

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ZANTHOXYLUM MARTINICENSE SOBRE LA EXPRESIÓN DE APOE, LRP, GLAST Y GLT-1 EN MODELO DE ASTROCITOS Y EN RATONES 3X TG-AD

IQ Juan Guillermo Lopez-Cano

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, D.C, Colombia

2022

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE ZANTHOXYLUM MARTINICENSE SOBRE LA EXPRESIÓN DE APOE, LRP, GLAST Y GLT-1 EN MODELO DE ASTROCITOS Y EN RATONES 3X TG-AD

IQ Juan Guillermo Lopez-Cano

Tesis o Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Neurociencias

Director:

Gonzalo Humberto Arboleda Bustos MD., PhD

Línea de Investigación: Enfermedades Neurodegenerativas

Grupo de Investigación Muerte neuronal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2022

Dedicatoria

Mi familia, la casa grande, de donde surge este ser que quiso arriesgarse a vivir



**ÁRBOLES SANTOS QUE
ACARICIAN
ESTRELLAS SAGRADAS
O LAS PERIPECIAS DE UN TACHERO EN
EL CEREBRO**

En Memoria de Juan Diego Moya Martínez y Jairo Saldarriaga



Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre: Juan Guillermo Lopez Cano

Agradecimientos/Créditos



Resumen

Evaluación del efecto del extracto de *Zanthoxylum martinicense* sobre la expresión de ApoE, LRP, GLAST y GLT-1 en modelo de astrocitos y en ratones 3x Tg-AD

El aumento no regulado de la excitación neuronal y del ingreso de calcio a la célula, conocido como excitotoxicidad y causado por un exceso de glutamato (ya sea en tiempo de permanencia y/o en concentración) en la hendidura sináptica, o por acúmulos de A β en el espacio extracelular en contextos de Alzheimer, ha sido considerado como uno de los posibles mecanismos moleculares que derivan en la muerte de neuronas del hipocampo en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los extractos vegetales presentan características químicas estructurales que amplían el espectro de ligandos o compuestos con actividad neuroprotectora, y dada esa diversidad química han ganado importancia en la búsqueda de alternativas terapéuticas a enfermedades neurodegenerativas como la EA convirtiéndolos en sustancias privilegiadas multidiana.

En este trabajo se evaluó el efecto de un extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum martinicense* sobre la expresión de las proteínas astrocitarias responsables de la regulación del glutamato en la hendidura sináptica, adicionalmente se evaluó el cambio en otras proteínas de interés en contextos de la EA dada la actividad agonista LXR β de este extracto demostrada previamente en nuestro grupo de investigación. Mediante técnicas de inmunología y de cuantificación de proteínas totales, se evaluó el cambio en la expresión de las proteínas LRP, APOE (que tienen un rol protagónico en la homeostasis de A β en el sistema nervioso central) y de los transportadores de glutamato GLAST (EAAT1) y GLT-1 (EAAT2), en cultivos *in vitro* de la línea U87-MG empleado como modelo de astrocitos y en un modelo *in vivo* de ratones 3xTg-AD que fueron tratados con el extracto de *Zanthoxylum martinicense*. El resultado muestra que el tratamiento con este extracto

específicamente tiene un efecto dosis dependiente en el aumento de la expresión de las proteínas ya mencionadas excepto LRP. El aumento en la expresión de APOE, GLAST y GLT1 tiene un potencial efecto neuroprotector por la posible mejora de la remoción de A β y en el incremento en la eficiencia de la retoma del glutamato sináptico evitando eventos de excitotoxicidad, y puede pensarse que sean una parte del sustento molecular que soporta la recuperación de la memoria espacial en ratones 3xTg-AD tratados con el extracto.

Palabras clave: Alzheimer, *Zanthoxylum martinicense*, APOE, GLT1, GLAST, Astrocitos, excitotoxicidad, Glutamato, transportadores de glutamato

Abstract

Evaluation of the effect of *Zanthoxylum martinicense* extract over the expression of ApoE, LRP, GLAST y GLT-1 in an astrocyte model and 3x Tg-AD mice.

The dysregulated increase of neuronal excitation and calcium entry into the neuron, known as excitotoxicity, after a glutamate excess in the synaptic cleft or because of the A β aggregates in the extracellular matrix in Alzheimer's disease (AD), has been considered as one of the possible molecular mechanisms driving neurodegeneration in the hippocampus during progression of AD.

Vegetable extracts exhibit structural chemical features that enlarge the spectrum of ligands or compounds with neuroprotective capacity. According to this chemical diversity, they have emerged as protagonists in the search for therapeutic alternatives to neurodegenerative diseases like Alzheimer, and make them privileged multitarget compounds.

In this research, we tested the effect of an ethanolic *Zanthoxylum martinicense* root's extract on the expression of astrocytic proteins responsible for glutamate reuptake in the synaptic cleft. Additionally, because previous research in our lab demonstrated an LXR β agonist activity of the extract, we evaluate the change in additional proteins related to AD. By using immunology tools and total protein quantification procedures, we probed changes in the expression of LRP, APOE (with a main role in the A β homeostasis in the central nervous system) and for the astrocytic glutamate transporters GLAST (EAAT1) and GLT-1 (EAAT2), in cultures of U87-MG cell line used as an astrocytic model, and in an *in-vivo* model of 3xTg-AD mice that were treated with the *Zanthoxylum martinicense* extract.

Our results show that the treatment with this extract has a dose-dependent effect in the upregulation of the above-mentioned proteins, except LRP. The APOE, GLT1, and GLAST

upregulation has a potential neuroprotective effect, due to their potential increased in A β removal and increased reuptake of synaptic glutamate, therefore avoiding excitotoxicity. We speculate that these effects are a constitutive part of the molecular substrate that supports the spatial memory recovery of 3xTg-AD treated with the extract.

Key words: Alzheimer, Zanthoxylum martinicense , APOE, GLT1, GLAST, Astrocytes, excitotoxicity, Glutamate, glutamate transporters.

Contenido

Declaración de obra original	V
Resumen.....	VII
Abstract	IX
Contenido.....	XI
Lista de Figuras.....	XV
Lista de Tablas.....	XIX
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XXI
Introducción.....	1
1 Marco teórico.....	5
1.1 Enfermedad de Alzheimer (EA).....	5
Hiperexcitabilidad neuronal como hipótesis en EA: rol de los astrocitos.....	8
1.2 Astrocitos	10
1.2.1 Aspectos Generales	10
1.2.2 Astrocitos: Funciones dentro del SNC	11
1.2.3 Transportadores de glutamato.....	14
1.3 Astrocitos y EA	16
1.3.1 Astrogliopatología: astrogliosis reactiva y astrocitopatía: dishomeóstasis vs inflamación ..	17
1.3.2 Atrofia en Astrocitos: efectos sobre transportadores de Glutamato y remoción de A β	18
1.3.3 Disfunción de Transportadores de glutamato en EA.....	19
1.4 Dinámica e interacciones entre APOE, A β y LRP: objetivo remoción de A β del SNC.....	20
1.4.1 Receptores Nucleares, agonistas y regulación de la expresión de APOE	21

1.4.2	APOE	23
1.4.3	Familia LDLR de receptores de endocitosis activada por agonista y rol de LRP1 en la remoción de A β 24	24
1.5	Alternativas terapéuticas a receptores nucleares: Extractos vegetales	26
	Extractos vegetales como agonistas LXR	27
2	Contexto.....	29
2.1	Descripción del problema	29
2.2	Justificación.....	31
3	Pregunta de investigación e Hipótesis	35
4	Objetivos	37
4.1	General.....	37
4.2	Específicos.....	37
5	Metodología.....	39
5.1	Modelo Experimental	40
5.1.1	Descripción del Modelo <i>in vitro</i>	40
5.1.2	Descripción del Modelo <i>in vivo</i>	41
5.2	Diseño experimental	44
5.2.1	Expresión de APOE, LRP, GLAST y GLT1 <i>in vitro</i>	44
5.2.2	Expresión de APOE, LRP, GLAST y GLT1 <i>in vivo</i>	45
5.3	Métodos.....	46
5.3.1	Cultivo <i>in vitro</i> de línea U87-MG	46
5.3.2	Citotoxicidad (viabilidad celular)(Galland et al., 2019; Park et al., 2020).....	46
5.3.3	Inmunocitoquímica de cultivos <i>in vitro</i> (Galland et al., 2019).....	46
5.3.4	Western Blot de Cultivos <i>in vitro</i> (Galland et al., 2019)	46
5.3.5	Disección del cerebro	47
5.3.6	Inmunohistoquímica de cortes de cerebro de ratón.....	48
5.3.7	Western Blot de lisados de hipocampo (Galland et al., 2019)	48

5.3.8	Análisis de datos.....	48
6	Resultados.....	49
6.1	El tratamiento con el extracto de <i>Zanthoxylum martinicense</i> aumenta la expresión de APOE en las U87 y en el hipocampo de animales 3xTg-AD, probablemente como un efecto de la actividad agonista LXR- β del extracto.....	51
6.2	La transcripción de LRP se ve aumentada por el tratamiento con el extracto de <i>Zanthoxylum martinicense</i> en modelo in vivo 3xTg-AD, pero no genera un cambio en la expresión de la proteína LRP ni en cultivo de línea U-87 ni en hipocampo de animales 3xTg-AD.	55
6.3	La expresión del transportador de glutamato astrocitario GLT-1, es incrementada después del tratamiento con el extracto de <i>Zanthoxylum martinicense</i> en modelo de astrocitos in vitro y en el hipocampo de animales 3xTg-AD.....	59
6.4	El tratamiento con el extracto de <i>Zanthoxylum martinicense</i> aumenta la expresión del transportador de glutamato astrocitario GLAST.....	64
6.5	La concentración del extracto de <i>Zanthoxylum martinicense</i> usada para el tratamiento de astrocitos de cultivo primario de hipocampo de ratón no reflejó variaciones en la expresión ni de GLAST ni de GLT-1.	68
7	Discusión y análisis.....	71
	Alcance transcripcional multidiana del extracto de <i>Zanthoxylum martinicense</i>	72
	Efecto del extracto consistente en U87 y 3xTg-AD, pero con diferencias asociadas a características propias del modelo.	74
	La comprobación del aumento transcripcional de LRP causado por el extracto, requiere un modelo diferente al usado en este trabajo.....	75
	Respuesta astrocitaria diferencial inter e intra regional al tratamiento con el extracto.	76
	Efecto del extracto sobre la expresión de GLT1 y GLAST es dependiente del tipo de transportador.	77
	La respuesta al aumento de las proteínas APOE, GLT1 y GLAST es dependiente de la dosis del extracto suministrada a animales 3xTg-AD.....	77
	El extracto como posible alternativa para regular la excitotoxicidad en contextos de EA.....	78

8	Conclusiones	81
9	Perspectivas	83
10	Fuentes de financiación	85
11	Referencias Bibliográficas	87
	Anexo A Información estadística de las figuras del capítulo 6	93
	Anexo B Consideraciones éticas y de bioseguridad	97

Lista de Figuras

Figura 1-1: Hipótesis posibles del curso de la enfermedad de Alzheimer. Modificado de (Rezaee et al., 2021).....	6
Figura 1-2: Hipótesis de la respuesta adaptativa. Modificado de (Jeremic et al., 2021)	7
Figura 1-3: Mecanismo molecular de hiperexcitabilidad desencadenado por A β . Modificado de (Esposito et al., 2013).....	9
Figura 1-4: Resumen de algunas funciones de los astrocitos en el SNC. Modificado de (Matias et al., 2019)	13
Figura 1-5: Localización de transportadores de Glutamato EAAT en la hendidura sináptica Modificado de (Benarroch, 2010).	14
Figura 1-6: Estequiometría de los transportadores de Glutamato en Astrocitos. Modificado de (Rebec, 2013)	15
Figura 1-7: Ciclo Glutamato-Glutamina en los Astrocitos. Modificado de (Lemberg & Fernández, 2009)	16
Figura 1-8: Mecanismo de remoción de A β mediado por APOE. Modificado de (Liao et al., 2017)20	
Figura 1-9: Organización estructural de los dominios generales de los receptores nucleares Tipo II. Modificado de (Hiebl et al., 2018).....	22
Figura 1-10: Mecanismo de activación de los NR del tipo II. Modificado de (Hiebl et al., 2018)	23
Figura 1-11: Partícula lipoprotéica y el rol en la conformación que cumple APOE. Modificado de (Z. Li et al., 2020).....	24
Figura 1-12: Familia de receptores LDLR. Modificado de (Go & Mani, 2012).	25
Figura 2-1: EA en cifras.....	29
Figura 5-1: Modelo Invitro	41
Figura 5-2: Modelo Invivo	43

Figura 6-1: Cuantificación del efecto del extracto sobre la expresión de APOE en Cultivos de U87-MG.....	51
Figura 6-2: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de APOE en regiones del hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	52
Figura 6-3: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de APOE en regiones de la corteza de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	54
Figura 6-4: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de APOE en el hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	55
Figura 6-5: Cuantificación del efecto del extracto sobre la expresión de LRP en Cultivos de U87-MG	56
Figura 6-6: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de LRP en regiones del hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	57
Figura 6-7: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de LRP en regiones de la corteza de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	58
Figura 6-8: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de LRP en el hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto.	59
Figura 6-9: Cuantificación del efecto del extracto sobre la expresión de GLT1 en Cultivos de U87-MG.....	60
Figura 6-10: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de GLT-1 en regiones del hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	62
Figura 6-11: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de GLT-1 en regiones de la corteza de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	63
Figura 6-12: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de GLT1 en el hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	64
Figura 6-13: Cuantificación del efecto del extracto sobre la expresión de GLAST en Cultivos de U87-MG.....	65
Figura 6-14: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de GLAST en regiones del hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	66
Figura 6-15: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de GLAST en regiones de la corteza de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	67
Figura 6-16: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de GLAST en el hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto	68

Figura 6-17: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de las proteínas en Astrocitos de Cultivo primario de hipocampo de ratón.....	69
Figura 7-1: Resumen gráfico	79
Figura 8-1Modelo Biomolecular propuesto.....	82
Figura 8-2Modelo de Señalización propuesto	82

Lista de Tablas

Tabla 1-1: Descripción general de los dos tipos de Alzheimer. Modificado de	7
Tabla 5-1: Diseño experimental para evaluar expresión de proteínas en modelo in vitro	44
Tabla 5-2: Diseño experimental para evaluar expresión de proteínas en modelo in vivo	45
Tabla 6-1: Resumen general de Resultados de la investigación.	50

Lista de Símbolos y abreviaturas

3x Tg-AD VH: Ratones tripletransgénicos para enfermedad de Alzheimer tratados con vehículo

3X TG-AD: Ratones tripletransgénicos para enfermedad de Alzheimer

3x Tg-EAZM50/ 3x Tg-EAZM100: Ratones tripletransgénicos para enfermedad de Alzheimer tratados con extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum martinicense* 50 mg/kg y 100 mg/kg respectivamente

ABCA1: Casette de unión al ATP

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

APOE: Apolipoproteína

APP: Proteína precursora de amiloide

A β : Amiloide beta

BHE: Barrera hematoencefálica

CREB: Elemento de unión en respuesta a cAMP

CSS: Corteza somatosensorial

Cx: Corteza

DAPI: Marcador 4',6-diamidino-2-fenilindol

DG: Giro Dentado

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAAT: Transportadores de aminoácidos excitatorios

EC: Corteza entorrinal

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EOAD/FAD: Enfermedad de Alzheimer de aparición temprana/ Enfermedad de Alzheimer familiar

GABA: ácido γ -aminobutírico

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GLAST: Transportadores de glutamato-aspartato

GLT-1: Transportador de glutamato 1

GW: Molécula GW3965, Agonista LXR β usado como control positivo

HC: Hipocampo

HDACi: inhibidores histona deacetilasa

ICQ: inmunocitoquímica

IHQ: inmunohistoquímica

LDL/ LDLR: Lipoproteínas de baja densidad/ Receptores de Lipoproteínas de baja densidad

LOAD/SAD: Enfermedad de Alzheimer de aparición tardía/ Enfermedad de Alzheimer esporádica

LRP: Proteína relacionada con receptores de Lipoproteínas de baja densidad

LXR β : Receptor nuclear del hígado

NF- κ B: Factor Nuclear- Kapa beta

NFT: Ovillos neurifibrilares

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMDA: Receptor del N-metil-D-aspartato

PA: Placas amiloideas

PBS: Solucion salina de buffer fosfato

PFA: Paraformaldehído

PPAR receptores activados-proliferadores de peroxisoma

PSEN: Presenilina

RN: Receptor Nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RXR: Receptor nuclear retinóico

SB: Subiculum

SEM: Media del error standard

SERM: moduladores de receptores de estrógeno/ estrógeno selectivos

Slc: Transportadores de solutos

SNC: Sistema nervioso central

TGF: Factor de crecimiento transformable

TNF: Factor de necrosis Tumoral

U87-MG: Línea celular

WB: Western Blot

ZM: extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum martinicense*

Introducción

Dentro de las demencias que afectan a la humanidad, la Enfermedad de Alzheimer es una de las patologías que ha venido aumentando de manera dramática en la incidencia y prevalencia dado principalmente por el aumento de la expectativa de vida. Esta patología afecta de manera significativa las actividades cotidianas de los pacientes y de sus cuidadores, sin mencionar el alto costo que significa para los sistemas de salud la atención efectiva a los pacientes con la enfermedad. Por lo tanto, se requiere una atención científica integral que permita elucidar terapias para disminuir el avance del deterioro de los pacientes, e incluso en años posteriores para prevenir la aparición de la patología. Cifras como que el 10% de las personas mayores de 65 años tienen la enfermedad o que dos de cada tres pacientes son mujeres, son dramáticas y hacen un llamado a la comunidad científica a atender esta enfermedad con un carácter de urgencia muy alto.

El conocimiento científico de la enfermedad ha permitido establecer dos tipos de Alzheimer bien diferenciados. El Alzheimer de aparición temprana o Alzheimer familiar (conocido como EOAD o FAD por sus siglas en inglés) que es explicado por mutaciones que causan modificaciones en la fisiología de las proteínas APP, PSEN1 y PSEN2 principalmente; y que se manifiesta en pacientes desde los 45 años en adelante. Un segundo tipo de Alzheimer conocido como de aparición tardía o Alzheimer esporádico (conocido como LOAD o SAD por sus siglas en inglés) afecta a más del 85% de los pacientes en el mundo con Alzheimer. Este segundo tipo de demencia, se considera una enfermedad compleja en la que confluyen varios factores de riesgo, entre ellos el factor de riesgo genético más estudiado es la aparición de una isoforma específica (Epsilon4) en la proteína ApoE. Se han estudiado varias hipótesis biomoleculares para explicar el origen y curso de la enfermedad siendo la más estudiada la del acúmulo fisiopatológico de fragmentos de la proteína APP llamados amiloide beta, que se encuentran en diferentes regiones del cerebro de manera correlativa con la Enfermedad. Sin embargo, hay otras hipótesis como la hiperfosforilación de la proteína Tau, el desbalance en el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, el daño en la transmisión colinérgica

o la neuro inflamación excesiva del sistema nervioso central como una respuesta del sistema inmune ante un disruptor de la homeóstasis en el cerebro. Dentro de estas hipótesis aparece una que puede estar derivada por el acúmulo fisiopatológico del péptido amiloide beta y es la excitotoxicidad. En los mecanismos biomoleculares de la excitotoxicidad es en los que se basa la presente investigación y en el rol de los astrocitos en la homeóstasis del glutamato, el principal neurotransmisor implicado en la muerte neuronal causada por la excitotoxicidad y desde la cual se puede dar soporte al desarrollo de la enfermedad.

Las alternativas terapéuticas probadas (algunas de ellas ya rechazadas y otras aún suministradas como tratamiento, pero sin eficacia contundente en el control de las causas subyacentes de la enfermedad) en investigaciones anteriores (e incluso las más recientemente aprobadas por la FDA), en su gran mayoría se inclinan por el tratamiento de la enfermedad desde una visión que se ha denominado amiloidogénica y que busca como estrategia de tratamiento aumentar la remoción de acúmulos de amiloide beta del parénquima cerebral. Solo los tratamientos con medicamentos reguladores de neurotransmisores apuntan a un impacto sobre la excitotoxicidad pero lo hacen desde un enfoque netamente neurocéntrico. En el presente trabajo apuntamos a develar ideas que permitan llegar a dianas terapéuticas basadas en la disminución de la muerte neuronal por excitotoxicidad, pero desde un enfoque astrocéntrico, dado el rol protagónico de este tipo de células en la homeóstasis total del cerebro.

Los astrocitos son el tipo de células más abundantes en el sistema nervioso central. Una de sus principales funciones es garantizar la homeóstasis a todo nivel biomolecular en el cerebro y para eso se encuentran localizadas de manera ubicua en todo el parénquima cerebral con interacciones de un astrocito con hasta 10.000 neuronas. A la luz de la presente investigación, estas células tienen dos funciones casi que exclusivas de ellas en el cerebro: (1) son las principales reguladoras del glutamato -principal neurotransmisor causante de la excitotoxicidad- a través de la expresión de transportadores transmembranales de glutamato -denominados GLT-1 y GLAST- y (2) son las principales sintetizadoras de ApoE – proteína protagonista de la remoción de los acúmulos patológicos de amiloide beta en el cerebro-.

Otras investigaciones han reportado el rol de los receptores nucleares LXR β como alternativa terapéutica para la enfermedad de Alzheimer, estos receptores tienen entre otras funciones la

regulación al alza de la transcripción para la proteína ApoE -mayoritariamente de origen astrocitario-. Dentro del grupo de investigación de muerte neuronal se ha demostrado previamente el efecto de algunos extractos vegetales como agonista de los receptores mencionados al comienzo de este párrafo.

De manera consecuente con lo anterior, la presente investigación pretende evaluar el efecto de un extracto vegetal de la raíz de la especie *Zanthoxylum martinicense* -con probada función agonista de los receptores LXR β -, sobre la expresión de proteínas específicas en líneas celulares de origen astrocitario y en astrocitos de un modelo animal para Enfermedad de Alzheimer. Las proteínas de interés son GLT-1, GLAST y ApoE. Estas proteínas que son sintetizadas primordialmente en astrocitos, tienen un rol protagónico en el curso de la enfermedad de Alzheimer por ser transportadores que regulan el glutamato en la hendidura sináptica previniendo la muerte neuronal por excitotoxicidad; y participando de manera directa en la remoción de los acúmulos de amiloide beta.

Evaluar los cambios en la expresión de las proteínas mencionadas ha sido motivado por el previo hallazgo en el grupo de muerte neuronal, del aumento transcripcional de estas proteínas en animales tratados con los extractos. La metodología utilizada está basada en el tratamiento con el extracto y con un agonista sintético de LXR β de cultivos de línea celular U87-MG y de un modelo de ratón para la enfermedad de Alzheimer. Luego de los tratamientos se han evaluado por técnicas de inmunohistoquímica y WesternBlot el cambio en la expresión de las proteínas.

El hecho de poder registrar el cambio en la expresión de las proteínas de origen astrocitario antes mencionadas, como respuesta a un tratamiento con extracto vegetal agonista LXR β , permitirá a futuras investigaciones elucidar modelos biomoleculares para los astrocitos que permitan entender de manera más clara el mecanismo a través del cual este tipo de células pueden participar en alternativas terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer

1 Marco teórico

1.1 Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA a nivel histo-morfológico, se caracteriza por el depósito extracelular excesivo del péptido amiloide beta ($A\beta$) y por la conformación intracelular de ovillos neurofibrilares (NFTs) que contienen proteínas TAU hiperfosforiladas. Esto conduce al daño neuronal, la muerte celular y consecuentemente daños en memoria y aprendizaje que derivan luego en demencia. La causa exacta de EA no es aún clara y hay muchos factores que contribuyen significativamente al inicio y a la progresión de la enfermedad. No hay una aproximación terapéutica efectiva para detener la progresión de EA y sus síntomas asociados por lo tanto la intervención temprana, preferiblemente en etapas preclínicas cuando el cerebro no está significativamente afectado, es la mejor opción de un tratamiento efectivo (Rezaee et al., 2021).

Como se muestra en la Figura 1-1 existen alrededor de 6 hipótesis aceptadas sobre el origen de la enfermedad (Rezaee et al., 2021), hipótesis que no son excluyentes y que más bien pueden ser concomitantes y complementarias:

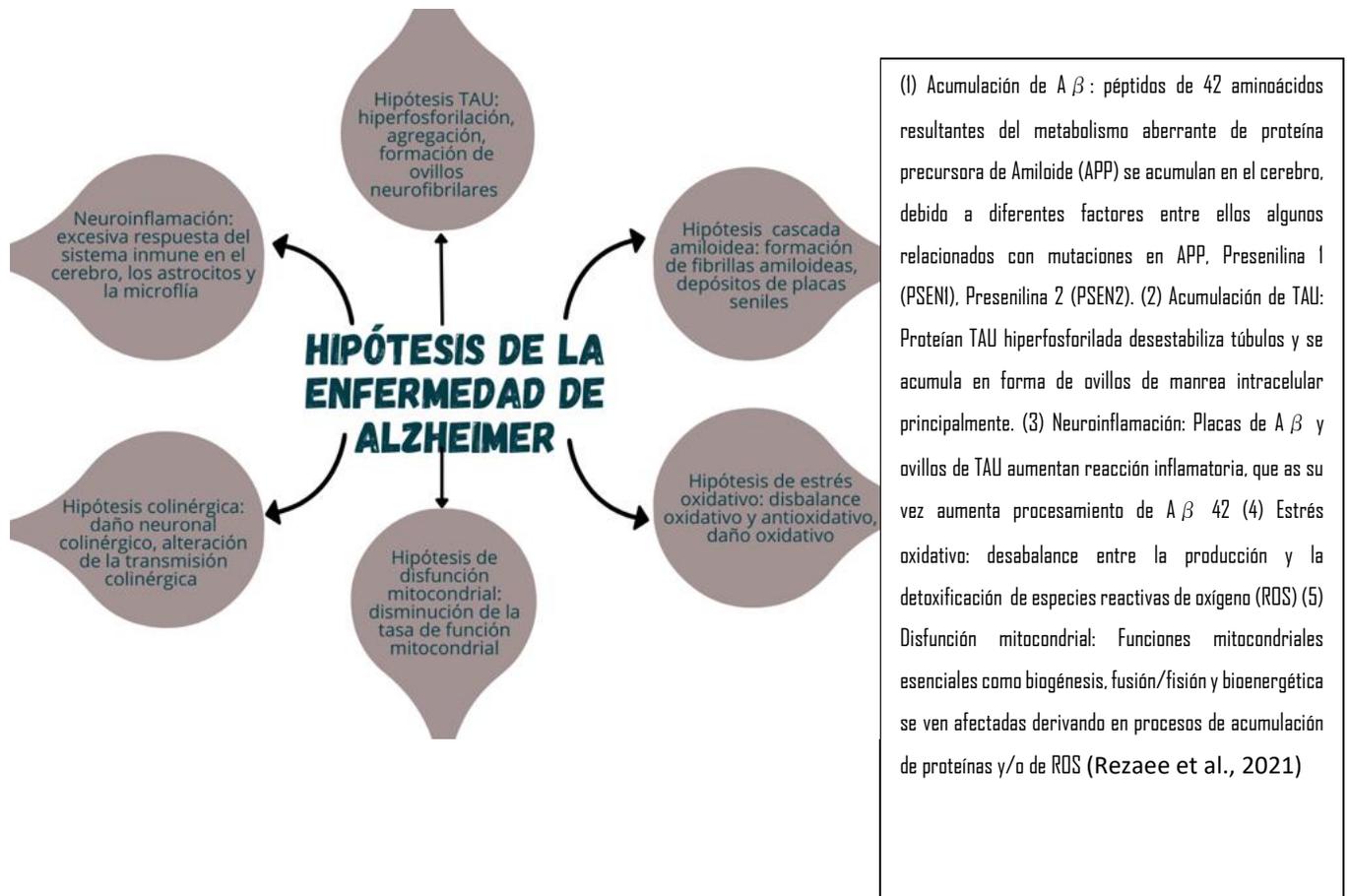


Figura 1-1: Hipótesis posibles del curso de la enfermedad de Alzheimer. Modificado de (Rezaee et al., 2021)

La hipótesis en la que más se ha enfocado la comunidad científica es la de la acumulación de péptidos de $A\beta$ como la causa de la EA.

Dentro de este enfoque se ha propuesto la hipótesis de la respuesta adaptativa que se muestra en la Figura 1-2 que plantea que la acumulación de $A\beta$ y de Tau hiperfosforilado en el cerebro son respuestas al estrés crónico causado por diferentes factores, que incluyen: la hiperexcitabilidad neuronal, neuroinflamación, cambios mitocondriales o desregulación metabólica, homeostasis alterada del colesterol o la resistencia a la insulina (Jeremic et al., 2021).

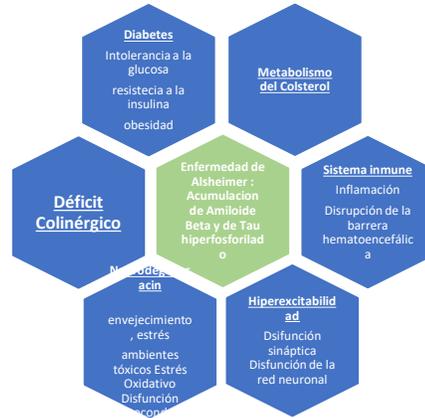


Figura 1-2: Hipótesis de la respuesta adaptativa. Modificado de (Jeremic et al., 2021)

Modificado de Jeremic et al., 2021 La respuesta adaptativa al estrés crónico causado por diferentes eventos fisiológicos de manera prolongada en el tiempo es considerada como la causa de la acumulación de Amiloide beta y de Tau hiperfosforilado en la EA.

La EA se clasifica en dos tipos, Alzheimer de aparición tardía o esporádico (del inglés LOAD o SAD) y Alzheimer de aparición temprana o familiar (del inglés EOAD o FAD). Ambos con un factor de riesgo genético.

