

EFFECTO DE LA INGESTA DE GLUTAMATO MONOSÓDICO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
Programa de Doctorado en Fisiología

TESIS DOCTORAL presentada por:

Raquel Yuste Pérez

Dirigida por:

José Viña Ribes

Ana Lloret Alcañiz

Tanja Fuchsberger

Valencia. 2020

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Programa de doctorado en Fisiología



TESIS DOCTORAL presentada por:
RAQUEL YUSTE PÉREZ

Y dirigida por:
Dr. José Viña Ribes
Dra. Ana Lloret Alcañiz
Dra. Tanja Fuchsberger

Valencia. 2020

D **José Viña Ribes**, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València, Dña **Ana Isabel Lloret Alcañiz**, Profesora titular del del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València y Dña **Tanja Fuchsberger**, Investigador Postdoctoral de la University of Cambridge, Department of Physiology, Development and Neuroscience. Cambridge, UK,

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “**Efecto de la ingesta de glutamato monosódico en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. **Raquel Yuste Pérez**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 5 de Febrero de 2020.



Fdo. Jose Viña Ribes



Fdo. Ana Isabel Lloret
Alcañiz



Fdo. Tanja Fuchsberger

AGRADECIMIENTOS

En mi primer lugar, quería darles las gracias a mis directores José Viña, Tanja Fuchsberger y Ana Lloret, por haberme guiado durante estos años de doctorado y por haberme permitido formar parte del equipo Freshage.

Ana, gracias por confiar en mí aun sabiendo de mi falta de experiencia, y por darme la oportunidad de conocer lo que es la ciencia. Pero sobre todo, gracias por mostrarte siempre tan cercana y por ser mucho más que una buena tutora.

A ti Tanja quiero darte las gracias por haberme enseñado tanto y haberlo hecho con tanta paciencia. He tenido mucha suerte en poder pasar mis primeros días de laboratorio aprendiendo de tu trabajo.

También tengo que dar las gracias a todos aquellos compañeros de laboratorio con los que he tenido la oportunidad de cruzarme durante estos años, algunos durante poquito tiempo y otro más, pero todos aportando algo. Gracias por enseñarme y por prestarme su ayuda cuando lo he necesitado. Adrián, el laboratorio no hubiese tenido tanta alegría sin ti; y Aitor, gracias por aportar ese punto de cordura siempre tan necesario.

Especialmente gracias a la parte del Lloret's Team con la que más cosas he compartido: Paloma y Dani. Me habéis acompañado y sufrido mis manías de primera mano y habéis estado ahí cuando he necesitado un empujoncito, tanto fuera como dentro de la bancada.

No me olvido de nuestras brasileñas Carla y Helen, y de nuestra francesa Coralie, no sabéis cuanto me alegro de haberos conocido.

Muchas gracias también a mi familia, especialmente a mis padres y a mi prima Silvia, que son los que posiblemente se hayan llevado la peor parte de las temporadas de más nervios. Y al bichejo de la casa, Neizan, que nos lleva a todos locos y nos ayuda a recordar que no todo se resume a estudio y trabajo.

Y por supuesto, gracias a mis amigas, a “las del pueblo”. Aunque estuviésemos lejos siempre habéis estado ahí para cualquier cosa. A veces hace falta que cada una sea muy distinta a las otras para poder entenderse tan bien como lo hacemos nosotras.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1. El glutamato..... | 5 |
| 1.1.1. Estructura..... | 6 |
| 1.1.2. Función fisiológica..... | 7 |
| 1.1.2.1. Función metabólica: Ciclo de Krebs..... | 8 |
| 1.1.2.2. Función como neurotransmisor..... | 10 |
| 1.1.3. Implicación del glutamato en la memoria y el aprendizaje..... | 15 |
| 1.1.4. Excitotoxicidad..... | 18 |
| 1.1.5. El glutamato monosódico (GMS)..... | 19 |
| 1.2. La Enfermedad de Alzheimer (EA)..... | 24 |
| 1.2.1. Epidemiología..... | 25 |
| 1.2.2. Etiología y fisiopatología de la EA..... | 28 |
| 1.2.3. El péptido A β y su depósito en placas..... | 29 |
| 1.2.4. La proteína Tau y la formación de ONF..... | 33 |
| 1.3. EA y neurotransmisores..... | 36 |
| 1.4. La Barrera hematoencefálica en la EA..... | 39 |
| 1.5. Glutamato y su papel en la EA..... | 42 |
| 2. OBJETIVOS..... | 45 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 46 |
| 3.1. Materiales..... | 46 |
| 3.1.1. Reactivos..... | 46 |
| 3.1.2. Anticuerpos..... | 47 |
| 3.1.3. Tampones y soluciones..... | 48 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.4. Instrumentos y equipos de laboratorio..... | 50 |
| 3.2. Animales de experimentación y dosis de GMS administrada..... | 53 |
| 3.3. Métodos..... | 57 |
| 3.3.1. Sacrificio de animales y extracción de tejidos..... | 57 |
| 3.3.2. Inmunofluorescencia..... | 58 |
| 3.3.3. Western blotting..... | 60 |
| 3.3.3.1. Preparación de los homogenados..... | 60 |
| 3.3.3.2. Determinación de proteínas: método Lowry..... | 60 |
| 3.3.3.3. Electroforesis en gel de acrilamida..... | 63 |
| 3.3.4. ELISA..... | 66 |
| 3.3.5. Determinación de neurotransmisores en LCR: cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas (LC-MS)..... | 68 |
| 3.3.6. Registros electrofisiológicos..... | 70 |
| 3.3.7. Estudio comportamental..... | 72 |
| 3.3.7.1. Estudio de memoria operativa: Laberinto de Hebb Williams..... | 72 |
| 3.3.7.2. Estudio de la ansiedad: Laberinto elevado en cruz..... | 74 |
| 3.3.8. Análisis estadístico..... | 75 |
| 3.3.8.1. Análisis estadístico de los ensayos de biología molecular..... | 75 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.8.2. Análisis estadístico de los registros electrofisiológicos..... | 75 |
| 3.3.8.3. Análisis estadístico del estudio comportamental..... | 76 |
| 4. RESULTADOS..... | 77 |
| 4.1. Administración de GMS y cantidad de agua consumida..... | 77 |
| 4.2. Ingesta de GMS y peso e índice glucémico..... | 78 |
| 4.3. Niveles de péptido A β en ratones APP/PS1 suplementados con 1% de GMS..... | 79 |
| 4.4. Estudio de la fosforilación de proteína Tau en ratones APP/PS1 con consumo de GMS al 1%..... | 82 |
| 4.5. Mecanismos moleculares implicados en la hiperfosforilación de Tau..... | 83 |
| 4.5.1. Análisis de Cdk5..... | 83 |
| 4.5.2. Análisis de p35/25..... | 84 |
| 4.5.3. Análisis de Cdh1..... | 84 |
| 4.5.4. Niveles de la enzima Glutaminasa..... | 86 |
| 4.6. Análisis de enzimas implicadas en el control y degradación de A β | 87 |
| 4.6.1. Análisis de ADAM10..... | 87 |
| 4.6.2. Niveles de la proteína BACE-1..... | 88 |
| 4.6.3. Niveles de la enzima Nicastrina..... | 89 |
| 4.6.4. Niveles de la enzima Neprelisina..... | 90 |
| 4.6.5. Niveles de la enzima IDE..... | 91 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.7. Alteración de neurotransmisores con consumo de GMS al 1%..... | 92 |
| 4.7.1. Determinación de glutamato, GABA y Glutamina en LCR..... | 92 |
| 4.8. Registro de la LTP..... | 93 |
| 4.9. Estudio de los receptores AMPA de glutamato..... | 95 |
| 4.10. Análisis del comportamiento de los ratones tras la ingesta de GMS..... | 97 |
| 4.10.1. Test de ansiedad: Laberinto en cruz elevado..... | 97 |
| 4.10.2. Test de memoria hipocámpica..... | 98 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 100 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 112 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 113 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El glutamato.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso; la mayoría de las neuronas lo utilizan como tal e interviene en un gran número de sinápsis glutamatérgicas (Pal, 2018; Zhou & Danbolt, 2014). Además, es junto a la Glutamina, el aminoácido libre más abundante en el sistema nervioso central (SNC) (Lewerenz & Maher, 2015). Puede ser sintetizado de manera endógena por el organismo, por lo que es un aminoácido no esencial (Beyreuther *et al.*, 2007).

Su distribución en el cerebro no es homogénea, si no que se distinguen varias agrupaciones relacionadas entre sí y en las cuales la concentración de glutamato varía. En general, se ha observado que en la región cortical, en el núcleo caudado y en el hipocampo son los lugares donde mayor concentración de glutamato hay mientras que, en el hipotálamo y en el tronco encefálico se localizan las concentraciones más bajas (Fagg y Foster, 1983).

En las vesículas sinápticas la concentración es de alrededor de 0,1 M mientras que en la hendidura sináptica el rango es de entre 6-7 mM (Van der Zeyden *et al.*, 2008; Kessler, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013). Los valores en el líquido cefalorraquídeo (LCR) son muy inferiores, entre 4 y 45 μ M (van der Zeyden *et al.*, 2008; Dash *et al.*, 2009).

1.1.1. Estructura.

El glutamato (o ácido glutámico) es un aminoácido de carga negativa que se encontró por primera vez en el gluten de trigo (Nelson y Cox, 2014). Al igual que el resto de los 20 aminoácidos estándar que se han encontrado en las proteínas, el glutamato es un α -aminoácido que cuenta con dos estereoisómeros (L y D glutamato). En las reacciones químicas se obtienen tanto isómeros L como D y estos son muy difíciles de distinguir entre sí; en cambio, para el organismo cada isómero es muy distinto al otro. En la naturaleza la mayoría de los compuestos biológicos presentan sólo una de sus formas estereoisómeras; de hecho, la mayoría de los aminoácidos de las proteínas son L-estereoisómeros y las células son capaces de sintetizar específicamente los isómeros L (Nelson y Cox, 2014).

A pesar de desconocerse muchos aspectos sobre el metabolismo y la regulación del glutamato, está descrito que el proceso es similar ya esté ligado a proteínas o en su forma libre, y que por lo tanto, no hay diferencias en el modo de captación que se produce en la capa luminal de los vasos (Kovacevic y McGivan, 1983; Low *et al.*, 1992). Por otro lado, se sabe que las enzimas implicadas en el metabolismo de la Glutamina y del glutamato son específicas de la mitocondria (Kovacevic y McGivan, 1983).

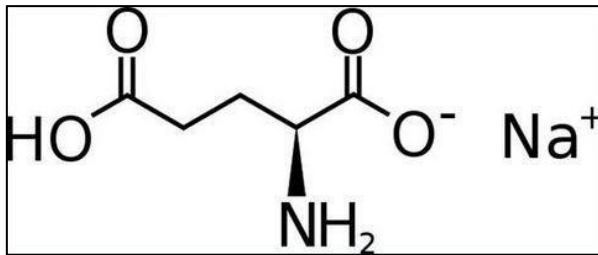


Figura 1. Esquema de la estructura del glutamato (*stguitars.com* 2019). Tomado de: <https://www.stguitars.com/G2yaXOgwg/>

1.1.2. Función fisiológica.

El glutamato es uno de los principales componentes de las proteínas, suponiendo en algunos casos hasta el 20% de las mismas (Geha *et al.*, 2000), y tiene diversas funciones en el organismo (Kitamura, Tsurugizawa, & Torii, 2011). Participa en el metabolismo y síntesis de otros aminoácidos y proteínas y tiene un importante papel en el funcionamiento del sistema nervioso, ya que además de actuar como neurotransmisor excitatorio regula la actividad sináptica, de aprendizaje, memoria y desarrollo neural (Kitamura, Tsurugizawa y Torii, 2011). Además, es precursor del neurotransmisor GABA (Bak, Schousboe y Waagepetersen, 2006). Por otro lado, interviene en la funcionalidad de los astrocitos, ya que actúa como señalizador (C. R. Rose *et al.*, 2018). Así, se puede decir que las células tomarán el glutamato para darle un uso metabólico (obtención de energía, síntesis de proteínas, fijación de amonio) o bien para utilizarlo como neurotransmisor (Danbolt, 2001).

1.1.2.1. Función metabólica: Ciclo de Krebs.

La síntesis de glutamato puede darse por dos vías: por medio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), ciclo del ácido cíclico o Ciclo de Krebs; o bien, a partir del ácido L-glutámico extracelular formado a partir de α -cetoglutarato (Bajaj y Singhal, 2009; Hsueh *et al.*, 2017).

El ciclo de Krebs es una ruta metabólica que tiene lugar en la mitocondria, y en la cual se produce la oxidación de azúcares, ácidos grasos y la mayor parte de los aminoácidos, que previamente han sido transformados en acetil-CoA. Este proceso supone un papel central en la conservación de la energía del organismo pero además, proporciona moléculas precursoras de un gran número de productos, como es el caso del α -cetoglutarato, necesario para la síntesis de glutamato (Nelson y Cox, 2014). El ciclo comienza con el cese de un grupo acetilo por parte del acetil-CoA (dos átomos de carbono), al oxalacetato (cuatro átomos de carbono), de manera que se obtiene una molécula de citrato (seis átomos de carbono) (Nelson y Cox, 2014). Este último se oxida por medio de una serie de reacciones, finalizando con la liberación de dos moléculas de CO_2 y con la producción de una molécula de ácido oxalacético. Así, en cada uno de los ciclos se regenera la molécula de partida, el oxalacetato, se incorpora una de acetil-CoA y se eliminan dos de CO_2 (Garrido *et al.*, 2009). Tal y como muestra la Figura 2, en el ciclo de Krebs se puede distinguir 8 pasos. En el tercero de ellos es en el que se obtiene el α -cetoglutarato, por oxidación del isocitrato. A partir de él, se produce la síntesis del glutamato por medio de dos vías (Belitsky y Sonenshein, 1998; Nelson y Cox, 2014). Una de ellas se produce en

ausencia de Glutamina, e interviene la Glutamatodeshidrogenasa (GD) que cataliza una reacción en la cual a partir de sulfato de amonio y α -cetoglutarato se obtiene L-glutamato (Belitsky y Sonenshein, 1998). En la otra la reacción es llevada a cabo en presencia de Glutamina, obteniéndose L-glutamato a partir de α -cetoglutarato y L-Glutamina, con la intervención de la Glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT); también, interviene la Glutamina sintetasa (GS) para la regeneración de Glutamina a partir de L-glutamato y sulfato de amonio (Shih y Van, 2001).

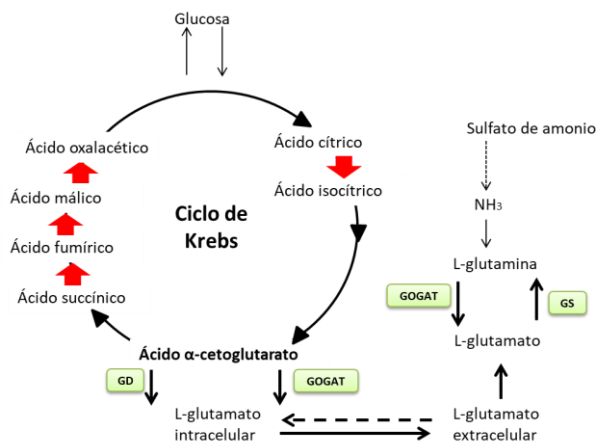


Figura 2. Esquema de la formación de Glutamato a partir del ciclo de Krebs. Esquema realizado a partir de la imagen disponible en: http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/BBM-II_farmacia/T14-C-urea.pdf

De esta manera, la entrada de glucosa plasmática al cerebro a través de sus transportadores, permite la síntesis de α -cetoglutarato en el Ciclo de Krebs, que más tarde es utilizado por neuronas y astrocitos para la producción de gran parte del glutamato cerebral.

1.1.2.2. Función como neurotransmisor.

Los neurotransmisores son moléculas endógenas (Aminoff y Daroff, 2014) que actúan como mensajeros químicos entre las neuronas para permitir el paso de información de unas a otras produciendo, en la mayor parte de los casos, una respuesta eléctrica postsináptica (Purves *et al.*, 2015). Mayoritariamente, se encuentran almacenados en las vesículas sinápticas y son liberados a la hendidura sináptica para unirse a su correspondiente receptor (Lodish, 2000).

Para evitar un efecto prolongado y excesivo de los mismos, que pueda dar lugar a la instauración de consecuencias clínicas, el organismo regula su acción por medio de distintos sistemas. Estos pueden ser por degradación química, llevada a cabo por enzimas, o mediante un sistema de recaptación, que se encarga de retirar el exceso de neurotransmisor de la hendidura sináptica para transportarlo de nuevo a la neurona de procedencia (Danbolt, 2001; Barret *et al.*, 2010).

En cuanto a su clasificación, pueden distinguirse dos grupos: los transmisores de bajo peso molecular y los transmisores de alto peso molecular. El primero de los grupos incluye la acetilcolina (ACh); las aminas biógenas, que a su vez se pueden clasificar en las catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina), serotonina e histamina; aminoácidos y derivados, como el glutamato, el GABA y la glicina; nucleótidos y nucleósidos, como la adenosina, el ATP, ADP y AMP; y finalmente, los no canónicos como el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono o el ácido araquidónico (Danbolt, 2001; Manzano Palomo, De la Morena Vicente y Barquero Jiménez, 2006).

El segundo de los grupos incluye los neuropéptidos, entre los que se encuentran la sustancia P y la vasopresina, entre otros.

Aunque depende del receptor al que se una, el glutamato tiene la capacidad de excitar a las células nerviosas, (Curtis, Phillis, & Watkins, 1960) de ahí que se le considere el principal neurotransmisor excitatorio del SNC de los mamíferos (Danbolt, 2001). Mantener una señal excitatoria adecuada es de gran importancia, de lo contrario tendrían lugar alteraciones neurológicas, ya sea por una excesiva o insuficiente concentración del mismo (Zhou y Danbolt, 2014; Robinson y Jackson, 2016).

Los receptores de glutamato se encuentran expresados en la superficie de las células, por lo que éste realiza su función neurotransmisora en el medio extracelular. Por este motivo, la estimulación de sus receptores va ligada a la cantidad de glutamato presente en el medio extracelular, que dependerá del equilibrio existente entre la liberación y la retirada del neurotransmisor (Zhou y Danbolt, 2014). Dichos receptores pueden ser de dos tipos: los ionotrópicos (iGluR) o los metabotrópicos (mGluR). Los primeros son los acoplados a canales iónicos y hay tres distintos: ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5metil-4isoxazol-propiónico (AMPA), y ácido kaínico (KA)(Gazulla y Cavero-Nagore, 2006); estos median la respuesta rápida a glutamato en el SNC en mamíferos (Stawski, Janovjak y Trauner, 2010). Los segundos son los acoplados a proteínas G y son los mGluR1, mGluR2, mGluR3, mGluR4, mGluR5, mGluR6, mGluR7, mGluR8 (Gazulla & Cavero-Nagore, 2006); estos median la neurotransmisión glutamatérgica a través de segundos mensajeros intracelulares (Niswender y Conn, 2010). De

esta manera, el glutamato, el cual se encuentra acumulado en las vesículas sinápticas de los terminales presinápticos, tras recibir un potencial de acción, es liberado a la hendidura sináptica por exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Rodríguez *et al.*, 2013) uniéndose a su correspondiente receptor en la post o en la presinapsis (Hanson, Heuser y Jahn, 1997).

La eliminación del glutamato en la hendidura es llevada a cabo por los astrocitos que toman el exceso de glutamato sináptico y lo convierten en Glutamina, para más tarde liberarlo al medio extracelular donde es captado por las neuronas presinápticas que de nuevo lo transforman en glutamato (Newcomb *et al.*, 1997; Danbolt, 2001). Este proceso se conoce como ciclo glutamato-Glutamina (Figura 3); se produce un reciclaje del glutamato y además se evita la instauración de un estado de toxicidad producido por la acumulación del neurotransmisor: la excitotoxicidad (Hägglund *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2013).

Este ciclo es una vía metabólica donde existe un intercambio de aminoácidos entre neuronas y astrocitos.

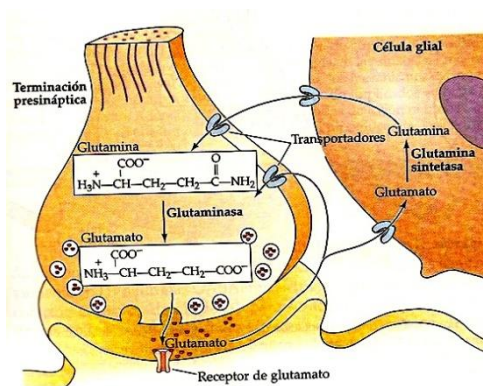


Figura 3. Esquema del ciclo Glutamina-glutamato. Disponible en: <https://audiology.wordpress.com/fisiologia/excitotoxicidad/circuito-Glutamina-glutamato/>

Los astrocitos toman aproximadamente un 80% del glutamato liberado al medio extracelular en la sinapsis, mientras que sólo un 20% queda acumulado en las neuronas postsinápticas (Danbolt, 2001). De su transporte al interior astrocitario se encargan los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs) pertenecientes a la familia de los transportadores de glutamato de membrana SLC1. Hay cinco tipos de recaptadores de glutamato: EAAT1/SLC1A3 y EAAT2/SLC1A2 expresados en astrocitos (Gegelashvili y Schousboe, 1997, 1998); EAAT3/SLC1A1, expresados en neuronas; EAAT4/SLC1A6, los cuales se encuentran en las espinas dendríticas de las células de Purkinje cerebelosas; y los EAAT5/SLCA7 que son los transportadores de glutamato de la retina (Rose, Verkhratsky y Parpura, 2013; Pal, 2018). La activación de estos transportadores depende del gradiente de concentración transmembrana de Na^+ , mantenido por la bomba Na^+-K^+ , la cual requiere consumo de ATP (Kirischuk, Kettenmann y Verkhratsky, 2007). Una vez tomado el glutamato, éste es transformado en Glutamina por medio de la GS, la cual en el cerebro se encuentra exclusivamente en los astrocitos (Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979; Anlauf y Derouiche, 2013). Para ello, es necesario amonio y consumo de ATP,



lo que sirve para evitar alteraciones debido a la acumulación de NH_4^+ libre (Matés *et al.*, 2009), lo cual resultaría también muy tóxico. La gran mayoría de la Glutamina es exportada al medio extracelular por los transportadores de aminoácidos neutros acoplados a sodio

(SNATs) (Hägglund *et al.*, 2015), para más tarde ser captada por las neuronas glutamatérgicas donde la Glutaminasa (GLS) de nuevo la transformará en glutamato (Eric R. *et al.*, 2013), o bien será utilizada como precursora del neurotransmisor inhibitorio γ -ácido aminobutírico (GABA) por las neuronas GABAérgicas, proceso en el cual interviene la glutamato descarboxilasa (GAD) (Bak, Schousboe y Waagepetersen, 2006; Hertz y Rothman, 2016). Tanto en las neuronas como en los astrocitos, una parte del glutamato, GABA y Glutamina es metabolizada en el TCA para mantener la homeostasis metabólica (Sonnewald, 2014).

En cuanto a los receptores ionotrópicos de glutamato, mientras que los receptores AMPA y los kainato permiten la entrada principalmente de Na^+ , los receptores NMDA muestran una alta permeabilidad al Ca^{2+} y están implicados en la plasticidad sináptica y en el aprendizaje (Miyamoto, 2006).

El mecanismo de activación de los receptores NMDA es el siguiente: los receptores NMDA se encuentran bloqueados por iones magnesio (Mg^{2+}). De esta manera, en condiciones fisiológicas el potencial de reposo de la membrana presentado por las neuronas es de -70mV y la concentración de Ca^{2+} intracelular de la neurona es baja. En situaciones en las que la liberación de glutamato es prolongada, como en los procesos implicados en el aprendizaje, los receptores AMPA son estimulados, permitiendo la entrada de Na^+ al interior de la célula. Consecuentemente, el potencial de membrana aumenta y el Mg^{2+} que bloqueaba los receptores NMDA es desalojado, dejando paso de esta manera a la entrada de Ca^{2+} al interior de la neurona postsináptica, e induciendo la puesta en marcha de una cascada de

procesos implicados en el aumento de la actividad sináptica (Danysz y Parsons, 2012).

1.1.3. Implicación del glutamato en la memoria y el aprendizaje.

La memoria es un proceso cognitivo complejo que se encuentra estrechamente relacionado con el proceso de aprendizaje (Machado *et al.*, 2008). Aquí el glutamato tiene un importante papel, ya que sus receptores, principalmente los ionotrópicos, se encuentran estrechamente implicados en la plasticidad. Esto último interviene en gran medida tanto en la memoria como en el aprendizaje, ya que permiten la puesta en marcha de cambios sinápticos necesarios para el desarrollo de ambos procesos (Wang y Reddy, 2017).

El hipocampo es la estructura cerebral encargada de recibir las aferencias necesarias para hacer posible el desarrollo de la memoria explícita, que es aquella relacionada con el almacenamiento consciente de la información (Fell *et al.*, 2006). Esto es posible por la existencia de 3 vías principales (Figura 4): la vía perforante (con proyecciones desde la corteza entorrinal hasta el giro dentado), la vía de las fibras musgosas (compuesta por los axones de las células granulosas que se dirigen a la zona CA3) y la vía colateral de Schaffer (que consiste en células colaterales excitadoras de la zona CA3 y que terminan en CA1) (Kandel, 2001).

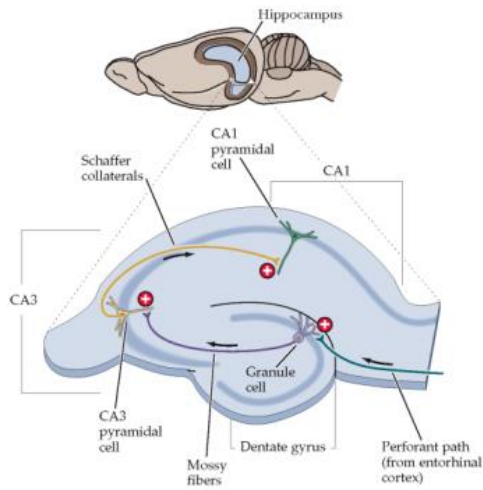


Figura 4. Esquema de las 3 vías aferentes del hipocampo: la vía perforante, la vía de las fibras musgosas y la vía colateral de Schaffer (Ortega, 2010).

Para que pueda darse la formación de la memoria es necesario que se produzcan cambios en la eficiencia sináptica, los cuales permitan un aumento de la potencia de conexión entre las neuronas (Lynch, 2004). Esto es en lo que consiste la LTP (Potenciación a largo plazo, en inglés *Long term potentiation*) que puede definirse como un aumento mantenido de la eficacia de la transmisión sináptica que tiene lugar después de la aplicación de estímulos de alta frecuencia en una vía aferente (Ortega Loubon y César Franco, 2010).

Como se muestra en la Figura 5, en condiciones basales la transmisión sináptica es mediada por los receptores AMPA. No obstante, cuando se producen periodos donde los estímulos son de alta intensidad, los receptores NMDA se activan, aumenta el calcio intracelular de la neurona postsináptica y tiene lugar la inducción de LTP (Lynch, 2004; Hsieh *et al.*, 2006). La entrada de Ca^{2+} a su vez,

activa las quinasas Calmodulina quinasa II (CAMKII), Proteinkinasa C (PKC) y la Tirosinquinasa Fyn. Además, CAMKII y PKC fosforilan los receptores AMPA haciendo que su sensibilidad hacia el glutamato aumente. De esta manera, se favorece el mantenimiento de la LTP por activación de canales de receptores silentes (Ortega Loubon y César Franco, 2010). Por su parte, el NO activado por las quinasas dependientes de calcio ya citadas, también contribuye a la persistencia de la LTP, ya que permite el aumento de liberación de glutamato por parte de la neurona presináptica (Machado *et al.*, 2008).

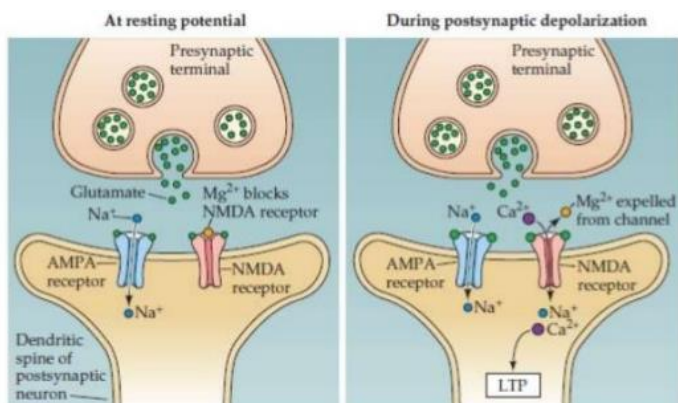


Figura 5. Esquema del comportamiento de los receptores NMDA antes y durante la despolarización de la membrana postsináptica en la formación de la LTP (Nicol et al, 1988).

Por otro lado, si la actividad sináptica es baja, la estimulación de los receptores NMDA puede producir lo contrario e inducir LTD (Long term depression). Esto podría conducir a la eliminación de receptores AMPA postsinápticos y pérdida dendrítica (Malenka y Bear, 2004; Hsieh *et al.*, 2006).

