



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



BIOINGENIERIA

EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO GLAST EN
CÉLULAS GLIALES DE LA GALLETA DE MAR *Dendraster excentricus*.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

P R E S E N T A

GABRIELA OSUNA CORTEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

MAYO DE 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO GLAST EN
CÉLULAS
GLIALES DE LA GALLETA DE MAR *Dendraster excentricus*

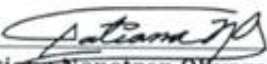
TESIS

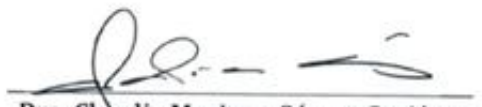
PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOINGENERO

PRESENTA:

GABRIELA OSUNA CORTEZ

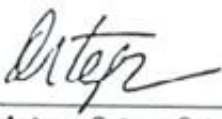
Aprobada por:


Dra. Tatiana Nenetzen Olvares Bañuelos
Directora de Tesis


Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Sinodal


Dr. Luis Manuel Enríquez Peredes
Sinodal


Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo
Sinodal


Dr. Arturo Ortega Soto
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, **Rafael y Adriana**, por brindarme su amor y apoyo incondicional en la vida, gracias por creer en mí.

A mis hermanas de corazón, **Perla y Valeria**, por su amistad sincera y siempre estar ahí en cada paso que doy.

A mi querido compañero de aventuras, **Ramón Castellanos**, por su amor incondicional y por cada granito de arena el cual me ayuda a ser mejor como persona y profesional, mi ejemplo a seguir, gracias por todo.

A mi grupo favorito de personas, **Ramón, Perla, Valeria, Noel, David**, por su amistad y apoyo sincero. Por dejarme ser parte de sus vidas.

A mi compañero y futuro colega, **Alejandro Villegas**, por su paciencia y buenos consejos que fueron de gran apoyo.

A mi directora de tesis, **Dra. Tatiana N. Olivares Bañuelos**, por la confianza al aceptarme para realizar este proyecto, por su entrega, enseñanzas y buenos deseos, por alentarme a ser una mejor estudiante.

A mis profesores, por brindarme sus conocimientos y por contribuir en el desarrollo de mi formación profesional.

A mis sinodales, **Dra. Tatiana N. Bañuelos, Dr. Arturo Ortega, Dra. Claudia M. Gómez, Dr. Dante A. Magdaleno, Dr. Luis M. Enriquez Peredes** por su dedicación y tiempo, por formar parte de este trabajo enriqueciéndolo con sus acertadas sugerencias.

A mis compañeros de clase, que fueron una parte importante en mis días universitarios, por esos buenos momentos compartidos.

A **UABC**, por todas las oportunidades que me ha brindado.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el

LABORATORIO DE GENÉTICA

Del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC.

Bajo la Dirección y Tutoría de la

DRA. TATIANA NENETZEN OLIVARES BAÑUELOS

Tabla de Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	2
ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Invertebrados marinos.....	6
2.2 Superfilo Deuterostomia.....	7
2.3 Sistema nervioso de equinodermos	8
2.4 Células gliales	9
2.5 Células gliales radiales	10
2.6 Transportadores de glutamato	10
2.7 GLAST/EAAT1	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo General	14
5.2 Objetivos Específicos	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 Extracción de RNA total	15
6.2 Retrotranscripción y PCR de punto final.....	16
6.3 Cuantificación de la expresión del gen GLAST por PCR Tiempo Real (PCR-TR)	17
6.4 Análisis estadísticos	19
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	20
7.1 Análisis del RNA total en etapa adulta y larvales de la galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i>	20
7.2 Estandarización de las condiciones de reacción para los ensayos de RT-PCR.	22
7.3 Análisis de la expresión génica de GLAST en larvas y adultos de la galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i>	26

