



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**El efecto de la proteína Klotho ante el daño por privación  
de oxígeno y glucosa en cultivo primario de astrocitos**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Biólogo**

**P R E S E N T A :**

**Pablo Alberto Peña Castillo**



**DIRECTORA DE TESIS: Dra. Hilda Martínez  
Coria  
Ciudad de México, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. DATOS DEL ALUMNO  
Peña  
Castillo  
Pablo Alberto  
5516427182  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
312177944
  
2. DATOS DEL TUTOR  
Dra.  
Hilda  
Martínez Coria
  
3. DATOS DEL SINODAL 1  
Dra.  
Maricela  
Luna  
Muñoz
  
4. DATOS DEL SINODAL 2  
Dr.  
Héctor Eduardo  
López Valdés
  
5. DATOS DEL SINODAL 3  
Dra.  
Penélope  
Aguilera  
Hernández
  
6. DATOS DEL SINODAL 4  
Dr.  
Octavio César  
García  
González
  
7. DATOS DE LA TESIS  
El efecto de la proteína Klotho ante el daño por privación de oxígeno y  
glucosa en cultivo primario de astrocitos.  
59 p.  
2020

Este proyecto se realizó bajo la tutoría de la Dra. Hilda Martínez Coria en el laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS) en conjunto con el Laboratorio de Bioquímica de Hormonas del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la ENP 6, a la facultad de Ciencias y en general a la UNAM, por haberme brindado un lugar entre sus filas, para poder nutrirme del conocimiento de sus aulas y por enseñarme el compromiso con mi carrera y con mi nación.

A la Dra. Hilda por tenerme paciencia y creer en mí, por ayudarme más allá de su labor como tutora, por enseñarme a lidiar con la frustración y por obligarme a ser más independiente y responsable.

Al laboratorio experimental de enfermedades neurodegenerativas, a la futura Dra. Dani, al Dr. Héctor, al Dr. Moisés y a la Dra. Minerva por enseñarme el funcionamiento del laboratorio y por sus consejos para mi proyecto.

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de bioquímica de hormonas, y por todo el material y reactivos necesarios para finalizar mi proyecto.

A la Dra. Maricela Luna, por ser mi tutora en Querétaro, por animarme a seguir adelante, por sus comentarios para mi trabajo y por adoptarme en mi estadía en Juriquilla.

A la Dra. Penélope Aguilera por permitirme el uso de sus instalaciones para realizar mis experimentos de hipoxia en el INNNMV.

A mis compañeros del laboratorio LEEN, por hacerme los días más llevaderos y divertidos, en especial gracias a Fernando quien con su particular humor siempre me hace reír, gracias por ser mi amigo. Gracias a Xochil, Naya, Gaby, Ulises y a todos con quienes compartí un poquito o mucho.

Gracias al equipo de trabajo del laboratorio de bioquímica de hormonas, por enseñarme como se hace ciencia y por subir mis estándares como estudiante. Gracias a Martha por regañarme y enseñarme a ser mas ordenado al trabajar. Gracias a Vale por estar conmigo el primer día que llegué a Querétaro, por tenerme paciencia y ser amable al explicarme cosas que por muy obvias no sabía. Gracias al temido Sr. Carlos, porque hasta de lo negativo se aprende. Gracias a Eli y a David por hacerme reír.

Gracias a Chayo, por guiarme en el tortuoso camino de la tesis, por explicarme una y otra vez las técnicas y la estadística, por brindarme su cariño y su aliento para no rendirme, gracias por dejarme adoptarla como mi hermanita, por dejarme enseñarle malos pasos, gracias por tu amistad, te quiero como no tienes idea.

Gracias a mi compañera de laboratorio, de carrera, de cuarto y de vida. A veces la persona que menos crees la indicada es quien te demuestra que puede ser la mejor amiga del mundo. Gracias Joss por estar en las buenas y en las malas, en las risas y en el llanto, en la diversión y en el estrés. Cambiaste mi vida para siempre. No puedo esperar por saber qué es lo que nos depara el destino.

Gracias a Mitzy, Johana y Verónica por acompañarme durante la carrera, por ser mis amigas y por todos los ratos de diversión.

Gracias a Paulina por siempre estar a pesar de la distancia o el distanciamiento. Te quiero infinitamente.

Gracias a Alex por enseñarme a ser mejor persona, por sacarme de mi jaula de oro, por enseñarme el mundo,

Gracias a Carlos por acompañarme en la mayoría de este proceso, por ir a verme a Querétaro y darme ánimos para seguir adelante. Recuerda que no todo el llanto es una calamidad.

Gracias a la gran señora, la gran mujer, la diva etérea e inalcanzable Marco. Gracias por ser mi mejor amigo, por darme la confianza para contarte todo. A veces no lo digo, pero me salvaste cuando estaba hecho mis cachitos, estaré eternamente agradecido por darme una mano para levantarme.

Gracias a Ricardo por cambiar mi mundo de un día a otro, por apoyarme y ayudarme sin pedir nada a cambio, porque ese es el secreto para ganar mi corazón, porque que cuando das sin esperar recibes a montones. Al infinito y más allá mi amooooooooor.

Gracias a todos mis amigos, porque una amistad puede salvar una vida y ustedes ya me salvaron.

Gracias a todos los profesores y compañeros que me ayudaron en este proceso, pero especialmente gracias a todos los que me lo dificultaron, sin los obstáculos que enfrenté jamás hubiera llegado a la meta.

Por último y más importante, gracias a mi familia, por brindarme TODO lo necesario para llegar a ser una persona exitosa. A mis padres por amarme incondicionalmente, por apoyarme en mis sueños y metas, por corregirme y regañarme, perdón si a veces no soy el hijo que esperaban, pero les prometo hacerlos sentir orgullosos. A mis hermanos por ser mis compañeros de vida, por enseñarme a convivir, por dejarme ser su ejemplo, a veces bueno y a veces malo, gracias por ser los mejores hermanos que alguien podría tener.

## **DEDICATORIA:**

Esta tesis esta dedicada a todos los estudiantes que viven situaciones difíciles, que han tenido que crecer rápido y que aun no conocen el enorme potencial que realmente tienen. Están siendo forjados a fuego lento como el metal, y como el metal pueden transformar sus grandes pruebas en sus más grandes fortalezas.

*Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace el camino,  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.  
Caminante no hay camino  
sino estelas en la mar.*

*-Antonio Machado*



**ABREVIATURAS:**

EA	Enfermedad de Alzheimer
KI	Klotho
MTPT	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
BHE	Barrera Hematoencefálica
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
IGF	Factor de crecimiento insulínico
A $\beta$	Beta amiloide
PSEN1	Presinilina 1
PSEN2	Presinilina 2
APOE4	Apolipoproteína 4
NEP	Neprilisina
IDE	Enzima degradadora de insulina
MMP	Metaloproteasas de matriz
ECE	Enzima convertidora de endotelina
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ERK	Cinasa de regulación extracelular
PERK	Proteína cinasa regulada por estrés
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
NO	Óxido nítrico
IL	Interleucina
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
IFN $\gamma$	Interferón gamma
LPS	Lipopolisacárido
IRS	Sustrato receptor de la insulina
PI3	Fosfoinositol 3-cinasa

# Índice

Introducción.....	1
Antecedentes.....	3
1. Infarto Cerebral .....	3
2. A $\beta$ y Enfermedad de Alzheimer .....	8
3. La convergencia entre la Isquemia y la EA .....	11
4. Neuroprotección.....	12
5. Astrocitos .....	13
5.1. Astrocitos reactivos y Astroglisis .....	15
Justificación .....	25
Hipótesis.....	26
Objetivo general .....	26
Objetivos particulares.....	26
Metodología .....	27
1. Animales.....	27
2. Diseño experimental: .....	27
3. Preparación de cultivos primarios de astrocitos: .....	28
4. Viabilidad celular:.....	29
5. Caracterización de la población celular en los cultivos primarios:.....	29
6. Tratamientos y condiciones experimentales de los cultivos: .....	30
7. Cuantificación de proteínas (BDNF, GFAP, KL): .....	31
8. Extracción de RNA:.....	33
9. Síntesis de DNA complementario (DNAc): .....	34
10. PCR punto final:.....	35
11. PCR y qPCR:.....	35
12. Análisis estadístico: .....	36
Resultados .....	37
1. Caracterización de la población celular de los cultivos primarios.....	37
2. Expresión de RNAm de KI en los cultivos primarios .....	38
3. Expresión de la proteína KI en los cultivos primarios de astrocitos .....	39

<b>4. Expresión de BDNF y GFAP en cultivo primario de astrocitos:</b> .....	41
<b>Discusión:</b> .....	43
<b>Conclusiones:</b> .....	53
<b>Referencias:</b> .....	54

## **Introducción**

El accidente cerebrovascular y la demencia son dos de los problemas de salud pública más graves que enfrenta nuestra sociedad. Los accidentes cerebrovasculares, ocurren como resultado del bloqueo repentino del suministro de sangre en regiones específicas del cerebro o por la ruptura de vasos sanguíneos. Por otro lado, la demencia es considerada como un proceso degenerativo, que conduce al deterioro cognitivo de manera progresiva. Aunque por mucho tiempo, ambas patologías fueron consideradas independientes, con el avance de la ciencia, hoy en día es evidente que ambos padecimientos están relacionados. Existen numerosos hechos que vinculan particularmente al infarto cerebral con la enfermedad de Alzheimer (EA) (Lazarov & Tesco, 2016). Estas enfermedades no solo comparten factores de riesgo en común como: hipertensión, diabetes mellitus, tabaquismo, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia y el envejecimiento (Attems & Jellinger, 2014), sino que, además, existe una fuerte incidencia de problemas vasculares, especialmente infartos cerebrales en pacientes que sufren de EA. Por otro lado, la hipoxia se ha relacionado con la alteración de factores vasculares que regulan el suministro de oxígeno al cerebro y acelera la progresión de la patogénesis de EA (Fisk, *et al* 2007).

Los astrocitos juegan un papel vital en la organización, mantenimiento, soporte, protección y reparación del tejido nervioso, por ejemplo: ofrecen soporte metabólico y trófico para las neuronas, participan en la eliminación de especies reactivas de oxígeno y son necesarios para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica (Alobayan, 2019). Por todas las características mencionadas

anteriormente, se considera que la manipulación de los astrocitos puede ser una estrategia importante ante un daño, ya que estas células protegen y aumentan la supervivencia neuronal en diversos eventos patológicos, incluidos la isquemia y la EA (Ouyang, *et al* 2013), a través de la activación de diversos mecanismos de protección endógenos, que promueven la integridad y funcionalidad del cerebro. A estas respuestas se les conoce con el nombre de neuroprotección (Estrada, *et al* 2012).

Entre los diversos mecanismos de neuroprotección, podemos mencionar de forma general la síntesis y liberación de factores tróficos, que ayuden a detener el daño y evitar la muerte celular. Durante años la investigación científica, se ha encargado de estudiar diversos factores tróficos con potencial neuroprotector, entre ellos una proteína llamada Klotho (KI), la cual es detectable principalmente en los túbulos contorneados distales en el riñón y en los plexos coroideos en el cerebro. Adicionalmente se ha demostrado que el mRNA de KI es detectable en regiones como: la corteza, el hipocampo, el cerebelo, el cuerpo estriado, la sustancia negra, el bulbo olfatorio y la médula (Kurosu *et al*, 2005). Por otro lado, gracias al estudio de ratones transgénicos que sobre expresan KI, se sabe que ésta molécula mejora el desempeño cognoscitivo de los ratones, otorga resistencia a la neurodegeneración causada por la sobreexpresión de la proteína APP y A $\beta$ , relacionadas con la EA. Además, estos ratones transgénicos parecen ser resistentes al tratamiento con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), una neurotoxina usada en el modelo de la enfermedad de Parkinson. En este modelo animal se observa una resistencia al estrés oxidante y protección contra la

excitotoxicidad por glutamato (Cararo-Lopes *et al*, 2017). Lo anterior sugiere que el KI es un factor de especial interés para el estudio de la neuroprotección, específicamente en eventos como la isquemia o la EA.

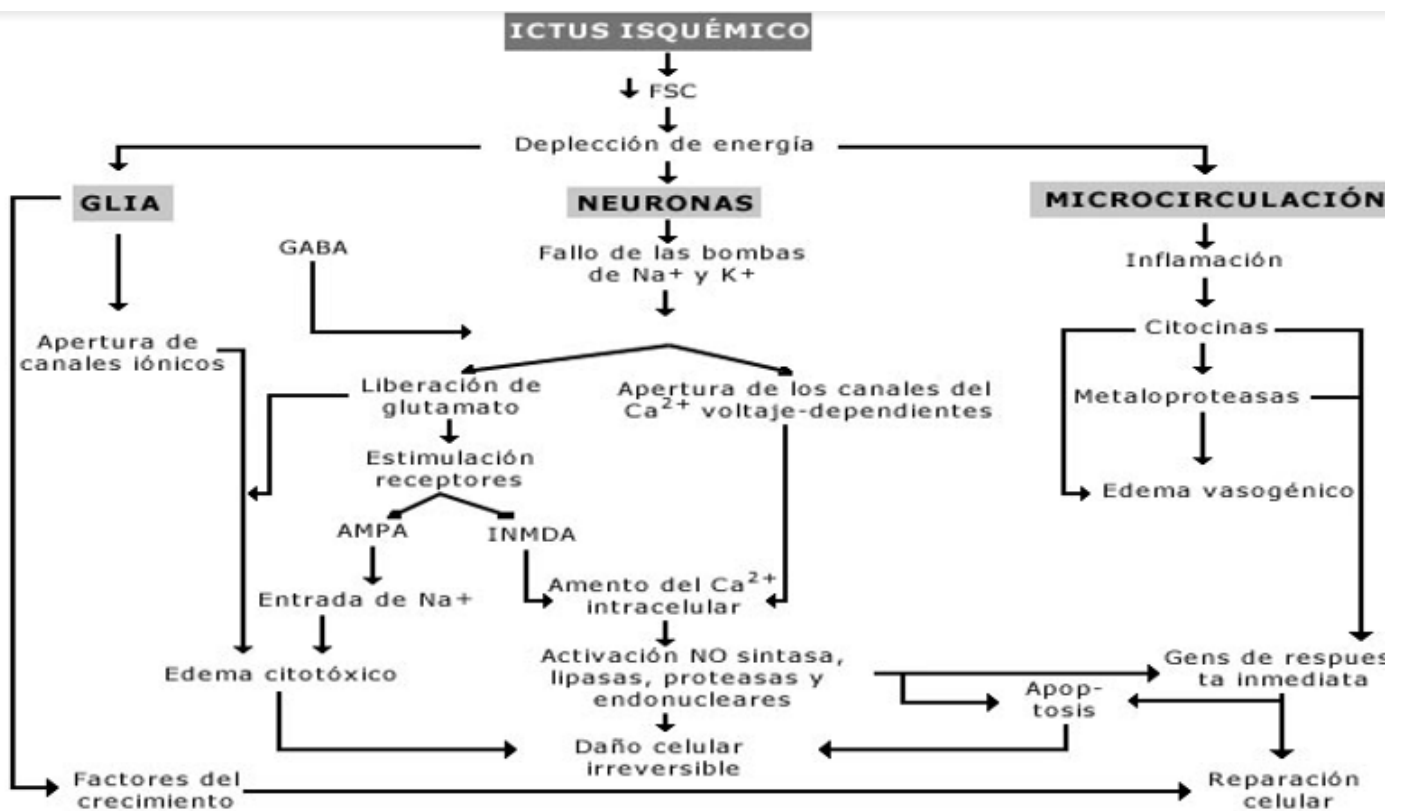
## **Antecedentes**

### **1. Infarto Cerebral**

Entre los accidentes cerebrovasculares, el infarto cerebral es el padecimiento más importante y representa la segunda causa de mortalidad y la tercera de incapacidad a nivel mundial. El infarto cerebral, ocurre como consecuencia de una disminución severa o bloqueo de la circulación de sangre en una arteria y la consecuente disminución de glucosa y oxígeno pueden causar diferentes niveles de daño, dependiendo del tiempo de oclusión del vaso sanguíneo, la resistencia de la células y la magnitud del tejido dañado, En el infarto cerebral, se activan diferentes mecanismos patológicos como excitotoxicidad, daño en la barrera hematoencefálica (BHE) y neuroinflamación ( Martínez-Coria, et al., 2020)

Existe evidencia de que la respuesta inflamatoria de los astrocitos es un evento temprano y primario después del infarto cerebral por lo que la disfunción en los astrocitos pueden disparar una secuencia de eventos patológicos como la pérdida del control del volumen celular, el edema ya sea vasogénico o celular, un incremento en la presión intracraneal, la formación de una hernia cerebral y finalmente el arresto de la circulación (Yu *et al*, 1989).