1.1.4. Excitotoxicidad.

El término excitotoxicidad se refiere a la capacidad del glutamato para matar a las neuronas y fue empleado por primera vez por Olney en 1986 (Olney, 1986). Se pueden distinguir dos sucesos: el edema celular, originado por el acúmulo de cloro, agua y sodio; y la degeneración y muerte neuronal, producida principalmente por la sobreestimulación de los receptores NMDA (Gazulla y Cavero-Nagore, 2006). La enfermedad más estudiada en la que se produce excitotoxicidad es la isquemia cerebral. En ella se ha demostrado, que en primer lugar se produciría un fallo en la membrana plasmática por afectación de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y compromiso de ATP, lo cual a su vez compromete el funcionamiento de los transportadores de glutamato y del ciclo glutamato-Glutamina que tiene lugar en los astrocitos (Gazulla & Cavero-Nagore, 2006). De esta manera, la concentración de glutamato en el medio extracelular se eleva y se produce una sobreestimulación de los receptores NMDA (Castilho, Ward, & Nicholls, 2001; Hu, Fernstrom, & Goldsmith, 1998), permitiendo así la entrada masiva de Ca^+ al citosol y a la mitocondria de la neurona postsináptica (Meldrum & Garthwaite, 1990). Esto hace que se activen enzimas como la Fosfolipasa A_2 (PP2A) y la Calcineurina que promueven la eliminación por endocitosis de los receptores NMDA, tras la fosforilación de su subunidad NR2B, y de los receptores AMPA (Tu, Okamoto, Lipton, & Xu, 2014). Todo este mecanismo deriva en el daño de estructuras postsinápticas y muerte neuronal (Castilho, Ward y Nicholls, 2001), con compromiso de la

actividad mitocondrial e inducción de apoptosis mediada por la Caspasa 3.

A su vez, la activación de la fosfolipasa A₂ produce ácido araquidónico que promueve la inhibición de recaptación de glutamato y el aumento de su liberación, alimentando así un círculo vicioso que conlleva de nuevo al aumento de las cantidades de Ca⁺ intracelulares. Además, la producción de radicales libres también contribuye al mantenimiento de este proceso, ya que fomenta la activación de la fosfolipasa A₂ (Gazulla & Caverro-Nagore, 2006).

A diferencia de lo que se pensó en un principio, la excitotoxicidad no es exclusiva de patologías agudas cerebrales, sino que está descrito igualmente en diversas enfermedades degenerativas del SNC como son la Enfermedad de Huntington o en la enfermedad de Alzheimer (Choi, 1988).

1.1.5. El glutamato monosódico (GMS).

El glutamato monosódico (GMS) es la sal sódica del L-glutamato (Beyreuther et al., 2007). Actualmente, se sintetiza a partir de la hidrólisis ácida o enzimática de proteínas o mediante la purificación por fermentación de melazas de caña de azúcar, de remolacha azucarera, almidón y azúcar de maíz (Nutrition, 2003). El GMS en su forma libre actúa como potenciador de sabor en los alimentos, aunque sólo el isómero L y cuando no está unido a otros aminoácidos formando proteínas (Zanfirescu *et al.*, 2017), produciendo un sabor característico conocido como “umami”, el cual se piensa que induce al consumo de proteínas (Bak, Schousboe y Waagepetersen, 2006; Lopez-Miranda *et al.*, 2015).

Este aditivo alimentario es muy utilizado en la elaboración de comida procesada en alimentos como salsas, sopas o pizza, y se corresponde con el código E621. La cantidad añadida en estos casos es de entre un 0,1 y 0,8% del peso total del alimento, lo que supone la misma cantidad de GMS libre que puede encontrarse de manera natural en varios alimentos como son el tomate, queso parmesano, sardinas, almejas, nueces o la patata (Rhodes *et al.*, 1991). Sin embargo, su uso en aceites y grasas emulsionadas, pasta, leche, chocolates y zumos de fruta no está permitido (Beyreuther *et al.*, 2007). A continuación, en la Tabla 1 se presentan algunos alimentos con las cantidades de glutamato que podemos encontrar en alimentos de consumo habitual.

| Contenido de glutamato en la comida de forma natural | | |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| | Glutamato unido a proteínas (mg/100g) | Glutamato libre (mg/100g) |
| Leche y productos lácteos | | |
| Leche de vaca | 819 | 2 |
| Leche humana | 229 | 22 |
| Queso parmesano | 9847 | 1200 |
| Productos derivados de aves de corral | | |
| Huevo | 1583 | 23 |
| Pollo | 3309 | 44 |
| Pato | 3636 | 69 |
| Carne | | |
| Vaca | 2846 | 33 |
| Cerdo | 2325 | 23 |
| Pescado | | |
| Bacalao | 2101 | 9 |
| Caballa | 2382 | 36 |
| Salmón | 2216 | 20 |
| Vegetales | | |
| Guisantes | 5583 | 200 |
| Maíz | 1765 | 130 |
| Remolacha | 256 | 30 |
| Zanahoria | 218 | 33 |
| Cabolla | 208 | 18 |
| Espinacas | 289 | 36 |
| Tomate | 238 | 140 |
| Pimiento verde | 120 | 32 |

Tabla 1. Cantidad de glutamato en alimentos unido a proteínas y libre. Cantidad de glutamato presente en algunos alimentos, tanto en su forma libre como formando parte de las proteínas presentes en ellos. Disponible en: <https://www.businessinsider.com/foods-with-natural-msg-2017-2?IR=T>

Según la FDA (*Food And Drug Administration*) de Estado Unidos, una persona puede ingerir diariamente 13 gramos de glutamato que se encuentran de manera natural formando parte de las proteínas de los alimentos (U.S. Food and Drug Administration., 2012). En cuanto al consumo por persona de GMS como aditivo, nos encontramos con una gran variabilidad, ya que se estima que en Europa el consumo medio es de 0,3-0,5 g/día mientras que en Asia es de 1,2-1,7 g/día. En cambio, si se tiene en cuenta el consumo máximo que algunas personas pueden llegar a tomar, la cifra asciende a 1 g/día en Europa y en el caso de Asia puede llegar hasta los 4 g/día (Beyreuther et al., 2007). Además, está descrito que en una sola comida donde se ingieren productos con alto contenido en glutamato, es posible llegar a consumir 5 g de GMS (Yang *et al.*, 1997). Actualmente, el GMS es considerado un aditivo “sano” y apto para su consumo. La FDA lo afirmó en 1958 (U.S. Department of Health and Human Services, 2009) y posteriormente, en 1991, lo hicieron organizaciones como la WHO (The World Health Organization) o la *European Commission's Scientific Committee for Food*, indicando además que no es necesario fijar una cantidad diaria recomendada para su consumo (JECFA, 1988; Commission of the European Communities, 1991). En 1995, de nuevo se confirma esta idea por la FDA, a través de la FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology), (Raiten, Talbot y Fisher, 1995).

No obstante, existe controversia al describirse una serie de síntomas, a los cuales se les ha denominado “Síndrome del restaurante chino”, que aparecen en algunas personas después de la ingesta de comida típica china, apuntando hacia el GMS como causante de los mismos.

Este síndrome, al que más tarde se le llamó “Complejo sintomático del GMS”, (Geha *et al.*, 2000) fue descrito por primera vez por Kwok en 1968, y se le relaciona con la aparición de síntomas como entumecimiento en la parte posterior del cuello, dolor de cabeza, sensación de presión en la cara y en el pecho, palpitaciones o debilidad general (Kwok, 1968). No obstante, este trabajo en la actualidad es controvertido, ya que se cuestiona si los efectos observados podrían deberse a un aumento de la tensión arterial por el sodio (Niaz, Zaplatic y Spoor, 2018).

Además, se ha visto que la ingesta de GMS puede causar o empeorar el asma, urticaria, dermatitis atópica, el malestar abdominal, las neuropatías y la arritmia ventricular. A pesar de todo, todavía existe debate al respecto y no hay resultados concluyentes que señalen que el GMS cause efectos adversos en aquellos que lo consuman (Morselli y Garantini, 1970; Geha *et al.*, 2000).

El tracto gastrointestinal supone la vía de entrada del glutamato presente en la dieta, tanto en su forma libre como ligado a proteínas, y por lo tanto, la primera barrera de control en el organismo. En cuanto a su absorción en el intestino, el glutamato participa en el mantenimiento de su actividad, ya que actúa como combustible para la metabolización de proteínas y es el precursor de moléculas de la mucosa intestinal. La microbiota intestinal es capaz de sintetizarlo por sí misma a partir de Glutamina, y además mediante la participación de la enzima GAD puede producir GABA a partir de él. Gracias a la gran capacidad presentada por el intestino para el metabolismo de este aminoácido, las concentraciones de glutamato en plasma pueden ser controladas y mantenerse bajas (Tomé, 2018).

1.2. La enfermedad de Alzheimer (EA)

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa y supone la forma más común de demencia entre la población anciana (Tu *et al.*, 2014). La alteración o muerte de neuronas que intervienen en el funcionamiento cognitivo da lugar a cambios citológicos, histológicos e inmunohistoquímicos característicos (Gaugler, James y Johnson, 2016), que siguen una determinada distribución en el cerebro diferente a la observada en el envejecimiento normal (F. Allegri *et al.*, 2011). Esta pérdida neuronal tiene lugar sobre todo en zonas de asociación del neocórtex, corteza entorrinal y en la formación hipocampal (Figura 6) (Gazulla y Cavero-Nagore, 2006), siendo la corteza entorrinal y el hipocampo las estructuras que más tempranamente se ven afectadas (Moodley y Chan, 2014).

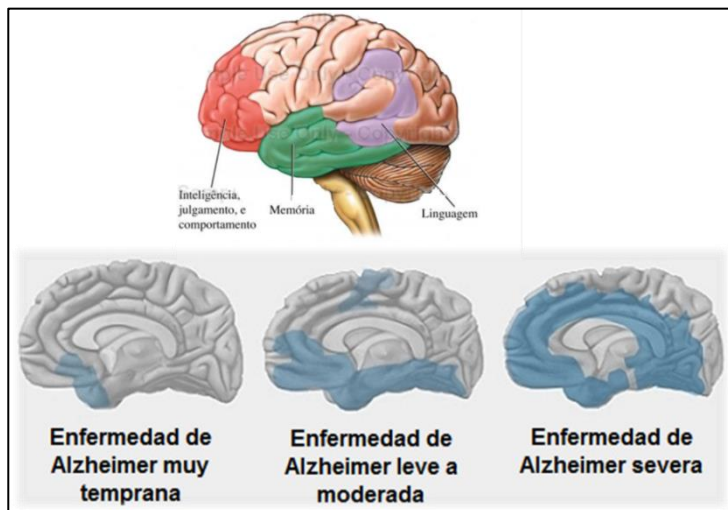


Figura 6. Esquema de la progresión de la EA en el cerebro
(Fuente: National Institute of Health, EEUU).

Clínicamente se caracteriza por presentar una pérdida de memoria y disfunción cognitiva progresiva, que hace que la persona cada vez vea más limitadas sus Actividades de la Vida Diaria (AVD) (Tu *et al.*, 2014).

El doctor Alois Alzheimer fue el primero en describir esta enfermedad en el año 1907. Este psiquiatra alemán describió el caso de una paciente de 51 años, Auguste Deter, la cual sufría una serie de alteraciones cognitivas progresivas características de las demencias seniles. Tras realizar un análisis *post mortem* del cerebro de la paciente, éste describió por primera vez dos lesiones histopatológicas. Una fue la presencia de depósitos de una sustancia en la corteza cerebral a los que denominó *miliary foci*, y que más tarde pasó a conocerse como placas amiloides. La otra fue la presencia de condensaciones de fibrillas intracelulares, a las que describió como “degeneración neurofibrilar” (Maurer, Volk y Gerbaldo, 1997). Estos dos eventos, depósitos de péptido A β y ovillos neurofibrilares (ONF), forman las dos principales características de la EA (Querfurth y LaFerla, 2010).

En cuanto a la esperanza de vida, se estima que a partir del diagnóstico las personas pueden llegar a vivir hasta 20 años, aunque siempre se ha de tener en cuenta las condiciones individuales de salud así como la edad del individuo (Tu *et al.*, 2014).

1.2.1. Epidemiología

En la actualidad, los avances en la medicina moderna han hecho posible que tenga lugar un gran aumento de la esperanza de vida y,

esto a su vez, ha producido un incremento de la población de adultos mayores en nuestra sociedad. Un ejemplo de ello es que en el año 1950 se estimaba que el número de personas de edad superior a los 60 años era de 205 millones (Organización Mundial de la Salud, 2013); en el año 2000 según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número ascendió hasta los 600 millones de individuos y en el año 2015 según la Alzheimer's Disease International Association (ADI) la cifra alcanzó los 900 millones (Martin Prince et al., 2015) .

En consecuencia, se ha incrementado el número de una serie de enfermedades asociadas al envejecimiento, como es el caso de la demencia, de la que se debe tener en cuenta que, aunque afecta principalmente a los ancianos, no forma parte de un proceso de envejecimiento normal (Organización Mundial de la Salud, 2013).

La EA por su parte, es la demencia más común entre la población anciana (Tu *et al.*, 2014), representando entre un 50%-75% de la totalidad (Martin Prince *et al.*, 2015). Según las estadísticas, la EA es una de las enfermedades que tuvo un crecimiento más rápido en el periodo entre 1990 y 2013 (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015). En el año 2006 el número de personas con EA era de 26,6 millones y se estima que en el año 2050 las cifras aumenten hasta los 106,8 millones (Brookmeyer *et al.*, 2007). La máxima prevalencia se encuentra en Norte América y el Este de Europa (6,4% y 5,4% respectivamente), seguida de América Latina (4,9%) y China (4%). Mientras, la incidencia es de 10,5 casos/1000 habitantes en Norte América, 8,8 casos/1000 habitantes en el Este de Europa, 9,2 casos/1000 habitantes en Latino América y 8 casos/1000 habitantes en China (Mayeux y Stern, 2012). Además, como vemos

en la Figura 7, es importante destacar que la incidencia de la EA se ve incrementada con la edad, ya que según los registros tomados hasta 2006, la cifra para el rango de edad de entre 50-59 años es de 1,98 y pasa a ser de 39,31 para personas mayores de 80 años (Cornutiu y Cornutiu, 2015).

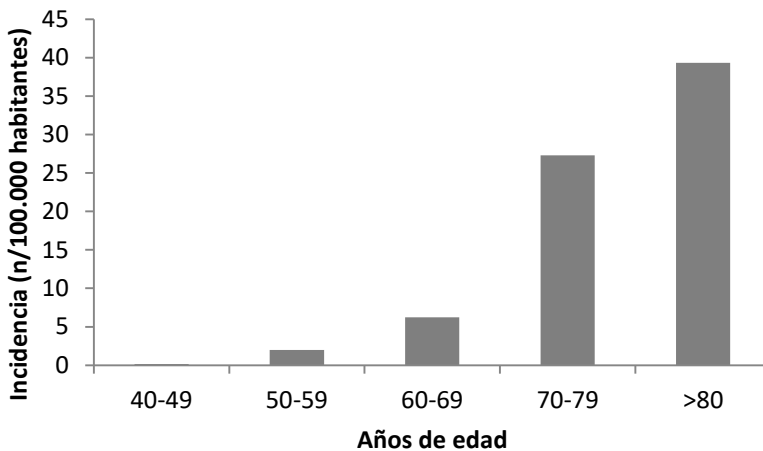


Figura 7. Incidencia de EA según rangos de edad (Cornutiu, 2011).

En cuanto a las diferencias entre género, existe una mayor prevalencia en el género femenino, ya que las mujeres representan dos tercios de los pacientes de EA (Hebert *et al.*, 2013). Es de gran importancia recalcar que, aunque estudios han demostrado que la incidencia entre hombres y mujeres es similar alrededor de los 60 años de edad, se sabe que en edades más avanzadas la incidencia en el sexo femenino se hace superior. Esto se piensa que es debido a la

pérdida del efecto protector de los estrógenos que se produce con la edad en mujeres (Viña, Viña y Lloret, 2010; Pike, 2017).

1.2.2. Etiología y fisiopatología de la EA.

Según su forma de aparición, existen dos tipos distintos de EA: la EA familiar y la esporádica. La forma familiar supone del 1 al 10% de los casos, y los síntomas aparecen en edades muy tempranas, alrededor de los 50 años de edad (Bird, 1993; Bateman *et al.*, 2011). En ella pueden tener lugar mutaciones en 3 genes distintos: en la proteína precursora de amiloide (APP), presenilina 1 (PS1) y presenilina 2 (PS2) (Bateman *et al.*, 2011). La forma esporádica es la más frecuente de la enfermedad (del 99 al 90% de los casos), sucede a partir de los 65 años y en ella se piensa que intervienen tanto factores genéticos, los cuales suponen aproximadamente un 70% del riesgo a padecer EA, como ambientales (Duara *et al.*, 1993; Verghese, Castellano y Holtzman, 2011). En este caso, el gen Apoε4 es el genotipo al que más riesgo se le atribuye para el desarrollo de la enfermedad (Roses, M.D, 1996; Verghese, Castellano y Holtzman, 2011).

Macroscópicamente el tejido cerebral se reduce, produciéndose un ensanchamiento de los surcos y una disminución de los pliegues cerebrales, además de un aumento en el tamaño de los ventrículos (Figura 8) (Bright Focus Foundation, 2000). No obstante, tal y como se ha nombrado anteriormente, las lesiones principales son la formación extracelular de placas por acúmulo de péptido Aβ y la formación de ONF intracelulares producidos por la hiperfosforilación

de la proteína Tau (Ballatore, Lee y Trojanowski, 2007; Querfurth y LaFerla, 2010).



Figura 8. Esquema de un corte transversal de un cerebro. A la izquierda se representa un cerebro sano y a la derecha un cerebro con Alzheimer. Fuente: <http://www.redpublicadominicana.com/ciencia/prevenir-el-alzheimer/attachment/atrofia-cerebral-en-alzheimer/>

En cuanto al origen de la enfermedad, la hipótesis amiloide es la teoría más aceptada en la actualidad, a pesar de que recientemente se está poniendo en duda su prevalencia (Hardy y Selkoe, 2002). A continuación, se explicará con detalle.

1.2.3. El péptido A β y su depósito en placas.

El péptido A β , constituido por 36-43 aminoácidos, es un producto natural de la proteólisis de la proteína APP. No obstante, en situaciones patológicas como es el caso de la EA, el procesado de la APP da lugar a monómeros de 40-42 aminoácidos que tienden a

agregarse y son difíciles de eliminar por el organismo. Como se muestra en la Figura 9, se pueden distinguir dos vías en las que tiene lugar el procesamiento de la APP: la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica. En este proceso intervienen las secretasas α , β , y γ , que serán las que determinen con su actuación el seguimiento de una vía u otra de metabolización (Querfurth y LaFerla, 2010). La γ -secretasa es un complejo multiproteico formado por 4 proteínas: Presenilina 1 y 2, Nicastrina y *Presenilin enhancer-2* (Pen-2), y participa en el corte de APP en ambas vías (Patterson, 2008).

En la vía no amiloidogénica, interviene en primer lugar la α -secretasa, que se encargará del procesamiento de la APP, la cual se encuentra anclada en la membrana celular. En este caso, como productos de la catabolización se libera al espacio extracelular una proteína precursora de amiloide larga (sAPP α), y permanece en la membrana celular un fragmento carboxilo terminal C83. A continuación, este último es procesado por la γ -secretasa, originando un péptido corto y soluble llamado p3, que queda en el medio extracelular pero que no forma agregados (Querfurth y LaFerla, 2010), y el llamado dominio intracelular de amiloide (AICD) que actúa como señalizador de activación de la transcripción.

En la vía amiloidogénica, la APP es procesada por la β -secretasa 1 (BACE-1), dando como resultado el fragmento sAPP β en el medio extracelular, y el fragmento C99 que queda anclado en la membrana celular. Seguidamente, la γ -secretasa actúa sobre C99 y como resultado se obtiene AICD intracelular y A β 40-42, muy difícil de eliminar y que tenderá a formar agregados en el espacio extracelular (Querfurth y LaFerla, 2010; Danysz y Parsons, 2012).

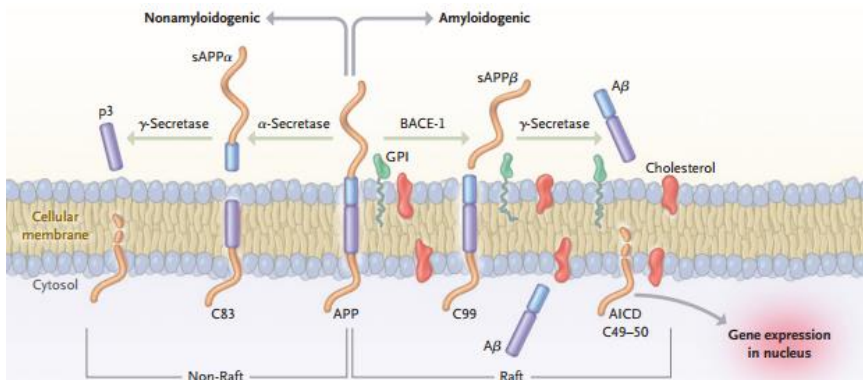


Figura 9. Transformación de la Proteína precursora de Amiloide (Querfurth, LaFeria 2010).

La agregación de este péptido comienza con la formación de fibrillas tóxicas de una longitud de 6-10 nm, que van construyendo un entramado que finalmente da lugar a las placas insolubles de Aβ, por medio de un mecanismo que todavía no es del todo conocido (Figura 10) (Muñoz López, 2001).

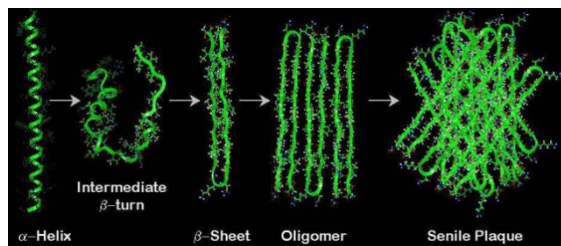


Figura 10. Formación de estructuras intermedias de Aβ y placas seniles visualizadas con la técnica espectroscópica de dicroísmo circular (García Pérez 2011).

Estas placas extracelulares consisten en unas estructuras esféricas de entre 50 y 200 μm de diámetro (Iwatsubo *et al.*, 1994) constituidas además de por Aβ por la apolipoproteína E (ApoE), clusterina, iones de cinc, cobre y hierro, varios componentes de la matriz extracelular,

componente amiloide P, antiqumiotripsina β 1 y catepsina D (Dickson y Weller, 2012).

Tanto a las placas seniles como a la forma soluble de A β se les relaciona con la producción de radicales libres e inducción de apoptosis (Lloret *et al.*, 2008). Además, A β fomenta la peroxidación de lípidos, afectando así al funcionamiento de los canales iónicos dependientes de ATP, de los transportadores de glucosa y de los transportadores de glutamato. Todo ello promueve la vulnerabilidad de las neuronas ante procesos de excitotoxicidad, facilitando la puesta en marcha de mecanismos que derivan en apoptosis (Guyton y Hall, 2011; Wang *et al.*, 2013). A β además, interviene en la funcionalidad electrofisiológica de los receptores NMDA. Esto es debido a que el péptido es capaz de incrementar los niveles de uno de los co-agonistas del glutamato, la D-Serina, necesario para que el neurotransmisor pueda activar estos receptores. Como consecuencia, se acaba produciendo pérdida sináptica por sobreestimulación de los receptores NMDA (Wang y Reddy, 2017). A β también induce la liberación de glutamato de los astrocitos, contribuyendo a su acumulación (Abramov *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2014).

La aparición de este péptido ya se produce durante la fase preclínica de la EA, en la cual no se pone de manifiesto el deterioro cognitivo (Dubois *et al.*, 2016). De hecho, su acumulación se ha relacionado con la afectación de la actividad del sistema cerebro-cerebelar incluso en personas mayores sanas con un estado cognitivo normal (Steininger *et al.*, 2014).

1.2.4. La proteína Tau y la formación de ONF.

Tau es una proteína perteneciente a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) que se encuentra expresada principalmente en las neuronas de los mamíferos. Se localiza en los axones neuronales, donde se une a la superficie de los microtúbulos formando puentes entre las fibras de tubulina, contribuyendo así a su ensamblaje y estabilización (Binder, 1985; Alberts *et al.*, 2008). Su actividad en condiciones fisiológicas es regulada por una serie de quinasas que se encargan de su fosforilación, ya sea en el sitio de unión con los microtúbulos o en punto cercanos (Johnson y Stoothoff, 2004; Gong y Iqbal, 2008).

La regulación de la acción de quinasas y fosfatasas sobre Tau, así como el sitio de fosforilación, determinan la funcionalidad biológica de la proteína, pudiendo llegar a tener un papel patológico como sucede en la EA (Gong y Iqbal, 2008). A pesar de que son múltiples las quinasas que tienen la capacidad de fosforilar a la proteína Tau (ver Tabla 2), nos centraremos en el papel de la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), ya que tiene una gran importancia en nuestro estudio.

Cdk5 es una proteína serina/treonina quinasa que pertenece a una familia de quinasas caracterizadas por la necesidad de asociarse a una ciclina para llevar a cabo su actividad enzimática (Manning *et al.*, 2002) y es una de las principales quinasas que intervienen en la fosforilación de la proteína Tau (Maccioni, 2001). Cdk5 se distingue del resto de las quinasas por activarse, además de por la ciclina I, por proteínas que no son ciclinas como p39 y p35. Otra de sus

particularidades es que es la única de las quinasas que cuenta con factores de transcripción, moléculas de señalización y proteínas citoesqueléticas como sustratos (Askew *et al.*, 2017).

| Sitio | Cinasas | notas |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| S46P ^a | ERK2, p38 | Identificado sólo por Anticuerpo en PHF |
| T175P ^a | ERK2, JNK, p38, GSK3β | Identificado en PHF |
| T181P ^a | TPKII, ERK2, JNK, p38, GSK3 GSK3β | Identificado en PHF e isoforma fetal |
| S185 ^a | p38 | Identificado en PHF |
| S199P ^a | TPK1, GSK3β | Identificado en PHF e isoforma fetal |
| S202P ^a | TPKII, ERK2, JNK, p38 | Identificado en PHF e isoforma fetal |
| T205P ^a | TPKII, ERK2, JNK, p38 | Identificado por anticuerpos en PHF |
| T212P ^a | TPKII, ERK2, JNK, p38 | Identificado en PHF |
| S214 ^a | Cinasa p110, PKA | Afecta la interacción con microtúbulos. PKA, fosforila sólo la isoforma que contiene 3 de las 4 secuencias repetidas. Sitio implicado en los primeros pasos en la conversión de tau normal a tau en EA |
| T217P ^a | TPKII, ERK2, JNK, p38, GSK3β | Identificado en PHF e isoforma fetal |
| T231P ^a | ERK2, JNK, p38, GSK3β | Característica específica de PHF-tau y marcador bioquímico para diagnóstico de EA. La fosforilación de este sitio provoca máxima inhibición de unión a microtúbulos porque se localiza en el primer dominio de unión a éstos. Identificado en PHF e isoforma fetal |
| S235P ^a | ERK2, JNK, p38, GSK3β | Característica específica de PHF-tau y marcador bioquímico para diagnóstico de EA. Identificado en PHF e isoforma fetal. |
| T245 ^a | p38 | |
| S262 | Cinasa p110, proteína cinasa II dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina, (CaMKP II), (MAP), | Afecta la interacción con microtúbulos. Sitio localizado en la región R1. |
| S285 | | Localizada entre las regiones R1 Y R2 |
| S305 | p38 | Localizada entre las regiones R2-R3 |
| S324 | | Situado en la región R3 |
| S352 | | Situado en la región R4 |
| S356 | JNK, p38 | Identificado en PHF Sitio localizado en la región R4. |
| S396 Pro ^a | TPKII, ERK2, JNK, p38, GSK3β | Sitio crítico para el ensamble de microtubulos. Identificado en PHF e isoforma fetal. |
| S400 ^a | GSK3β | Identificado en PHF e isoforma fetal. |
| S404P ^a | TPKII, ERK2, p38, GSK3β | Sitio crítico para el ensamble de microtúbulos. Identificado en PHF e isoforma fetal. |
| S409 | PKA | Sitio implicado en las primeras fases de conversión de tau normal a tau en EA |
| S413 | GSK3β | |

Tabla 2. Sitios de fosforilación de Tau fuera de los dominios de unión a microtúbulos (García y Jay, 2004).

Se sabe que en la EA el exceso de calcio promueve el procesado del coactivador p35 y lo transforma en p25. Este último, forma un complejo con Cdk5 muy estable, lo que hace que la actividad de la quinasa sea superior a la fisiológica (Sato *et al.*, 2011).

El desbalance entre la fosforilación y defosforilación a favor de la primera, produce una hiperfosforilación de Tau (Figura 11), se incrementan los niveles de la proteína libre, no unida a microtúbulos, pudiéndose acumular en el cuerpo celular. Estos mecanismos derivan en agregación y fibrilación de Tau, en la alteración de la estructura del citoesqueleto, y dan lugar finalmente a la formación de los ONF (Dickson y Weller, 2012). Los ONF y las fibrillas están formadas por filamentos rectos de 15 nm y de filamentos helicoidales pareados de unos 22 nm de medida (Meraz-Ríos *et al.*, 2010). Todo ello supone una afectación del transporte axonal, lo que lleva a una disfunción sináptica y neurodegeneración neuronal (Ballatore, Lee y Trojanowski, 2007; Meraz-Ríos *et al.*, 2010).