8. CONCLUSIONES	27
9. PERSPECTIVAS	28
10. BIBLIOGRAFÍA.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema modelo de la distribución de las muestras en una placa de 96 pocillos para PCR-TR.	19
FIGURA 2. Imagen representativa de la electroforesis de RNA total de los diferentes estadios de desarrollo de las larvas de la galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> en gel de agarosa. (A) Pseudo-réplicas de las larvas de 4-brazos, 6-brazos, 8-brazos, larvas competentes y larvas metamorfoseadas. (C) Pseudoreplicas de larvas de 8-brazos.	20
FIGURA 3. Electroforesis de PCR punto final en gel de agarosa al 2.0% Estandarización de la concentración del oligonucleótido GLAST en RT-PCR de punto final.....	22
FIGURA 4. Imagen representativa de electroforesis de los productos de PCR punto final en gel de agarosa 2.0%. (A) muestras de 4-brazos, 6-brazos y 8-brazos. (B) muestras de larvas competentes y larvas metamorfoseadas.	24
FIGURA 5. Distribución de las pseudo-réplicas por triplicado de los diferentes estadios de la galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> en placa de 96 pocillos para PCR-TR.	25
FIGURA 6. Gráfica de la expresión relativa de GLAST de las diferentes etapas de la galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i>	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Especificaciones de los oligonucleótidos GLAST y R18S.	16
Tabla II. Especificaciones de las condiciones de la PCR punto final de el gen GLAST, usando R18S como control de carga en cada corrida experimental.	17
Tabla III. Condiciones de la PCR-TR de el gen GLAST, usando R18S como control de expresión constitutiva de genes en cada corrida experimental.	18
Tabla IV. Resultados de la cuantificación de RNA total de los diferentes estadios de la galleta de mar <i>Dendroaster excentricus</i> mediante NanoDrop ND-100 (Biolab, Mulgrave, VIC, Australia).....	21

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
C	Citosina
DNA	Del inglés <i>Deoxyribonucleic acid</i>
cDNA	Del inglés <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Del inglés <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F	Del inglés <i>Forward</i>
G	Guanina
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato 1
Glu	Glutamato
H ⁺	Protón
K ⁺	Potasio
kDa	Kilodalton(s)
μl, ml	Microlitro, mililitro
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Mn	Manganeso
μM, mM, M	Micromolar, milimolar, molar
mRNA	Del inglés <i>Messenger ribonucleic acid</i>
N	Normal
Na ⁺	Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng, μg, mg	Nanogramos, microgramos, miligramos
nm	Nanómetros
PACAP	Del inglés <i>Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>
pb	Pares de bases
PCR	Del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial de hidrógeno
R	Del inglés <i>Reverse</i>
R18S	Gen ribosomal 18
RNA	Del inglés <i>ribonucleic acid</i>
RNasa	Ribonucleasa
RT-PCR	Del inglés <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
s	Segundos
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
TAE	Tris-acetato-EDTA
Tm	Temperatura de fusión

V
°C

Volts
Grados centígrados

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) es una de las estructuras más importantes de los organismos vertebrados e invertebrados. En ambos grupos del reino animal, el SNC está compuesto por dos tipos de células que trabajan de manera conjunta para el correcto funcionamiento de todas aquellas actividades metabólicas que garantizan la supervivencia de los seres vivos; las neuronas y las células gliales (Brusca et al., 2016). Aunque por décadas el papel de las neuronas en el SNC ha sido el centro de atención de las neurociencias las células gliales juegan también un papel muy importante en el desarrollo, funcionalidad y regeneración de las células neuronales (S. Song et al., 2020), participando en los procesos de osmorregulación neuronal. Además de que las células gliales favorecen y modulan las sinapsis neuronales, producen una serie de factores celulares que están involucrados tanto en los procesos de generación como de regeneración neuronas en el SNC de vertebrados e invertebrados (Campbell & Götz, 2002; Kroehne et al., 2011; Odintsova et al., 2005).

