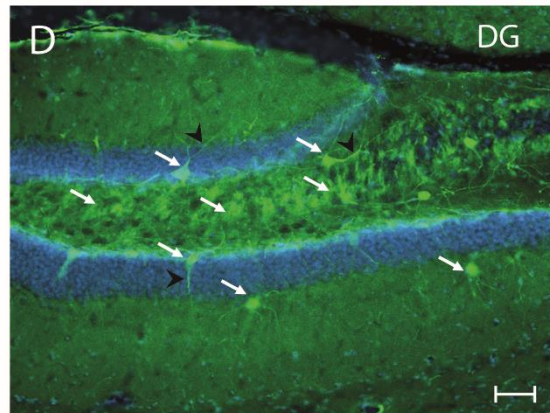
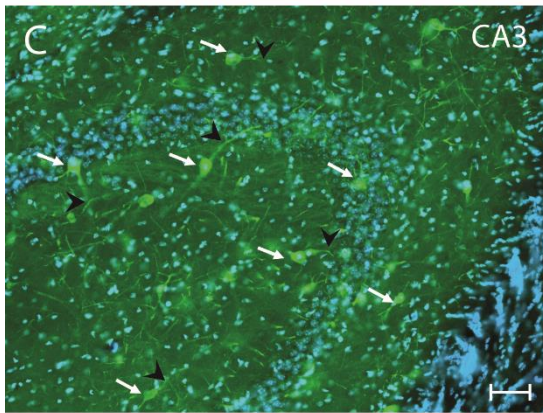
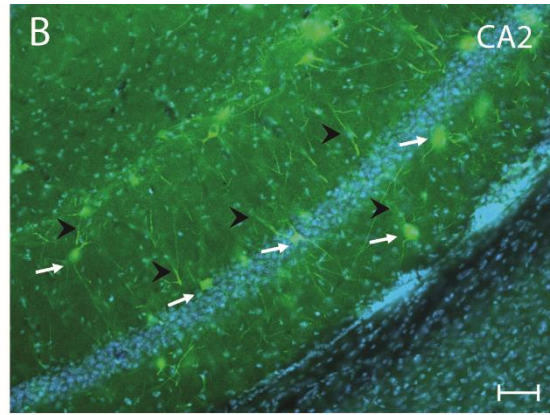
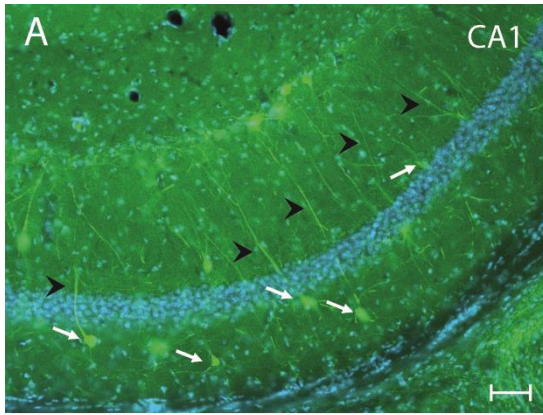


Figura 8. Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón NT. (A) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la región CA1 del hipocampo. Se observan somas y procesos dendríticos (Flechas y cabezas de flechas). (B) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la región CA2, (C) en la región CA3, y (D) en la región del giro dentado. Nótese el incremento de marca en la región del hilus. (E) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la región del subículum del hipocampo (F) Nivel de expresión del transportador SNAT2 de cada región del hipocampo evaluada (Prueba de Wilcoxon, ns= $p>0.05$). (G - I) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en neuronas del hipocampo. Se aprecia marca en el soma y en procesos dendríticos (Flecha y cabezas de flechas), escala A – E = 50 μ m, G y H = 5 μ m, n = 3.

7.6 Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón Tg4510

Posteriormente, se evaluaron los niveles de expresión del transportador SNAT2 en el hipocampo de ratones Tg4510 de un mes de edad. Nuestros datos mostraron la expresión del transportador SNAT2 en la región CA1 del hipocampo, donde se distinguen principalmente somas neuronales y procesos dendríticos (Fig. 9A, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 0.019 ± 0.002 u.a.). Los niveles de expresión de SNAT2 en la región CA2 presentaron una menor densidad y se distinguieron en somas neuronales y procesos dendríticos (Fig. 9B, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 0.022 ± 0.002 u.a.). En la región CA3 se observó marca en somas neuronales y procesos dendríticos que se encontraron distribuidos de manera dispersa (Fig. 9C, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 0.019 ± 0.002 u.a.). Los niveles de expresión de SNAT2 se observaron con poca densidad en la región del hilus del giro dentado, sólo se detectó expresión preferentemente en somas neuronales adyacentes a la capa de células granulares (Fig. 9D, ver flechas y cabeza de flecha, media de fluorescencia relativa de 0.02119 ± 0.003 u.a.). En la región del subículum la marca de SNAT2 se apreció en somas neuronales y a lo

largo de procesos dendríticos, con una distribución principalmente homogénea (Fig. 9E, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 0.022 ± 0.005 u.a.). El análisis estadístico reveló que la región de CA1, CA2 y subículum presentaron un menor nivel de expresión de SNAT2 cuando se compara con la región de giro dentado (Fig. 9F).

En resumen, las neuronas del ratón Tg4510 presentaron un patrón de expresión de SNAT2 en los somas neuronales y en procesos dendríticos proximales y distales (Fig. 9G, y 9H, ver flechas y cabezas de flechas).

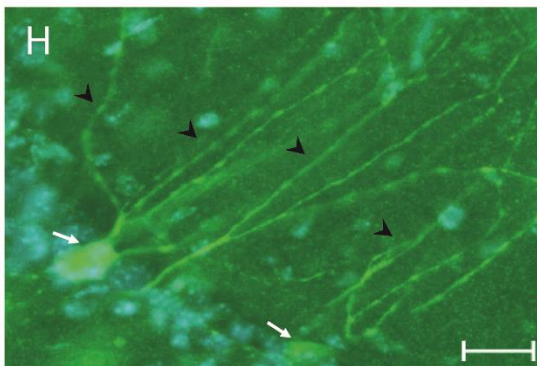
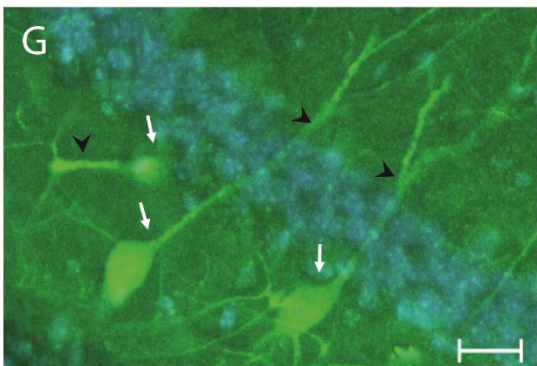
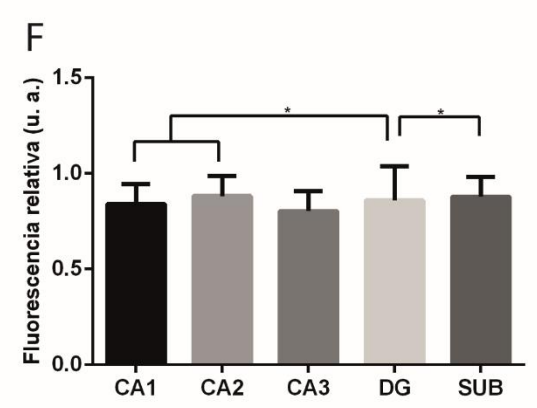
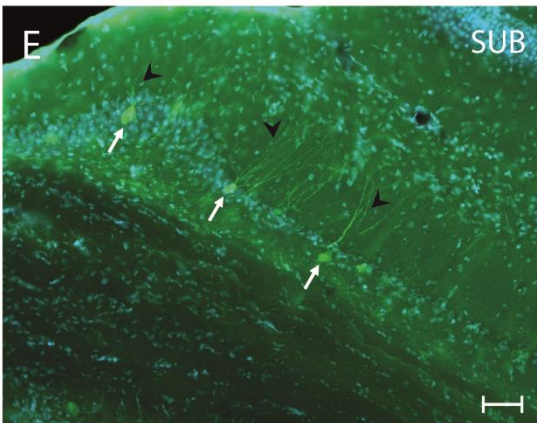
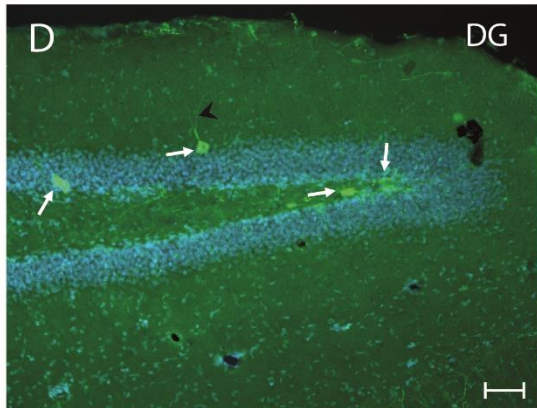
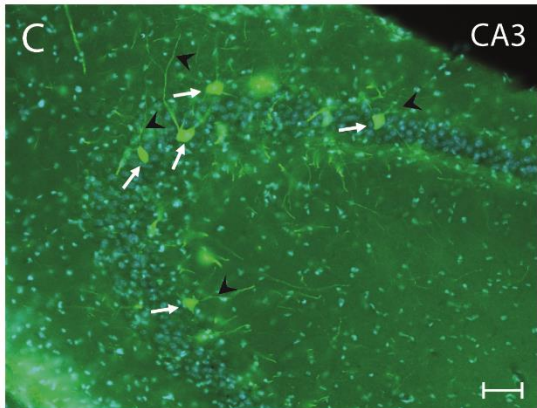
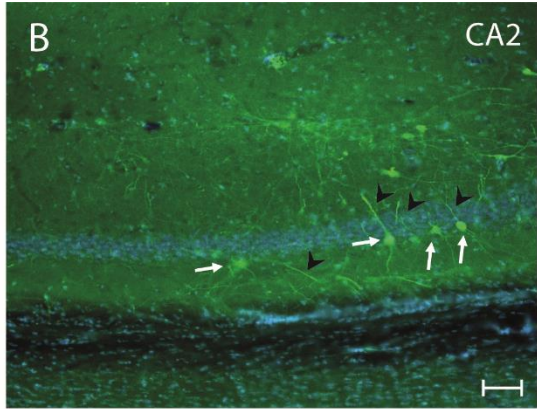
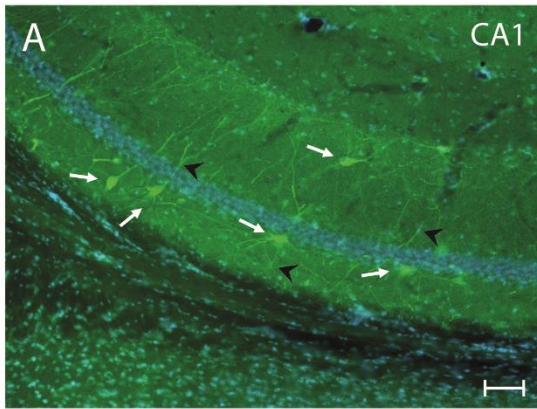


Figura 9. Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón Tg4510. (A) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la región CA1 del hipocampo (Flechas y cabezas de flechas). (B) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la región CA2, (C) en la región CA3 y (D) en la región del giro dentado. (E) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la región del subículum del hipocampo. (F) Expresión del transportador SNAT2 de cada región del hipocampo evaluada (Prueba de Wilcoxon, * $p < = 0.05$). (G y H) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en neuronas del hipocampo. Se aprecia marca en el soma y a lo largo de los procesos dendríticos (Flecha y cabezas de flechas), escala A – E = 50 μm , G y H = 5 μm , n = 3.