SAD	FAD
Los síntomas aparecen alrededor de los 60's años de edad	Los síntomas pueden aparecer en las personas después de los 30's y antes de los 60's años de vida.
Tipo mas común, lo padece mas del 85 % de los casos	Es el tipo menos común, llega a ser alrededor del 10% de los casos
Normalmente está involucrado el alelo APOE4	Heredado de padres a hijos, involucra mutaciones en tres genes principalmente: Proteína precursora de Amiloide (APP) en el cromosoma 21 Presenilina 1 (PSEN1) en el cromosoma 14 Presenilina 2 (PSEN2)) en el cromosoma 1

Tabla 1-1: Descripción general de los dos tipos de Alzheimer. Modificado de <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>

Hiperexcitabilidad neuronal como hipótesis en EA: rol de los astrocitos

La hipótesis de la muerte neuronal por excitotoxicidad en EA, está basada en el aumento de influjo de calcio a las neuronas postsinápticas y la incapacidad de la neurona de regular la oleada de calcio que deriva en el desencadenamiento de varios mecanismos de muerte (Esposito et al., 2013). El aumento del influjo de calcio descontrolado, o excitotoxicidad, se puede ver disparado por diferentes vías, entre ellas por el exceso de glutamato en la hendidura sináptica. Algunas de estas vías son posiblemente iniciadas por eventos característicos de EA.

Como se describirá más adelante, hay una participación protagónica de los astrocitos en los mecanismos de transmisión sináptica y de regulación del glutamato en esa transmisión, tanto en contextos fisiológicos como de EA.

En la Figura 1-3 se muestra un mecanismo probable de la vía excitotóxica en la que se ven implicados A β y el glutamato. Los oligómeros de A β interfieren con la señalización de receptores NMDA y con los transportadores de glutamato de los astrocitos, la concentración de glutamato en la hendidura sináptica se ve aumentada y como consecuencia, el influjo de calcio a la neurona postsináptica. La avalancha de glutamato puede activar receptores NMDA extrasinápticos que incrementan las concentraciones intracelulares de calcio y vías metabólicas responsables del colapso neuronal y de la pérdida sináptica, asociadas también con la inhibición de vías prosupervivencia. En la medida en que esta condición persiste, más se activarán vías patológicas que llevan a la hiperfosforilación de TAU en el citoesqueleto con degeneración neuronal y muerte celular (Esposito et al., 2013).

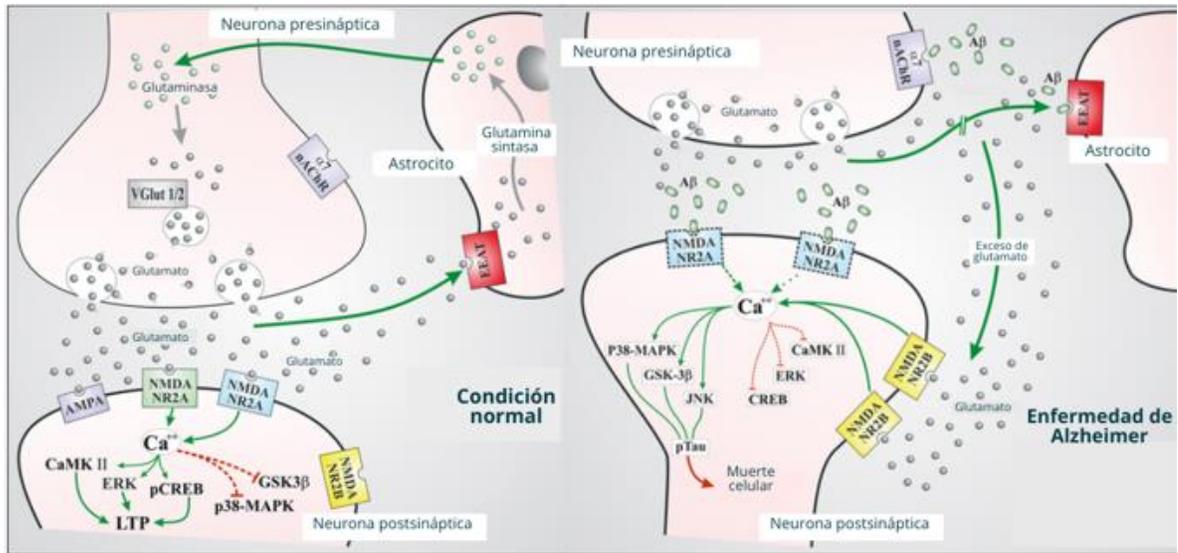


Figura 1-3: Mecanismo molecular de hiperexcitabilidad desencadenado por Aβ. Modificado de (Esposito et al., 2013).

(1) A la izquierda descripción del mecanismo fisiológico de la regulación de glutamato en la hendidura sináptica. El glutamato liberado por la presinapsis se difunde en el espacio extracelular siendo sentido por los receptores postsinápticos y por los transportadores de Glutamato en los astrocitos para ser removido y mantenerlo en los niveles adecuados para la transmisión sináptica. (2) a la derecha sucesos que probablemente acontecen en un contexto de EA. Aβ y sus acúmulos interfieren en el aumento de la liberación de glutamato presináptico, en la señalización del mismo en los receptores de la densidad postsináptica y en los transportadores destinados a la regulación de la concentración y el tiempo de permanencia en la hendidura sináptica, generando eventos de excitotoxicidad que pueden llevar a muerte neuronal.

La muerte neuronal mediada por excitotoxicidad es una característica clave de EA y es atribuida principalmente al incremento de niveles extracelulares de glutamato, pérdida de GLT1 (Del inglés Glutamate Transporter 1 ó EAAT2: Transportador de aminoácidos excitatorios /Glutamato) de los astrocitos (Almad & Maragakis, 2018; Sofroniew & Vinters, 2010).

El modelo de la Figura 1-3 propone entonces una correlación entre la hipótesis amiloidogénica y la excitotoxicidad, y como los cúmulos de Aβ o los péptidos en sí mismos, causan una interrupción del metabolismo del glutamato en la hendidura sináptica. Por lo anterior un posible aumento de los transportadores de glutamato en los astrocitos, responsables de esa homeostasis, podría convertirse en una alternativa para disminuir el progreso de la EA en algunas etapas de la misma. El modelo que se pretende plantear como resultado del proyecto está basado en esa posible interacción Aβ/Transportadores de Glutamato y la dishomeóstasis del neurotransmisor.

1.2 Astrocitos

1.2.1 Aspectos Generales

Los astrocitos son junto con los oligodendrocitos y la microglía, las células clasificadas como células gliales. Estas células suministran principalmente soporte homeostático, en la transmisión de la señal neuronal o inmunológico en el sistema nervioso central (SNC).

Los astrocitos son un tipo de células altamente presentes en el SNC, responsables por cualquier tarea homeostática en el cerebro; las estimaciones sobre el número de células totales en el SNC humano son muy variadas en rangos que van desde 100 billones de neuronas y 1000 billones de astrocitos (obtenidas a mediados del siglo anterior), hasta otras estimaciones más recientes que concluyen que la cantidad de neuronas está alrededor de 86 billones con una cantidad similar de células gliales (Azevedo et al., 2009; von Bartheld et al., 2016), dentro de las cuales la proporción de astrocitos puede ser del 20% (von Bartheld et al., 2016). Los astrocitos son células altamente heterogéneas, con diferencias tanto inter como intrarregionales en el SNC (Ben Haim & Rowitch, 2016; Rodríguez-Arellano et al., 2016). No hay regiones del SNC carentes de astrocitos o células similares. En el hipocampo o en la corteza, se estima que varias proyecciones ramificadas de un solo astrocito están en contacto con varios cientos de dendritas de múltiples neuronas y envuelven más de 100.000 sinapsis (Sofroniew & Vinters, 2010).

Los astrocitos en la materia gris parcelan el tejido neuronal en unidades, relativamente independientes, astrogliovasculares (Rodríguez-Arellano et al., 2016). Sus conexiones pueden contactar sinapsis, otras células gliales, vasos sanguíneos y dependiendo del área del cerebro tienen funciones más específicas. Uno de esos roles principales es la regulación sináptica (Matias et al., 2019). Dentro de esos dominios territoriales las membranas astrogliales cubren la mayoría de las sinapsis y de las neuronas; esas membranas astrogliales disponen de numerosas bombas y transportadores que son responsables por la homeóstasis iónica, de metabolitos, especies reactivas de oxígeno (ROS) y de neurotransmisores en los fluidos intersticiales. Las terminales de los astrocitos tapizan los vasos sanguíneos y crean un sistema “glimfático” que promueve la remoción de metabolitos del parénquima del SNC. Los astrocitos actúan además como células secretoras del SNC expresando transportadores y receptores, y liberando neurotransmisores (e.g. ATP, glutamato o GABA), neuromoduladores (D-Serina o ácido Quinurénico) y factores tróficos, (tales como factores de crecimiento, neurotrofinas, o factores de necrosis tumoral $-\alpha$, TNF- α) que

afectan varios procesos de plasticidad y el procesamiento de información en el SNC. (Matias et al., 2019; Rodríguez-Arellano et al., 2016)

Además del rol en la función sináptica, los astrocitos son responsables de la homeóstasis iónica en el SNC, regulando los niveles iónicos extracelulares de potasio, cloro y calcio, la homeóstasis hídrica y el mantenimiento del pH de las células. Ellos son además responsables de proveer metabolitos energéticos requeridos por las neuronas en las redes neuronales, como la glucosa y el lactato, y factores tróficos esenciales para la supervivencia y diferenciación neuronal (Matias et al., 2019).

Adicionalmente los astrocitos mantienen un contacto íntimo con pericitos y con células endoteliales, lo que contribuye a la formación de la barrera hematoencefálica (BHE). Mas recientemente una nueva función ha sido atribuida a los astrocitos como parte del sistema glimfático, en la cual los extremos de las terminales de los astrocitos contactan la vasculatura, rodeándola y formando un sistema de túneles a través de los cuales compuestos como la glucosa y aminoácidos son distribuidos, y el exceso de desechos tóxicos es removido, tales como grandes proteínas como A β y TAU (Matias et al., 2019).

Debido a la gran cantidad de funciones ejecutadas por los astrocitos, se puede esperar que el déficit en estas células o sus funciones, conlleve a un impacto importante en el funcionamiento del cerebro. Dicho impacto, sin embargo, debido a la diversidad de estas células, cambia entre diferentes áreas del cerebro (Matías, Morgado &Gomes, 2019).

1.2.2 Astrocitos: Funciones dentro del SNC

Los astrocitos tienen funciones críticas en la preservación de la función neurológica, como la regulación de la formación y eliminación de sinapsis, y el mantenimiento de la comunicación sináptica. Los astrocitos son actores clave en la homeóstasis del SNC y a través de canales y receptores presentes en sus superficies, funcionan como controladores de agua, iones (como potasio y calcio), glutamato y segundos mensajeros. Los astrocitos además suministran energía a las neuronas transportando lactato y amino ácidos (Almad & Maragakis, 2018). En la Figura 1-4 se muestra un esquema con algunas de las funciones más destacadas de los astrocitos que se relacionan a continuación.

Función estructural. Dan forma a la materia gris y conforman la unidad neurovascular (Verkhatsky et al., 2010).

Roles en el desarrollo. Las fronteras moleculares formadas por los astrocitos guían la migración de axones en desarrollo (Sofroniew & Vinters, 2010).

Regulación del flujo de sangre. Mediante múltiples interacciones bidireccionales con los vasos sanguíneos, regulan el flujo local de sangre en SNC (Sofroniew & Vinters, 2010).

Homeóstasis de fluidos, iones, pH y transmisores de la hendidura sináptica en una manera que es crítica para la transmisión sináptica saludable (Sofroniew & Vinters, 2010).

Roles en la función sináptica. Liberación regulada de moléculas activas incluyendo glutamato, purinas (ATP y adenosina) GABA y D-Serina (Sofroniew & Vinters, 2010).

Energía y metabolismo. Proveen metabolitos energéticos a los diferentes elementos neuronales en la materia gris y blanca (Sofroniew & Vinters, 2010).

Barrera hematoencefálica (BHE). Induce propiedades de barrera en el cerebro y en células endoteliales (Sofroniew & Vinters, 2010).

Metabolismo de Aminoácidos (Glutamato), proteínas y homeóstasis de iones específicos en el cerebro (Maragakis & Rothstein, 2006). Los astrocitos son las células del SNC donde se sintetiza la mayor cantidad de Apolipoproteína E (APOE), que como lo desarrollaremos más adelante (1.4 Dinámica e interacciones entre APOE, A β y LRP: objetivo remoción de A β del) cumple una función central en la dinámica molecular asociada a la EA.

Modulación de la transmisión excitatoria sináptica. A través de transportadores especializados que describiremos más adelante (1.2.3 Transportadores de glutamato), transportan la gran mayoría del glutamato extracelular y lo convierten en glutamina (Maragakis & Rothstein, 2006).

Reacción a daños y reparación del tejido del SNC. Mediante la formación de la cicatriz glial ayudan a la reparación y confinamiento del daño neuronal (C. Li et al., 2011).

Rol en la Unidad Neurovascular. Mediante las proyecciones finas, los astrocitos interactúan con todas las células constitutivas de la unidad neurovascular mediando diferentes procesos regulatorios, manteniendo la integridad de la BHE, soporte mecánico y metabólico, regulación cerebrovascular y respuesta inmune. Los astrocitos son claves en la regulación del flujo sanguíneo

cerebral mediante la liberación de agentes vasoactivos como Prostaglandina E2 y ATP. Los astrocitos tienen un papel fundamental en el suministro de energía dependiente de la actividad cerebral (McConnell & Mishra, 2022).

Respuesta Inflamatoria. Los astrocitos responden con señalización proinflamatoria ante diferentes eventos en el CNS, esta respuesta inflamatoria secreta sustancias que derivan en vías de señalización y respuestas en las demás células del CNS. Por ejemplo, señalizando la sinaptogénesis o la poda sináptica, el reclutamiento de microglía para el aclaramiento de A β en contextos de EA. Se ha considerado que esta respuesta inflamatoria tiene diferentes etapas y que puede en algunos casos considerarse neuroprotectora y en otros deletérea (Verkhatsky et al., 2010).

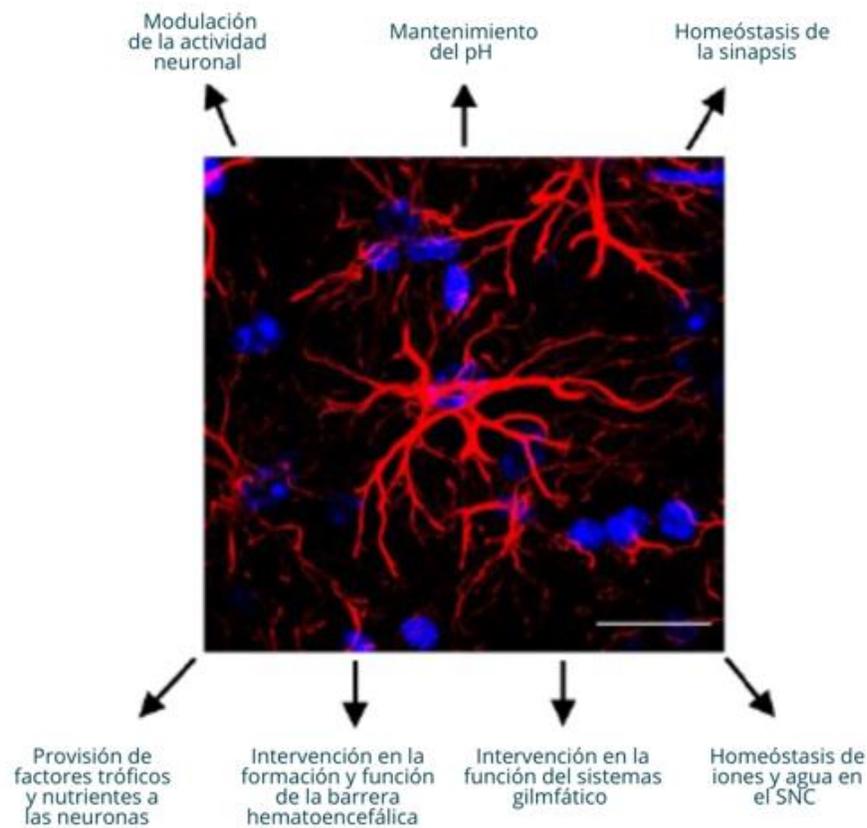


Figura 1-4: Resumen de algunas funciones de los astrocitos en el SNC. Modificado de (Matias et al., 2019)

(I) Representación esquemática de las principales funciones de los astrocitos en el sistema nervioso central. Los astrocitos en el cerebro saludable, son células altamente ramificadas responsables por varias funciones en el desarrollo, funcionamiento y homeostasis del sistema nervioso central. En Rojo se ve la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y los núcleos teñidos en DAPI (azul) de tejido de hipocampo murino. Barra de escala 20 μ m.

1.2.3 Transportadores de glutamato

Los astrocitos son los elementos centrales de la homeóstasis de los neurotransmisores en el SNC. Ellos son particularmente importantes para la transformación del principal neurotransmisor del cerebro, el glutamato. Ellos son el principal sumidero de esta molécula. De todo el glutamato liberado durante la transmisión sináptica, aproximadamente el 20% es reciclado en las neuronas y el 80% es tomado por los astrocitos perisinápticos (Maragakis & Rothstein, 2006; Verkhratsky et al., 2010).

El transporte astroglial de glutamato es una función específica de los transportadores EAAT (del inglés Excitatory Amino Acid Transporters). Hay 5 tipos de EAATs en el SNC (EAAT1 a EAAT5 según se muestra en la Figura 1-5) que se ubican principalmente en membrana citoplasmática de los astrocitos (Maragakis & Rothstein, 2006). El transporte astroglial de glutamato es una función específica de los transportadores EAAT1 y EAAT2 que están presentes de manera exclusiva en los astrocitos (Simpson et al., 2010; Verkhratsky et al., 2010), y son los principales reguladores de los niveles extracelulares de Glutamato. La pérdida de la proteína EAAT2 y el transporte defectuoso de glutamato han sido reportados en EA, sugiriendo que el decrecimiento en la actividad de estos transportadores puede jugar un rol fundamental en la patogénesis de EA (Simpson et al., 2010).

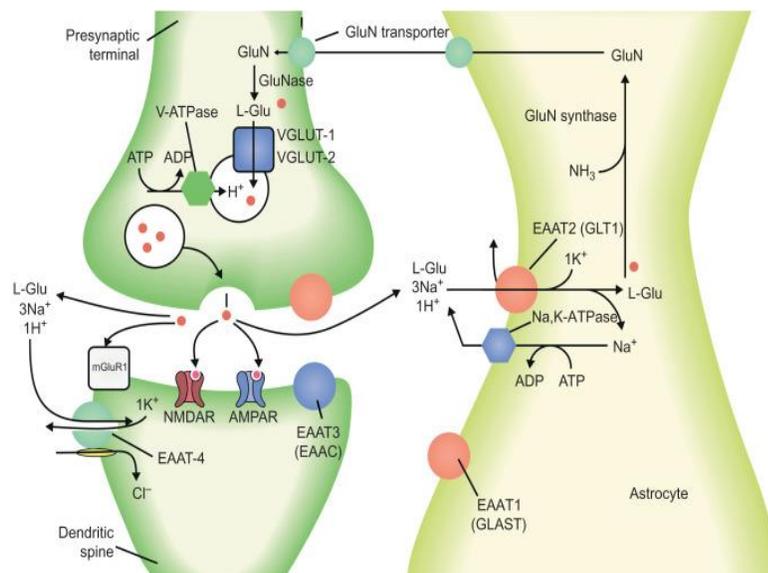


Figura 1-5: Localización de transportadores de Glutamato EAAT en la hendidura sináptica Modificado de (Benarroch, 2010).

EAAT 1 y 2 localizados exclusivamente en astrocitos, EAAT 3,4 y 5 de localización esporádica en espinas dendríticas de las neuronas. Luego de la internalización de glutamato en los astrocitos, se lleva a cabo la conversión a Glutamina para ser retornada a la neurona presináptica para su reciclado en la transmisión sináptica. En ratones EAAT1 y EAAT2 son denominados GLAST (Glutamate-aspartate transporter) y GLT-1 (Glutamate transporter-1) respectivamente.

Los transportadores de glutamato GLAST y GLT1 (o EAAT1 y EAAT2 en humanos), son expresados por los genes Slc1A3 y Slc1A2 respectivamente (Maragakis & Rothstein, 2006).

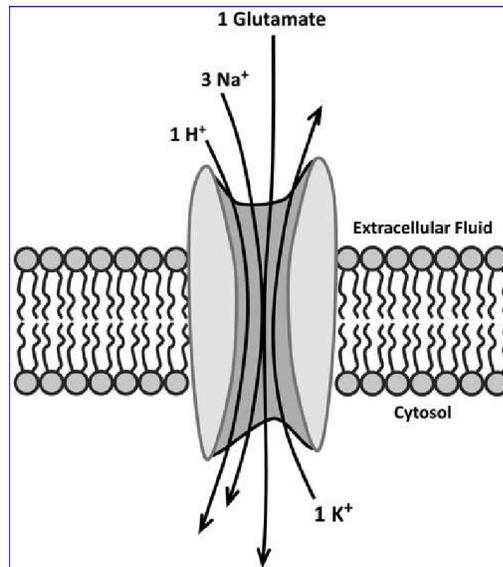


Figura 1-6: Estequiometría de los transportadores de Glutamato en Astrocitos. Modificado de (Rebec, 2013)

Transporte electrogénico de Glutamato -no dependiente de ATP-, aprovechando la diferencia de cargas y de concentraciones iónicas. Por el ingreso al astrocito de 3 iones de Na^+ , un protón y la salida de un ion de K^+ , ingresa una molécula de glutamato.

El transporte de glutamato es guiado por el gradiente transmembrana para la traslocación de Na^+ , por cada molécula de glutamato, haciendo este transporte electrogénico, como se esquematiza en la Figura 1-6 (Verkhatsky et al., 2010). Este proceso es capaz de concentrar glutamato intracelular más de 10,000 veces comparado con el ambiente extracelular (Maragakis & Rothstein, 2006). El glutamato después de haber ingresado a los astrocitos es convertido en glutamina por la glutamina sintetasa. La glutamina no tóxica es luego transportada de regreso a la terminal presináptica a través del espacio extracelular, y en el citoplasma de la neurona la glutamina es convertida en glutamato (ciclo Glutamato-Glutamina que se muestra en la Figura 1-7) el cual es acumulado en las vesículas sinápticas, completando la conmutación glutamato-glutamina (Verkhatsky et al., 2010).

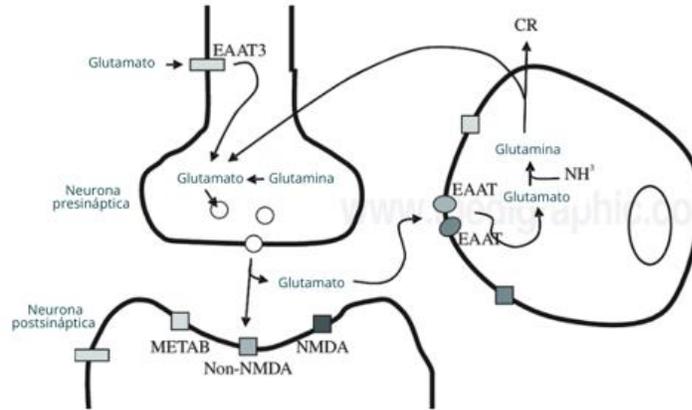


Figura 1-7: Ciclo Glutamato-Glutamina en los Astrocitos. Modificado de (Lemberg & Fernández, 2009)

Los astrocitos son las únicas células provistas de glutamina sintetasa en el SNC. El Glutamato internalizado es convertido en Glutamina para ser regresada a las neuronas o es almacenado como metabolito para proceso de anaplerosis dentro del astrocito. Dependiendo del balance extracelular de glutamina, del requerimiento por la transmisión sináptica y del requerimiento energético del astrocito o de la neurona se decide una u otra vía

1.3 Astrocitos y EA

El presente proyecto pretende dar herramientas para posteriormente tratar de establecer un modelo que se basa en la coincidencia correlativa de eventos en los que los astrocitos participan en el contexto de la EA.

Dentro de las funciones asociadas al rol fisiológico o dishomeostático de los astrocitos en contextos de la EA, se pueden enumerar los siguientes con un impacto directo sobre el desarrollo de la enfermedad (González-Reyes et al., 2017):

- Desregulación del Calcio: Los depósitos de A β generan cambios morfológicos o de señalización que disregulan la concentración de calcio intracelular y tiene como consecuencia alteraciones en la gliotransmisión.
- Disfunción glutamatérgica y excitotoxicidad: El A β extracelular tiene efectos en la expresión de transportadores astrocíticos del glutamato sináptico, disminuyendo así su capacidad de remoción del neurotransmisor y permitiendo procesos de hiperexcitabilidad neuronal. Adicionalmente A β aumenta la expresión de receptores NMDA astrocíticos, así como la liberación de gliotransmisores en las sinapsis.

- Aclaramiento de A β : Los astrocitos participan tanto en los procesos de transporte/remoción de depósitos de A β en el espacio extracelular mediante la expresión de APOE y adicionalmente, los astrocitos son sumideros de A β removido y que requiere ser degradado.
- Alteración del ciclo Glutamato/GABA-Glutamina
- Regulación del metabolismo: los astrocitos regulan no solo el flujo sanguíneo, sino también el flujo de fuentes energéticas como glicógeno y lactato para las neuronas de una manera dependiente de la actividad.
- Neuroinflamación: Los astrocitos responden con señalizaciones proinflamatorias de manera diferencial dependiendo del daño y del curso de la enfermedad
- Estrés Oxidativo: Los depósitos de A β causan disregulaciones en el calcio intracelular del astrocito, que afectan el funcionamiento mitocondrial y conllevan al aumento de generación de especies reactivas de oxígeno nocivas para la estabilidad del sistema.

Los eventos más relevantes relacionados con astrocitos en contexto de EA considerados para este proyecto son:

- La síntesis que se presenta en los astrocitos del APOE que participa en la remoción de A β (Liao et al., 2017)
- Hipótesis de A β no removido que genera señalizaciones de excitotoxicidad en contexto de EA (Esposito et al., 2013).
- Eficiencia de los astrocitos en la remoción de Glutamato de la hendidura sináptica para disminuir probabilidad de excitotoxicidad (Simpson et al., 2010; Verkhratsky et al., 2010).

De manera interesante los cambios en los astrocitos aparecen de manera temprana en el desarrollo de EA y de manera más prominente en regiones específicas del cerebro conocidas como las más susceptibles y vulnerables a la enfermedad (Matias et al., 2019).

1.3.1 Astrogliopatología: astrogliosis reactiva y astrocitopatía: dishomeóstasis vs inflamación

Se puede hipotetizar entonces que la patología de los astrocitos es importante en la progresión de lesiones tipo EA y en el desarrollo de daño cognitivo. Esto puede ser a través de la producción de

sustancias patogénicas y/o por la pérdida normal de funciones (Simpson et al., 2010). Se pueden identificar dos enfoques en la evolución del concepto de astrogliopatología.

El primero, la percepción de la astrogliosis reactiva como una remodelación puramente patológica con un resultado negativo, ha sido reemplazado por un concepto de reactividad como un proceso defensivo que representa un amplio espectro de cambios celulares para diferentes contextos patológicos. La respuesta astrogliótica por lo tanto resulta en varios fenotipos optimizados para la neuroprotección y el soporte trófico de neuronas estresadas, contribuye a la formación de la cicatriz glial que aísla el área de daño del resto del SNC, facilita la reconstrucción de la barrera hematoencefálica comprometida y es indispensable para la regeneración post lesión. El resultado adaptativo de la astrogliosis reactiva es usualmente benéfico, y la supresión de la reactividad astrogliar incrementa la vulnerabilidad neuronal, exagera el desarrollo patológico y altera la regeneración. En ciertas circunstancias, sin embargo, los cambios glióticos pueden asumir proporciones deletéreas y pueden contribuir a la neurotoxicidad (Rodríguez-Arellano et al., 2016).

En segundo lugar, numerosas formas de neuropatología están asociadas con astrocitopatía aguda o crónica, manifestada en una pérdida o remodelación de funciones básicas astrogliales. Una pérdida de la función astrogliar, como por ejemplo una falla en la regulación de la concentración de glutamato en los intersticios, toma un rol de liderazgo en desórdenes asociados con la muerte por excitotoxicidad neuronal, como por ejemplo la encefalopatía de Wernicke o la Esclerosis lateral amiotrófica (Rodríguez-Arellano et al., 2016).

En conclusión, la reactividad glial (con procesos hipertróficos y atróficos) y la remodelación patológica solas o en combinación, son componentes necesarios de toda enfermedad neurológica, y por lo tanto los posteriores hallazgos en astrogliopatología, pueden ser críticos para el avance de nuevas estrategias terapéuticas (Rodríguez-Arellano et al., 2016).

1.3.2 Atrofia en Astrocitos: efectos sobre transportadores de Glutamato y remoción de A β

Estudios subsecuentes han mostrado que los astrocitos sufren alteraciones complejas morfológicas, transcripcionales y funcionales en EA. Morfológicamente los astrocitos pueden ser atróficos o hipertróficos dependiendo de la etapa de la enfermedad o de la proximidad a los depósitos de placas de A β (PAs).

La atrofia de astrocitos ha sido observada durante las etapas tempranas de la patología EA, así como en astrocitos no asociados a placas a lo largo de la progresión de la enfermedad (Matias et al., 2019).

En contraste, varias evidencias han demostrado que durante las etapas tardías de EA, los astrocitos circundantes a las placas se convierten en hipertróficos y producen niveles incrementados de GFAP (Matias et al., 2019). Aún se mantiene sin determinar el significado funcional de la hipertrofia de los astrocitos y de la sobreproducción de GFAP en las etapas finales de EA (Rodríguez-Arellano et al., 2016).

El desarrollo de la atrofia astrogliol difiere entre regiones del cerebro a lo largo de la edad (Rodríguez-Arellano et al., 2016). Esta atrofia refleja un decrecimiento en sus dominios territoriales y muy probablemente indica una reducción en la cobertura astrogliol de neuronas y sinapsis localizadas en esos dominios. (Rodríguez-Arellano et al., 2016).