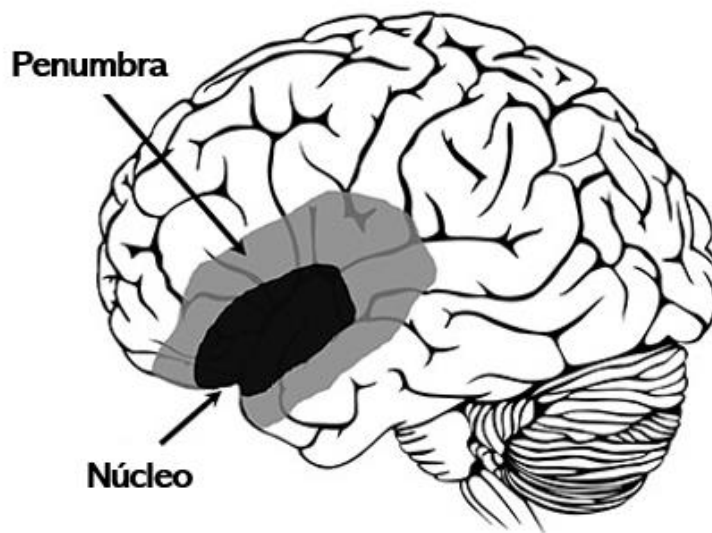
Durante un infarto cerebral, las neuronas son privadas de oxígeno y energía lo cual desencadena una serie de procesos que conducen a la muerte celular: excitotoxicidad, estrés oxidativo y nitrosativo, inflamación y apoptosis. Estos procesos fisiopatológicos (Fig. 1) son perjudiciales no solo para las neuronas, sino también para la glía y las células endoteliales, que al estar interconectadas entre si, están expuestas a compuestos tóxicos que causan la muerte del tejido (Attems, 2014).



■ **Figura 1:** Cascada Isquémica Cerebral, adaptado de Castillo et al. 2003.

Debido a esta interconexión es posible observar un espectro de severidad en la región afectada (Fig. 2), causada por la disminución diferencial del suministro de sangre a diferentes zonas por lo que una parte del tejido cerebral (núcleo), sufre un

daño irreversible debido a la muerte celular necrótica, mientras que los tejidos circundantes (penumbra) contienen células recuperables y metabólicamente activas, en las cuales la muerte celular ocurre con menor rapidez (Khoshnam *et al*, 2017). A pesar de este gradiente de daño, se ha observado que después de un infarto cerebral, algunos astrocitos dentro del núcleo isquémico permanecen viables y metabólicamente activos en las primeras fases después de la reperfusión, por lo que las consecuencias del daño isquémico sobre ellos podrían ser reversibles (Pekny & Nilsson, 2005).



**Figura 2:** Áreas del infarto cerebral

Los cambios en los astrocitos se encuentran entre las respuestas más tempranas y dramáticas del cerebro a una lesión y pueden tener consecuencias críticas sobre la evolución y el resultado del infarto cerebral. Entre los primeros cambios que ocurren



en este tipo celular, se encuentra un cambio morfológico denominado “hipertrofia astrocítica” debido a que los astrocitos adoptan un citoplasma acuoso y agrandado con vacuolas distendidas. Este proceso es el resultado de la alteración osmótica provocada por la pérdida de la homeostasis iónica (Panickar & Norenberg, 2005); además, los astrocitos presentan un gran número de mitocondrias y aumento del retículo endoplásmico rugoso debido al incremento en la síntesis de proteínas (Schimidit, *et al* 1994).

A nivel molecular, la isquemia provoca en las células la falla de la fosforilación oxidativa y de la síntesis de ATP, lo que lleva a que se agote el suministro de ATP, lo cual afecta de forma negativa a la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, lo que resulta en la despolarización de la membrana plasmática, la liberación de potasio al espacio extracelular y la entrada de sodio a las células. Además, existe un fallo en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje lo que causa un aumento dramático en la concentración de calcio intracelular. Esto activa diversas proteínas de señalización de muerte celular, como las proteasas dependientes de calcio, las lipasas y las DNAasas, lo que eventualmente termina en la muerte celular (Khoshnam *et al*, 2017). Sin embargo, los astrocitos son capaces de sobrevivir y funcionar durante períodos prolongados en condiciones de hipoxia mediante la glucólisis anaeróbica, y aunque este proceso promueve la supervivencia de los atrocitos también promueve la acumulación de ácido láctico en el área de penumbra, la cual puede tener efectos perjudiciales sobre el metabolismo celular, dado que la producción de ácido láctico genera iones de hidrógeno lo que altera la homeostasis del pH intracelular (Chen & Swanson, 2003).

Después de una isquemia, existe una liberación patológica de glutamato celular, y aunque usualmente la recaptura de glutamato es llevada a cabo por los astrocitos, estos no son capaces de prevenir la excitotoxicidad. En una crisis excitatoria, las funciones potencialmente protectoras de los astrocitos, como la recaptura del glutamato, la eliminación de radicales libres y el sistema amortiguador de  $K^+$ , pueden verse eventualmente reducidos o incluso revertidos, contribuyendo al desarrollo del daño neuronal. Los cambios morfológicos y moleculares experimentados por los astrocitos cuando ocurre un daño al tejido, se les denomina astrogliosis reactiva o astrocitos reactivos (Anderson y Sofroniew, 2014). Los astrocitos reactivos pueden tanto proteger como contribuir el daño neuronal mediado por glutamato (Pekny & Nilsson, 2005). Además, bajo condiciones de isquemia, tanto la microglía como los astrocitos reactivos son capaces de secretar productos con acciones neuroprotectoras. Por ejemplo, distintos estudios han demostrado que la eliminación de citocinas producidas tras un evento isquémico como IL-6 e IL-1 $\beta$  aumentan la permeabilidad de la BHE y disminuye la producción de factores neurotróficos como el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y el factor de crecimiento insulínico (IGF), lo cual indica que la astrogliosis inducida por citocinas después de un trauma es importante para restablecer la integridad de la BHE y para reparar la lesión en general. Varios datos *in vitro* demuestran que citocinas como la IL-1, la IL-6 y el TNF apoyan la producción de mediadores neuroprotectores (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017).

## **2. A $\beta$ y Enfermedad de Alzheimer**

La EA es una patología neurodegenerativa, irreversible y progresiva cuyo síntoma más notorio y temprano, es la pérdida de la memoria junto con una gradual disminución de otras habilidades intelectuales, cambios notables en la personalidad y el comportamiento, en resumen, las personas que sufren de la EA presentan demencia, es decir, un grupo de desórdenes cerebrales que impiden la cognición (Li, 2011) y que son el resultado del daño progresivo que termina por destruir las células cerebrales. En a EA son dos procesos degenerativos los que caracterizan la fisiopatología: la amiloidogénesis, que corresponde a la formación de filamentos de péptido A $\beta$  en forma de depósitos extracelulares y la degeneración neurofibrilar, resultado de la agregación intraneuronal de filamentos de proteínas tau hiperfosforiladas (Li, *et al* 2011). Esta enfermedad se presenta de dos formas principales; la familiar autosómica dominante de EA que ocurre en menos del 1 % de los casos, es completamente hederitaria, se presenta a una edad temprana y se asocia con mutaciones en el gen de la proteína precursora del amiloide (APP) en la región que codifica para el péptido A $\beta$ , así como en los genes que codifican para las presinilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2), enzimas que regulan la amiloidogenesis. Las otra forma de esta enfermedad, es la llamada esporádica y se asocia a multiples factores de riesgo principalmente la edad, estilo de vida, la presencia del alelo épsilon 4 de la apopoliproteína (APOE4) y algunas comorbilidades como enfermedades vasculares y diabetes entre otras (Dossi *et al* 2018). Se presenta en personas mayores de 65 años y representa la principal causa de demencia en adultos mayores alrededor del mundo. Se caracteriza por la acumulación de

oligómeros del péptido A $\beta$ , el cual se forma como producto de la escisión de APP, ovillos neurofibrilares de la proteína Tau, neuroinflamación y muerte celular. Presenta una progresión lenta que inicia en la región de la corteza temporal y el hipocampo distribuyéndose a todo el cerebro en etapas avanzadas (López-Valdés & Martínez-Coria, 2016).

La neuropatología de la EA es muy compleja y se han propuesto varias hipótesis sobre el desarrollo de esta enfermedad, una de ellas propone al péptido A $\beta$  como el principal generador (Yamamoto *et al*, 2018). Se estima que la acumulación y agregación patológica de A $\beta$  que se ve en la EA, es resultado principalmente de un desequilibrio entre su producción y su eliminación. Por mucho tiempo se ha propuesto que las neuronas son las únicas células responsables de acumular y secretar el péptido A $\beta$ 42 y sus oligómeros en la EA, mientras que los astrocitos se encargan de eliminar los desechos neuronales y los residuos de A $\beta$  (Dal Prá, *et al* 2015). Por otro lado, se sabe que existen varias enzimas endógenas expresadas por los astrocitos capaces de la degradación de A $\beta$ , incluidas la neprilisina (NEP), la enzima degradadora de insulina (IDE), la plasmina, diversas metaloproteasas de matriz (MMP), la enzima convertidora de endotelina (ECE) y la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Yamamoto *et al*, 2018). Por lo tanto, se asumió que esta es la razón por la que los astrocitos están cargados con A $\beta$ 42 en los cerebros humanos con EA. Sin embargo, se ha demostrado que los astrocitos humanos aislados de las cortezas cerebrales del lóbulo temporal al ser expuesto al fragmento A $\beta$ 25-35 exógeno, se convierten en células productoras, acumuladoras y secretoras de A $\beta$ 42. Se propone que la EA se desarrolla como un “contagio” endocerebral puesto

que los oligómeros de A $\beta$  se propagan a través de los procesos de las células por exocitosis, exosoma o varicosidades axonales, convirtiendo a las células diana, astrocitos y neuronas, en células productoras de A $\beta$ . Tomando en cuenta que la proporción de astrocitos es de 1.7 a 2.2 neuronas en general y que además las sinapsis de las redes neuronales están envueltas por los procesos móviles de los astrocitos, donde cada astrocito envuelve un conjunto de neuronas y sus procesos, se propone que los astrocitos podrían contribuir sustancialmente al desarrollo de la neuropatología de la EA (Dal Prá, et al 2015).

Por otra parte, la astrogliosis reactiva junto con los ovillos neurofibrilares y las placas de A $\beta$ , se consideran como los marcadores neuropatológicos del cerebro con la EA (Li, 2011). Aunque los estímulos capaces de inducir la reactividad en astrocitos durante la EA siguen bajo debate, diversos estudios utilizando agregados del péptido A $\beta$  y núcleos intactos de las placas de A $\beta$  aislados de cerebros que presentaban la enfermedad, mostraron que el A $\beta$  puede disparar la activación de astrocitos *in vitro*, dando como resultado una sobreexpresión de GFAP, además de cambios morfológicos en estas células (Dossi *et al* 2018) a través de la activación de la vía ERK (cinasa de regulación extracelular), de hecho, se ha encontrado que el nivel de activación de la proteína cinasa regulada por estrés en el retículo endoplásmico (PERK) en astrocitos, está fuertemente correlacionado con el desempeño cognitivo y la gravedad de la neuropatología en pacientes con EA. Además, se ha demostrado que el péptido A $\beta$ , puede elevar la producción de citocinas y quimiocinas en astrocitos lo que puede transformar a los astrocitos *per se* en reactivos (Li, 2011).

### **3. La convergencia entre la Isquemia y la EA**

El infarto cerebral y la demencia son dos de los problemas de salud pública más graves que enfrenta nuestra sociedad. Como se ha mencionado previamente, el infarto cerebral ocurre como resultado del bloqueo repentino del suministro de sangre a regiones específicas del cerebro. Por otro lado, la demencia es considerada como un proceso degenerativo que conduce al deterioro cognitivo de manera progresiva. Aunque por mucho tiempo ambas patologías fueron considerados como entidades no relacionadas, hoy en día es evidente que ambos padecimientos están relacionados y, de hecho, existe gran evidencia que vinculan estos padecimientos (EA) (Lazarov & Tesco, 2016). No solo comparten factores de riesgo en común como: hipertensión, diabetes mellitus, tabaquismo, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia y el envejecimiento (Attems & Jellinger, 2014), sino que, además, existe una fuerte incidencia de problemas vasculares, especialmente infartos cerebrales en pacientes que sufren de EA. Esto último se ha relacionado con la expresión de la APOE4, una apolipoproteína que regula el metabolismo de lipoproteínas y se asocia con la acumulación de amiloide en los capilares del cerebro. Por otro lado, la hipoxia se ha relacionado con la alteración de factores vasculares que regulan el suministro de oxígeno al cerebro y acelera la progresión de la patogénesis de EA (Fisk et al 2007). Por ejemplo, varios estudios experimentales han demostrado que la isquemia cerebral o la hipoperfusión crónica están asociadas con una mayor expresión de APP,  $\beta$ -secretasa,  $\gamma$ -secretasa y la deposición de  $A\beta$ . Por otro lado, aunque se han descrito diversos mecanismos para

la eliminación A $\beta$ , se cree que la vía vascular juega un papel importante en dicha eliminación ya que la evidencia experimental indica, que estas vías de depuración vascular se deterioran tras un infarto cerebral, lo que disminuye la posibilidad de que se elimine el A $\beta$  acumulado. Por lo tanto, la hipoperfusión cerebral y la isquemia inducida por un infarto cerebral pueden acelerar y potencialmente iniciar la cascada de neurodegeneración en la EA al aumentar la acumulación de A $\beta$  y reducir su depuración (Lazarov & Tesco, 2016), a su vez, el A $\beta$  puede promover la formación de lesiones ateroscleróticas a través del estrés oxidante vascular y la disfunción endotelial, lo cual puede desencadenar una isquemia (Khoshnam *et al*, 2017).

#### **4. Neuroprotección**

Prácticamente cualquier estímulo capaz de causar daño a un tejido u órgano puede activar mecanismos de protección endógenos, lo que potencialmente disminuye el impacto de estímulos posteriores más severos (Dirnagl, *et al* 2003), particularmente las respuestas de protección que intentan mantener la integridad y funcionalidad del cerebro bajo diferentes estímulos dañinos. Estas respuestas se conocen como neuroprotección (Estrada, *et al* 2012). De esta manera podemos definir a la neuroprotección como la prevención o disminución del daño neuronal evidenciado por las irregularidades en el metabolismo cerebral, la histopatología o la función neurológica que ocurre después de un evento de daño. Por lo tanto, la prevención del daño y la recuperación del tejido nervioso representan los objetivos esenciales de la neuroprotección (Hudetz, 2010).

Múltiples datos demuestran que los astrocitos juegan un papel multifacético y complejo en respuesta al daño en el SNC, de hecho, se considera que estas células son las principales responsables de la protección de las neuronas especialmente después de una lesión neuronal (Barreto, 2011) ya que protegen a las neuronas y aumentan su supervivencia en muchos eventos patológicos como la EA y el infarto cerebral, por lo tanto la manipulación de las funciones de los astrocitos es una estrategia importante para mejorar la supervivencia neuronal (Ouyang, *et al* 2013).