Las células gliales han sido ampliamente estudiadas en organismos vertebrados, pero recientemente se han incrementado el número de investigaciones sobre éstas células en animales invertebrados, sobre todo en el Superfilo Deuterostomia dada la estrecha relación filogenética que tienen con los mamíferos (Mashanov & Zueva, 2018) y la simplicidad de su sistema nervioso que tiene pocas células. Tanto en vertebrados como en invertebrados las células gliales comparten características estructurales y funcionales, lo que facilita su caracterización en aquellos organismos en donde estas células aún no han sido reportadas. Dentro de las características de las células gliales se encuentran los sistemas transportadores de glutamato, cuya función es mantener niveles adecuados de glutamato en la hendidura sináptica para evitar la degeneración e incluso la muerte, de las células neuronales (López-Bayghen & Ortega, 2011). Cabe mencionar que el glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC y participa en la mayoría de los procesos químicos que ocurren en el cerebro, por lo que la regulación de la concentración de esta molécula es de vital importancia para la funcionalidad de cualquier organismo. La

importancia biológica que tienen las células gliales en el SNC, sumado a la presencia de una importante cantidad de estructuras filogenéticamente conservadas, convierte a estas células en importantes blancos de investigación biomédica. Es posible que, en un futuro cercano, el estudio de los factores moduladores que dichas células producen pueda emplearse en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica, entre otras.

Considerando lo anterior, el presente proyecto de trabajo tiene como objetivo general identificar, mediante técnicas moleculares, la expresión génica del transportador de glutamato GLAST en larvas y adultos de la galleta de mar *Dendraster excentricus*. Este transportador es exclusivo de las células gliales y nunca han sido analizados en *Dendraster excentricus*, por lo cual el proyecto permitirá identificar los cambios en los niveles de expresión de GLAST de células gliales en cada uno de los estadios de desarrollo de esta galleta de mar de las costas de Baja California perteneciente al Superfilo Deuterostomia.

2. ANTECEDENTES

2.1 Invertebrados marinos

A lo largo de la historia de la ciencia, los organismos marinos han sido muy importantes para el desarrollo del conocimiento científico, ya que se han utilizado como modelos para diversas ramas de las ciencias biológicas, tales como la biomedicina y la neurobiología. Gracias a estos modelos se han logrado identificar mecanismos que están relacionados con el funcionamiento del sistema nervioso (Ortega & Olivares-Bañuelos, 2020).

En los organismos marinos el sistema nervioso está compuesto por células con formas y funciones particulares, estas ayudan a controlar el comportamiento del organismo, además de detectar y responder a los diferentes estímulos ambientales (Northcutt et al., 2018). Las respuestas a los estímulos ambientales se dan mediante la recepción (interna o externa), codificación, transmisión y procesamiento de información (Hickman et al., 2001).

Las células nerviosas, que se encuentran en todos los organismos multicelulares, permiten comprender el entorno mediante el procesamiento de las señales sensoriales, la selección de respuestas, la transmisión de la información, e incluso la regeneración de células nerviosas del sistema nervioso. Para ello se debe contar con la disposición adecuada de las células nerviosas y de una eficiente comunicación entre ellas (Blankenship & Houck, 2014).

El estudio del sistema nervioso se facilita en gran medida en aquellos organismos con un sistema simple y accesible. A comparación del resto de los organismos multicelulares, los invertebrados son organismos que tienen el sistema nervioso más simple y, estructurado con pocas células de gran tamaño (Blankenship & Houck, 2014).

La gran importancia que conlleva el estudio y la comprensión de las actividades cerebrales es trascendente para la identificación y el desarrollo de tratamientos neuropatológicos (Ortega & Olivares-Bañuelos, 2020).

2.2 Superfilo Deuterostomia

En el clado Deuterostomía, los equinodermos se consideran un filo clave en los estudios de evolución y ecología. Los Deuterostomas presentan un plexo neural como SN, es decir, que presenta una red formada de nervios que se cruzan entre sí (Byrne & Cisternas, 2002; Cañestro et al., 2005). Se conoce que existe una estrecha relación filogenética entre los equinodermos y cordados, su evidencia en la comparten un ancestro común los ha convertido en modelo de estudio en neurociencias. Sin embargo, otros organismos que están tomando importancia son los hemicordados debido a que el desarrollo de su SN favorece a la comprensión de la evolución del SN en todos los vertebrados (Ortega & Olivares-Bañuelos, 2020).