7.7 Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón 3xTg-AD

Se evaluaron los niveles de expresión del transportador SNAT2 en el hipocampo de los ratones 3xTg-AD de un mes de edad. Nuestros datos evidenciaron la expresión del transportador SNAT2 en la región CA1 del hipocampo, tanto en somas neuronales como a lo largo de procesos dendríticos (Fig. 10A, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 0.019 ± 0.002 u.a.). En la región CA2 se observó un patrón de marca semejante al encontrado en CA1 (Fig.10B, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 0.022 ± 0.002 u.a.). Los niveles de expresión de SNAT2 en la región CA3 denotaron preferentemente somas neuronales distribuidos de manera dispersa (Fig. 10C, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 0.019 ± 0.002 u.a.). La región del giro dentado presentó expresión en somas neuronales ubicados en el hilus y adyacentes a la capa de células granulares (Fig. 10D, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 0.02119 ± 0.003 u.a.). Los mayores niveles de expresión de SNAT2 en la región del subículum, se identificaron principalmente en somas neuronales (Fig. 10E, ver flechas y cabezas de flechas, media de fluorescencia relativa de 0.022 ± 0.005 u.a.). El análisis estadístico mostró que la región de CA1 presentó una disminución en los niveles de expresión de SNAT2 cuando se

compara con la región del giro dentado (Fig. 10F). En resumen, nuestros resultados mostraron que el patrón de expresión de SNAT2 en neuronas de la formación hipocampal del ratón 3xTg-AD, presenta una expresión uniforme en el soma y a lo largo de procesos dendríticos (Fig. 10G, 10H, ver flechas y cabezas de flechas).

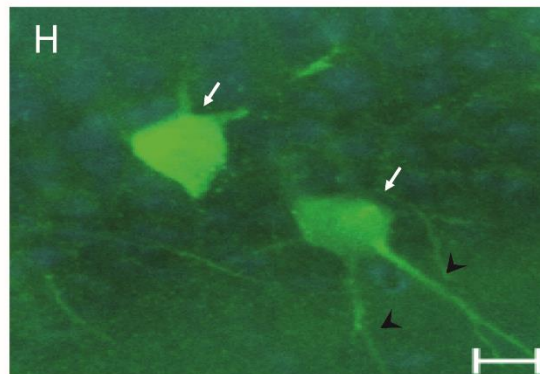
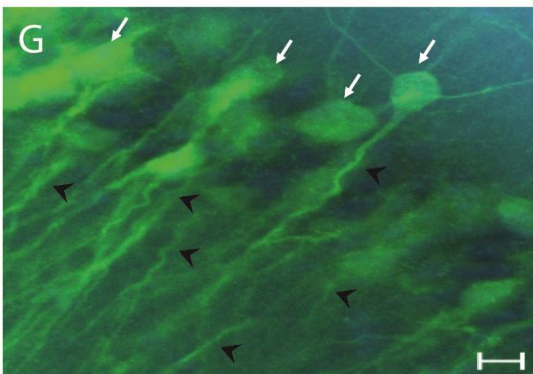
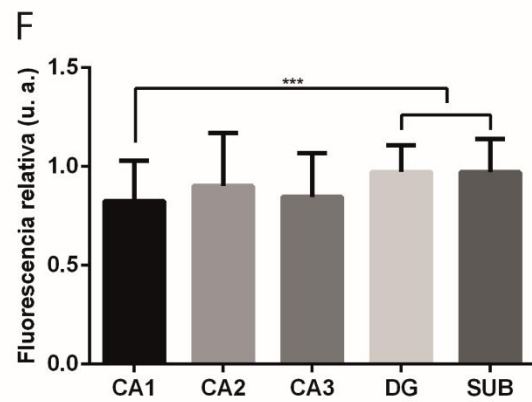
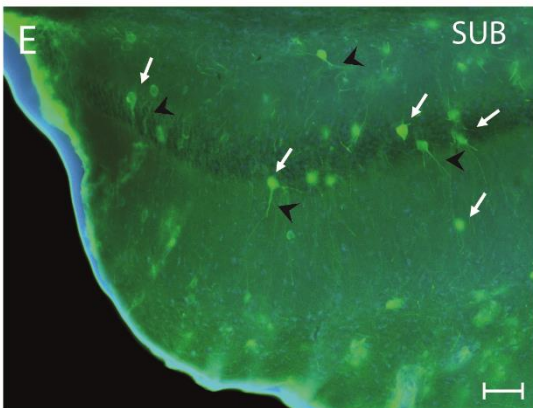
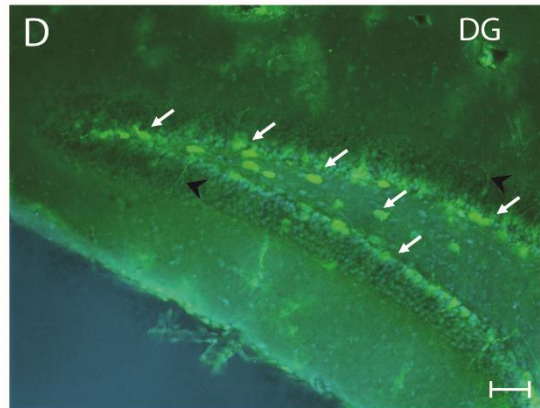
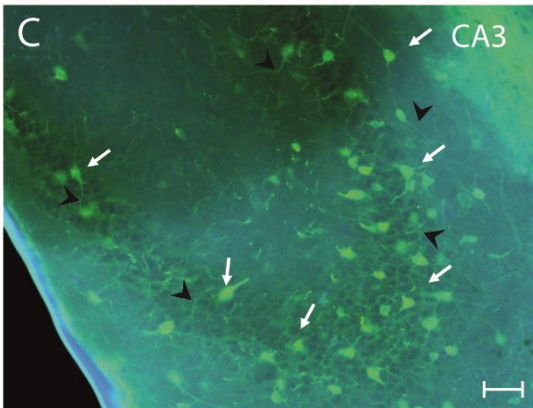
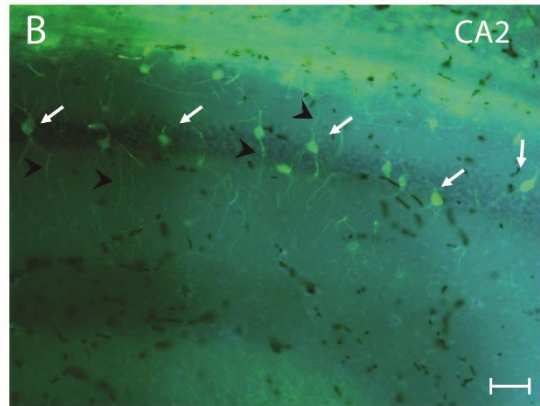
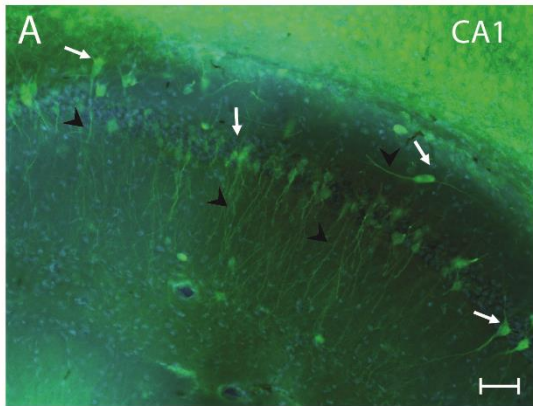


Figura 10. Distribución morfológica del transportador SNAT2 en el hipocampo del ratón 3xTg-AD. (A) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la región CA1 del hipocampo (Flechas y cabezas de flechas). (B) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la región CA2, (C) en la región CA3, (D) en la región del giro dentado (E) y en subículum. (F) Expresión relativa del transportador SNAT2 de cada región del hipocampo (Prueba de Wilcoxon, *** $p < 0.001$). (G y H) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en neuronas del hipocampo (Flechas= somas y cabezas de flechas=dendritas), escala A – E = 50 μm , G y H = 10 μm , n = 3.

7.8 Disminución en la expresión del transportador SNAT2 en el hipocampo de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD

Para evaluar los niveles de expresión del transportador SNAT2 en el hipocampo de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD se compararon los valores de fluorescencia obtenidos a partir de las inmunofluorescencias realizadas. Nuestros datos mostraron que en la región CA1, tanto el ratón Tg4510 como el 3xTg-AD presentan una disminución en la expresión del transportador SNAT2 en comparación con el ratón NT (Fig. 11A). En la región CA2 se observó que también hay una disminución en los niveles de expresión de las neuronas del ratón Tg4510 y 3xTg-AD (Fig. 11B). Para el caso de la región CA3, se observó una disminución de la expresión de SNAT2 en ambos modelos (Fig. 11C). De igual forma, en la región del giro dentado se detectó que tanto el ratón Tg4510, como el 3xTg-AD mostraron una disminución en la expresión del transportador SNAT2 (Fig. 11D). Por último, en la región del subículum se evidenció que el ratón Tg4510 presenta una disminución en la expresión de SNAT2 (Fig. 11E). Mientras que, no se detectaron diferencias entre los niveles de expresión del ratón 3xTg-AD cuando se comparan contra el grupo NT (Fig. 11E, $p=0.16$).

En resumen, nuestros datos revelaron que las neuronas de la formación hipocampal del ratón Tg4510 presentaron una disminución de la expresión del transportador SNAT2 en comparación con el ratón NT. Mientras que las neuronas del ratón 3xTg-

AD sólo mostraron una disminución en la expresión de SNAT2 en las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado.

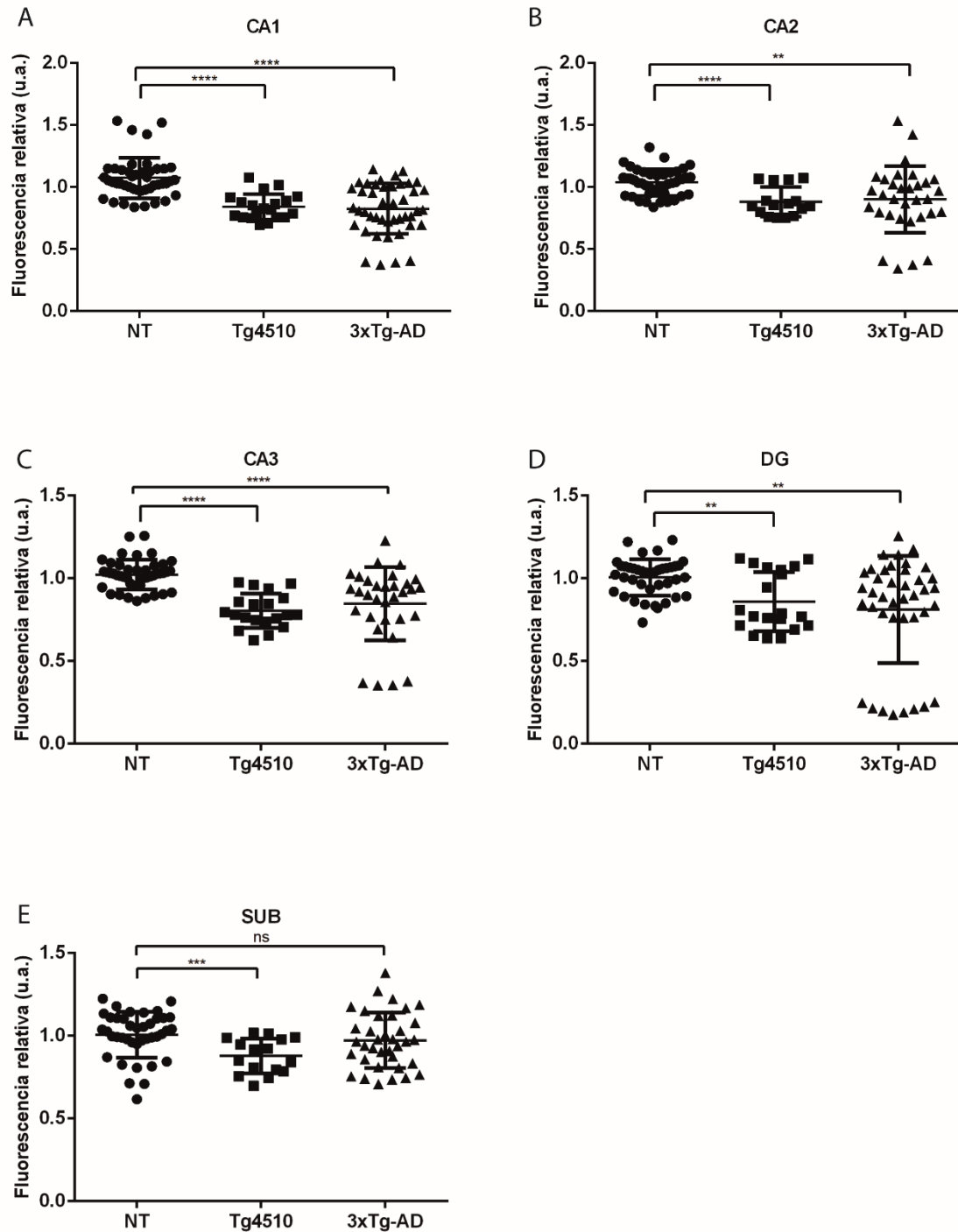


Figura 11. Disminución en la expresión del transportador SNAT2 en el hipocampo de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD. (A) Expresión del transportador SNAT2 en la región de CA1, **(B)** CA2, **(C)** CA3, **(D)** giro dentado **(E)** y subículum

para el ratón NT, Tg4510 y 3xTg-AD (n=3, Mann-Whitney, ns= $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Hipocampo				
	SNAT1		SNAT2	
Área	Tg4510	3xTg-AD	Tg4510	3xTg-AD
CA1	↓	SC	↓	↓
CA2	↓	SC	↓	↓
CA3	↓	SC	↓	↓
DG	↓	↓	↓	↓
SUB	↓	↓	↓	SC

Tabla 1. Expresión de los transportadores SNAT1 ySNAT2 en el hipocampo de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD. Se muestra la disminución de la expresión de los transportadores SNAT1 y SNAT2 para cada área del hipocampo de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD (↓= Disminución de la expresión cuando se compara con los ratones NT, SC= sin cambios cuando se compara con la expresión de los ratones NT).