1.3.3 Disfunción de Transportadores de glutamato en EA

Uno de los efectos fisiológicos de los cambios morfológicos en los astrocitos, independientemente de que sea atróficos o hipertróficos, es la localización membranal y física dentro del SNC de proteínas que son responsables del proceso homeostático. Específicamente, se ha encontrado que en astrocitos atróficos hay una disminución en la expresión de transportadores y en la remoción de glutamato (Verkhatsky et al., 2010).

Varios estudios han demostrado que la modificación en la expresión y/o localización de EAAT2 resulta en un cambio en la retoma de Glutamato por los atrocitos in vitro. En un estudio en particular se reportó una tendencia a la reducción de la expresión de EAAT2 asociada con el aumento de la patología EA y sugieren que los astrocitos pierden su capacidad neuroprotectora y contribuyen al daño neuronal en procesos neurodegenerativos relacionados con la edad (Simpson et al., 2010). Con esto se hipotetiza que los astrocitos reactivos (atróficos o hipertróficos) en algún momento pierden la expresión de EAAT2 con la resultante pérdida de su función fisiológica (Simpson et al., 2010).

1.4 Dinámica e interacciones entre APOE, A β y LRP: objetivo remoción de A β del SNC

Una de las vías más reconocidas para la remoción de A β del parénquima cerebral es la vía en la que participan APOE (Apolipoproteína E), ABCA1 (del inglés ATP-Binding Cassette 1) y los receptores de la familia LDL (del inglés Low Density Lipoprotein). El mecanismo consiste en que los complejos lipoproteicos que contienen APOE, y que son lipidados por ABCA1, encapsulan y transportan A β desde el espacio extracelular hasta los receptores de la familia LDL, que están presentes en las diferentes células del SNC y en las células epiteliales (Figura 1-8). Estos receptores activados por el ligando APOE, ejecutan procesos de endocitosis para la degradación de A β ya sea por procesos lisosomales o por transporte fuera de la barrera (Liao et al., 2017).

Tanto ABCA1 como APOE son regulados por receptores nucleares (RN) que aumentan su expresión o su capacidad de lipidización, lo que redundaría en ambos casos en un aumento en la eficiencia de la remoción de A β , por lo tanto los mecanismos que aumentan la expresión de ABCA1 y/o de APOE a través de agonistas de los RN han sido estudiados ampliamente como alternativas terapéuticas en contextos de EA (Báez-Becerra et al., 2018; Liao et al., 2017; Sandoval-Hernández et al., 2015, 2016)

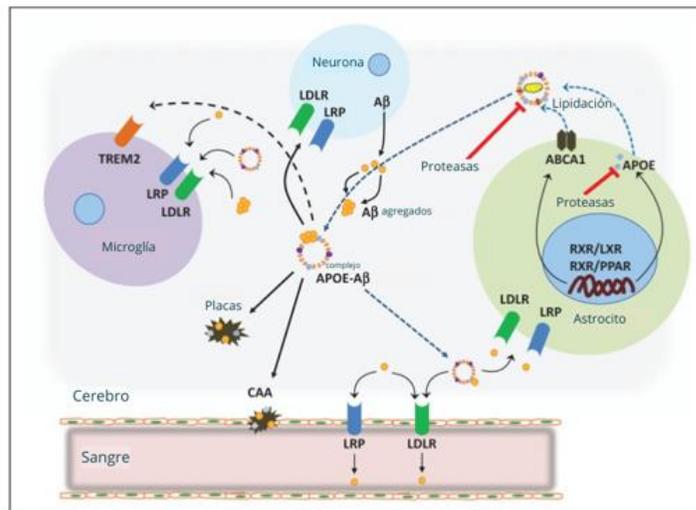


Figura 1-8: Mecanismo de remoción de A β mediado por APOE. Modificado de (Liao et al., 2017)

APOE es expresado principalmente por astrocitos y es regulado por receptores nucleares RxR, LxR y PPAR. APOE Lipidado por ABCA1 se une a A β . El complejo lipoproteico es transportado a neuronas, astrocitos, microglía y barrera hematoencefálica para ser removido por diferentes vías. Una de ellas es la degradación enzimática posterior a la endocitosis mediada por receptor-ligando (receptores de la familia LRP) tanto para transporte fuera de la barrera hematoencefálica como a células gliales.

1.4.1 Receptores Nucleares, agonistas y regulación de la expresión de APOE

Los RN son una familia de factores de transcripción de unión al DNA que son modulados por un ligando de unión y que pueden ser activados o reprimidos a través de múltiples mecanismos que incluyen la transactivación y la transrepresión como se muestra en la Figura 1-9 y Figura 1-10 (Hiebl et al., 2018; Muñoz-Cabrera et al., 2021).

En el genoma humano se conocen al menos 48 receptores nucleares que se clasifican en tres subclases dependiendo del tipo de ligando de unión: (1) Receptores clásicos esteroides; (2) receptores huérfanos, que no tienen un ligando natural conocido y en algunas ocasiones funciona de una manera independiente de ligando; y (3) Receptores huérfanos adoptados o receptores no esteroidales, que fueron primero identificados como huérfanos, y posteriormente se les identificó un ligando. Los miembros de la tercera subclase incluyen receptores de ácido retinoico (RAR α , β , γ), Receptores retinoide X (RXR α , β , γ) receptores de hormona tiroide (TR α , β), receptor de vitamina D (VDR), receptores activados-proliferadores de peroxisoma (PPAR α , β , γ) y los receptores X del hígado (LXR α , β) activados por oxisteroles. Los receptores de esta tercera subclase están particularmente involucrados en la regulación de lípidos, metabolismo energético y modulación de la actividad sináptica (Muñoz-Cabrera et al., 2021). En el caso del funcionamiento en el cerebro, los LXR y los PPAR conforman obligatoriamente heterodímeros con los RXR.

Dependiendo del mecanismo molecular usado para modular la transcripción, los NR se clasifican en tres tipos (Muñoz-Cabrera et al., 2021) :

- Tipo I: principalmente compuestos por los receptores de la subclase esteroides. Están anclados en la membrana citoplasmática y al unirse al ligando se homodimerizan y se translocan al núcleo donde se localizan en sus sitios de unión a sus elementos de respuesta.
- Tipo II: compuestos por los receptores no esteroidales. Residen en el núcleo y obligatoriamente forman heterodímeros con RXR que se unen a su elemento de respuesta. Pueden ser activados por el ligando de RXR o del otro receptor del heterodímero y se llaman receptores permisivos, o pueden ser activados solo por el ligando del receptor emparejado con RXR y se llaman entonces receptores no permisivos.
- Tipo III: formados principalmente por los receptores huérfanos y su función es similar a la del Tipo I, pero forman monómeros que reconocen secuencias específicas de DNA.

Dados los mecanismos de acción y el efecto de este tipo de receptores en la modulación de diversos procesos, se han convertido en dianas terapéuticas de diversas patologías, entre ellas la EA (Muñoz-Cabrera et al., 2021).

Específicamente los LXR en el cerebro tienen 2 isoformas llamadas LXR α y LXR β , siendo el segundo de ellos mayormente expresado en la mayoría de las células del SNC. Son activados por formas hidroxiladas de colesterol y por oxisteroles endógenos. Forman heterodímeros del tipo permisivo con RXR. En ausencia del ligando, permanece unido al heterodímero un correpresor, que es liberado y reemplazado por un coactivador cuando se une el ligando de alguno de los receptores que conforman el heterodímero y se activa la función de transcripción de genes específicos (Muñoz-Cabrera et al., 2021).

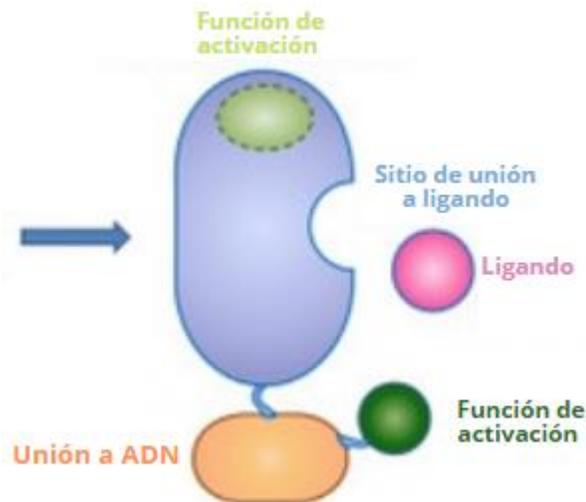


Figura 1-9: Organización estructural de los dominios generales de los receptores nucleares Tipo II. Modificado de (Hiebl et al., 2018)

Los receptores nucleares tipo II, tienen dominios bien definidos para los coactivadores/correpresores (elipse verde punteada), para el ligando (lugar de inserción de la esfera fucsia), para unión al DNA y la activación de la función promotora de la transcripción (elipse naranja y esfera verde).

En el contexto de EA, se han encontrado que los NR tipo II tienen implicaciones específicas en el desarrollo de la enfermedad como lo son (Muñoz-Cabrera et al., 2021; Hiebl et al., 2018):

- Remoción de A β : LXR regula la expresión de APOE y por lo tanto regula la remoción de A β .
- Supresión de la generación de A β
- Represión de la expresión de Agentes pro inflamatorios
- Regulación de la función neuronal

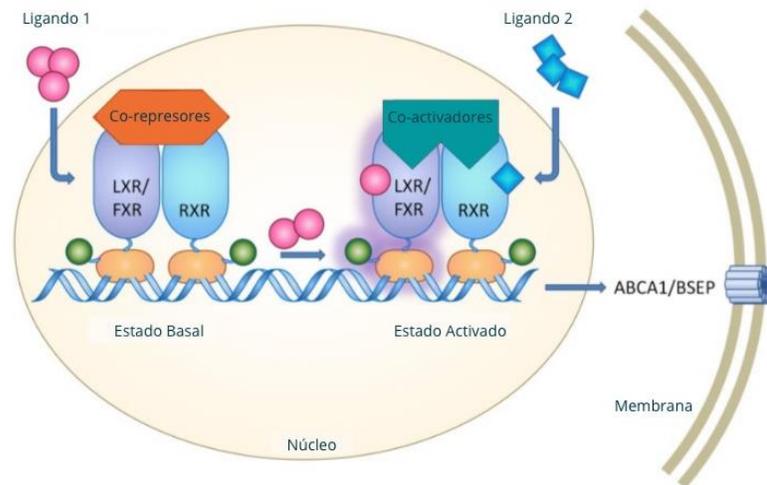


Figura 1-10: Mecanismo de activación de los NR del tipo II. Modificado de (Hiebl et al., 2018)

Receptor heterodimérico en estado basal, ubicado en núcleo celular en presencia de co-represor. Luego de que el ligando se ha insertado en el dominio definido para eso, el co-represor se libera y deja el espacio para la localización del coactivador. De esa manera se activa el receptor nuclear e inicia su función de promotor de transcripción de proteínas como ABCA1 y APOE.

Se ha probado a la molécula GW3965 de origen sintético como un agonista de receptores LXR β (Báez-Becerra et al., 2018; Leik et al., 2007; Muñoz-Cabrera et al., 2019; Namjoshi et al., 2013), por lo tanto será empleada en el proyecto como control positivo para evaluar el cambio en la expresión de proteínas debido al tratamiento con extractos. Sin embargo, este y otros agonistas sintéticos de LXR no han podido ser usados como en terapias en humanos debido a los efectos colaterales como la hiper-trigliceridemia y la esteatosis del hígado (Hiebl et al., 2018).

1.4.2 APOE

El genotipo de la APOE es el principal factor de riesgo genético, siendo con el Alelo E4 un factor de riesgo para EA y el Alelo E2 un factor de protección. En el cerebro APOE es producido predominantemente por los astrocitos. APOE facilita la transferencia de colesterol y lípidos entre las células, y sirve como ligando en la endocitosis mediada por la familia de receptores LDL. En humanos se encuentran tres isoformas (APOE2, APOE3, and APOE4) que solo difieren en dos residuos. Los estudios han demostrado que hay una diferencia importante entre las isoformas y su afinidad por A β y su remoción, demostrándose que la acumulación de A β obedece al siguiente patrón APOE4 > APOE3 > APOE2 (Liao et al., 2017).

APOE es codificada por el gen del mismo nombre en el cromosoma 19, y las diferencias entre las tres isoformas se dan por la alternancia de argininas y cisteínas en las posiciones 112 y 158 de la proteína (Liao et al., 2017).

APOE, además de regular la remoción de A β , tiene otras funciones (Liao et al., 2017) como:

- Regulación de la barrera hematoencefálica, del flujo cerebral de sangre y del acoplamiento neurovascular.
- Modulación de la reacción astroglíótica proinflamatoria.
- Metabolismo de lípidos y glucosa
- Regulación de la Plasticidad Sináptica
- Factor transcripcional.

APOE es lipidado por ABCA1 en la porción extracelular de la membrana de los astrocitos, conformando una partícula lipoprotéica como se muestra en la Figura 1-11 (Liao et al., 2017).



Figura 1-11: Partícula lipoprotéica y el rol en la conformación que cumple APOE. Modificado de (Z. Li et al., 2020)

APOE se localiza principalmente en la superficie de la partícula/complejo lipoprotéico, de esa manera ayuda a la estabilización de cargas y de la hidrofobicidad de los lípidos y demás contenidos del complejo. De esta manera APOE ayuda a mantener la integridad y afinidad del complejo para poder realizar el transporte en el espacio extracelular y la señalización para los receptores destinatarios de las cargas contenidas en el interior.

1.4.3 Familia LDLR de receptores de endocitosis activada por agonista y rol de LRP1 en la remoción de A β

La familia LDLR comprende un grupo de receptores endocíticos de la superficie celular que se unen e internalizan ligandos extracelulares que incluyen lipoproteínas, exotoxinas y complejos transportadores de lípidos. Los miembros de la familia LDLR (están estructural y funcionalmente relacionados a LDLR, el primer receptor de la familia, Figura 1-12). Las diferencias en las posiciones y el número de cada uno de los dominios crea la diversidad de receptores en esta familia, pero la

mayoría de ellos participan en la homeostasis del colesterol y el metabolismo de lípidos (Go & Mani, 2012).

Los principales receptores membranales de esta familia para APOE son LDLR y LRP1 (del inglés Lipoprotein receptor-related protein 1). De manera interesante ambos receptores interactúan con A β aun sin la presencia de APOE. A β y APOE son los únicos ligandos conocidos para LDLR, pero hay más de 30 proteínas que funcionan como ligandos para LRP1 (Liao et al., 2017).

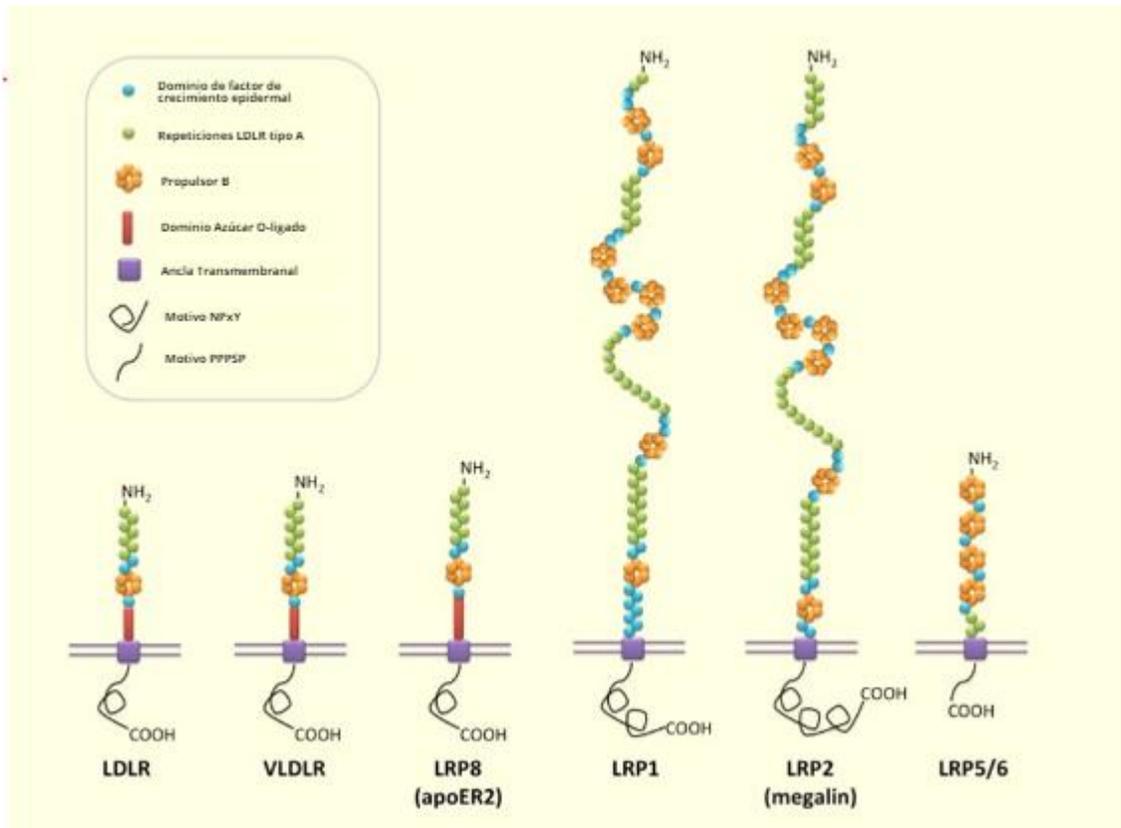


Figura 1-12: Familia de receptores LDLR. Modificado de (Go & Mani, 2012).

Diferencias estructurales entre los principales receptores de la familia LDLR. Esas diferencias confieren especificidad para la unión a ligandos y para los procesos de endocitosis. LRP1 es codificado por el gen del mismo nombre localizado en el cromosoma 12 en humanos.

LRP1 también conocido como APOER, A2-macroglobulina o CD91, está ampliamente expresado en hígado y en cerebro. LRP1 ancla ligandos como transportadores de cargas metabólicas y facilita la remoción de A β hacia la barrera hematoencefálica (Go & Mani, 2012).

1.5 Alternativas terapéuticas a receptores nucleares: Extractos vegetales

Dada la importancia de los RN en la regulación de procesos metabólicos, y que las alteraciones en esos procesos son algunas de las principales causas subyacentes a enfermedades relacionadas con síndromes metabólicos, los RN y la modulación de la activación de ellos, representan una diana atractiva para el tratamiento de enfermedades relacionadas con dishomeóstasis metabólicas.

Adicionalmente se ha encontrado que los productos naturales son una fuente interesante de ligando potenciales que han sido refinados bajo la presión evolutiva para interactuar con proteínas u otros targets biológicos (Hiebl et al., 2018).

Si bien las investigaciones con productos naturales hacia los 90's habían perdido cierta relevancia, por las desventajas que representaban estos productos (como por ejemplo la dificultad de aislar los componentes activos, la altísima sensibilidad a la variación en las concentraciones y la irregularidad en el suministro de los compuestos), estas investigaciones han ganado nueva atención en recientes años ya que los avances tecnológicos han ayudado a superar algunas de las desventajas antes identificadas y se facilitan avances promisorios para el desarrollo de medicamentos derivados de productos vegetales (Hiebl et al., 2018).

En comparación con los productos de origen sintético, los productos de origen natural presentan muchas características químicas estructurales, de biodiversidad y funcionalidad que determinan de manera contundente el resultado final terapéutico. Esas diferencias esenciales hacen que los compuestos de origen vegetal se puedan clasificar como sustancias privilegiadas capaces de interactuar con múltiples proteínas u otras dianas biológicas (Hiebl et al., 2018).

Aún si un producto natural en sí mismo no puede ser usado como medicamento terapéutico debido a problemas de suministro, costos elevados o por una biodisponibilidad desfavorable, ese producto puede ayudar a entender la interacción con una diana específica o puede ser usado como una guía para simulaciones sintéticas. Más aún, el estudio del perfil farmacológico del producto de origen vegetal puede generar conocimiento científico sobre productos usados etno-farmacológicamente (Hiebl et al., 2018).

Extractos vegetales como agonistas LXR

Dadas algunas dificultades mencionadas antes y los efectos colaterales de los agonistas sintéticos, los agonistas de origen natural para LXR se convierten en aproximaciones más recomendables para evaluar alternativas terapéuticas por su reducida potencia putativa, los menores efectos colaterales o su actividad específica o tejido-selectiva (Hiebl et al., 2018).

Algunos productos naturales que se han identificado como moduladores de LXR se mencionan a continuación (Hiebl et al., 2018):

<u>Antagonistas</u>	✓ Fucosterol	✓ Quercetina
✓ Ácido araquidónico	✓ Paxilina	✓ Sesamol
✓ Ricardina	✓ Cianidina	✓ Formononetina
C/Ricardina F	✓ Cineola	✓ Buteina
✓ Diosgenina	✓ Ácido acantónico	✓ Ácido Octulosónico
✓ Xanthohumol	✓ Policarpol	✓ Naringenina
	✓ Gorgostano	✓ Genisteina
	✓ Paeoniflorina	
<u>Agonistas</u>	✓ Taurina	

Dentro del trabajo previo del grupo de Muerte Neuronal del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, en colaboración con el grupo de productos naturales del departamento de Química de la misma universidad, (Bustos et al., 2021 trabajo de grado de maestría y artículo pendiente de publicarse) se ha probado la actividad agonista LXR- β de varios extractos de origen vegetal de diferentes especies encontradas en Colombia. Después de un screening de esta gran variedad de extractos, se ha hecho una preselección basada en la eficacia agonista del extracto, y se han focalizado pruebas en contextos de EA con 4 de ellos, *Zanthoxylum martinicense*, *Zanthoxylum caribeum*, *Zanthoxylum rothifolium* y *Nectandra reticulata*. Para este trabajo se utilizará *Zanthoxylum martinicense*.

2 Contexto

2.1 Descripción del problema

Las demencias son un grupo de enfermedades caracterizadas por el daño cognitivo progresivo que afecta las actividades diarias cotidianas. Las demencias están consideradas como unas de las afecciones más importantes en términos de salud pública de este siglo (Rezaee et al., 2021). Estas tienen impacto en las personas, los cuidadores, las familias y las sociedades. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la más prevalente de las demencias (Rezaee et al., 2021).

En la actualidad más de 50 millones de personas en todo el mundo padecen la enfermedad y se estima que para 2050 se alcance la cifra de 152 millones de pacientes (Rezaee et al., 2021).



Figura 2-1: EA en cifras.

Cifras que contextualizan el problema social y de salud pública que representa EA en EEUU, Tamaño de la población afectada, prevalencia, impacto en mortalidad, afección por género. <https://www.healthcentral.com/condition/alzheimers-disease> / <https://www.homecareassistanceanchorage.com/alzheimers-facts-and-figures-2017/>

El manejo de esta enfermedad demanda una alta inversión de recursos para su administración, algunas cifras representativas se muestran en la Figura 2-1: EA en cifras. Por ejemplo, en 2017 se invirtieron en EEUU alrededor de USD 259 billones en pacientes con demencias, principalmente EA, (con un costo promedio de USD 45,567 por año para atender un paciente y un cuidador en 2014) y se estima que en EEUU para 2014 había 5,2 millones de personas de todas las edades que sufrían EA con una prevalencia del 11% para individuos mayores de 65 años y del 32% para individuos de más de 85 años (Prada et al., 2014).

En países en vía de desarrollo, estas cifras han sido más difíciles de estimar dado que hay menos estudios relacionados con estos costos; sin embargo, se estima que en Colombia en 2009 el costo total fue de USD 2,000 millones (Prada et al., 2014) con solo 16,5% de los pacientes recibiendo tratamiento (costo de \$99 millones de pesos colombianos por los 8 años que puede durar un tratamiento). Estas estimaciones permitieron estimar que el costo mínimo directo anual de la enfermedad en 2013 fue del orden de 116 a 140 mil millones de pesos colombianos con una población de 260 mil pacientes con la enfermedad (Prada et al., 2014).

A pesar de los avances en medicina, no hay un tratamiento efectivo contra la EA. La FDA ha aprobado 5 medicamentos para manejo sintomático de EA, pero no son efectivos para prevenir el daño irreversible a las neuronas, y buscan tratar de mantener la función mental. Las terapias actuales (basadas en medicamentos reguladores de neurotransmisores como donepezilo, la rivastigmina la galantamina y la memantina) solamente aplazan de manera temporal la progresión de algunos síntomas cognitivos de EA y no cambian las causas subyacentes de la enfermedad (Rezaee et al., 2021).

Recientemente, fueron reportados dos nuevos medicamentos, (1) Aduhelm/Aducanumab (aprobado por la FDA en 2021) y (2) Lecanemab (resultados de ensayo clínico fase II publicados en Septiembre de 2022) basados en anticuerpos monoclonales para identificar y remover agregados de amiloide beta, ambos con un efecto modulador de las placas amiloideas en el cerebro (abordando la causa subyacente de la enfermedad), pero su eficacia en recuperación de memoria y procesos cognitivos, (reduciendo el déficit cognitivo hasta en un 27%) está por ser determinada durante los ensayos clínicos de fase 3. El medicamento ayuda a reducir los depósitos de amiloide en el cerebro y puede ayudar a retrasar el avance de la enfermedad de Alzheimer, aunque aún no se ha demostrado que afecte los resultados clínicos, como el avance del deterioro cognitivo o la demencia (Rezaee et al., 2021),(Prillaman, 2022).

Dado lo anterior, existe una necesidad importante de encontrar una forma de prevenir o detener la progresión de EA (Rezaee et al., 2021). En este contexto, las fuentes naturales de antioxidantes o de sustancias que tengan algún efecto en la cascada metabólica de la progresión de la EA han sido identificadas como rutas promisorias preventivas o terapéuticas para la neuroprotección (Rezaee et al., 2021). Este enfoque se planteó anteriormente en este documento en (1.5 Alternativas terapéuticas a receptores nucleares: Extractos vegetales).

2.2 Justificación

De acuerdo con las estimaciones presentadas anteriormente sobre el número de pacientes afectados por la EA, la tendencia en el incremento del número de personas afectadas por la enfermedad a nivel mundial, el aumento de la expectativa de vida promedio, el costo de tratamiento y las demás consecuencias psicosociales, no estimadas en términos ni de afectación ni de costo en recursos, se reafirma que la EA tiene y tendrá un costo alto (en todos los aspectos más allá del financiero) para toda la sociedad. En contraste, el avance en las investigaciones sobre la etiología de la enfermedad y las alternativas terapéuticas no parecen responder en la misma magnitud y velocidad que el avance de la problemática en salud pública.

A pesar de décadas de investigación, aún no hay medicamentos que puedan detener la progresión de la enfermedad, y menos, ofrecer una cura. Los resultados preclínicos han fallado de manera repetitiva al ser trasladados a tratamientos para pacientes humanos. En algunos casos se critica que las investigaciones han estado muy enfocadas en los péptidos amiloide beta (A β), por lo tanto el interés científico por explorar aproximaciones alternas está en aumento (Hodson, 2018). Estas nuevas aproximaciones incluyen el enfoque en hipótesis diferentes a la amiloidogénica y en abordajes no neurocéntricos, sino basados en otras células del sistema nervioso central; además contemplan, entre otras cosas, medicamentos que están diseñados para detener la propagación de la proteína TAU, o incluso evitar el enfoque farmacéutico de manera radical en favor de las intervenciones comportamentales que mejoran la calidad de vida (Hodson, 2018).

Como una forma de aportar información que pueda ayudar a continuar abordando el estatus de la enfermedad antes descrito, la presente investigación desarrolló una serie de experimentos que revisan el efecto del extracto de raíz de *Zanthoxylum Martinicense* sobre la expresión de proteínas asociadas a los astrocitos y con protagonismo en la fisiopatología de la EA, específicamente se

evaluaron cambios en la expresión de ApoE, los transportadores de Glutamato y los receptores LRP.

Los astrocitos son las células responsables por excelencia de la homeostasis del sistema nervioso central, con alto impacto en funciones específicas en la fisiopatología de EA, como por ejemplo la regulación de los niveles de Glutamato (mediador de la excitación neuronal) y la síntesis de tres proteínas directamente relacionadas con la remoción de amiloide beta del sistema nervioso central: APOE, ABCA1 y LRP.

APOE es una proteína sintetizada mayoritariamente en los astrocitos y que tiene un rol fundamental en la conformación de los complejos lipoproteicos que transportan lípidos en el sistema nervioso central, complejos que además median el transporte de depósitos de A β -principal causante de la EA según la hipótesis amiloidogénica- desde el espacio extracelular hacia las células encargadas de su degradación. La síntesis de APOE es regulada por la activación de los receptores nucleares LXR β . Como ya fue comprobado en resultados previos del grupo de muerte celular, el extracto propuesto para los experimentos es un agonista de los receptores LXR β .

Los transportadores de glutamato -principal neurotransmisor excitatorio dentro del sistema nervioso central- se expresan principalmente en los astrocitos, están ubicados en la membrana celular muy cerca de las sinapsis, remueven del espacio extracelular el glutamato para regular de manera directa la excitabilidad de la neurona postsináptica y evitar procesos de muerte neuronal por exceso en la entrada de calcio a la neurona. Estos procesos de excitotoxicidad están mediados por los péptidos de amiloide beta que se localizan en la hendidura sináptica principalmente. Adicionalmente la expresión de los transportadores se ve disminuida por los depósitos de amiloide beta en contextos de EA.

Por lo anterior, evaluar el efecto del tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* sobre la expresión de APOE, LRP y los transportadores de glutamato en los astrocitos puede elucidar información que permita construir en investigaciones posteriores alguna propuesta terapéutica para EA asociada a la función de los astrocitos.

El proyecto se integra en la línea de investigación del grupo de Muerte Celular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional y el grupo de Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (Quipronab) del departamento de química de la Universidad Nacional alrededor de

extractos vegetales con efectos biomoleculares sobre células del sistema nervioso central y que pueden tener un efecto neuroprotector en contextos de la EA.

3 Pregunta de investigación e Hipótesis

Habiéndose demostrado previamente en investigaciones del grupo de Muerte Celular (Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia), que el extracto *Zanthoxylum martinicense*:

- Es un agonista de LXR β (factor de transcripción de Apolipoproteína E -APOE-, como se describe en 1.4.1Receptores Nucleares, agonistas y regulación de la expresión de APOE) (Bustos et al., 2021 trabajo de grado de maestría y artículo pendiente de publicarse), y
- Aumenta la transcripción del gen LRP1 -codificador del transportador transmembranal de lipoproteínas LRP- y de los genes SLC1A2 y SLC1A3 -codificantes para los transportadores transmembranales de glutamato GLT-1 y GLAST respectivamente- (resultados de RNA-seq de lisados de hipocampo de animales tripletransgénicos tratados con extracto reportados por Muñoz-Cabrera, Jonathan como parte de trabajo de grado de doctorado en curso a Junio 2022).