## **5. Astrocitos**

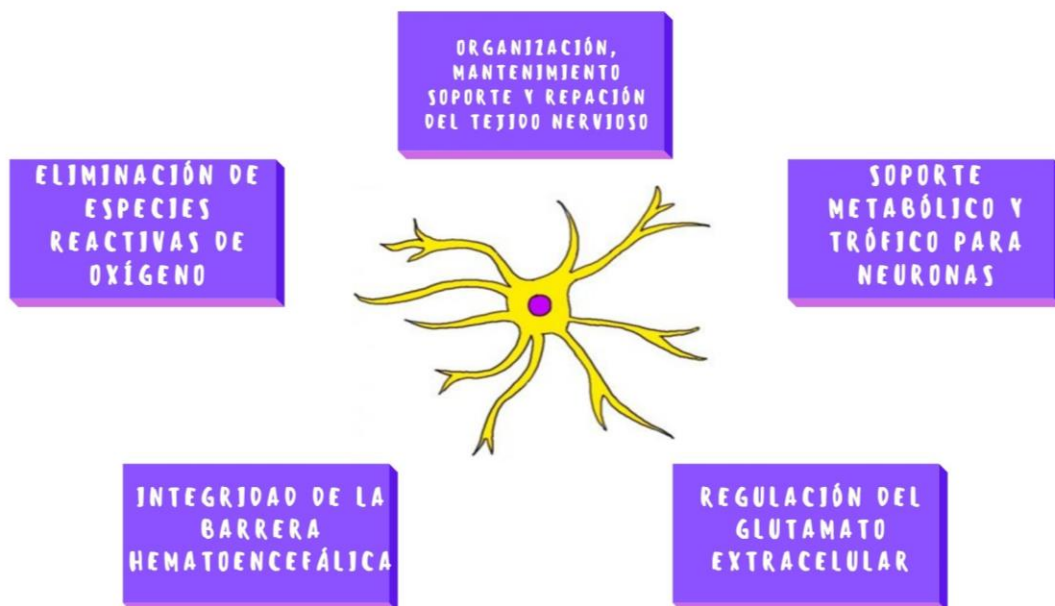
Hasta hace un par de décadas, los astrocitos estuvieron considerados como células gliales de soporte, con actividades limitadas a brindar metabolismo trófico y soporte estructural a las neuronas. Sin embargo, hoy en día, diversas investigaciones han revelado el rol multifacético de los astrocitos en la homeostasis del parénquima cerebral (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017).

Los astrocitos son las células más numerosas del sistema nervioso central y realizan múltiples funciones (Fig. 3) que son de vital importancia para el funcionamiento neuronal óptimo (Chen & Swanson, 2003). Bajo condiciones fisiológicas, los astrocitos juegan un papel muy relevante en la organización, mantenimiento, soporte y reparación del tejido nervioso, ofrecen soporte metabólico y trófico para las neuronas, participan en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, y son necesarios para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica. Además, es importante mencionar que los astrocitos son importantes para la plasticidad y transmisión sináptica en el sistema nervioso central puesto que participan en la



regulación de los niveles de glutamato extracelular en el espacio postsináptico (Alobayan, 2019). Además, pueden liberar factores neurotróficos y antioxidantes, y pueden responder a la liberación de moléculas pro y antiinflamatorias. También, se ha demostrado que los astrocitos regulan el flujo sanguíneo durante la actividad neuronal, a través de la liberación de sustancias vasoactivas como el óxido nítrico (NO), los productos derivados de la actividad de la epoxigenasa, el ATP y la ciclooxigenasa (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017). Muchas de las actividades que realizan los astrocitos se deben a la capacidad de estos para estar interconectados entre ellos vía uniones comunicantes (Pekny & Nilsson, 2005), es decir puntos especializados de contacto, que actúan como unidades de comunicación intercelular para la transmisión directa de moléculas de bajo peso molecular (<1kDa), usualmente iones y metabolitos (Panickar & Norenberg, 2005).

**Figura 3.** Funciones básicas de los astrocitos



Clásicamente los astrocitos se clasifican en tres tipos principales, dependiendo de su morfología y su organización espacial: astrocitos radiales que rodean los ventrículos y que se encuentran orientados perpendicularmente a las superficies ventriculares, sus procesos son largos y poco ramificados; astrocitos protoplasmáticos en la materia gris con una morfología abultada y con numerosos procesos cortos, pero altamente ramificados; y astrocitos fibrosos en la materia blanca y que presentan una morfología más estrellada con procesos suaves y largos, pero poco ramificados. A pesar de esta clasificación es posible encontrar en varias zonas del cerebro astrocitos con una morfología mixta entre los tipos anteriores (Chen & Swanson, 2003).

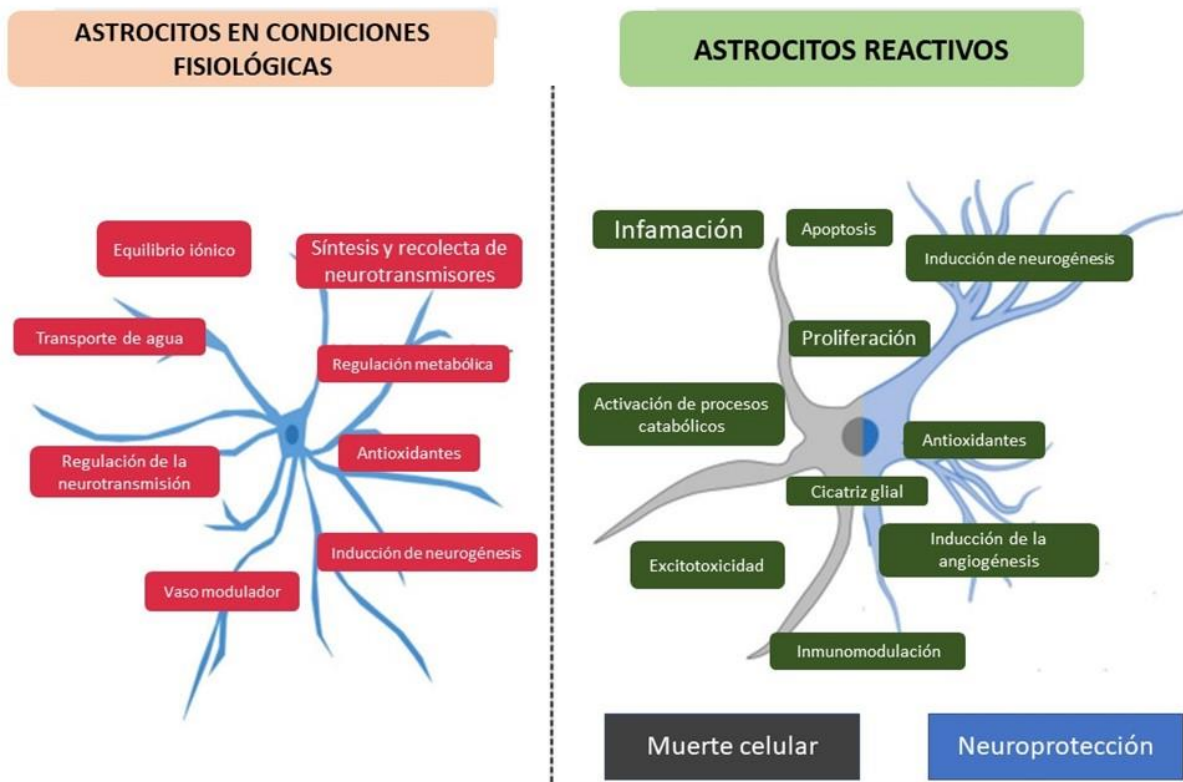
### **5.1. Astrocitos reactivos y Astroglisis**

Los astrocitos son células muy complejas, que no solo juegan un rol fundamental en la protección del sistema nervioso a través de mantener el equilibrio iónico, la síntesis y la recaptura de neurotransmisores, el control del flujo sanguíneo cerebral, el transporte de agua, la liberación de antioxidantes, la inmunomodulación y la neurogénesis (Fig. 4), sino que además, se ven involucrados en eventos de daño al tejido nervioso, modificando su morfología estrellada característica a una forma “reactiva” cuando las células son sometidas a condiciones de estrés, daño o degeneración (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017). A este proceso se le denomina “astroglisis reactiva” (Fig. 4) y es el resultado de la señalización específica de moléculas que pueden inducir múltiples cambios que van desde la hipertrofia celular, las cicatrices gliales, hasta la expresión génica que puede resultar

en la secreción de diferentes mediadores como factores de crecimiento (NGF, GDNF, BDNF, IGF), interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11), quimiocinas (CXCL1, CXCL10, CC12, CC17) y factores de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (López-Valdés & Martínez-Coria, 2016).

Durante los últimos veinte años se han recopilado evidencias sobre los cambios continuos y graduales que suceden en la astrogliosis reactiva y van desde alteraciones reversibles en la expresión génica e hipertrofia celular, hasta la formación de cicatrices que pueden representar un reordenamiento permanente en el tejido nervioso. También es claro que esta diversidad de cambios estructurales y funcionales es dependiente del contexto del daño al que se enfrentan los astrocitos (Anderson, *et al* 2014).

La forma reactiva de los astrocitos está directamente relacionada con la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017), de hecho, los astrocitos reactivos fueron caracterizados originalmente por sus cambios morfológicos (hipertrofia, reestructuración de los procesos, etc.) y por la sobreexpresión de GFAP (Ben-Haim, *et al*, 2015). Esta sobreexpresión de GFAP depende de factores como la naturaleza del daño, la distancia entre los astrocitos, el sitio del daño, y el tiempo transcurrido desde el daño. Sin embargo, es importante mencionar que además de la sobreexpresión de GFAP, otras proteínas participantes en la formación de la red de filamentos intermedios se sobreexpresan, como la vimentina y la nestina. Dicha red se vuelve cada vez más prominente, especialmente en los procesos principales y en el soma de la célula (Pekny & Nilsson, 2005).



**Figura 4.** Papel de los astrocitos en condiciones fisiológicas y de astrogliosis reactiva. Tomado y modificado de Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017.

Los estudios *in vitro*, particularmente los cultivos primarios de astrocitos han permitido conocer algunos de los mecanismos moleculares involucrados en la astrogliosis. Generalmente los astrocitos en cultivos primarios son expuestos a citocinas como interleucinas (IL), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN $\gamma$ ), los cuales inducen varios factores transcripcionales que terminan por provocar cambios funcionales; sin embargo, estas células muestran signos de reactividad en ausencia de estímulos. Normalmente los astrocitos en cultivo expresan altos niveles de GFAP y una morfología plana y poligonal, diferente a la observada *in situ*. Cuando los astrocitos son co-cultivados con neuronas, muestran

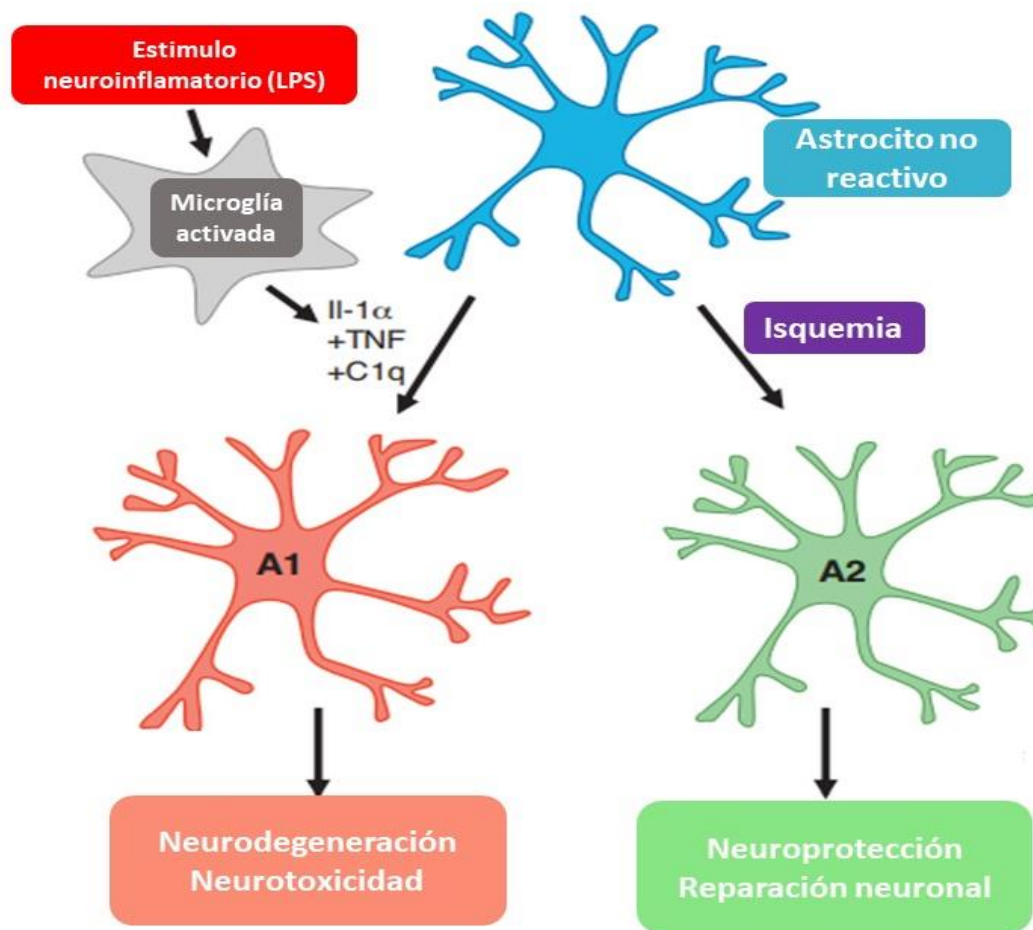
una morfología estrellada y una baja expresión de GFAP, lo cual sugiere que las neuronas liberan factores que mantienen a los astrocitos en un estado no reactivo (Ben-Haim, *et al*, 2015).

Aunque aún no son muy claros los mecanismos moleculares en la astrogliosis reactiva, se sabe que juega un papel importante en la neuroprotección, gracias a los distintos factores producidos bajo estas condiciones que pueden promover la supervivencia celular y la proliferación (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017).

Muchos estudios sugieren que los astrocitos reactivos pueden ser tanto neurotóxicos como neuroprotectores dependiendo de las condiciones, lo cual sugiere que diferentes tipos de estímulos inducen diferentes tipos de astrocitos reactivos, por ejemplo un estímulo neuroinflamatorio como el lipopolisacárido (LPS) puede activar a la microglía para secretar citocinas inflamatorias como IL-1 $\alpha$ , TNF y C1q lo que produce astrocitos reactivos con características neurotóxicas, por el contrario la isquemia tiene como resultado la producción de astrocitos reactivos con características neuroprotectoras por mecanismos aun no totalmente conocidos (Baldwin, 2017). Por esta razón es que diversos autores clasifican a los astrocitos reactivos en dos categorías: A1 y A2 (Fig. 5), haciendo una analogía a la clasificación M1 y M2 de macrófagos. Los astrocitos A1 se caracterizan por una sobreexpresión de vías que activan genes, como el sistema complemento, que pueden impedir la sinapsis, y que además secretan neurotoxinas. Los astrocitos A2 sobreexpresan diversos factores neurotróficos que pueden promover tanto la supervivencia neuronal como la reparación sináptica. En resumen, el estado A1

puede ser considerado como dañino mientras que A2 como un estado de reparación (Li, K. *et al*, 2019).

La astrogliosis reactiva puede observarse como respuesta a prácticamente cualquier daño del sistema nervioso, incluyendo el infarto cerebral y las enfermedades neurodegenerativas.