7.9 Distribución morfológica del transportador SNAT1 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD

Adicionalmente, se estudiaron los niveles de expresión del transportador SNAT1 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD de un mes de edad, para lo que se realizaron inmunofluorescencias para reconocer de manera específica a la proteína SNAT1. Nuestros datos mostraron la expresión de SNAT1 en la RSC de ratones NT donde la expresión se denotó principalmente en somas neuronales pertenecientes a la capa V (Fig. 12A, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 1.056 ± 0.126 u.a.). Los niveles de expresión de SNAT1 en la RSC de ratones Tg4510 se detectaron de manera muy escasa en somas de la capa V (Fig. 12B, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.844 ± 0.077 u.a.). En la RSC del ratón 3xTg-AD la marca de SNAT1 se apreció preferentemente en capa V (Fig. 12C, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.888 ± 0.138 u.a.). Los mayores niveles de

expresión de SNAT1 en la RSC del ratón NT se presentaron en capa IV y V principalmente (Fig. 12D, ver flechas). En la RSC del ratón Tg4510 la marca detectada fue escasa y se encontró de manera preferente en la capa V (Fig. 12E, ver flechas). Para el caso de la RSC del ratón 3xTg-AD se detectaron niveles de expresión en las capas IV, V y VI (Fig. 12F, ver flechas).

En resumen, el patrón de expresión de SNAT1 en neuronas de la RSC del ratón NT presentó una expresión de tipo puntillado y homogéneo en somas neuronales (Fig. 12G, ver flechas). Mientras que, en las neuronas del ratón Tg4510 el patrón de marcaje se conservó como puntillado, pero de manera interesante presentó una distribución preferentemente perinuclear (Fig. 12H, ver flechas). Por último, las neuronas del ratón 3xTg-AD se caracterizaron por ser las que presentan un patrón puntillado más pronunciado y con una menor densidad en somas neuronales que lo visto con los otros dos modelos de estudio (Fig. 12I, ver flechas).

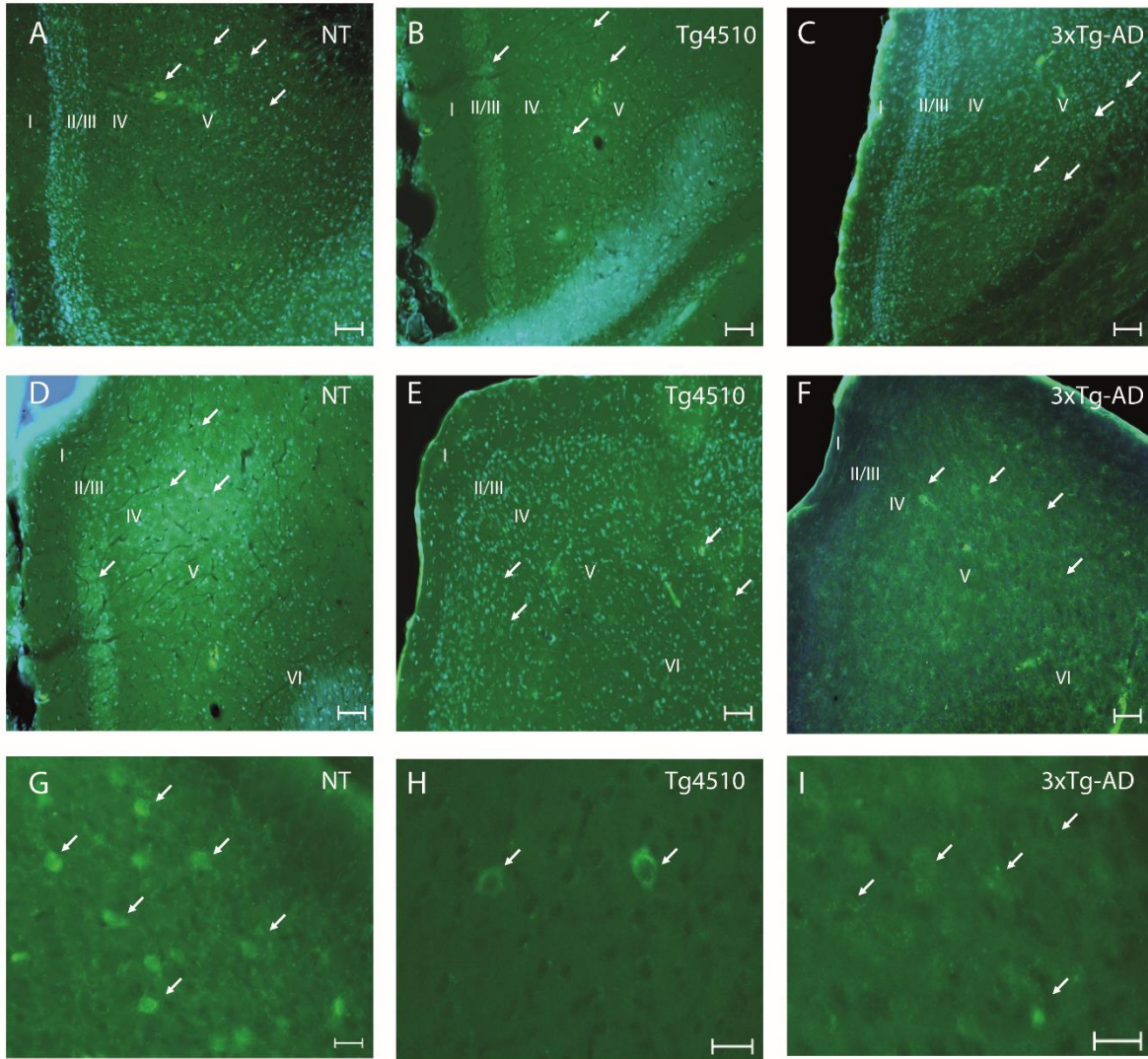


Figura 12. Distribución morfológica del transportador SNAT1 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD. (A) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la RSC de ratones NT. Se esquematizan las distintas capas que componen a la RSC y se aprecia marca en somas de la capa V (Flechas). (B) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la RSC de ratones Tg4510, (C) RSC de ratones 3xTg-AD, (D) RSC de ratones NT. (E) RSC de ratones Tg4510. Se aprecia marca principalmente en capa IV y V. (F) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en la RSC de ratones 3xTg-AD. Nótese la expresión tanto en capa IV, como en capa V. (G) Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en somas de la RSC de ratones NT (Flechas). (H) en la RSC de ratones Tg4510. La marca se distingue en el soma,

alrededor del núcleo celular (Flechas). **(I)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT1 en somas neuronales de la RSC de ratones 3xTg-AD (escala A – F = 50 μm , G – I = 20 μm).

7.10 Distribución morfológica del transportador SNAT2 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD

Para estudiar los niveles de expresión del transportador SNAT2 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD de un mes de edad se realizaron nuevamente inmunohistoquímicas para identificar al transportador SNAT2. Nuestros resultados evidenciaron la expresión del transportador SNAT2 denotando somas neuronales en las capas II/III, IV y V de la RSC de ratones NT (Fig. 13A, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 1.089 ± 0.269 u.a.). Los niveles de expresión de SNAT2 en la RSC de ratones Tg4510 se encontraron preferentemente en somas neuronales de la capa IV y V (Fig. 13B, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.671 ± 0.113 u.a.). La expresión de SNAT2 en la RSC del ratón 3xTg-AD se distingue en las capas II/III, IV y V (Fig. 13C, ver flechas, media de fluorescencia relativa de 0.963 ± 0.269 u.a.). La marca de SNAT2 en el ratón NT se presentó principalmente en la capa V de la RSC (Fig. 13D, ver flechas). En el caso del ratón Tg4510 se mostró de igual forma una distribución de marca principalmente en la capa V, pero a diferencia del ratón NT, en el ratón Tg4510 sí se observó expresión en procesos dendríticos. Por último, la marca de SNAT2 en la RSC del ratón 3xTg-AD mostró un patrón de marcaje principalmente en somas neuronales. En resumen, el patrón de marcaje de SNAT2 en las neuronas de la RSC del ratón NT mantuvo una distribución perinuclear en somas, con expresión tipo puntillada que se conservó al detectarse en procesos dendríticos (Fig. 13G, ver flechas y cabezas de flechas). Por otro lado, la expresión de SNAT2 en neuronas del ratón Tg4510 se caracterizaron por presentarse en la membrana del soma neuronal y a lo largo de procesos dendríticos (Fig. 13H, ver flecha y cabezas de flechas). Lo mismo se mantuvo para las neuronas del ratón 3xTg-AD que presentaron expresión en somas neuronales y a lo largo de procesos dendríticos (Fig. 13I, ver flechas y cabezas de flechas).