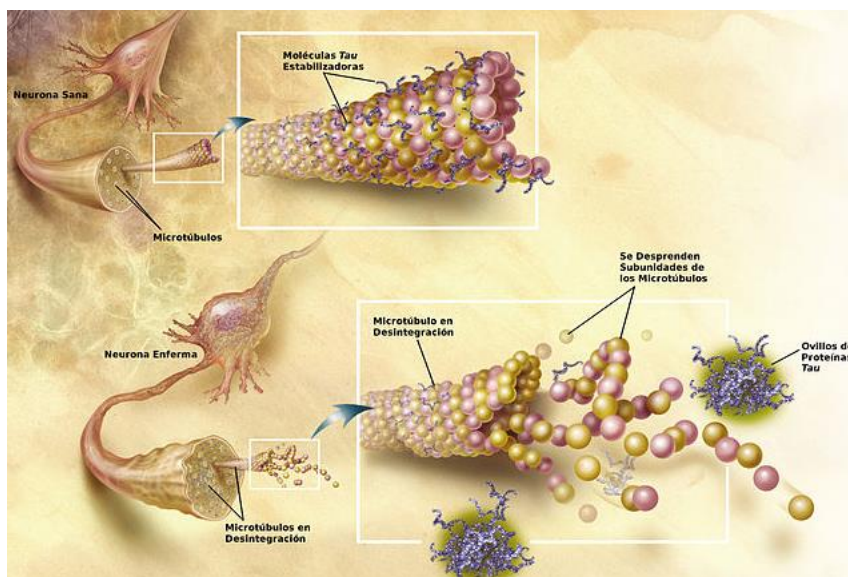


Figura 11. Esquema de la hiperfosforilación de Tau y formación de ONF. Fuente: <https://mariecuriesnews.wordpress.com/tag/enfermedad-de-alzheimer/>

En cuanto a su localización en la EA, se ha observado que los ONF comienzan a formarse en la corteza entorrinal, después aparecen en hipocampo, para extenderse más tarde hacia la neocorteza. Además, también se han detectado en el bulbo olfatorio desde fases tempranas de la enfermedad (Braak y Braak, 1990). Lo importante es que la evolución de esta lesión se correlaciona con los síntomas cognitivos de los pacientes, es decir, con la neurodegeneración.

1.3. EA y neurotransmisores.

Como estamos viendo, el proceso patológico asociado a la EA es complejo y abarca muchos niveles tanto anatómicos, celulares, como bioquímicos (Manzano Palomo, De la Morena Vicente y Barquero Jiménez, 2006). En este sentido, los neurotransmisores también se ven afectados, siendo claves en la disfunción sináptica y finalmente, en la funcionalidad cerebral. Funciones como el aprendizaje, la percepción, la afectividad o la fase REM del sueño, dependen de proyecciones axonales dopaminérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas o colinérgicas, por lo que alteraciones en los niveles de alguno de estos neurotransmisores podrían ocasionar afectación en alguna de las capacidades del Sistema Nervioso (Manzano Palomo, De la Morena Vicente y Barquero Jiménez, 2006).

En cuanto a su implicación en la fisiopatología de la EA, los neurotransmisores que juegan un importante papel en su desarrollo son: la ACh, el GABA, la serotonina, la histamina, el glutamato, y la arginina (Snyder y Innis, 1979; Kandimalla y Reddy, 2017).

Varios estudios han demostrado que en la EA existe una reducción del sistema colinérgico (Manzano Palomo, De la Morena Vicente y Barquero

Jiménez, 2006). En pacientes que padecían esta enfermedad, se han encontrado déficits en su actividad debido a la degeneración de neuronas colinérgicas, la cual conduce a la reducción de la liberación de ACh (Strac, Muck-Seler y Pivac, 2015). De hecho, algunos autores han defendido la hipótesis colinérgica de la EA, ya que a finales de la década de los setenta se le dio mucha importancia al papel de la ACh en los procesos de aprendizaje y memoria. No obstante, esta hipótesis fue perdiendo fuerza debido a la controversia encontrada en la instauración de esa afectación del sistema colinérgico; algunos autores defendían una aparición temprana en la enfermedad y otros señalaban que ésta se producía paulatinamente (Perry, 1980; Court y Perry, 1991). También, se ha descrito una disminución de los receptores para este neurotransmisor, relacionada con la aparición de cambios histopatológicos, como la formación de placas de A β y ONF, característicos de la EA (Strac, Muck-Seler y Pivac, 2015).

Por otro lado, los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico, son otros afectados en la EA, aunque lo hacen de manera menos marcada que la acetilcolina (Manzano Palomo, De la Morena Vicente y Barquero Jiménez, 2006). La noradrenalina, se piensa que puede ser uno de los cambios tardíos de la EA, aunque se ha observado una disminución en las enzimas implicadas en su formación, con tendencia a correlacionarse con el aumento del número de placas seniles, los resultados todavía son controvertidos (Bondareff, Mountjoy y Roth, 1982). Por su parte, al sistema serotoninérgico se le implica en procesos como la depresión, comportamientos suicidas, agresividad o el aprendizaje (Lai *et al.*, 2003). En algunos estudios se ha demostrado que la instauración de un estado de inflamación cerebral puede dar lugar a la alteración del metabolismo

de la serotonina y reducir sus niveles, algo que se ha relacionado con el comportamiento depresivo y parece estar implicado en la EA (Jose *et al.*, 2016). Otro de los hechos que relacionan la reducción de serotonina con los cambios comportamentales dados en personas con EA, es la reducción de receptores postsinápticos observados en algunos pacientes (Lai *et al.*, 2003).

Por otro lado, la histamina es un neurotransmisor implicado en el proceso de la neurogénesis y cuyos niveles se encuentran también reducidos en la EA, contribuyendo a la afectación del aprendizaje y de la memoria (Zlomuzica *et al.*, 2016). Se ha demostrado, que la liberación de histamina cerebral, producida por el uso de antagonistas de sus receptores, podría contribuir a la mejora de la memoria por medio de la activación de los receptores NMDA. Aunque es necesario continuar con la investigación respecto a ello, se piensa que puede llegar a ser una terapia que mejore la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas como la EA (Alachkar *et al.*, 2019).

Finalmente, el glutamato y GABA por su parte, tienen un importante papel en la modulación del SNC, ya que son los neurotransmisores excitatorio e inhibitorio, respectivamente, más abundantes. Ambos se encuentran implicados en el desarrollo de las funciones cognitivas (Huang *et al.*, 2017) y, en relación al Alzheimer, se piensa que la alteración en la concentración de los mismos y la acumulación de A β están vinculadas (Ulrich, 2015). Incluso en adultos sin demencia se ha observado cambios en la actividad cerebral relacionada con alteraciones en los niveles tanto de GABA como de glutamato (Quevenco *et al.*, 2019). En la EA se sabe que la funcionalidad de GABA se encuentra disminuida, y que por tanto su capacidad inhibitoria se ve alterada. No obstante, existe controversia en

los resultados referente a ello, ya que en algunos estudios *postmortem* se ha visto que las células GABAérgicas se conservan. Otras investigaciones señalan haber encontrado, en tejido *postmortem* reconstituido, un aumento seguido de una disminución de GABA, que podría ser el resultado por la coexistencia de una respuesta compensatoria frente a un proceso degenerativo (Ulrich, 2015).

En cuanto al glutamato, y como venimos comentando en la presente tesis, en la EA su liberación presináptica se vuelve excesiva y los sistemas de recaptación fallan. Como consecuencia, se produce una sobreestimulación de los receptores NMDA, dando lugar a la puesta en marcha de una secuencia de mecanismos fisiopatológicos (Revett *et al.*, 2013). De hecho, la memantina, antagonista de los receptores NMDA, es una terapia establecida para el tratamiento de la EA. Esto es debido a que actúa bloqueando los receptores impidiendo que el glutamato los active y por lo tanto, evita la entrada de calcio en el interior de la célula con la consecuente pérdida sináptica (Talantova *et al.*, 2013; Kishi *et al.*, 2017).

1.4. La barrera hematoencefálica en la EA.

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura formada por células endoteliales conectadas entre sí mediante uniones estrechas (en inglés, “tight-junction”), que recubren los capilares cerebrales (Abbott, 2005) y que están provistas de una capa luminal y una abluminal (Figura 12) (Daneman & Prat, 2015). Constituye una medida muy importante para la protección del SNC, ya que mantiene separados el contenido de la sangre circulante del líquido intersticial cerebral (Bartanusz *et al.*, 2011). La

difusión molecular es controlada por su membrana lipídica, que permite la entrada de pequeñas moléculas hidrofílicas y algunos iones, además de sustancias lipofílicas como son el etanol y ciertos fármacos. Por su parte, la presencia de receptores y canales de las capas luminal y abluminal, permiten el transporte de macromoléculas y proteínas a través de ella (Zenaro, Piacentino y Constantin, 2017). Existen dos tipos de transportadores encargados de la regulación del paso de iones y moléculas a través de la BHE: los transportadores de flujo y transportadores de nutrientes. Muchos de estos últimos están localizados en la capa luminal de la BHE, e impiden el paso de pequeñas moléculas lipofílicas. Para el paso de sustratos en contra del gradiente de concentración, utilizan el ATP generado por hidrólisis. Los transportadores de flujo por su parte, facilitan el paso de nutrientes específicos, desde la sangre hacia el SNC, a través de la BHE a favor de su gradiente de concentración. Es el caso de la glucosa, el piruvato y el lactato por ejemplo. Estos transportadores son utilizados con fines terapéuticos para la introducción de fármacos en el SNC (Daneman y Prat, 2015). Por otro lado, la intervención de enzimas tiene un importante papel, ya que se encargan de la metabolización de sustancias que podrían resultar nocivas para el SNC (el-Bacha y Minn, 1999).

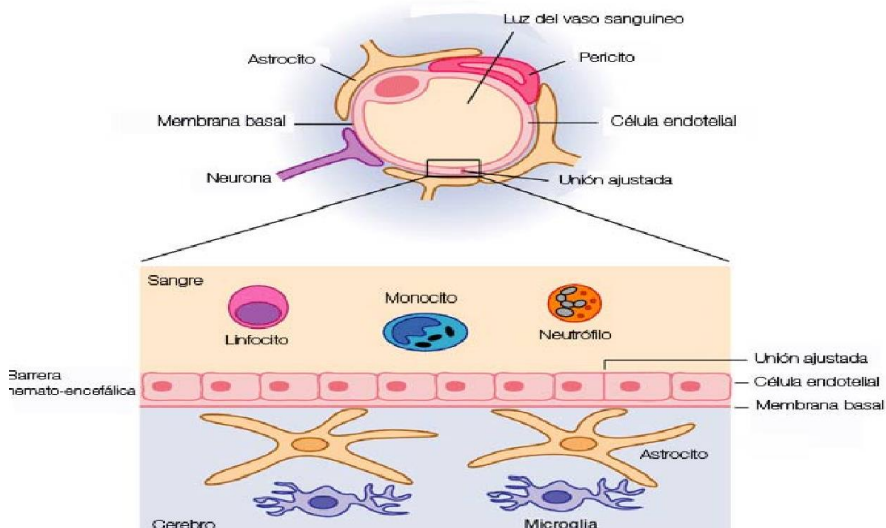
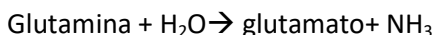


Figura 12. Esquema de la Barrera Hematoencefálica. Fuente: <http://drogasyfarmacos.blogspot.com/2012/01/barrera-hematoencefalica.html>

En cuanto al glutamato, importante en nuestro trabajo, no es capaz de entrar al cerebro atravesando la BHE, no obstante, en la zona donde se encuentra los órganos circunventriculares sí puede acceder, ya que esta región no cuenta con la capa de células endoteliales características de la BHE (Viña *et al.*, 1997; von Bernhardt, 2004). En cambio, la capa abluminal de la BHE cuenta con transportadores específicos que hacen posible el paso de glutamato desde el cerebro al torrente sanguíneo para su eliminación (Hawkins y Viña, 2016). Este transporte puede realizarse también en forma de Glutamina, que después será nuevamente transformada en glutamato siguiendo la siguiente reacción que tiene lugar en la mitocondria tal y como se ha explicado con anterioridad (Helms *et al.*, 2012; Sulkowski *et al.*, 2014):



encontrada en cerebros sanos (Sasaki *et al.*, 1986). Por el contrario, en fases tempranas de la enfermedad, se produce una acumulación del neurotransmisor en el medio extracelular, que es lo que da lugar a la excitotoxicidad. No está del todo claro qué desencadena este fenómeno, aunque se ha señalado hacia la isquemia prolongada como mecanismo generador. Como consecuencia de ello, tiene lugar un fallo de la membrana plasmática por compromiso de la bomba sodio-potasio-ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$), lo que hace que la función de los transportadores de glutamato se altere, se interrumpa el ciclo Glutamina-glutamato, y aumente la liberación de glutamato vesicular (Gazulla y Cavero-Nagore, 2006). A su vez, como se ha nombrado anteriormente, la liberación de glutamato es estimulada por la presencia del péptido $\text{A}\beta$, quien además eleva la cantidad de calcio intracelular. Esto hace que los receptores del glutamato sean eliminados por endocitosis, contribuyendo al acúmulo de glutamato y por lo tanto al compromiso de la LTP y a la pérdida sináptica (Ulrich, 2015).

Otra de las consecuencias del aumento del calcio intracelular y del exceso de glutamato, es la alteración mitocondrial. La entrada de calcio desde el citosol al orgánulo aumenta y además los iones Ca^+ acumulados en el interior de la célula inducen la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pores*). Esto último hace que la mitocondria se vuelva permeable a moléculas como el citocromo C o el factor inductor de apoptosis (Cabezas-Opazo *et al.*, 2015; Cassano *et al.*, 2016). Así, se desencadena la caída en la producción de ATP que conduce de nuevo a un aumento de Ca^+ poniendo en marcha un círculo vicioso, que deriva en disfunción mitocondrial, disminución del potencial de membrana y muerte por apoptosis (Cassano *et al.*, 2016).

El incremento de Ca^+ intracelular además, activa a la Calpaína (proteasa citoplasmática dependiente de Ca^+), la cual en condiciones fisiológicas interviene en la función sináptica y en la memoria. En la EA sabemos que se activa en exceso (Sato *et al.*, 2011; Cabezas-Opazo *et al.*, 2015; Cassano *et al.*, 2016) y afecta negativamente a la supervivencia neuronal. La Calpaína a su vez, escinde a p35 (coactivador de Cdk5 en condiciones fisiológicas) y los transforma en p25, formando un complejo Cdk5-p25 muy estable y de alta actividad, implicado en eventos patológicos. Este complejo fosforila sustratos necesarios para la supervivencia neuronal produciendo muerte neuronal y dando lugar a un estado de neurodegeneración (Sato *et al.*, 2011; Cortés *et al.*, 2019) . Otra de las proteínas a las que inhibe Cdk5-p25 es Cdh1, impidiendo la formación del complejo APC (Complejo de promoción de la anafase)/Cdh1, que es el regulador principal del ciclo celular (Qiao *et al.*, 2010). Además, en las neuronas (células que no entran en ciclo celular) también tiene un papel importante.

Se ha visto que APC/Cdh1 está implicado en funciones como el crecimiento axonal, diferenciación neuronal, neurogénesis, regulación de la plasticidad e inducción de la LTP y LTD. Nuestro grupo ha demostrado que la inhibición de Cdh1 disminuye la degradación de Glutaminasa, promoviendo su acumulación y por lo tanto, favoreciendo la producción de glutamato (Fuchsberger, Lloret y Viña, 2017).

Con todo lo expuesto anteriormente y en base a las evidencias experimentales comentadas, en esta tesis doctoral nos planteamos la siguiente hipótesis: la ingesta de GMS adelanta el inicio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la EA.

2. OBJETIVOS

1. Determinar si la ingesta de GMS al 0,5 y al 1% aumenta los niveles de A β (tanto en su forma depositada como soluble) en un modelo transgénico de EA.
2. Comprobar si la ingesta de GMS incrementa la fosforilación de la proteína Tau en los ratones.
3. Analizar si el consumo de GMS afecta a las enzimas cerebrales involucradas, tanto en la síntesis como en la degradación de A β (β -secretasa, α -secretasa, γ -secretasa, Nephelisa e IDE).
4. Determinar si la ingesta de GMS afecta a la expresión de la quinasa Cdk5, importante en la fosforilación de Tau, así como de sus reguladores p25/p35. Analizaremos además otras dianas de Cdk5, importantes en la fisiopatología de la EA, como son Cdh1 y Glutaminasa.
5. Medir cambios en la cantidad de receptores de glutamato AMPA hipocámpicos y la LTP evocada por la activación de los mismos, tras la ingesta de GMS.
6. Explorar si el suplemento con GMS produce un efecto en el comportamiento de los animales, en concreto en el aprendizaje y memoria espacial.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

- Agua destilada
- Agua MilliQ
- APS, *Sigma*
- THEMED, T9281, *Sigma*
- SDS, *Merck*
- Inhibidor de proteasas
- Ortovanadato
- Methanol 8402 JT Baker, Avantor.
- Reactivo Lowry: se añadió 40 ml de agua MilliQ al reactivo *Lowry Reagent Powder (L3540-1VL, Sigma)*, y se envolvió el recipiente con papel de plata para protegerlo de la luz. A continuación, se dejó en el agitador hasta disolverse.
- Reactivo Folin: se añadió 90 ml de agua MilliQ a 18 ml de solución *Folin & Ciocalteu's Phenol Regaent F9252-500ML* y se agitó hasta mezclar bien los componentes.
- Luminata Classico Western HRP Substrate. Lot 140935. *Millipore*
- Acrylamide/Bis Solution, 29:1 (40% w/v), 3.3% C. 10680.01 *Serva*.
- Isopropanol I8516, *Sigma*.
- Trizma base T6066, *Sigma*.
- Glycine G 8898, *Sigma*.
- Tween20
- Restore Western blot Stripping Buffer, 21059, *Thermo Scientific*.
- Paraformaldehído.

- Isoflorano, IsoFlo®, Provesa, Murcia.
- Eutanax (100 mg/kg), Dolethal Vetoquinol Madrid, España.
- Medio de montaje S3023, DAKO, Santa Clara, CA, USA.
- Tritón, T8787, Sigma Aldrich Co, USA.
- Suero de cabra, G9023 Sigma-Aldrich Quimica SL.
- Tampón Fosfato Salino (PBS). pH 7.4, 10010-056, *Gibco*.

3.1.2. Anticuerpos

- Anticuerpos primarios:
 - **α - tubulina:** sc-8035, *Santa Cruz Biotechnology*, 1:1000
 - **p-Tau:** MN1020, *Thermo Fisher*, 5-10 μ g/ml
 - **Tau (AB2):** 092402H, *Thermo Scientific*, 1:200
 - **p35/25:** 2680, *Cell Signaling Technology*, 1:1000
 - **Cdk5:** 2506, *Cell Signaling Technology*, 1:1000
 - **AMPA (GluR1):** 13185, *Cell Signaling Technology*, 1:1000
 - **NMDAR2A:** 4205, *Cell Signaling Technology*, 1:1000
 - **Cdh1:** NBP1-54465, *Novus biologicals*, 1:500
 - **A β (MOAB-2):** NBP2-13075 *Novusbiological*, 1:500
 - **Nicastrina:** N1660, *Sigma*, 1:1000
 - **Neprelisina:** ab9561, *abcam*, 1:1000
 - **ADAM10:** AB19026, *Millipore*, 1:500
 - **GLS1:** 12855-1-AP, *Proteintech*
 - **IDE:** ab133561, *abcam*, 1:1000
- Anticuerpos secundarios:
 - **Anti-Mouse :** 401215 *CALBIOCHEM*, 1:3000
 - **Anti- Rabbit:** 7074S *Cell signaling*, 1:3000

- **Alexa Fluor 488 anti-rabbit** : Cell Signaling Tech, 1:1000
- **Alexa Fluor 647 anti-mouse**: Cell Signaling Tech 1:1000

3.1.3. Tampones y soluciones.

- **Tris HCl [1M], pH 6.8.** Se pesaron 60,55g de Tris y se añadieron a 400 ml de agua destilada, ajustando su pH a 6.8 utilizando HCl. Una vez ajustado, se enrasó la solución hasta llegar a 500 ml de agua destilada. Se conservó a 4 °C.
- **Tris HCl [1.5M], pH 8.8.** Se pesaron 90.83 g de Tris y se añadieron a 400 ml de agua destilada, ajustando el pH a 8.8 con HCl. Tras alcanzar este pH, se enrasó hasta los 500 ml de agua bidestilada. Se guardó a 4 °C.
- **Solución eutanax (15%).** Para la preparación de 10 ml de solución se midieron 1.5 ml de eutanax y se añadió 0.5 ml de etanol absoluto. Finalmente, se enrasó con suero salino hasta 10 ml. Se conservó a 4 °C.
- **Isopropanol 50%:** se diluyó isopropanol absoluto con agua MilliQ con una proporción 1:1.
- **Tampón de electroforesis 10%** (*Tris-glycine electrophoresis buffer [25 mM Tris, 190 mM glycine, 0,1% (w/v) SDS]*): se pesó 15 g de Tris, 71,88 g de glicina y 5 g de SDS. Todo ello se diluyó en 5000 ml de agua destilada. Se conservó a temperatura ambiente.
- **Tampón de electroforesis 1%:** para su elaboración se diluyeron 100 ml de *Tampón de transferencia al 10%*, en 900 ml de agua destilada.

- **Tampón de transferencia:** para la preparación de 1L de Transfer Buffer se pesaron 14,4g de glicina y 3,03 g Tris y se añadió agua MilliQ hasta llegar a 800 ml. A continuación, se mezcló la solución hasta disolver los componentes sólidos y se refrigeró a 4°C hasta su posterior uso (1 hora aproximadamente). Inmediatamente antes de su uso, se añadió 200 ml de metanol y de nuevo se agitó el contenido.
- **Tampón de carga (2x)** [*50 mM Tris HCl pH 6.8, 3% SDS, 10% glycerol, 0,005% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol*]: se hizo una disolución de 0,6 ml de 1M Tris HCl con un pH de 6.8, 1,5 ml 20% SDS, 1 ml de glicerol y 50 µl 1% de azul bromofenol. Después, se añadió 9,5 ml de agua destilada y se conservó a temperatura ambiente. Antes de utilizarlo, se añadió 500 µl de 2-mercaptoetanol.
- **TBS (10x) (Tampón Tris Salino):** para la preparación de 1L se pesaron 80 g de NaCl y 24,2g de Trizma. A continuación, se añadió agua MilliQ hasta alcanzar el volumen de 1 litro y se ajustó el pH a 7.6.
- **TBS-t (1x) (Tampón Tris Salino – Tween):** se llenó una probeta con 900 ml de MilliQ y se añadió 100 ml de la solución TBS (10%). Finalmente, se adjuntó 1 ml de Tween 20.
- **Solución de bloqueo (BSA 5% / Leche 5%):** se pesó 5 g de albúmina bovino (BSA) o de leche desnatada en polvo, y se añadió 100 ml de TBS-t (1%). Se agitó hasta disolver completamente. Su conservación se mantuvo a 4°C.

- **APS 10%**. (Persulfato de Amonio): se pesó 1 g de persulfato de amonio y se diluyó en 10 ml de agua destilada. Se almacenó en eppendorfs de 1 ml a una temperatura de 4°C.
- **Tampón de Lisis**: se pesó la cantidad de 0,927 g de Tris y se diluyó en 100 ml de agua destilada. Seguidamente, se ajustó el pH a 6.7 y se extrajo 83 ml de esta disolución, para después añadir 2 g de SDS y 10 ml de glicerol. A continuación, se extrajo 3.766 ml de solución y se suplementó con 40µl de ortovanadato de Na [200mM], para inhibir las fosfatasas, y con 40µl de cocktail inhibidor de proteasas.
- **SDS 10%**_(Dodecil sulfato de sodio): se pesó 1 g de dodecil sulfato de sodio y se diluyó en 10 ml de agua destilada. Se alicuotó en eppendorfs de 1 ml y se almacenó a temperatura ambiente.
- **PBS-t 0.5% (Tampón Tris Fosfato- Tritón)**: se añadió 1 ml de Tritón en 200 ml de PBS y se agitó hasta su completa disolución. Se conservó a temperatura ambiente.
- **PFA (4%) (Paraformaldehído)**: se disolvieron 4 ml de paraformaldehído en 996 ml de PBS. Se conservó a 4°C.

3.1.4. Instrumentos y equipos de laboratorio

Todos los instrumentos y equipos de laboratorio utilizados para la realización de los experimentos de esta tesis están ubicados en el Departamento de Fisiología y en la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM), ambos situados en la Facultad Medicina de la Universidad de Valencia. En concreto, la infraestructura corresponde al grupo de trabajo del Dr. José Viña y la Dra. Ana Lloret.

- Centrifugas:

- Centrífuga Sigma, modelo 1-14.
 - Centrífuga Hettich, rotor 35 R para eppendorfs.
 - Centrífuga de placas, marca Eppendorf, modelo Centrifuge.
- Balanzas:
 - Balanza Gram precision, modelo AHZ. Sensibilidad ± 0.01 g.
 - Balanza de precisión Sartorius, modelo Aculab. Sensibilidad $\pm 0,0001$ g.
 - Balanza de precisión Sartorius, modelo Aculab. Sensibilidad ± 0.0001 g
 - Agitador magnético:
 - Selecta, modelo Agimatic-S.
 - Sistema de purificación de agua:
 - Purelab flex marca Elga.
 - pHmetro:
 - Medidor pH Criston, modelo GLP21.
 - Congeladores y neveras:
 - Congelador de -80 °C. Froilabo. Modelo BMT690.
 - Congelador de -20 °C. Liebherr, modelo Confort Nofrost.
 - Cámara Fría (4°C). Ibercex.
 - Nevera ($2-4^{\circ}\text{C}$). Lynx
 - Termobloque:
 - Stuart, Block heater, SBH 130 D.
 - Espectrofotómetro:

- Espectrofotómetro Molecular Devices, SpectraMax Plus 384.
- Lavador automático de placas ELISA:
 - Marca Tecan, modelo Hydroflex.
- Homogeneizador
 - Marca IKA-WERK, modelo Janke y Kunkel RW 20 DZH.
- Campanas de flujo laminar:
 - Burdinola, modelo OR-ST 1200.
 - Crumair, 1100-G A.
- Sistema de análisis de imágenes radiactivas fluorescentes y quimioluminiscencias:
 - ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare Bio-Sciences
- Plataforma de movimiento:
 - Duomax, 1030, Heidolf.
- Vórtex:
 - Heidolph
- Glucómetro:
 - Contour® XT de Bayer
- Medidor ph:
 - pH meter *GLP 21, CRISON*
- Cubetas electroforesis
 - BIO-RAD.
- Fuente de alimentación
 - PowerPac Basic. BIO-RAD.
- Bomba perfusión.
- Cánula perfusión.
- Microscopio confocal Leica TCS SP2.

- Criostato, Leica.
- Pipetas

3.2. Animales de experimentación y dosis de GMS administrada.

Para la realización de esta tesis se utilizaron ratones doble transgénicos APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, modelo establecido de EA (Jankowsky *et al.*, 2004). Tanto la cepa genética basal, C57BL/6J, como el modelo transgénico, proceden de los laboratorios Jackson (Estados Unidos). Estos animales tienen insertados 2 transgenes, que están asociados a un desarrollo temprano de la EA en humanos. Uno de ellos es un híbrido entre ratón y humano para la APP (Mo/HuAPP695^{swe}), y contiene las mutaciones humanas “suecas” K595N/M596L. Implica la sobreexpresión de la APP, lo cual deriva en un aumento en la producción de A β por acción de la β -secretasa. El otro, el PS1-dE9, contiene una mutación de la PS1 humana y una delección en el exón 9. Ambos transgenes sólo se expresan en el SNC y se insertan juntos funcionando bajo el control del mismo promotor. Fenotípicamente producen la aparición de depósitos de A β en hipocampo a partir de los 6 meses de edad, y en el cerebro a partir de los 9 meses. No obstante, estos últimos depósitos pueden encontrarse en alguna ocasión a los 6 meses. El ratio del péptido A β de 40:42 aminoácidos es de 1:2 (Alzforum, 2018).

La colonia se mantiene cruzando ratones *wild type* (WT) con ratones transgénicos (APP/PS1), siendo su descendencia hemizigota para los 2 genes. Los animales son criados en el animalario de la *Unitat Central d'Investigació de la Facultat de Medicina de la Universitat de València*. El

ciclo de oscuridad-luminosidad es de 12:12 h, a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura y a un 60% de humedad relativa. Se alimentan con una dieta estándar (PANLAB S.L) y agua, que consumen de manera libre.

Para genotipar los ratones se extrae una pequeña muestra, bien de la oreja o bien de la cola. La extracción de ADN de las muestras se hizo con el *High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)* y el genotipado fue llevado a cabo por la “Unidad de genotipado y diagnóstico genético” de la *Facultat de Medicina* de Valencia.

Para llevar a cabo nuestro estudio se utilizaron 84 ratones. Para las pruebas de inmunohistoquímica, western blot, registros electrofisiológicos y análisis comportamental se utilizaron 60 animales de 16 semanas de edad. Pasadas las primeras 5 semanas de vida, se destetaron y se dividieron en 3 grupos: un grupo experimental de ratones que bebieron agua, otro grupo que bebió agua con GMS disuelto al 1%, y el tercero agua con GMS disuelto al 0,5%; todos ellos bebieron *ad libitum*. Pasadas esas 5 semanas se mantuvieron 5 semanas más sin cambios en condiciones ambientales ni en dieta alimentaria, en las cuales todos los animales bebían agua sin GMS. Al cumplir las 15 semanas de vida, los animales realizaron las pruebas correspondientes al estudio comportamental incluido en nuestro proyecto, así como los registros electrofisiológicos, tras lo cual fueron sacrificados (Figura 14).

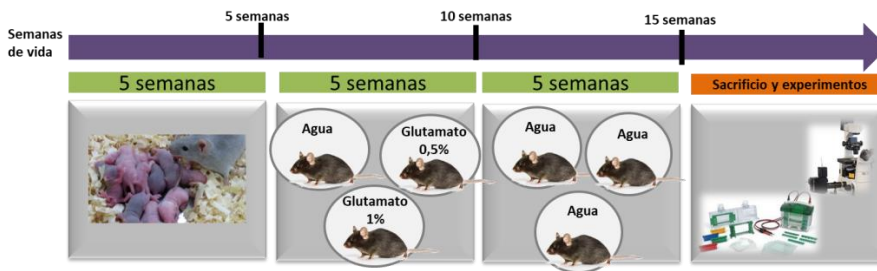


Figura 14. Esquema del plan de experimentación. Plan de organización de los pasos seguidos durante la investigación. El tratamiento es administrado durante 5 semanas a las 5 semanas de vida. Tras otras 5 semanas sin tratamiento, se realizan los análisis de comportamiento y electrofisiología y se sacrifican los animales para la determinación de proteínas mediante western blot e inmunofluorescencia.