Se plantean entonces las siguientes preguntas de investigación e hipótesis para este proyecto:

Pregunta de investigación:

En un modelo celular *in vitro* y en un modelo *in vivo*, **¿Cuáles son los efectos del tratamiento con un extracto de *Zanthoxylum martinicense*, sobre la expresión de las proteínas APOE, LRP, GLT-1 y GLAST en líneas celulares (astrocitoma U87) y en astrocitos de ratones 3xTg-AD?**

Hipótesis:

Hipótesis nula (HO): El tratamiento con un extracto de *Zanthoxylum martinicense* no tiene efecto en la expresión de proteínas (APOE, LRP, GLT-1 y GLAST) en cultivos celulares de línea U87-MG ni en ratones 3xTg-AD.

Hipótesis alterna (HA): El tratamiento con un extracto de *Zanthoxylum martinicense* en cultivos celulares de línea U87-MG y en un modelo animal de ratones 3xTg-AD, genera un cambio en la

expresión de las proteínas APOE, LRP, GLT-1 y GLAST, evaluada en el cultivo in vitro y en el cerebro de los animales.

La importancia de la expresión en las proteínas mencionadas, radica en que todas ellas tienen un papel relevante en la fisiopatología de la EA, y que cambios en su expresión podrían tener un efecto neuroprotector en contextos de esta enfermedad. Además, APOE, GLT-1 y GLAST son predominantemente sintetizadas y expresadas en los Astrocitos para cumplir funciones homeostáticas en el sistema nervioso central.

La hipótesis le apunta entonces a poder desarrollar posteriormente un modelo, basado en el rol de estas proteínas dentro de la teoría de excitotoxicidad para EA, que se desarrollará en el marco teórico de este documento (Hiperexcitabilidad neuronal como hipótesis en EA: rol de los astrocitos).

Como se describe más adelante en la metodología y el diseño experimental, en el proyecto se desarrollarán ensayos en líneas celulares de U87MG y en ratones 3xTg-AD, que permitan identificar posibles efectos del extracto de *Zanthoxylum martinicense* sobre la expresión de las proteínas específicas.

4 Objetivos

4.1 General

Evaluar el efecto del tratamiento del extracto de *Zanthoxylum martinicense* (con función agonista LXR) sobre la expresión de proteínas en astrocitos en un modelo *in vivo* de EA y en un modelo *in vitro* de línea celular.

4.2 Específicos

- Determinar el efecto del tratamiento con extracto de *Zanthoxylum martinicense*, sobre la expresión de las proteínas APOE, LRP, GLT-1 y GLAST en un modelo *in vitro* de astrocitos (Línea U87 MG).
- Evaluar el efecto del tratamiento con un extracto de *Zanthoxylum martinicense* sobre la expresión de las proteínas astrocitarias GLT-1 y GLAST en cerebros de ratones (3xTg-AD)

5 Metodología

Para el modelo de astrocitos *in vitro* se usaron cultivos de la línea celular U87-MG (astrocitos inmortalizados provenientes de un glioblastoma de una mujer de 44 años). Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos en una concentración de 300 mil células por pozo. Las células fueron tratadas en el día 1 después del establecimiento del cultivo.

Mediante un análisis de viabilidad mitocondrial por MTT, se determinó la IC₅₀ para GW3965 (un agonista sintético de LXR β y para el extracto, obteniéndose como resultado concentraciones de trabajo de 10 μ M y 50 μ g/ml respectivamente. 24 horas después de aplicados los tratamientos, se hizo la fijación de las células y la extracción de la proteína para los análisis de inmunocitoquímica (ICQ) con n=9 y de Western blotting (WB) con n=3. Se utilizaron los siguientes anticuerpos para cada una de las proteínas evaluadas: APOE: ab183597, LRP: ab92544, GLT-1 :3838S y GLAST: ab181036.

Para el modelo *in vivo* se usaron animales 3xTg-AD de 18 meses de edad que fueron tratados por 90 días con dos dosis del extracto ZM₅₀ y ZM₁₀₀ (50 y 100 mg de extracto/kg de peso del animal respectivamente y con un vehículo como control, una vez al día) administrada por vía oral directamente al estómago. Luego de terminado el tratamiento se corrieron pruebas comportamentales y se hizo la disección de los cerebros para obtener rodajas de 50 μ de espesor para los análisis de inmunohistoquímica (IHQ) con un n= 10, y proteína del hipocampo para los análisis de WB n=3. Se usaron los mismos anticuerpos relacionados en el párrafo anterior.

El último modelo utilizado, fue el de cultivo primario de astrocitos de hipocampo de ratón. Los animales P1 se sacrificaron y disecaron para obtener tejido del hipocampo a partir del cual se estableció un cultivo primario de astrocitos. Los astrocitos se mantuvieron en las mismas condiciones de medio de cultivo y atmósfera que las descritas antes para las U87-MG y fueron tratados en el día 20 de cultivo con GW3965 y con el extracto en concentraciones de 5 μ M y 50

$\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente. Un día después del tratamiento, se hizo la extracción de la proteína para los análisis de WB respectivos. Se usaron los mismos anticuerpos que para las U87-MG.

5.1 Modelo Experimental

El desarrollo del proyecto se apoya en el uso de dos modelos: 1) cultivo celular de línea U87MG (en adelante llamado modelo *in vitro*); y 2) ratones triple transgénicos 3xTg-AD (en adelante llamado modelo *in vivo*). El uso de los modelos responde a una estrategia de escalado, donde los resultados conseguidos en el modelo menos complejo *in vitro*, son considerados para abordar luego los hallazgos encontrados en el modelo más complejo *in vivo*.

5.1.1 Descripción del Modelo *in vitro*

Se hicieron cultivos celulares de la línea U87MG, de origen astrocitoma humano, y que es frecuentemente usada en los laboratorios para aproximarse a predecir efectos de tratamientos sobre los astrocitos de pacientes humanos o de animales.

Luego de establecidos los cultivos se definieron las dosis adecuadas para tratamiento con el extracto de *Z. martinicense* y con GW3965, se trataron los cultivos por 24 hr a las dosis elegidas y finalmente se evaluaron por técnicas de inmunocitoquímica y Western Blot (Figura 5-1), los cambios en la expresión de las proteínas de interés, mayoritariamente expresadas en Astrocitos. Se usó como control positivo a GW3965, por ser un fármaco con función agonista LXR β probada.

Proteínas evaluadas: APOE, LRP, GLT-1 y GLAST

Técnicas usadas: Citotoxicidad por MTT (MTT), Inmunocitoquímica (ICQ) y Western Blot (WB)

Objetivos del modelo

Inferir un efecto agonista LXR β del extracto de *Z. martinicense* en células derivadas de astrocitoma humano a través de la cuantificación del cambio en la expresión de APOE en este tipo de células

Evaluar expresión de transportadores de Glutamato y receptores LRP en líneas derivadas de astrocitoma humano, influenciada por agonistas de LXR β (extracto y GW3965) independiente de otras señalizaciones (Por ejemplo, independiente de señalización de la vía Notch entre astrocitos y células endoteliales)

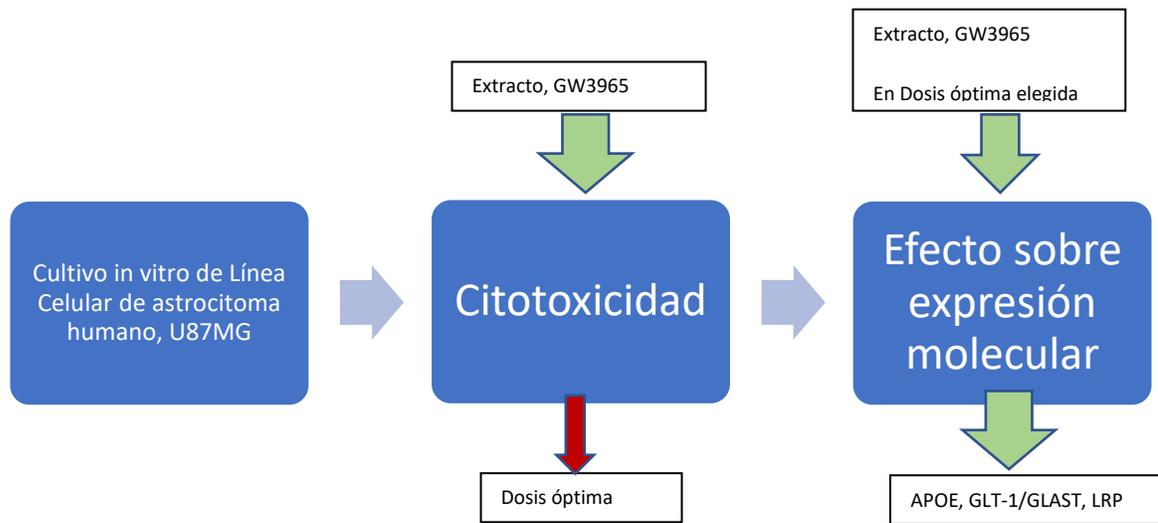


Figura 5-1: Modelo Invitro

Los tratamientos son puestos dentro del medio de cultivo de las células en la concentración y tiempos definidos. Luego de finalizado el tratamiento se hace el proceso de fijación de células para IHC o extracción de proteína para WB.

Este mismo modelo se usó para los astrocitos de cultivo primario de hipocampo de cerebro, empleando las mismas dosis que se encontraron óptimas para la línea U87-MG

5.1.2 Descripción del Modelo in vivo

El ratón triple transgénico de EA (3xTg-AD) empleado como modelo para la investigación molecular de la enfermedad presenta modificaciones neuropatológicas, sinápticas y bioquímicas ampliamente caracterizadas; específicamente, tres mutaciones: APPSwe, TAU P301L, y PS1M146V, (mutaciones de APP, TAU y PS1 respectivamente). Por tal motivo, este roedor manifiesta -a partir de los 4 meses- una disfunción sináptica y deterioro cognitivo asociado con la presencia de A β intraneuronal. Además, sus rasgos patológicos se caracterizan por la presencia de un depósito A β -dependiente de la edad y región específica-; un transgén humano TAU; y, epítomos de TAU hiperfosforilada localizados en el componente neurítico de la placa; sin embargo, no desarrollan ovillos neurofibrilares. En consecuencia, el conjunto de eventos ocasiona una insuficiencia en procesos de aprendizaje y de memoria espacial en roedores a partir de los 6 meses de edad.

Se trataron dos grupos de animales 3x Tg-AD, suministrando el extracto *Zanthoxylum martinicense* por vía oral en dos dosis diferentes (50 y 100 mg de extracto/kg de peso del animal respectivamente), una vez por día durante 90 días (Figura 5-2). Adicionalmente se trató un tercer

grupo con un vehículo (DMSO) que se usó como control en la variación de la expresión de proteínas por el efecto del extracto.

Las dosis a suministrar (50 y 100 mg de extracto/gr de peso del animal) fueron tomadas como referencia de trabajos anteriores realizados en el grupo con extractos etanólicos crudos similares (Ruiz, 2021; Caicedo, 2021) en los que se ha encontrado que estas dosis en frecuencias diarias por 90 días no tienen un efecto adverso en el animal y que, a su vez, han demostrado eficacia en el tratamiento.

Al final del tratamiento, se sacrificaron los animales para diseccionar el cerebro y usarlo en análisis inmunohistoquímica y Western Blot en hipocampo (y corteza en el caso de Inmunohistoquímica) para las proteínas de interés.

Al igual que en el modelo in vitro, se evaluaron los cambios en la expresión de las proteínas de interés, expresadas mayoritariamente en Astrocitos, con un enfoque en contexto de EA.

Se enfocó la evaluación en hipocampo de los cerebros de ratón, dado que es una de las regiones más afectadas en el desarrollo de la EA y un impacto protector en esta región, debería provocar un cambio en el curso de la enfermedad.

Proteínas evaluadas: APOE, LRP, GLT-1 y GLAST

Técnicas usadas: Inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot (WB)

Objetivos del modelo

Inferir un efecto agonista LXR β del extracto en un modelo in vivo de ratón a través de la cuantificación del cambio en la expresión de APOE en el hipocampo

Evaluar el efecto del extracto sobre la expresión de las proteínas LRP, GLT-1 y GLAST en el hipocampo de ratón y a partir de ello proponer posibles efectos neuroprotectores del extracto en contextos de EA.

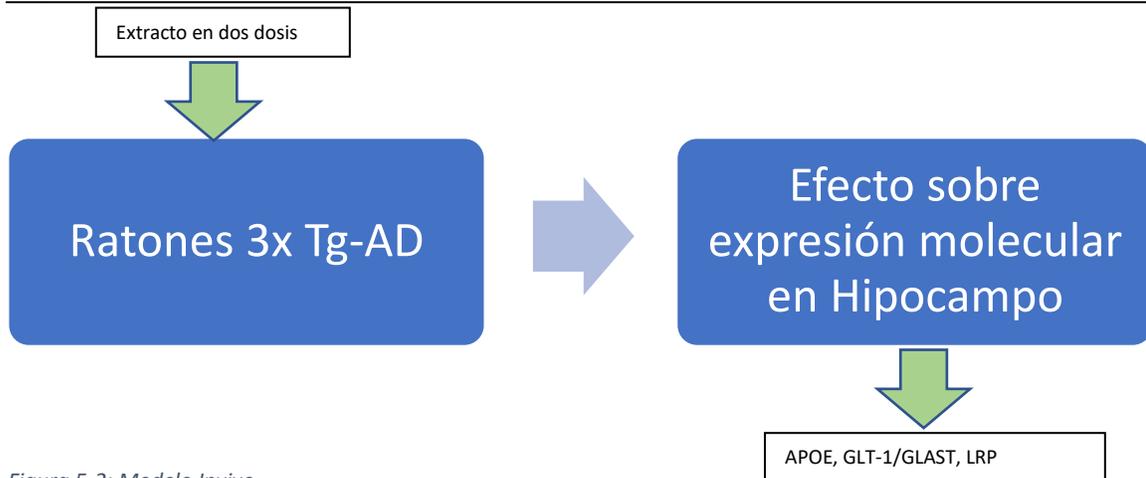


Figura 5-2: Modelo In vivo

Tratamiento a los animales por vía oral, sacrificio y disección de cerebros para IHQ o WB de proteína extraída de hipocampo. En el Anexo I sobre consideraciones éticas y de bioseguridad se describen las condiciones en las que se mantuvieron los animales.

Se usaron 45 ratones 3xTg-AD de 18 meses de edad. La colonia de animales triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), provino de The Institute for Brain Aging and Dementia, Center for the Neurobiology of Learning and Memory, cuyo Co-Director es el Dr. Frank Laferla. Actualmente la colonia de 3xTg-AD se cría de manera endogámica, y se expande para experimentación en condiciones microbiológicamente controladas en el bioterio de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia. Los animales que fueron enviados por el Grupo de Neurociencias de la Universidad de Antioquia, se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia en un microaislador, en cajas-hogar con agua y alimento ad libitum, y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, cuyas luces se encendían a las 7:00 a.m. (Muñoz-Cabrera, 2015). Todos los animales fueron tratados, se usaron 12 animales de cada tratamiento para los análisis por Inmunohistoquímica y 3 animales para la lisis de cerebros para Western blot.

En el apartado Anexo B Consideraciones éticas y de bioseguridad, se amplían los aspectos a tener en cuenta desde el punto de vista ético y de bioseguridad de los animales.

5.2 Diseño experimental

5.2.1 Expresión de APOE, LRP, GLAST y GLT1 in vitro

1. Establecimiento del cultivo en placa de pozos de 6X4 para Inmunicitoquímica (ICQ) y tres cajas de 3x2 para análisis Western Blot (WB).
2. Aplicación de Vehículo (en este caso el vehículo es medio de cultivo celular DMEM)+ Extracto+GW3965 en cada una de las concentraciones definidas y 3 réplicas por tratamiento para un total de 9 pozos para ICQ y 3 cajas de Petri para extracción de proteína para WB.
3. Incubación
4. ICQ para GLAST, APOE, LRP y GLT-1
5. Lectura por epifluorescencia para evaluación de expresión de proteínas, (GLAST, GLT-1, APOE y LRP). Cuantificación de proteínas por fluorescencia.
6. Lisis de las células para extracción de proteínas
7. Western Blot de proteínas extraídas del cultivo in vitro
8. Cuantificación de expresión de proteínas por densitometría

Expresión de APOE, GLT-1, GLAST LRP

		1	2	3
1	Control R1-R2-R3			
2	Extracto R1-R2-R3			
3	GW3965 R1-R2-R3			

Tabla 5-1: Diseño experimental para evaluar expresión de proteínas en modelo in vitro

Registro de Variables y resultados in vitro:

- Concentración de extractos y de GW
- Intensidad de fluorescencia de los anticuerpos de cada proteína para la ICQ. Con n=9 (3 imágenes por cada una de las tres réplicas en vidrio) para cada tratamiento
- Intensidad de fluorescencia membranas Western Blot. Con n=3, tres réplicas por cada tratamiento.

Este mismo diseño se usó para los astrocitos de cultivo primario de hipocampo de cerebro, empleando las mismas dosis que se encontraron óptimas para la línea U87-MG

5.2.2 Expresión de APOE, LRP, GLAST y GLT1 in vivo

1. Tratamiento a los animales con el extracto, 12 animales por grupo experimental (5 se usarán para Inmunohistoquímica -IHQ- y 5 para extracción de proteínas para análisis por WB)
2. Disección de cerebros
3. Corte de cerebros y preservación
4. IHQ de los cortes de cerebro para APOE, LRP, GLAST y GLT-1
5. Lectura por epifluorescencia para evaluación de expresión de proteínas, (APOE, LRP, GLAST y GLT-1). Cuantificación de proteínas por fluorescencia
6. Extracción de proteína de los cerebros de animales tratados
7. Western Blot de proteínas obtenidas del cerebro.
8. Cuantificación de expresión de proteínas por densitometría

Registro variables y resultados *in vivo*

- Dosis de extractos
- Intensidad de fluorescencia de los anticuerpos de cada proteína para la IHQ. Con n= 12 para cada tratamiento
- Intensidad de fluorescencia membranas Western Blot. Con n=3 para cada tratamiento.

Ratones 3xTg-AD		IHQ	WB
1	Vehículo		
2	Z. martinicense [50mg/kg/día]		
3	Z. martinicense [100mg/kg/día]		

Tabla 5-2: Diseño experimental para evaluar expresión de proteínas en modelo *in vivo*

5.3 Métodos

5.3.1 Cultivo in vitro de línea U87-MG

Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10% FBS, Penicilina 1% y estreptomina al 1% incubadas a 35C en una atmosfera al 5% de CO₂ (Park et al., 2020). Se utilizó el mismo medio de cultivo para los astrocitos de cultivo primario de hipocampo de ratón.

5.3.2 Citotoxicidad (viabilidad celular)(Galland et al., 2019; Park et al., 2020)

Se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de absorbancia colorimétrica con MTT. Se establecieron cultivos de 5x10⁴ células por pozo en placas de 96 pozos. Se adicionó, extracto y GW3965, se dejaron incubar por 48 hr. Las células se incubaron a 37C durante una hora con 50 µg/mL bromuro de methiltiazolildifenyl-tetrazolium (MTT). Los cristales de formazán se disolvieron en 500 µL de DMSO y las absorbancias se midieron con espectrofotometría usando un lector de microplacas a 550 nm.

5.3.3 Inmunocitoquímica de cultivos in vitro (Galland et al., 2019)

Los cultivos in vitro se fijaron por 10 minutos en una solución 4% % paraformaldehído/4% sucrosa y fueron permeabilizados con 0.1% Triton X-100 en PBS por 20 min a temperatura ambiente.

Después se bloquearon por 1 hr con albumina bovina al 2%, se incubaron durante la noche (12 hr) con anti-GLAST, anti-APOE, anti- GLT-1 y anti-LRP. Para los cultivos de línea celular los anticuerpos se incubaron en concentración de 1:250. Después se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron por 1 hr a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios específicos conjugados con Alexa Fluor 488. Los núcleos de las células fueron teñidos con 0,2 mg/mL de DAPI. Las células se analizaron mediante el microscopio de eplifluorescencia.

La expresión de proteínas se analizó mediante un microscopio Nikon Eclipse C1 (Melville, NY, Estados Unidos). Las imágenes se capturaron con un objetivo 10x. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia (intensidad) se analizó por medio del Software ImageJ y Fiji.

5.3.4 Western Blot de Cultivos in vitro (Galland et al., 2019)

Los cultivos celulares se homogenizaron en un buffer (0.0625M tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) b-mercaptoetanol, 10% (v/v) glicerol, 0.002% (w/v) azul de bromofenol) y subsecuentemente

fueron centrifugados. Cantidades iguales de proteínas totales (5 μ L) fueron electroforizadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 8 y 10% (w/v). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de PDV. Las membranas fueron incubadas por 1 hr a 4C en TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 137 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20) con albumina bovina al 5% (w/v). subsecuentemente, las membranas fueron incubadas durante la noche a 4C, con el anticuerpo adecuado en su dilución (1:500): anti- GLAST, anti-GLT-1, anti-LRP o anti-APOE. Las membranas fueron luego enjuagadas con TBS-T y expuestas por 1 hr a temperatura ambiente a anticuerpos anti-IgG peroxidasa de rábano. La carga equivalente de cada muestra fue confirmada con anti- β actina. Se analizarán las diferencias en luminiscencia cuantitativamente.

5.3.5 Disección del cerebro

Basadas en las “Normas Bioéticas Colombianas sobre el Bienestar Animal” (Ley 84 de 1989 y Resolución 8430 de 1993) y las “Pautas de Experimentos in vivo de Informes de Investigación Animal”, se hizo el sacrificio de cada roedor.

Así, el animal fue inmovilizado y anestesiado vía intraperitoneal con Xilacina 10mg/Kg y Ketamina 90mg/Kg; posteriormente, se hizo una incisión en la línea media anterior en tórax y abdomen para localizar el corazón y se realizó una perfusión inicial con jeringa sobre ventrículo izquierdo empleando una solución de Buffer fosfato 4% para exanguinación y 4% p-formaldehído en Buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) para fijación de todos los tejidos. A continuación, el tejido cerebral se extrajo y se sumergió en una solución de PFA 4% por 48h a 4°C y seguidamente, se sometió a un proceso de deshidratación en gradiente creciente de sucrosa en PB (7%, 25% y 30%). Finalmente, el tejido cerebral se cortó en secciones coronales de 50 μ m mediante un Vibratome 1000 Plus (Estados Unidos, California) y se almacenó en medio de crio preservación a -20°C para su procesamiento (Báez-Becerra et al., 2018; Muñoz-Cabrera et al., 2019).

Para la cuantificación de la proteína del lisado de cerebro, luego del sacrificio del animal por dislocación cervical, se extrajo el hipocampo y corteza para inmersión en nitrógeno líquido hasta su cuantificación. El tejido cerebral se homogeneizó en un homogeneizador (ProScientific PRO200) con 300 μ L de tampón RIPA helado (RIPA lysis buffer Santa Cruz Biotechnology ref.sc-24948) durante 20s a velocidad máxima, el cual contenía un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa. El homogeneizado se sonicó por 10s para su centrifugación a 12500g por 45min a 4°C en una microcentrífuga. La concentración de proteínas de las fracciones sobrenadantes se realizó con el kit de ensayo de proteínas para cuantificar la cantidad necesaria según el anticuerpo requerido.

5.3.6 Inmunohistoquímica de cortes de cerebro de ratón

Los cortes de cerebro fueron permeabilizados y bloqueados por 1 hr con albumina bovina al 2%, luego se incubaron por 36 hr a -4C. con anti-APOE, anti-LRP, anti-GLAST y anti- GLT-1. Para los cortes los anticuerpos se incubaron en concentración de 1:250. Después se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron por 1 hr a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios específicos conjugados con Alexa Fluor 488 o 568. Los núcleos de las células fueron teñidos con 0,2 mg/mL de DAPI. Las células se analizaron mediante el microscopio de eplifluorescencia (Báez-Becerra et al., 2018; Muñoz-Cabrera et al., 2019).

La expresión de proteínas y colocalización en estructuras hipocampales se analizó mediante un microscopio Nikon Eclipse C1 (Melville, NY, Estados Unidos). Las imágenes se capturaron con un objetivo 10x en las regiones del giro dentado, CA3, CA1, subículo, corteza somatosensorial y corteza entorrinal de cada corte. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia (área integrada) se analizó por medio del Software ImageJ y Fiji.

5.3.7 Western Blot de lisados de hipocampo (Galland et al., 2019)

Cantidades iguales de proteínas totales (5 μ l) fueron electroforizadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 8 y 10% (w/v). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de PDV. Las membranas fueron incubadas por 1 hr a 4C en TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 137 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20) con albumina bovin al 5% (w/v). Subsecuentemente, las membranas fueron incubadas durante la noche a 4C, con el anticuerpo adecuado en su dilución (1:500): anti-GLAST, anti-GLT-1, anti-LRP o anti-APOE. Las membranas fueron luego enjuagadas con TBS-T y expuestas por 1 hr a 4C a anticuerpos anti-IgG peroxidasa de rábano. La carga equivalente de cada muestra fue confirmada con anti- β actina. Se analizaron las diferencias en luminiscencia cuantitativamente.

5.3.8 Análisis de datos

Para el análisis de datos de inmunofluorescencia y cuantificación de Western Blot se usó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (para aquellos datos sin distribución normal) y ANOVA de una vía respectivamente. El análisis estadístico fue realizado con el Software GraphPad Prism versión 8.0.1 y los resultados fueron expresados como: media \pm SEM, con una significancia estadística de $p \leq 0.05$.

6 Resultados

Se trataron con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* y con la molécula GW 3965 (agonista sintético de LXR β), cultivos in vitro de la línea U87-MG (usada como modelo para astrocitos) y cultivos primarios de astrocitos de hipocampo de ratón. Adicionalmente se trataron animales 3xTg-AD con dos dosis diferentes del extracto administrada por gavage.

A partir de estos experimentos se cuantificó el cambio en la expresión de las proteínas APOE, LRP, GLT-1 y GLAST por dos técnicas diferentes (inmunohistoquímica/inmunocitoquímica y Western blotting) obteniéndose los resultados que se describen más adelante y que se resumen en la Tabla 6-1. Para el modelo in vitro los resultados del tratamiento con GW3965 y con el extracto se contrastan contra resultados de un tratamiento con un vehículo (medio de cultivo DMEM), todos en condiciones basales, es decir sin exposición a A β . En cuanto a los resultados en el modelo in vivo, los resultados de los tratamientos con el extracto se contrastan contra el resultado de un animal tratado con un vehículo (DMSO), todos en modelo de animal 3xTg-AD. No se contrasta con animales control no transgénicos porque el objetivo del experimento es medir el cambio en contextos patológicos y por lo tanto la línea base se establece con un animal con la patología.

En los modelos de cultivo celular (línea U87 y cultivo primario) siempre se usó a GW 3965 como un control positivo para la activación de LXR β , esto con el fin de evaluar si la activación de este receptor nuclear tiene algún efecto correlacionable con la expresión de las proteínas de los transportadores GLT-1 y GLAST. Adicionalmente en este modelo se pretendía evaluar la respuesta del receptor nuclear en un contexto basal para determinar la interacción libre de la variable patológica como por ejemplo la exposición a A β en contextos de EA.

Proteína	Modelo - Técnica		Total HC	Total Cx	CA1	CA3	DG	SB	EC	CSS
LRP	U87 - Inmuno									
	U87 -WB									
	Cerebros 3xTg-AD-Inmuno									
	Hipocampo 3xTg-AD - WB									
	Cultivo primario Hipocampo - WB									
ApoE	U87 - Inmuno									
	U87 -WB									
	Cerebros 3xTg-AD-Inmuno		DD	DD	DD	DD	DD			DD
	Hipocampo 3xTg-AD - WB		DD							
GLT1	U87 - Inmuno									
	U87 -WB									
	Cerebros 3xTg-AD-Inmuno					DD				
	Hipocampo 3xTg-AD - WB		DD							
	Cultivo primario Hipocampo - WB									
GLAST	U87 - Inmuno									
	U87 -WB									
	Cerebros 3xTg-AD-Inmuno		DD		DD	DD	DD	DD		
	Hipocampo 3xTg-AD - WB		DD							
	Cultivo primario Hipocampo - WB									

DD: Comportamiento dosis dependiente

Rojo: incremento en la expresión con valor p significativo

Naranja: incremento en la expresión sin valor p significativo

Gris: sin cambio en la expresión

Tabla 6-1: Resumen general de Resultados de la investigación.

Total HC y Total Cx son lisados completos de hipocampo y de corteza de cerebro de ratón 3xTg-AD respectivamente. CA1, CA3, DG (Giro Dentado), SB (Subiculum) regiones del hipocampo específicas. EC (Corteza entorrinal) Y CSS (Corteza Somato sensorial) regiones de la corteza específicas.

6.1 El tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* aumenta la expresión de APOE en las U87 y en el hipocampo de animales 3xTg-AD, probablemente como un efecto de la actividad agonista LXR-β del extracto.

Como ya fue reportado en un trabajo anterior del grupo de Muerte Celular (Bustos-Rangel, 2021) el extracto de raíz de *Zanthoxylum martinicense* tiene un efecto agonista de receptores LXRβ y por lo tanto se esperaría que el tratamiento con este extracto tuviera un efecto en la expresión de APOE, ya que: (1) APOE es una de las dianas transcripcionales de este tipo de RN; y (2) es sintetizada mayoritariamente en los astrocitos.