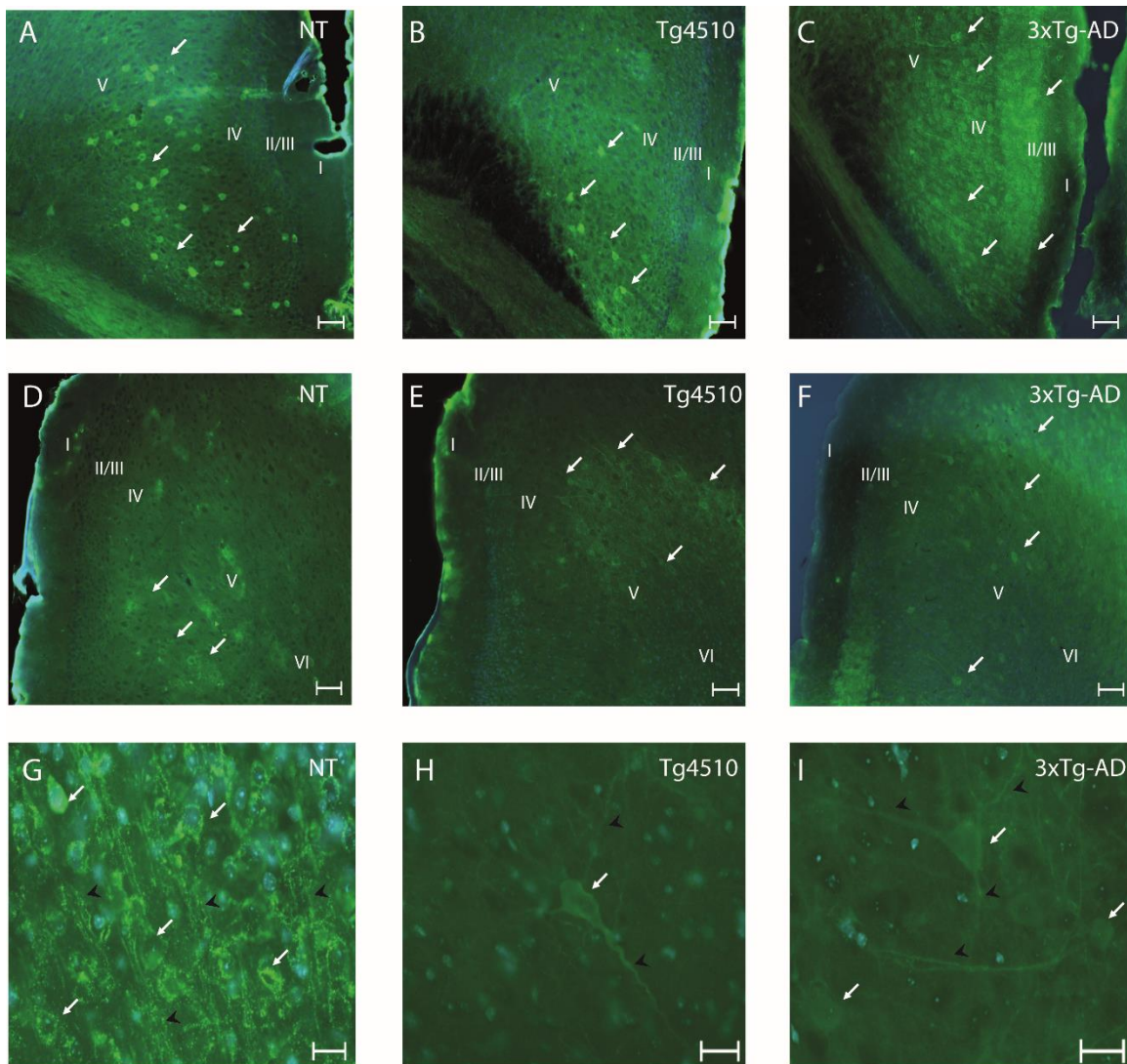


Figura 13. Distribución morfológica del transportador SNAT2 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD. (A) Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la RSC de ratones NT. Se esquematizan las distintas capas que componen a la RSC y se aprecian somas en las capas II/III, IV y V (Flechas). **(B)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en la RSC de ratones Tg4510, **(C)** RSC de ratones 3xTg-AD, **(D)** RSC de ratones NT, **(E)** RSC de ratones Tg4510, **(F)** RSC de ratones 3xTg-AD. **(G)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en neuronas de la RSC de ratones NT. Nótese la marca en somas y procesos dendríticos (Flechas y cabezas de flechas). **(H)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en neurona de

la RSC de ratones Tg4510. **(I)** Inmunofluorescencia positiva para SNAT2 en neuronas de la RSC de ratón 3xTg-AD (escala A - F= 50 μ m, G - H= 10 μ m).

7.11 Disminución en la expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD

Para evaluar la expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC de los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD, se compararon los datos de fluorescencia obtenidos a partir de las inmunohistoquímicas realizadas. Nuestros resultados detectaron que el ratón Tg4510 y el 3xTg-AD presentan una disminución en la expresión del transportador SNAT1 en comparación con el ratón NT (Fig. 14A). Del mismo modo, nuestros datos revelaron que ambos modelos, Tg4510, y 3xTg-AD, muestran una disminución en la expresión de SNAT2 en comparación con el ratón NT (Fig. 14B). Por otro lado, los análisis estadísticos no detectaron diferencia entre la expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC de ratones NT (Fig.14C, $p=0.77$). Sin embargo, en el ratón Tg4510 sí hay diferencias entre la expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC, ya que los resultados señalaron que el transportador SNAT2 se expresa en menor medida que el transportador SNAT1 (Fig. 14D). Por último, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de SNAT1 y SNAT2 en la RSC del ratón 3xTg-AD (Fig. 14E, $p=0.21$). En resumen, nuestros resultados revelaron que los niveles de expresión de los transportadores SNAT1 y SNAT2 se encuentran disminuidos en la RSC de ratones Tg4510 y 3xTg-AD cuando fueron comparados con el ratón NT. Adicionalmente, nuestros resultados evidenciaron que el transportador SNAT1 se expresa en mayor medida que el transportador SNAT2 en la RSC del ratón Tg4510.

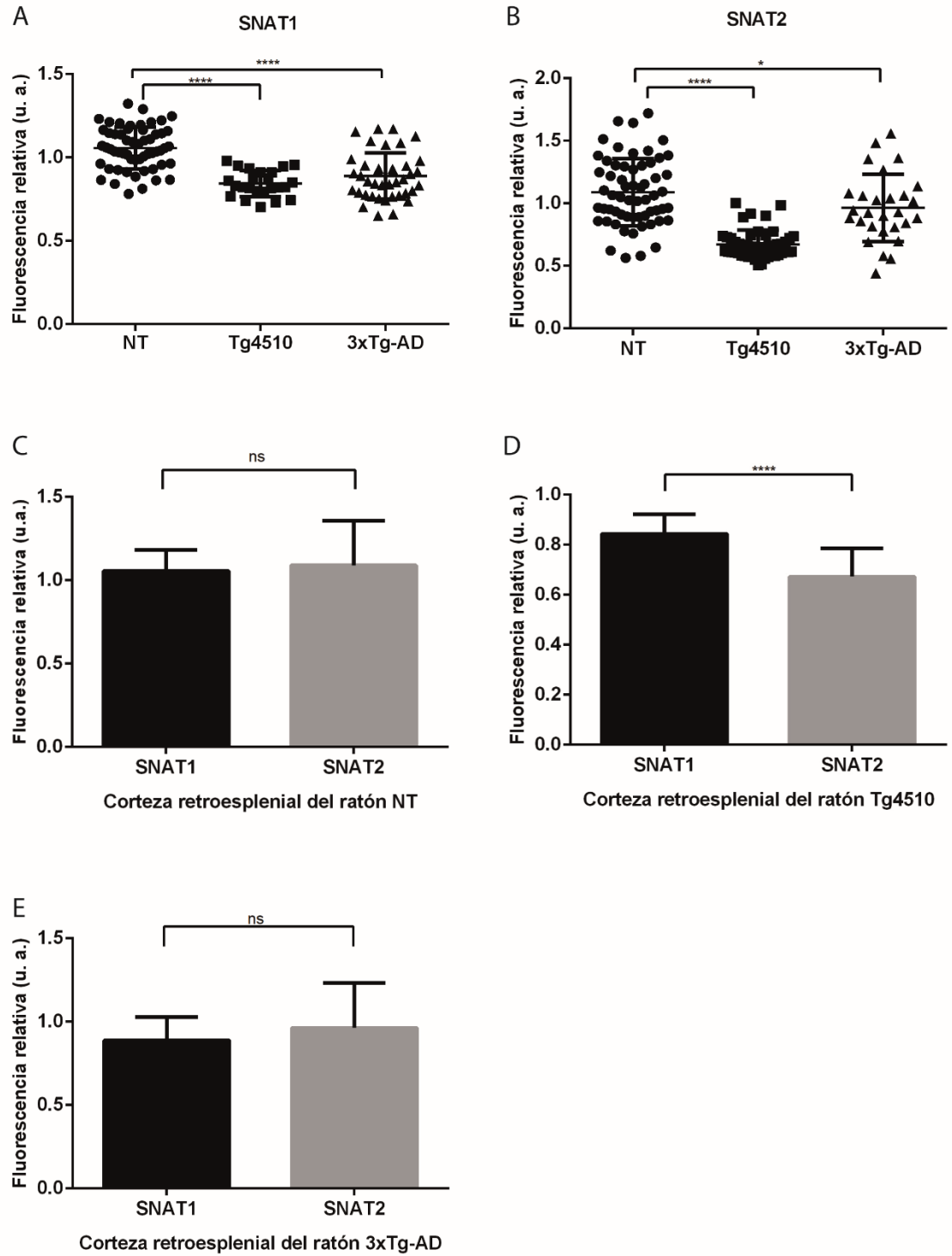


Figura 14. Disminución en la expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD. (A) Expresión relativa del transportador SNAT1 en la RSC de ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD (n=3). **(B)** Expresión del transportador SNAT2 en la RSC de ratones NT (n=5), Tg4510 (n=3) y 3xTg-AD

(n=3). **(C)** Expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC del ratón NT. **(D)** Expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC del ratón Tg4510. **(E)** Expresión del transportador SNAT1 y SNAT2 en la RSC del ratón 3xTg-AD (Mann-Whitney, ns= $p > 0.05$, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$).

RSC				
	SNAT1		SNAT2	
	Tg4510	3xTg-AD	Tg4510	3xTg-AD
Área total	↓	↓	↓	↓

Tabla 2. Expresión de los transportadores SNAT1 y SNAT2 en la RSC de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD. Se muestra la disminución de la expresión de los transportadores SNAT1 y SNAT2 de la RSC de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD (↓= Disminución de la expresión cuando se compara con los ratones NT).

7.12 Distribución morfológica de la proteína pTau en el hipocampo de los ratones 3xTg-AD y Tg4510

Para corroborar que los ratones 3xTg-AD y Tg4510 expresaran la isoforma de tau MAPT P301L, se realizaron inmunofluorescencias para evaluar la presencia de pTau. Nuestros resultados detectaron marca en la región CA1 en el ratón 3xTg-AD, se destacaron somas neuronales y procesos dendríticos (Fig. 15A, ver flechas y cabezas de flechas). La región CA1 del ratón Tg4510 presenta marca en somas neuronales y procesos dendríticos (Fig. 15B, ver flechas y cabezas de flechas). La región de CA2 del ratón 3xTg-AD denotó marca preferentemente en somas neuronales (Fig. 15C, ver flechas), por otro lado, en la región CA2 del ratón Tg4510 se observa marca en somas y en procesos dendríticos (Fig. 15D, ver flechas y cabezas de flechas). Para la región CA3 se detectó marca en somas neuronales del ratón 3xTg-AD (Fig. 15E, flechas) y de igual manera, se observó la marca preferentemente en somas neuronales del ratón Tg4510 (Fig. 15F, ver flechas). La región CA3 mostró expresión en somas neuronales adyacentes a la capa de células granulares, esto para el caso tanto del ratón 3xTg-AD, como para el Tg4510 (Fig.

15E y 15F, ver flechas). En la región del giro dentado del ratón 3xTg-AD, se observó marca en somas neuronales y procesos dendríticos en la región del hilus y cercanos a la capa de células granulares (Fig. 15G, ver flechas y cabeza de flecha). Mientras que en la región del giro dentado del ratón Tg4510 se observó marca principalmente en la región del hilus (Fig. 15H, ver flechas y cabeza de flecha). Por último, en la región del subículum se distinguió marca en somas neuronales y procesos dendríticos, tanto para el ratón 3xTg-AD (Fig. 15I, ver flechas y cabezas de flechas), como para el Tg4510 (Fig. 15J, ver flechas y cabezas de flechas). Estos resultados mostraron que los mayores niveles de expresión de pTau se encuentran en los somas neuronales de la formación hipocampal de los ratones 3xTg-AD y Tg4510.