Por otro lado, se utilizaron 24 ratones de 6 semanas para la medida de glutamato en LCR. Estos animales fueron destetados a las 5 semanas y pasado ese tiempo se dividieron en dos grupos. Uno de los grupos correspondía a los animales que bebían agua durante una semana, y el otro a los que bebían agua con glutamato disuelto al 1% durante una semana (Figura 15). Las condiciones ambientales y dieta alimentaria (PANLAB S.L) fueron las seguidas por el resto de los animales.

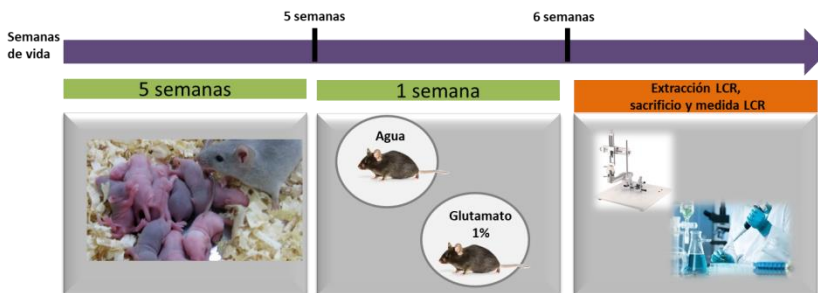


Figura 15. Esquema de plan de experimentación para la medida de glutamato en LCR. A las 5 semanas de vida se les administra a los animales el tratamiento durante 1 semana. Inmediatamente después de la retirada de tratamiento los animales son sacrificados.

De esta manera, finalmente se obtuvieron 6 grupos de experimentación: ratones WT que bebieron agua normal (WT C), ratones WT que bebieron agua suplementada con glutamato al 0,5 % (WT 0,5%), ratones WT que bebieron agua con glutamato al 1% (WT 1%), ratones APP/PS1 que bebieron agua normal (APP/PS1 C), ratones APP/PS1 que bebieron agua con glutamato al 0,5% (APP/PS1 0,5%) y por último, ratones APP/PS1 que bebieron agua con glutamato al 1% (APP/PS1 1%). Todos los experimentos y protocolos de experimentación fueron aprobados por el *Comité d'Ètica d'Experimentació i Benestar Animal de la Universitat de València* con la referencia A1508327990956, A14278868668839.

La dosis de glutamato administrada fue calculada teniendo en cuenta la ingesta de GMS humana. Para poder extrapolar las dosis de GMS empleadas en los ratones de nuestro estudio a la ingesta de GMS realizada en humanos, realizamos una serie de cálculos siguiendo la fórmula citada a continuación, descrita para hallar la dosis humana equivalente (Human Equivalent Dosis, HED) que utiliza el área de superficie de un cuerpo (Body Surface Area, BSA) (Reagan-Shaw, Nihal y Ahmad, 2008): $HED(mg/kg) = dosis\ animal\ (mg/kg) \times (k_m\ animal / k_m\ humano)$, siendo $k_m\ animal$ un valor fijo de 3 y $k_m\ humano$ un valor fijo de 37. Según esto, tomando como HED 66mg/kg, que se corresponde al consumo de glutamato al día en una persona en Asia (4 g) con una media de peso de 60kg, sustituyendo los valores en la fórmula, la dosis animal resultante es de 814 mg/kg .

3.3. Métodos.

3.3.1. Sacrificio de animales y extracción de tejidos.

Cada uno de los animales utilizados para el análisis de proteínas por la prueba de western blotting y la técnica ELISA, fue anestesiado utilizando anestesia inhalada (isoflurano) y sacrificado por dislocación cervical. Se pesó a cada uno de ellos, y se midió el valor de la glucosa utilizando un glucómetro. Seguidamente, se extrajo el cerebro y se separó el cerebelo, el hipocampo y la corteza cerebral. Todas las partes se trataron con la técnica Freeze – Clamping, y se conservaron a -80 °C. Esta misma técnica de sacrificio mediante dislocación cervical, fue utilizada en aquellos ratones utilizados para la medida de neurotransmisores, tras la extracción de LCR.

En el caso de los animales utilizados en inmunohistoquímica, fueron anestesiados con una dosis de 0,5 ml de una disolución de eutanax al 15% (Dolethal Vetoquinol Madrid, España), y etanol al 5% en suero salino inyectada intraperitoneal. Seguidamente, se perfundieron transcardialmente con suero salino heparinizado (0,1%, pH 7.4) y paraformaldehído (4%) en tampón fosfato salino (PBS) (0,1M, pH 7.4). A continuación, se extrajo el cerebro y se dejó fijar 24h en paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C. Después, permanecieron durante 2 días en PBS y sacarosa al 30% a 4°C en ausencia de luz. Por último, se realizaron cortes coronales de 40 µm con un criostato (Leica) y se conservaron hasta su uso en PBS y sacarosa al 30%, a -20°C.

3.3.2. Inmunofluorescencia.

Para la detección del péptido A β , Tau fosforilada y receptores AMPA, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia por flotación libre (“Free Flotting”). Para su realización, se utilizaron cortes cerebrales de 40 μ m, que fueron marcados con los anticuerpos correspondientes en cada caso, y analizados al microscopio confocal.

Fundamento.

La inmunofluorescencia es una técnica que consiste en la detección de proteínas presentes en un tejido o en una célula, realizando un marcaje de las mismas utilizando anticuerpos específicos a ellas y que tienen unidas moléculas fluorescentes (fluorocromo). La muestra es expuesta a una fuente de luz de onda corta que genera un fenómeno de fluorescencia en el fluorocromo, haciendo que éste emita una luz de longitud de onda mayor (y por lo tanto de menor energía) a la correspondiente a la luz excitadora.

Este fenómeno se produce por el hecho de que todas las moléculas poseen la capacidad de absorber radiaciones electromagnéticas, de manera que su estado electrónico fundamental puede pasar a un estado electrónico excitado donde su energía será mayor. Al volver a su estado fundamental, la energía sobrante se disipa en forma de radiación electromagnética radiactiva o no radiactiva. En el primero de los casos, se produce la emisión fluorescente.

Así, con el uso de instrumentos de análisis de imagen, como el microscopio confocal, se puede reproducir este fenómeno y posteriormente cuantificar la cantidad de fluorescencia obtenida.

Procedimiento.

Tras descongelar los cortes obtenidos, y conservados hasta el momento a -20°C , se hicieron 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con PBS y Tritón al 0.5% (PBS-t) y después se bloquearon en PBS-t con un 10% de suero de cabra durante 90 minutos y a temperatura ambiente. A continuación, se incubó "overnight" con los anticuerpos primarios correspondientes: A β soluble (MOAB-2) (NBP2-13075 Novusbiochemical) 1:500; AMPA GluR1 (13185, Cell Signaling Technology, Inc. USA) 1:1000; p-tau (MN1020, Thermo Fisher Waltham, Massachusetts, USA) 5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tras 3 nuevos lavados con PBS-t, las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 anti-rabbit (Cell Signaling Tech; Danvers, USA) 1:1000 y Alexa Fluor anti-mouse 647 (Cell Signaling Tech) 1:1000 en PBS-T, durante 90 minutos. De nuevo, el tejido fue lavado 3 veces con PBS-t e incubado posteriormente con Hoechst (33342 Thermo Fisher, España), 1:1000, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, los cortes fueron montados en un portaobjetos recubiertos de gelatina de piel de cerdo (0.5%) y tras cubrirlos con medio de montaje de fluorescencia (S3023, DAKO, 243 Santa Clara, CA, USA). Los cortes fueron analizados con el microscopio confocal Leica.

Para la cuantificación de las imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia con el microscopio confocal se utilizó el programa *Image J*. Se analizó la fluorescencia de 5 imágenes por cada uno de los animales sometidos a estudio, se relativizó respecto a su señal de Hoechst y se calculó la media para cada caso. Seguidamente, se calculó la media

para cada uno de los grupos (n=4) y el error relativo correspondiente a cada uno de ellos.

3.3.3. Western blotting

3.3.3.1. Preparación homogenados

Para la realización del western blot, el tejido extraído (corteza, hipocampo, cerebelo) fue homogeneizado mediante homogenización mecánica con Potter-glass Teflon. Para ello, se extrajo un trozo de ese tejido, se pesó y se añadió 1 ml de tampón de lisis (Tris: 16,5 mM, pH 6,8; SDS: 2%; Glycerol 10%) por cada 100mg de tejido. Seguidamente, se homogeneizó con el potter durante 3 segundos, con una pipeta pasteur se recogió el homogenado y se depositó en un eppendorf sumergido en hielo. Por último, los homogenados se calentaron durante 5 minutos a 95°C antes de su conservación a -20°C.

3.3.3.2. Determinación de proteínas: método Lowry.

Para la determinación de la concentración de proteínas totales de cada una de las muestras de los tejidos obtenidos, se utilizó el *Protein Assay Kit*, basado en el método de Lowry (Lowry O.H. *et al.*, 1951).

Fundamento.

Este método espectrofotométrico se basa en el hecho de que cada sustancia tiene la propiedad característica de absorber una determinada

cantidad de luz (absorbancia) en alguna de las regiones del espectro electromagnético (VIS, UV, IR, etc).

Lambert y Beer demostraron que esta absorbancia (A) es directamente proporcional a la concentración (c) de la sustancia absorbente, la longitud del paso de luz (l) y una constante denominada coeficiente de extinción o coeficiente de absorción (ϵ), que es característico para cada sustancia a una longitud de onda(λ) determinada.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

De esta manera, para hallar la concentración de una sustancia (muestra problema), se compara su absorbancia con la de una solución de la misma sustancia y de concentración conocida (solución patrón o estándar). El valor de la concentración de las “muestras problema” se halla preparando una curva de calibrado con la medida de las absorbancias de varias diluciones que constituyen el estándar (Suero de albúmina bovina (BSA)), tratadas en las mismas condiciones, con el mismo método y medidas a una misma longitud de onda (660nm). Después, se representa gráficamente la recta resultante de la relación concentración-absorbancia, se calcula la ecuación de la recta y se sustituye en ella cada uno de los valores de las absorbancias de las muestras problema, cuya concentración se quiere conocer.

Procedimiento.

Para la realización de la recta patrón se partió de una dilución de Suero de albúmina bovina (BSA) de concentración 25 mg/ml, preparada con 25 mg de BSA y 1 ml de agua Milli Q, de la cual se obtuvieron 6 soluciones

seriadas: 12,5 mg/ml; 6,25 mg/ml; 3,12 mg/ml; 1,56 mg/ml; 0,78 mg/ml; 0,39 mg/ml.

Seguidamente, en cada uno de los tubos se añadió 990 μ l de agua Milli Q y 10 μ l de la muestra correspondiente, ya sean muestras pertenecientes a la recta patrón o “muestras problema”. En uno de los tubos se introdujo sólo agua MilliQ (1 ml) y se empleó como “blanco”. El siguiente paso fue añadir 1 ml del Lowry preparado anteriormente y dejar incubar durante 20 minutos en oscuridad. Pasado ese tiempo, se añadió 500 μ l de Folin y se dejó incubar en oscuridad durante 30 minutos.

La lectura de las absorbancias se realizó programando una longitud de onda de 660 nm en el espectrofotómetro. El primer paso fue medir y registrar el “blanco” para tomarlo como punto de referencia para el resto de las soluciones y a continuación, se midieron todas ellas.

Una vez obtenidas todas las absorbancias, se introdujeron los datos en el programa *Excell* y se construyó una recta representativa del valor de cada una de esas absorbancias en función de la concentración (mg/ml), colocando la variable “absorbancia” en el eje “x” y la variable “concentración” en el eje “y”. De esta recta se obtuvo la correspondiente ecuación ($y=mx+n$). Realizando un cálculo con el valor de la pendiente, ordenada en el origen y absorbancia obtenidas ((Absorbancia-ordenada en el origen)/ pendiente), se obtuvo la concentración para cada una de las “muestras problema”. Seguidamente, se calculó el volumen necesario de proteína para obtener 20 μ g de la misma, que es la cantidad empleada en este caso para la determinación por inmunoblot.

3.3.3.3. Electroforesis en gel de acrilamida.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) es una técnica que separa las proteínas según su densidad de carga molecular y de su tamaño en presencia de un campo eléctrico. Estos geles tienen poros de tamaño determinado formados por la formación de enlaces cruzados de monómeros de acrilamida y bis-acrilamida, de manera que las proteínas, cargadas negativamente por la formación de micelas por reacción con el SDS, se separan según la resistencia que ofrezca el tamaño del poro a su paso por el gel hacia un polo positivo. Cada gel está compuesto por dos partes: “Stacking” o gel concentrador, corto y de poro laxo; y “Resolving” o gel resolutivo, más largo que el anterior y de mayor concentración de acrilamida, la cual puede variar según el tamaño de la proteína a medir.

Los geles de Acrilamida fueron elaborados según el protocolo estándar SDS-PAGE. La concentración del gel separador fue seleccionada teniendo en cuenta el peso molecular de la proteína a analizar. De esta manera, se utilizó un gel más concentrado (15%) para proteínas de bajo peso molecular, mientras que para las de alto peso molecular se utilizó uno de baja concentración (10%). A continuación, en la Tabla 3 se exponen los volúmenes empleados de cada uno de los reactivos necesarios para la elaboración de los geles según la concentración de los mismos.

| | Concentración gel | | | |
|--------------------------------|-------------------|---------|---------|------------------|
| | Gel resolutivo | | | Gel concentrador |
| | 10% | 12,50% | 15% | |
| Agua MilliQ | 4,9 ml | 4,27 ml | 3,65 ml | 3,075 ml |
| Tampón de separación pH8.8 | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | - |
| Tampón de separación pH6.8 | - | - | - | 1,25 ml |
| Acrilamida | 2,5 ml | 3,13 ml | 3,75 ml | 0,625 ml |
| SDS 10% | 100µl | 100µl | 100µl | 50µl |
| APS 10% | 30µl | 30µl | 30µl | 15µl |
| TEMED(Tetrametiletilendiamina) | 15µl | 15µl | 15µl | 7,5µl |

Tabla 3. Composición de los geles de acrilamida empleados para el análisis mediante western blot. Volúmenes empleados para la realización de los geles de acrilamida para sus diferentes posibles concentraciones.

Cada uno de los volúmenes calculados para obtener 20µg de proteínas de las muestras extraídas, fueron introducidos en tubos de 0,5 ml. Seguidamente, se añadió la cantidad que correspondía en cada caso de *Tampón de carga al 2x*. Todo el procedimiento fue realizado conservando las muestras en hielo. Antes de cargar los geles con las muestras obtenidas, éstas fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos.

En cada uno de los geles anteriormente preparados, el primero de los pocillos fue cargado con 5 µl de patrón, que sirvió de guía a lo largo de todo el procedimiento. En los pocillos restantes se depositaron las muestras a estudiar (3 muestras de cada uno de los grupos), que contenían 20 µg de proteína, siguiendo un orden preestablecido que en este caso fue: WT C, WT 1%, APP/PS1 C, APP/PS1 1%.

Una vez cargados los geles, fueron introducidos en una cámara de electroforesis con *Tampón de electroforesis* al 1% y fueron sometidos a un voltaje continuo de 100 voltios, que fueron programados en la fuente de

alimentación empleada, de manera que las proteínas fueron separadas según su peso molecular. Este procedimiento es interrumpido a los 75 minutos aproximadamente, cuando las bandas de marcador que contiene el patrón llegan al final del gel.

Para la transferencia de proteínas se montaron los “sándwich” siguiendo el siguiente orden: esponja, papel de filtro, gel de acrilamida, membrana Nitrocelulosa, papel de filtro, esponja. Cada uno de los “sándwich” fue introducido en la cámara de transferencia, orientando la membrana hacia el ánodo. La cubeta fue llenada con 1 L de *Tampón de transferencia* y se colocaron 2 placas de hielo para conservar una temperatura adecuada. La fuente de alimentación fue programada con un amperaje continuo de 240 mA y se dejó durante 90 minutos.

Seguidamente, las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con BSA (5%) o leche en polvo (5%) con Tween 20 en tampón Tris salino (TBS-t al 1%), según requiera el anticuerpo que se vaya a utilizar, a temperatura ambiente y en movimiento. La incubación con cada uno de los anticuerpos específicos primarios empleados se hizo overnight a 4°C y en movimiento. A continuación, las membranas fueron lavadas 3 veces (10 min - 5 min- 5 min) con TBS-t (1%) y se incubaron con anticuerpo secundario mouse o rabbit, según corresponda. Posteriormente, se realizaron de nuevo tres lavados como los indicados anteriormente.

Para revelar las membranas se utilizó un sistema de quimioluminiscencia ImageQuant™ LAS 4000, *GE Healthcare Bio-Sciences*. Durante el procedimiento, se añadió 1ml de luminol (Luminata Classico Western HRP Substrate Lot 140935. *Millipore*) a la superficie de cada una de ellas, asegurando una distribución uniforme.

Como indicador del peso molecular de las proteínas se utilizó la escala “PageReguler Plus Prestained Protein Ladder” (26620, Thermo Scientific, Rockford, USA). Además, en todos los casos las medidas se normalizaron utilizando Tubulina (α -Tubulin (TU-02) sc-8035, *Santa Cruz Biotechnology*, 1:1000). Para ello se realizó un Stripping (*Restore western blot Stripping Buffer*, 21059, *Thermo Scientific*) durante 20 minutos a temperatura ambiente y con movimiento. Tras 3 lavados (10 min- 5 min-5 min) de las membranas con TBS-t (1%), y un bloqueo de 60 minutos con BSA (5%), con movimiento y a temperatura ambiente, se realizó la incubación con el anti-tubulina (1:1000) en solución de BSA, a 4°C y overnight. Como anticuerpo secundario se utilizó Anti-mouse, durante 60 minutos a temperatura ambiente y con movimiento. Tras realizar los lavados de las membranas con TBS-t (1%), se revelaron con el sistema ImageQuant™ LAS 4000.

Para la cuantificación de las imágenes obtenidas, se utilizó el software *ImageGauge V4.0* que calcula la señal de cada una de las bandas obtenidas para cada uno de los animales. Se hizo la media de todas ellas (n=3) para cada uno de los grupos y se calculó la desviación estándar correspondiente en cada caso.

3.3.4. ELISA.

Fundamento.

El ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (del inglés, Enzyme Linked InmunoSorbent Assay o ELISA) consiste en una de las técnicas más utilizadas para la detección de antígenos y/o anticuerpos de manera específica. Se fundamenta en que un anticuerpo o antígeno soluble

acoplado a una matriz sólida insoluble retiene su actividad inmunológica y puede unirse a un enzima. La reacción antígeno- anticuerpo desencadenada, da lugar a un producto coloreado detectable y medible por un espectrofotómetro.

Durante el procedimiento de este inmunoensayo enzimático heterogéneo, tienen lugar una serie de lavados y aspiraciones que permiten la separación de las diferentes fases, obteniendo por un lado el inmunocomplejo que queda fijado y por otro las biomoléculas no fijadas.

Preparación de los homogenados.

Para la preparación de los homogenados utilizados en este experimento, se utilizó tejido de corteza cerebral e hipocampo de ratón. El procedimiento a seguir fue el de homogeneización mecánica explicado anteriormente en el apartado “western blotting”. El tampón de lisis añadido fue 5M guanidina-HCl con 50 mM Tris y para la disolución de las placas seniles se mantuvo en rotación durante 4 horas a temperatura ambiente.

Procedimiento.

Para nuestro estudio decidimos medir la concentración de A β que se encontraba formando las placas características descritas en la EA tanto en ratones transgénicos APP/PS1 como en ratones WT. En este último grupo decidimos medirlo para saber si el tratamiento había afectado en el procesado del propio APP de ratón. Los pasos seguidos en ambos kits de ELISA fueron los indicados en cada uno de los casos: *Human A β kit* (Invitrogen KHB3544, Camarillo CA, USA) para ratones APP/PS1 y *Mouse*

Aβ kit (Invitrogen KMB3441, Camarillo CA, USA) para ratones WT. En ambos casos, se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos en los cuales, se encontraba fijado el anticuerpo correspondiente a la proteína que se deseaba detectar.

Para llevar a cabo este experimento, se realizó una curva patrón empleando la proteína estándar, proporcionada por la casa comercial, a distintas concentraciones. Los volúmenes de las muestras y de los patrones fueron cargados por duplicado en la placa. Para la lectura de las absorbancias, se utilizó un lector de placas espectrofotométrico. Las concentraciones de las proteínas problema fueron calculadas mediante la interpolación de la curva patrón realizada con las muestras estándares de concentración conocida.

3.3.5. Determinación de neurotransmisores en LCR: cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas (LC-MS).

Fundamento.

La espectrometría por masas es una técnica de análisis cualitativo que se utiliza para la determinación de estructuras orgánicas. Partiendo de una muestra líquida, ésta es dividida en pequeñas gotas que son evaporadas para seguidamente obtener iones que son separados según su masa y carga. Por último, estos son captados por el sistema que registra y procesa la información. Así, dependiendo de la composición química de la sustancia a medir, se obtiene un número mayor o menor de diferentes tipos de iones.

Extracción de LCR en ratón.

La extracción de LCR se llevó a cabo bajo anestesia total del animal mediante la inhalación de isofluorano. La dosis utilizada para la inducción fue 3,5% v/v de isofluorano, mientras que la de mantenimiento fue 2,5% v/v administrada mediante una mascarilla. Una vez que el animal estuvo completamente anestesiado, se colocó en un aparato estereotáxico. La fijación se hizo de manera que la cabeza del animal estuviera inclinada, quedando la parte alta de la misma posicionada por encima de su nariz. Seguidamente, se realizó una sutura longitudinal en la piel y en la musculatura, desde la parte frontal de la cabeza hasta la parte posterior del cuello, hasta conseguir que la cisterna estuviera expuesta. Para recoger el LCR se utilizó un capilar de vidrio de 0,75 mm de diámetro interior y 1,0 mm de exterior. La punta del capilar (10-20 μm) sirvió para perforar la duramadre hasta llegar al interior de la cisterna y con la ayuda de una jeringuilla conectada a él se aspiró el líquido (10 μl aproximadamente) y se depositó en tubos de 0,2 ml. Finalmente, se centrifugó a 10000g, 5 min a 4°C y se conservó el sobrenadante a -20°C hasta su posterior uso.

Procedimiento.

La cuantificación de glutamato, Glutamina y GABA fue llevada a cabo mediante el sistema cromatográfico Waters Acquity UPLC-XevoTQ system (Milford, MA, USA).

Los sobrenadantes obtenidos de la extracción fueron diluidos con acetonitrilo, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (70:30), y se añadió el estándar interno Fenilalanina (Phe-D5) 10 mmol/L a cada uno de ellos. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: ionización por electroespray, voltaje

capilar 5,30 kV, extractor 5,00 V, temperatura 120 °C, temperatura de desolvatación 350°C, flujo de cono de nitrógeno 50 l/h y flujo de gas de desolvatación 750 l/h. Las condiciones de separación fueron seleccionadas utilizando una columna HILIC de Phenomenex (100x2,1mm, 7 µm, 100Å). La fase móvil fue CH3OH (5mM NH4HCO2): H2O (5mM NH4HCO2), (70:30) con un gradiente isocrático de 10 min. La velocidad de flujo fue 0,4 mL/min, 30°C de temperatura de la columna y 5 µL de volumen para cada inyección. Durante el análisis las muestras se mantuvieron a 4°C en el inyector. Los datos obtenidos fueron procesados por los softwares MassLynx 4,1 y QuanLynx 4,1. La línea de tendencia de las curvas fue calculada con Phe-D5 (Tabla 4).

| ANALITO | IÓN PADRE (M/Z) | CONO (V) | IÓN HIJO (M/Z) | CONFIRMACIÓN | ENERGÍA DE COLISIÓN (EV) |
|-----------|-----------------|----------|----------------|--------------|--------------------------|
| Glutamato | 148 | 20 | 84 | 102 | 15 |
| Glutamina | 147 | 10 | 84 | 130 | 10 |
| GABA | 104 | 20 | 69 | 87 | 10 |
| Phe-D5 | 171.1 | 35 | 125 | - | - |

Tabla 4. MS/MS Parámetros adquiridos.

3.3.6. Registros electrofisiológicos.

Fundamento.

La electrofisiología en neurociencias se encarga de estudiar la actividad eléctrica neuronal con la finalidad de conocer diferentes aspectos de la función cerebral. Esto nos permite analizar la capacidad cognitiva de los animales, como es el caso de los ratones utilizados en este estudio. La

potenciación a largo plazo (LTP) es un proceso implicado en el almacenamiento de la memoria explícita y por estar afectada en la EA nos es de gran importancia su estudio.

Procedimiento.

Para el análisis de los circuitos neuronales mediante electrofisiología incluidos en este trabajo, se utilizaron ratones que fueron anestesiados con una dosis de uretano de concentración 1,7 g/Kg. Seguidamente, se inyectó 0,1 ml de lidocaína (5%) de forma local en la garganta de los animales y, una vez comprobada la abolición de los reflejos plantar y ocular, se realizó una traqueotomía (Moldestad *et al.*, 2009) para asegurar una adecuada respiración de los animales.

Mediante la aplicación de impulsos eléctricos, de voltaje constante, en la vía perforante de los animales se produjeron potenciales excitadores postsinápticos de campo evocados (PEPs) que más tarde fueron registrados en el giro dentado del hipocampo. Para ello, se implantaron dos electrodos siguiendo las coordenadas descritas por Huang *et al.* (2012) tomando como punto de referencia el punto *Bregma* en el cráneo del animal: (AP: -2,3 mm; LM: 1,0 mm; A: 2,2 mm) para la localización del giro dentado y, (AP: -4,3 mm; ML: 2,5 mm; A: 1,7 mm) para las fibras de la vía perforante (Paxinos and Franklin, 2001). Para la elección de los parámetros de los impulsos aplicados, se realizó una curva en la cual se partían de un voltaje de 0 y se iba incrementando 0,1 mA hasta llegar al PEPs máximo.

Finalmente, los parámetros seleccionados para los impulsos eléctricos fueron de 0,1 ms, 0,1 Hz, 0,1-0,7 mA, ya que suponen la intensidad

mínima para garantizar la respuesta correspondiente al 30% de la amplitud máxima.

Tras esto, se dejó un periodo de 30 minutos para la estabilización del animal. A continuación, se comenzó con el protocolo, el cual incluye 30 minutos de estimulación con pulsos eléctricos de 0,1 ms, 0,1 Hz, inducción de LTP mediante la aplicación de alta frecuencia (HFS) y 90 minutos de registro en condiciones basales post-estimulación. La estimulación por HFS consistió en 2 grupos de trenes de impulsos con un espacio de 5 minutos entre grupo. Cada uno de ellos a su vez, estaba compuesto por 6 trenes de impulsos de 400 Hz separados en intervalos de 20 segundos, que consistían en 6 pulsos de 0,4 ms y 400Hz. Los datos fueron digitalizados a 16 KHz con la interfaz de adquisición de datos Micro 1401 MKII y el Software Spike2 (Cambridge Electronic Design, Ltd.).

La amplitud obtenida para los potenciales evocados, fue utilizada como medida de la estimulación sináptica de cada animal.

Para el análisis de datos de los registros electrofisiológicos se utilizó el software *Matlab (R2015b, MathWorks, Inc., Natick, MA, USA)*. Se calculó la media de los potenciales evocados analizados y se expresó en porcentaje respecto al potencial basal previo a la estimulación.

3.3.7. Estudio comportamental.

3.3.7.1. Estudio memoria operativa: Laberinto Hebb-Williams.

Fundamentos.

El laberinto de Hebb-Williams es una prueba en la que se evalúa la memoria operativa espacial animal. Consiste en una estructura cuadrada

con paredes que pueden moverse para crear laberintos de diferente dificultad. La prueba consiste en dejar al animal en el interior del laberinto para que busque la salida y medir el tiempo que invierte en ello. Con esto se evalúa la memoria espacial y la capacidad de aprendizaje que tiene el animal para recordar el camino que conduce a la salida del laberinto.

Procedimiento.

Para la realización de esta prueba se utilizó una caja de 60 cm de ancho, 60 cm de largo y 10 cm de alto, la cual contenía dos cajas de medidas 14 cm x 9 cm. Una de ellas consistía en la combinación de paredes que formaban el laberinto, y tenía 3,5 cm de agua a 15 °C por los pasillos que el animal debía recorrer. La otra tenía el suelo seco, lo cual suponía una recompensa para el animal. El objetivo del animal es encontrar la salida para escapar del suelo con agua y alcanzar la caja con el suelo seco.

Antes de comenzar el estudio, se realizó un periodo de entrenamiento de 3 días. El primero de ellos consistió en 5 minutos de habituación en un espacio sin barreras y con el terreno seco. El día 2 superaron un recorrido de prueba, y el día 3 un nuevo recorrido; en ambos casos, disponían de 4 intentos. En los días sucesivos, los animales fueron expuestos a 5 distintos laberintos de dificultad fácil y difícil en los cuales disponían de 8 ensayos. El tiempo límite para encontrar la salida era de 5 minutos y superado este tiempo, si el animal no lo había conseguido, era guiado hasta la salida.

Se recogieron 3 tipos de medidas: tiempo total de latencia, número de animales que no habían sido capaces de superar el laberinto en el tiempo máximo establecido (300s), clasificación de dificultad para los laberintos según la clasificación de Stanford y Brown classification (2003): fáciles o difíciles.

3.3.7.2. Estudio de la ansiedad: Laberinto elevado en cruz.

Fundamento.

El laberinto Elevado en Cruz es una prueba utilizada para evaluar la ansiedad en ratones. La estructura que se utiliza consiste en 4 brazos (dos abiertos y dos cerrados) unidos entre sí por una pequeña plataforma. El animal es introducido en la zona central del laberinto y se evalúa el tiempo que pasa en cada uno de las zonas. De esta manera, se puede observar y analizar el conflicto que tiene el animal de permanecer en los brazos cerrados donde se siente protegido (respuesta innata al miedo) y el deseo que muestra de explorar nuevas zonas (lo cual evitaría en un estado de ansiedad).