Los hemicordados son organismos que tienen una relación cercana con los equinodermos y cordados (Dakin, 1916). Estos organismos marinos tienen la característica de poseer un SN primitivo con células nerviosas distribuidas por toda la capa epidérmica. Las fibras

nerviosas están organizadas en dos capas: la primera es una capa basal delgada de fibras con disposiciones irregulares, y la segunda es una capa superficial más gruesa en donde la organización de estas fibras forman un sistema conductor (Knight-Jones, 1951).

Debido a su simetría bilateral como adultos, se ha demostrado a nivel molecular que los hemicordados muestran patrones de regeneración (Arimoto & Tagawa, 2015, 2018; Lowe et al., 2003; Miyamoto & Wada, 2015). Son los únicos organismos conocidos que regeneran el SN completo de la estructura anterior, por ejemplo, *Ptychodera flava* que tiene la capacidad de regenerar todo su SN en 1–4 días (Humphreys et al., 2010; Luttrell et al., 2016).

2.3 Sistema nervioso de equinodermos

Una de las características anatómicas únicas que presentan los equinodermos, dentro del grupo de los invertebrados, es una simetría radial pentámera secundaria a la simetría bilateral que presentan a lo largo de etapa. Los equinodermos se dividen en seis clases: *Crinoidea* (lirios de mar), *Asteroidea* (estrellas de mar), *Ophiuroidea* (ofiuras), *Echinoidea* (erizos de mar, galletas de mar), *Holothurioidea* (pepinos de mar) y *Concentricycloidea* (margaritas de mar), en donde estas últimas cinco comprenden a los equinodermos móviles.

Los equinodermos se consideran un filo clave en los estudios de evolución. Sin embargo, una de las desventajas de trabajar con su SN y razón por lo cual son los menos estudiados, es debido a las dificultades técnicas. A pesar de eso, han sido tema de estudio desde los últimos 75 años en los cuales se ha obtenido información relevante para el entendimiento de estos organismos (Cobb, 1987; Díaz-Balzac et al., 2018; García-Arrarás et al., 2001; Mashanov et al., 2013; Pentreath & Cobb, 1972).

El sistema nervioso de los equinodermos presenta una estructura simple formado por tres redes (ectoneural u oral, hiponeural y entoneural o aboral) combinadas en cordones nerviosos ganglionares (Cobb, 1987; García-Arrarás et al., 2001; Pentreath & Cobb, 1972).

El sistema ectoneural es el componente principal del SN en cinco de las seis clases de equinodermos, con excepción de *Concentricycloidea* (García-Arrarás et al., 2001). Los axones de las neuronas en los equinodermos son pequeños y no mielinizados, y está organizado en paquetes en posición paralela (Pentreath & Cobb, 1972).

Comúnmente se ha relacionado a los equinodermos con la neurociencia debido a que se han convertido en modelos para el estudio de los procesos de regeneración neuronal. Este grupo destaca por su capacidad de regenerar partes externas e internas, así como también del SN (Mashanov et al., 2015).

2.4 Células gliales

Las células gliales son células no neuronales, que cuentan con características bioquímicas y estructurales particulares, que les permiten llevar a cabo funciones dentro del SN (Zhang, 2001).

Las células gliales carecen de las propiedades de la membrana citoplasmática de las neuronas, lo que no les permite generar potenciales de acción. Esto hace que sean poco estudiadas en la comunicación y en el proceso de la transferencia de información en el SN (Rouach & Giaume, 2001). Sin embargo, en los últimos años, se han realizado numerosos estudios para conocer el funcionamiento de las células gliales que han sido replanteadas en la integración del funcionamiento del SN (Martínez-Gómez, 2014).

Las células gliales tienen un papel muy importante. Las células gliales son indispensables en el desarrollo temprano del SN, participan como soporte y protección de las neuronas, dan mantenimiento para llevar a cabo la neurotransmisión normal, suministra el combustible metabólico adecuado a las neuronas y ayuda en la regulación homeostática del SN (Brand & Livesey, 2011; Coles, 2015; Denes et al., 2007). Además, participan en los mecanismos que utilizan las neuronas jóvenes como orientación para poder migrar a los objetivos específicos de manera adecuada (Coles, 2015; Leise, 1990).