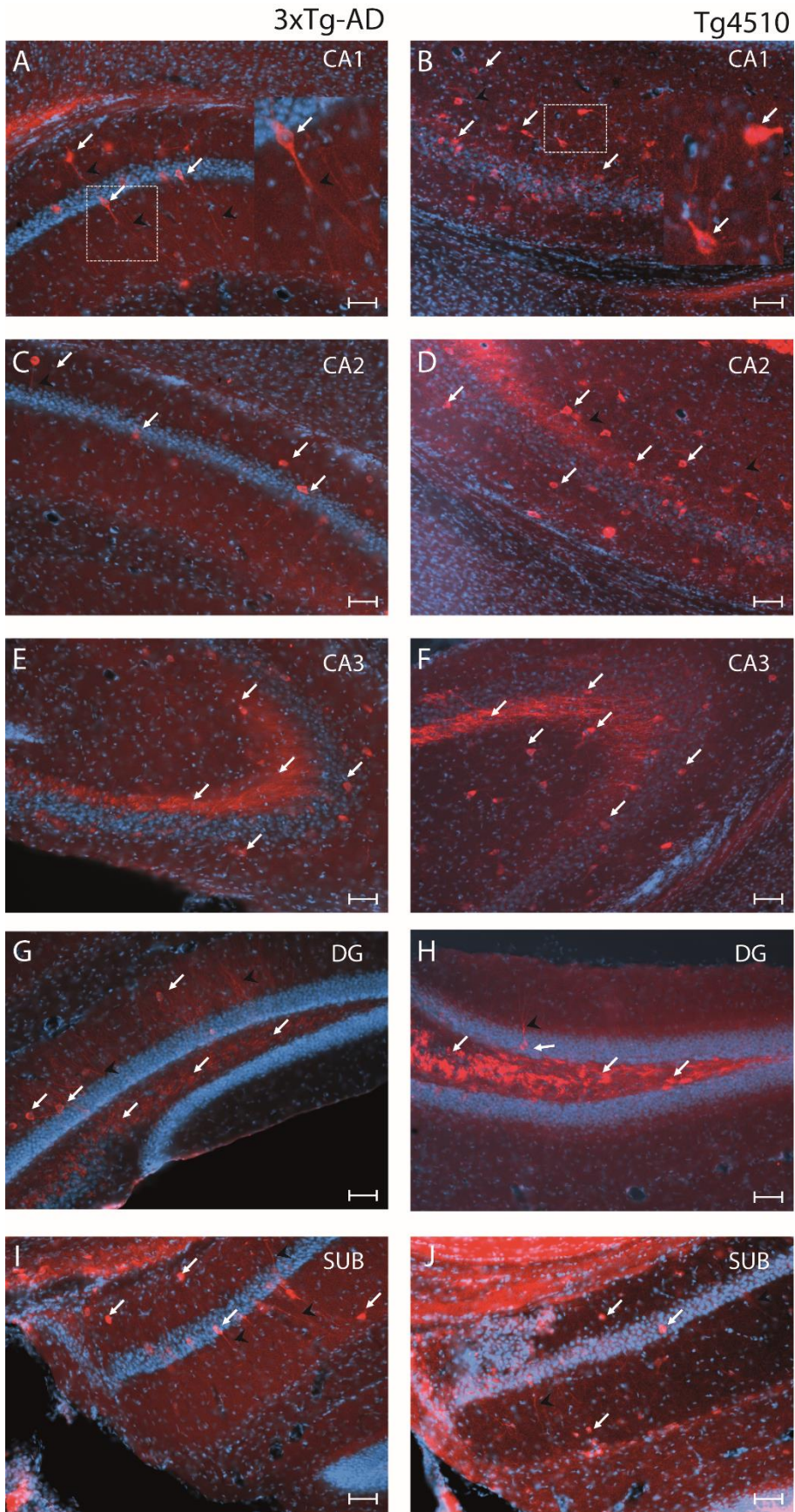


Figura 15. Distribución morfológica de la proteína pTau en el hipocampo de los ratones 3xTg-AD y Tg4510. (A) Inmunofluorescencia positiva para pTau en la región CA1 del hipocampo del ratón 3xTg-AD. Se observa marca tanto en somas como en procesos dendríticos (Flechas y cabezas de flechas). (B) Inmunofluorescencia positiva para pTau en la región CA1 del ratón Tg4510, (C) en la región CA2 del ratón 3xTg-AD, (D) en la región CA2 del ratón Tg4510, (E) en la región CA3 del ratón 3xTg-AD, (F) en la región CA3 del ratón Tg4510, (G) en la región del giro dentado del ratón 3xTg-AD, (H) en la región del giro dentado del ratón Tg4510. (I) en la región del subículum del ratón 3xTg-AD (J) y en la región del subículum del ratón Tg4510 (escala=50 μ m).

7.13 Distribución morfológica de la proteína pTau en la RSC de los ratones 3xTg-AD y Tg4510

Adicionalmente, para corroborar que la RSC de los ratones 3xTg-AD y Tg4510 expresara la isoforma de tau MAPT P301L, nuevamente se realizaron inmunofluorescencias para reconocer los niveles de expresión de pTau. Nuestros resultados evidenciaron que la expresión de pTau en el ratón 3xTg-AD, se detecta en todas las capas de la RSC (Fig. 16A). Mientras que los mayores niveles de expresión de pTau en la RSC del ratón Tg4510, se encuentran principalmente en la capa V (Fig. 16B). En resumen, el patrón de expresión de pTau en las neuronas de la RSC del ratón 3xTg-AD, se caracteriza por ubicarse en el soma neuronal de manera perinuclear y a lo largo de procesos dendríticos (Fig. 16C, ver flechas y cabezas de flechas). Mientras que en las neuronas de la RSC del ratón Tg4510 el patrón de expresión se ubica principalmente en los somas neuronales, conservándose la expresión de manera perinuclear (Fig. 16D, ver flechas).

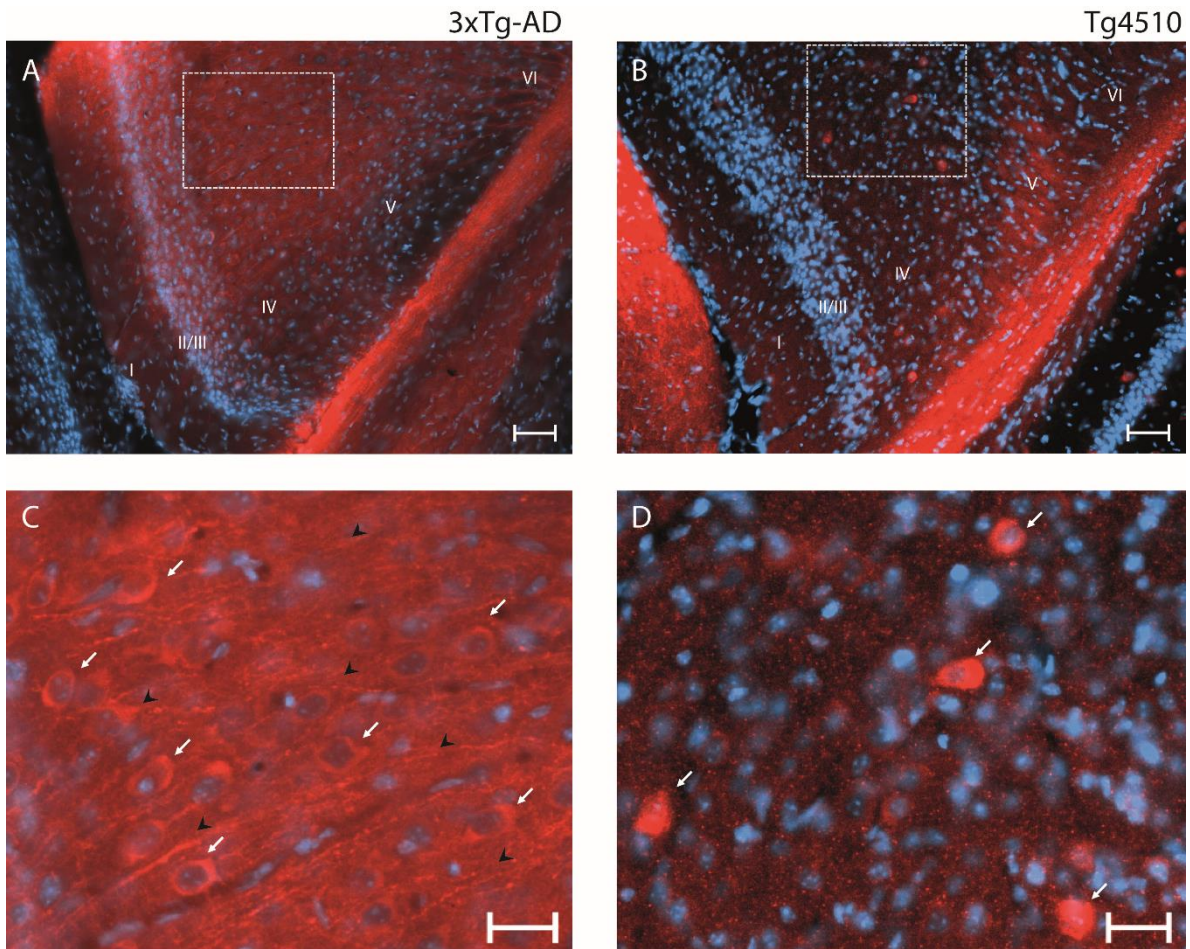


Figura 16. Distribución morfológica de la proteína pTau en la RSC de los ratones 3xTg-AD y Tg4510. (A) Inmunofluorescencia positiva para pTau en la RSC del ratón 3xTg-AD. Se esquematizan las capas de la RSC. **(B)** Inmunofluorescencia positiva para pTau en la región RSC del ratón Tg4510. **(C)** Aumento del panel A, se observan somas y procesos dendríticos con marca (Flechas y cabezas de flechas). **(D)** Aumento del panel B, se muestran somas con marca (Flechas) (escala A – B =50 μ m, escala C – D =20 μ m).

8. Discusión

8.1 Alteraciones en los transportadores de aminoácidos SNAT1 y SNAT2 en la formación del hipocampo

En este proyecto se buscó evaluar las alteraciones de los transportadores de aminoácidos SNAT1 y SNAT2 en las neuronas del hipocampo de ratones transgénicos Tg4510 y 3xTg-AD de un mes de edad. Cabe mencionar que esta edad corresponde a una etapa temprana del desarrollo de la patología tipo Alzheimer. Los resultados obtenidos en esta investigación evidenciaron que las neuronas hipocampales del ratón NT expresan el transportador de aminoácidos SNAT1 (Fig. 4). Aunque la mayor expresión se detectó en somas, también se localizó expresión en los procesos proximales al soma neuronal (Fig. 4). Lo anterior, está en línea con los resultados obtenidos por Mackenzie *et al.* (2003), quienes reportaron que en el cerebro de rata adulta la expresión de SNAT1 se localizaba en somas neuronales y en dendritas proximales. Adicionalmente, identificaron la expresión de SNAT1 en neuronas piramidales, que se caracterizan por su actividad glutamatérgica, así como en interneuronas GABAérgicas. En este sentido, nuestros resultados identificaron la expresión de SNAT1 en neuronas piramidales y en neuronas que, por su estructura cercana a la capa de células piramidales, sugieren ser de tipo parvoalbúmina+ (Sik *et al.*, 1995). Estos datos sugieren la posible participación del transportador de aminoácidos SNAT1 en la regulación de la actividad neuronal del hipocampo. Estudios electrofisiológicos en otros modelos proveen evidencia de que SNAT1 es capaz de regular la excitabilidad de la actividad neuronal, ya que al utilizar al inhibidor competitivo no metabolizable del Sistema A, ácido alfa metilamino isobutírico, se reduce la amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos miniatura (mEPSC por sus siglas en inglés) (Armano *et al.*, 2002).

Al evaluar los niveles de expresión del transportador SNAT1 en el modelo transgénico Tg4510, que desarrolla agregados neurofibrilares constituidos principalmente por la proteína tau anormalmente fosforilada, los resultados mostraron que la expresión de SNAT1 se preservó con un patrón de localización

similar, ya que encontramos expresión preferentemente en somas neuronales y en procesos dendríticos proximales (Fig. 5). Sin embargo, la expresión del transportador SNAT1 en este modelo transgénico se concentró en la región perinuclear (Fig.5), lo que corrobora lo que se conoce de la proteína SNAT1 que no tiene una función nuclear y que además es reconocida por el anticuerpo en distintas etapas de su síntesis antes de ser enviada y acoplada en membrana plasmática (Zander *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que la proteína tau al unirse a la tubulina, participa en la formación de los microtúbulos que conforman al citoesqueleto neuronal (Kosik, 1993), en el modelo Tg4510 la fosforilación anormal de la proteína tau impide la unión de tau con la tubulina, lo que conlleva a que la estructura de los microtúbulos se vea comprometida y con ella, la estructura del citoesqueleto neuronal (Avila, 2008). En el tráfico de los transportadores SNAT hacia membrana plasmática, participa el transporte intracelular que está regulado por el citoesqueleto (Ross *et al.*, 2009), De modo que, si el citoesqueleto se encuentra alterado, la dinámica de transporte de estos transportadores puede verse afectada.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el modelo 3xTg-AD, que se caracteriza por desarrollar agregados neurofibrilares constituidos por la proteína tau anormalmente fosforilada y el péptido β A, mostraron que, aunque la distribución de SNAT1 se preserva en somas y en dendritas proximales, el patrón de expresión es preferentemente puntillado (Fig.6). De manera importante, se ha reportado que la expresión puntillada señala que SNAT1 se encuentra como reserva en múltiples sitios de manera intracelular, en espera de señales que regulen su tráfico hasta la membrana plasmática (Mackenzie *et al.*, 2003; Brown y Mathews, 2010). Lo anterior está relacionado con lo que se sabe sobre la regulación de la expresión del transportador SNAT1, ya que se ha descrito que la síntesis de este transportador responde a múltiples señales ambientales que regulan su ensamblaje en la membrana plasmática (McGivan y Pastor-Anglada, 1994). Entre las respuestas ambientales que regulan su expresión, síntesis y tráfico hacia la membrana se encuentran: condiciones de isquemia (Kamphuis *et al.*, 2007), falta de aminoácidos (Kilberg *et al.*, 2005), así como una dependencia de los factores que incrementan al AMP cíclico (Hatanaka *et al.*, 2001). Por otro lado, en este modelo, el ratón 3xTg-

AD presenta péptido β A que se ha relacionado con una disminución de hasta el 50% de la expresión del transportador SNAT1 (Buntup *et al.*, 2008).