Procedimiento.

El laberinto que se utilizó para la realización de la prueba consistía en dos brazos abiertos de 30 x 5 x 0,25 cm y dos cerrados de 30 x 5 x 15 cm unidos en el centro por una zona de 5x5cm. Las paredes eran de color claro y el suelo de color negro. Toda la estructura era de metacrilato y se encontraba elevada a 45 cm del suelo. Antes de la prueba, el animal pasaba una hora en la sala donde se realizaba el procedimiento para que se habituara a la iluminación y a las condiciones de la habitación. Al inicio de la prueba, el animal fue colocado en la plataforma central frente a uno de los brazos abiertos y se le dejó explorar durante 5 minutos. Todo ello era grabado para después poder ser analizado por un observador. Los parámetros evaluados fueron los siguientes: número de veces que

entraba en cada una de las zonas del laberinto y tiempo que el animal pasaba en cada una de las zonas (expresado en segundos y porcentaje).

3.3.8. Análisis estadístico

3.3.8.1. Análisis estadístico de los ensayos de biología molecular.

Los resultados de los inmunoblots, la inmunohistoquímica y los ELISAS están expresados por las medias de los valores obtenidos en cada uno de los experimentos, además de la desviación estándar y error relativo según corresponda en cada caso. Las pruebas utilizadas fueron ANOVA y t-Student. La significancia de los resultados está expresada en función a lo siguiente: $p < 0,05$ no significativo, $p < 0,05$ significativo (*), $p < 0,01$ muy significativo (**), $p < 0,001$ altamente significativo (***).

3.3.8.2. Análisis estadísticos de los registros electrofisiológicos.

Para el análisis de la normalidad de los resultados obtenidos en los registros electrofisiológicos se utilizó la prueba Shapiro-Wilk's. Tras comprobar la normalidad de todos los datos ($p < 0,05$), se empleó la prueba t-Student. Una prueba ANOVA de una vía fue utilizada para el análisis del conjunto de datos obtenidos después de la estimulación entre grupos. Posteriormente, se aplicaron las pruebas post-hoc Pairwise y Bonferroni según correspondía. Los resultados fueron representados con la media de los porcentajes \pm el error estándar de la media (S.E.M.).

3.3.8.3. Análisis estadístico del estudio comportamental.

Para la realización de los cálculos estadísticos de los resultados obtenidos con el Laberinto en Cruz Elevado, se utilizó una prueba ANOVA con dos variables entre los sujetos. Por un lado, los tres distintos tipos de tratamiento (control, GMS 0,5%, GMS 1%) y por otro, el modelo genético del animal (WT y APP/PS1). Para el laberinto de Hebb-Williams se empleó una ANOVA con tres variables entre sujetos: variable genética (WT y APP/PS1), variable tratamiento (control, glutamato 0,5%, glutamato 1%) y variable de dificultad del laberinto (fácil y difícil). También se utilizó la prueba post-hoc de Bonferroni. Todos los resultados fueron expresados como las medias \pm S.E.M.

4. RESULTADOS

4.1. Administración de GMS y cantidad de agua consumida.

Realizamos un control de la cantidad diaria de agua que consumía cada animal durante las 5 semanas en las cuales se les administraba el tratamiento correspondiente. Como resultado se muestra que la media tomada por los ratones que consumían un 1% de GMS disuelto en la bebida (4,17 ml/día/ratón), es significativamente mayor que la registrada para los controles (3,43 ml/día/ratón) y que la registrada para los que ingerían un 0,5% de GMS (3,60ml/día/ratón) (Figura 15). Teniendo en cuenta estos datos y la media de peso de un ratón, calculamos la cantidad en gramos de glutamato administrado: 1,79 g/kg/día en el grupo 1% GMS y 0,71 g/kg/día en el grupo 0,5% GMS.

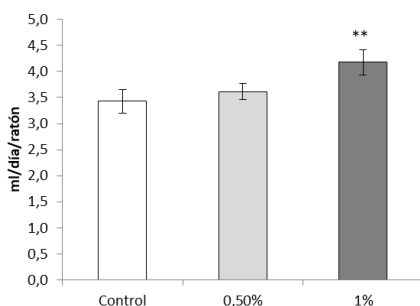


Figura 15: volumen de agua consumida diariamente por ratón. Representación de consumo diario de agua (ml) por ratón. En el grupo control se incluyen los grupos WT C, APP/PS1 C; en el grupo 0,5% los grupos WT 0,5% y APP/PS1 0,5%; y en el 1% los grupos WT 1% y APP/PS1 1%. Valores estadísticamente significativos (** $p < 0,01$).

4.2. Ingesta de GMS y peso e índice glucémico.

Con el fin de comprobar si la mayor ingesta de GMS había afectado al peso de los ratones, registramos su medida justo antes del sacrificio. Los pesos medios resultantes en los machos fueron los siguientes: 26,6g en controles, 29,6g con GMS al 0,5%, 25,4g con GMS al 1%. En el caso de las hembras fueron: 20,7g en controles, 20,6 con 0,5% de GMS, 21,1g con consumo de 1% de GMS. Esto supone que el peso medio en el grupo control es de 23,65 g, 25,1 g en el caso del grupo al 0,5% de GMS y 23,25 g en el grupo con GMS al 1%. Por lo tanto, tal y como se muestra en la Figura 16, no existen diferencias entre los grupos del mismo género.

Teniendo en cuenta el volumen de agua ingerido y el peso de los animales, la cantidad final de GMS tomada para cada grupo es la siguiente: 1700 mg/kg para el grupo con 1% de GMS (0,0417 g de GMS disuelto en los 4,17 ml de agua bebidos/ 23,25 g de ratón) y 717 mg /kg para el grupo 0,5% de GMS (0,0153 g de GMS disuelto en los 3,6 ml de agua bebidos/ 25,1g de ratón).

Otro de los parámetros que tuvimos en cuenta fue el índice glucémico, ya que estudios señalan que una ingesta de GMS puede dar lugar a un aumento del mismo e inducir diabetes (Nagata *et al.*, 2006; Roman-Ramos *et al.*, 2011). En nuestro caso, tal y como se observa en la Figura 17, no se producen variaciones de los niveles de glucemia en ninguno de los grupos de nuestro trabajo: 117,8 µg/dl en controles, 129,7 µg/dl con consumo de 0,5% de GMS y 115,5 µg/dl con GMS al 1%.

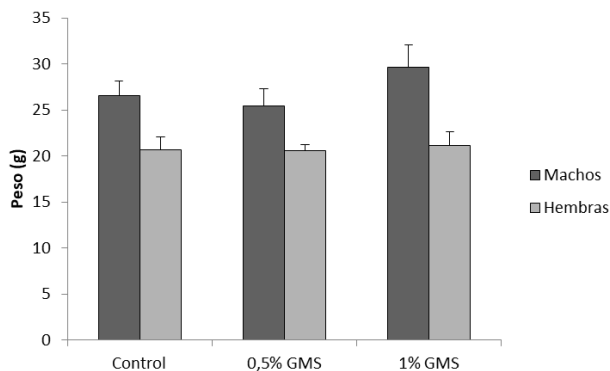


Figura 16: peso (g) en machos y hembras. Representación de medias del peso en gramos de ratones machos y hembras controles, con consumo de GMS al 0,5% y GMS al 1%.

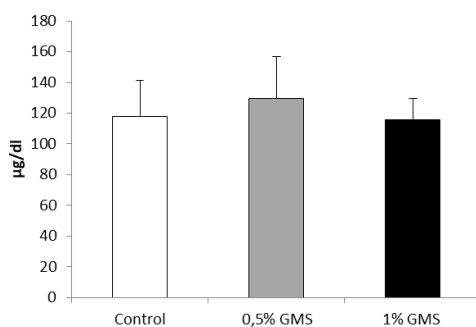


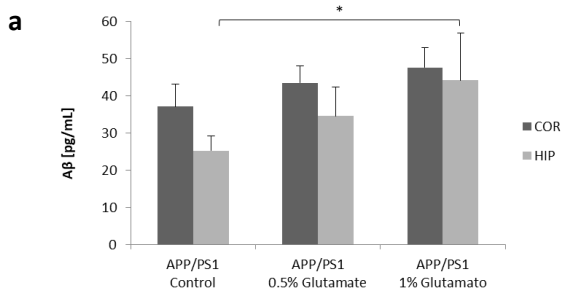
Figura 17: representación de índice glucémico de los ratones de experimentación. Niveles de glucemia (μ /dl) correspondientes al grupo control, con ingesta de GMS al 0,5% y con GMS al 1%.

4.3. Niveles de péptido A β en ratones APP/PS1 suplementados con 1% de GMS.

Con el fin de determinar si la ingesta de GMS provocaba la aparición de las lesiones características de la EA, procedimos a medir las dos lesiones principales que se dan en la enfermedad. En primer lugar, medimos por ELISA el péptido A β en placas. En la Figura 18a se muestran los niveles de

A β de tejido hipocámpico y de corteza cerebral de ratones APP/PS1. En ambos casos la concentración aumenta con el consumo de glutamato, correspondiendo los niveles más elevados los de los grupos APP/PS1 1%. Sin embargo, el aumento sólo es estadísticamente significativo en tejido hipocámpico comparando el grupo APP/PS1 1% con el grupo APP/PS1 C. Por otro lado, también quisimos comprobar si la ingesta de GMS causaba un aumento de la producción de A β propia del ratón en los WT y no sólo la producida por las mutaciones humanas insertadas en el transgénico. En la Figura 18b se muestran los resultados obtenidos en corteza e hipocampo de A β murino en ratones WT. En ella observamos que aunque hay tendencia al aumento del péptido en el grupo con consumo de un 1% de GMS, no hay diferencias estadísticamente significativas.

Además, quisimos ampliar estas mediciones incluyendo la determinación tanto de placas como de A β oligomérico. En la Figura 18c se muestran las imágenes para la detección de oligómeros y formas fibrilares de A β , medidos por inmunohistoquímica en la zona CA1 del hipocampo. El análisis estadístico señaló que los niveles de A β encontrados en los ratones APP/PS1 1% son significativamente superiores a los hallados en el resto de los grupos (Figura 18d).



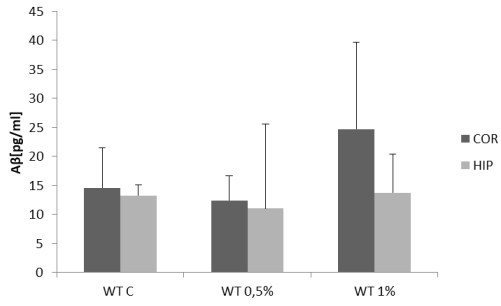
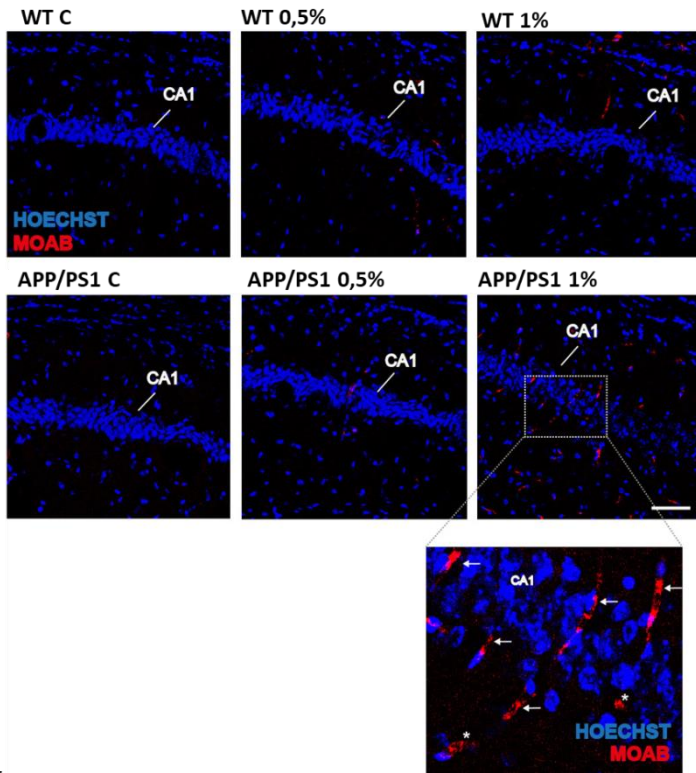
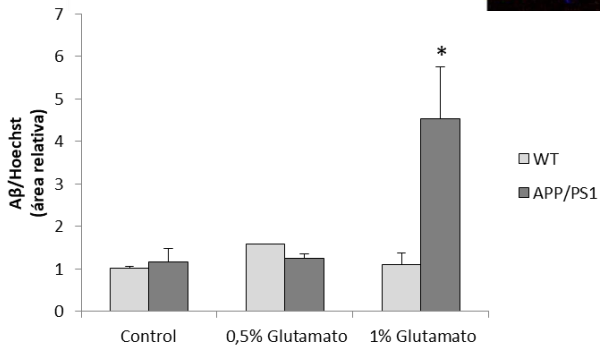
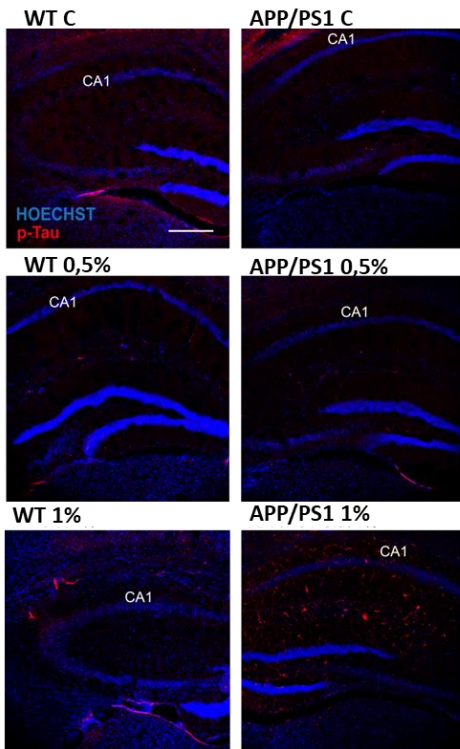
b**c****d**

Figura 18. Análisis de la proteína A β en tejido hipocámpico y corteza cerebral. (a) Concentración de A β obtenido por ELISA en corteza e hipocampo de ratones APP/PS1. (b) Concentración de A β murino medidos mediante ELISA en corteza e hipocampo de ratones WT. (c,d). Detección de A β en la zona CA1 del hipocampo por inmunohistoquímica con el anticuerpo A β (1:500) en rojo y Hoechst (1:1000) para tinción de núcleos en azul. Resultados estadísticamente significativos (* $p < 0,05$); (n=4).

4.4. Estudio de la fosforilación de proteína Tau en ratones APP/PS1 con consumo de GMS al 1%.

El marcaje para la detección de la fosforilación del sitio Ser202/Thr205 de la proteína Tau por inmunohistoquímica (Figura 19a), indica que la hiperfosforilación en el grupo APP/PS1 1% es significativamente más alta que la encontrada en su grupo control. Además, la fosforilación resulta también significativamente más elevada en el grupo WT 1% respecto al WT C (Figura 19b).

a



b

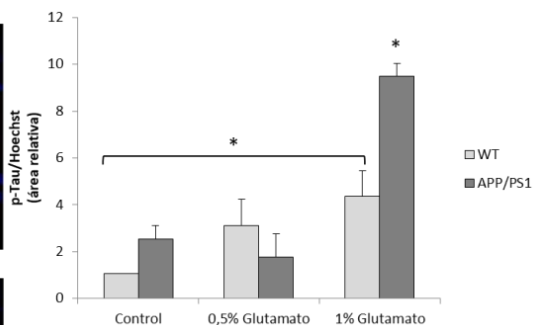


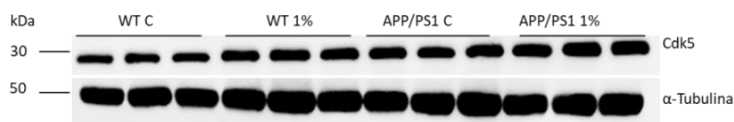
Figura 19. Detección por inmunohistoquímica de la proteína p-Tau en zona CA1. (a) Imágenes representativas de inmunohistoquímica tras la incubación de anticuerpo p-Tau (5-10 $\mu\text{g/ml}$) en rojo y Hoechst (1:1000) para el marcaje de núcleos en azul. (b) Representación de los valores cuantificados de fluorescencia. Resultados estadísticamente significativos ($*p<0.05$); (n=4).

4.5. Mecanismos moleculares implicados en la hiperfosforilación de Tau.

4.5.1. Análisis de Cdk5.

Tras la detección de la proteína p-Tau quisimos analizar el mecanismo por el cuál ésta estaba siendo fosforilada, por lo que decidimos estudiar la quinasa Cdk5, una de las principales responsables de la fosforilación de Tau en la patología de la EA. Observamos que Cdk5 aumenta significativamente en el grupo APP/PS1 1% en comparación al resto de los grupos (Figura 20).

a



b

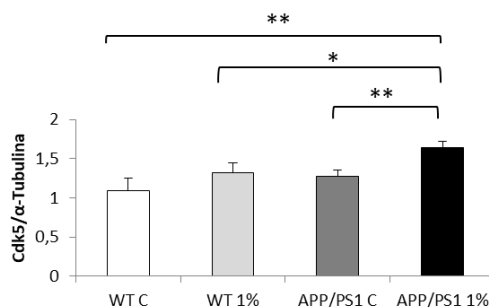


Figura 20: Determinación de proteína Cdk5 en corteza. (a) Imagen del western blotting tras la incubación de los anticuerpos específicos primarios Cdk5 (1:1000) y α -Tubulina (1:1000) y análisis mediante quimioluminiscencia. (b) Resultado de niveles de proteína para cada uno de los grupos por densitometría de las bandas: WT C, WT 1%, APP/PS1 C, APP/PS1 1%. Resultados estadísticamente significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$); (n=3).

4.5.2. Análisis de p35/25.

Una vez concluido un aumento de Cdk5, quisimos analizar el estado de sus coactivadores p35 y p25. El primero de ellos actúa en condiciones fisiológicas, mientras que el último lo hace en presencia de aumento de calcio intracelular y se ha descrito su aumento en la EA (Patrick *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000).

Tal y como se observa en la Figura 21 (a,b) los resultados obtenidos por western blotting indican una tendencia al aumento de p35 en el grupo APP/PS1 1% respecto a su grupo control, aunque no llega a ser significativa ($p=0,468$). Por otro lado, los niveles de p25 resultan significativamente más altos en el grupo APP/PS1 1% que los hallados en el grupo WT 1% (Figura 21c).

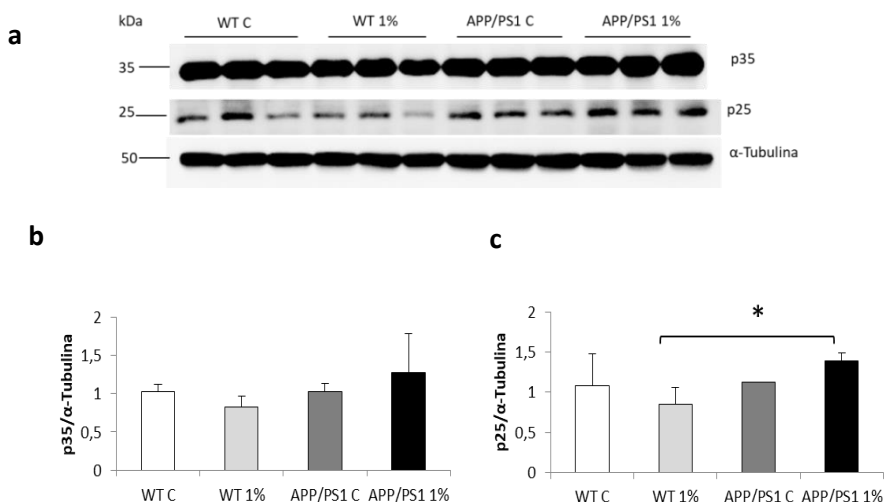


Figura 21: Determinación de la proteína p35/25 en corteza. (a) Imagen de análisis mediante quimioluminiscencia en los grupos de experimentación: WT C, WT 1%; APP/PS1 C; APP/PS1 1%. (b,c) Niveles de p35/25 obtenidos mediante densitometría de bandas. Valores estadísticamente significativos (* $p < 0,05$); (n=3).

4.5.3. Análisis de Cdh1.

A continuación, decidimos estudiar la proteína Cdh1 ya que su actividad, determinante para la viabilidad neuronal, se encuentra influenciada por Cdk5 (Qiao *et al.*, 2010). Como muestra la Figura 22a, en tejido de corteza cerebral, observamos que en el grupo APP/PS1 1% se produce una disminución significativa en sus niveles al compararlo con el APP/PS1 C (Figura 22b).

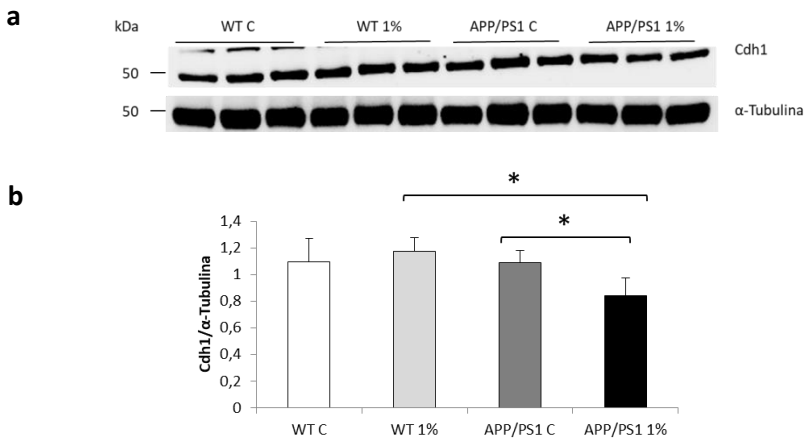


Figura 22: Determinación de Cdh1 en corteza cerebral. (a,b) Resultados obtenidos en la incubación con anticuerpos específicos primarios Cdh1 (1:1000) y α-Tubulina (1:1000) (a) Imagen representativa de análisis por inmunoblotting. (b) Representación de niveles de Cdh1 correspondientes a la densitometría de las bandas de cada uno de los grupos: WT C, WT 1%; APP/PS1 C; APP/PS1 1%. Valores estadísticamente significativos (* $p < 0,05$); (n=3).

Del mismo modo, en hipocampo encontramos que en ratones APP/PS1 que habían consumido GMS al 1% Cdh1 disminuye significativamente respecto al grupo WT con y sin glutamato. Además, al comparar la

cantidad de proteína entre WT C y APP/PS1 C observamos que en estos últimos los niveles son estadísticamente menores (Figura 23).

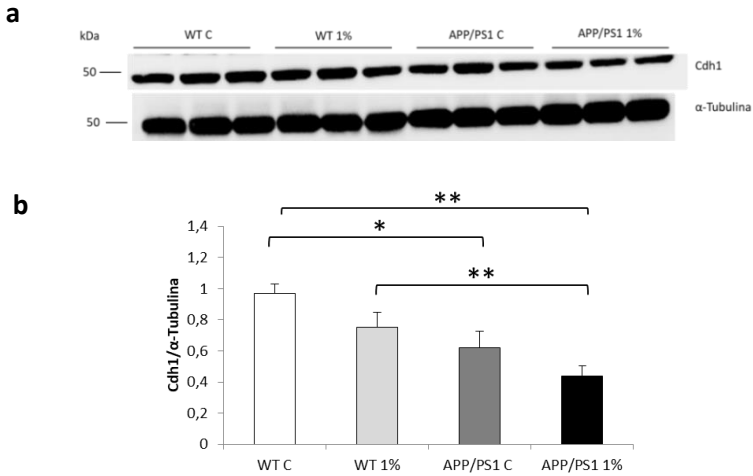
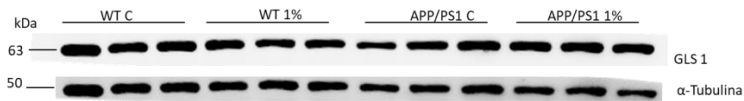


Figura 23: Determinación de Cdh1 en tejido de hipocampo. (a) Imagen del western blot obtenida por incubación con anticuerpos específicos primarios Cdh1 (1:1000) y α-Tubulina (1:1000). (b) Representación de niveles de Cdh1 obtenidos por densitometría de las bandas para los grupos: WT C, WT 1%; APP/PS1 C; APP/PS1 1%. Resultados estadísticamente significativos (* $p < 0,05$, ** $p < 0.01$); (n=3).

4.5.4. Niveles de la enzima Glutaminasa.

Seguidamente, al encontrar diferencias en los niveles de Cdh1, quisimos estudiar una de las dianas de su actividad que además está involucrada en el metabolismo del glutamato, la Glutaminasa (GLS). Cdh1 se une a la E3 ubiquitín ligasa APC/C activándola y ubiquitinizan múltiples proteínas entre las que se encuentra la GLS. Esta enzima es responsable de la producción de glutamato a través de la Glutamina. Su análisis en corteza cerebral de ratón, muestra que los niveles de proteína alcanzados en el grupo APP/PS1 1% son significativamente más altos que los observados en el resto de los grupos tal y como se representa en la Figura 24 (a,b).

a



b

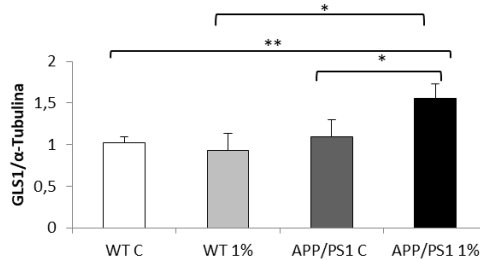


Figura 24: Determinación de GLS1 en corteza cerebral de ratón. (a) Imagen representativa de western blot de anticuerpo GLS1 (1:1000) y α -Tubulina (1:1000). (b) Representación de los niveles obtenidos de la densitometría de las bandas de GLS1 para los grupos: WT C, WT 1%, APP/PS1 C, APP/PS1 1%. Resultados estadísticamente significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$); (n=3).

4.6. Análisis de enzimas implicados en el control y degradación de A β .

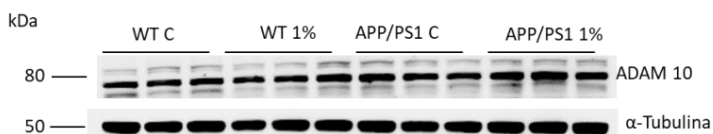
Ya que habíamos comprobado un aumento en los niveles de A β , quisimos comprobar tanto los niveles de enzimas implicadas en su producción, como en su degradación. De esta manera, seleccionamos las proteínas ADAM 10 (parte de la α -secretasa), BACE-1 (β -secretasa), Nicastrina (parte de la γ -secretasa) para analizar la producción a partir del APP; y Neprelisina e IDE, principales enzimas responsables de su degradación.

4.6.1. Análisis de ADAM 10.

En primer lugar, comenzamos con el estudio de la proteína ADAM 10 (α -secretasa) encargada del procesado de la proteína APP en la vía no

amiloidogénica (Figura 25 a,b). En tejido de corteza cerebral se observa que los niveles de ADAM 10 encontrados en los grupos APP/PS1, con y sin consumo de GMS, son significativamente más altos que los encontrados en el grupo WT C (Figura 25b).

a



b

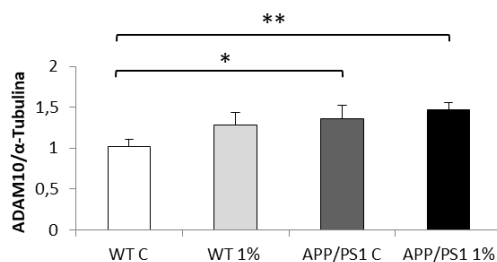
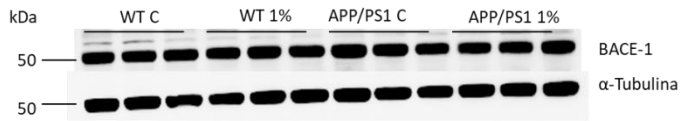


Figura 25: Determinación de ADAM 10 en corteza cerebral de ratón. (a) Imagen representativa de western blot obtenido por la incubación de anticuerpos específicos primarios ADAM 10 (1:500) y α -Tubulina (1:1000). (b) Representación de niveles de ADAM 10 obtenidos por densitometría de las bandas para los grupos: WT C, WT 1%; APP/PS1 C; APP/PS1 1%. Resultados estadísticamente significativos (* p <0,05; ** p <0.01); (n=3).

4.6.2. Niveles de la proteína BACE-1.

Seguidamente, analizamos en corteza de ratón la enzima BACE-1 (β -secretasa), la cual interviene en el procesamiento de la proteína APP en la vía amiloidogénica. Como resultado se obtuvo que no hay variaciones en los niveles de BACE-1 en ninguno de los grupos sometidos a estudio (Figura 26 a,b).

a



b

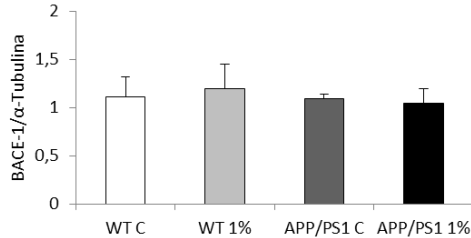
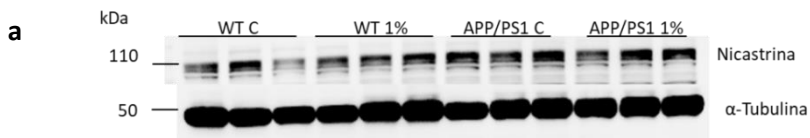


Figura 26: Determinación de BACE-1 en corteza cerebral de ratón. (a) Imagen representativa de western blot obtenido con los anticuerpos específicos primarios BACE-1 (1:1000) y α -Tubulina (1:1000). (b) Representación de niveles de BACE-1 para los grupos: WT C, WT 1%, APP/PS1 C, APP/PS1 1%. (n=3).