Se ha demostrado que las células gliales están presentes en numerosos filos marinos pero el número, el tipo y la distribución de células gliales en el sistema nervioso de los invertebrados son variables. Se conoce que, en los equinodermos, el 45-70% de la masa total de SN son células gliales (Ortega & Olivares-Bañuelos, 2020).

2.5 Células gliales radiales

Se han identificado células gliales radiales en el sistema central de los equinodermos, se descubrió que son el tipo principal de células gliales. La glía radial tiene una distribución amplia y abundante durante el desarrollo del SNC, sus proyecciones sirven como andamiaje permitiendo la migración de precursores neuronales, a través de las fibras radiales gliales, hacia a las distintas regiones del sistema nervioso, de vertebrados e invertebrados (Mashanov et al., 2007, 2009, 2010).

En mamíferos, la glía radial representa un tipo de astrocitos especializados, existen dos subtipos de células gliales radiales, ubicadas en dos regiones del cerebro adulto de los vertebrados: en la retina, en donde se encuentra la célula glía de Müller, y en el cerebelo, que cuenta con la célula glía de Bergmann, esta se puede encontrar desde etapas muy tempranas en el desarrollo (Sild & Ruthazer, 2011).

Los astrocitos y la glía radial comparten varias características, como: la expresión de proteínas del citoesqueleto y de membrana, receptores y transportadores neurotransmisiones como Glu y ácido gamma-aminobutírico (GABA). Además, se ha descubierto que la glía radial sirve como progenitor primario con capacidad de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).

2.6 Transportadores de glutamato

De manera similar a la de los mamíferos, en los invertebrados, el glutamato (Glu) es el neurotransmisor excitador principal del SNC, está presente en todas las áreas del SN a

altas concentraciones y sus receptores están ampliamente distribuidos y expresados en células neuronales y no neuronales. La importancia de este aminoácido excitador es que tiene funciones cerebrales superiores, como la cognición, el aprendizaje y la formación de la memoria (Birur et al., 2017; Fonnum, 1984; Headley & Grillner, 1990; Stanley et al., 2017), además de estar involucrado en la regulación del desarrollo del SNC como la inducción y la eliminación de la sinapsis (Durand et al., 1996; Murphy-Royal et al., 2015; Rabacchi et al., 1992), así como en la migración y diferenciación celular (Campana et al., 2017; Komuro & Rakic, 1993; Rossi & Slater, 1993; M. Song et al., 2017).

Durante la actividad sináptica, el Glu se libera y activa una amplia cascada de señales al unirse a receptores y transportadores de membrana específicos, por otro lado, se va eliminando de la hendidura sináptica. Este aminoácido no solamente es considerado un neurotransmisor excitador principal en el SNC, sino también una potente neurotoxina debido a que en altas concentraciones provoca una hiperactivación prolongada de sus receptores extrasinápticos, excitando una amplia serie de eventos intracelulares asociado a un desequilibrio iónico, ocasionando la muerte de las células neuronales, proceso que se le conoce como excitotoxicidad, mecanismo que causa varias enfermedades neurodegenerativas (T. N. Olivares-Bañuelos et al., 2019).

La función de los transportadores de glutamato es mantener una baja concentración de Glu en la hendidura sináptica para evitar una sobreestimulación dañina de la señalización glutamatérgicos (T. N. Olivares-Bañuelos et al., 2019). Para mantener estas bajas concentraciones, el Glu se elimina del espacio extracelular por una familia de sistemas de transporte de alta afinidad ubicados principalmente en la membrana plasmática de los astrocitos perinápticos y, en pocos casos, en neuronas (Kanai et al., 1993). El transporte de Glu están determinados por los gradientes de concentración transmembrana de sodio (Na^+), potasio (K^+) y protones (H^+), estos gradientes electroquímicos proporcionan la fuerza impulsora para llevar a cabo la absorción de glutamato. La estequiometría del transporte de Glu consiste en co-transportar una molécula de glutamato con tres Na^+ y un protón (H^+), y se libera simultáneamente un potasio (K^+) por cada ciclo de transporte (Danbolt, 2001; Levy et al., 1998; Zerangue & Kavanaugh, 1996).