En resumen, los ratones jóvenes NT, Tg4510 y 3xTg-AD se caracterizaron por presentar un patrón de expresión del transportador de aminoácidos SNAT1 en el espacio somatodendrítico y en dendritas proximales. Este patrón de expresión ha sido reportado por diversos autores (Mackensie *et al.*, 2003; Melone *et al.*, 2004). Sin embargo, existe polémica al respecto de la expresión de SNAT1 en axones y en contactos sinápticos. Si bien es cierto que nosotros no utilizamos marcadores que nos permitan determinar si la expresión es en axones, Armano *et al.* (2002), detectaron expresión de SNAT1 en axones, conos axónicos y contactos sinápticos, esto en cultivos primarios de neuronas de rata en edad fetal. Mientras que, Melone *et al.* (2004) realizaron un estudio en corteza cerebral de rata y humano adulto donde identificaron por inmunohistoquímicas la expresión de SNAT1 sólo en el compartimento somatodendrítico, con muy poca expresión en las terminales de los axones. Además, por microscopía electrónica corroboran que la expresión de SNAT1 se encuentra preferentemente en el citoplasma y en dendritas, no en espinas dendríticas (Melone *et al.*, 2004).

En cuanto a los niveles de expresión del transportador SNAT1, los datos evidenciaron que se encuentra disminuido en el hipocampo del ratón Tg4510 (Fig.7). Mientras que en el ratón 3xTg-AD la expresión de SNAT1 se encuentra disminuida sólo en la región del giro dentado y subículum (Fig.7). Es importante mencionar que una disminución en los niveles de expresión del transportador de aminoácidos SNAT1 podría conducir a una menor disponibilidad de glutamina para la síntesis de neurotransmisores. En suma, estos datos sugieren la participación de SNAT1 como mecanismo de patogénesis en el desarrollo de la patología de Alzheimer. De manera similar, nuestros resultados evidenciaron que la expresión de SNAT2 en el ratón NT se encuentra preferentemente en somas y en procesos dendríticos distales (Fig.8), lo cual confirma lo encontrado por González-González *et al.* (2005), quienes encontraron que SNAT2 se expresa en somas neuronales y en procesos dendríticos distales. Asimismo, nuestros datos también muestran que la expresión de SNAT2 se encuentra en células piramidales y en neuronas que por

su posición y estructura sugieren ser parvoalbúmina+ (Sik *et al.*, 1995). De manera interesante, en el hipocampo del ratón Tg4510 y 3xTg-AD, el patrón de la distribución morfológica de SNAT2 se conserva ya que también se distingue expresión en somas y en procesos dendríticos distales de neuronas piramidales y sugerentes de parvoalbúmina+ (Sik *et al.*, 1995) (Fig.9 y 10). El patrón de expresión se distingue en la membrana plasmática de las neuronas, como lo había encontrado y reportado Blot *et al.* (2009). La ubicación en membrana plasmática sugiere que se encuentra en su forma madura, participando en el transporte de aminoácidos neutros (Blot *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que la expresión de tau anormalmente fosforilada y la sobreproducción de β A no alteran el patrón de la distribución de los transportadores SNAT2, sin embargo, los que sí se alteran son los niveles de expresión (Fig. 11). Lo que nos lleva a sugerir que la disminución de SNAT2 que observamos en la formación hipocampal del ratón Tg4510 y en las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado del ratón 3xTg-AD, podrían ser eventos tempranos en una desregulación metabólica en el cerebro que posteriormente puede conducir alteraciones en la sinapsis (Fig. 11). El desbalance metabólico en el cerebro ya ha sido propuesto como un evento que correlaciona con la pérdida de sinapsis y el deterioro cognitivo, particularmente la resistencia a la insulina observada en el cerebro de pacientes con la EA (Talbot *et al.*, 2012).

8.2 Alteraciones en los transportadores de aminoácidos SNAT1 y SNAT2 en la formación de la RSC

Al evaluar los transportadores de aminoácidos en la RSC, los resultados evidenciaron que el patrón de expresión de SNAT1 difiere entre los ratones transgénicos y NT. El marcaje en el ratón NT denotó un patrón menos puntillado y con expresión homogénea en los somas neuronales, lo que sugiere que el transportador se encuentra en la membrana plasmática (Fig.12). La expresión en Tg4510 se observó puntillada y con una distribución perinuclear, mientras que en el ratón 3xTg-AD la expresión en somas neuronales se observó preferentemente

puntillada (Fig.12). Como se mencionó anteriormente, la expresión de SNAT1 puntillada está asociada a que existen reservas intracelulares del transportador que en respuesta a estímulos o demanda metabólica realizarán el tráfico hasta la membrana plasmática (Brown y Mathews, 2010).

En el caso del transportador SNAT2 en la RSC del ratón Tg4510 y 3xTg-AD, el patrón de expresión observado en el hipocampo, se preservó en las capas de la RSC. La expresión de SNAT2 no se limita únicamente a somas neuronales, sino que también es detectado en procesos dendríticos, como había sido detectado en el hipocampo (Fig13). A diferencia de SNAT1 en la RSC, SNAT2 no sólo se detecta en capa V, sino en las capas II/III, IV tanto en el ratón NT, como en el 3xTg-AD, lo que sugiere que SNAT2 desempeña un papel importante en neuronas de distintos tipos a distintos niveles de las capas de la RSC, en comparación con SNAT1 (Fig. 13). Esto podría estar relacionado con el hecho de que se ha reportado que estos transportadores se encuentran en regiones distintas y, en consecuencia, desempeñan papeles complementarios (Armano *et al.*, 2002).

De manera interesante, nosotros encontramos que, con respecto a los niveles de expresión en la RSC del ratón Tg4519 y del 3xTg-AD, los transportadores SNAT1 y SNAT2 se encuentran disminuidos en comparación con los datos del ratón NT (Fig. 14). Lo que sugiere que además del hipocampo, la RSC también presenta alteraciones en los transportadores SNAT1 y SNAT2. Los niveles de expresión de SNAT1 y SNAT2 en la RSC no presentaron diferencias entre sí, es decir que en este punto temporal de la neurodegeneración no se detectan diferencias entre la expresión de estos dos transportadores en el caso de los ratones NT y 3xTg-AD (Fig. 14).

En resumen, los hallazgos de este proyecto evidencian que los ratones transgénicos Tg4510 y 3xTg-AD a la edad de un mes, denotan expresión de tau fosforilada en la formación hipocampal y la RSC (Fig. 15 y 16) y la presencia de tau fosforilada correlaciona con alteraciones en los niveles de expresión de los transportadores SNAT1 y SNAT2. Lo que contribuye directamente a modificar la respuesta de las neuronas involucradas en procesos de aprendizaje y memoria.

9. Conclusiones

9.1 El transportador SNAT1 denotó un patrón de expresión preferentemente en somas neuronales y en procesos dendríticos proximales, este patrón se conservó en el hipocampo del ratón NT, Tg4510 y 3xTg-AD de un mes de edad.

9.2 El patrón de expresión del transportador SNAT1 en el hipocampo del ratón NT y Tg4510, se presentó de forma homogénea, mientras que el ratón 3xTg-AD presentó un patrón de expresión puntillado.

9.3 Los niveles de expresión del transportador SNAT1 se encontraron disminuidos, a lo largo de la formación hipocampal del ratón Tg4510, cuando se compararon con lo encontrado en el ratón NT.

9.4 En el hipocampo del ratón 3xTg-AD, los niveles de expresión del transportador SNAT1 se encontraron disminuidos en la región del giro dentado y subículum, cuando se compararon con el ratón NT.

9.5 El transportador SNAT2 presentó un patrón de expresión homogéneo preferentemente en somas y a lo largo de procesos dendríticos distales, este patrón se preservó en el hipocampo del ratón NT, Tg4510 y 3xTg-AD a la edad de un mes.

9.6 Los niveles de expresión del transportador SNAT2 a lo largo de la formación hipocampal del ratón Tg4510 presentaron una disminución cuando fueron comparados con el ratón NT.

9.7 El transportador SNAT2 mostró una disminución en los niveles de expresión de las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado del hipocampo del ratón 3xTg-AD, cuando se comparó con lo encontrado en el ratón NT.

9.8 El transportador SNAT1 se expresó principalmente en las capas IV y V de la RSC en los ratones NT, Tg4510 y 3xTg-AD, con una distribución preferentemente en somas neuronales.

9.9 El transportador SNAT2 denotó un patrón de expresión puntillada en somas y en procesos dendríticos en las neuronas de las capas II/III, IV, V y VI de la RSC de los ratones NT, Tg4510 Y 3xTg-AD.

9.10 Los niveles de expresión de los transportadores SNAT1 y SNAT2 se encontraron disminuidos en la RSC de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD, cuando fueron comparados con el ratón NT.

9.11 El hipocampo y la RSC de los ratones Tg4510 y 3xTg-AD a la edad de un mes, presentaron tau anormalmente fosforilada en la formación hipocampal y en la RSC.

10. Referencias

Alzheimer's Association. (2017). Alzheimer's Association Report 2017 Alzheimer's Disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 13.

Alzheimer's Disease International. (2015). World Alzheimer Report. The global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends.

Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O'Keefe, J. (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press: New York. 853 pp.

Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 118, 167-179.

Armano, S., Coco, S., Bacci, A., Pravettoni, E., Schenk, U., Verderio, C., Varoqui, H., Erickson, J. D. y Matteoli, M. (2002). Localization and functional relevance of system A neutral amino acid transporters in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 277:10467–10473.

Arnold, S.E., Hyman, B.T., Flory, J., Damasio, A.R. y Van Hoesen, G.W. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, 1: 103-116.

Arriagada, P.V., Marzloff, K. y Hyman, B.T. (1992). Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in non-demented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(9):1681-8.

Aupeé, A. M., Desgranges, B., Eustache, F., Laleve ´e, C., de la Sayette, V., Viader, F., Baron, J. C. (2001). Voxel-based mapping of brain hypometabolism in permanent amnesia with PET. *Neuroimage*, 6:1164–1173.

Avila, J. (2008). Tau kinases and phosphatases. *J Cell Mol Med*, 12(1): 258-9.

Bak, L. K., Schousboe, A. y Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*, 98(3): 641-53.

Bastrikova, N., Gardner, G. A., Reece, J. M., Jeromin, A., y Dudek, S. M. (2008). Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proceedings National Academy of Science USA*, 105(8): 3123-3127.

Basurto-Islas, G., Luna-Muñoz, J., Guillozet-Bongaarts, A. L., Binder, L. I., Mena, R. y García-Sierra, F. (2008). Accumulation of aspartic acid 421-and glutamic acid 391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67(5): 470-483.

Bateman, R. J., Xiong, C., Benzinger, T. L., Fagan, A. M., Goate, A., Fox, N. C., Marcus, D. S., Cairns, N. J., Xie, X., Blazey, T. M., Holtzman, D. M., Santacruz, A., Buckles, V., Oliver, A., Moulder, K., Aisen, P. S., Ghetti, B., Klunk, W. E., McDade, E., Martins, R. N., Masters, C. L., Mayeux, R., Ringman, J. M., Rossor, M. N., Schofield, P. R., Sperling, R. A., Salloway, S., Morris, J. C. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 367(9): 795-804.

Belluscio, M. A., Mizuseki, K., Schmidt, R., Kempter, R. y Buzsáki, G. (2012). Cross-frequency phase-phase coupling between theta and gamma oscillations in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 32(2): 423-435.

Bhutia, Y. D. y Ganapathy, V. (2016). Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(10): 2531-2539.