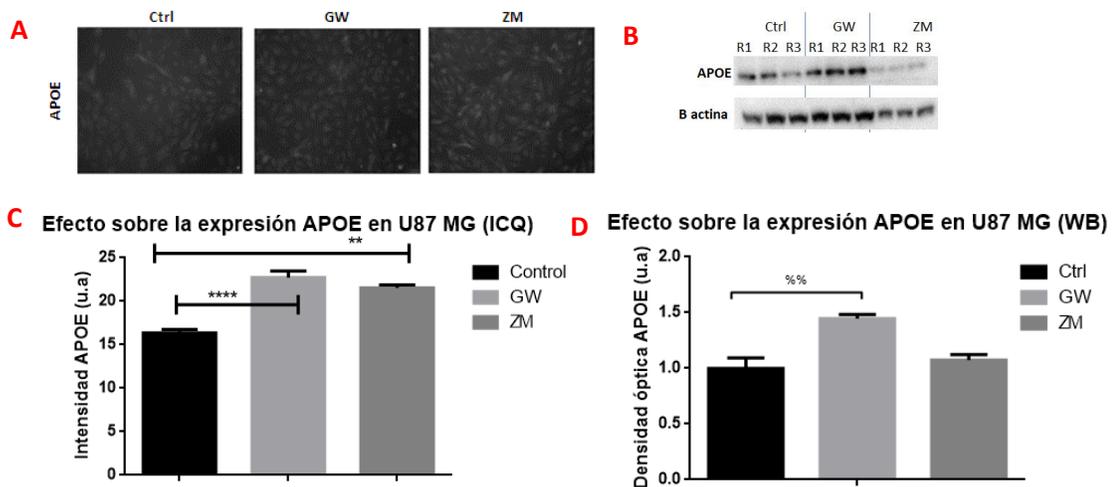


Figura 6-1: Cuantificación del efecto del extracto sobre la expresión de APOE en Cultivos de U87-MG (A) Micrografías representativas del área de inmunoreactividad positiva para APOE en cultivos de U87. (B) Imágenes representativas de los Western Blot de APOE en cultivos de U87 tratados con GW y con el extracto vegetal ZM. (C) Cuantificación de la intensidad de (A). (D) Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot en (B), donde las muestras fueron normalizadas contra la señal de β-actina y expresadas como tasa de cambio. Parámetros estadísticos de la cuantificación en: (C) Kruskal-Wallis: 18.99, ****: < 0.0001; **: 0.006; en (D) ANOVA de una sola vía, %: 0.0047.

Como se observa en la Figura 6-1 A y Figura 6-1 C, en la cuantificación del resultado de la ICQ, los cultivos de U87 tratados tanto con GW3965 (22,7 ± 0,72) como con el extracto (21,5± 0,35) presentaron un aumento la expresión de la proteína APOE con respecto al control (16,3 ± 0,41), aumentando alrededor del 40% (1,35 veces más) la cantidad de proteína en respuesta al

tratamiento (datos expresados como media \pm SEM $p < 0,006$, Ver Anexo 1 para información estadística detallada de todas las figuras).

De otro lado, el análisis del cambio en la expresión de APOE en los cultivos de U87 por WB, arrojó como resultado un aumento en la expresión tanto con GW ($1,445 \pm 0,037$) como con ZM ($1,075 \pm 0,048$) en comparación con el control ($1 \pm 0,092$). Sin embargo, solo con significancia estadística en el tratamiento con GW (ver Figura 6-1 B y Figura 6-1 D, datos expresados como media \pm SEM $p < 0,005$).

De manera consistente con lo anterior, en la cuantificación de las IHQ del modelo animal 3xTg-AD se mantuvo la tendencia al aumento de la expresión de APOE en los animales tratados con el extracto, mostrando aumento de la expresión dependiente de la dosis del extracto en todos los casos, aunque con significancia estadística solo en algunos de ellos y en algunas regiones. El aumento de la expresión en el hipocampo es más considerable que el incremento en las regiones de la corteza analizadas (ver Figura 6-2 C y Figura 6-3 C).

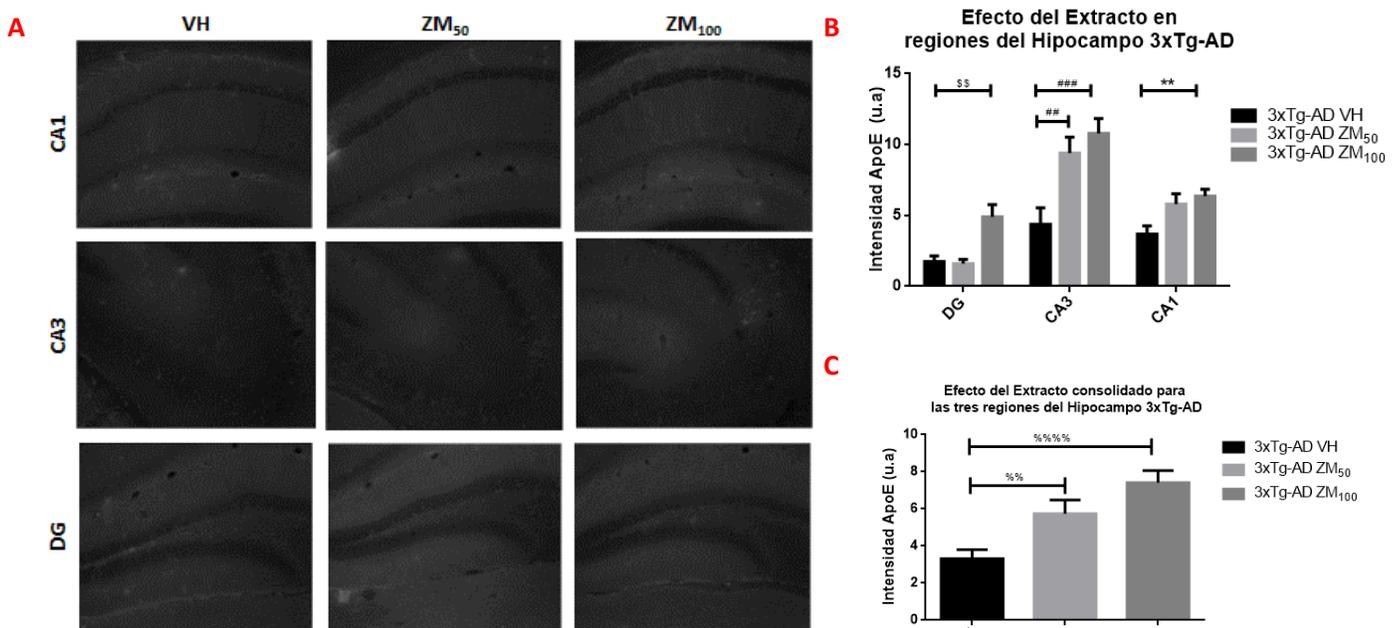


Figura 6-2: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de APOE en regiones del hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto

(A) Micrografías representativas del área de inmunoreactividad positiva para APOE en regiones del hipocampo (CA1, CA3, DG: Giro Dentado) de ratones 3xTg-EA. (B) Cuantificación de la intensidad en cada una de las regiones del hipocampo evaluadas (C) Cuantificación de la intensidad consolidada para las regiones CA1, CA3 y DG del hipocampo. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. **: 0,0032, ##: 0,01; ###: 0,0007, \$\$: 0,0035, %%%: 0,0072; %%%%: <0,0001. 3xTg-AD VH: Vehículo, 3xTg-AD ZM50: Dosis 50 mg/kg, 3xTg-AD ZM100: dosis 100mg/kg

Para las tres regiones del hipocampo analizadas, se encontró un aumento en la expresión que era mayor a medida que aumentaba la dosis del extracto suministrada a los animales. Mostrando significancia estadística en todos los casos en la comparación entre el vehículo y la mayor dosis así: en CA1: VH $3,685 \pm 0,5673$ vs ZM₁₀₀ $6,352 \pm 0,5083$, en CA3 VH $4,382 \pm 1,155$ vs ZM₁₀₀ $10,79 \pm 1,044$ y en DG: $1,754 \pm 0,3938$ vs ZM₁₀₀ $4,907 \pm 0,8645$ (ver Figura 6-2 A y Figura 6-2 B, datos expresados como media \pm SEM $p < 0,01$), con aumentos de 1,72; 2,46 y 2,79 respectivamente en cada una de las regiones evaluadas. Al evaluar la expresión en el consolidado de estas tres regiones del hipocampo, se encuentra un aumento de la expresión de la proteína dosis dependiente de la siguiente manera: VH $3,317 \pm 0,4832$ vs ZM₅₀ $5,75 \pm 0,7311$ y ZM₁₀₀ $7,425 \pm 0,6475$ (ver Figura 6-2 C, datos expresados como media \pm SEM $p < 0,007$) con un aumento en la expresión vs el vehículo de 1,7 y 2,2 para cada uno de los tratamientos respectivamente.

En el caso de las regiones evaluadas para la corteza, se ven aumentos en la expresión de APOE para las dosis más altas suministradas (ZM₁₀₀) a los animales 3xTg-AD (con aumentos de hasta un 40%). Sin embargo, en ninguno de los casos presenta significancia estadística (ver Figura 6-3 A y Figura 6-3 B y Figura 6-3 C).

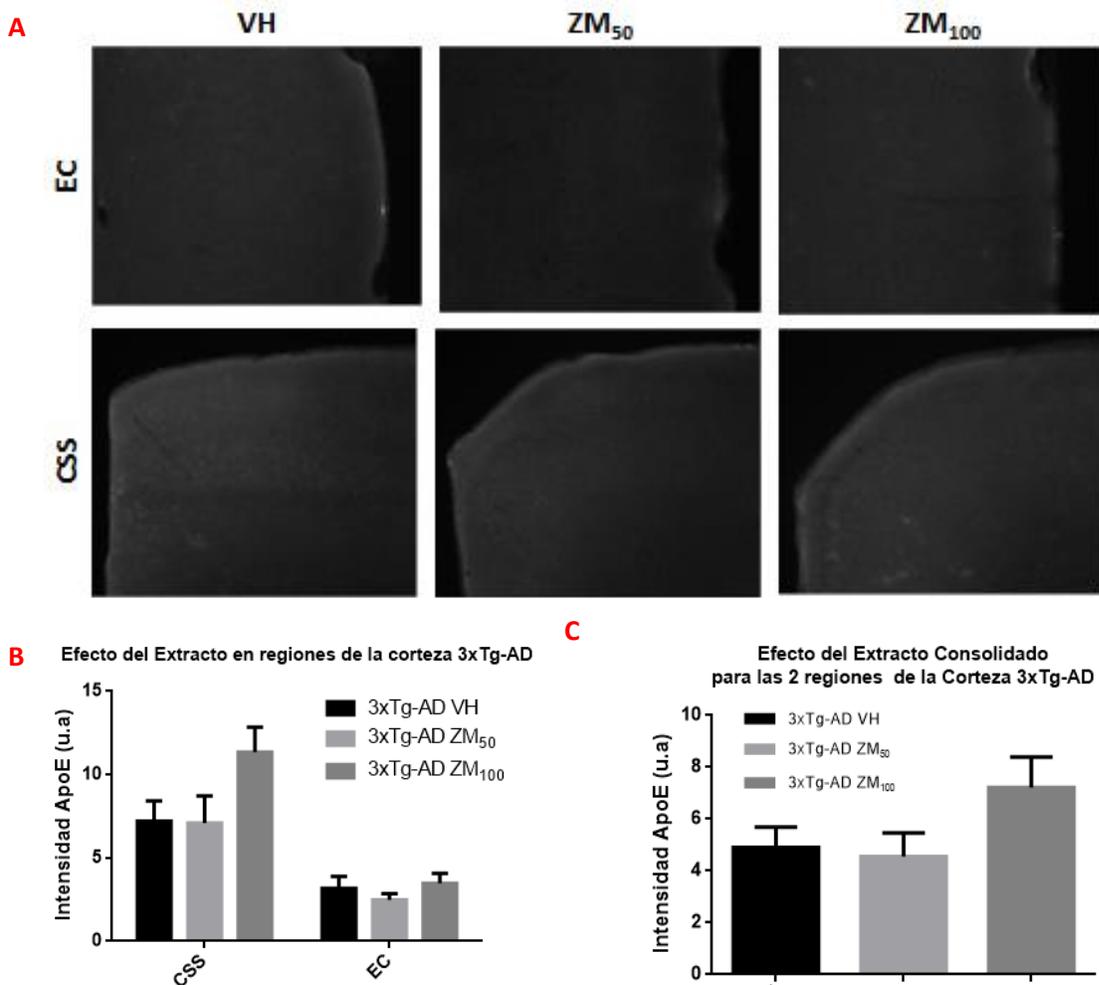


Figura 6-3: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de APOE en regiones de la corteza de animales 3xTg-AD tratados con el extracto

(A) Micrográficas representativas del área de inmunoreactividad positiva para APOE en regiones de la corteza (EC: Corteza entorrinal, CSS: Corteza somatosensorial) de ratones 3xTg-EA. (B) Cuantificación de la intensidad en cada una de las regiones de la corteza evaluadas (C) Cuantificación de la intensidad consolidada para las regiones EC y CSS de la corteza. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. 3xTg-AD VH: Vehículo, 3xTg-AD ZM₅₀: Dosis 50 mg/kg, 3xTg-AD ZM₁₀₀: dosis 100mg/kg KW: Kruskal-Wallis

Finalmente, el análisis del cambio de la expresión en la proteína en todo el hipocampo mediante WB, arrojó como resultado que hay aumentos en la expresión de APOE de manera dosis dependiente (con cambio de 1,14 y 2,72 veces para cada uno de los tratamientos respectivamente) pero con significancia estadística solo para los animales tratados con la mayor dosis (ZM₁₀₀), así: VH $1 \pm 0,2027$ vs ZM₁₀₀ $2,718 \pm 0,177$ (Figura 6-4 A y Figura 6-4 B, datos expresados como media \pm SEM $p < 0,0005$).

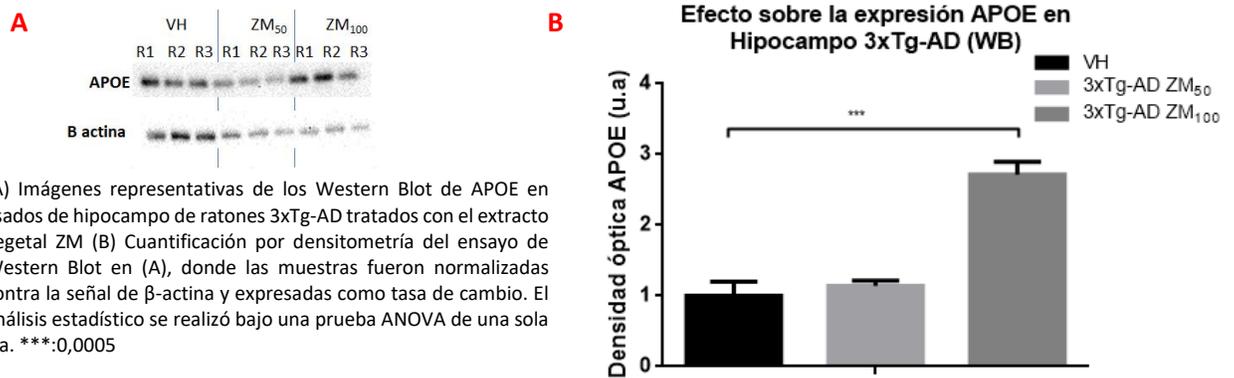


Figura 6-4: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de APOE en el hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto

Con base en los resultados anteriores, se puede decir que el tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* para los diferentes modelos y dosis, genera un aumento en la expresión de la proteína APOE, y que probablemente ese aumento está asociado a una activación de la vía transcripcional mediada por el receptor nuclear LXR β para el cual el extracto tiene una actividad agonista comprobada.

6.2 La transcripción de LRP se ve aumentada por el tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* en modelo in vivo 3xTg-AD, pero no genera un cambio en la expresión de la proteína LRP ni en cultivo de línea U-87 ni en hipocampo de animales 3xTg-AD.

Dado que en los análisis de RNA-seq realizados en el grupo (Muñoz-Cabrera 2023, tesis de grado de doctorado pendiente de publicarse) se encontró que en animales tratados con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* había un aumento transcripcional del gen responsable de la proteína LRP, se propuso en este trabajo evaluar el cambio en la expresión de esta proteína, que si bien no es exclusiva de astrocitos, si tiene un rol fundamental en la remoción de A β acumulado en el parénquima y está involucrada en el mecanismo a través del cual APOE realiza esa remoción.

Para el caso de los cultivos de U87 tratados con GW y con el extracto, no se encontraron aumentos en la expresión de la proteína que pudieran asociarse con el tratamiento. El análisis de ICQ (Figura 6-5 A y Figura 6-5 C) mostró que la expresión de la proteína no sufre ningún cambio con respecto

al control (Ctrl $24,5 \pm 0,42$, GW: $24,5 \pm 0,18$ y ZM: $24,1 \pm 0,5$ datos expresados como media \pm SEM y sin significancia estadística). El análisis de expresión por WB, incluso mostró una tendencia a la disminución en la expresión de la proteína, aunque nuevamente sin significancia estadística (Figura 6-5 B y Figura 6-5 D, Ctrl $1 \pm 0,1453$, GW: $0,6519 \pm 0,03237$ y ZM: $0,6459 \pm 0,08451$ datos expresados como media \pm SEM y sin significancia estadística).

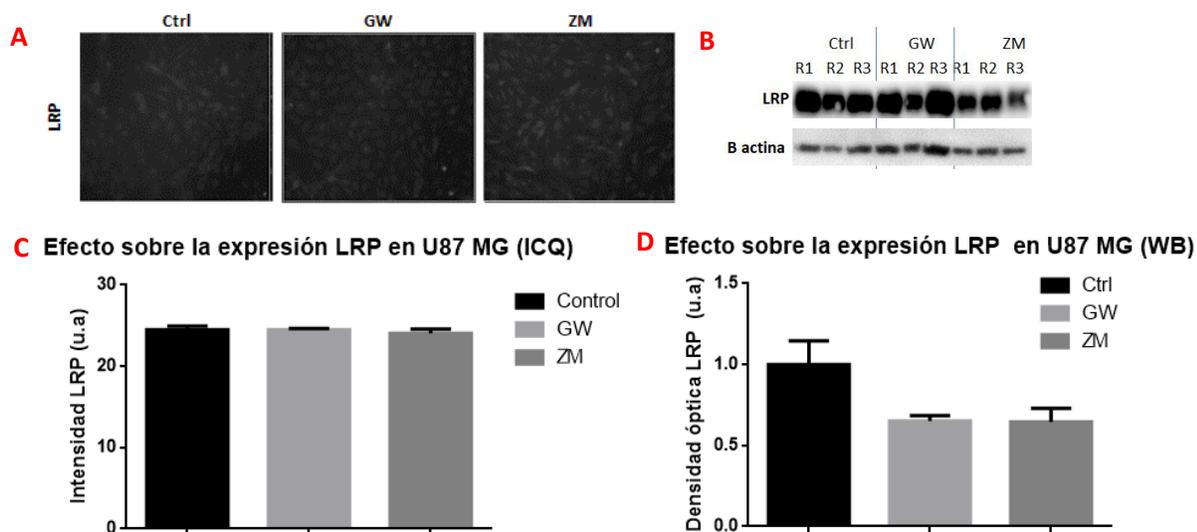


Figura 6-5: Cuantificación del efecto del extracto sobre la expresión de LRP en Cultivos de U87-MG

(A) Micrografías representativas del área de inmunoreactividad positiva para LRP en cultivos de U87. (B) Imágenes representativas de los Western Blot de LRP en cultivos de U87 tratados con GW y con el extracto vegetal ZM. (C) Cuantificación de la intensidad de (A). (D) Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot en (B), donde las muestras fueron normalizadas contra la señal de β -actina y expresadas como tasa de cambio. Parámetros estadísticos de la cuantificación en: (C) Kruskal-Wallis: 0,79; en (D) ANOVA de una sola vía.

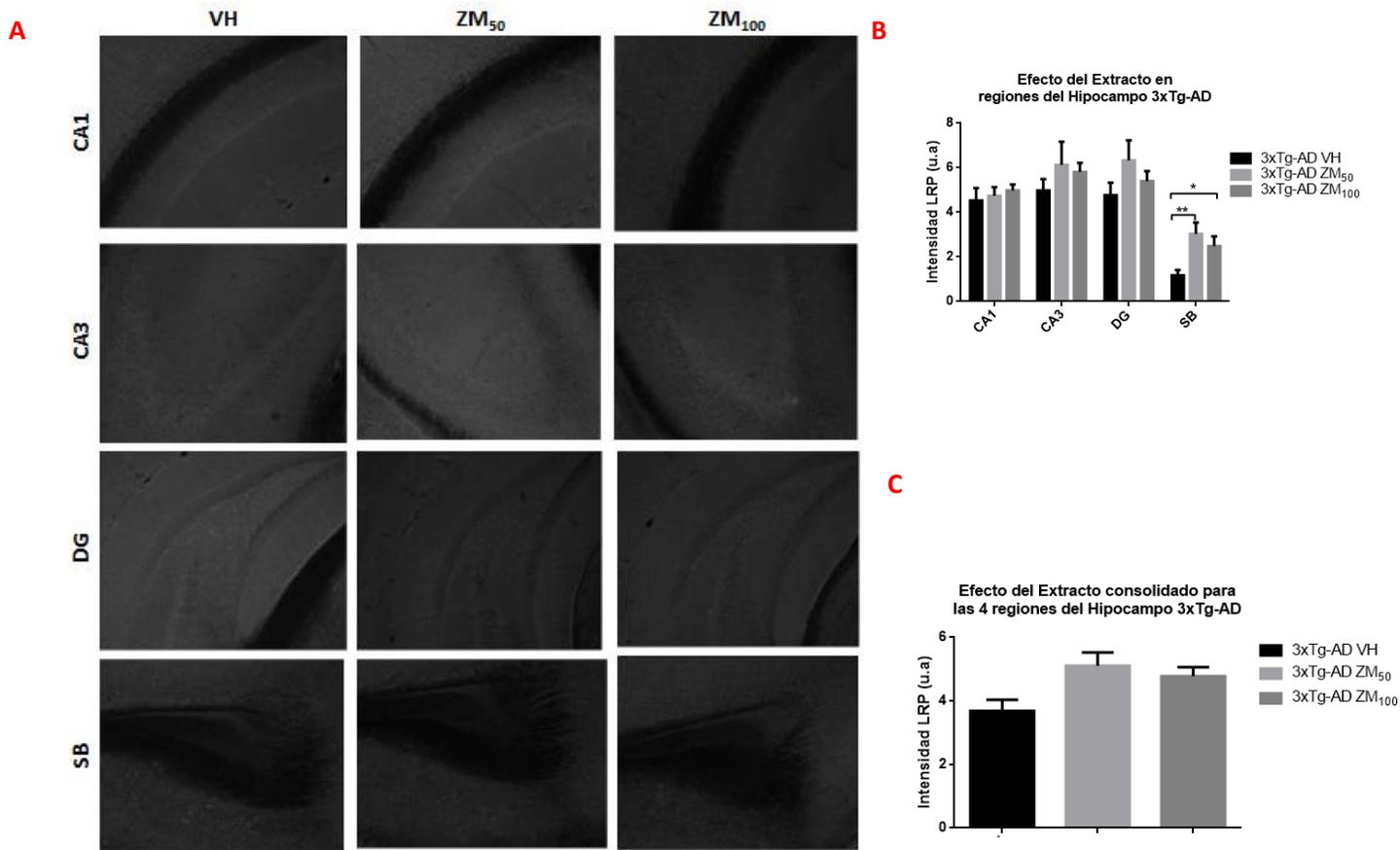


Figura 6-6: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de LRP en regiones del hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto

(A) Micrografías representativas del área de inmunoreactividad positiva para LRP en regiones del hipocampo (CA1, CA3, DG: Giro Dentado, SB: Subiculum) de ratones 3xTg-EA. (B) Cuantificación de la intensidad en cada una de las regiones del hipocampo evaluadas. (C) Cuantificación de la intensidad consolidada para las regiones CA1, CA3, Dg y SB del hipocampo. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. **: 0,0074; *: 0,037 3xTg-AD VH: Vehículo, 3xTg-AD ZM50: Dosis 50 mg/kg, 3xTg-AD ZM100: dosis 100mg/kg.

En el caso de los análisis de IHQ realizados a los cortes de los cerebros de animales 3xTg-AD tratados con vehículo y con el extracto para las regiones del hipocampo analizadas, se encuentra una tendencia al aumento en la expresión de LRP en animales tratados con el extracto que solo muestra significancia estadística y no dosis dependiente para el subiculum (Figura 6-6 A y Figura 6-6 B, VH $1,175 \pm 0,234$ vs ZM₅₀ $3,031 \pm 0,5137$ y vs ZM₁₀₀ $2,48 \pm 0,4413$, datos expresados como media \pm SEM, $p < 0,037$). En las demás regiones y en el análisis consolidado de las cuatros regiones del

hipocampo, se encuentran aumentos en la expresión de LRP que varían entre 1,04 y 1,35 veces, pero sin significancia estadística (Figura 6-6 A, Figura 6-6 B y Figura 6-6 C, Ver Anexo 1 para información estadística detallada de todas las figuras).

En contraste con lo anterior, para las regiones de la corteza analizadas no se ve ninguna tendencia al cambio de la expresión de la proteína y para todos los casos se mantiene la expresión en niveles similares a los encontrados en el vehículo (Figura 6-7 A, Figura 6-7 B y Figura 6-7 C).

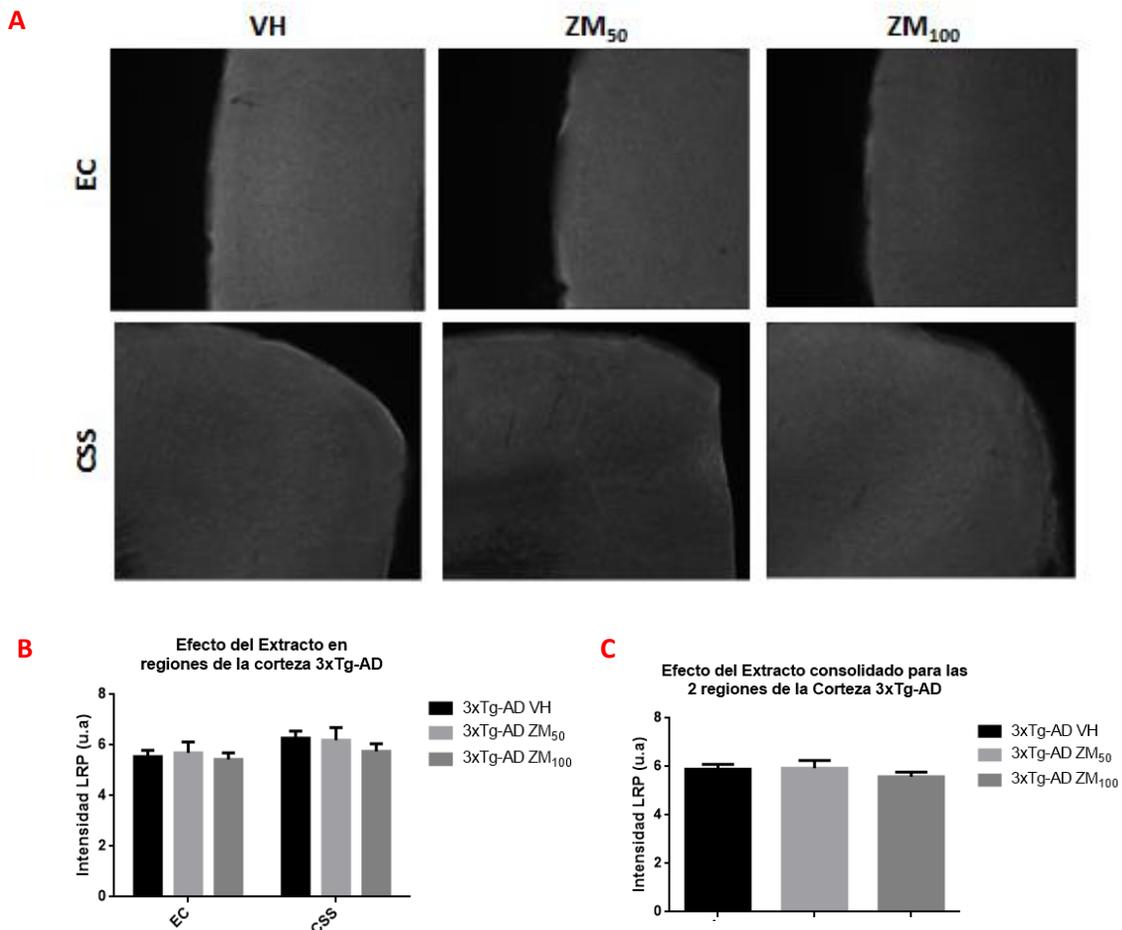
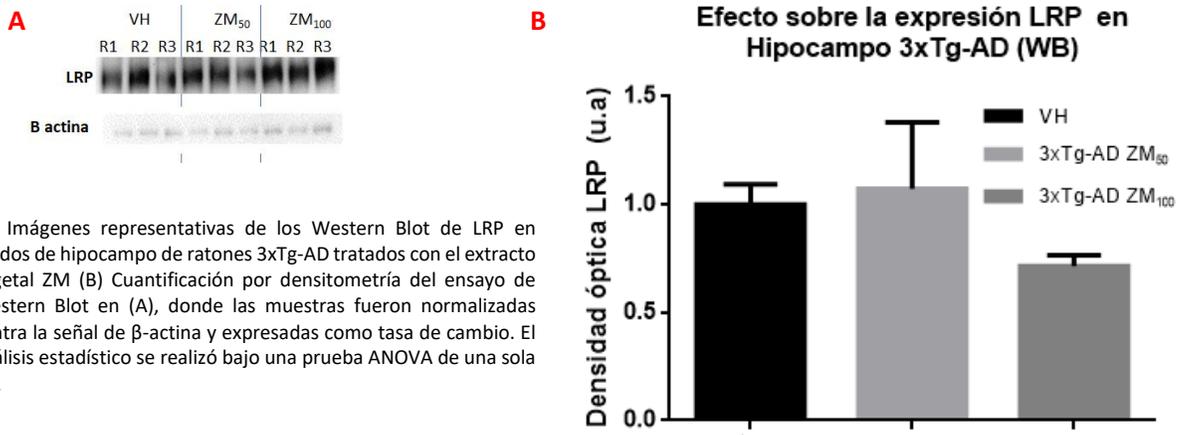


Figura 6-7: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de LRP en regiones de la corteza de animales 3xTg-AD tratados con el extracto

(A) Micrográficas representativas del área de inmunoreactividad positiva para LRP en regiones de la corteza (EC: Corteza entorrinal, CSS: Corteza somatosensorial) de ratones 3xTg-EA. (B) Cuantificación de la intensidad en cada una de las regiones de la corteza evaluadas. (C) Cuantificación de la intensidad consolidada para las regiones EC y CSS de la corteza. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. 3xTg-AD VH: Vehículo, 3xTg-AD ZM₅₀: Dosis 50 mg/kg, 3xTg-AD ZM₁₀₀: dosis 100mg/kg.