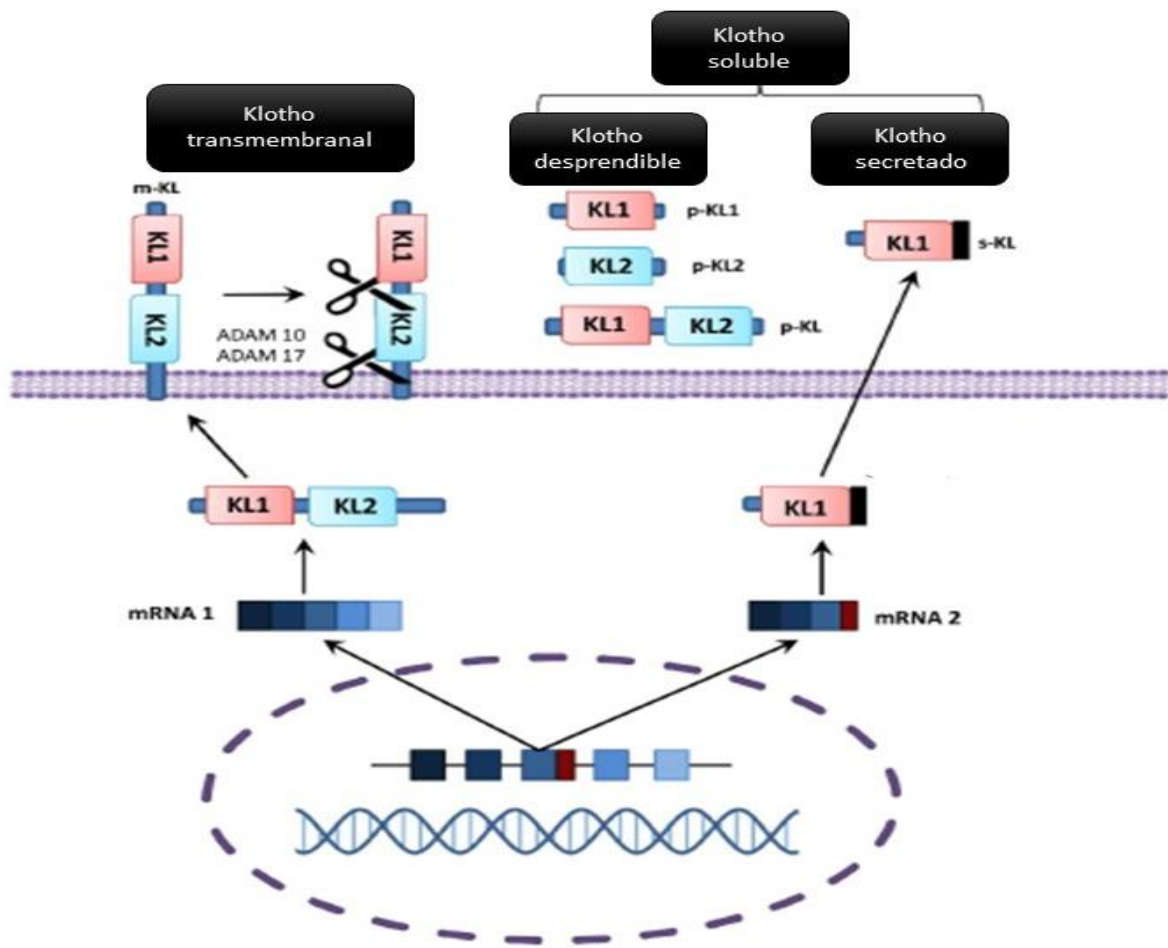
**Figura 5.** Heterogeneidad de los astrocitos reactivos. Tomado y modificado de Baldwin, 2017.

## **6. Klotho (KI)**

En la mitología griega, tres diosas, Cloto, Láquesis y Átropos determinan la duración de la vida de cada mortal controlando el hilo de la vida. Así pues, hilaban, median y cortaban dicho hilo, respectivamente (Kuro-o, 2009). KI fue identificado en 1997 como un gen mutado en una cepa de ratones que acelera la pérdida de funciones dependientes de la edad. Los ratones homocigotos para el alelo mutado (ratones KI - / -) muestran rasgos normales hasta la tercera o cuarta semana de vida, y a partir de ese momento empiezan a manifestar múltiples trastornos relacionados con la edad, como calcificación ectópica, atrofia de la piel, atrofia muscular, osteoporosis, arterosclerosis y enfisema pulmonar. Los ratones KI - / - sufren una muerte prematura alrededor de los dos meses de edad (Kurosue et al, 2005). Todos estos fenotipos están presentes en cada ratón deficiente de KI con una penetrancia del 100%. Además es importante mencionar que estos ratones deficientes de KI no muestran un incremento en la incidencia de tumores malignos, ni un incremento en las placas amiloides o en los ovillos neurofibrilares en el cerebro, características asociadas al envejecimiento. Sin embargo, es posible que esto se deba a que los ratones deficientes mueren demasiado pronto para desarrollar dichas características (Kuro-o, 2009).

El gen KI codifica para una proteína del mismo nombre y existe en cinco formas diferentes: una proteína transmembranal, tres formas desprendibles y una proteína secretada (Fig.6). La proteína transmembranal y los dominios desprendibles son producto del mismo mRNA, que inicialmente produce una proteína transmembranal de ~130 kDa. Las formas desprendibles de KI se liberan mediante la escisión

proteolítica del dominio extracelular del KI transmembranal por las metaloproteinasas ADAM10 y ADAM17. De este dominio extracelular se derivan dos fragmentos con secuencias similares (K11 y K12) y uno compuesto por ambos (K11+K12). Por otro lado, el KI secretado es producto de un evento de splicing alternativo, y su secuencia es similar a K11 con una variación en el carboxilo terminal. Se asume que esta forma molecular de KI es secretada y probablemente reside en los líquidos extracelulares y la luz de las vesículas intracelulares (Cararo-Lopes et al, 2017).



**Figura 6:** Diferentes formas de la proteína KI. Modificado de Cararo-Lopes et al, 2017.



La proteína KI tiene diversas funciones en el cuerpo (Fig. 7), por ejemplo, el KI transmembranal funciona como un correceptor obligado para el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), una hormona producida en los osteocitos y actúa aumentando la eliminación de fósforo a nivel renal (Kuro-o, 2011), de esta manera KI participa en la regulación del metabolismo del fosfato, calcio y de la vitamina D. El dominio extracelular de KI que es cortado y secretado al sistema circulatorio funciona como un factor endocrino que tiene una actividad putativa como sialidasa, por lo que modifica los glucanos de los canales de calcio TRPV5 de la superficie celular (Kuro-o, 2009). Además, este KI secretado influye en diferentes vías de señalización como p53/p21, cAMP, PKC y Wnt, aunque el efecto más marcado de la proteína KI se aprecia al inhibir la vía de señalización de la insulina/IGF-1 (Wang, 2009), ya que esta característica puede contribuir a las propiedades antioxidantes y anticancerígenas de KI a nivel sistémico (Kuro-o, 2009).

KI es detectable principalmente en los túbulos contorneados distales en el riñón y en el plexo coroideo en el cerebro (Kurosu et al, 2005), y la mayoría de los estudios se han centrado en estudiar la expresión de KI en el riñón, por lo tanto actualmente no se sabe con claridad por qué existe una alta expresión de KI en las células epiteliales del plexo coroideo. Ya que KI soluble es detectable en el líquido cerebro espinal, lo más razonable es suponer que esta proteína ha sido producida por el plexo coroideo, considerándose por algunos investigadores como una producción análoga a la del riñón, quien suministra KI soluble al suero. Esta comparación no parece tan sorprendente al tomar en cuenta que el riñón y el plexo coroideo

presentan grandes similitudes a nivel de expresión génica, por lo que el plexo coroideo se le ha denominado “el riñón del cerebro”. Por otro lado, el mRNA de KI también es detectable en regiones como la corteza, el hipocampo, el cerebelo, el cuerpo estriado, la sustancia negra, el bulbo olfatorio y la médula. Sin embargo, la falta de anticuerpos adecuados ha dificultado los estudios de expresión de KI a nivel de proteína. Dado que no existe evidencia de que KI pueda cruzar la barrera hematoencefálica y ya que hay muy poco intercambio de fluidos entre el líquido cerebro espinal y el líquido intersticial del parénquima cerebral, se puede asumir que la proteína KI que es detectable en el cerebro ha sido expresada localmente (Cararo-Lopes et al, 2017).

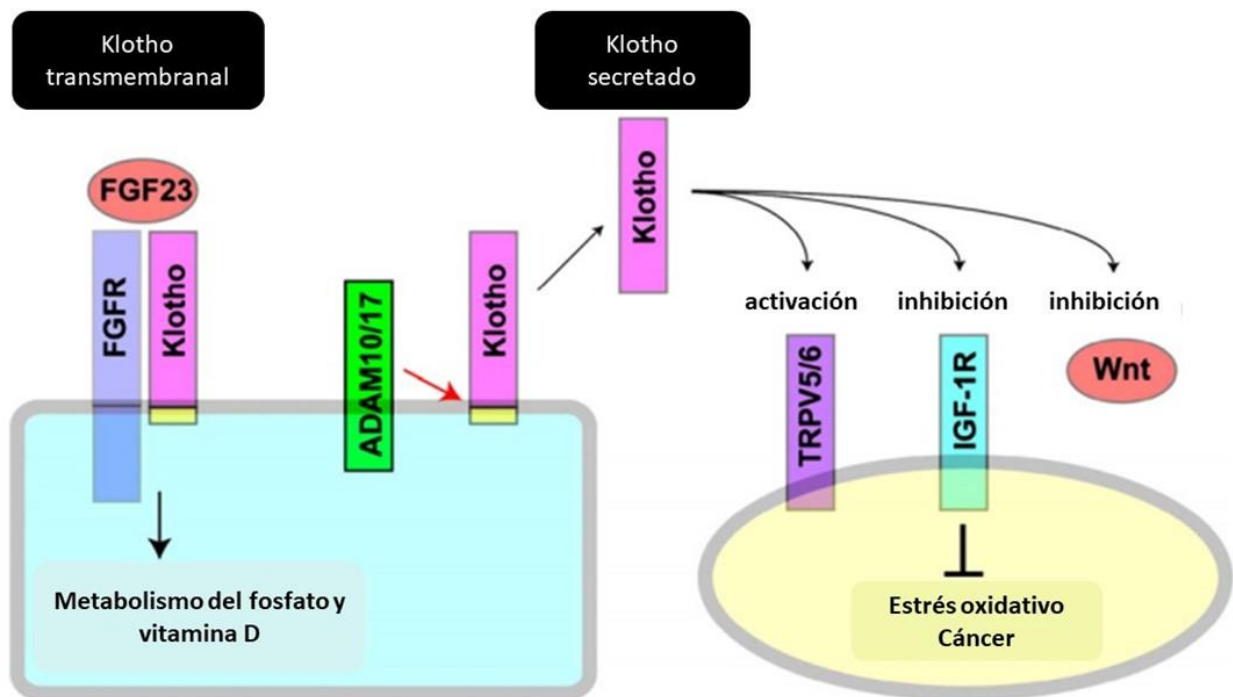


Figura 7: Funciones de la proteína KI. Modificado de Kuro-o, 2009.

Como se mencionó anteriormente, un defecto en el gen KI conduce a una degeneración sistémica dependiente de la edad, además se ha demostrado que la sobreexpresión de KI puede extender la longevidad, esto debido a que el dominio extracelular de la proteína KI circula en la sangre y puede unirse a un receptor de superficie celular que tiene efectos marcados en la fisiología de la insulina. Aparentemente al suprimir la fosforilación de tirosina de los receptores de insulina e IGF1 se reduce la actividad de las proteínas del sustrato receptor de la insulina (IRS) y su asociación con la fosfoinositol 3-quinasa (PI3), lo cual inhibe la señalización de la insulina. El aumento de la longevidad tras la regulación negativa de la insulina y la señalización de IGF1 es un mecanismo conservado evolutivamente para suprimir el envejecimiento. KI parece actuar por lo tanto como una hormona que modula el metabolismo de la insulina y el envejecimiento (Kurosu et al, 2005).

En el cerebro, la evidencia sugiere que la proteína KI se requiere a diferentes niveles. Por ejemplo, a las 5 semanas de edad en los ratones KI - / - se presenta hipocinesia provocada por la degeneración de las células de Purkinje en el cerebelo. Investigaciones posteriores en el hipocampo de estos animales, han reportado pérdida de sinapsis, perturbaciones en el transporte axonal, alteraciones en los neuro filamentos y acumulación de lisosomas. Como era de esperar, a las siete semanas de edad, los ratones muestran alteraciones cognitivas severas, asociadas con disfunción colinérgica, daño oxidativo y estrés apoptótico. En contraste, los ratones que sobreexpresan KI muestran una cognición mejorada y parecen resistentes a la neurodegeneración causada por la sobreexpresión de la proteína

APP y A $\beta$ , relacionadas con la EA, parecen ser resistentes al tratamiento con MPTP, modelo de la enfermedad de Parkinson, y también se observa una resistencia al estrés oxidante y protección contra la excitotoxicidad por glutamato (Cararo-Lopes et al, 2017). Además, un estudio de Zhou y colaboradores (2018), concluyó que la proteína KI puede funcionar como un factor neuroprotector endógeno contra el daño por isquemia cerebral al menos parcialmente ya que puede inhibir la señalización inflamatoria de RIG-I/NF- $\kappa$ B.

## **Justificación**

Tanto en la EA como en la isquemia cerebral, diversos estudios han reportado una astrogliosis reactiva de forma crónica con un incremento en las citocinas proinflamatorias y quimiocinas que exacerban la respuesta inmune (Yu *et al*, 1989; Panickar & Norenberg, 2005; Li, 2011). Como consecuencia se disminuye la neuroprotección proporcionada por los astrocitos y agrava la patología. También, se alteran funciones como la recaptura del glutamato contribuyendo a la muerte neuronal por excitotoxicidad y se reduce la depuración de A $\beta$  (Pekny & Nilsson, 2005; Khoshnam *et al*, 2017; Lazarov & Tesco, 2016). Además, el incremento de citocinas proinflamatorias producen un aumento en la producción de óxido nítrico (NO), apoptosis neuronal e inhibición de la neurogénesis (Baldwin, 2017; Li, K. *et al*, 2019). Recientemente, se han analizado tratamientos que prolonguen la neuroprotección y reduzcan la neuroinflamación, utilizando como blanco la respuesta de los astrocitos (Barreto, 2011; Ouyang, *et al* 2013). En este trabajo exploramos la posibilidad de reducir la respuesta inflamatoria a través de modular un factor neurotrófico como el KI.

Diversos estudios demuestran la importancia de la proteína KI como factor antienviejecimiento. Sin embargo, los estudios acerca de su funcionamiento en el SNC parecen ser aun escasos. La mayoría de las observaciones hechas hasta ahora, apuntan a que la proteína KI juega un papel neuroprotector en el cerebro. Este trabajo pretende contribuir al entendimiento del posible papel neuroprotector de esta proteína.

## **Hipótesis**

Si la proteína KI funciona como neuroprotectora entonces, es posible observar una disminución en la astrogliosis reactiva, provocada por la privación de oxígeno y glucosa y A $\beta$  en el cultivo primario de astrocitos de rata neonata.

## **Objetivo general**

Identificar si la proteína KI tiene un efecto neuroprotector en los astrocitos tratados con A $\beta$  y sometidos a la privación de glucosa y oxígeno en un modelo *in vitro*.

## **Objetivos particulares**

- Determinar si existe expresión del gen y de la proteína KI en cultivo primario de astrocitos de rata neonata
- Determinar los valores basales de GFAP y BDNF en astrocitos
- Determinar los cambios en la expresión de GFAP Y BDNF en respuesta a los tratamientos con A $\beta$ , KI y la privación de glucosa y oxígeno.