Bliss, T. V. y Gardner-Medwin, A. R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232(2): 357-74.

Blot, A., Billups, D., Bjorkmo, M., Quazi, A. Z., Uwechue, N. M., Chaudhry, F. A. y Billups, B. (2009). Functional expression of two system A glutamine transporter isoforms in rat auditory brainstem neurons. *Neuroscience*, 164(3-3): 998-1008.

Bott, J. B., Muller, M. A., Jackson, J., Aubert, J., Cassel, J. C. Mathis, C. y Goutagny, R. (2016). Spatial reference memory is associated with modulation of theta-gamma coupling in the dentate gyrus. *Cerebral Cortex*, 26 (9): 3744-3753.

Boulland, J., Osen, K.K., Levy, I.M., Danbolt, N.C., Edwards, R. H., Storm-Mathisen, J. y Chaudhry, F.A. (2002). Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *European Journal of Neuroscience*, 10 (15): 1615-1631.

Boulland, J., Rafiki, A., Levy, L. M., Storm-Mathisen, J. y Chaudhry, F.A. (2003). Highly differential expression of SN1, a bidirectional glutamine transporter, in astroglia and endothelium in the developing rat brain. *Glia*, 41:260–275.

Braak, H. (1972). Pigment architecture of the human cortex cerebri. II. Subiculum. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 131:235-54.

Bröer, S. y Brookes, N. (2001). Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem*, 77(3):705-719.

Bröer, A., Albers, A., Setiawan, I., Edwards, R. H., Chaudhry, F. A., Lang, F., Wagner, C. A. y Bröer, S. (2002). Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J Physiol*, 539(1):3–14.

Bröer, S. (2014). The SLC38 family of sodium-amino acid co-transporters. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 466:155-172.

Brown, M. N. y Mathews, G. C. (2010). Activity- and age-dependent modulation of GABAergic neurotransmission by System A-mediated glutamine uptake. *J Neurochem*, 114(3): 909-920.

Buntup, D., Skare, O., Solbu, T. T., Chaudhry, F. A., Storm-Mathisen, J. y Thangnipon, W. (2008). B-Amyloid 25-35 peptide reduces the expression of glutamine transporter SAT1 in cultured cortical neurons. *Neurochem Res*, 33: 248-256.

Burkhalter, J., Fiumelli, H., Erickson, J. D. y Martin, J. (2006). A critical role for system A amino acid transport in the regulation of dendritic development by brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8):5152-5159.

Buzsáki, G., Anastassiou, C.A. y Koch C. (2012). The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neuroscie*, 13(6):407-420.

Calderón-Garcidueñas, A. y Duyckaerts, C. (2018). Chapter 23. Alzheimer's Disease. En: Handbook of Clinical Neurology. 3°ed. Elsevier. 619 pp.

Canter, R. G., Penney, J. y Tsai, L. H. (2016). The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature*, 539:187–196.

Cariappa, R. y Kilberg, M. S. (1990). Hormone-induced system A amino acid transport activity in rat liver plasma membrane and Golgi vesicles. Evidence for a differential sensitivity to inactivation by N-ethylmaleimide during carrier maturation. *J Biol Chem*, 265:1470–1475.

Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D. R. y Edwards. R. H. (1999). Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell*, 99(7):769-80.

Cho, J. y Johnson, G. V. W. (2004). Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *Journal of Neurochemistry*, 88(2): 349-358.

Christensen, H. N. (1990). Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev*, 70(1):43-77.

Collarini, E. J., y Oxender, D. L. (1987). Mechanisms of transport of amino acids across membranes. *Annu Rev Nutr*, 7:75–90.

Collingridge, G. L., Peineau, S., Howland, J. G., y Wang, Y. T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nat Rev. Neurosci*, 11:459-473.

Cormier, R. J. y Kelly, P. T. (1996). Glutamate-induced long-term potentiation enhances spontaneous EPSC amplitude but not frequency. *J Neurophysiol*, 75(5): 1909-18.

Coulter, D. A. y Eid, T. (2012). Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia*, 60:1215–1226.

Crimins, J. L., Pooler, A., Polydoro, M., Luebke, J. I. y Spires-Jones, T. L. (2013). The intersection of amyloid β and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev*, 12:757-763.

Cubelos, B., González-González, I. M., Giménez, C. y Zafra, F. (2005). Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Gli.*, 49(2):230-44.

Dingledine, R. y McBain, C. J. (1999). Glutamate and Aspartate Are the Major Excitatory Transmitters in the Brain. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6° ed. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Dudai, Y. y Morris, R. G. (2013). Memorable trends. *Neuron*, 80:742-750.

Emptage, N. J., Reid, C. A., Fine, A. y Bliss, T. V. (2003). Optical quantal analysis reveals a presynaptic component of LTP at hippocampal Schaffer-associational synapses. *Neuron*, 38(5): 797-804.

Erecińska, M. y Silver, I.A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 35:245–296.

Fell, J. y Axmacher, N. (2011). The role of phase synchronization in memor processes. *Nat Rev Neurosci*, 12(2):105-118.

Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, 1(42):1-11.

Franchi-Gazzola, R., Visigalli, R., Dall'Asta, V., Sala, R., Woo, S. K., Kwon, H. M., Gazzola, G. C. y Bussolati, O. (2001). Amino acid depletion activates TonEBP and sodium-coupled inositol transport. *J Physiol Cell Physiol*, 280:1465 –1474.

Franchi-Gazzola, R., Gaccioli, F., Bevilacqua, E., Visigalli, R., Dall'Asta, V., Sala, R., Varoqui, H., Erickson, J. D., Gazzola, G. C. y Bussolati, O. (2004). The synthesis of SNAT2 transporters is required for the hypertonic stimulation of system A transport activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1667(2):157-166.

Freeman, T. L., Ngo, H. Q. y Maillard, M. E. (1999). Inhibition of system A amino acid transport and hepatocyte proliferation following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology*, 30(2): 437-44.

Frey, U. y Morris, R. G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, 385(6616): 553-6.

Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V.K., Weiler, J. E., O'Brien, P. J. y MacLennan, D. H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253(5018): 448-51.

García-Sierra, F., Ghoshal, N., Quinn, B., Berry, R. W. y Binder, L. I. (2003). *Journal of Alzheimer's Disease*, 5: 65-77.

Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussiere, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G. y Hof, P. R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, 60:1495-500.

Goedert, M. y Jakes, R. (2005). Mutation causing neurodegenerative tauopathies. *Biochem Biophys Acta*, 1739(2-3):240-50.

Gold, C. A., y Budson, A. E. (2008). Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics. *Expert review of neurotherapeutics*, 8(12):1879-91.

Gómez-Isla, Y., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R.C., Parisi, J. E. y Hyman, B. T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 41(1):17-24.

González-González, I.M., Cubelos, B., Giménez, C. y Zafra, F. (2005). Immunohistochemical localization of the amino acid transporter SNAT2 in the rat brain. *Neuroscience*, 130:61–73.

Goutagny, R., Jackson, J. y William, S. (2009). Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 12(12): 1491-1493.

Goutagny, R., Gu, N., Cavanagh, C., Jackson, J., Chabot, J. G., Quirion, R., Krantic, S. y William, S. (2013). Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A β overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci*, 37(12):1896-1902.

Grewal, S., Defamie, N., Zhang, X., De Gois, S., Shawki, A., Mackenzie, B., Chen, C., Varoqui, H. y Erickson, J. D. (2009). SNAT2 amino acid transporter is regulated by amino acids of the SLC6 γ -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.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. y Binder, I. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(13): 4913-7.

Hägglund, M. G., Hellsten, S. V., Bagchi, S., Philippot, G., Löfqvist, E., Nilsson, V. C. O., Almkvist, I., Karlsson, E., Streedharan, S., Tafreshiha, A. y Fredriksson, R.

(2015). Transport of l-glutamine, l-alanine, l-arginine and l-histidine by the neuron-specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS. *J Mol Bio*, 427:1495-1512.

Halgren, E. y Smith, M. E. (1987). Cognitive evoked potentials as modulatory processes in human memory formation and retrieval. *Human neurobiology*, 6(2): 129-39.

Hardy, J. A. y Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054): 184-5.

Hardy, J. y Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297 (5580):353-6.

Harris, K. M., Fiala, J. C. y Ostroff, L. (2003). Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 358(1432):745-748.

Hatanaka, T., Huang, W., Martindale, R.G. y Ganapathy V. (2001). Differential influence of cAMP on the expression of the three subtypes (ATA1, ATA2, and ATA3) of the amino acid transport system A. *FEBS Lett*, 505: 317-320.

Hebb, D.O. (1949). Organization of behavior: A neuropsychological theory. New York. John Wiley and sons.

Hertz, L. (1979). Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog Neurobiol*, 13(3): 277-323.

Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., y Robinson, S. R. (1999). Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res*, 428:417-428.

Hyde, R., Cwiklinski, E. L., MacAulay, K., Taylor, P. M., Hundal, H. S. (2007). Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transporter by amino acid availability. *J Biol Chem*, 282(27):19788–19798.

Iaria, G., Chen, J. K., Guariglia, C., Ptito, A., Petrides, M. (2007). Retrosplenial and hippocampal brain region in human navigation: Complementary functional contributions to the formation and use of cognitive maps. *Eur J Neurosci*, 25(3):890-9.

Iresjo, B. M., Svanberg, E. y Lundholm, K. (2005). Reevaluation of amino acid stimulation of protein synthesis in murine- and human-derived skeletal muscle cells assessed by independent techniques. *J Physiol Endocrinol Metab*, 288:1028–1037.

Jeitner, T., Battaile, K. y Cooper, A. L. (2015). Critical evaluation of the changes in glutamine synthetase activity in models of cerebral stroke. *Neurochem Res*, 40:1–13.

Jenstad, M., Quazi, A. Z., Zilberter, M., Haglerød, C., Berghuis, P., Saddique, N., Goiny, M., Buntup, D., Davanger, S., Haug, F. M., Barnes, C. A., McNaughton, B. L., Ottersen, O. P, Storm-Mathisen, J., Harkany, T. y Chaudhry, F. A. (2009). System A transporter SAT2 mediates replenishment of dendritic glutamate pools controlling retrograde signaling by glutamate. *Cereb Cortex*, 19:1092–1106.

Kamphuis, W., Dijk, F., van Soest, S. y Bergen, A. A. (2007). Global gene expression profiling of ischemic preconditioning in the rat retina. *Mol Vis*, 13: 1020-1030.

Kandel. E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M, Siegelbaum, S. A., Hudspeth, A. J., Mack, S. (2013). Principles of neural science. 5°ed. McGraw-Hill Companies Inc.

Kandel, E. R., Dudai, Y., y Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157:163-186.

Keene, C. S. y Bucci, D. J. (2008). Contribution of the retrosplenial and posterior parietal cortices to cue-specific and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*, 122(1):89-97.

Kilberg, M. S., Handlogten, M. E. y Christensen, H. N. (1980). Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J Biol Chem*, 233(9):4011-9.

Kilberg, M. S., Pan Y. X., Chen H. y Leung-Pineda V. (2005). Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu. Rev. Nutr*, 25:59–85.

Kitazawa, M., Medeiros, R. y LaFerla, F. M. (2012). Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions. *Curr Pharm Des*, 18(8):1131-1147.

Kletzien, R. F., Pariza, M. W., Becker, J. E., Potter, V. R. y Butcher, F. R. (1976). Induction of amino acid transport in primary cultures of adult rat liver parenchymal cells by insulin. *J Biol Chem*, 251:3014–3020.

Kosik, K. S. (1993). The molecular and cellular biology of tau. *Brain Pathol*, 3(1): 39-43.

Lassmann, H. (1995). Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol*, 89:35-41.

Le, R., Cruz, L., Urbanc, B., Knowles, R. B., Hsiao-Ashe, K., Duff, K., Irizarry, M. C., Stanley, H. E. y Hyman, B. T. (2001). Plaque-induced abnormalities in neurite geometry in transgenic models of Alzheimer disease: implication for neural system disruption. *J Neuropathol. Exp. Neurol*, 60(8):753-8.

Lei, M., Xu, H., Li, Z., Wang, Z., O'Malley, T. T., Zhang, D., Walsh, D. M., Xu, P., Selkoe, D. J., y Li, S. (2016). Soluble A β oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance. *Neurobiol Dis*, 85:111–121.