Finalmente, el análisis de la proteína para lisados de hipocampo de cerebro de ratones 3xTg-AD muestra que no hay un cambio significativo en la expresión de LRP en esta región del cerebro (Figura 6-8 A y Figura 6-8 B).



(A) Imágenes representativas de los Western Blot de LRP en lisados de hipocampo de ratones 3xTg-AD tratados con el extracto vegetal ZM (B) Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot en (A), donde las muestras fueron normalizadas contra la señal de β -actina y expresadas como tasa de cambio. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba ANOVA de una sola vía.

Figura 6-8: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de LRP en el hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto.

Los datos encontrados para la variación de LRP permiten decir que ni el extracto ni GW tienen un efecto sobre la expresión de LRP en cultivos de U87. De otro lado, si bien hay un aumento transcripcional de LRP en animales tratados con el extracto, este aumento transcripcional no se ve reflejado en cambios en la expresión de la proteína en el hipocampo ni en las regiones evaluadas de la corteza.

6.3 La expresión del transportador de glutamato astrocitario GLT-1, es incrementada después del tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* en modelo de astrocitos in vitro y en el hipocampo de animales 3xTg-AD.

El transportador de glutamato GLT-1 (EAAT2) es el principal responsable de la retoma del glutamato de la hendidura sináptica después de que el neurotransmisor ha cumplido su función al ser secretado en las vesículas del botón axonal y ser detectado por los receptores AMPA y NMDA en la postsinapsis. Este transportador se expresa de manera mayoritaria en los astrocitos, es el principal transportador (de los 5 que se han reportado desde el neurodesarrollo hasta la edad

adulto), y se expresa ampliamente desde la última etapa del desarrollo y en la edad adulta del individuo.

De la misma manera que se hizo para las otras proteínas evaluadas en este trabajo, se probó el cambio en la expresión de la proteína primero en un modelo de células de línea in vitro y luego en animales tratados con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* para evaluar la pertinencia de pensar en los cambios en este transportador como alternativa terapéutica en contextos de la EA.

En la cuantificación de la ICQ de los cultivos de U87 (Figura 6-9 A y Figura 6-9 C. Ver Anexo 1 para estadística detallada de todas las figuras) se encontró un aumento en la expresión de GLT1 en respuesta a los tratamientos con GW ($23,2 \pm 1,24$) y con el extracto ($18,8 \pm 1,31$), en comparación con el control ($12,7 \pm 0,23$). Esto significa un aumento de 1,83 y 1,85 veces la expresión de la proteína (datos expresados como media \pm SEM, $p < 0,0007$).

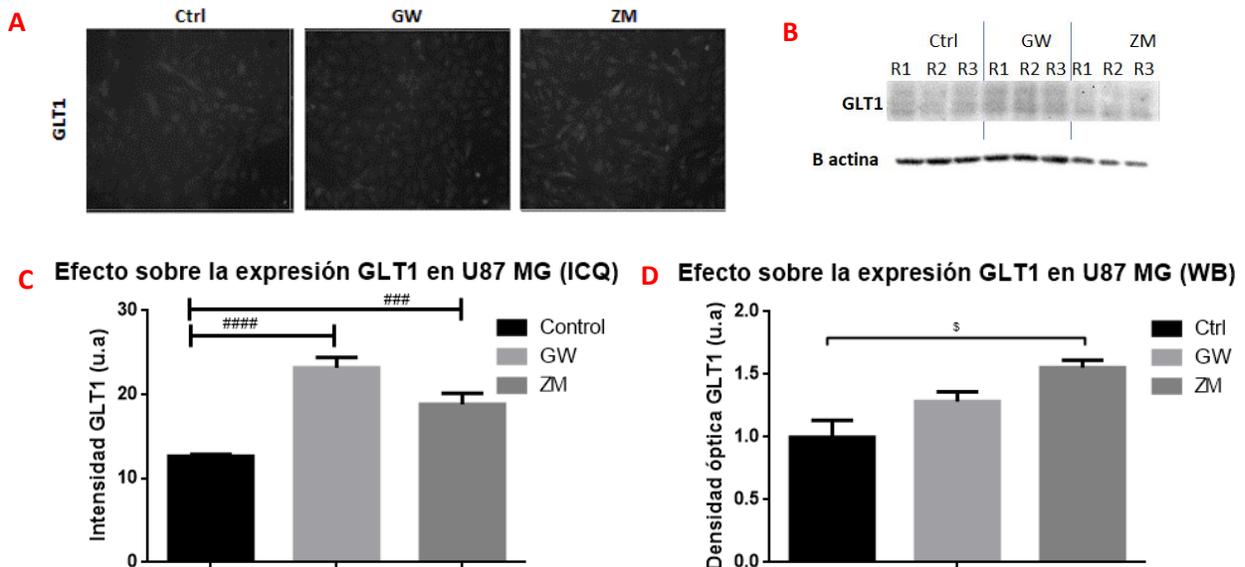


Figura 6-9: Cuantificación del efecto del extracto sobre la expresión de GLT1 en Cultivos de U87-MG

(A) Micrográficas representativas del área de inmunoreactividad positiva para GLT1 en cultivos de U87-MG (B) Imágenes representativas de los Western Blot de GLT1 en cultivos de U87-MG tratados con GW y con el extracto vegetal ZM (C) Cuantificación de la intensidad de (A). (D) Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot en (B), donde las muestras fueron normalizadas contra la señal de β -actina y expresadas como tasa de cambio. Parámetros estadísticos de la cuantificación en: (C). ANOVA de una sola vía, ####: $< 0,0001$; ###: $0,0007$; en (D) ANOVA de una sola vía, \$: $0,0113$.

En la misma dirección del resultado en la ICQ, la evaluación del cambio en la expresión de GLT1 por WB en las U87, arrojó como resultado un aumento contra el control de 1,28 veces para las células

tratadas con GW y de 1,55 para las células tratadas con el extracto, aunque con significancia estadística solo para los resultados con el extracto (Figura 6-9 B y Figura 6-9 D, Ctrl: $1 \pm 0,1325$ GW: $1,284 \pm 0,0772$ y ZM: $1,552 \pm 0,06052$, datos expresados como media \pm SEM, $p < 0,011$ para ZM vs Ctrl.).

En cuanto al resultado de los experimentos de IHQ para hipocampos de cerebros de animales 3xTg-AD, se encontró la tendencia al aumento en la expresión de GLT1 para todas las regiones del hipocampo (Figura 6-10 A y Figura 6-10 B) y para todas las dosis de extracto suministradas (con cambios en la expresión que van desde 1,08 hasta 2,15 veces entre las diferentes regiones del hipocampo). Sin embargo, solo se encontró significancia estadística para algunas regiones del hipocampo como lo son: CA1: VH $1,197 \pm 0,2941$ vs ZM₅₀ $2,577 \pm 0,2791$, DG: VH $1,639 \pm 0,3283$ vs ZM₅₀ $2,918 \pm 0,4909$ vs ZM₁₀₀ $3,035 \pm 0,3066$, y SB VH $2,807 \pm 0,4223$ vs ZM₅₀ $4,014 \pm 0,3981$ (datos expresados como media \pm SEM, $p < 0,045$ y $p = 0,0681$ para ZM₅₀ vs VH.) La cuantificación del cambio en GLT1 para el consolidado de las 4 regiones del hipocampo (Figura 6-10 C) arrojó como resultado un aumento significativo para las dos dosis suministradas, pero no una dependencia de la dosis en el cambio de la proteína pues la variación es de 1,59 y 1,50 veces para ZM₅₀ y ZM₁₀₀ respectivamente (VH $1,832 \pm 0,1967$ vs ZM₅₀ $2,908 \pm 0,2249$ vs ZM₁₀₀ $2,753 \pm 0,1712$, datos expresados como media \pm SEM, $p < 0,023$).

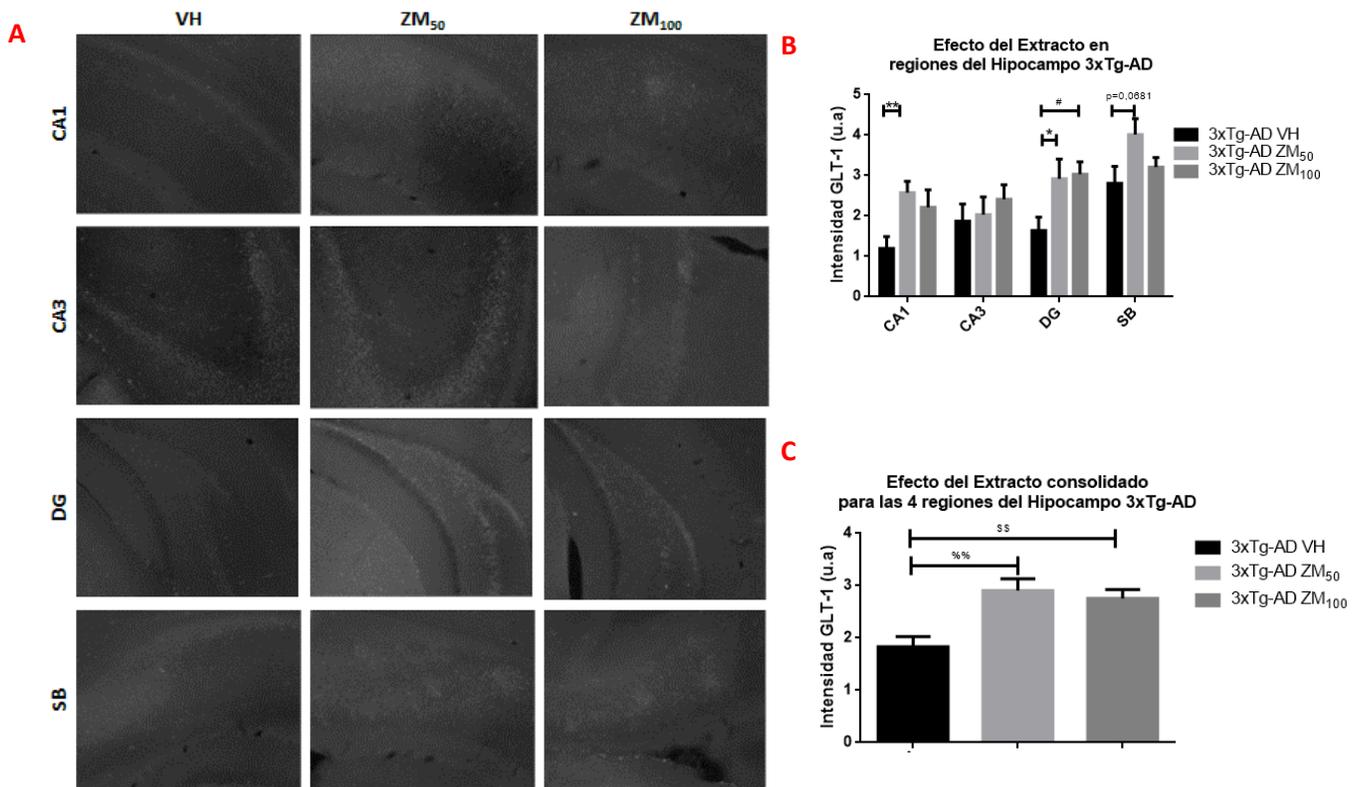


Figura 6-10: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de GLT-1 en regiones del hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto

(A) Micrografías representativas del área de inmunoreactividad positiva para GLT1 en regiones del hipocampo (CA1, CA3, DG: Giro Dentado, SB: Subiculum) de ratones 3xTg-EA. (B) Cuantificación de la intensidad en cada una de las regiones del hipocampo evaluadas. (C) Cuantificación de la intensidad consolidada para las regiones CA1, CA3, DG y SB del hipocampo. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. **:0,0068, *:0,0454; #:0,0278, %:0,0011; \$\$:0,0023. 3xTg-AD VH: Vehículo, 3xTg-AD ZM50: Dosis 50 mg/kg, 3xTg-AD ZM100: dosis 100mg/kg.

La cuantificación de la IHQ para las regiones de la corteza evaluadas (Figura 6-11 A, Figura 6-11 B y Figura 6-11 C) muestra una tendencia a mantener la misma expresión de GLT1 para los tratamientos que para el vehículo (cambio en la expresión entre 0,80 y 1,13 veces sin significancia estadística).

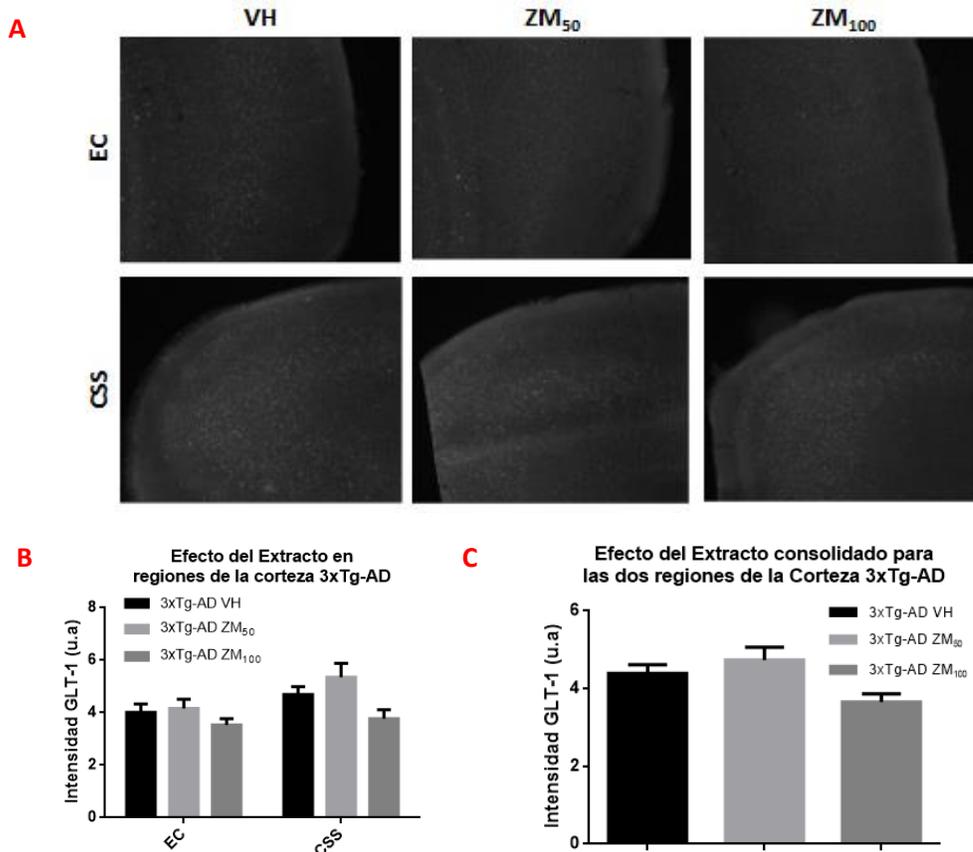


Figura 6-11: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de GLT-1 en regiones de la corteza de animales 3xTg-AD tratados con el extracto

(A) Micrografías representativas del área de inmunoreactividad positiva para GLT-1 en regiones de la corteza (EC: Corteza entorrinal, CSS: Corteza somatosensorial) de ratones 3xTg-AD. (B) Cuantificación de la intensidad en cada una de las regiones de la corteza evaluadas. (C) Cuantificación de la intensidad consolidada para las regiones EC y CSS de la corteza. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba ANOVA de una sola vía. 3xTg-AD VH: Vehículo, 3xTg-AD ZM₅₀: Dosis 50 mg/kg, 3xTg-AD ZM₁₀₀: dosis 100mg/kg.

Como resultado del último experimento para esta proteína, se cuantificó el cambio de la expresión en la totalidad del hipocampo por WB (Figura 6-12 A y Figura 6-12 B), encontrándose una tendencia al aumento después de tratamiento de los animales 3xTg-AD de hasta 1,36 y 2,8 veces frente al vehículo para ZM₅₀ y ZM₁₀₀ respectivamente, pero con significancia estadística solo para la dosis mayor (VH $1 \pm 0,1247$ vs ZM₁₀₀ $2,796 \pm 0,4745$, datos expresados como media \pm SEM, $p < 0,026$).

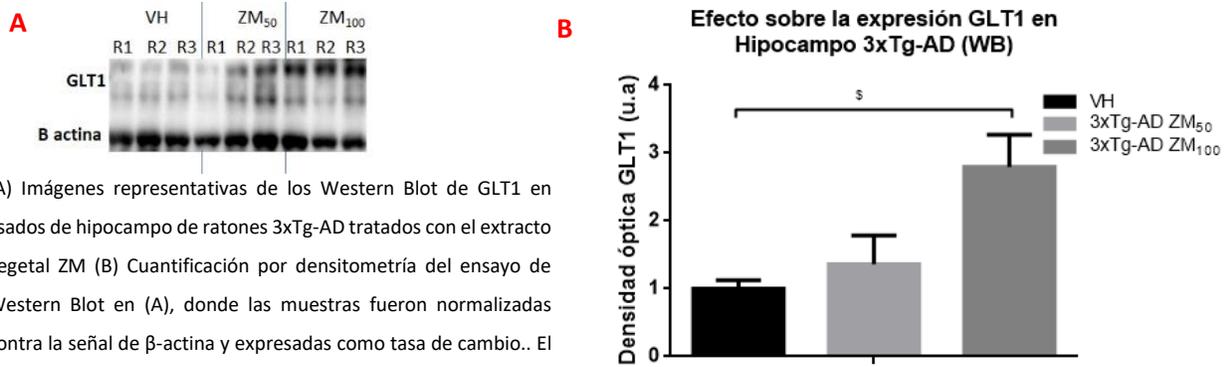


Figura 6-12: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de GLT1 en el hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto

Los resultados de la evaluación del cambio en la expresión de GLT1 para los dos modelos son consistentes en que hay un aumento de la expresión de este transportador tanto en células U87 como en el hipocampo de cerebros 3xTg-AD después del tratamiento con el extracto. Este cambio es de proporciones significativas manteniéndose una tendencia de 1,5 veces más que la expresión en el vehículo y alcanzando en ocasiones hasta 2,8 veces la expresión en el vehículo. Si bien el cambio también se encontró para el tratamiento con GW, no es posible aún correlacionar este cambio de la proteína con una activación de los receptores LXR β y se requieren experimentos posteriores para determinar la vía o el mecanismo por el cual GW y el extracto aumentan la expresión de GLT1.

6.4 El tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* aumenta la expresión del transportador de glutamato astrocitario GLAST.

GLAST es el segundo transportador de glutamato astrocitario en abundancia en el CNS aunque es mayormente expresado durante las etapas del desarrollo.

En los tratamientos de las U87 se encontró un cambio en la expresión de GLAST solamente en respuesta al tratamiento con el extracto por la técnica de WB (Figura 6-13 B y Figura 6-13 D) (Ctrl: $1 \pm 0,02349$ vs ZM: $1,994 \pm 0,2094$, datos expresados como media \pm SEM, $p=0,0022$) con un aumento de 2 veces en la expresión entre el control y el tratamiento con ZM (Ver Anexo 1 para estadística detallada de todas las figuras).

No se encontraron cambios en la expresión de GLAST como respuesta al tratamiento con GW ni en la ICQ ni en la evaluación por WB (Figura 6-13).

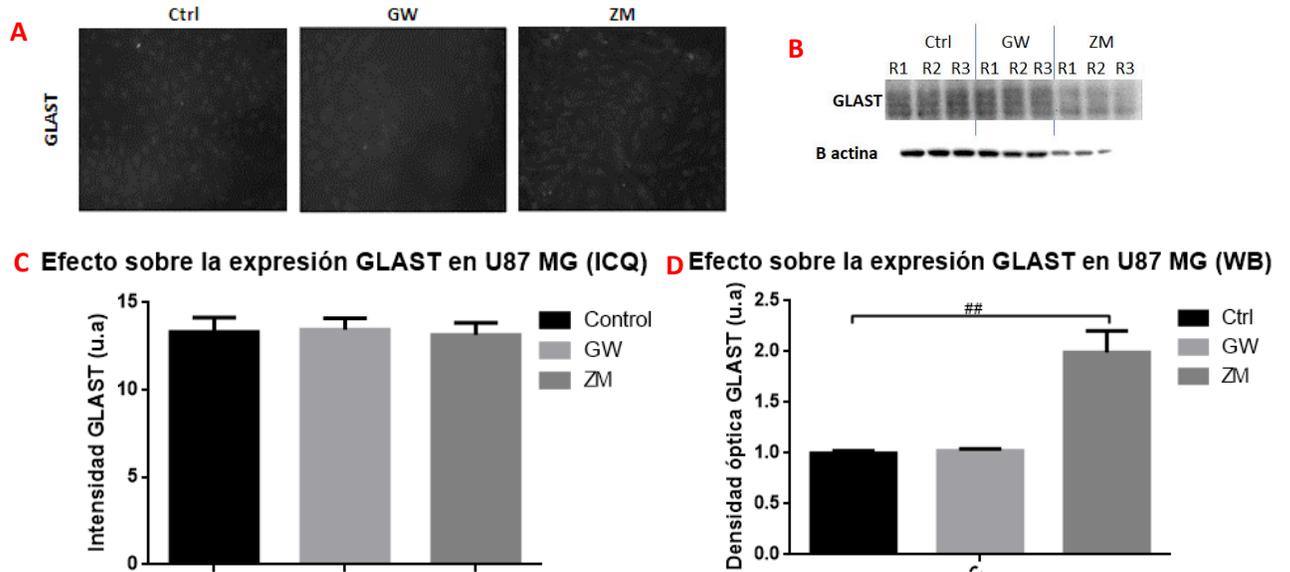


Figura 6-13: Cuantificación del efecto del extracto sobre la expresión de GLAST en Cultivos de U87-MG

(A) Micrografías representativas del área de inmunoreactividad positiva para GLAST en cultivos de U87 (B) Imágenes representativas de los Western Blot de GLAST en cultivos de U87 tratados con GW y con el extracto vegetal ZM (C) Cuantificación de la intensidad de (A). (D) Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot en (B), donde las muestras fueron normalizadas contra la señal de β -actina y expresadas como tasa de cambio. Parámetros estadísticos de la cuantificación en: (C) Kruskal-Wallis: 0,10; en (D) ANOVA de una sola vía, ##: 0,0022.

La cuantificación del cambio en GLAST para todas las diferentes regiones del hipocampo (Figura 6-14 A y Figura 6-14 B) muestra que hay una tendencia al aumento de la proteína de manera dosis dependiente, para las dos dosis utilizadas en los animales 3xTg-AD, aunque con significancia estadística solo para el tratamiento con ZM₁₀₀ en CA1 (VH $0,9686 \pm 0,3445$ vs ZM₁₀₀ $1,685 \pm 0,1502$, datos expresados como media \pm SEM, $p=0,048$). El aumento va desde 1,20 hasta 1,74 veces comparado con el vehículo. En línea con lo anterior, cuando se cuantifica el cambio de la proteína en el consolidado de las 4 regiones del hipocampo (Figura 6-14 C) se mantiene la tendencia de aumento de la proteína de manera dosis dependiente, 1,23 y 1,48 veces para ZM₅₀ y ZM₁₀₀ respectivamente con respecto al vehículo y con significancia estadística para el caso de ZM₁₀₀ (VH $1,278 \pm 0,1658$ vs ZM₁₀₀ $1,886 \pm 0,1374$, datos expresados como media \pm SEM, $p=0,0096$).

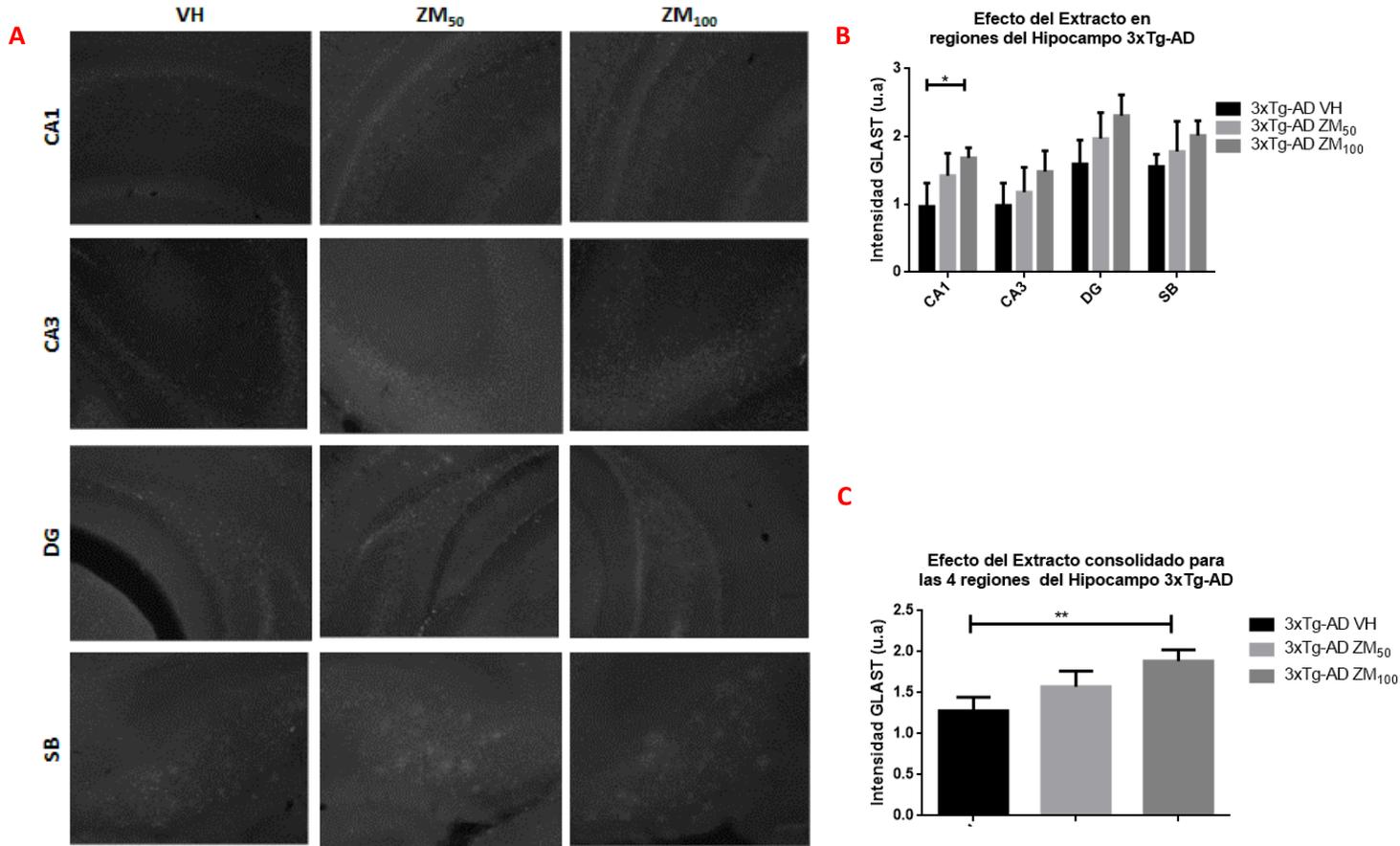


Figura 6-14: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de GLAST en regiones del hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto

((A) Micrografías representativas del área de inmunoreactividad positiva para GLAST en regiones del hipocampo (CA1, CA3, DG: Giro Dentado, SB: Subiculum) de ratones 3xTg-EA. (B) Cuantificación de la intensidad en cada una de las regiones del hipocampo evaluadas. (C) Cuantificación de la intensidad consolidada para las regiones CA1, CA3, DG y SB del hipocampo. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. *:0,0479, **: 0,0096. 3xTg-AD VH: Vehículo, 3xTg-AD ZM50: Dosis 50 mg/kg, 3xTg-AD ZM100: dosis 100mg/kg.

El análisis cuantitativo del cambio en las dos regiones de la corteza, dan como respuesta una tendencia al aumento de GLAST solo para los animales tratados con de ZM₅₀ (

Figura 6-15 A y

Figura 6-15 B) con significancia estadística solo para CSS, con aumento de la expresión 1,59 veces con respecto al vehículo (VH $2,603 \pm 0,363$ vs ZM₅₀ $4,159 \pm 0,1627$, datos expresados como media \pm SEM, $p=0,0015$). De manera consistente al evaluar el consolidado de la corteza para las regiones analizadas (

Figura 6-15 C) se obtuvo un cambio con significancia estadística solo para el tratamiento con ZM₅₀ (VH $2,385 \pm 0,2152$ vs ZM₅₀ $3,56 \pm 0,2403$, datos expresados como media \pm SEM, $p=0,002$) con aumento de 1,5 veces con respecto al vehículo.