## **Metodología**

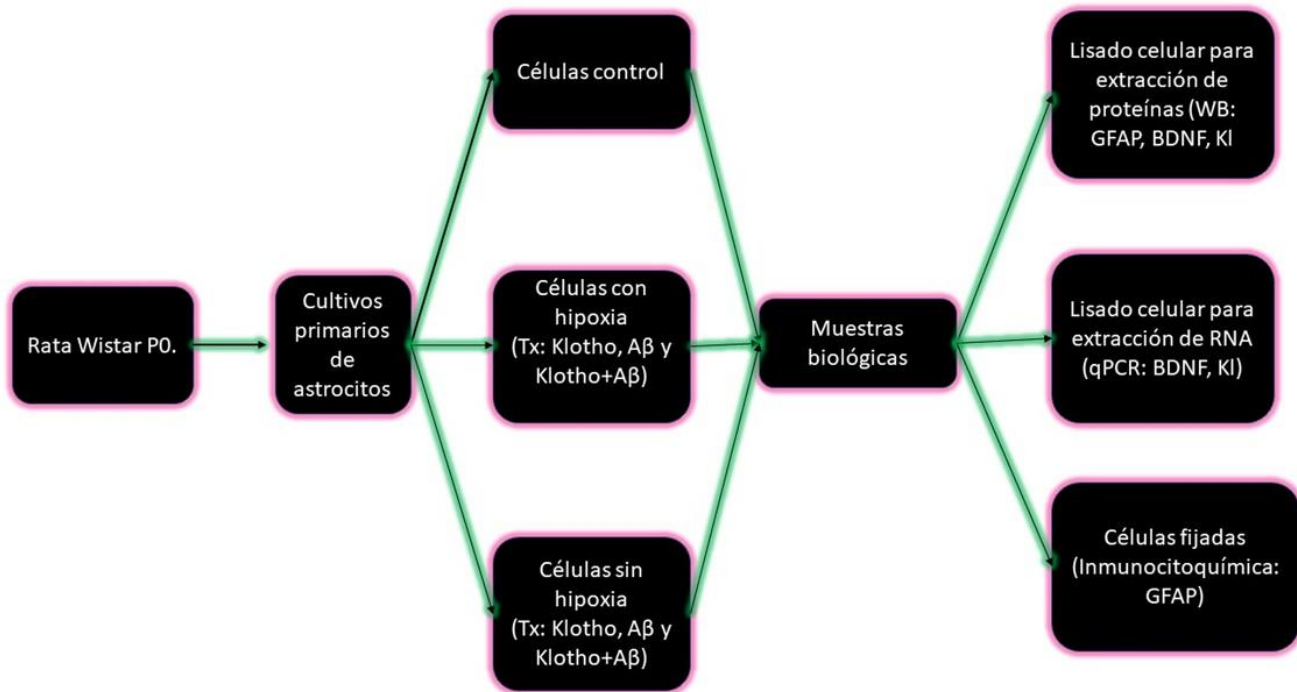
### **1. Animales**

Los cultivos primarios de astrocitos se aislaron de la corteza de ratas de la especie *Rattus norvegicus* cepa Wistar de 0-3 días de nacimiento, las cuales se obtuvieron del Departamento de Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. El bioterio del instituto mantiene a los animales de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. El protocolo forma parte del proyecto número 150/18 que fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los animales de laboratorio (CICUAL-INNN) del INNN. También se observaron las recomendaciones de la NOM-087-ECOL-1995 para la disposición de residuos biológicos. La manipulación de los animales se realizó siempre procurando minimizar el sufrimiento animal.

### **2. Diseño experimental:**

Se trabajó con cultivos primarios de astrocitos entre el día 16 y 18 de los cuales se obtuvieron dos grupos, el grupo de células sin hipoxia (37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> 95 % O<sub>2</sub>) y el grupo de células con hipoxia (85 % N<sub>2</sub> 10% H<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>), a los cuales se les aplico durante 6 h tratamientos con KI (0.4 ug/ ml) y A $\beta$  (1ug/ml). Inmediatamente después de 6 h se obtuvieron tres tipos de muestras: lisados celulares para la extracción y cuantificación de proteínas, lisados celulares para la extracción de RNA

y células fijadas sembradas en vidrio para inmunocitoquímica. Esto se resume en la figura 8.



**Figura 8:** Esquema representativo del diseño experimental (Tx: tratamiento, KI: Klotho, A $\beta$ : Péptido beta-amiloide, WB: Western Blot, GFAP: Proteína ácida fibrilar glial, BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro, RNA: ácido ribonucleico, qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

### **3. Preparación de cultivos primarios de astrocitos:**

Se utilizó un protocolo previamente reportado (*Schildge*, et al 2013). Se extrajo el cerebro de la cavidad craneal y se colocó en solución Hanks libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, donde se retiraron las meninges y se diseccionaron las cortezas. El tejido se disgregó de forma mecánica con la ayuda de una pipeta pasteur y de una jeringa con calibre 21G. El tejido disgregado se centrifugó posteriormente durante 3 minutos a 1200 rpm, el pellet resultante se resuspendió en medio DMEM suplementado con

suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibacteriano-antimicótico al 1 %. La suspensión fue colocada en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> previamente tratado con poli-D-lisina al menos durante 1 hora. El medio se cambió 24 h después de la siembra y posteriormente dos veces por semana. Al llegar al día 14-16, el frasco se agitó durante 24 h a 200 rpm a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>, lo que promovió la suspensión de las células no astrocíticas. Los astrocitos fueron despegados del frasco con una solución de tripsina al 0.5% y agitación manual. Una alícuota de la resuspensión de las células se contabilizaron mediante tinción con azul de tripano, y se sembraron en placas de 6 pozos o en fluorodish a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células. Los tratamientos fueron aplicados 48 h después de su estabilización.

#### **4. Viabilidad celular:**

La viabilidad de las células se realizó mediante la técnica de azul de tripano. Se tomó una alícuota de 10 µl de células en medio DMEM y se mezcló con 10 µl de azul de tripano al 0.05%, y se agregaron 80 µl de medio DMEM. La cuantificación se realizó con la ayuda de la cámara de Neubauer y de un microscopio de luz invertido (Olympus 1X50). Se consideraron como células muertas a todas las células teñidas en azul, mientras que las no teñidas se cuantificaron como células vivas.

#### **5. Caracterización de la población celular en los cultivos primarios:**

La caracterización de la población celular se llevo a cabo mediante la técnica de inmunocitoquímica utilizando como marcador a la proteína ácida fibrilar glial (Glial



Fibrillary Acidic Protein, GFAP). La GFAP es un filamento intermedio que se encuentra en el citoesqueleto astrogial (Dennie, et al, 2016).

Para su cuantificación, los cultivos primarios fueron fijados con paraformaldehído al 4 % en TBS 1x (Tris 10 mM, NaCl 234 mM, pH 7.6) durante 30 minutos. Posteriormente, para permeabilizar las células se realizaron 5 lavados de 15 min con TTBS 1x (Tritón X-100 0.1% en TBS 1x). Para el bloqueo de sitios inespecíficos se procedió a incubar con leche descremada (BioRad) al 5 % en TBS 1x por 1 hr. Finalizado el tiempo de incubación, se prosiguió a lavar las células con TTBS 1x 3 veces por 10 min, después las células fueron puestas en incubación y refrigeración durante toda la noche con el anticuerpo Anti-GFAP (monoclonal, hecho en ratón, Millipore MAB360) en una dilución 1:1000 en TTBS 1x con leche al 1 %. Pasada la noche, se lavó con TTBS 1x durante 30 minutos y posteriormente se incubaron las células por 2 hrs con anticuerpo anti-ratón hecho en conejo marcado con Alexa 488 a una dilución 1:2000 en TTBS 1x con leche al 1 %. Terminado el período de incubación, las células se lavaron durante 10 min con TTBS 1x, para después contra-teñir los núcleos celulares con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilidole, 300M, Invitrogen) 1 µg/ml. Las células fueron observadas en el microscopio confocal y se analizaron con el software Imagen J.

## **6. Tratamientos y condiciones experimentales de los cultivos:**

Se formó un grupo control y dos grupos experimentales. Las células control se mantuvieron a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>/ 95 % O<sub>2</sub> durante 6 h, para luego ser procesadas. El primero grupo experimental “Células sin hipoxia” fue mantenido a 37 °C y 5 %

CO<sub>2</sub>/95 % O<sub>2</sub> durante 6 hrs , dichas células fueron divididas en tres subgrupos con tratamientos diferentes: KI, Aβ y KI + Aβ. El grupo experimental “Células con hipoxia” fue mantenido en condiciones anaeróbicas (85 % N<sub>2</sub> / 10% H<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) durante 6 h, dicho grupo fue subdividido en cuatro: Células sin tratamiento, células con KI, células con Aβ y células con KI y Aβ.

El KI recombinante de 50 µg se disolvió en 1,250 µl de H<sub>2</sub>O y para los grupos tratados con KI se utilizaron 10 µl de la disolución por cada ml de medio (concentración final de 0.4 ug/ ml).

Se disolvió 1 mg de Aβ (25-35) en 1ml de H<sub>2</sub>O y se utilizó 1 µl de esta solución por cada ml de medio (concentración final de 1ug/ml).

Durante las 6 h de experimento, todos los grupos, incluido el grupo control, fueron mantenidos con medio DMEM bajo en glucosa.

## **7. Cuantificación de proteínas (BDNF, GFAP, KI):**

Para la cuantificación de BDNF, GFAP y KI mediante SDS-Western Blot los cultivos de astrocitos, tanto los controles como los grupos experimentales, fueron preservados a 80°C inmediatamente después de las 6 h de tratamiento. Posteriormente fueron descongelados y homogenizados en amortiguador (50 mM TRIS, inhibidor de proteasas, Complete mini, pH 7.4), posteriormente las células se lisaron por sonicación (sonicador Fisher, FSH9) durante 2 min, se homogenizaron con ayuda de un pistilo de plástico y se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (500-0006 de Bio-Rad, EUA)

Se realizó un SDS-PAGE en condiciones reductoras en un gel de poliacrilamida al 12% con una carga total de 60 µg de proteína por pozo. Una vez terminada la electroforesis el gel al igual que las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, EUA), se equilibraron durante 15 min con amortiguador de transferencia (TRIS 25mM, Gly 192 mM, metanol 20 %, pH 8.3). Posteriormente se transfirieron los geles de poliacrilamida a las membranas de nitrocelulosa a 200 mA durante 1 h con agitación constante. Después se lavaron las membranas con TBS 1X (TRIS 100 nM, NaCl 2.5 M, pH 7.5) por 30 min y se bloquearon las membrana con leche al 5% en TBS 1X durante 2 h, a temperatura ambiente y agitación constante. Inmediatamente después las membrana fueron lavadas con TTBS 1X (Tween 20 al 0.05 % en TBS) por 30 min para posteriormente ser incubadas con los anticuerpos primarios: Anti-BDNF dilución 1:1000 (Monoclonal hecho en ratón, abcam ab205067), Anti-KI dilución 1:500 (Policlonal hecho en conejo, abcam ab98111) y Anti-GFAP dilución 1:500 (Monoclonal hecho en ratón, millipore MAB360). La incubación se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente las membrana fueron lavadas con TTBS 1x por 30 min y se incubaron por 2 h en el anticuerpo secundario: Tanto para BDNF como GFAP se utilizó un anticuerpo anti-mouse hecho en conejo conjugado con HRP, diluido en TTBS 1X con leche al 1 % (1:3000 y 1:600, respectivamente). Para KI se utilizó un anticuerpo anti-conejo hecho en cabra conjugado con HRP, diluido en TTBS 1X con leche al 1 % (1:5000).

Posteriormente, las membranas se lavaron con TTBS 1X durante 30 min y con TBS 1X por 20 min, para después ser reveladas con ECL (Amersham GE healthcare) en películas Kodak Biomax ML.

Para determinar el nivel de expresión de actina como control de carga se realizó stripping a las membranas. Se lavaron con TBS 1X durante 30 min y se incubaron con amortiguador para stripping (TRIS-HCL/SDS/Mercaptoetanol) por 20 min a 70°C en baño maría y con agitación constante. Posteriormente, se lavaron con TBS 1X para eliminar el exceso de mercaptoetanol. Se bloquearon con leche al 5 % por 2 h para después ser lavadas con TTBS 1X por 30 min para luego ser incubadas con el anticuerpo anti-actina dilución 1:3000 (Monoclonal hecho en ratón) en TTBS 1X con leche al 1% durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas fueron lavadas con TTBS 1X durante 30 min para después ser incubadas por dos hrs con el anticuerpo anti-ratón hecho en conejo conjugado con HRP, diluido 1:6000 en TTBS 1X con leche al 1, por 2 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo las membranas se lavaron con TTBS 1X durante 30 min y luego con TBS 1X durante 20 min. Se revelaron con ECL (Amersham GE healthcare) en películas Kodak Biomax ML.

Se determinó la densidad de pixeles con ayuda del software Image Lab 6.0.1 de Bio-Rad y se hizo la relación con respecto a la actina.

## **8. Extracción de RNA:**

A partir de  $1.5 \times 10^6$  células se realizó la extracción de ARN total mediante el método de trizol (Invitrogen) y el kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo research, R2050). Las células fueron homogenizadas en 450  $\mu$ l de Trizol y después se les añadió 450  $\mu$ l de etanol (100%), se homogenizo con vortex. Después el contenido fue transferido a una columna Zymo-Spin IIC dentro de un tubo colector y se procedió a

centrifugarlo a 16,000 x g por 30 s (centrífuga Sorvall). Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 400 µl del RNA Wash Buffer a la columna para después ser centrifugada nuevamente a 16,000 x g por 30s. Posteriormente se realizó un tratamiento con Dnasa tipo I, es decir se le adicionaron a la columna 5 µl de DNasa tipo I y 75 µl de Digestion Buffer, y se dejó incubar por un lapso de 15 min a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo se adicionaron 400 µl de Directo-zol RNA PreWash a la columna para ser centrifugada a 16,000 x g por 30s. Pasado este tiempo se adicionaron a la columna 700 µl de RNA Wash buffer y se centrifugó a 16,000 x g por 2 min. Por último se transfirió la columna a un tubo libre de RNasa y se suspendió el RNA adicionando 50 µl de agua libre de RNasa para luego ser centrifugado a 16,000 x g por 30s. La concentración se cuantificó leyendo 2 µl del RNA eluído a 260 y 280 nm en un Nanodrop (Thermo scientific).

### **9. Síntesis de DNA complementario (DNAc):**

Para sintetizar el DNAc se utilizó 1 µg del RNA total en un volumen final de 40 µl. Se siguió una serie de 2 reacciones: En la primera se añadieron 1 µl de hexámeros y 1 µl de oligo d(T)(100pM). En la segunda reacción se añadieron 1 µl de dNTPs (10mM), 8 µl de Buffer de la retrotranscriptasa, 1 µl de RNasa out y 1 µl de transcriptasa reversa. El volumen se completó con H<sub>2</sub>O. La reacción para la transcripción se llevó a cabo a 37°C durante 90 min. Posteriormente las muestras se guardaron a - 4 °C.

## **10. PCR punto final:**

Para detectar la expresión del RNA mensajero de la proteína KI se utilizó el equipo GeneAmp PCR System 2400 Thermal Cycler (Perkin Elmer) y oligonucleótidos para KI y para la fracción 18S ribosomal como gen endógeno. Los reactivos utilizados fueron de la marca BioRad.

Se preparó una mezcla de reacción para cada muestra, la cual consistió en: 10.75  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l de Buffer (5x), 4  $\mu$ l de Magnesio (50nm), 1  $\mu$ l de DNTPs, 2  $\mu$ l de DNAC de la muestra, 1  $\mu$ l de primer forward, 1  $\mu$ l de primer reverse y 0.25  $\mu$ l de Taq Polimerasa, dando un volumen final de 25  $\mu$ l. Cada muestra fue colocada en el termociclador para realizar la reacción de la cadena de la polimerasa bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, desnaturalización a 95°C por 30s, alineamiento a 62°C por 30s, extensión a 72°C por 1 min por 40 ciclos y extensión final a 72°C por 10 min.

El producto obtenido se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (40ml de TAE 1x, 0.4 g de agarosa y 2  $\mu$ l de Bromuro de etidio 10 mg/ml). La visualización de los amplicones se llevó a cabo mediante la exposición del gel de agarosa a luz UV, para posteriormente tomar una foto con un fotodocumentador .