Leke, R. y Schousboe, A. (2016). Chapter 8. The glutamine transporters and their role in the glutamate/GABA-Glutamine cycle. En: *The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle*. Advances in Neurobiology. Springer International Publishing.

Li, Z., Jo, J., Jia, J-M., Lo, S. C., Whitcomb, D. J., Jiao, S., Cho, K. y Sheng, M. (2010). Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell*, 141, 859-871.

Lisman, J. y Buzsáki, G. (2008). A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophrenia Bulletin*, 34(5): 974-980.

Mackenzie, B, Schäfer, M. K. H., Erickson, J. D., Hediger, M. A., Weihe, E., Varoqui, H. (2003). Functional properties and cellular distribution of the system A glutamine transporter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *J Biol Chem*, 278:23720–23730.

Mackenzie, B. y Erickson, J. D. (2004). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch*, 447(5): 784-795.

Mahar, I., Albuquerque, M. S., Mondragón-Rodríguez, S., Cavanagh, C., Davoli, M.A. Chabot, J. G., Williams, S., Mechawar, N., Quirion, R., y Krantic, S. (2017). Phenotypic alterations in hippocampal NPY- and PV-expressing interneurons in a presymptomatic transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, 8:327.

Mailliard, M. E., Cariappa, R. y Banks, R. K. (1994). Impairment of glucagon-induced hepatic system A activity by short-term ethanol administration in the rat. *Gastroenterology*, 106:480–487.

Mathern, G. W., Mendoza, D., Lozada, A., Pretorius, J. K., Dehnes, Y., Danbolt, N. C., Nelson, N., Leite, J. P., Chimelli, L., Born, D. E., Sakamoto, A. C., Assirati, J. A., Fried, I., Peacock, W. J., Ojemann, G. A. y Adelson, P. D. (1999). Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 52:453–472.

Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E. y Bateman, R. J. (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, 330(6012):1774.

McDowell, H. E., Evers, P. A., Hundal, H. S. (1998). Regulation of System A amino acid transport in L6 rat skeletal muscle cells by insulin, chemical and hyperthermic stress. *FEBS Lett*, 441:15–19.

McGivan, J. D. y Pastor-Anglada, M. (1994). Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem J*, 299: 321-334.

Melone, M., Quagliano, F., Barabaresi, P., Varequi, H., Erickson, J. D. y Conti, F. (2004). Localization of the glutamine transporter SNAT1 in rat cerebral cortex and neighboring structures, with a note on its localization in human cortex. *Cerebral Cortex*, 14: 562-574.

Melone, M., Varoqui, H., Erickson, J. D. y Conti, F. (2006). Localization of the Na⁺-coupled neutral amino acid transporter 2 in the cerebral cortex. *Neuroscience*, 140: 281-292.

Mondragón-Rodríguez, S., Basurto-Islas, G., Santa-Maria, I., Mena, R., Binder, L. I., Avila, J., Smith, M. A., Perry, G. y García-Sierra, F. (2008). Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol*, 89: 81–90.

Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N. y Boehm, J. (2012) Interaction of endogenous tau with synaptic proteins is regulated by NMDA-receptor dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem*, 287:32040–3205.

Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Luna-Muñoz, J., Acevedo-Aquino, M. C. y Williams, S. (2014). Phosphorylation of tau protein at sites Ser³⁹⁶⁻⁴⁰⁴ is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathology and applied neurobiology*, 40:121-135.

Mondragón-Rodríguez, S., Salas-Gallardo, A., González-Pereyra, P., Macías, M., Ordaz, B., Peña-Ortega, F., Aguilar-Vázquez, A., Orta-Salazar, E., Díaz-Cintra, S., Perry, G. y Williams, S. (2018). Phosphorylation of tau protein correlates with changes in hippocampal theta oscillations and reduces hippocampal excitability in Alzheimer's model. *J.Biol.Chem*, 293(22):8462–8472.

Mota, S. I., Ferreira, I. L. y Rego, A. C. (2014). Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease- A focus on NMDA receptors. *Neuropharmacology*, 76(A):16-26.

Musiek, E. S. y Holtzman, D. M. (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen”. *Nat Neurosci*, 18(6): 800-6.

Norenberg, M. y Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*, 161:303–310.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. y LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39:409-421.

O'Leary, T., van Rossum, M. C. y Wyllie, D. J. A. (2010). Homeostasis of intrinsic excitability in hippocampal neurons: dynamics and mechanism of the response to chronic depolarization. *J Physiol*, 588(1):157-170.

Oxender, D. L. y Christensen, H. N. (1963). Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem*, 238:3686–3699.

Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., Yoo, J., Ho, K. O., Yu, G. Q., Kreitzer, A., Finkbeiner, S., Noebels, J. L. y Mucke, L. (2007). Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*, 55(5): 697-711.

Palop, J. J. y Mucke, L. (2010). Amyloid- β induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature Neuroscience*. 13(7): 812-818.

Pengas, G., Williams, G. B., Acosta-Carbonero, J., Ash, T. W. J., Hong, Y. T., Izquierdo-Garcia, D., Fryer, T. D., Hodges, J. R. y Nestor, P. J. (2012). The relationship of topographical memory performance to regional neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Frontiers Aging Neuroscience*, 4:17.

Perez-Nievas, B. G., Stein, T. D., Tai, H., Dols-Icardo, O., Scotton, T. C., Barroeta-Espar, I., Fernandez-Carballo, L., de Munain, E. L., Perez, J., Marquie, M., Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Lowe, V., Parisi, J. E., Petersen, R. C., Ikonomic, M. D., López, O. L., Klunk, W., Hyman, B. T. y Gómez-Isla, T. (2013). Dissecting

phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain*, 136:2510-26.

Pooler, A. M., Polydoro, M., Wegmann, S., Nicholls, S. B., Spires-Jones, T. L. y Hyman, B. T. (2013). Propagation of tau pathology in Alzheimer's disease: identification of novel therapeutic targets. *Alzheimers Res Ther*, 5(5): 49.

Preston, A. R., y Eichenbaum, H. (2013). Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current biology*, 23(17):764-73.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A-S., McNamara, J. O. y Williams, S. M. (2004). Neuroscience. 3° ed. Massachusetts. Sinauer Associates, Inc.

Qiu, C., Kivipelto, M. y von Strauss, E. (2009). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11(2):111-28.

Ramón y Cajal, S. (1894). The Croonian lecture. -La fine structure des centres nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London*, 55:331-335.

Ramsden, M., Kotilinek, L., Forster, C., Paulson, J., McGowan, E., SantaCruz, K., Guimaraes, A., Yue, M., Lewis, J., Carlson, G., Hutton, M. y Ashe, K. H. (2005). Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci*, 25:10637–10647.

Redondo, R. L. y Morris, R. G. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci*, 12(1): 17-30.

Reimer, R. J., Chaudhry, F. A., Gray, A. T., Edwards, R. H. (2000). Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:7715–7720.

Reitz, C. y Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*, 88:640-651.

Robinson, S. (2001). Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 980:972–980.

Ross, J. L., Ali, M. Y., Warshaw, D. M. (2008). Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 20(1): 41-47.

Salgado-Puga, K., Rodríguez-Colorado, J., Prado-Alcalá, R. A. y Peña-Ortega, F. (2017). Subclinical doses of ATP-sensitive potassium channel modulators prevent alterations in memory and synaptic plasticity induced by amyloid beta. *J. Alzheimer's Dis*, 57:205–226.

Sanhueza, M. y Lisman, J. (2013). The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Mol Brain*, 6:10.

Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M. y Ashe, K. H. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*, 309(5733): 476-481.

Schousboe, A., Westergaard, N., Waagepetersen, H. S., Larsson, O. M., Bakken, I. J., y Sonnewald, U. (1997). Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia*, 21:99–105.

Schousboe, A. (2003). Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res.* 28:347–352.

Schousboe, A., Bak, L.K. y Waagepetersen, H. S. (2013). Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4(102):1-11.

Schultz, C. y Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the Hippocampal Formation. *Frontiers in Neurology and Neuroscience*, 34:6-17.

Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A. y Buzsaki, G. (1995). Hippocampal CA1 interneurons: labeling study an in vivo intracellular. *J. Neurosci*, 75: 6651–6655.

Spires, T. L. y Hyman, B. T. (2005). Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx*, 3: 423-37.

Spires-Jones, T. L. y Hyman, B. T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*, 82(4):756-71.

Stanton, P. K., Winterer, J., Bailey, C. P. Kyrozis, A., Raginov, I., Laube, G., Veh, R. W., Nguyen, C. Q. y Müller, W. (2003). Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. *Journal of Neuroscience*, 23(13): 5936-5944.

Su, T. Z., Wang, M., Syu, L. J., Saltiel, A. R. y Oxender, D. L. (1998). Regulation of system A amino acid transport in 3T3-L1 adipocytes by insulin. *J Biol Chem*, 273:3173–3179.

Sun, B., Li, W., Zhu, C., Jin, W-S., Zeng, F., Liu, Y-H., Bu, X-L., Zhu, J., Yao, X-Q. y Wang, Y-J. (2018). Clinical research on Alzheimer's disease: Progress and perspectives. *Neuroscience Bulletin*, 34(6)-1111-1118.

Talbot, K., Wang, H.Y., Kazi, H., Han, L.Y., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R. L., Kawaguchi, K. R., Samoyedny, A. J., Wilson, R. S., Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wolf, B. A., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q. y Arnold, S. E. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest*, 122(4): 1316-38.

Tanzi, R. E. (2012). The genetics of Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb. Perspect Med*, 2(10).

Teyler, T. J. y DiScenna, P. (1985). The role of hippocampus in memory: a hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev*, 9(3):377-89.

Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., y Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12):1791-800.

Thal, D. R., Beach, T. G., Zanette, M., Heurling, K., Chakrabarty, A., Ismail, A., Smith, A. P. y Buckley, C. (2015). [18 F] flutemetamol amyloid positron emission tomography in preclinical and symptomatic Alzheimer's disease: Specific detection of advanced phases of amyloid- β pathology. *Alzheimer's Dement*, 11: 975–985.

Todd, T. P. y Bucci, D. J. (2015). Retrosplenial Cortex and Long-Term Memory: Molecules to behavior. *Neural Plasticity*, 414173.

Tsumoto, T. (1993). Long-term depression in cerebral cortex: a possible substrate of "forgetting" that should not be forgotten. *Neuroscience Research*, 16(4): 263-270.

Varoqui, H., Zhu, H., Yao, D., Ming, H. y Erickson, J. D. (2000). Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J Biol Chem*, 275(6):4049-54.

Villain, N., Desgranges, B., Viader, F., De la Sayette, V., Mézenge, F., Landeau, B., Baron, J. C., Eustache, F. y Chételat, G. (2008). Relationships between hippocampal atrophy, White matter disruption, and grey matter hypometabolism in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 28:6174–6181.

Vogt, B.A. y Peters, A. (1981). Form and distribution of neurons in rat cingulate cortex: Areas 32, 24 and 29. *J Comp Neurol*, 195(4):603-25.

Walton, H. S. y Dodd, P. R. (2007). Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 50:1052–1066.

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. y Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72(5): 1858-1862.

Weiss, M. D., Derazi, S., Rossignol, C., Varoqui, H., Erickson, J., Kilberg, M. S. y Anderson, K. J. (2003). Ontogeny of the neutral amino acid transporter SAT1/ATA1 in rat brain. *Dev Brain Res*, 143:151–159.

Wong, P. C., Cai, H., Borchelt, D. R., and Price, D. L. (2002). Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci*, 5, 633–639.

Yao, D., Mackenzie, B., Ming, H., Varoqui, H., Zhu, H., Hediger, M. A. y Erickson, J. D. (2000). A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. *J Biol Chem*, 275(30):22790-7

Yasuno, F., Imamura, T., Hirono, N., Ishii, K., Sasaki, M., Ikejiri, Y., Hashimoto, M., Shimomura, T., Yamashita, H. y Mori, E. (1998). Age at onset and regional cerebral glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 9(2):63-7.

Yu, A. C., Drejer, J., Hertz, L. y Schousboe, A. (1983). Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J Neurochem*, 41:1484–1487.

Zander, C., Zhang, Z., Albers, T. y Grewer, C. (2015). Chapter 2: Amino acid transporters and glutamine. En: Glutamine in clinical nutrition. *Nutrition and health*, 21-36.