El Glu obtenido de los transportadores se utiliza con fines metabólicos o para reciclaje como transmisor, a través del ciclo glutamato/glutamina (Danbolt, 2001).

Estudios moleculares han descrito al menos cinco subtipos de transportadores de Glu de membrana plasmática de origen humano o roedor: transportador de glutamato/aspartato (GLAST), aislado de rata (Stoffel et al., 1992), que en la contraparte humana es el transportador de aminoácidos excitador 1 (EAAT1) (Arriza et al., 1994); transportador de glutamato 1 (GLT-1), aislado de rata (Pines et al., 1992), cuya contraparte humana es (EAAT2) (Arriza et al., 1994); EAAC1, aislado por primera vez del conejo (Kanai & Hediger, 1992), cuya contraparte humana es EAAT3 (Arriza et al., 1994); EAAT4, expresado predominantemente en el cerebelo (Fairman et al., 1995), y EAAT5, expresado predominantemente en la retina (Arriza et al., 1994). En estas dos últimas son proteínas que tiene la misma nomenclatura en ambas especies.

GLAST/EAAT1 es uno de los transportadores de Glu principales que lleva a cabo la mayoría de la recaptura de Glu cerebral en las células gliales (Brasnjo & Otis, 2004; Diamond, 2001; Eulenburg & Gomez, 2010; Glowatzki et al., 2006; Huang et al., 2004; Lehre & Danbolt, 1998; Palmer et al., 2003).

2.7 GLAST/EAAT1

La proteína EAAT1 humana cuenta con 542 aminoácidos de longitud con un peso molecular aparente de 59.5 kDa. Se ha encontrado que entre los cinco neurotransportadores existe una identidad de secuencia de aminoácidos que varían entre sí. EAAT1 tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 96% con la secuencia de GLAST de roedor (Storck et al., 1992).

En GLAST, tiene como célula principal los astrocitos y los oligodendrocitos, estas son un tipo de células de la macroglía. La distribución de estas células en el SNC en vertebrados es en el cerebelo, córtex cerebral y médula espinal (Furuta et al., 1997; Lehre et al., 1997; Maragakis & Rothstein, 2004; Storck et al., 1992; Takatsuru et al., 2007).

Experimentalmente, se han desarrollado algunos métodos para obtener efectos en los niveles de expresión de la proteína GLAST. La expresión de GLAST está regulada por diferentes estímulos, se ha descubierto que el uso de diversos tipos de moléculas puede llevar a cabo la regulación de la expresión de GLAST, dándose tanto en las células gliales como en las neuronas, como: hormonas, factores de crecimiento, derivados de nucleótidos cíclicos, receptores de Glu, polipéptidos, tóxicos ambientales y condiciones de estrés como la hipoxia (T. N. Olivares-Bañuelos et al., 2019). Por ejemplo: aplicar un polipéptido derivado de neurona, el polipéptido activador de adenilato ciclasa (PACAP), regula la velocidad máxima y los niveles de proteína del transporte de Glu mediado por GLAST (Figiel & Engele, 2000; Michel et al., 2006); otro grupo de activadores en la expresión GLAST son los esteroides, en las células primarias de la astrogliá, el estrógeno y el tamoxifeno favorecen en el aumento de la proteína GLAST y su mRNA (Karki et al., 2014; Lee et al., 2009; Pawlak et al., 2005). Sin embargo, se puede reducir la expresión de GLAST bajo condiciones hipóxicas (Feng et al., 2015; Raymond et al., 2011), con tóxicos ambientales, y bajo la exposición de astrocitos a Mn^{+2} (Johnson et al., 2018).

Se conoce que la expresión de GLAST en vertebrados está regulada por el desarrollo. Es decir, en las primeras etapas de desarrollo el transportador GLAST se ve expresado abundantemente (Furuta et al., 1997). Con base en esta observación se puede sugerir usar GLAST como marcador de células progenitoras neural (Chen et al., 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Este estudio acerca de la expresión del gen que codifica para la proteína GLAST, uno de los principales transportadores de Glu, en las células gliales del SN en la galleta de mar *Dendraster excentricus* nos permitirá distinguir si existen diferentes niveles de expresión del gen GLAST en las distintas etapas de desarrollo de esta especie. Debido a que no se han analizado estos transportadores de glutamato en *Dendraster excentricus*, este enfoque puede favorecer al seguimiento de estudios del sistema nervioso en equinodermos, ya que se muestran como modelos de estudios estratégicos para las

ciencias biológicas, principalmente en el área biomédica para el diagnóstico y tratamientos de enfermedades neurodegenerativas.