## **11. PCR y qPCR:**

Para cuantificar la expresión de los mensajeros de KI y BDNF se utilizó el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific), el kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), with separate ROX vial (Thermo Fisher) y oligonucleótidos para KI, BDNF y para la fracción 18s ribosomal como gen control

(tabla 1). La mezcla de reacción contenía 5 µl de Maxima Mix, 0.5 µl del primer forward, 0.5 µl del primer reverse y 1 µl de H<sub>2</sub>O, y para obtener un volumen final de 10 µl se adicionaron 3 µl de la muestra previamente diluida con H<sub>2</sub>O 1:3. Se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación a 95 °C por 10 s, 65 °C durante 30 s y 72 °C por 20 s en cada ciclo. Posteriormente se obtuvo la cuantificación del producto de qPCR gracias a la determinación de CT comparativo, usando como gen de referencia la fracción 18s ribosomal.

**Tabla 1:** Secuencia de oligonucleótidos de KI, BDNF y 18s ribosomal de Rata (*Rattus norvegicus*)

Nombre	<u>Secuencia sentido</u>	<u>Secuencia antisentido</u>
<u>KIRt</u>	GGACAAAGAAGTGGCGG	TTGATGCCGTCCAACACGTA
<u>BDNFRt</u>	CTGCGCCCATGAAAGAAG	GCTGTGACCCACTCGCTAAT
<u>18sRt</u>	CTTTAATGGCAGTGATAGCGA	CTCTTCCACAGGAGGCCTA

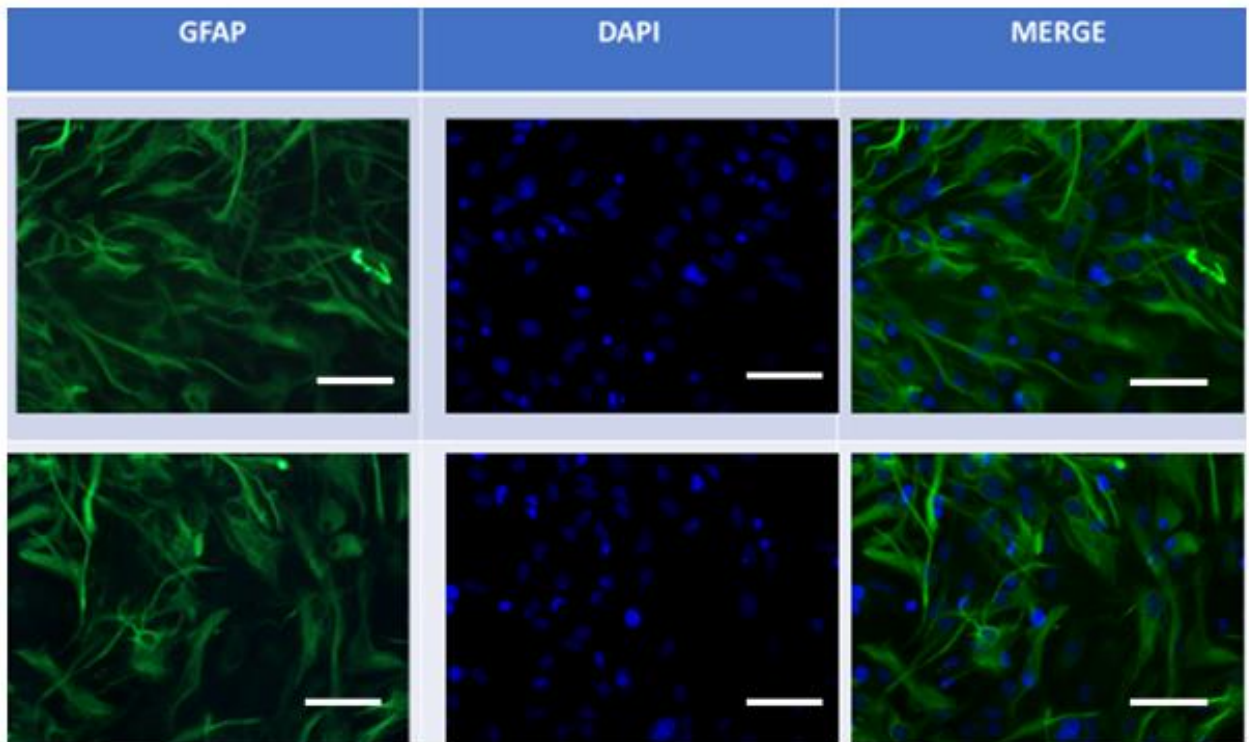
## **12. Análisis estadístico:**

El análisis comparativo entre los grupos experimentales y el grupo control se realizó por medio de una ANOVA de una vía, usando la prueba de Tukey como prueba *post-hoc*. Los datos se analizaron usando Prism 8.0 (Graphpad Software, San Diego, California, USA), y se presentaron los promedios obtenidos de por lo menos cuatro experimentos independientes con su error estándar de la media.

## Resultados

### 1. Caracterización de la población celular de los cultivos primarios

La población celular en los cultivos se caracterizó mediante inmunocitoquímica utilizando los marcadores para proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y DAPI. Se observó una gran cantidad de células con alta inmunoreactividad a GFAP, dichas células presentan una morfología estrellada con prolongaciones largas, correspondiente a la forma de los astrocitos (Fig. 7) El porcentaje de astrocitos en el cultivo fue de 87%, calculado contabilizando la proporción de células positivas a DAPI y a GFAP.

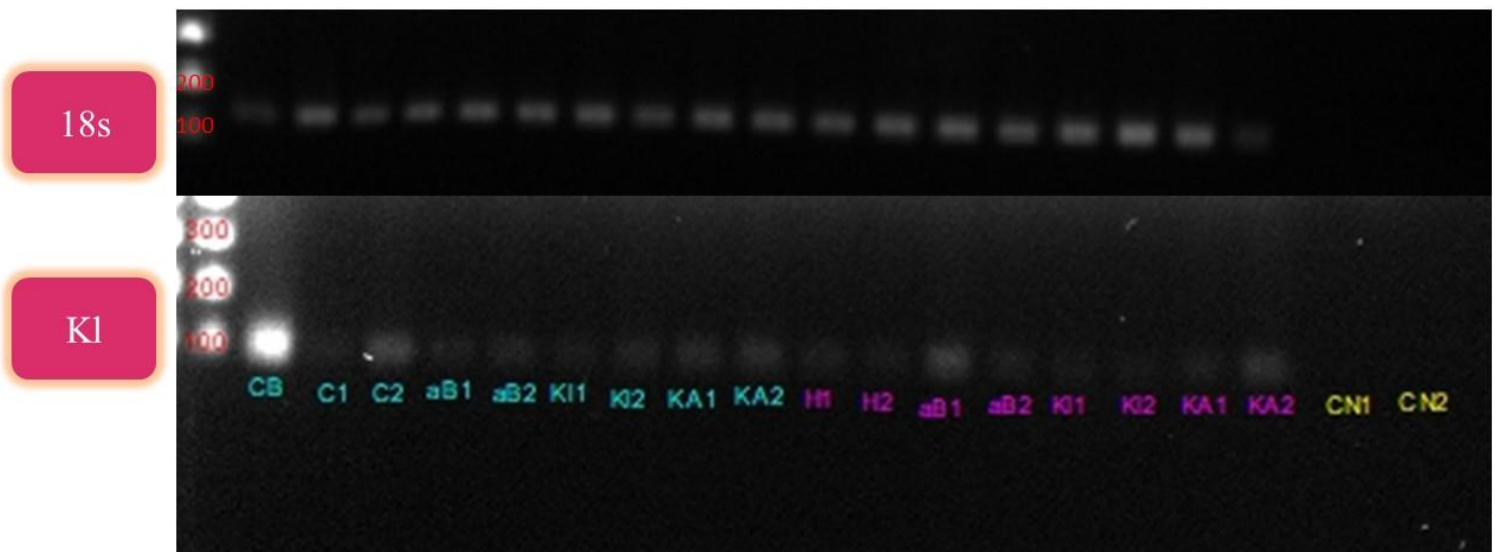


**Figura 7:** Imágenes representativas de inmunocitoquímicas para GFAP (verde) y DAPI (azul), y combinación (traslape de ambas imágenes) en cultivos primarios de corteza prefrontal de rata neonata. Objetivo 40x. Barra de escala 100  $\mu$ m.



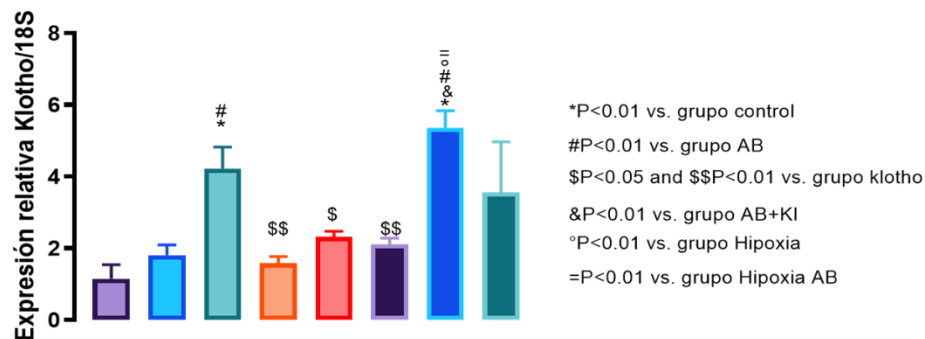
## 2. Expresión de RNAm de KI en los cultivos primarios

Para determinar si existía una expresión endógena de KI en los astrocitos, se evaluó la expresión del RNAm de KI en los cultivos primarios de astrocitos, tanto en condiciones control como en condiciones experimentales. Debido a que no existía un registro en la literatura acerca de esta proteína en los astrocitos, se procedió primero mediante la técnica de PCR punto final. En la figura 8, podemos observar como el RNAm de KI es detectable en los cultivos en condiciones control (C1 y C2) y en cada una de las condiciones experimentales.



**Figura 8.** Imagen representativa de un gel de agarosa, donde se observa la comparación entre la expresión de RNAm de 18s y RNAm de KI de cada condición control y experimental por duplicado, donde CB representa una muestra de cerebro de rata, C1 y C2 condiciones control, aB1 y aB2 células sin hipoxia con A $\beta$ , K11 y K12 células sin hipoxia con KI, KA1 y KA2 células sin hipoxia con KI y A $\beta$ , H1 y H2 células con hipoxia, las demás acotaciones en color morado corresponden a los tratamientos antes mencionados pero en condiciones de hipoxia, CN1 y CN2 son los controles negativos.

Una vez comprobada la expresión del RNAm de KI en los cultivos primarios de astrocitos, se evaluó el cambio en su expresión provocado por los diferentes tratamientos y/o condiciones experimentales, por lo cual se realizó un PCR en tiempo real para poder medir las diferencias. En la figura 9 podemos observar que la expresión del RNAm de KI aumenta por efecto de la hipoxia. Sin embargo, el tratamiento con A $\beta$  no produce ningún cambio con respecto al control en ambas condiciones de oxígeno. Con el tratamiento con KI se observó un incremento de 2.34 veces más en la expresión de RNAm de KI, pero la presencia de A $\beta$  inhibe esta expresión. Este efecto se pudo observar tanto en condiciones normales como en condiciones de hipoxia.

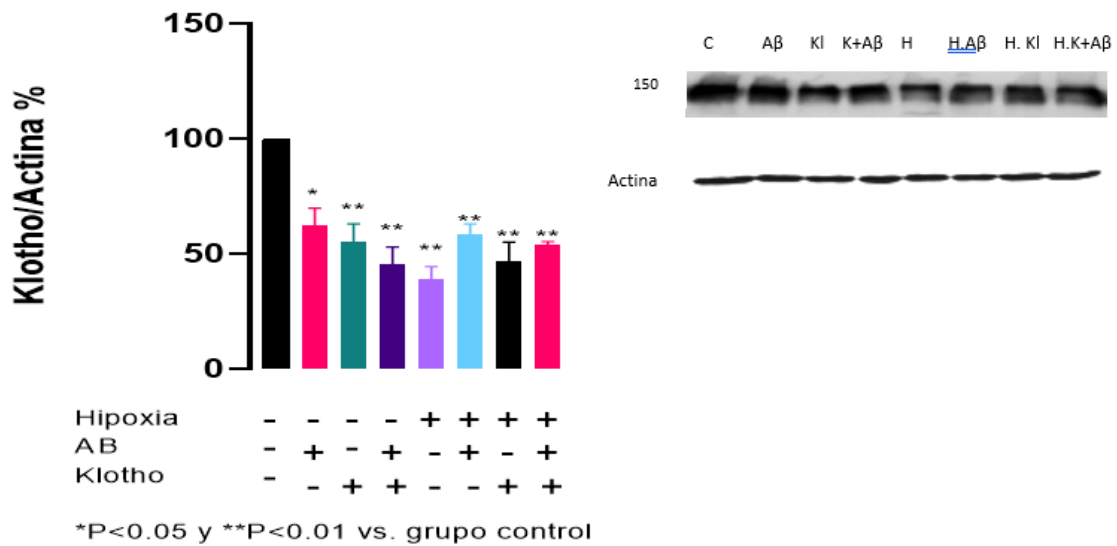


**Figura 9.** Análisis de la expresión de KI en cultivos primarios de astrocitos tanto en condiciones control (37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>/ 95 % O<sub>2</sub>) como en condiciones experimentales (6 h de privación de oxígeno glucosa: 85% N<sub>2</sub> 10% H<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>, A $\beta$ : 1ug/ml, KI: 0.4 ug/ ml). Las células fueron recolectadas inmediatamente después de las 6 h la expresión de RNAm de KI fue medida por qPCR. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar, n= 4 experimentos independientes. ANOVA de una vía post hoc Tukey. AB = tratamiento con A $\beta$

### 3. Expresión de la proteína KI en los cultivos primarios de astrocitos

Una vez que se confirmó la expresión del RNAm de KI en los astrocitos, así como los cambios en su expresión, se decidió determinar si existía una expresión cuantificable de la proteína KI en estas células, así como si la expresión de esta

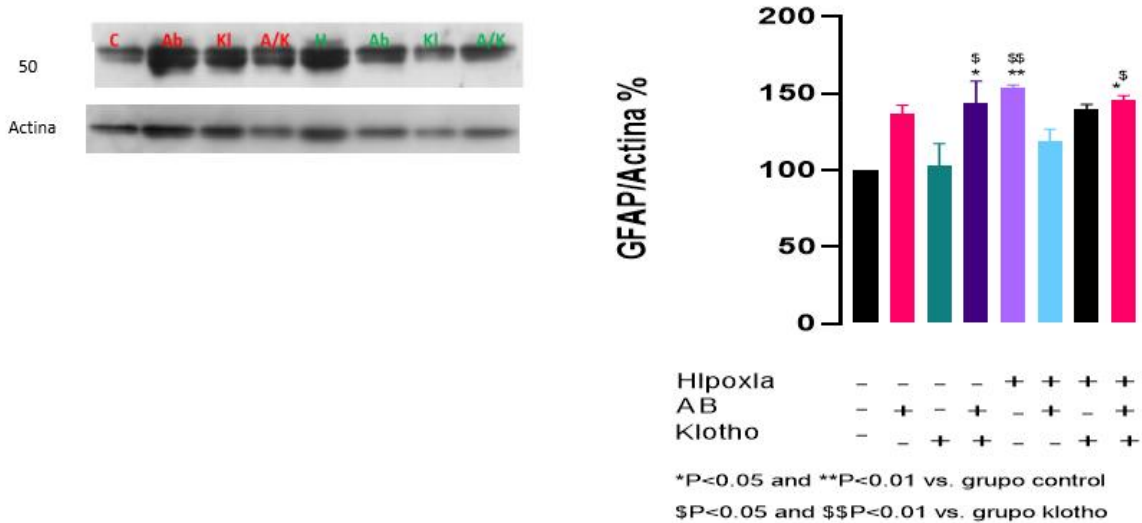
podía modificarse con respecto a las condiciones experimentales. En la figura 10, se observa una disminución estadísticamente significativa de la proteína Kl en las células en cada uno de los tratamientos, con respecto al control.