4.6.3. Niveles de la enzima Nicastrina.

Como parte de la enzima γ -secretasa, decidimos determinar una de sus subunidades llamada Nicastrina, usada ampliamente como marcador de la misma (Figura 27 a,b). Encontramos un incremento estadísticamente significativo de los niveles de ésta en ambos grupos APP/PS1 respecto al grupo WT C.



b

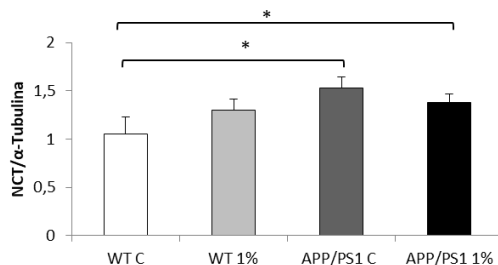


Figura 27: Determinación de Nicastrina en corteza cerebral de ratón. (a) Imagen representativa obtenida por western blot con los anticuerpos específicos primarios Nicastrina (1:1000) y α -Tubulina (1:1000). (b) Niveles de proteína obtenidos por densitometría de las bandas para los grupos: WT C, WT 1%, APP/PS1 C, APP/PS1 1%. Resultados estadísticamente significativos (* $p < 0,05$); (n=3).

4.6.4. Niveles de la enzima Nephelisisina.

Tras analizar los mecanismos implicados en la producción de $A\beta$, decidimos averiguar si la degradación del péptido estaba siendo alterada. Por esta razón, estudiamos los niveles de Nephelisisina en corteza cerebral (Figura 28 a,b).

Tal y como se muestra en la Figura 28b, aunque hay una tendencia a la disminución de los niveles de esta proteína en el grupo APP/PS1 con consumo de GMS al 1%, no se encuentran alteraciones significativas respecto al transgénico no suplementado. Sin embargo, sí aparecen diferencias respecto al WT C.

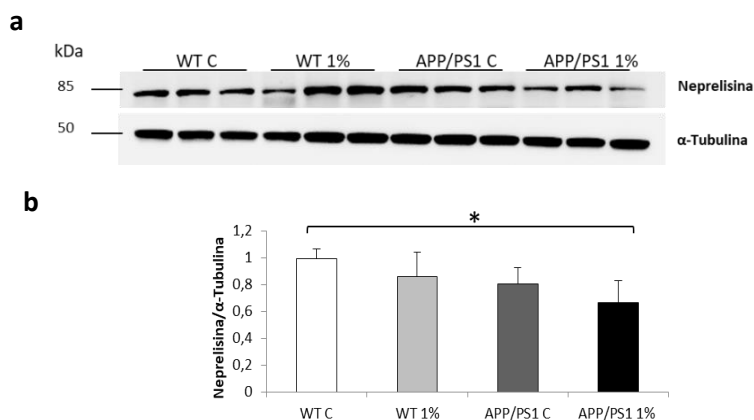


Figura 28. Determinación de Nephelisisina en corteza cerebral de ratón. (a) Imagen representativa de niveles de Nephelisisina analizados mediante western blot con los anticuerpos específicos primarios Nephelisisina (1:1000) y α -Tubulina (1:1000). (b) Representación de resultados de la densitometría de las bandas para los grupos: WT C, WT 1%, APP/PS1 C, APP/PS1 1%. Resultados estadísticamente significativos (* $p < 0,05$); (n=3).

4.6.5. Niveles de la enzima IDE.

Otra de las enzimas principales en la degradación del péptido A β es la enzima degradadora de insulina o IDE y por ello, decidimos determinar sus niveles.

En la figura 29 a,b se observa que los animales WT con suplementación de GMS al 1% aumentan los niveles de la proteína de manera estadísticamente significativa respecto al resto de los grupos. Por otro lado, el consumo de GMS no afecta de manera significativa a los niveles de IDE en animales APP/PS1 (Figura 29b).

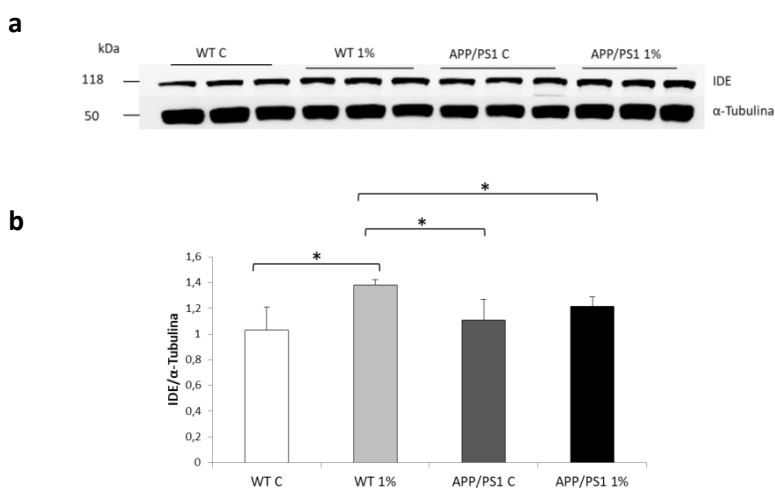


Figura 29. Determinación de IDE en corteza cerebral de ratón. (a) Imagen representativa de western blot obtenida con los anticuerpos IDE (1:1000) y α -Tubulina (1:1000). (b) Representación de resultados de la densitometría para los grupos: WT C, WT 1%, APP/PS1 C, APP/PS1 1%. Valores estadísticamente significativos (* p <0.05); (n=3).

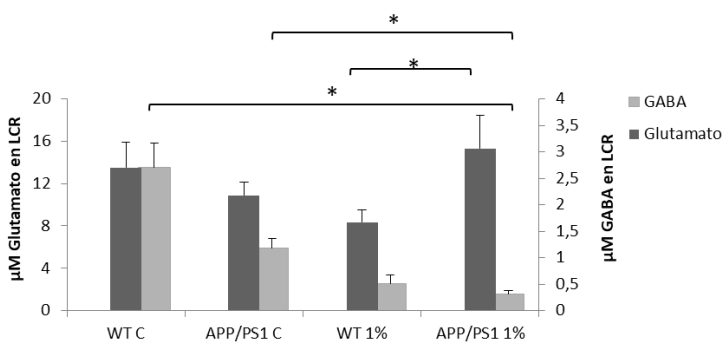
4.7. Alteración de neurotransmisores con consumo de GMS al 1%.

4.7.1. Determinación de glutamato, GABA y Glutamina en LCR.

Los análisis de neurotransmisores en LCR de ratón mostraron alteraciones en los niveles de glutamato y GABA. En el primer caso, se observa una tendencia al descenso en el grupo WT 1% respecto a su grupo sin consumo de glutamato. Por otro lado, los niveles más altos de glutamato se encuentran en el grupo APP/PS1 1%, siendo significativamente más elevados que los hallados en el grupo WT 1% (Figura 30a).

En cuanto al neurotransmisor GABA, se observa que su valor en el grupo WT C es significativamente mayor respecto al grupo APP/PS1 1%. Además, los niveles mostrados en el grupo APP/PS1 1% son significativamente menores a los observados en su grupo control (Figura 30a). No se observan alteraciones en los niveles de Glutamina en ninguno de los grupos experimentales (Figura 30b).

a



b

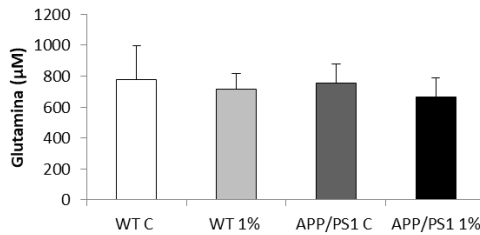
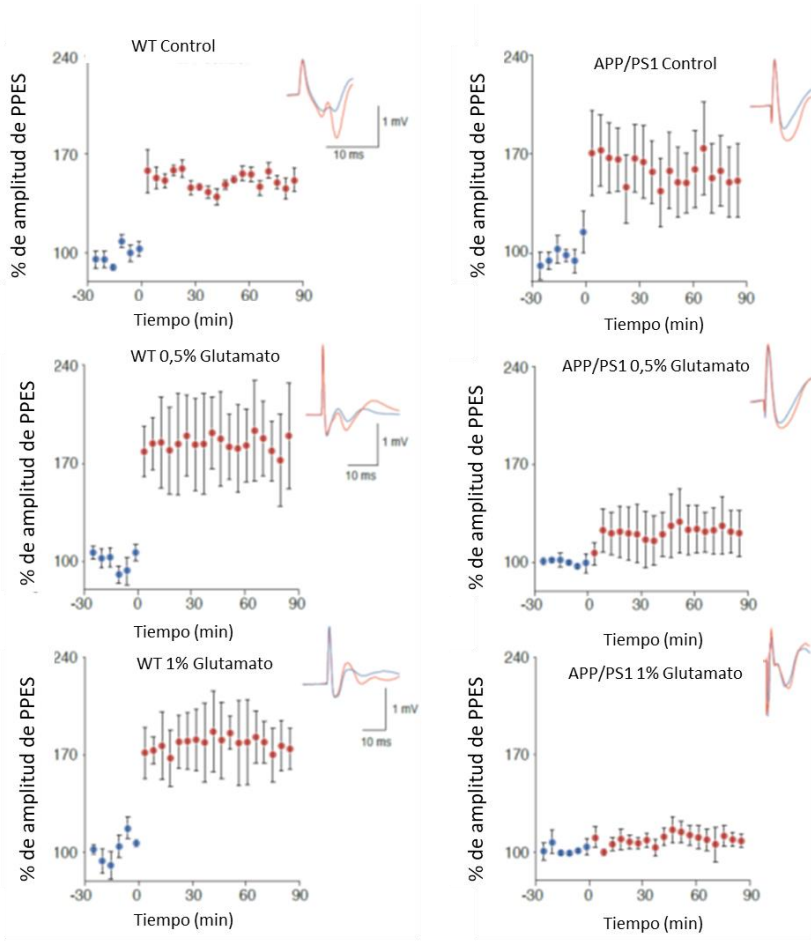


Figura 30. Medida de neurotransmisores en LCR. (a) Representación de los niveles detectados mediante cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas de glutamato y GABA y (b) Glutamina expresados en µM. Resultados estadísticamente significativos (* $p < 0,05$); (n=3).

4.8. Registro de la LTP.

A continuación, decidimos estudiar si la ingesta de GMS provocaba alguna alteración en la funcionalidad del hipocampo, principal órgano involucrado en el desarrollo de la EA. Para ello, quisimos registrar la LTP en los ratones tanto suplementados como controles, para así analizar si la ingesta de GMS afecta a los PEPs hipocámpicos. Como se muestra en la Figura 31b en el grupo APP/PS1 C la respuesta de la LTP basal y posterior al estímulo se encuentra significativamente elevada respecto a las encontradas en los grupos APP/PS1 con consumo de glutamato al 0,5% y 1%, donde la respuesta post estímulo apenas aumenta respecto a la LTP basal. Por otro lado, en los grupos WT la LTP post estimulación aumenta de manera significativa en los grupos suplementados con GMS respecto al control.

a



b

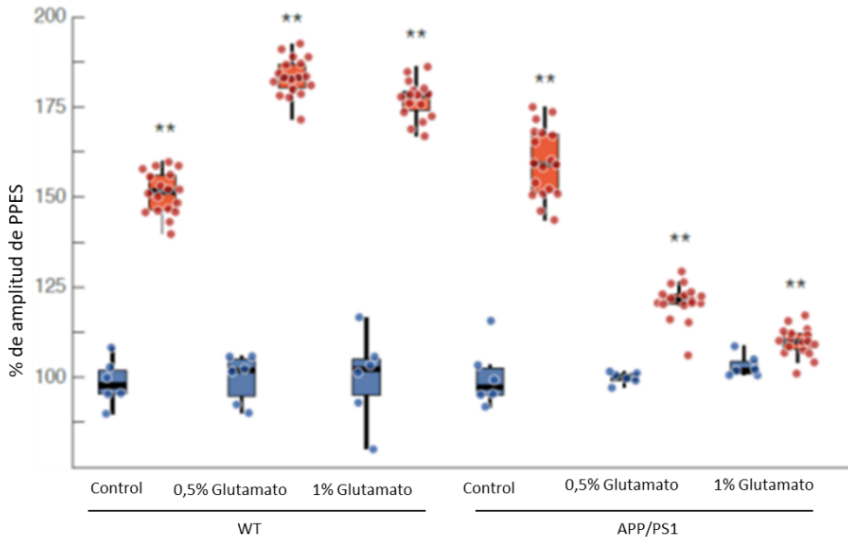
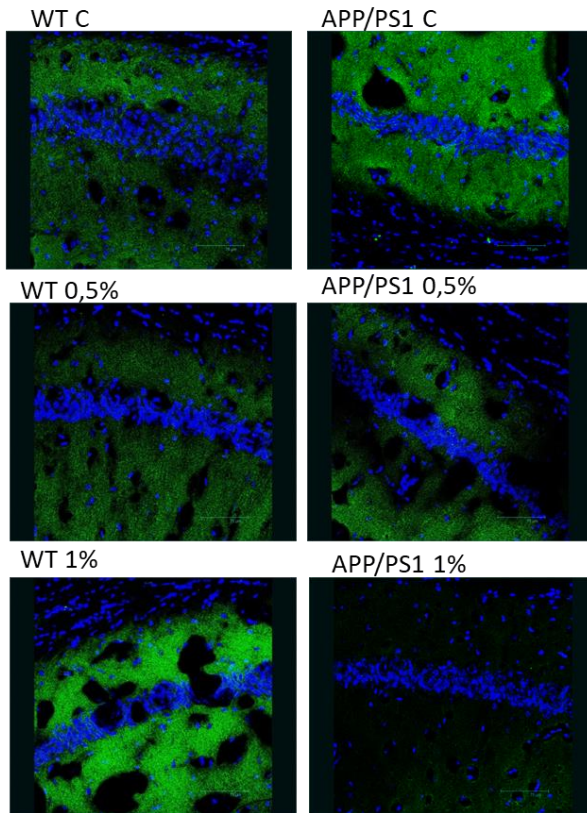


Figura 31. Registro LTP en hipocampo de ratones WT y APP/PS1. (a) Registro de las amplitudes de los potenciales evocados basales (puntos azules) y 90 minutos después de la estimulación (puntos rojos). (b) Porcentaje de las amplitudes tomando como referencia la basal para cada uno de los grupos. Resultados estadísticamente significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$); ($n=5$).

4.9. Estudio de los receptores AMPA de glutamato.

Tras ver una disminución tan importante en la LTP, nos interesaba estudiar los niveles de receptores AMPA ya que están implicados en su inducción. Los receptores AMPA de glutamato permiten llevar a cabo un proceso tan complejo y gravemente afectado en la EA como es el aprendizaje y la memoria. Como vemos en la Figura 31b, el análisis de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA, los cuales están implicados en la producción de LTP, determinó una disminución estadísticamente significativa en el grupo APP/PS1 1% respecto a su grupo control así como en comparación con el grupo WT 1%.

a



b

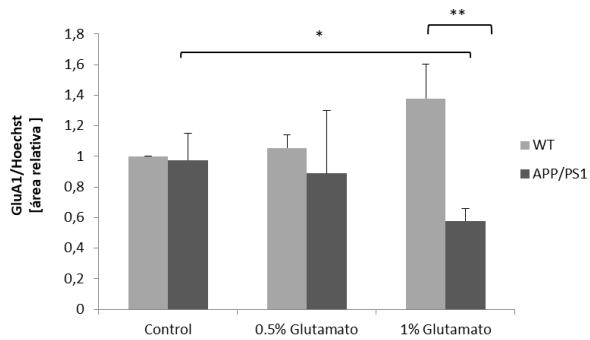


Figura 31. Detección por inmunohistoquímica de la subunidad GluA1 de receptores AMPA en CA1. (a) Imágenes representativas de la detección de AMPA GluA1 (verde) y Hoechst para teñir los núcleos (azul) en ratones WT C, APP/PS1 C, WT 0,5%, APP/PS1 0,5%, WT 1%, APP/PS1 1%. (b) Representación de los valores resultantes de la cuantificación de la fluorescencia de AMPA respecto a la cantidad de células (Hoechst). Resultados estadísticamente significativos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$); (n=4).

4.10. Análisis del comportamiento de los ratones tras la ingesta de GMS.

4.10.1. Test de ansiedad: Laberinto en cruz elevado.

El estado de ansiedad de los ratones se determina por el tiempo total que los animales han pasado en los brazos abiertos del laberinto (TOA, Time in Open Arms), así como su porcentaje, todo ello valorado mediante la prueba del Laberinto en cruz elevado. Según los resultados obtenidos, el tiempo correspondiente al grupo APP/PS1 1% es significativamente mayor respecto a los grupos WT 1% (*) y APP/PS1 C (+), lo cual indica que se encuentran en un estado de ansiedad inferior (Tabla 5).

| | TOA | %TOA |
|-----------------------|---------------|--------------|
| WT-C | 33 ± 10 | 19,1 ± 5 |
| WT-0.5% | 15,3 ± 2 | 18,9 ± 6 |
| WT-1% | 24,4 ± 6 | 16,2 ± 3 |
| APP/PS1 - C | 27,5 ± 6 | 15,5 ± 4 |
| APP/PS1 - 0.5% | 25,4 ± 12 | 14,3 ± 6 |
| APP/PS1 - 1% | 69,7 ± 21 * + | 35,9 ± 9 * + |

Tabla 5. Representación de resultados obtenidos en el Laberinto en cruz elevado. Representación del tiempo absoluto y del porcentaje obtenido en el Laberinto en cruz elevado para la evaluación del estado de ansiedad de los animales. Valores estadísticamente significativos (* $p < 0,05$ en APP/PS1 1% respecto a WT 1%; + $p < 0,05$ en APP/PS1 1% respecto a APP/PS1 C); (n=5).

4.10.2. Test de memoria hipocámpica.

Para valorar el aprendizaje mediado por el hipocampo de los ratones de nuestro estudio se realizó la prueba del Laberinto de Hebb Williams. En la Figura 32 están representados los tiempos (en segundos) que necesitaba cada grupo para resolver el laberinto y encontrar la salida. Las diferentes pruebas que incluye este test se han agrupado en dos niveles de dificultad: un set de laberintos que hemos catalogado como “fáciles”, representados por las barras agrupadas a la izquierda, y otro set de laberintos catalogados como “difíciles”, representados por las barras agrupadas a la derecha. El grupo APP/PS1 1% tiende a invertir mayor tiempo en encontrar la salida en los laberintos fáciles, en comparación a todos los demás grupos, aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas. Sin embargo, en los laberintos difíciles sí encontramos un aumento estadísticamente significativo en el tiempo empleado para resolver la prueba en el grupo APP/PS1 1% en comparación con el grupo WT C (***) y respecto a los grupos APP/PS1 C y APP/PS1 0,5% (++) . Esto muestra que la memoria espacial de los ratones APP/PS1 1% presenta déficits en comparación a la del resto de los grupos.

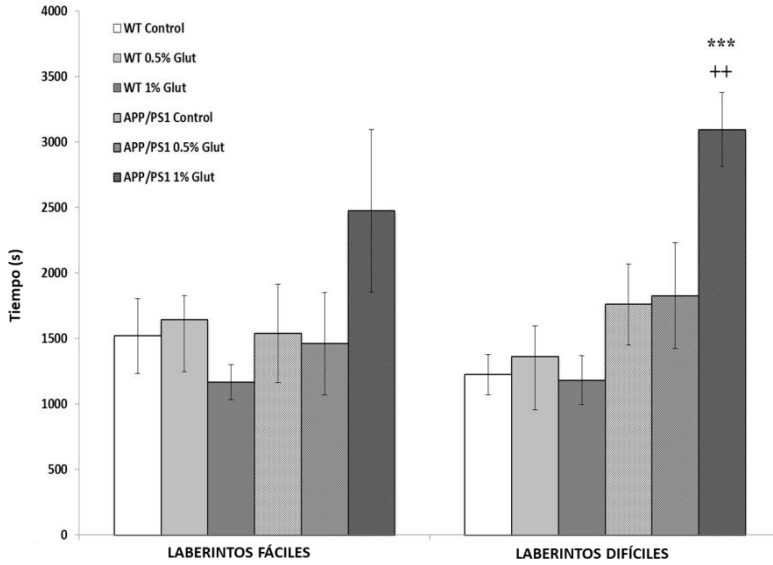


Figura 32: Representación de los resultados del Laberinto Hebb Williams. Laberintos fáciles/Difíciles. Resultados de análisis de memoria hipocámpica de ratones WT Control, WT 0,5%, WT 1%, APP/PS1 C, APP/PS1 0,5%, APP/PS1 1% Glut. Medias \pm S.E.M correspondientes al tiempo de latencia para cada uno de los grupos. Promedio de tiempo invertido \pm S.E.M para la resolución de la prueba, laberintos fáciles y difíciles *** $p < 0,001$ respecto al grupo WT C ++ $p < 0,01$ en comparación a APP/PS1 C y APP/PS1 0,5% (n=5).

5. DISCUSIÓN

El GMS es un potenciador del sabor muy utilizado en la industria alimentaria y hoy en día considerada su ingesta como segura para la salud (Rhodes *et al.*, 1991). Se piensa que su consumo puede aumentar el apetito, de ahí que en ocasiones sea utilizado en personas ancianas que bien no ingieren el alimento suficiente, o que han perdido el apetito o la palatabilidad (Schiffman, 2000; Mojet, Heidema y Christ-Hazelhof, 2003), como puede ser el caso de los pacientes pródromos de EA. Sin embargo, no se han realizado estudios donde demuestren que, específicamente en estos pacientes, la ingesta de GMS en cantidades significativas tenga alguna repercusión en su enfermedad. De hecho, el consumo en exceso de GMS se ha relacionado con el llamado “Síndrome del restaurante chino” (Geha *et al.*, 2000) aunque todavía existe controversia sobre ello (Morselli y Garattini, 1970). Debemos tener en cuenta que, en condiciones fisiológicas, el glutamato no puede pasar del torrente sanguíneo al cerebro ya que la BHE se lo impide (Viña *et al.*, 1997). En cambio, se ha observado que tanto en el envejecimiento normal como en la EA la BHE se encuentra afectada y se vuelve más permeable (Zenaro, Piacentino y Constantin, 2017). Algunos estudios señalan que la pérdida de pericitos puede ser clave para la conservación de la BHE, y que una alteración en la misma puede dar lugar a neurodegeneración (Bell *et al.*, 2012; Sagare *et al.*, 2013). Recientemente, se ha demostrado una disminución del número de pericitos en cerebros de pacientes con EA (Schultz *et al.*, 2018).

Por ello, hemos querido analizar si la administración oral de GMS afecta a la vía fisiopatológica asociada a la EA en ratones APP/PS1 tras el destete (5 semanas). Hipotetizamos que el GMS administrado a los ratones de nuestro estudio puede cruzar la BHE debido a la corta edad de los mismos, y llegar hasta el SNC, agravando o acelerando la enfermedad. Además, al estudiar los efectos en edades tempranas, nos aseguramos de detectar los cambios producidos por la administración de GMS y no por el proceso natural de la enfermedad, ya que durante esas semanas de vida, en nuestro modelo animal, todavía no se producen cambios evidentes como la formación de placas seniles o la hiperfosforilación de Tau o incluso comportamentales (Alzforum, 2018).

En cuanto a la dosis de GMS elegida se realizó basándonos en las cantidades ingeridas por los seres humanos. Sin embargo, la cantidad de GMS consumida por la población puede llegar a ser muy variable. En Europa la estimación media por persona es de 0,5 g/día y en Asia puede llegar a los 1,7 g/día, o incluso 4 g/día en aquellas personas que representan las ingestas más altas (Beyreuther *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta este último dato, y siguiendo la fórmula que utiliza el área de superficie corporal para el cálculo de una dosis de tratamiento animal equivalente a la aplicada en humanos:

$HED(mg/kg) = dosis\ animal\ (mg/kg) \times (k_m\ animal / k_m\ humano)$ (Reagan-Shaw, Nihal y Ahmad, 2008), nosotros administramos GMS con una concentración de 1% y 0,5%, que corresponde a 1700 mg/kg y 717 mg/kg respectivamente, teniendo en cuenta cantidad de agua consumida y peso medio de cada ratón. Es decir, utilizamos dosis de GMS que se corresponden aproximadamente a lo equivalente en una persona que consume 4g al día de GMS como ocurre en Asia (en el caso del grupo con

GMS al 0,5%) y equivalente al doble de este consumo (en el caso del grupo con GSM al 1%). A pesar de ser una dosis relativamente alta, es inferior a la utilizada en otras investigaciones (O'Hara y Takasaki, 1979; Ün y Büyükuslu, 2018; Vorhees, 2018), y no es una dosis inalcanzable en las personas, ya que, como hemos comentado, la dosis ingerida en una sola ingesta puede llegar a 5 g y los datos de cantidades consumidas por personas son medias, pudiendo llegar a ser en algunos casos realmente altas (Beyreuther *et al.*, 2007).

Mientras que en la mayoría de los estudios el GSM es administrado por inyección (Rosa *et al.*, 2018; Saikrishna *et al.*, 2018; López-Vázquez *et al.*, 2019) nosotros decidimos hacerlo vía oral, ya que queríamos saber si la ingesta alta de GSM podía llegar a causar efectos negativos en aquellas personas que son más vulnerables, como sucede en la EA donde existe una alteración en la protección del SNC.

Lo primero que observamos fue que los ratones suplementados con GSM al 1% bebían más cantidad de agua comparado con el resto de grupos. Esto nos llevó a considerar si habríamos provocado de alguna manera una situación de aumento de glucemia y en su caso, de obesidad y de ahí el mayor consumo de agua. Efectivamente, el consumo de GSM se ha relacionado con un aumento de la obesidad. En estudios con animales, se ha señalado que la inyección de GSM, o la administración de dietas ricas en GSM en ratones y ratas recién nacidos, produce obesidad y resistencia a la insulina (Bahadoran, Mirmiran y Ghasemi, 2019; Torrezan *et al.*, 2019). Nosotros comprobamos al medir los niveles de glucemia entre grupos que no había diferencias significativas. Igualmente, medimos el peso de nuestra muestra y vimos que en ninguno de los casos había diferencias entre grupos. Seguidamente y para comprobar nuestra

hipótesis, medimos las 2 lesiones principales que caracterizan la EA: el incremento en los niveles cerebrales de A β y de Tau fosforilada. Según nuestros resultados, la ingesta de GMS al 1% en ratones jóvenes APP/PS1 causa un aumento de los niveles de A β cerebral, tanto en placas como de forma soluble (oligómeros y formas fibrilares), así como de Tau fosforilada. Es decir, hemos “adelantado” la enfermedad, ya que estos marcadores patológicos no se distinguen en estos ratones hasta meses más tarde.

El mecanismo por el cual hemos producido este aumento de los niveles de A β no está del todo claro, aunque pensamos que puede estar influido por el incremento en la actividad sináptica. Se ha demostrado que el incremento de la actividad neuronal influye en el metabolismo estimulando la glicolisis aeróbica y que esto se relaciona con el aumento de los niveles de A β propios de la EA (Bero *et al.*, 2011). Efectivamente, para conservar una óptima funcionalidad cerebral es necesario mantener una concentración de glutamato adecuada. De esta manera, en el medio extracelular es relativamente baja y oscila entre 0,5-2 μ mol/L, mientras que la concentración en plasma puede llegar a 50–100 μ mol/L (Hawkins, 2009). Nosotros obtuvimos que la concentración de glutamato en LCR de ratones APP/PS1 con GMS al 1%, se incrementa de manera significativa respecto a los niveles expresados en el grupo WT con GMS al 1%. Por el contrario, los niveles de GABA encontrados en el grupo APP/PS1 al 1% eran significativamente menores que el expresado por el resto de los grupos. Esto nos lleva a pensar, que el aumento de la permeabilidad de la BHE producida por la disrupción descrita en la EA (Poduslo *et al.*, 2001; Do *et al.*, 2014; Ahn *et al.*, 2018) permitiría el paso del GMS administrado oralmente en nuestro estudio y que esto provocaría alteraciones en el

equilibrio excitación-inhibición. Estos resultados coinciden con lo descrito anteriormente, donde se expone que la exportación de glutamato cerebral se produce por medio de un gradiente de concentración entre los niveles del plasma y los propios del LCR. Por ello, aumentos acusados de glutamato en plasma pueden alterar el control de la entrada de este neurotransmisor al cerebro (Gottlieb, Wang y Teichberg, 2003; Teichberg et al., 2009).

Además, la activación prolongada de los receptores NMDA extrasinápticos, y no la de sinápticos, y la alteración en la transmisión de glutamato, son también mecanismos que promueven la liberación de A β (Lesne *et al.*, 2005; Hoey, Williams y Perkinson, 2009; Bordji *et al.*, 2010).

A su vez, se ha observado que los oligómeros A β promueven la acumulación de glutamato en el espacio extracelular y reduce la cantidad de transportadores que se encargan de su eliminación, favoreciendo de esta manera todavía más el incremento de su concentración y poniendo en marcha un círculo vicioso entre A β y glutamato (Parsons y Raymond, 2014).

Nosotros hemos encontrado que la administración de GMS aumenta significativamente los niveles de A β en nuestro modelo experimental. Aunque la activación de los receptores NMDA extrasinápticos explicaría este fenómeno, nosotros quisimos además, medir tanto las enzimas implicadas en su síntesis como las implicadas en su degradación. En este sentido, hemos determinado los niveles de BACE-1, Nicastrina, ADAM10, Nephrelisina, e IDE.