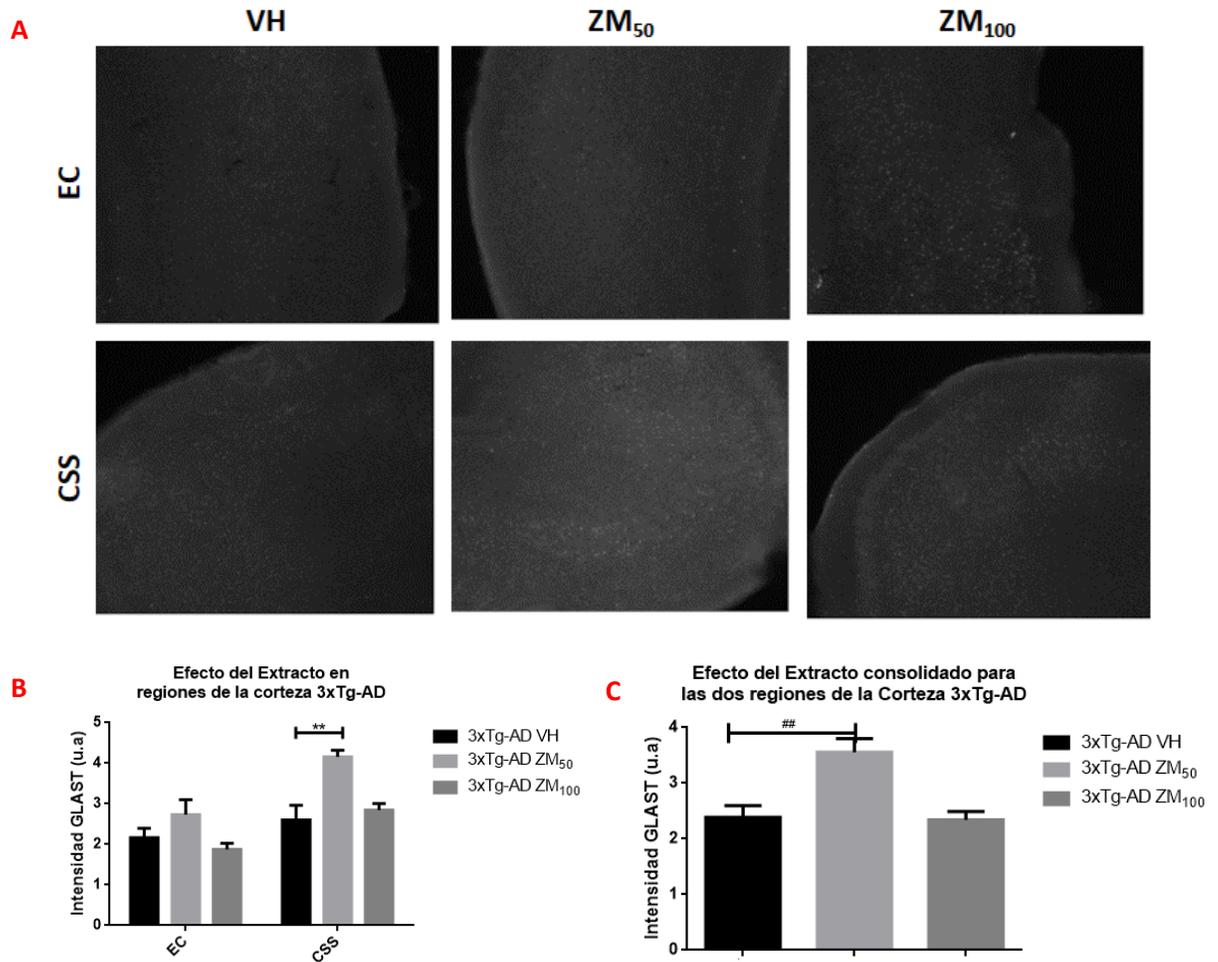
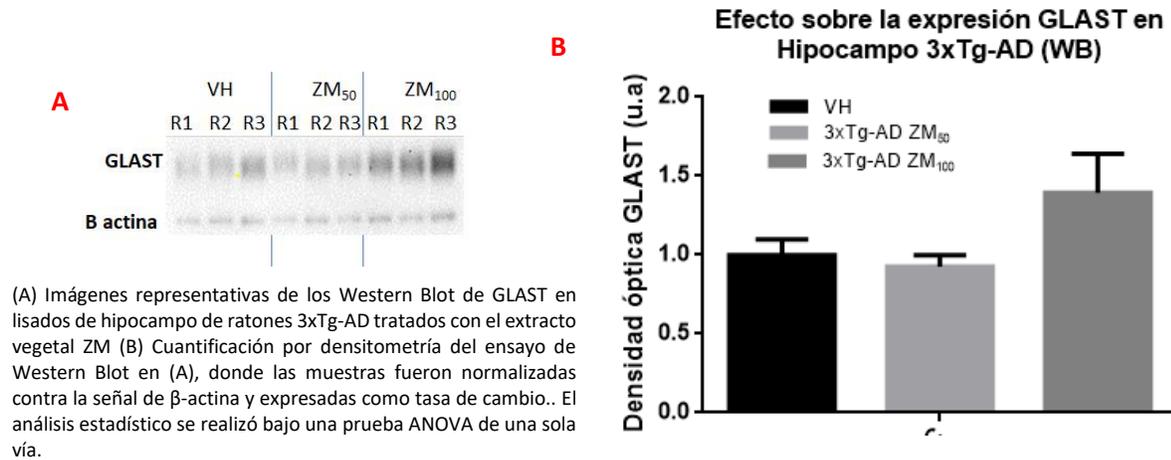


Figura 6-15: Cuantificación (IHQ) del cambio de expresión de GLAST en regiones de la corteza de animales 3xTg-AD tratados con el extracto (A) Micrografías representativas del área de inmunoreactividad positiva para GLAST en regiones de la corteza (EC: Corteza entorrinal, CSS: Corteza somatosensorial) de ratones 3xTg-EA. (B) Cuantificación de la intensidad en cada una de las regiones de la corteza evaluadas. (C) Cuantificación de la intensidad consolidada para las regiones EC y CSS de la corteza. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. **: 0,0015, ##: 0,002. 3xTg-AD VH: Vehículo, 3xTg-AD ZM50: Dosis 50 mg/kg, 3xTg-AD ZM100: dosis 100mg/kg.

Finalmente, la cuantificación del cambio en GLAST para lisados de hipocampo de animales 3xTg-AD, arrojó como resultado una tendencia al aumento para los animales tratados con la dosis ZM₁₀₀ de 1,4 veces, aunque sin significancia estadística (Figura 6-16).

Figura 6-16: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de GLAST en el hipocampo de animales 3xTg-AD tratados con el extracto



Los datos obtenidos de estos experimentos para el cambio en la expresión de GLAST, permiten concluir, que al igual que con GLT1, el tratamiento con el extracto tiene un efecto en el aumento de la expresión de GLAST, en cultivo de células U87 y en regiones del hipocampo y de la corteza de animales 3xTg-AD. Por otra parte, los valores de intensidad para las ICQ y las IHQ, de GLT1 fueron consistentemente mayores que los de GLAST para todas las regiones del hipocampo y de la corteza de animales 3xTg-AD (desde la Figura 6-10 a la Figura 6-16). Adicionalmente en el hipocampo, el factor de aumento en la expresión de GLT1 (1,59 y 1,50 en la Figura 6-10 C) es mayor en comparación con el aumento en GLAST (1,23 y 1,48 en la Figura 6-14 C) para cada una de las dosis respectivamente.

6.5 La concentración del extracto de *Zanthoxylum martinicense* usada para el tratamiento de astrocitos de cultivo primario de hipocampo de ratón no reflejó variaciones en la expresión ni de GLAST ni de GLT-1.

Para las pruebas del cambio de la expresión de los transportadores en cultivo primario de astrocitos de hipocampo de ratón, se trataron las células con concentraciones del mismo orden de magnitud

que las usadas para los cultivos de U87 tanto con GW como con ZM. Sin embargo, para el tratamiento con ZM, a esas concentraciones no se encontró cambio en la expresión de los transportadores de Glutamato (Figura 6-17 A y Figura 6-17 B), pero si en la expresión de LRP (1,3 veces aumento en la expresión de LRP). De otro lado para el tratamiento con GW (Figura 6-17 A y Figura 6-17 B) se encontraron aumentos de la expresión para los transportadores de glutamato y para LRP que van desde 1, 11 hasta 1,31 veces respectivamente. En ninguno de los casos se encontraron diferencias estadísticas significativas. Este resultado, contrastado con todos los anteriores, en los que se ha confirmado un efecto del extracto en el aumento de la expresión de los transportadores, sugiere que la concentración usada para las pruebas en cultivo primario no es suficiente para evidenciar un efecto sobre las proteínas de interés. Aunque la línea U87 es ampliamente aceptada como modelo de astrocitos, tiene diferencias genotípicas y fenotípicas con respecto a los astrocitos de cultivo primario de hipocampo y por lo tanto se requiere un manejo diferencial para evaluar los posibles cambios provocados por el tratamiento con el extracto sobre este último tipo de células.

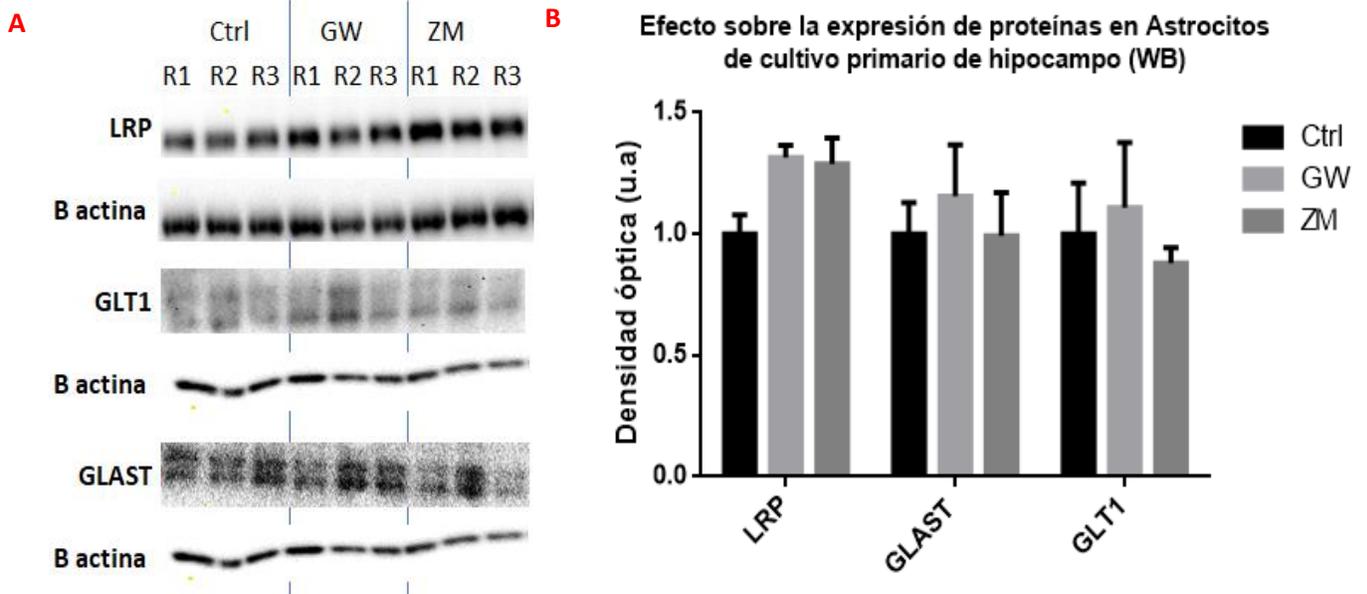


Figura 6-17: Cuantificación por WB del efecto del extracto sobre la expresión de las proteínas en Astrocitos de Cultivo primario de hipocampo de ratón

(A) Imágenes representativas de los Western Blot de las proteínas evaluadas y β-actina en cultivos primarios de astrocitos de hipocampo de ratones tratados con GW y con el extracto vegetal ZM (B) Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot en (A), donde las muestras fueron normalizadas contra la señal de β-actina y expresadas como tasa de cambio. El análisis estadístico se realizó bajo una prueba ANOVA de una sola vía

7 Discusión y análisis

En esta investigación se hizo una evaluación del efecto del tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* sobre la expresión de las proteínas LRP, APOE, GLT1 y GLAST. Para esa evaluación se usaron (1) la línea de células U87-MG como modelo de astrocitos y (2) animales 3xTg-AD, y se comparó el cambio en la expresión contra un control puro o un vehículo. En el caso de los cultivos de U87, se contrastó además contra GW, un agonista sintético de los receptores LXR β . El trabajo se orientó a partir de los hallazgos preliminares del grupo en los cuales (1) ya se había demostrado la actividad agonista del extracto para los receptores LXR β en células de línea y (2) el aumento transcripcional de los genes responsables de estas cuatro proteínas en animales tratados con el extracto. A partir de estos hallazgos, se quiso comprobar el efecto del extracto específicamente sobre astrocitos y proteínas que mayoritariamente se expresan en ellas como APOE y los dos principales transportadores de glutamato: GLT1 y GLAST.

El otro factor que orientó la investigación fue el enfoque en reducción de la excitotoxicidad como alternativa terapéutica para la EA, y desde este punto de vista evaluar si el extracto aumentaba la expresión de los transportadores que regulan la retoma del glutamato, para considerar así un posible doble efecto del extracto (aumento en la expresión de APOE y de GLT1, para la mejora de la homeóstasis de A β y disminución de la excitotoxicidad, respectivamente) a la hora de tenerlo en cuenta como posible alternativa terapéutica.

El trabajo permitió encontrar que el tratamiento con el extracto aumenta la expresión de APOE, como era de esperarse dada la actividad agonista LXR β del extracto, y que adicionalmente aumenta a expresión de GLT1 y GLAST, lo que permite pensar en un efecto multidiana del extracto en contextos terapéuticos para la EA.

Alcance transcripcional multidiana del extracto de *Zanthoxylum martinicense*.

Los mecanismos reportados para incrementar la expresión de GLT-1 están basados en vías mediadas por NF- κ B, CREB, TGF- α y EGF (Fontana, 2015; Soni et al., 2014) y en una más recientemente reportadas como la vía PI3K/AKT (Peng et al., 2019).

Las regiones de unión de promotores de GLT-1 y GLAST tienen múltiples sitios de unión para NF- κ B, de ahí que varios fármacos como el Tamoxifeno, por ejemplo, o proteínas como TGF- α activan la vía de transcripción mediada por NF- κ B. Vías de señalización como MAPK/ERK y PI3K/AKT, o vías en las que mTOR activa AKT, promueven la activación de NF- κ B y aumentan la expresión de GLT-1 y GLAST. Estas vías en las que participa NF- κ B, están reguladas por la subunidad p65 de esta proteína, sobrexpresiones de p65 en el dímero p50/p65 de NF- κ B se ven reflejadas en aumentos de expresión de los transportadores de glutamato (Fontana, 2015; Pajarillo et al., 2019b; Peng et al., 2019).

El factor de transcripción CREB es conocido por su rol en la plasticidad sináptica y en la formación de memoria, así como su implicación en AD. CREB se une a CRE en las regiones promotoras de transcripción de GLAST y GLT-1 para iniciar su transcripción. Para soportar la importancia de CREB en esta transcripción, se ha encontrado que la inhibición de PKA, un activador aguas arriba de CREB, bloquea los efectos de fármacos como el tamoxifeno en el aumento de expresión de transportadores de glutamato (Pajarillo et al., 2019b).

Se han reportado efectos en el aumento de la expresión derivada de tratamientos con antibióticos β -lactama, moduladores de receptores de estrógeno/estrógeno selectivos (SERM por su sigla en inglés) e inhibidores de histona deacetilasa (HDACi por su sigla en inglés) (Pajarillo et al., 2019b). Los compuestos que se han identificado con potencial regulador de esa sobrexpresión son por ejemplo: Dexmedetomidina (Peng et al., 2019), Ceftriaxona, Tamoxifeno, Estradiol, Clozapina, Mynociclina (Fontana, 2015; Soni et al., 2014) entre otros. Se han obtenido resultados en disminución de la excitotoxicidad con tratamientos con riluzol que incrementan la expresión de GLT-1 en contextos de EA (Rodríguez-Giraldo et al., 2022). Compuestos como la Ceftriaxona no solo tienen efecto en la expresión al alza de transportadores de glutamato, sino en mecanismos asociados a la transmisión glutamatérgica como la regulación de vesículas de transporte de glutamato en neuronas y el ciclo

glutamato-glutamina en astrocitos en contextos EA (Rodríguez-Giraldo et al., 2022). Otros compuestos como UBP141y dizolcilpina, y nitromemantina, han sido probados como reguladores de receptores NMDA astrocitarios y extrasinápticos respectivamente, para regular la homeóstasis del calcio en las sinapsis. El levetiracetam además de incrementar la expresión de transportadores de glutamato, demostró ser un buen inhibidor de la liberación de glutamato desde los astrocitos. Otros posibles tratamientos consisten en el uso de Moduladores de los receptores selectivo de estrógeno (SERM por su sigla en inglés) que tienen un efecto por medio de la modulación de las vías transcripcionales en las que están involucrados MAPK, ERK, PI3K-Akt, TGF- α y NF- $\kappa\beta$ en los astrocitos. La taurina, por sus efectos en la regulación de la glitransmisión, ha sido considerado también una posible alternativa de tratamiento para regular la excitotoxicidad en contextos de EA (Rodríguez-Giraldo et al., 2022).

A la fecha no se puede confirmar si el extracto vegetal puede contener algunas de estas sustancias o similares, con efecto regulador de la expresión de GLT-1, ni tampoco hay reportes de que la vía mediada por receptores LXR β tenga un efecto en la expresión de GLT1. Por lo tanto, no se puede elucidar el mecanismo por el cual el extracto tiene un efecto en el aumento de la expresión de GLT1. En otro experimento reportado en una investigación anterior del grupo de Muerte Celular (Muñoz-Cabrera 2023, trabajo de tesis de doctorado pendiente de ser publicado) se demostró el aumento transcripcional de GLT1 que sumado al resultado de la presente investigación, del aumento de la expresión de GLT1, permite pensar en experimentos que lleven a identificar cual de los componentes del extracto tiene efectos sobre las vías mencionadas al inicio de este párrafo y por cuál de ellas es que se genera el cambio en la expresión del transportador de Glutamato astrocitario.

Adicionalmente, el resultado de aumento de expresión de GLT1 reportado en este trabajo, tiene como contraparte una mejora cognitiva (medida como recuperación de la memoria espacial en la prueba del laberinto acuático de Morris) de los animales 3xTg-AD tratados con el extracto (Perez-Silva, 2023. Trabajo de grado de maestría pendiente de ser publicado). La mejora comportamental en memoria espacial reportada en el trabajo de Perez-Silva está acompañada de cambios biomoleculares en otras proteínas asociadas a la patología del modelo 3xTg-AD, como la disminución de carga de A β , la disminución de cúmulos de Tau, la disminución de la reacción inflamatoria de astrocitos y microglía y el aumento en la expresión de APOE y de ABCA1. Dada la

complejidad de la patología de la EA, la ocurrencia simultánea de cambios con efectos neuroprotectores como los mencionados del trabajo de Perez-Silva y los hallados en la presente investigación, se hace muy difícil atribuir la mejora comportamental a un único factor. Sin embargo, lo que sí se puede proponer es el efecto multidiana del extracto al impactar de manera positiva en diferentes vías que concluyen en un efecto neuroprotector probado.

Para dar más soporte a lo anterior, en la presente investigación, se evaluó también el cambio en la expresión de APOE. Como ya se había reportado antes (Bustos-Rangel, 2021) el extracto tiene efecto agonista LXR β , lo que permite predecir que la expresión de esta proteína, mayoritariamente astrocitaria, debería verse aumentada pues es una de las dianas transcripcionales de los receptores LXR β . El resultado obtenido en este trabajo confirma esta predicción en la medida en la que la expresión de la proteína se ve aumentada de manera consistente en los diferentes modelos evaluados. El efecto del extracto en proteínas reguladas por diferentes vías transcripcionales, permite pensar en su potencial terapéutico multidiana.

Finalmente, en esta dirección del potencial transcripcional del extracto, es necesario mencionar, que los cambios en la expresión de las proteínas evaluadas que son generados por el tratamiento con GW, no fueron los mismos que con el extracto en todos los experimentos. Siendo GW un compuesto diseñado para ser específicamente agonista LXR β , permite pensar que efectivamente el extracto logra su efecto por una combinación de efectos de varias vías adicionales a las de los receptores nucleares.

Efecto del extracto consistente en U87 y 3xTg-AD, pero con diferencias asociadas a características propias del modelo.

Tanto APOE, como GLT1 y GLAST, son proteínas que se expresan mayoritariamente en astrocitos. Aunque los resultados comparativos entre los modelos evaluados, U87-MG y 3xTg-AD, mantienen una tendencia similar y confirman el aumento de la expresión de APOE y de GLT1, se encuentran diferencias en ellos. Por ejemplo, en el orden de magnitud del aumento de la expresión de cada proteína en cada modelo. Estas diferencias, que no cambian en ningún momento la tendencia al aumento en la expresión vista en los resultados, pueden explicarse desde varios puntos de vista.

(1) La diferencia en la “concentración final” del extracto en contacto con las células del modelo 3xTg-AD, pues en este modelo no es posible determinar los metabolitos ni la concentración que reciben los astrocitos a partir de la dosis suministrada vía oral (dada la complejidad propia del modelo in vivo se espera que el extracto sufra modificaciones durante el tránsito desde el aparato digestivo hasta llegar al parénquima cerebral); (2) la línea U87-MG, por ser un glioblastoma humano inmortalizado, puede tener alteraciones genotípicas, transcripcionales/traduccionales específicas para los genes y proteínas de interés; y (3) los astrocitos del modelo in vivo, reciben la señalización e influencia de las demás células del SNC. Por las mismas razones mencionadas, si se quiere obtener un resultado consistente en los cultivos primario de astrocitos de hipocampo, y que pueda ser contrastado contra los resultados de las U87 y de los animales 3xTg-AD, se requiere hacer un tratamiento diferencial con concentraciones que respondan a las diferencias genotípicas de los astrocitos de cultivo primario con las U87 y a las diferencias medioambientales con los astrocitos de animales 3xTg-AD.

La comprobación del aumento transcripcional de LRP causado por el extracto, requiere un modelo diferente al usado en este trabajo.

La regulación transcripcional de LRP está basada principalmente en vías asociadas a SREBP (Sigla para el término en inglés Sterol Regulatory Element Binding Protein), a hormonas o factores de crecimiento, y en el caso de las neuronas a NGF (Sigla para el término en inglés Nerve Growth Factor) (Emonard et al., 2014; Hong et al., 2022; Sahng et al., 2004). Aunque estas vías de regulación transcripcional de LRP distan de las vías asociadas a LXR β (para el caso de APOE) y de las vías asociadas GLT1 y GLAST, el extracto parece activar también la transcripción de LRP en animales tratados con este (Muñoz-Cabrera 2023, tesis de doctorado pendiente de ser publicada), lo que fortalece la consideración de un efecto multidiana del extracto. Sin embargo, dado que en esta investigación no se encontró un cambio en la expresión de LRP en lisados de hipocampo, en corteza entorrinal, ni en corteza somatosensorial, se puede pensar que el aumento transcripcional causado de manera directa o indirecta por el extracto, se ve reflejado en otras células y en otras regiones del cerebro que no fueron objeto del estudio de este trabajo. Por ejemplo, se esperaría que un

aumento transcripcional se evidenciara en un aumento de la expresión de LRP en la microglía o en células constitutivas de la barrera hematoencefálica (pericitos y células endoteliales) y no en un modelo de astrocitos como las U87. De manera similar se podría esperar que ese cambio transcripcional se reflejara en regiones diferentes al hipocampo, en el cual no se encontró cambio significativo en este estudio.

Pese a lo anterior, la sobrerregulación transcripcional de LRP (que puede convertirse en un aumento en la expresión de esta proteína) en combinación con el incremento en la expresión de APOE (que si fue encontrado en esta investigación), puede desencadenar una mejoría en la remoción de A β , y esa combinación de efectos puede redundar en una disminución de la patología y en una recuperación comportamental en animales en contexto de la EA.

Respuesta astrocitaria diferencial inter e intra regional al tratamiento con el extracto.

De acuerdo con lo reportado en otros estudios, existen diferencias fenotípicas inter e intrarregionales entre los astrocitos, estas diferencias son tan marcadas que en ocasiones permitirían pensar que se trata de células completamente diferentes (Ben Haim & Rowitch, 2016; Rodríguez-Arellano et al., 2016). Dada esa gran especialización regional de los astrocitos, en este trabajo se encontraron diferencias interregionales entre la corteza y el hipocampo, en la expresión y en el aumento de la proteína después del tratamiento con el extracto. No hubo cambios en la expresión de APOE ni de GLT1 en la Corteza Entorrinal y los cambios en la corteza somatosensorial no tuvieron significancia estadística. Así mismo se encontraron diferencias intrarregionales entre varias estructuras del hipocampo. Para APOE el cambio en CA3 fue del orden de 2,5 veces, mientras que para CA1 fue del orden de 1,7 veces. Para GLT1 el cambio en CA1 fue del orden de 2 veces mientras que en CA3 y SB fue del orden de 1,2 veces. Así mismo la expresión general de GLT1 en SB es 1,5 veces mayor que en el resto de regiones del hipocampo. La respuesta en el cambio de GLT1 y APOE, dependiente de la región del cerebro y de la región del hipocampo, confirma que tanto las necesidades homeostáticas como la afectación en contextos de EA tienen comportamientos espaciotemporales diferentes, con sus respectivas consecuencias comportamentales y clínicas.

Efecto del extracto sobre la expresión de GLT1 y GLAST es dependiente del tipo de transportador.

De acuerdo con lo reportado en otras revisiones, GLT1 es el mayor responsable de la recaptura del glutamato sináptico, GLT1 se expresa hasta 4 veces más en el hipocampo que GLAST (80% de los transportadores de glutamato del hipocampo son GLT1). GLT1 es expresado mayoritariamente en el hipocampo y en general en el cerebro anterior, mientras que GLAST se expresa principalmente en el cerebelo (Fontana, 2015; Soni et al., 2014). En línea con lo anterior, en el presente trabajo se encontró que en el hipocampo GLT1 se expresa hasta 1,4, 1,85 y 1,45 veces más que GLAST para cerebros de animales 3xTg-AD tratados con Vehículo, con ZM₅₀ y ZM₁₀₀ respectivamente. Adicionalmente, en el análisis por WB de proteínas de lisado del hipocampo se encontró que el aumento de GLT1 después del tratamiento era 1,4 y 2,8 veces comparado contra el vehículo, mientras que el cambio para GLAST fue 0,9 y 1,4 veces comparado con el vehículo para cada uno de los tratamientos ZM₅₀ y ZM₁₀₀ respectivamente. Estos resultados permiten confirmar la importancia de GLT1 (por la mayor expresión y la mayor respuesta al tratamiento con el extracto) en el hipocampo en contextos de EA, que el rol de GLT1 en la homeóstasis del glutamato es más relevante que el de GLAST, y los resultados permiten a su vez proponer la posibilidad de una alternativa terapéutica para la regulación del glutamato asociada al efecto del extracto sobre la expresión de GLT1.

La respuesta al aumento de las proteínas APOE, GLT1 y GLAST es dependiente de la dosis del extracto suministrada a animales 3xTg-AD

En el análisis por WB del lisado de hipocampo de ratones 3xTg-AD y en las IHQ de hipocampo completo, los cambios en la expresión de APOE, GLT1 y GLAST tuvieron un comportamiento dosis dependiente. Lo anterior permite pensar que en el escenario en el cual el extracto se use con fines

terapéuticos, se podrían esperar que se regularan los efectos del mismo, variando la dosis (cantidad y/o frecuencia) en respuesta al estado de avance de la patología EA específico en los individuos. Para soportar al menos considerar esta propuesta, se requieren experimentos adicionales en un modelo animal 3xTg-AD.

El extracto como posible alternativa para regular la excitotoxicidad en contextos de EA.

Existe un cuerpo de evidencia amplio que soporta el rol de los transportadores de glutamato y la función astrocitaria de la regulación del glutamato en contextos de EA (Wood et al., 2022; Zhang et al., 2019). Las evidencias reportadas correlacionan efectos de los acúmulos de A β sobre la expresión y funcionalidad de los transportadores de glutamato. Por ejemplo se ha encontrado que los acúmulos de A β provocan disminución en la expresión, deslocalización, disminución de la función de retoma y hasta disminución transcripcional de los transportadores, especialmente de GLT1 (Wood et al., 2022). Al igual que los reportes del efecto de A β en la formación de poros conductores de iones (Bezprozvanny & Mattson, 2008), todos los efectos de A β sobre los transportadores de glutamato astrocitarios mencionados antes, conducen a la desregulación del calcio en la neurona y una consiguiente excitotoxicidad que lleva a la muerte neuronal con los consabidos efectos de la EA.

En contraposición a todo lo anterior, se han reportado muchas investigaciones que tienen como diana terapéutica para EA los transportadores GLT1 y el aumento en la expresión de la proteína en los astrocitos (Lee et al., 2022; Pajarillo et al., 2019a; Peng et al., 2019; Soni et al., 2014; Wood et al., 2022), incluso algunos medicamentos que le apuntan a este fin se encuentran en etapas de ensayo clínico o preclínico como la Ceftriaxona (Lee et al., 2022) y la Dexmetomidina (Peng et al., 2019).

A partir de los resultados obtenidos, se puede pensar en un posible abordaje terapéutico con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* (o sus componentes activos) para la EA. El fundamento de esa potencial alternativa terapéutica está basado en que el tratamiento con el extracto aumenta (1) la expresión de GLT1-lo que derivaría en un incremento en la eficiencia de la recaptura del glutamato sináptico- y (2) la expresión de APOE - clave en la posible remoción de A β del espacio extracelular-. Estos efectos estarían en contraposición a las diferentes formas en las que la

desregulación de A β , en contextos de EA, impacta el aumento de la excitotoxicidad y/o la dishomeóstasis del calcio intracelular. La factibilidad de una futura evaluación de esta propuesta está apoyada en resultados obtenidos en el grupo de Muerte Celular sobre recuperación comportamental en ratones 3xTg-AD tratados con el extracto - incluso después de haber desarrollado la patología y haber alcanzado la adultez -(Perez-Silva 2023, tesis de grado pendiente de ser publicada). A partir de estos resultados en comportamentales en modelos in vivo, se podría establecer una posible correlación entre el aumento de la expresión del transportador GLT1 y APOE, y la mejora en pruebas de memoria espacial.