**Figura 10.** Efecto de los diferentes tratamientos (Aβ: 1ug/ml, Kl: 0.4 ug/ ml) y condiciones experimentales de privación de oxígeno y glucosa (85% N2 10% H2 5% CO2,) en la expresión de la proteína Klotho en cultivos primarios de astrocitos. Las células fueron recolectadas inmediatamente después de las 6 h de tratamiento. La expresión de la proteína fue evaluada mediante Western Blot. Cada barra representa la media ± erros estándar, n= 4 experimentos independientes. ANOVA de una vía post hoc Tukey. AB = tratamiento con Aβ

#### 4. Expresión de BDNF y GFAP en cultivo primario de astrocitos:

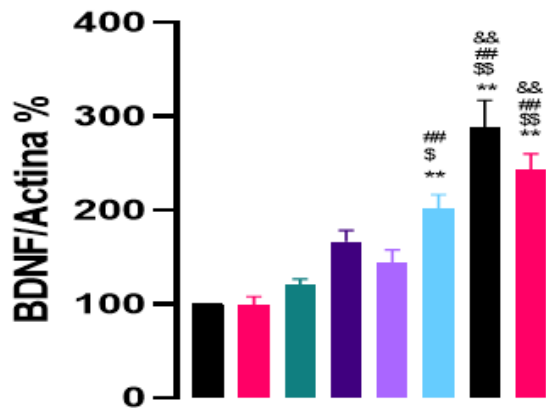
Para determinar si la proteína KI juega un papel neuroprotector se decidió evaluar la expresión del Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), así como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en los cultivos primarios de astrocitos, tanto en condiciones control como en condiciones de hipoxia.



**Figura 11.** Efecto de los diferentes tratamientos (A $\beta$ : 1ug/ml, KI: 0.4 ug/ ml) y condiciones experimentales de privación de oxígeno y glucosa (85% N<sub>2</sub> 10% H<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>.) en la expresión de la proteína GFAP en cultivos primarios de astrocitos. Las células fueron recolectadas inmediatamente después de las 6 h de tratamiento. La expresión de la proteína fue evaluada mediante Western Blot. Cada barra representa la media  $\pm$  errores estándar, n= 4 experimentos independientes. ANOVA de una vía post hoc Tukey. AB = tratamiento con A $\beta$

En la figura 11 se pueden observar los niveles de GFAP en respuesta a los diferentes tratamiento. Se encontró que la hipoxia produce un incremento significativo de GFAP en las células (1.53 veces más que el control). Sin embargo, este efecto se reduce en presencia de A $\beta$ . Es interesante que solo se observó esta disminución con la combinación de hipoxia y A $\beta$  porque en condiciones controles el efecto de A $\beta$  es contrario, aumenta la expresión de GFAP. En condiciones controles

el KI no tuvo ningún efecto sobre los niveles de GFAP aún en presencia de A $\beta$ . Sin embargo, en condiciones de hipoxia el KI se opone al efecto del tratamiento con A $\beta$ . En la figura 12 se pueden observar los niveles de BDNF en los astrocitos en cultivo y se puede ver como la hipoxia produjo un incremento de BDNF, mientras que el tratamiento con A $\beta$  solo incrementó los niveles de BDNF en condiciones de hipoxia. Por otro lado, KI produjo un incremento de BDNF en las células tanto en condiciones de normales como en hipoxia, particularmente en condiciones de hipoxia donde el aumento es de 2.88 veces con respecto al control cercano. Es interesante resaltar que este efecto del KI sobre BDNF no se ve alterado por la presencia de A $\beta$ . Por otro lado, es posible observar que existe una tendencia al aumento de la expresión de BDNF (Fig. 12) en condiciones de daño, ya sea por A $\beta$  o hipoxia, y este cambio es estadísticamente significativo y muy notorio en el grupo tratado con KI bajo condiciones de hipoxia, seguido por el grupo tratado A $\beta$  en condiciones de hipoxia.



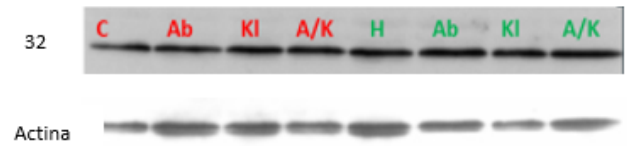
Hipoxia	-	-	-	-	+	+	+	+
AB	-	+	-	+	-	+	-	+
Klotho	-	-	+	+	-	-	+	+

\*P<0.05 y \*\*P<0.01 vs. grupo control

##P<0.01 vs. grupo AB

\$P<0.05 and \$\$P<0.01 vs. grupo klotho

&P<0.05 and &&P<0.01 vs. grupo AB+Kl



**Figura 12.** Efecto de los diferentes tratamientos (A $\beta$ : 1ug/ml, Kl: 0.4 ug/ ml) y condiciones experimentales de privaci3n de ox3geno y glucosa (85% N2 10% H2 5% CO2,) en la expresi3n de la prote3na BDNF en cultivos primarios de astrocitos. Las c3lulas fueron recolectadas inmediatamente despu3s de las 6 h de tratamiento. La expresi3n de la prote3na fue evaluada mediante Western Blot. Cada barra representa la media  $\pm$  errores est3ndar, n= 4 experimentos independientes. ANOVA de una v3a post hoc Tukey. AB = tratamiento con A $\beta$

## Discusi3n:

En este trabajo se analiz3 el efecto de la prote3na Kl en cultivo primario de astrocitos de rata neonata, sometidos a la privaci3n de glucosa y ox3geno por 6 hrs combinado con el tratamiento de A $\beta$ . El gen Kl, codifica para una prote3na transmembranal, que juega un papel cr3tico en la funci3n renal como co-receptor para FGF23 (Kuro-o, M.,

2009). El KI también se expresa en los plexos coroides donde es liberado en el líquido cerebroespinal, así mismo se ha observado su expresión en el parénquima cerebral (Cararo-Lopes *et al*, 2017). Los resultados obtenidos en este trabajo no solo confirman la expresión del RNAm de KI en el parénquima cerebral de rata, sino que muestran la expresión del mensajero de KI (Figuras 8 y 9) y la proteína (Fig. 10) en los astrocitos cultivados de las cortezas cerebrales de rata. Además, es importante señalar que la expresión del mensajero cambia por efecto de los tratamientos. Además, se pudo observar que la hipoxia produce un aumento en la expresión del RNAm de KI, lo que podría sugerir que el KI responde ante un daño. Estos resultados concuerdan con los reportes del efecto neuroprotector de KI sobre citotoxicidad en neuronas (Zeldich, *et al* 2014; Abraham, *et al* 2016). Normalmente los astrocitos juegan un papel importante en la citotoxicidad en las neuronas, a través de la recaptura de glutamato y la depuración de radicales libres (Chen & Swanson, 2003). Sin embargo, no se observaron cambios por efecto del A $\beta$  directamente sobre los niveles de RNAm de KI. Recientemente se ha reportado, que la acumulación de A $\beta$  producen un deterioro en la depuración de este péptido por parte de los astrocitos y un exceso de A $\beta$  provoca que los mismos astrocitos inicien con la producción de más A $\beta$  (Dal Prá, *et al* 2015).

Los astrocitos tratados con KI soluble, ya sea en condiciones control o hipoxia, muestran un aumento significativo en la expresión del RNAm, lo cual podría sugerir un caso de retroalimentación positiva. Aunque fisiológicamente los ejemplos de retroalimentación positiva son poco abundantes, se sabe que como parte de la regulación de la maduración en astrocitos existe un proceso de retroalimentación

positiva que involucra al factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF) y al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Li, *et al*, 2019). No sería extraño que el KI soluble, provocara una producción de KI intracelular. Sin embargo, para confirmar este hecho se debe ampliar la investigación acerca de la regulación intracelular de KI.

Como se ha mencionado anteriormente la expresión del gen KI disminuye con la edad y la evidencia acumulada de diversas investigaciones sugiere un posible nexo entre KI y diversos padecimientos presentes en el envejecimiento, incluyendo la neurodegeneración y los infartos cerebrales (Zhou, H., *et al*, 2018). Por esta razón, es que se decidió someter a los cultivos primarios de astrocitos a condiciones de privación de oxígeno y glucosa, ya que este modelo ha sido el más comúnmente utilizado para inducir daño similar al infarto cerebral en células *in vitro*. El método consiste en reemplazar el medio de cultivo estándar por uno sin o con poca glucosa, y la incubación de las células en una cámara de hipoxia (Tornabene, *et al*, 2019). Para imitar un infarto cerebral, los astrocitos en cultivo fueron sometidos a un medio de cultivo con 1g/L D-glucosa en una cámara de hipoxia con 1% de O<sub>2</sub>. Además, como se mencionó previamente, existe evidencia que sugiere fuertemente una relación entre EA y el accidente cerebrovascular, factores de riesgo vascular, como la hipertensión, relacionados con la isquemia, aumentan significativamente el riesgo de presentar EA, además, entre el 60-90% de los pacientes con EA presentan lesiones correspondientes a las de un accidente cerebrovascular. Por otro lado, algunos estudios clínicos indican que personas con deficiencias cognitivas como las diagnosticadas clínicamente con EA tienen un mayor riesgo de presentar isquemia



o un accidente cerebrovascular (Koistinaho & Koistinaho, 2005). Existe evidencia que ha revelado que la exposición a hipoxia/isquemia aumenta la síntesis de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (APP), lo cual conduce a una acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide en el cerebro (Salminen, 2017). Aunque por mucho tiempo se pensó, que las neuronas eran el único tipo celular capaz de producir  $A\beta$ , estudios recientes muestran que los astrocitos son capaces de secretar  $A\beta$  (Frost, 2017), de hecho, en cultivos de astrocitos sometidos a periodos largos de hipoxia se ha observado la producción de la proteína  $\beta$ -amiloide (Boycott, 2007). También, se sabe que el envejecimiento, además de ser un factor de riesgo común para la EA y el infarto cerebral, puede tener efectos sobre las arterias cerebrales reflejándose en una mayor acumulación de  $A\beta$  soluble tanto en el parénquima cerebral como en las paredes de los vasos sanguíneos, provocando una predisposición para sufrir hipoxia (Attems, 2014). Por eso se considero apropiado incluir entre los tratamientos experimentales el fragmento  $A\beta$  (25-35) disuelto en el medio celular y en combinación de la hipoxia, teniendo como objetivo comprender mejor la interacción entre la acumulación de la proteína amiloide y la hipoxia. Se decidió trabajar con el fragmento de  $A\beta$  25-35 ya que se ha propuesto que este fragmento representa la región biológicamente activa del  $A\beta$ , además estudios *in vitro* han demostrado que no requiere del “envejecimiento para agregarse y volverse tóxica (Hughes, 2000).

A pesar de que se encontró un aumento significativo en cuanto a la expresión del RNAm de KI en los grupos tratados con KI soluble, ya sea en hipoxia o no, y a pesar de que se observa una tendencia a aumentar el RNAm de KI, en general en todas las condiciones comparadas con el grupo control, al realizar la cuantificación de la

proteína KI en los cultivos (Fig. 10), se observó una disminución estadísticamente significativa de KI en cada tratamiento, siendo más marcada en los tratamientos con hipoxia. Es importante recordar, que el dogma central de la biología vincula fuertemente al DNA, RNA y a su proteína. Mientras que una secuencia genética determina la secuencia del RNAm producto, y a su vez este determina la secuencia de aminoácidos del polipéptido resultante, no existe una relación exacta entre la concentración de un transcripto y la concentración o concentraciones de la o las proteínas derivadas de un locus particular. Cuando una célula se encuentra en “estado estable”, se considera que no se encuentra experimentando grandes cambios fisiológicos y sus promedios de traducción proteína y/o RNAm se mantienen estables, bajo dichas circunstancias, la variación de los niveles de proteína entre genes está determinada principalmente por sus respectivos niveles de RNAm. Cuando una célula se encuentra en un estado de transición, las proteínas sintetizadas también pueden ser determinadas en gran medida por la inducción de RNAm respectiva. Sin embargo, no se espera que la transcripción inducida conduzca a un aumento inmediato de los niveles de proteínas, ya que la maduración, la exportación y la traducción del RNAm toman algún tiempo, por lo tanto, se considera que existe un retraso entre la inducción transcripcional y el aumento del nivel de proteínas (Liu, Y, 2016). De hecho, en un estudio publicado en 2015 usando un modelo de estimulación por LPS de células dendríticas de ratón, donde se midieron proteínas de respuesta inmune y se demostró que a pesar de existir un pico de RNAm a las 5 hrs de la estimulación, no es hasta 12 hrs post

tratamiento, que los niveles de proteína pueden ser correlacionados con sus RNAm específicos (Jovanovic, 2015).

Como se mencionó anteriormente, a pesar de que se observa un aumento significativo en la expresión del RNAm de KI (Fig. 9), este aumento parece no correlacionar con los niveles de expresión de la proteína KI, pero debemos tomar en cuenta, que la hipoxia tiene efectos significativos y conocidos en las diversas proteínas celulares, lo cual puede provocar no solo efectos inmediatos en la activación de enzimas, sino que puede resultar en cambios en la síntesis de proteínas (Fisk, 2007). Además, no solo se utilizó la hipoxia como factor de estrés y daño celular, sino también el del péptido A $\beta$  25-35 fue usado en algunos grupos experimentales. Debido a que diversos estudios previos, han demostrado que los agregados de A $\beta$ , así como el núcleo intacto de las placas de A $\beta$ , pueden disparar la activación de los astrocitos *in vitro*, causando una sobre regulación notoria de GFAP acompañada de cambios morfológicos, entre muchos otros efectos (Dossi, 2018) es probable, por lo tanto, que la diferencia entre el RNAm y la proteína KI se deba al retraso en la síntesis de la proteína.

Como se mencionó anteriormente, se decidió evaluar la expresión de la proteína GFAP mediante la técnica de Western Blot ya que los cambios en la expresión de esta proteína han sido considerados por muchos estudios previos como un marcador para medir la reactividad de los astrocitos en diferentes modelos de daño celular (Liddelow, 2017). Además se ha postulado que la proteína GFAP puede jugar un papel importante en el proceso isquémico, de hecho, el ratón knockout para GFAP muestra un volumen mayor de infarto cortical, una disminución local de la

circulación sanguínea y un aumento de la presión intracraneal después de un proceso de isquemia/reperfusión, comparado con los controles (Panickar, 2005). En 2018 Zhou y colaboradores, publicaron un estudio donde se afirma que KI tiene un efecto protector frente al daño cerebral provocado por isquemia, y en parte se debe a que la sobreexpresión de KI disminuye significativamente la inmunoreactividad de la proteína GFAP (Zhou, 2018). En el presente trabajo de tesis, se puede observar que el KI soluble no reduce la expresión de GFAP (Fig. 11), de hecho, existe un aumento estadísticamente significativo en cuanto a la expresión de esta proteína cuando se convinan los tratamientos de A $\beta$  y KI, ya sea en condiciones de hipoxia o control. Es necesario recordar que los astrocitos adoptan un estado “reactivo” ante cualquier daño del SNC, este estado de reactividad incluye la hipertrofia celular y diversos cambios en la expresión genética (Sofroniew, 2005), siendo tal vez el más notorio el incremento en la expresión de la proteína GFAP, además de la Vimentina y la Nestina. El estado reactivo de los astrocitos específicamente después de un infarto sigue siendo controversial, por lo que se considera que los astrocitos reactivos pueden desempeñar papeles perjudiciales o beneficiosos dependiendo de las condiciones espacio temporales (Liu, 2014). En el estudio de Zhou y colaboradores (2018) observaron una disminución en la expresión de la proteína GFAP medido 72 hrs después del infarto cerebral y la reperfusión cerebral, es decir, la expresión de la proteína GFAP fue analizada en una etapa no aguda del daño por isquemia, mientras que en la presente tesis, la expresión de dicha proteína fue determinada inmediatamente después de aplicarse el modelo de privación de oxígeno y glucosa, lo cual explicaría porque a pesar de lo previamente publicado,

no se registra una disminución de la expresión de GFAP, posiblemente si se hubieran tomado mediciones a tiempos mas largos se podría observar un decaimiento de la expresión de GFAP.