BACE-1 es una proteína esencial para la formación de A β a partir de la proteína APP. En modelos de ratones *knockout* para esta proteína se ha observado que no se produce A β (Luo *et al.*, 2001), mientras que en

modelos transgénicos con sobreexpresión de BACE-1 los niveles del péptido se encuentran elevados (Bodendorf *et al.*, 2002), algo que también se ha observado en cerebros de pacientes con EA (Fukumoto *et al.*, 2002). No obstante, en algunos estudios no se han descrito variaciones en los niveles de esta proteína ni tampoco en su expresión (Preece *et al.*, 2003; Stockley y O'Neill, 2008); al igual que en nuestros resultados, donde los niveles de BACE-1, medidos mediante Western blot en corteza cerebral, se mantienen estables tanto en ratones WT como en transgénicos con o sin GMS.

En cuanto a las proteínas implicadas en la disminución de los niveles de A β , ADAM 10 es una de las enzimas que tiene un papel fundamental en la EA, ya que no sólo se le ha relacionado con el control de la producción del péptido A β , sino que cumple una importante función en el SNC interviniendo en la neurogénesis, taupatías o en la sinapsis (Yuan *et al.*, 2017). Es una de las metaloproteasas que constituye la α -secretasa, junto con ADAM 17 y ADAM 19, aunque es a la que más importancia se le atribuye, ya que se ha observado que es la que constituye mayoritariamente su estructura. Se ha observado que su sobreexpresión reduce la cantidad producida de A β (Postina *et al.*, 2004) y que por el contrario, la disminución de su actividad conlleva a un aumento en la producción del péptido (Kuhn *et al.*, 2010). No obstante, en nuestro estudio hemos detectado que los niveles de ADAM 10 en corteza cerebral eran superiores en los ratones transgénicos con y sin glutamato al 1%.

Por su parte, la γ -secretasa es otra de las proteasas que participan en el procesado de la APP. A ésta se le otorga un importante papel en la fisiopatología de la EA ya que está relacionada con el incremento del péptido A β 1-42, que es el que más tarde tenderá a agregarse y formar las

placas características de esta enfermedad (Petit *et al.*, 2019). Está formada por cuatro subunidades que intervienen en su actividad así como en su estabilidad estructural, y la Nicastrina, que es uno de ellos, parece ser la que más peso tiene en la regulación de dicho complejo (Zhang *et al.*, 2005). Se ha comprobado que la Nicastrina promueve la actividad de la γ -secretasa, y que por lo tanto contribuye al incremento del péptido A β (Marlow *et al.*, 2003). Los resultados de esta tesis muestran que el consumo de GMS no influye en los niveles de Nicastrina de los animales. No obstante, los niveles de ambos grupos transgénicos, con y sin GMS, son significativamente superiores a los mostrados por el grupo WT sin consumo de GMS.

Dado que en los ratones transgénicos se expresa una mayor cantidad de APP, pensamos que el incremento observado en ellos en los niveles tanto de ADAM10 como de Nicastrina, es debido a que existe un aumento del sustrato (APP) que será procesado por dichas enzimas. Esto exige la elevación de los niveles de ambas secretasas para asegurar el mantenimiento del equilibrio entre el procesado de APP propio de la vía no amiloidogénica y la amiloidogénica.

La Nephelisisina e IDE son las principales proteasas encargadas de la degradación de A β , contribuyendo así al manteniendo del equilibrio entre su producción y degradación (Selkoe, 2001). Mientras que IDE sólo es capaz de eliminar los monómeros solubles de A β , la Nephelisisina actúa además sobre los oligómeros insolubles (Caccamo *et al.*, 2005), y ambas se ha visto que disminuyen sus niveles en corteza e hipocampo con la edad y en estadios tempranos de la EA (Huang *et al.*, 2006). En el caso de la Nephelisisina, se ha observado que su presencia puede disminuir la formación de placas de A β en estudios realizados en *Drosophila* (Iijima-

Ando *et al.*, 2008), y que su expresión es capaz de reducir los niveles cerebrales de dicho péptido en estudios realizados con ratones (Marr *et al.*, 2003). De igual manera, se ha visto que su disminución da lugar a un aumento de A β y consecuentemente, a una disfunción de la actividad sináptica y daño cognitivo (Huang *et al.*, 2006). En nuestro estudio, aunque sí observamos que los niveles de Neprelisina son inferiores en aquellos ratones transgénicos para la EA que han consumido GMS 1% respecto a los ratones WT sin consumo de glutamato, no encontramos diferencias entre ninguno de los otros grupos. Esto pensamos que puede ser debido a la corta edad de los animales utilizados en nuestra investigación. De hecho, en un metaanálisis se demostró que la actividad y expresión de la Neprelisina en la EA sólo era significativamente menor en edades más avanzadas, mientras que en animales jóvenes todavía no era posible encontrar alteraciones (Zhang *et al.*, 2017).

De la misma manera, el descenso de los niveles de IDE se ha descrito como una de las alteraciones propias de la fisiopatología de la EA (Pérez *et al.*, 2000). Además, en animales con EA también se ha relacionado con el aumento de A β y a su vez, se ha comprobado que la aplicación de activadores para el incremento de la expresión de esta proteasa hacen posible el descenso de los niveles de A β (Li *et al.*, 2018). En este aspecto, nuestros resultados muestran que el consumo de GMS al 1% no disminuye los niveles de IDE, y que por el contrario causa su incremento en el grupo WT. Al igual que lo comentado con la Neprelisina, pensamos que de nuevo la existencia de correlación entre edad y descenso de los niveles de IDE (Kochkina *et al.*, 2015), puede influir en nuestros resultados, manteniéndolos sin alteraciones debido a la temprana edad de los ratones utilizados en nuestra investigación.

Todas estas alteraciones observadas en la fisiopatología de la EA, hacen que los mecanismos que se encargan del control de las concentraciones de A β no sean eficaces y, por lo tanto, se incrementen los niveles del mismo.

Nosotros hemos comprobado que la ingesta de GMS en nuestro modelo APP/PS1 ha aumentado los niveles de A β y ha alterado la relación excitación/inhibición de neurotransmisores, aumentando el glutamato cerebral y disminuyendo el GABA. Cuando se dan ambos fenómenos, se ha descrito una sobreestimulación de receptores NMDA como ya hemos comentado, lo cual provocaría un aumento masivo de la entrada de Ca²⁺ en el interior de las neuronas (Figura 33). El aumento de Ca²⁺ intracelular activa a la Calpaína, y ésta a su vez interviene en la modulación de la fosforilación de la proteína Tau por medio del incremento de la actividad de Cdk5 (Ferreira, 2012). Esto es debido al procesado de p35 llevado a cabo por dicha proteasa, que hace que se produzcan las subunidades p10 y p25, siendo esta última capaz de formar un complejo muy estable con Cdk5, muy difícil de eliminar y produce la hiperactividad de la quinasa (Lee *et al.*, 2000). Investigaciones señalan un aumento de p25, además de un incremento en la fosforilación de Tau y disrupción de los microtúbulos, asociado al incremento del complejo p25/Cdk5, tanto en cerebros de pacientes de EA (Patrick *et al.*, 1999), como en animales transgénicos modelos de la enfermedad (Cruz *et al.*, 2003), ya que Cdk5 es una de las principales quinasas de Tau. En nuestro modelo hemos encontrado que la ingesta de GMS ha aumentado los niveles de Cdk5/p25 y como consecuencia, los de p-Tau.

En este aspecto también es importante destacar el papel de p25/Cdk5 sobre el complejo APC/C-Cdh1, una E3 ubiquitín ligasa especialmente

abundante en neuronas. En un trabajo anterior de este grupo de investigación, se comprobó que la inactivación del complejo APC/C-Cdh1 favorece a la excitotoxicidad ya que aumenta los niveles de glutamato. En este estudio, mediante el tratamiento *in vitro* de neuronas con A β oligomérico, se observó una disminución en los niveles de Cdh1 y un aumento de la Glutaminasa mediada por el aumento de Cdk5 (Fuchsberger *et al.*, 2016). Todo ello se correlaciona con los resultados encontrados en nuestro estudio, donde se ha hallado un aumento en los niveles de Cdk5 y de su coactivador p25 en corteza cerebral de ratones transgénicos APP/PS1 con consumo de glutamato al 1%. En estos mismos ratones, también se ha observado que la proteína Cdh1 disminuye, tanto en corteza cerebral como en hipocampo.

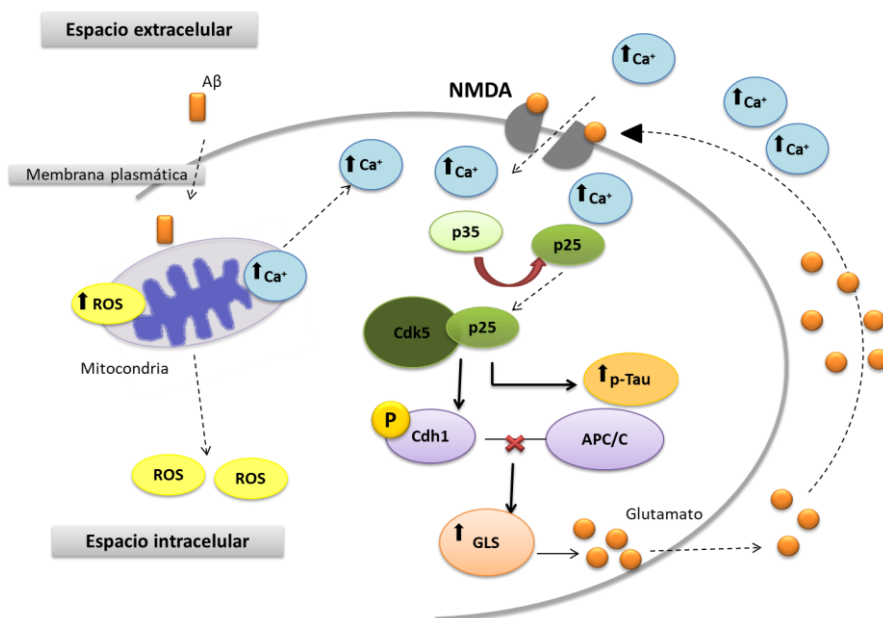


Figura 33. Esquema de la vía de excitotoxicidad en la EA. Esquema representativo de las alteraciones producidas en los mecanismos fisiopatológicos relacionados con la excitotoxicidad presente en la EA analizados.

Por otro lado, estudios han demostrado que A β produce cambios en los receptores NMDA, pero también una disminución aberrante de los receptores AMPA (Guntupalli, Widagdo y Anggono, 2016). En el caso de la EA, se ha visto que una pérdida de los niveles de AMPA es una alteración que se produce tempranamente. Además, se ha observado una correlación entre esta pérdida de la actividad sináptica y la disminución de los mismos, que se da en zonas como la corteza entorrinal y el hipocampo, y que son muy vulnerables en esta enfermedad (Zhao et al., 2010). Congruente con la hipótesis LTP de la memoria a largo plazo, la inyección de estos oligómeros A β solubles en el hipocampo de la rata interrumpe la función cognitiva y el comportamiento aprendido (Cleary et al., 2005; Shankar et al., 2008). De hecho, se ha descrito una pérdida de LTP y déficits a nivel cognitivo en ratones APP/PS1 aunque sólo a partir de los 8 meses de edad (Radde et al., 2006; Gengler, Hamilton y Hölscher, 2010). No obstante, en nuestra investigación hemos encontrado dichas alteraciones en edades más tempranas, por lo que pensamos que el consumo de GMS puede adelantar la aparición de eventos característicos de la enfermedad. Nosotros observamos que el número de los receptores AMPA se ve disminuido en animales APP/PS1 con consumo de GMS y que además disminuye la LTP. Esto último es algo ya descrito en otros estudios, donde se ha observado que un incremento de A β extracelular y alteraciones en la proteína Tau reducen la memoria y la LTP en ratones (Fá et al., 2016).

En nuestro caso, evaluamos la memoria y el aprendizaje espacial mediante el laberinto de Hebb Williams, test específico de la evaluación de la función hipocámpica. Los resultados muestran un incremento del

tiempo empleado por los ratones transgénicos con consumo de GMS al 1% para encontrar la salida del laberinto. Esto nos lleva a pensar que la capacidad de aprender el trayecto del recorrido hasta la salida, se ve alterada por la afectación de la memoria que sufren estos animales. La ansiedad ha sido otro de los parámetros medidos en nuestra investigación, y para ello hemos utilizado el Laberinto en cruz elevado. Curiosamente, los animales transgénicos con consumo de GMS al 1% pasaron más tiempo en los brazos del laberinto abiertos, demostrando así un menor estado de ansiedad estadísticamente significativo, en comparación a los WT con GMS al 1% y a los transgénicos sin consumo de GMS. Esto nos lleva a pensar que el GMS en cantidades elevadas posee un efecto ansiolítico, algo que ya ha sido observado anteriormente (Onaolapo, Aremu y Onaolapo, 2017).

Por todo lo expuesto anteriormente en este trabajo de tesis doctoral, hemos demostrado que el consumo de cantidades altas pero alcanzables de GMS adelanta o agrava la enfermedad de Alzheimer en un modelo murino de la enfermedad. A continuación, exponemos las conclusiones concretas del estudio.

6. CONCLUSIONES

1. La ingesta de GMS al 1% aumenta los niveles de las dos moléculas clave en la EA: el péptido A β (soluble y en placas) y la proteína del citoesqueleto Tau, en su estado hiperfosforilado.
2. El consumo de GMS al 1% no causa diferencias en los niveles de las enzimas implicadas en la producción y degradación de A β .
3. La ingesta de GMS al 1% causa un desequilibrio entre la excitación e inhibición cerebral.
4. La toma de GMS al 1% causa aumento de los niveles de Cdk5 y de su activador p25.
5. La expresión de Cdh1 disminuye en los ratones transgénicos suplementados con GMS al 1%. Así mismo, la GLS1 se acumula, posiblemente, a consecuencia de lo anterior.
6. Los niveles de receptores AMPA disminuyen en ratones transgénicos con consumo de GMS al 1%. Esto conduce a una disminución de la LTP y a la afectación del aprendizaje y memoria espacial.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott, N. J. (2005) «ELSEVIER V-/-^ Physiology of the blood-brain barrier and its consequences for drug transport to the brain», *International Congress Series*, 1277, pp. 3-18. doi: 10.1016/j.ics.2005.02.008.
2. Abramov, E. *et al.* (2009) «Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses», *Nature Neuroscience*, 12(12), pp. 1567-1576. doi: 10.1038/nn.2433.
3. Alachkar, A. *et al.* (2019) «Neuropsychiatric Disease and Treatment Dovepress histamine h3 receptor antagonist e177 attenuates amnesia induced by dizocilpine without modulation of anxiety-like behaviors in rats». doi: 10.2147/NDT.s193125.
4. Alberts, B. *et al.* (2008) «Molecular Biology of the Cell, 5th Edition». doi: 10.1002/bmb.20192.
5. Alzforum (sin fecha) *APPswe/PSEN1dE9 (line 85) | ALZFORUM*. Disponible en: <https://www.alzforum.org/research-models/appswepsen1de9-line-85> (Accedido: 13 de septiembre de 2019).
6. Aminoff, M. J. (Michael J. y Daroff, R. B. (2014) *Encyclopedia of the neurological sciences*.
7. Anlauf, E. y Derouiche, A. (2013) «Glutamine Synthetase as an Astrocytic Marker: Its Cell Type and Vesicle Localization»,

- Frontiers in Endocrinology*, 4, p. 144. doi: 10.3389/fendo.2013.00144.
8. Askew, D. *et al.* (2017) «Cyclin-dependent kinase 5 activity is required for allogeneic T-cell responses after hematopoietic cell transplantation in mice.», *Blood*. The American Society of Hematology, 129(2), pp. 246-256. doi: 10.1182/blood-2016-05-702738.
 9. Bahadoran, Z., Mirmiran, P. y Ghasemi, A. (2019) «Monosodium Glutamate (MSG)-Induced Animal Model of Type 2 Diabetes», en, pp. 49-65. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_3.
 10. Bajaj, I. B. y Singhal, R. S. (2009) «Enhanced production of poly (gamma-glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors», *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Food Engineering and Technology Department, Institute of Chemical Technology, University of Mumbai, Mumbai, India. ishbajaj1@yahoo.co.in, 159(1), pp. 133-141. doi: 10.1007/s12010-008-8427-5 [doi].
 11. Bak, L. K., Schousboe, A. y Waagepetersen, H. S. (2006) «The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer», *Journal of neurochemistry*. Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, The Danish University of Pharmaceutical Sciences, Copenhagen, Denmark. laba@dfuni.dk, 98(3), pp. 641-653. doi: JNC3913 [pii].
 12. Ballatore, C., Lee, V. M.-Y. y Trojanowski, J. Q. (2007) «Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and

- related disorders», *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9), pp. 663-672. doi: 10.1038/nrn2194.
13. Barret, K. E. *et al.* (2010) *Ganong. Fisiología médica*.
 14. Bartanusz, V. *et al.* (2011) «The blood-spinal cord barrier: Morphology and Clinical Implications», *Annals of Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 70(2), pp. 194-206. doi: 10.1002/ana.22421.
 15. Bateman, R. J. *et al.* (2011) «Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease.», *Alzheimer's research & therapy*. BioMed Central, 3(1), p. 1. doi: 10.1186/alzrt59.
 16. Belitsky, B. R. y Sonenshein, A. L. (1998) «Role and regulation of Bacillus subtilis glutamate dehydrogenase genes», *Journal of Bacteriology*. Department of Molecular Biology and Microbiology, Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts 02111, USA. bbelit02@tufts.edu, 180(23), pp. 6298-6305.
 17. von Bernhardt, R. (2004) «La Barrera Hemato-Encefálica en la patología del Sistema Nervioso Central: su importancia en la Respuesta Inflamatoria», *Revista chilena de neuro-psiquiatría*. Sociedad de Neurología, Psiquiatría y Neurocirugía, 42(2), pp. 121-130. doi: 10.4067/S0717-92272004000200005.
 18. Bero, A. W. *et al.* (2011) «Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid- β deposition», *Nature Neuroscience*, 14(6), pp. 750-756. doi: 10.1038/nn.2801.
 19. Beyreuther, K. *et al.* (2007) «Consensus meeting: monosodium glutamate - an update», *European journal of*

- clinical nutrition*. ZMBH, University of Heidelberg, Germany., 61(3), pp. 304-313. doi: 1602526 [pii].
20. Binder, L. I. (1985) «The distribution of tau in the mammalian central nervous system», *The Journal of Cell Biology*, 101(4), pp. 1371-1378. doi: 10.1083/jcb.101.4.1371.
 21. Bird, T. D. (1993) *Alzheimer Disease Overview*, GeneReviews®. University of Washington, Seattle. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301340> (Accedido: 22 de marzo de 2019).
 22. Bodendorf, U. *et al.* (2002) «Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid», *Journal of Neurochemistry*, 80(5), pp. 799-806. doi: 10.1046/j.0022-3042.2002.00770.x.
 23. Bondareff, W., Mountjoy, C. Q. y Roth, M. (1982) «Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia.», *Neurology*, 32(2), pp. 164-8. doi: 10.1212/wnl.32.2.164.
 24. Bordji, K. *et al.* (2010) «Activation of Extrasynaptic, But Not Synaptic, NMDA Receptors Modifies Amyloid Precursor Protein Expression Pattern and Increases Amyloid-Production», *Journal of Neuroscience*, 30(47), pp. 15927-15942. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3021-10.2010.
 25. Braak, H. y Braak, E. (1990) «Neurofibrillary changes confined to the entorhinal region and an abundance of cortical amyloid in cases of presenile and senile dementia», *Acta Neuropathologica*. Springer-Verlag, 80(5), pp. 479-486. doi: 10.1007/BF00294607.

26. Bright Focus Foundation (2000) *Cerebro con la Enfermedad de Alzheimer* | *BrightFocus Foundation*. Disponible en: <https://www.brightfocus.org/espanol/la-enfermedad-de-alzheimer-y-la-demencia/cerebro-con-la-enfermedad-de-alzheimer> (Accedido: 26 de marzo de 2019).
27. Brookmeyer, R. *et al.* (2007) «Forecasting the global burden of Alzheimer's disease», *Alzheimer's & Dementia*, 3(3), pp. 186-191. doi: 10.1016/j.jalz.2007.04.381.
28. Cabezas-Opazo, F. A. *et al.* (2015) «Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease», *Oxidative medicine and cellular longevity*. Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Centro de Investigacion Biomedica, Universidad Autonoma de Chile, San Miguel, 8900000 Santiago, Chile.; Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Centro de Investigacion Biomedica, Universidad Autonoma de Chile, S, 2015, p. 509654. doi: 10.1155/2015/509654 [doi].
29. Caccamo, A. *et al.* (2005) «Age- and region-dependent alterations in A β -degrading enzymes: Implications for A β -induced disorders», *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 26(5), pp. 645-654. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.013.
30. Cassano, T. *et al.* (2016) «Glutamate and Mitochondria: Two Prominent Players in the Oxidative Stress-Induced Neurodegeneration», *Current Alzheimer research*. Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia, Viale Luigi Pinto 1, Foggia 71100, Italy.

- tommaso.cassano@unifg.it., 13(2), pp. 185-197. doi: CAR-EPUB-72614 [pii].
31. Castilho, R. F., Ward, M. W. y Nicholls, D. G. (2001) «Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Acute Glutamate Excitotoxicity in Cultured Cerebellar Granule Cells», *Journal of Neurochemistry*, 72(4), pp. 1394-1401. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.721394.x.
 32. Choi, D. W. (1988) «Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system», *Neuron*. Department of Neurology, Stanford University Medical Center, California 94305., 1(8), pp. 623-634. doi: 0896-6273(88)90162-6 [pii].
 33. Cleary, J. P. *et al.* (2005) «Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function», *Nature Neuroscience*, 8(1), pp. 79-84. doi: 10.1038/nn1372.
 34. Cornutiu, G. (2011) «The Incidence and Prevalence of Alzheimer's Disease», *Neurodegenerative Diseases*, 8(1-2), pp. 9-14. doi: 10.1159/000313659.
 35. Cornutiu, G. y Cornutiu, G. (2015) «The Epidemiological Scale of Alzheimer's Disease», *Journal of Clinical Medicine Research*, 7(9), pp. 657-666. doi: 10.14740/jocmr.v7i9.2106.
 36. Cortés, N. *et al.* (2019) «CDK5: A Unique CDK and Its Multiple Roles in the Nervous System», *Journal of Alzheimer's Disease*, 68(3), pp. 843-855. doi: 10.3233/JAD-180792.
 37. Court, J. A. y Perry, E. K. (1991) «Dementia: The neurochemical basis of putative transmitter orientated therapy», *Pharmacology & Therapeutics*, 52(3), pp. 423-443. doi: 10.1016/0163-7258(91)90035-K.

38. Cruz, J. C. *et al.* (2003) «Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles.», *Neuron*. Elsevier, 40(3), pp. 471-83. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00627-5.
39. Danbolt, N. C. (2001) «Glutamate uptake», *Progress in Neurobiology*, 65(1), pp. 1-105. doi: 10.1016/S0301-0082(00)00067-8.
40. Daneman, R. y Prat, A. (2015) «The Blood-Brain Barrier». doi: 10.1101/cshperspect.a020412.
41. Danysz, W. y Parsons, C. G. (2012) «Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections», *British journal of pharmacology*. Merz Pharmaceuticals GmbH, Eckenheimer Landstrasse, Frankfurt am Main, Germany.: The British Pharmacological Society, 167(2), pp. 324-352. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02057.x [doi].
42. Dash, M. B. *et al.* (2009) «Long-Term Homeostasis of Extracellular Glutamate in the Rat Cerebral Cortex across Sleep and Waking States», *The Journal of Neuroscience*, 29(3), pp. 620-629. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5486-08.2009.
43. Dickson, D. W. y Weller, R. O. (2012) *Neurodegeneración. Patología molecular de la demencia y los trastornos del movimiento*.
44. Duara, R. *et al.* (1993) «A comparison of familial and sporadic Alzheimer's disease.», *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins, 43(7), pp. 1377-84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8327141> (Accedido:

23 de marzo de 2019).

45. Dubois, B. *et al.* (2016) «Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria», *Alzheimer's & Dementia*, 12(3), pp. 292-323. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.002.
46. el-Bacha, R. S. y Minn, A. (1999) «Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain.», *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 45(1), pp. 15-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099836> (Accedido: 13 de febrero de 2019).
47. Eric R. Kandel, Edited, James H. Schwartz, Edited, Thomas M. Jessell, Edited, Steven A. Siegelbaum, Edited, A. J. Hudspeth, Edited, S. M. (2013) *Principles of Neural Science*. 5.^a ed.
48. Evie, I. (sin fecha) *R W International Food Information Council Foundation*. Disponible en: <https://www.foodinsight.org/Content/76/Glutamate-and-Monosodium-Glutamate.pdf> (Accedido: 29 de octubre de 2018).
49. F. Allegri, R. *et al.* (2011) «Enfermedad de Alzheimer. Guía de práctica clínica.», 3, pp. 120-137. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-argentina-301-pdf-S185300281170026X> (Accedido: 28 de febrero de 2019).
50. Fá, M. *et al.* (2016) «Extracellular Tau Oligomers Produce An Immediate Impairment of LTP and Memory.», *Scientific reports*, 6, p. 19393. doi: 10.1038/srep19393.
51. Fagg, G. E. y Foster, A. C. (1983) «Amino acid

- neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system», *Neuroscience*, 9(4), pp. 701-719. doi: 10.1016/0306-4522(83)90263-4.
52. Fell, J. *et al.* (2006) «Rhinal–hippocampal coupling during declarative memory formation: Dependence on item characteristics», *Neuroscience Letters*, 407(1), pp. 37-41. doi: 10.1016/j.neulet.2006.07.074.
53. Ferreira, A. (2012) «Calpain Dysregulation in Alzheimer’s Disease», *ISRN Biochemistry*. Hindawi, 2012, pp. 1-12. doi: 10.5402/2012/728571.
54. *Fórmula para el glutamato monosódico / stguitars.com* (sin fecha). Disponible en: <https://www.stguitars.com/G2yaXOgwg/> (Accedido: 30 de octubre de 2019).
55. Fuchsberger, T. *et al.* (2016) «A β Induces Excitotoxicity Mediated by APC/C-Cdh1 Depletion That Can Be Prevented by Glutaminase Inhibition Promoting Neuronal Survival», *Scientific Reports*, 6(1), p. 31158. doi: 10.1038/srep31158.
56. Fuchsberger, T., Lloret, A. y Viña, J. (2017) «New Functions of APC/C Ubiquitin Ligase in the Nervous System and Its Role in Alzheimer’s Disease», *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 18(5). doi: 10.3390/IJMS18051057.
57. Fukumoto, H. *et al.* (2002) « β -Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease», *Archives of Neurology*. American Medical Association, 59(9), p. 1381. doi: 10.1001/archneur.59.9.1381.