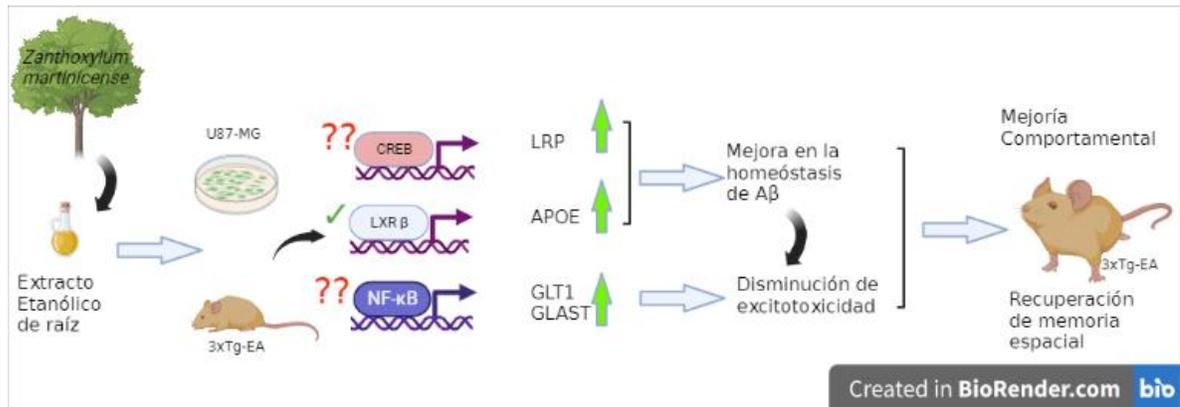


Figura 7-1: Resumen gráfico

Animales y células de línea tratadas con un extracto de *Zanthoxylum martinicense* mostraron incrementos en la transcripción y/o expresión de las proteínas LRP, APOE, GLT1 y GLAST que se vieron reflejadas en mejora comportamental de la memoria espacial en animales 3xTg-AD. Se ha demostrado que el extracto tiene actividad agonista LXR β , lo que explica la posible activación de APOE, pero no se conocen las vías por cuáles el extracto activa la expresión de las otras proteínas. La mejora comportamental se puede atribuir a una mejoría en la homeostasis de A β y a una regulación neuroprotectora de la excitotoxicidad.

8 Conclusiones

1. El extracto de *Zanthoxylum martinicense* tiene una función agonista LXR β en un modelo de astrocitos como la línea U87 y en modelos in vivo de ratones 3xTg-AD, evidenciado por el aumento en ambos casos la expresión de APOE, que es una diana transcripcional de los receptores nucleares LXR β .
2. No se pudo comprobar un aumento en la expresión de LRP, ni en el modelo de U87 ni tampoco en las regiones del Hipocampo, corteza entorrinal ni corteza somatosensorial de animales 3xTg-AD tratados con el extracto. El aumento transcripcional de LRP encontrado en animales 3xTg-AD podría estarse viendo reflejado en aumento de expresión de la proteína en células y regiones que no fueron del alcance de este trabajo.
3. Al tratar cultivos celulares de la línea U87 y animales 3xTg-AD con el extracto *Zanthoxylum martinicense* se encontró un aumento de magnitudes considerables en la expresión de GLT1. No se conocen las vías transcripcionales/traduccionales por las que el extracto *Zanthoxylum martinicense* genera un aumento en la expresión de GLT1 tanto en cultivos de línea U87 como en hipocampo de animales 3xTg-AD.
4. El tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* también genera un aumento sobre la expresión de GLAST en el hipocampo en órdenes de magnitud inferiores a los de GLT1.
5. Los cambios en la expresión de las proteínas APOE, GLT1 y GLAST son dependientes de la dosis utilizada en el tratamiento en animales 3xTg-AD, lo que puede permitir pensar en variantes para ensayos terapéuticos posteriores en animales 3xTg-AD.
6. La evidencia de que el extracto tiene un efecto sobre la expresión de APOE y GLT1, lo convierten en una alternativa terapéutica multidiana para EA. La combinación de (1) el aumento de la expresión de APOE, (2) el aumento del mRNA de LRP, responsables de la remoción de A β en el sistema nervioso central, y (3) el aumento en la expresión de GLT1,

responsable de la regulación de glutamato sináptico y por lo tanto del control de la excitotoxicidad, efectos todos causados por el tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum martinicense* sobre los astrocitos, genera posiblemente un efecto neuroprotector complejo en contextos de EA evidenciados en mejora comportamental.

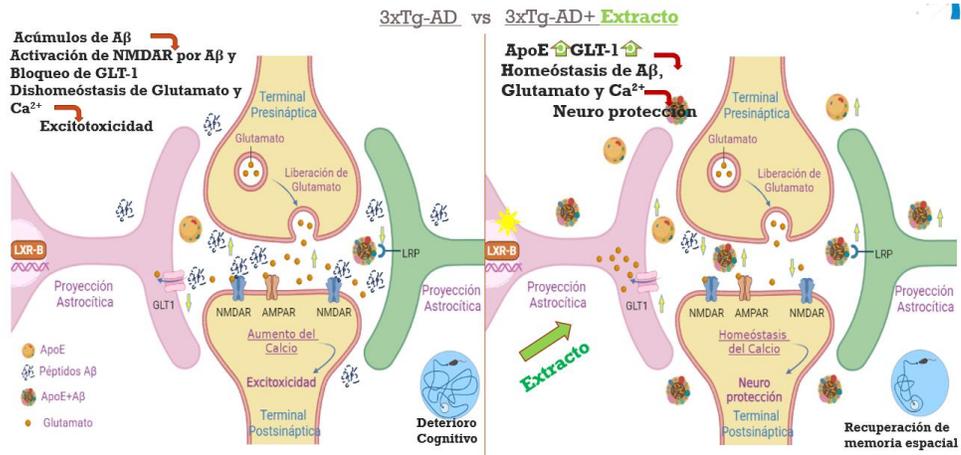


Figura 8-1 Modelo Biomolecular propuesto

El extracto de ZM aumenta la expresión de GLT-1 y de ApoE en los astrocitos, lo que redundaría en un aumento en la eficiencia de recaptura de glutamato (disminución de la excitotoxicidad) y remoción de Aβ. Ambos efectos ayudan a la homeostasis del CNS y a la recuperación de la memoria espacial en animales 3xTg-AD.

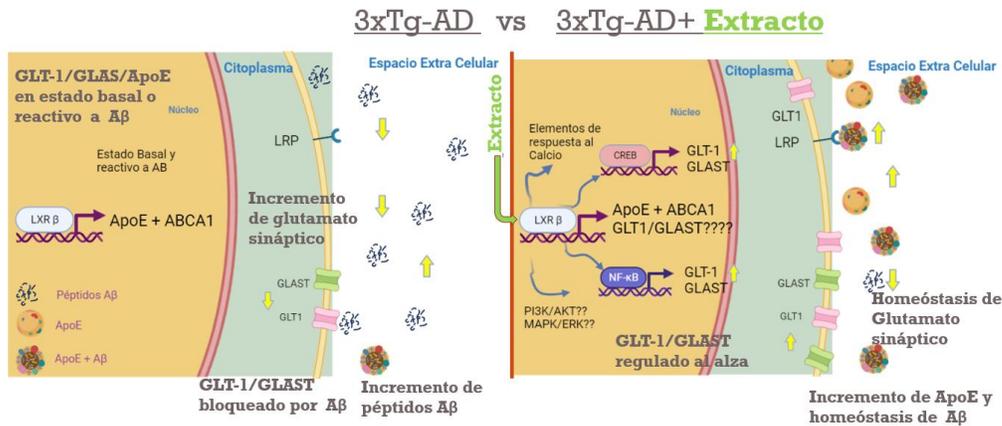


Figura 8-2 Modelo de Señalización propuesto

La expresión de GLT-1 y ApoE está influenciada por vías de señalización que son activadas por el extracto ZM dependientes de LXRβ (siendo este extracto un agonista comprobado para este RN). Adicionalmente el extracto puede estar activando otras vías de señalización independientes de LXRβ con efectos transcripcionales para GLT-1. De esta manera se podría considerar el extracto ZM como un efector Multidiana

9 Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten aproximaciones con un enfoque más centrado en los astrocitos y sus funcionalidades, a inquietudes sobre posibles alternativas terapéuticas para EA derivadas del efecto de un extracto vegetal multidiaria sobre los astrocitos. Se deben continuar experimentos que permitan determinar si el extracto tiene efectos adicionales sobre los astrocitos como por ejemplo sobre la regulación de la activación inflamatoria de los mismos y si esta tiene funciones neuroprotectoras. Es necesario también evaluar si el aumento en la expresión de GLT1 tiene un efecto en la eficiencia de la recaptura del glutamato y en la regulación del calcio intracelular que redunde en protección frente a excitotoxicidad. Esta medición en el cambio de la eficiencia implica entre otras posibilidades evaluar: (1) la dinámica del glutamato en la sinápsis y dentro de los astrocitos, (2) la localización membranal o no de la GLT1 sobrepresada, y (3) duración en el tiempo, asociado a la administración del extracto, del efecto en la sobrepresión de GLT1. Sería necesario también evaluar la edad y/o etapa del desarrollo de la EA más adecuada para el inicio del tratamiento, determinar si es posible hacer tratamientos preventivos independientemente de la probabilidad de desarrollo de la EA y de la edad. Se encuentra también importante poder determinar en un modelo in vivo si hay alguna correlación entre la localización de las regiones con aumento en la expresión de GLT1 y la acumulación de marcadores histopatológicos de la EA como agregados de A β o Tau hiperfosforilado. Finalmente se requiere continuar con la determinación de la composición química del extracto y las posibles vías transcripcionales/traduccionales en las que participa para poder tener un mejor control de una posible terapia dosis dependiente.

10 Fuentes de financiación

Esta tesis fue financiada mediante un proyecto avalado por Colciencias, titulado “Bioprospección del potencial terapéutico de extractos vegetales de las familias lauráceas y rutáceas asociados a la actividad farmacológica de LXR en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer y análisis computacional” del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Código: 110189666226, CT – 734-2018

11 Referencias Bibliográficas

- Almad, A., & Maragakis, N. J. (2018). A stocked toolbox for understanding the role of astrocytes in disease. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 14, Issue 6, pp. 351–362). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0010-2>
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Filho, W. J., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, *513*(5), 532–541. <https://doi.org/10.1002/CNE.21974>
- Báez-Becerra, C., Filipello, F., Sandoval-Hernández, A., Arboleda, H., & Arboleda, G. (2018). Liver X Receptor Agonist GW3965 Regulates Synaptic Function upon Amyloid Beta Exposure in Hippocampal Neurons. *Neurotoxicity Research* *2018* *33*:3, *33*(3), 569–579. <https://doi.org/10.1007/S12640-017-9845-3>
- Ben Haim, L., & Rowitch, D. H. (2016). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience* *2016* *18*:1, *18*(1), 31–41. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.159>
- Benarroch, E. E. (2010). Glutamate transporters. *Neurology*, *74*(3), 259–264. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3181CC89E3>
- Bezprozvanny, I., & Mattson, M. P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, *31*(9), 454–463. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2008.06.005>
- Bustos-Rangel, A. (2021). *Búsqueda de agonistas LXR en plantas colombianas con potencial terapéutico para la enfermedad de Alzheimer* [Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/80277>
- Emonard, H., Théret, L., Bennisroune, A. H., & Dedieu, S. (2014). Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathologie-Biologie*, *62*(2), 84–90. <https://doi.org/10.1016/J.PATBIO.2014.02.002>
- Esposito, Z., Belli, L., Toniolo, S., Sancesario, G., Bianconi, C., & Martorana, A. (2013). Amyloid β , Glutamate, Excitotoxicity in Alzheimer's Disease: Are We on the Right Track? *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *19*(8), 549. <https://doi.org/10.1111/CNS.12095>
- Fontana, A. C. K. (2015). Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *Journal of Neurochemistry*, *134*(6), 982–1007. <https://doi.org/10.1111/JNC.13200>
- Galland, F., Seady, M., Taday, J., Smaili, S. S., Gonçalves, C. A., & Leite, M. C. (2019). Astrocyte

- culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochemistry International*, 131, 104538. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104538>
- Go, G. W., & Mani, A. (2012). Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Family Orchestrates Cholesterol Homeostasis. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 85(1), 19. [/pmc/articles/PMC3313535/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23313535/)
- González-Reyes, R., Nava-Mesa, M., Ariza-Salamanca, D., Mora-Muñoz, L., & Vargas-Sánchez, K. (2017). Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00427>
- Hiebl, V., Ladurner, A., Latkolik, S., & Dirsch, V. M. (2018). Natural products as modulators of the nuclear receptors and metabolic sensors LXR, FXR and RXR. *Biotechnology Advances*, 36(6), 1657–1698. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.03.003>
- Hodson, R. (2018). Alzheimer's disease. *Nature*, 559(7715), S1. <https://doi.org/10.1038/D41586-018-05717-6>
- Hong, D. Y., Lee, D. H., Lee, J. Y., Lee, E. C., Park, S. W., Lee, M. R., & Oh, J. S. (2022). Relationship between Brain Metabolic Disorders and Cognitive Impairment: LDL Receptor Defect. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/IJMS23158384>
- Jeremic, D., Jiménez-Díaz, L., & Navarro-López, J. D. (2021). Past, present and future of therapeutic strategies against amyloid- β peptides in Alzheimer's disease: a systematic review. *Ageing Research Reviews*, 72. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101496>
- Jonathan, M. C., Adrián, S. H., & Gonzalo, A. (2021). Type II nuclear receptors with potential role in Alzheimer disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 100940. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100940>
- Lee, H. G., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2022). Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 21(5), 339. <https://doi.org/10.1038/S41573-022-00390-X>
- Leik, C. E., Carson, N. L., Hennan, J. K., Basso, M. D., Liu, Q. Y., Crandall, D. L., & Nambi, P. (2007). GW3965, a synthetic liver X receptor (LXR) agonist, reduces angiotensin II-mediated pressor responses in Sprague–Dawley rats. *British Journal of Pharmacology*, 151(4), 450. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0707241>
- Lemberg, A., & Fernández, M. A. (2009). Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Annals of Hepatology*, 8(2), 95–102. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31785-5](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31785-5)
- Li, C., Zhao, R., Gao, K., Wei, Z., Yaoyao Yin, M., Ting Lau, L., Chui, D., & Cheung Hoi Yu, A. (2011). Astrocytes: Implications for Neuroinflammatory Pathogenesis of Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research*, 8(1), 67–80. <https://doi.org/10.2174/156720511794604543>
- Li, Z., Shue, F., Zhao, N., Shinohara, M., & Bu, G. (2020). APOE2: protective mechanism and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S13024-020-00413-4>

- Liao, F., Yoon, H., & Kim, J. (2017). Apolipoprotein E metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Lipidology*, 28(1), 60. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000383>
- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2006). Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. In *Nature Clinical Practice Neurology* (Vol. 2, Issue 12, pp. 679–689). Nat Clin Pract Neurol. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0355>
- Matias, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019). Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
- McConnell, H. L., & Mishra, A. (2022). Cells of the Blood-brain Barrier: an Overview of the Neurovascular Unit in Health and Disease. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2492, 3. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2289-6_1
- Muñoz-Cabrera, J. M. (2015). *Efecto del Bexaroteno sobre la plasticidad en la sinapsis comisural CA3-CA1 en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer*. Universidad Nacional de Colombia.
- Muñoz-Cabrera, J. M., Sandoval-Hernández, A. G., Niño, A., Báez, T., Bustos-Rangel, A., Cardona-Gómez, G. P., Múnera, A., & Arboleda, G. (2019). Bexarotene therapy ameliorates behavioral deficits and induces functional and molecular changes in very-old Triple Transgenic Mice model of Alzheimer's disease. *PLOS ONE*, 14(10), e0223578. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0223578>
- Namjoshi, D. R., Martin, G., Donkin, J., Wilkinson, A., Stukas, S., Fan, J., Carr, M., Tabarestani, S., Wuerth, K., Hancock, R. E. W., & Wellington, C. L. (2013). The Liver X Receptor Agonist GW3965 Improves Recovery from Mild Repetitive Traumatic Brain Injury in Mice Partly through Apolipoprotein E. *PLOS ONE*, 8(1), e53529. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0053529>
- Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., Aschner, M., & Lee, E. (2019a). The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*, 161, 107559. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.002>
- Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., Aschner, M., & Lee, E. (2019b). The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.002>
- Park, S. H., Lee, J. Y., Jhee, K. H., & Yang, S. A. (2020). Amyloid- β peptides inhibit the expression of AQP4 and glutamate transporter EAAC1 in insulin-treated C6 glioma cells. *Toxicology Reports*, 7, 1083–1089. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.032>
- Peng, M., Ling, X., Song, R., Gao, X., Liang, Z., Fang, F., & Cang, J. (2019). Upregulation of GLT-1 via PI3K/Akt Pathway Contributes to Neuroprotection Induced by Dexmedetomidine. *Frontiers in Neurology*, 10(SEP). <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.01041>
- Pérez Silva, A. (2023). Evaluación del potencial terapéutico del extracto vegetal *Zanthoxylum martinicense* asociado a la actividad agonista de LXR en el modelo murino de enfermedad de

- Alzheimer (3xTg-AD). Universidad Nacional de Colombia.
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/83985>
- Prada, S. I., Takeuchi, Y., & Ariza, Y. (2014). Costo monetario del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en Colombia Monetary cost of treatment for Alzheimer's disease in Colombia Artículo original. *Acta Neurol Colomb*, 30(4), 247–255.
- Rebec, G. V. (2013). Dysregulation of Corticostriatal Ascorbate Release and Glutamate Uptake in Transgenic Models of Huntington's Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(17), 2115.
<https://doi.org/10.1089/ARS.2013.5387>
- Rezaee, N., Fernando, W. M. A. D. B., Hone, E., Sohrabi, H. R., Johnson, S. K., Gunzburg, S., & Martins, R. N. (2021). Potential of Sorghum Polyphenols to Prevent and Treat Alzheimer's Disease: A Review Article. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 603.
<https://doi.org/10.3389/FNAGI.2021.729949/BIBTEX>
- Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., Zorec, R., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. In *Neuroscience* (Vol. 323, pp. 170–182). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007>
- Rodríguez-Giraldo, M., González-Reyes, R. E., Ramírez-Guerrero, S., Bonilla-Trilleras, C. E., Guardo-Maya, S., & Nava-Mesa, M. O. (2022). Astrocytes as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease—Comprehensive Review and Recent Developments. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 13630, 23(21), 13630.
<https://doi.org/10.3390/IJMS232113630>
- Sahng, W. P., Moon, Y. A., & Horton, J. D. (2004). Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50630–50638.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M410077200>
- Sandoval-Hernández, A. G., Buitrago, L., Moreno, H., Cardona-Gómez, G. P., & Arboleda, G. (2015). Role of Liver X Receptor in AD Pathophysiology. *PLOS ONE*, 10(12), e0145467.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0145467>
- Sandoval-Hernández, A. G., Restrepo, A., Cardona-Gómez, G. P., & Arboleda, G. (2016). LXR activation protects hippocampal microvasculature in very old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 621, 15–21.
<https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2016.04.007>
- Simpson, J. E., Ince, P. G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P. J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., & Wharton, S. B. (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of Aging*, 31(4), 578–590.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2008.05.015>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 119, Issue 1, pp. 7–35). Acta Neuropathol.
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Soni, N., Reddy, B. V. K., & Kumar, P. (2014). GLT-1 transporter: An effective pharmacological target for various neurological disorders. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 127, 70–81.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.10.001>

- Verkhratsky, A., Olabarria, M., Noristani, H. N., Yeh, C. Y., & Rodriguez, J. J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, 7(4), 399–412. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.017>
- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/CNE.24040>
- Wood, O. W. G., Yeung, J. H. Y., Faull, R. L. M., & Kwakowsky, A. (2022). EAAT2 as a therapeutic research target in Alzheimer's disease: A systematic review. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 952096. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.952096>
- Zhang, X., Lao, K., Qiu, Z., Rahman, M. S., Zhang, Y., & Gou, X. (2019). Potential Astrocytic Receptors and Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 67(4), 1109–1122. <https://doi.org/10.3233/JAD-181084>
- Ruiz González, J. (2021). Evaluación del potencial terapéutico de un extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* en un modelo triple transgénico de Enfermedad de Alzheimer. Universidad Nacional de Colombia.
- Caicedo Díaz, J. (2021). Evaluación del potencial terapéutico de agonistas sintéticos y naturales de LXR (GW3965 y *Nectandra reticulata*) en el modelo murino 3xTg-AD de la enfermedad de Alzheimer. Universidad Nacional de Colombia.
- Prillaman, M. (2022). Alzheimer's drug slows mental decline in trial-but is it a breakthrough?. *Nature*.

Anexo A Información estadística de las figuras del capítulo 6

SEM: Media del error standard

KW: Kruskal-Wallis

1WA: ANOVA de una vía

Tabla suplementaria 1: Información Estadística de las figuras 6.1, 6.5, 6.9 y 6.13

Proteína	Parámetro	Valor K	Ctrl		GW		ZM		Referencia en figura
			Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	
LRP	KW	0,79	24,52	0,42	24,48	0,18	24,07	0,50	Figura 6.5
ApoE	KW	18,99	16,34	0,41	22,74	0,72	21,54	0,35	Figura 6.1
GLAST	KW	0,10	13,32	0,81	13,44	0,66	13,15	0,68	Figura 6.13
GLT1	1WA		12,65	0,23	23,19	1,24	18,84	1,31	Figura 6.9

Tabla suplementaria 2: Información Estadística de las figuras 6.1, 6.5, 6.9 y 6.13

Proteína	Ctrl		GW		ZM		Referencia en figura
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	
LRP	1,00	0,15	0,65	0,03	0,65	0,08	Figura 6.5
ApoE	1,00	0,09	1,45	0,04	1,08	0,05	Figura 6.1
GLAST	1,00	0,02	1,02	0,02	1,99	0,21	Figura 6.13
GLT1	1,00	0,13	1,28	0,08	1,55	0,06	Figura 6.9

Tabla suplementaria 3: Información Estadística de la figura 6.2 (APOE)

Región	Parámetro	Valor K	3xTg-AD VH		3xTg-AD ZM ₅₀		3xTg-AD ZM ₁₀₀	
			Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
CA1	KW	10,64	3,69	0,57	5,81	0,72	6,35	0,51
CA3	KW	14,44	4,38	1,16	9,41	1,12	10,79	1,04
DG	KW	12,39	1,75	0,39	1,61	0,28	4,91	0,86
Consolidado	KW	24,70	3,32	0,48	5,75	0,73	7,43	0,65

Tabla suplementaria 4: Información Estadística de la figura 6.3 (APOE)

Región	Parámetro	Valor K	3xTg-AD VH		3xTg-AD ZM ₅₀		3xTg-AD ZM ₁₀₀	
			Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
EC	KW	2,23	2,57	0,54	2,48	0,38	3,48	0,60
CSS	KW	6,25	7,21	1,21	7,09	1,63	11,34	1,51
Consolidado	KW	3,64	4,90	0,78	4,55	0,91	7,22	1,16

Tabla suplementaria 5: Información Estadística de la figura 6.6 (LRP)

Región	Parámetro	Valor K	3xTg-AD VH		3xTg-AD ZM ₅₀		3xTg-AD ZM ₁₀₀	
			Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
CA1	1WA	0,36	4,53	0,57	4,75	0,39	4,98	0,28
CA3	1WA	1,11	4,99	0,51	6,14	1,03	5,81	0,41
DG	KW	2,49	4,77	0,56	6,33	0,90	5,40	0,46
SB	KW	10,23	1,18	0,23	3,03	0,51	2,48	0,44
Consolidado	KW	4,96	3,68	0,35	5,11	0,42	4,78	0,28

Tabla suplementaria 6: Información Estadística de la figura 6.7 (LRP)

Región	Parámetro	Valor K	3xTg-AD VH		3xTg-AD ZM ₅₀		3xTg-AD ZM ₁₀₀	
			Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
EC	KW	0,16	5,55	0,25	5,69	0,44	5,43	0,26
CSS	1WA		6,28	0,27	6,20	0,50	5,75	0,31
Consolidado	KW	0,95	5,90	0,19	5,93	0,32	5,58	0,20

Tabla suplementaria 7: Información Estadística de la figura 6.10 (GLT1)

Región	Parámetro	Valor K	3xTg-AD VH		3xTg-AD ZM ₅₀		3xTg-AD ZM ₁₀₀	
			Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
CA1	KW	9,19	1,20	0,29	2,58	0,28	2,21	0,43
CA3	KW	0,88	1,87	0,42	2,03	0,44	2,41	0,36
DG	1WA		1,64	0,33	2,92	0,49	3,04	0,31
SB	KW	4,59	2,81	0,42	4,01	0,40	3,21	0,24
Consolidado	KW	14,91	1,83	0,20	2,91	0,22	2,75	0,17

Tabla suplementaria 8: Información Estadística de la figura 6.11 (GLT1)

Región	Parámetro	Valor K	3xTg-AD VH		3xTg-AD ZM ₅₀		3xTg-AD ZM ₁₀₀	
			Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
EC	1WA		4,01	0,32	4,16	0,36	3,53	0,25
CSS	1WA		4,70	0,30	5,36	0,53	3,77	0,35
Consolidado	1WA		4,39	0,23	4,74	0,33	3,65	0,21

Tabla suplementaria 9: Información Estadística de la figura 6.14 (GLAST)

Región	Parámetro	Valor K	3xTg-AD VH		3xTg-AD ZM ₅₀		3xTg-AD ZM ₁₀₀	
			Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
CA1	KW	5,10	0,97	0,34	1,42	0,33	1,69	0,15
CA3	KW	1,58	0,98	0,33	1,18	0,37	1,48	0,31
DG	1WA	0,00	1,60	0,35	1,97	0,38	2,31	0,31
SB	KW	1,46	1,56	0,18	1,78	0,45	2,02	0,22
Consolidado	KW	8,08	1,28	0,17	1,57	0,19	1,89	0,14

Tabla suplementaria 10: Información Estadística de la figura 6.15 (GLAST)

Región	Parámetro	Valor K	3xTg-AD VH		3xTg-AD ZM ₅₀		3xTg-AD ZM ₁₀₀	
			Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
EC	1WA		2,17	0,23	2,74	0,36	1,88	0,15
CSS	KW	17,25	2,60	0,36	4,16	0,16	2,85	0,16
Consolidado	KW	18,52	2,39	0,22	3,56	0,24	2,34	0,15

Tabla suplementaria 11: Información Estadística de las figuras 6.4, 6.8, 6.12 y 6.16

Proteína	3xTg-AD VH		3xTg-AD ZM ₅₀		3xTg-AD ZM ₁₀₀		Referencia en figura
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	
LRP	1,00	0,09	1,07	0,31	0,71	0,05	Figura 6.8
ApoE	1,00	0,20	1,14	0,07	2,72	0,18	Figura 6.4
GLAST	1,00	0,10	0,93	0,07	1,40	0,25	Figura 6.16
GLT1	1,00	0,12	1,36	0,43	2,80	0,47	Figura 6.12

Tabla suplementaria 12: Información Estadística de la figura 6.17

Proteína	Ctrl		GW		ZM	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
LRP	1,00	0,08	1,32	0,05	1,29	0,11
GLAST	1,00	0,13	1,16	0,21	0,99	0,18
GLT1	1,00	0,21	1,11	0,27	0,88	0,06

Anexo B Consideraciones éticas y de bioseguridad

Tanto los procedimientos experimentales y la disposición de los residuos biológicos y químicos, como las condiciones de alojamiento y protección contra el dolor de los animales, se realizarán observando las normativas nacionales e internacionales pertinentes: Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989; también se observarán los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (National Research Council, 1996). Además, estos procedimientos experimentales serán sometidos para evaluación por un Comité de Ética, conformado según lo estipulado en el artículo 26 de la Ley 84 de 1989, el cual supervisara periódicamente el desarrollo de los experimentos.

Los experimentos se realizarán en el bioterio del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Este espacio cuenta con micro aislador que filtra polvo y macropartículas. Los animales se mantendrán en condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 5\%$) y fotoperiodo de luz: oscuridad de 12 horas y acceso a agua y alimento ad libitum. Los animales serán mantenidos en cajas-hogar donde puedan satisfacer sus necesidades biológicas y sociales básicas. La manipulación general de los animales se hará bajo cabina de flujo laminar y con los elementos de bioseguridad pertinentes (bata quirúrgica, guantes, polainas, gorro), todo esto para asegurar la esterilidad.

Para los experimentos comportamentales los animales serán manipulados de manera que se asegure el mínimo estrés e incomodidad. Para determinar el “punto final” se tomará en cuenta la guía “Guidelines on Choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research,

teaching and testing”, según la cual, para evitar el sufrimiento de los animales se deben sacrificar en caso que se presenten malformaciones, incapacidades fisiológicas, físicas y/o motoras, daños neurológicos, desnutrición, ceguera. Finalmente, los animales serán anestesiados con una mezcla de Ketamina/xilacina por vía intraperitoneal y una vez logrado el estado de anestesia, estos serán sacrificados por perfusión cardiaca o por decapitación.

Cabe destacar las siguientes aclaraciones con respecto a esta investigación: (1) No existe una metodología o procedimiento alternativo eficiente para el modelo experimental propuesto, por tanto, no es posible reemplazar el uso de animales de laboratorio por otro tipo de modelos, tales como modelos in sílico, cultivos celulares o modelos computarizados. (2) Los animales que puedan ser sometidos a procedimientos que potencialmente impliquen sufrimiento o dolor causados por la intervención investigativa serán puestos bajo los efectos de anestesia y analgesia según lo estipulado en el artículo 24 de la ley 84 de 1989. (3) Al término de los experimentos, los animales serán sacrificados previa aplicación de una sobredosis de anestésico. (4) El número de animales a utilizar será el mínimo necesario para obtener datos fisiológicos consistentes que permitan hacer comparaciones estadísticas y obtener resultados concluyentes.

Debido a que la ejecución de la presente investigación implica la utilización de fármacos y reactivos potencialmente contaminantes, y con el fin de garantizar la seguridad de los investigadores, la manipulación de los residuos contaminados producidos por este estudio, se hará utilizando batas y gorros desechables, guantes de látex, tapabocas, y gafas de protección, además, la Unidad de Recursos Físicos de la Universidad Nacional de Colombia, a través del programa UN Ambiente, se hará cargo de la disposición definitiva de los desechos orgánicos y químicos producidos en el presente proyecto. Para impedir la contaminación ambiental con elementos potencialmente tóxicos derivados de las actividades investigativas, los residuos químicos y los materiales desechables utilizados durante la investigación serán depositados en contenedores adecuados que sigan normas de bioseguridad establecidas. Finalmente, los cadáveres de los animales, así como los residuos anatomopatológicos generados por la investigación, serán incinerados en el complejo de Ciencias de la Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.