Por último, se decidió evaluar la expresión a nivel del BDNF, este factor es un miembro de la familia de las neurotrofinas, dicha proteína desempeña funciones de supervivencia y diferenciación durante el desarrollo del sistema nervioso. Además, el BDNF se mantiene presente en el cerebro maduro y participa en la potenciación a largo plazo, el aprendizaje y la formación de la memoria. El BDNF además es una molécula crucial para la señalización molecular en la plasticidad cerebral adaptativa después de un infarto cerebral, de hecho, los tratamientos que mejoran la recuperación de funciones están fuertemente asociados con el incremento de los niveles de BDNF en las áreas periféricas a la lesión. Contrariamente, la disminución en los niveles de BDNF, después de un infarto cerebral reduce la neuroplasticidad o la recuperación de funciones ya sean espontáneas o inducidas por terapia de rehabilitación (Béjot, 2011). Clásicamente se consideraba que las neuronas producían y almacenaban el BDNF, pero hoy en día se sabe que los astrocitos son capaces de producir BDNF en el SNC bajo circunstancias de daño como la esclerosis múltiple, el mal de Parkinson, la EA, o el infarto cerebral, en donde existe una sobre regulación de BDNF es los astrocitos reactivos. También se sabe, que después de una estimulación *in vitro*, los astrocitos reactivos producen BDNF para rescatar a las células neuronales de la degeneración neurítica inducida experimentalmente, por lo tanto, se considera que, la producción de BDNF por los

astrocitos reactivos puede contribuir a la reparación de tejidos lesionados y a la neuroprotección (Wei, 2010).

En la presente tesis, pudimos observar que existe un aumento significativo de la expresión de BDNF (Fig. 12) con todos los tratamientos, y bajo condiciones de hipoxia cuando a los cultivos se les aplico A $\beta$  o KI, o la combinación de ambos. En un estudio *in vivo*, Béjot y colaboradores (2011), demostraron que tanto las neuronas como las células no neuronales, producen una cantidad sustancial de BDNF después de un accidente cerebrovascular en ratas, pero esta contribución relativa depende del retraso después de que se inicia el infarto cerebral. Es decir, en las primeras cuatro horas después del infarto el incremento de BDNF es debido a la sobre regulación de esta proteína por las neuronas, tiempo después tanto las células endoteliales como la microglía se convierten en las células productoras dominantes, mientras que 8 días después del infarto, la sobreproducción de BDNF involucra tanto a las neuronas como a los astrocitos. Por lo tanto, no es de sorprender que no se observe un incremento estadísticamente significativo en la producción de BDNF bajo condiciones de hipoxia *in vitro*, ya que las mediciones de la proteína se llevaron a cabo inmediatamente después que las células fueron extraídas de la cámara de hipoxia. Por otro lado, lo que sí es importante mencionar, es el aumento significativo en la producción de BDNF cuando las células son tratadas con A $\beta$  bajo condiciones de hipoxia, ya que en un estudio de Tang y colaboradores (2000) se encontró que, aunque existe una expresión de BDNF inducida por A $\beta$  ésta se da 3 días después de mantener una infusión intracerebroventricular continua de A $\beta$  en ratas. Tanto la hipoxia como la proteína

$\beta$ -amiloide son capaces de inducir la producción de BDNF pero en tiempos considerablemente más largos a los observados en esta trabajo. Por lo tanto el que en los experimentos aquí presentados se observe una producción estadísticamente significativa de BDNF en tan solo 6 horas se puede deber a un efecto sinérgico producido por la combinación del tratamiento con A $\beta$  bajo condiciones de hipoxia. También, es posible que exista un efecto sinérgico en la producción de BDNF debido a la aplicación del tratamiento con KI bajo condiciones de hipoxia, ya que como se menciona antes, el daño por isquemia es capaz de provocar una sobre expresión de BDNF, pero varios días después del daño, al menos en astrocitos y aunque no esta reportada una relación estrecha entre KI y BDNF, los modelos murinos demuestran que la deficiencia de la proteína KI, resulta en un bajo desempeño cognitivo en las pruebas de memoria y aprendizaje, mientras que su sobreexpresión mejora las funciones cognitivas (Abraham, 2016). Además, el ratón knock out de Kotho, presenta una baja expresión de diversas proteínas entre ellas BDNF (Park, 2013), por lo que es posible sugerir una relación entre BDNF y KI con efectos directos sobre el desempeño cognitivo, pero es necesario investigar más al respecto para poder realizar conclusiones definitivas.

## **Conclusiones:**

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que los astrocitos corticales de rata en cultivo primario expresan KI, tanto a nivel de proteína como de RNAm. Sin embargo, existe un desfase en la relación RNAm y proteína, el cual se puede atribuir a las condiciones de daño celular a las que fueron sometidos los cultivos. Además, el KI soluble es capaz de inducir un aumento muy significativo en la expresión del RNAm de KI, por lo que se podría sugerir un posible caso de retroalimentación positiva. También se puede concluir, que el KI soluble no disminuye la sobreexpresión de GFAP en un proceso agudo de daño como la hipoxia inducida por 6 hrs o el tratamiento con A $\beta$ . Por otro lado, el KI soluble combinado con la hipoxia, promueve el aumento en la expresión de BDNF como resultado de una posible interacción sinérgica.



## **Referencias:**

1. Abraham, C. R., Mullen, P. C., Tucker-Zhou, T., Chen, C. D., & Zeldich, E. (2016). Klotho is a neuroprotective and cognition-enhancing protein. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 101, pp. 215-238). Academic Press.
2. Alobayan, R. (2019). Caracterización de la vía de señalización Wnt en astrocitos y su papel en la neuroprotección. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience letters*, 565, 23-29.
4. Attems, J., Jellinger, K.A. The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease - lessons from pathology. *BMC Med* 12, 206 (2014). <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0206-2>
5. Baldwin, K. T., & Eroglu, C. (2017). Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Current opinion in neurobiology*, 45, 113-120.
6. Barreto, G. E., Gonzalez, J., Torres, Y., & Morales, L. (2011). Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neuroscience research*, 71(2), 107-113.
7. Becerra-Calixto, A., & Cardona-Gómez, G. P. (2017). *The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10.doi:10.3389/fnmol.2017.00088
8. Béjot, Y., Prigent-Tessier, A., Cachia, C., Giroud, M., Mossiat, C., Bertrand, N., ... Marie, C. (2011). Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochemistry International*, 58(1), 102–111. doi:10.1016/j.neuint.2010.10.019
9. Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzériat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. doi:10.3389/fncel.2015.00278
10. Boycott, H. E., Dallas, M., Boyle, J. P., Pearson, H. A., & Peers, C. (2007). Hypoxia suppresses astrocyte glutamate transport independently of amyloid formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(1), 100–104. doi:10.1016/j.bbrc.2007.09.102

11. Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron*, 81(2), 229–248. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.034
12. Cararo-Lopes, M., et al (2017) *The relevance of Klotho to the central nervous system: Some key questions*. *Ageing Research Reviews* 36. 137–148
13. Castillo, J., Alvarez-Sabin, J., Davalos, A., Diez-Tejedor, E., Lizasoain, I., Martinez-Vila, E., ... & Zarranz, J. J. (2003). Consensus review. Pharmacological neuroprotection in cerebral ischemia: is it still a therapeutic option?. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 18(7), 368-384.
14. Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(2), 137-149.
15. Dal Prà, I., Chiarini, A., Gui, L., Chakravarthy, B., Pacchiana, R., Gardenal, E., ... & Armato, U. (2015). Do astrocytes collaborate with neurons in spreading the “infectious” A $\beta$  and Tau drivers of Alzheimer’s disease?. *The Neuroscientist*, 21(1), 9-29.
16. Dennie, D., Louboutin, J. P., & Strayer, D. S. (2016). Migration of bone marrow progenitor cells in the adult brain of rats and rabbits. *World Journal of Stem Cells*, 8(4), 136.
17. Dirnagl, U., Simon, R. P., & Hallenbeck, J. M. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends in Neurosciences*, 26(5), 248–254. doi:10.1016/s0166-2236(03)00071-7
18. Dossi, E. et al (2018). *Human astrocytes in the diseased brain*. *Brain Research Bulletin* 136. p139–156.
19. Estrada, F., et al. (2012). *Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. Vol. 55, N.o 4.
20. Fisk, L. et al (2007). *Effects of Hypoxia and Oxidative Stress on Expression Nprilysin in Human Neuroblastoma Cells and Rat Cortical Neurons and Astrocytes*. *Neurochem Res* 32:1741–1748
21. Frost GR, Li Y-M. 2017 The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer’s disease. *Open Biol.* 7: 170228. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.170228>
22. Hudetz, J. A., & Pagel, P. S. (2010). Neuroprotection by ketamine: a review of the experimental and clinical evidence. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 24(1), 131-142.

23. Hughes, E., Burke, R. M., & Doig, A. J. (2000). Inhibition of Toxicity in the  $\beta$ -Amyloid Peptide Fragment  $\beta$ -(25–35) Using N-Methylated Derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25109–25115. doi:10.1074/jbc.m003554200
24. Jovanovic, M., Rooney, M. S., Mertins, P., Przybylski, D., Chevrier, N., Satija, R., Regev, A. (2015). Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science*, 347(6226), 1259038–1259038. doi:10.1126/science.1259038
25. Khoshnam, S. E., Winlow, W., Farzaneh, M., Farbood, Y., & Moghaddam, H. F. (2017). Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurological Sciences*, 38(7), 1167–1186. doi:10.1007/s10072-017-2938-1
26. Koistinaho, M., & Koistinaho, J. (2005). Interactions between Alzheimer's disease and cerebral ischemia—focus on inflammation. *Brain Research Reviews*, 48(2), 240-250.
27. Kuro-o, M. (2009). Klotho and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(10), 1049-1058.
28. Kuro-o, M. (2011). Klotho and the aging process. *The Korean journal of internal medicine*, 26(2), 113.
29. Kurosu, H. et al. (2005). *Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho*. *Science*. 309(5742): 1829–1833
30. Lazarov, O., & Tesco, G. (Eds.). (2016). *Genes, environment and Alzheimer's disease*. Academic Press.
31. Li, C., Zhao, R., Gao, K., Wei, Z., Yaoyao Yin, M., Ting Lau, L., ... & Cheung Hoi Yu, A. (2011). Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 8(1), 67-80.
32. Li, K., et al (2019). *Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases*. *Aging and Disease*. Vol 3. No. 3. 664-675.
33. Li, J., Khankan, R. R., Caneda, C., Godoy, M. I., Haney, M. S., Krawczyk, M. C., Bassik, M. C., Sloan, S. A., & Zhang, Y. (2019). *Astrocyte-to-astrocyte contact and a positive feedback loop of growth factor signaling regulate astrocyte maturation*. *Glia*, 67(8), 1571–1597. <https://doi.org/10.1002/glia.23630>
34. Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957–967. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.006

35. Liu, Z., Li, Y., Cui, Y., Roberts, C., Lu, M., Wilhelmsson, U., ... Chopp, M. (2014). Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. *Glia*, 62(12), 2022–2033. doi:10.1002/glia.22723
36. Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, 165(3), 535–550. doi:10.1016/j.cell.2016.03.014
37. López-Valdés, H. E., & Martínez-Coria, H. (2016). The role of neuroinflammation in age-related dementias. *Revista de investigacion clinica*, 68(1), 40-48.
38. Mansoor SR, Hashemian M, Khalili-Fomeshi M, Ashrafpour M, Moghadamnia AA, Ghasemi-Kasman M, Upregulation of klotho and erythropoietin contributes to the neuroprotection induced by curcumin-loaded nanoparticles in experimental model of chronic epilepsy, *Brain Research Bulletin* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.08.010>
39. Martínez-Coria, H., Arrieta-Cruz, I., Cruz, M. E., & López-Valdés, H. E. (2020). Physiopathology of ischemic stroke and its modulation using memantine: evidence from preclinical stroke. *Neural Regeneration Research*, 16(3), 433.
40. N. Yamamoto et al (2018). *Insulin-signaling Pathway Regulates the Degradation of Amyloid b-protein via Astrocytes*. *Neuroscience* 385 (2018) 227–236
41. Ouyang, Y.-B., Xu, L., Yue, S., Liu, S., & Giffard, R. G. (2014). *Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: Importance of microRNAs*. *Neuroscience Letters*, 565, 53–58.
42. Panickar, K. S., & Norenberg, M. D. (2005). *Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations*. *Glia*, 50(4), 287–298. doi:10.1002/glia.20181
43. Park, S. J., Shin, E. J., Min, S. S., An, J., Li, Z., Chung, Y. H., ... & Jang, C. G. (2013). Inactivation of JAK2/STAT3 signaling axis and downregulation of M1 mAChR cause cognitive impairment in klotho mutant mice, a genetic model of aging. *Neuropsychopharmacology*, 38(8), 1426-1437.
44. Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). *Astrocyte activation and reactive gliosis*. *Glia*, 50(4), 427–434. doi:10.1002/glia.20207
45. Rizor, A., Pajarillo, E., Johnson, J., Aschner, M., & Lee, E. (2019). Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's

Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes. *Antioxidants*, 8(8), 265. doi:10.3390/antiox8080265

46. Salminen, A., Kauppinen, A., & Kaarniranta, K. (2017). Hypoxia/ischemia activate processing of Amyloid Precursor Protein: impact of vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 140(4), 536–549. doi:10.1111/jnc.13932
47. Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K., & Schachtrup, C. (2013). Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (71), e50079.
48. Schmidt, A. M., Hori, O., Brett, J., Yan, S. D., Wautier, J. L., & Stern, D. (1994). Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, 14(10), 1521-1528.
49. Sofroniew, M. V. (2005). Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *The Neuroscientist*, 11(5), 400–407. doi:10.1177/1073858405278321
50. Tang, Y.-P., Yamada, K., Kanou, Y., Miyazaki, T., Xiong, X.-L., Kambe, F., ... Nabeshima, T. (2000). Spatiotemporal expression of BDNF in the hippocampus induced by the continuous intracerebroventricular infusion of  $\beta$ -amyloid in rats. *Molecular Brain Research*, 80(2), 188–197. doi:10.1016/s0169-328x(00)00158-3
51. Tornabene E, Helms HCC, Pedersen SF, Brodin B (2019) Effects of oxygen-glucose deprivation (OGD) on barrier properties and mRNA transcript levels of selected marker proteins in brain endothelial cells/astrocyte co-cultures. *PLoS ONE* 14(8): e0221103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221103>
52. Wang, Y., & Sun, Z. (2009). Current understanding of klotho. *Ageing research reviews*, 8(1), 43-51.
53. Wei, R., Lin, C.-M., & Tu, Y.-Y. (2010). Strain-specific BDNF expression of rat primary astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 220(1-2), 90–98. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.02.002
54. Yamamoto, N., Ishikuro, R., Tanida, M., Suzuki, K., Ikeda-Matsuo, Y., & Sobue, K. (2018). Insulin-signaling pathway regulates the degradation of amyloid  $\beta$ -protein via astrocytes. *Neuroscience*, 385, 227-236.
55. Zeldich, E., Chen, C. D., Colvin, T. A., Bove-Fenderson, E. A., Liang, J., Zhou, T. B. T., ... & Abraham, C. R. (2014). The neuroprotective effect of

Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24700-24715.

56. Zhou, H.-J., Li, H., Shi, M.-Q., Mao, X.-N., Liu, D.-L., Chang, Y.-R., ... Du, J.-R. (2018). Protective Effect of Klotho against Ischemic Brain Injury Is Associated with Inhibition of RIG-I/NF- $\kappa$ B Signaling. *Frontiers in Pharmacology*, 8. doi:10.3389/fphar.2017.00950