58. Garrido, A. *et al.* (2009) *Bioquímica metabólica Conceptos y Tests*. 2ª. Tebar.
59. Gaugler, J., James, B. y Johnson, T. (2016) «2016 Alzheimer's disease facts and figures», *Alzheimer's & Dementia*, 12, pp. 459-509. doi: 10.1016/j.jalz.2016.03.001.
60. Gazulla, J. y Cavero-Nagore, M. (2006) «[Glutamate and Alzheimer's disease].», *Revista de neurologia*, 42(7), pp. 427-32. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16602060> (Accedido: 10 de enero de 2019).
61. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators (2015) «Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013», *The Lancet*, 385(9963), pp. 117-171. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2.
62. Gegelashvili, G. y Schousboe, A. (1997) «High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity.», *Molecular pharmacology*, 52(1), pp. 6-15. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224806> (Accedido: 7 de enero de 2019).
63. Gegelashvili, G. y Schousboe, A. (1998) «Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters.», *Brain research bulletin*, 45(3), pp. 233-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9510415> (Accedido: 7

- de enero de 2019).
64. Geha, R. S. *et al.* (2000) «Review of alleged reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study», *The Journal of nutrition*. Division of Immunology, Children's Hospital and Department of Pediatrics, Harvard University, Boston, MA, USA., 130(4S Suppl), pp. 1058S-62S.
 65. Gengler, S., Hamilton, A. y Hölscher, C. (2010) «Synaptic Plasticity in the Hippocampus of a APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Is Impaired in Old but Not Young Mice», *PLoS ONE*, 5(3). doi: 10.1371/journal.pone.0009764.
 66. Gong, C.-X. y Iqbal, K. (2008) «Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease», *Current Medicinal Chemistry*, 15(23), pp. 2321-2328. doi: 10.2174/092986708785909111.
 67. Guntupalli, S., Widagdo, J. y Anggono, V. (2016) «Amyloid- β - Induced Dysregulation of AMPA Receptor Trafficking», *Neural Plasticity*. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2016/3204519.
 68. Guyton y Hall (2011) *Tratado de fisiología médica*. Disponible en: <http://media.axon.es/pdf/82948.pdf> (Accedido: 2 de abril de 2019).
 69. Hägglund, M. G. A. *et al.* (2015) «Transport of I -Glutamine, I -Alanine, I -Arginine and I -Histidine by the Neuron-Specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS», *Journal of Molecular Biology*, 427(6), pp. 1495-1512. doi: 10.1016/j.jmb.2014.10.016.
 70. Hanson, P. I., Heuser, J. E. y Jahn, R. (1997) «Neurotransmitter release — four years of SNARE complexes», *Current Opinion in*

- Neurobiology*. Elsevier Current Trends, 7(3), pp. 310-315. doi: 10.1016/S0959-4388(97)80057-8.
71. Hardy, J. y Selkoe, D. J. (2002) «The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.», *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), pp. 353-6. doi: 10.1126/science.1072994.
72. Hawkins, R. A. y Viña, J. R. (2016) «How Glutamate Is Managed by the Blood-Brain Barrier.», *Biology*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 5(4). doi: 10.3390/biology5040037.
73. Hebert, L. E. *et al.* (2013) «Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census», *Neurology*, 80(19), pp. 1778-1783. doi: 10.1212/WNL.0b013e31828726f5.
74. Helms, H. C. *et al.* (2012) «In vitro evidence for the brain glutamate efflux hypothesis: Brain endothelial cells cocultured with astrocytes display a polarized brain-to-blood transport of glutamate», *Glia*. John Wiley & Sons, Ltd, 60(6), pp. 882-893. doi: 10.1002/glia.22321.
75. Hertz, L. y Rothman, D. L. (2016) «Glucose, Lactate, β -Hydroxybutyrate, Acetate, GABA, and Succinate as Substrates for Synthesis of Glutamate and GABA in the Glutamine–Glutamate/GABA Cycle», en *Advances in neurobiology*, pp. 9-42. doi: 10.1007/978-3-319-45096-4_2.
76. Hoey, S. E., Williams, R. J. y Perkinson, M. S. (2009) «Synaptic NMDA Receptor Activation Stimulates α -Secretase Amyloid Precursor Protein Processing and Inhibits Amyloid- β

- Production», *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 29(14), pp. 4442-4460. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6017-08.2009.
77. Hsieh, H. *et al.* (2006) «AMPA removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss», *Neuron*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 11724, USA., 52(5), pp. 831-843. doi: S0896-6273(06)00872-5 [pii].
78. Hsueh, Y. H. *et al.* (2017) «Poly-gamma-glutamic Acid Synthesis, Gene Regulation, Phylogenetic Relationships, and Role in Fermentation», *International journal of molecular sciences*. Graduate School of Biotechnology and Bioengineering, Yuan Ze University, Taoyuan city 32003, Taiwan. yihhsueh@saturn.yzu.edu.tw.; Department of Computer Science and Engineering, Yuan Ze University, Taoyuan city 32003, Taiwan. kaiyao.tw@gmail.com.; Departm, 18(12), p. 10.3390/ijms18122644. doi: E2644 [pii].
79. Huang, D. *et al.* (2017) «Glutamate-glutamine and GABA in brain of normal aged and patients with cognitive impairment», *European Radiology*, 27(7), pp. 2698-2705. doi: 10.1007/s00330-016-4669-8.
80. Huang, S.-M. *et al.* (2006) «Nepriylsin-sensitive Synapse-associated Amyloid-Peptide Oligomers Impair Neuronal Plasticity and Cognitive Function * □ S». doi: 10.1074/jbc.M601372200.
81. Iijima-Ando, K. *et al.* (2008) «Overexpression of neprilysin reduces alzheimer amyloid-beta42 (Abeta42)-induced neuron

- loss and intraneuronal Abeta42 deposits but causes a reduction in cAMP-responsive element-binding protein-mediated transcription, age-dependent axon pathology, and premature death in *Drosophila*.», *The Journal of biological chemistry*, 283(27), pp. 19066-76. doi: 10.1074/jbc.M710509200.
82. Iwatsubo, T. *et al.* (1994) «Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43)», *Neuron*. Elsevier, 13(1), pp. 45-53. doi: 10.1016/0896-6273(94)90458-8.
83. Jankowsky, J. L. *et al.* (2004) «Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase», *Human Molecular Genetics*, pp. 159-170. doi: 10.1093/hmg/ddh019.
84. Johnson, G. V. W. y Stoothoff, W. H. (2004) «Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction», *Journal of Cell Science*, 117(24), pp. 5721-5729. doi: 10.1242/jcs.01558.
85. Jose, X. *et al.* (2016) «Neurobiology of Disease Cross Talk Between Brain Innate Immunity and Serotonin Signaling Underlies Depressive-Like Behavior Induced by Alzheimer's Amyloid-Oligomers in Mice». doi: 10.1523/JNEUROSCI.1269-16.2016.
86. Kandel, E. (2001) *Principios de Neurociencias*. 4.^a ed. Mc Garw Hill Interamericana.

87. Kandimalla, R. y Reddy, P. H. (2017) «Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease», *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), pp. 1049-1069. doi: 10.3233/JAD-161118.
88. Kessler, J. P. (2013) «Control of cleft glutamate concentration and glutamate spill-out by perisynaptic glia: uptake and diffusion barriers», *PLoS one*. Aix Marseille Universite, CNRS, CRN2M UMR 7286, Marseille, France. jean-pierre.kessler@univ-amu.fr, 8(8), p. e70791. doi: 10.1371/journal.pone.0070791 [doi].
89. Kirischuk, S., Kettenmann, H. y Verkhratsky, A. (2007) «Membrane currents and cytoplasmic sodium transients generated by glutamate transport in Bergmann glial cells», *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. Springer-Verlag, 454(2), pp. 245-252. doi: 10.1007/s00424-007-0207-5.
90. Kishi, T. *et al.* (2017) «Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis», *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(2), pp. 401-425. doi: 10.3233/JAD-170424.
91. Kitamura, A., Tsurugizawa, T. y Torii, K. (2011) «Biological significance of glutamate signaling during digestion of food through the gut-brain axis», *Digestion*. Frontier Research Laboratories, Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki-ku, Kawasaki, Japan.: S. Karger AG, Basel, 83 Suppl 1, pp. 37-43. doi: 10.1159/000323407 [doi].
92. Kochkina, E. G. *et al.* (2015) «Effects of ageing and experimental diabetes on insulin-degrading

- enzyme expression in male rat tissues.», *Biogerontology*, 16(4), pp. 473-84. doi: 10.1007/s10522-015-9569-9.
93. Kovacevic, Z. y McGivan, J. D. (1983) «Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance», *Physiological Reviews*. United States, 63(2), pp. 547-605. doi: 10.1152/physrev.1983.63.2.547 [doi].
94. Kuhn, P.-H. *et al.* (2010) «ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons», *The EMBO Journal*, 29(17), pp. 3020-3032. doi: 10.1038/emboj.2010.167.
95. Kwok, R. H. (1968) «Chinese-restaurant syndrome», *The New England journal of medicine*. National Biomedical Research Foundation. Silver Spring, Maryland, 278(14), p. 796.
96. Lai, M. K. P. *et al.* (2003) «Reduced serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in the temporal cortex correlates with aggressive behavior in Alzheimer disease», *Brain Research*, 974(1-2), pp. 82-87. doi: 10.1016/S0006-8993(03)02554-X.
97. Lee, M. *et al.* (2000) «Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain», *Nature*, 405(6784), pp. 360-364. doi: 10.1038/35012636.
98. Lesne, S. *et al.* (2005) «NMDA Receptor Activation Inhibits - Secretase and Promotes Neuronal Amyloid- Production», *Journal of Neuroscience*, 25(41), pp. 9367-9377. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0849-05.2005.
99. Lewerenz, J. y Maher, P. (2015) «Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence?», *Frontiers in neuroscience*. Department of Neurology, Ulm

University Ulm, Germany.; Cellular Neurobiology Laboratory,
Salk Institute for Biological Studies La Jolla, CA, USA., 9, p. 469.
doi: 10.3389/fnins.2015.00469 [doi].

100. Li, H. *et al.* (2018) «Insulin degrading enzyme contributes to the pathology in a mixed model of Type 2 diabetes and Alzheimer's disease: possible mechanisms of IDE in T2D and AD», *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd, 38(1). doi: 10.1042/BSR20170862.
101. Lloret, A. *et al.* (2008) «Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease», *Free radical biology & medicine*. Departamento de Fisiologia, Facultad de Medicina, Avda. Blasco Ibanez 15, 46010 Valencia, Spain., 44(12), pp. 2019-2025. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.017 [doi].
102. Lodish, H. F. (2000) *Molecular cell biology*. W.H. Freeman.
Disponibile en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/> (Accedido:
31 de julio de 2019).
103. Lopez-Miranda, V. *et al.* (2015) «Effects of chronic dietary exposure to monosodium glutamate on feeding behavior, adiposity, gastrointestinal motility, and cardiovascular function in healthy adult rats», *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. Area de Farmacologia y Nutricion y Unidad Asociada al Instituto de Quimica Medica(IQM) y al Centro de Investigacion de Alimentos (CIAL) del Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC), Universidad Rey Juan Carlos,

- Alcorcon, Madrid, Spain.; Inst: John Wiley & Sons Ltd, 27(11), pp. 1559-1570. doi: 10.1111/nmo.12653 [doi].
104. López-Vázquez, M. Á. *et al.* (2019) «Neonatal Monosodium Glutamate Administration Disrupts Place Learning and Alters Hippocampal–Prefrontal Learning-Related Theta Activity in the Adult Rat», *Neuroscience*. Pergamon, 414, pp. 228-244. doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2019.07.007.
105. Low, S. Y. *et al.* (1992) «Transport of l-glutamine and l-glutamate across sinusoidal membranes of rat liver. Effects of starvation, diabetes and corticosteroid treatment», *Biochemical Journal*, 284(2), pp. 333-340. doi: 10.1042/bj2840333.
106. Luo, Y. *et al.* (2001) «Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation», *Nature Neuroscience*, 4(3), pp. 231-232. doi: 10.1038/85059.
107. Lynch, M. . (2004) «Long-Term Potentiation and Memory», *Physiol Rev*, 84, pp. 87-137. Disponible en: <https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.00014.2003>.
108. Maccioni, R. B. (2001) «Cdk5.», *European journal of biochemistry*, 268(6), p. 1517. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02022.x.
109. Machado, S. *et al.* (2008) *REVISIÓN EN NEUROCIENCIA Aprendizaje y memoria implícita: mecanismos y neuroplasticidad.* Disponible en: <http://www.neurocienciasaplicadas.com.br/artigos/memoria>

2.pdf (Accedido: 31 de enero de 2019).

110. Malenka, R. C. y Bear, M. F. (2004) *Review LTP and LTD: An Embarrassment of Riches useful to conceptualize LTP and LTD as a general class of cellular/synaptic phenomena. Just as different neu-rons express different complements of ion channels to, Neuron*. Disponible en: https://ac.els-cdn.com/S0896627304006087/1-s2.0-S0896627304006087-main.pdf?_tid=2d347523-f088-4c8f-ac16-22ca8c6027e2&acdnat=1549273373_16d51621968594cce34c4f30f8f65860 (Accedido: 4 de febrero de 2019).
111. Manning, G. *et al.* (2002) «The Protein Kinase Complement of the Human Genome», *Science*, 298(5600), pp. 1912-1934. doi: 10.1126/science.1075762.
112. Manzano Palomo, S., De la Morena Vicente, M. A. y Barquero Jiménez, M. S. (2006) «Neurotransmisores en la enfermedad de Alzheimer», *Revista de Neurología*, 42(06), p. 350. doi: 10.33588/rn.4206.2005219.
113. Marlow, L. *et al.* (2003) «APH1, PEN2, and Nicastrin increase A β levels and γ -secretase activity», *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press Inc., 305(3), pp. 502-509. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00797-6.
114. Marr, R. A. *et al.* (2003) «Nepriylsin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice», *Journal of Neuroscience*, 23(6), pp. 1992-1996. doi: 10.1523/jneurosci.23-06-01992.2003.
115. Martin Prince, A. *et al.* (2015) *World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An AnAlysis of*

prevAlence, IncIDence, cosT AnD TrenDs. Disponible en: www.alz.co.uk/worldreport2015corrections (Accedido: 4 de marzo de 2019).

116. Matés, J. M. *et al.* (2009) «Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics», *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10), pp. 2051-2061. doi: 10.1016/j.biocel.2009.03.003.
117. Maurer, K., Volk, S. y Gerbaldo, H. (1997) «Auguste D and Alzheimer's disease», *The Lancet*, 349(9064), pp. 1546-1549. doi: 10.1016/S0140-6736(96)10203-8.
118. Mayeux, R. y Stern, Y. (2012) «Epidemiology of Alzheimer Disease». doi: 10.1101/cshperspect.a006239.
119. Meldrum, B. y Garthwaite, J. (1990) «Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease», *Trends in pharmacological sciences*. Institute of Psychiatry, De Crespigny Park, UK., 11(9), pp. 379-387. doi: 0165-6147(90)90184-A [pii].
120. Meraz-Ríos, M. A. *et al.* (2010) «Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease», *Journal of Neurochemistry*, 112(6), pp. 1353-1367. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06511.x.
121. Miyamoto, E. (2006) «Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity: Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus», *Journal of Pharmacological Sciences J Pharmacol Sci*, 100, pp. 433-442. doi: 10.1254/jphs.
122. Mojet, J., Heidema, J. y Christ-Hazelhof, E. (2003) «Taste

- Perception with Age: Generic or Specific Losses in Supra-threshold Intensities of Five Taste Qualities?», *Chemical Senses*, 28(5), pp. 397-413. doi: 10.1093/chemse/28.5.397.
123. Moldestad, O. *et al.* (2009) «Tracheotomy improves experiment success rate in mice during urethane anesthesia and stereotaxic surgery», *Journal of Neuroscience Methods*, 176(2), pp. 57-62. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.08.015.
124. Moodley, K. K. y Chan, D. (2014) «The Hippocampus in Neurodegenerative Disease», en *Frontiers of neurology and neuroscience*, pp. 95-108. doi: 10.1159/000356430.
125. Morselli, P. L. y Garattini, S. (1970) «Monosodium Glutamate and the Chinese Restaurant Syndrome», *Nature*. Nature Publishing Group, 227(5258), pp. 611-612. doi: 10.1038/227611a0.
126. Nagata, M. *et al.* (2006) «Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate», *Experimental Animals*, 55(2), pp. 109-115. doi: 10.1538/expanim.55.109.
127. Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2014) *Principios de bioquímica*. 6^a. Disponible en: [https://www.berri.es/pdf/LEHNINGER PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA/9788428216036](https://www.berri.es/pdf/LEHNINGER_PRINCIPIOS_DE_BIOQUIMICA/9788428216036) (Accedido: 29 de octubre de 2018).
128. Newcomb, R. *et al.* (1997) «Increased production of extracellular glutamate by the mitochondrial glutaminase following neuronal death.», *The Journal of biological chemistry*, 272(17), pp. 11276-82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111031> (Accedido:

13 de enero de 2019).

129. Niaz, K., Zaplatic, E. y Spoor, J. (2018) «Extensive use of monosodium glutamate: A threat to public health?», *EXCLI Journal*, 19 marzo, pp. 273-278. doi: 10.17179/excli2018-1092.
130. Niswender, C. M. y Conn, P. J. (2010) «Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease», *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), pp. 295-322. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.
131. Norenberg, M. D. y Martinez-Hernandez, A. (1979) «Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain», *Brain Research*. Elsevier, 161(2), pp. 303-310. doi: 10.1016/0006-8993(79)90071-4.
132. Nutrition, 'Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety and (2003) «MONOSODIUM GLUTAMATE A Safety Assessment». Disponible en: <http://www.foodstandards.gov.au>. (Accedido: 13 de febrero de 2019).
133. O'Hara, Y. y Takasaki, Y. (1979) «Relationship between plasma glutamate levels and hypothalamic lesions in rodents», *Toxicology Letters*. Elsevier, 4(6), pp. 499-505. doi: 10.1016/0378-4274(79)90118-8.
134. Olney, J. W. (1986) «Inciting excitotoxic cytocide among central neurons.», *Advances in experimental medicine and biology*, 203, pp. 631-45. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3024464> (Accedido:

- 19 de febrero de 2019).
135. Onaolapo, O. J., Aremu, O. S. y Onaolapo, A. Y. (2017) «Monosodium glutamate-associated alterations in open field, anxiety-related and conditioned place preference behaviours in mice», *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Springer Verlag, 390(7), pp. 677-689. doi: 10.1007/s00210-017-1371-6.
 136. Organización Mundial de la Salud (2013) *Demencia una prioriDaD De salud pública*. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/98377/9789275318256_spa.pdf;jsessionid=C34D9858A6466B1A332D444AA3A40679?sequence=1 (Accedido: 7 de marzo de 2019).
 137. Ortega Loubon, C. y César Franco, J. (2010) «Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. Plasticidad Neuronal», 6(2). doi: 10.3823/048.
 138. Pal, B. (2018) «Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability», *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei krt 98, Debrecen, 4012, Hungary. pal.balazs@med.unideb.hu. doi: 10.1007/s00018-018-2837-5 [doi].
 139. Parsons, M. P. y Raymond, L. A. (2014) «Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders», *Neuron*, 82(2), pp. 279-293. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.030.
 140. Patrick, G. N. *et al.* (1999) «Conversion of p35 to p25

- deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration», *Nature*, 402(6762), pp. 615-622. doi: 10.1038/45159.
141. Patterson, C. (2008) «The case Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease Review». doi: 10.1503/cmaj.070796.
142. Pérez, A. *et al.* (2000) «Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains.», *Neurochemical research*, 25(2), pp. 247-55. doi: 10.1023/a:1007527721160.
143. Perry, E. K. (1980) «THE CHOLINERGIC SYSTEM IN OLD AGE AND ALZHEIMER'S DISEASE», *Age and Ageing*, 9(1), pp. 1-8. doi: 10.1093/ageing/9.1.1.
144. Petit, D. *et al.* (2019) «Extracellular interface between APP and Nicastrin regulates A β length and response to γ -secretase modulators.», *The EMBO journal*, 38(12). doi: 10.15252/embj.2019101494.
145. Pike, C. J. (2017) «Sex and the development of Alzheimer's disease», *Journal of Neuroscience Research*, 95(1-2), pp. 671-680. doi: 10.1002/jnr.23827.
146. Postina, R. *et al.* (2004) «A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model», *Journal of Clinical Investigation*, 113(10), pp. 1456-1464. doi: 10.1172/JCI20864.
147. Preece, P. *et al.* (2003) « β -Secretase (BACE) and GSK-3 mRNA levels in Alzheimer's disease», *Molecular Brain Research*, 116(1-2), pp. 155-158. doi: 10.1016/S0169-

328X(03)00233-X.

148. Purves, D. *et al.* (2015) *Neurociencia*. 5^a.
149. Qiao, X. *et al.* (2010) «APC/C-Cdh1: from cell cycle to cellular differentiation and genomic integrity», *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. Department of Cell Biology and Physiology, University of Pittsburgh School of Medicine and University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, PA, USA., 9(19), pp. 3904-3912. doi: 13585 [pii].
150. Querfurth, H. W. y LaFerla, F. M. (2010) «Alzheimer's Disease», *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society, 362(4), pp. 329-344. doi: 10.1056/NEJMra0909142.
151. Quevenco, F. C. *et al.* (2019) «GABA and glutamate moderate beta-amyloid related functional connectivity in cognitively unimpaired old-aged adults». doi: 10.1016/j.nicl.2019.101776.
152. Radde, R. *et al.* (2006) «Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic ... [EMBO Rep. 2006] - PubMed result», *EMBO reports*, 7(9), pp. 940-6. doi: 10.1038/sj.embor.7400784.
153. Raiten, D. J., Talbot, J. M. y Fisher, K. D. (sin fecha) *Executive Summary from the Report: Analysis of Adverse Reactions to Monosodium Glutamate (MSG)*.
154. Reagan-Shaw, S., Nihal, M. y Ahmad, N. (2008) «Dose translation from animal to human studies revisited», *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Department of Dermatology, University of Wisconsin, 1300 University Ave.,

- Madison, WI 53706, USA., 22(3), pp. 659-661. doi: fj.07-9574LSF [pii].
155. Revett, T. J. *et al.* (2013) «Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology.», *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*. Canadian Medical Association, 38(1), pp. 6-23. doi: 10.1503/jpn.110190.
156. Rhodes, J. *et al.* (1991) «A survey of the monosodium glutamate content of foods and an estimation of the dietary intake of monosodium glutamate», *Food additives and contaminants*. Lancashire County Laboratory, Ashton on Ribble, Preston, UK., 8(5), pp. 663-672. doi: 10.1080/02652039109374021 [doi].
157. Robinson, M. B. y Jackson, J. G. (2016) «Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics», *Neurochemistry International*, 98, pp. 56-71. doi: 10.1016/j.neuint.2016.03.014.
158. Rodriguez, M. *et al.* (2013) «The role of non-synaptic extracellular glutamate», *Brain research bulletin*. Laboratory of Neurobiology and Experimental Neurology, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of La Laguna, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain. mrdiaz@ull.es: Elsevier Inc, 93, pp. 17-26. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.09.018 [doi].
159. Roman-Ramos, R. *et al.* (2011) «Monosodium Glutamate Neonatal Intoxication Associated with Obesity in Adult Stage is Characterized by Chronic Inflammation and Increased

- mRNA Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Mice», *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108(6), pp. 406-413. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00671.x.
160. Rosa, S. G. *et al.* (2018) «Monosodium glutamate induced nociception and oxidative stress dependent on time of administration, age of rats and susceptibility of spinal cord and brain regions», *Toxicology and Applied Pharmacology*, 351, pp. 64-73. doi: 10.1016/j.taap.2018.05.019.
161. Rose, C. F., Verkhatsky, A. y Parpura, V. (2013) «Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease.», *Biochemical Society transactions*, 41(6), pp. 1518-24. doi: 10.1042/BST20130237.
162. Rose, C. R. *et al.* (2018) «Astroglial Glutamate Signaling and Uptake in the Hippocampus». doi: 10.3389/fnmol.2017.00451.
163. Roses, M.D, A. D. (1996) «APOLIPOPROTEIN E ALLELES AS RISK FACTORS IN ALZHEIMER'S DISEASE», *Annual Review of Medicine*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , 47(1), pp. 387-400. doi: 10.1146/annurev.med.47.1.387.
164. Saikrishna, K. *et al.* (2018) «Combined Administration of Monosodium Glutamate and High Sucrose Diet Accelerates the Induction of Type 2 Diabetes, Vascular Dysfunction, and Memory Impairment in Rats», *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 37(1), pp. 63-80. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018017186.

165. Sasaki, H. *et al.* (1986) «Regional distribution of amino acid transmitters in postmortem brains of presenile and senile dementia of Alzheimer type», *Annals of Neurology*, 19(3), pp. 263-269. doi: 10.1002/ana.410190307.
166. Sato, K. *et al.* (2011) «Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25», *Journal of neurochemistry*. Department of Biological Sciences, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo, Japan.: International Society for Neurochemistry, 117(3), pp. 504-515. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07222.x [doi].
167. Schiffman, S. S. (2000) «Intensification of Sensory Properties of Foods for the Elderly», *The Journal of Nutrition*, 130(4), pp. 927S-930S. doi: 10.1093/jn/130.4.927S.
168. Schultz, N. *et al.* (2018) «Amyloid-beta 1-40 is associated with alterations in NG2+ pericyte population ex vivo and in vitro», *Aging Cell*. doi: 10.1111/accel.12728.
169. Selkoe, D. J. (2001) «Clearing the brain's amyloid cobwebs.», *Neuron*, 32(2), pp. 177-80. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00475-5.
170. Shankar, G. M. *et al.* (2008) «Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory», *Nature Medicine*, 14(8), pp. 837-842. doi: 10.1038/nm1782.
171. Shih, I.-L. y Van, Y.-T. (2001) «The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications», *Reviews Issue*, pp. 207-225. doi:

[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00074-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00074-8).

172. Snyder, S. H. y Innis, R. B. (1979) «Peptide neurotransmitters.», *Annual review of biochemistry*, 48, pp. 755-82. doi: 10.1146/annurev.bi.48.070179.003543.
173. Sonnewald, U. (2014) «Glutamate synthesis has to be matched by its degradation - where do all the carbons go?», *Journal of Neurochemistry*, 131(4), pp. 399-406. doi: 10.1111/jnc.12812.
174. Stawski, P., Janovjak, H. y Trauner, D. (2010) «Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective», *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(22), pp. 7759-7772. doi: 10.1016/j.bmc.2010.09.012.
175. Steininger, S. C. et al. (2014) «Cortical Amyloid Beta in Cognitively Normal Elderly Adults is Associated with Decreased Network Efficiency within the Cerebro-Cerebellar System», *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers, 6, p. 52. doi: 10.3389/fnagi.2014.00052.
176. Stockley, J. H. y O'Neill, C. (2008) «Understanding BACE1: essential protease for amyloid- β production in Alzheimer's disease», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(20), pp. 3265-3289. doi: 10.1007/s00018-008-8271-3.
177. Strac, D. S., Muck-Seler, D. y Pivac, N. (2015) *NEUROTRANSMITTER MEASURES IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE: A REVIEW*, Review © Medicinska naklada. Disponible en: http://www.psychiatria-danubina.com/UserDocsImages/pdf/dnb_vol27_no1/dnb_vol

27_no1_14.pdf (Accedido: 26 de julio de 2019).

178. Sulkowski, G. *et al.* (2014) «Modulation of Glutamate Transport and Receptor Binding by Glutamate Receptor Antagonists in EAE Rat Brain», *PLoS ONE*. Editado por V. Ceña, 9(11), p. e113954. doi: 10.1371/journal.pone.0113954.
179. Talantova, M. *et al.* (2013) «A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(27), pp. E2518-27. doi: 10.1073/pnas.1306832110.
180. Tomé, D. (2018) «The Roles of Dietary Glutamate in the Intestine», *Annals of Nutrition and Metabolism*, 73(Suppl. 5), pp. 15-20. doi: 10.1159/000494777.
181. Torrezan, R. *et al.* (2019) «Monosodium I -glutamate-obesity onset is associated with disruption of central control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system», *Journal of Neuroendocrinology*, 31(6), p. e12717. doi: 10.1111/jne.12717.
182. Tu, S. *et al.* (2014) «Oligomeric Abeta-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease», *Molecular neurodegeneration*. Neuroscience and Aging Research Center, Sanford-Burnham Medical Research Institute, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA. shichuntu@sanfordburnham.org., 9, p. 48. doi: 10.1186/1750-1326-9-48 [doi].
183. Ulrich, D. (2015) «Amyloid- Impairs Synaptic Inhibition via

GABAA Receptor Endocytosis». doi:
10.1523/JNEUROSCI.0950-15.2015.

184. Ün, İ. y Büyükuslu, N. (2018) «Maternal monosodium glutamate intake influences the learning ability of the offspring of sprague dawley rats», *ACTA Pharmaceutica Scientia*, 56(4), p. 107. doi: 10.23893/1307-2080.APS.05628.
185. Verghese, P. B., Castellano, J. M. y Holtzman, D. M. (2011) «Roles of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease and Other Neurological Disorders». doi: 10.1016/S1474-4422(10)70325-2.
186. Viña, J. R. *et al.* (1997) «Penetration of glutamate into brain of 7-day-old rats», *Metabolic Brain Disease*, 12(3), pp. 219-227. doi: 10.1007/BF02674614.
187. Viña, J., Viña, V. y Lloret, A. (2010) «Why Women Have More Alzheimer's Disease Than Men: Gender and Mitochondrial Toxicity of Amyloid- β Peptide», *Journal of Alzheimer's Disease*, 20, pp. 527-533. doi: 10.3233/JAD-2010-100501.
188. Vorhees, C. V. (2018) «A Test of Dietary Monosodium Glutamate Developmental Neurotoxicity in Rats: A Reappraisal», *Annals of Nutrition and Metabolism*. Karger Publishers, 73(Suppl. 5), pp. 36-42. doi: 10.1159/000494781.
189. Wang, R. y Reddy, P. H. (2017) «Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease», *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), pp. 1041-1048. doi: 10.3233/JAD-160763.
190. Wang, X. *et al.* (2013) «Oxidative Stress and Mitochondrial

Dysfunction in Alzheimer's Disease». doi: 10.1016/j.bbadis.2013.10.015.

191. Yang, W. H. *et al.* (1997) «The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo-controlled, randomized study», *The Journal of allergy and clinical immunology*. Department of Medicine, University of Ottawa, Ontario, Canada., 99(6 Pt 1), pp. 757-762. doi: S0091674997001437 [pii].
192. Yuan, X.-Z. *et al.* (2017) «The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease», *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press, 58(2), pp. 303-322. doi: 10.3233/JAD-170061.
193. Zanfirescu, A. *et al.* (2017) «Chronic Monosodium Glutamate Administration Induced Hyperalgesia in Mice», *Nutrients*. Faculty of Pharmacy, «Carol Davila» University of Medicine and Pharmacy, TraianVuia 6, 020956 Bucharest, Romania. zanfirescuanca@yahoo.com.; Faculty of Pharmacy, «Carol Davila» University of Medicine and Pharmacy, TraianVuia 6, 020956 Bucharest, Romania. , 10(1), p. 10.3390/nu10010001. doi: E1 [pii].
194. Zenaro, E., Piacentino, G. y Constantin, G. (2017) «The blood-brain barrier in Alzheimer's disease.», *Neurobiology of disease*. Elsevier, 107, pp. 41-56. doi: 10.1016/j.nbd.2016.07.007.
195. van der Zeyden, M. *et al.* (2008) «Microdialysis of GABA and glutamate: analysis, interpretation and comparison with microsensors», *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. Department of Biomonitoring and Sensing, University

Centre for Pharmacy, Antonius Deusinglaan 1, Groningen, The Netherlands. m.van.de.zeyden@rug.nl, 90(2), pp. 135-147. doi: S0091-3057(07)00279-1 [pii].

196. Zhang, H. *et al.* (2017) «Meta-analysis of expression and function of neprilysin in Alzheimer's disease», *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 657, pp. 69-76. doi: 10.1016/j.neulet.2017.07.060.
197. Zhang, Y. *et al.* (2005) «Nicastrin Is Critical for Stability and Trafficking but Not Association of Other Presenilin/ γ -Secretase Components», *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), pp. 17020-17026. doi: 10.1074/jbc.M409467200.
198. Zhao, W.-Q. *et al.* (2010) «Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption.», *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(10), pp. 7619-32. doi: 10.1074/jbc.M109.057182.
199. Zhou, Y. y Danbolt, N. C. (2014) «Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain», *Journal of Neural Transmission*, 121(8), pp. 799-817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8.
200. Zlomuzica, A. *et al.* (2016) «Neuronal histamine and cognitive symptoms in Alzheimer's disease», *Neuropharmacology*, 106, pp. 135-145. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.007.