4. HIPÓTESIS

Las larvas y adultos de la galleta de mar *Dendraster excentricus* expresan el gen que codifica para la proteína GLAST y esta expresión es dependiente del estadio de desarrollo. La expresión del transportador demuestra la existencia de células gliales en el sistema nervioso central de esta galleta de mar que habita en las costas de Baja California, México.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la expresión génica del transportador de glutamato GLAST en el sistema nervioso de la galleta de mar *Dendraster excentricus* en cada una de las etapas larvales de desarrollo y en organismos adultos.

5.2 Objetivos Específicos

1. Extraer y evaluar la cantidad y calidad del RNA total de galletas de mar *Dendraster excentricus* en etapa adulta y larvales (cuatro, seis, y ocho brazos, competentes y metamorfoseadas).
2. Estandarizar las condiciones de reacción para los ensayos de RT-PCR punto final utilizando los oligonucleótidos para el gen GLAST de la galleta de mar.

3. Analizar la expresión génica de GLAST en larvas y adultos de la galleta de mar *Dendroaster excentricus*, mediante ensayos de PCR Tiempo Real.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Extracción de RNA total

Las muestras biológicas para el desarrollo del presente proyecto fueron proporcionadas por la Dra. Tatiana Olivares, quien colectó tejido de galletas adultas y larvas en cada uno de sus estadios de desarrollo (4-Brazos, 6-Brazos, 8-Brazos, competentes y metamorfoseadas; (T. Olivares-Bañuelos et al., 2012)). La extracción de RNA total se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA) mediante el método de TRIzol. Brevemente, el proceso de homogenización del tejido se realizó sobre hielo con ayuda de una varilla de teflón. Posteriormente, se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (Biolab, Mulgrave, VIC, Australia) para determinar la calidad y la cantidad de los ácidos nucleicos extraídos con base en las absorbancias a 260 y 280 nm. La integridad del RNA total fue corroborada por electroforesis utilizando geles de agarosa al 1% con TAE.

Se preparó la cámara de electroforesis lavándola con hidróxido de sodio (NaOH) 1N, enjuagando dos veces con agua destilada y una vez más con agua destilada estéril. Se cargaron 2 µl de RNA total de la muestra correspondiente, 2 µl de solución amortiguadora de carga, 1 µl de SYBR Gold y 7 µl de agua destilada estéril en un gel de agarosa de 1.0% colocado en el tanque de electroforesis con TAE (Tris-acetato-EDTA). La electroforesis se realizó a 80 V durante 35 minutos y luego a 110 V durante 25 minutos.

Aquellas muestras que no se observaron degradadas en los geles y, que tuvieron una relación 260/280 mayor o igual a 1.7 y menor a 2.2, fueron utilizadas para los análisis de expresión génica (BancoADN, 2015).

6.2 Retrotranscripción y PCR de punto final

Seguido de la extracción de RNA total de los organismos adultos y los diferentes estadios de desarrollo de las larvas de la galleta de mar *Dendraster excentricus* se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) punto final. Las reacciones de retrotranscripción para formar DNA copia (cDNA) se llevó a cabo utilizando el kit SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el oligo (dT)₂₀ (Amersham, Piscataway, NJ), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de Retrotranscripción se llevaron a cabo en un volumen total de 20 µl, agregando 1 µg de RNA total a 50 mM de oligo (dT)₂₀, 10 mM de cada dNTP y agua destilada estéril para completar un volumen de 13 µl. Esta mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y se incubó a continuación en hielo durante 1 minuto. Posteriormente, se añadió First-Strand Buffer (5X), 0.1 M de DTT, 40 U del inhibidor de la RNasa y 200 U de la transcriptasa reversa SuperScript III y se homogenizó la mezcla. La reacción se incubó a 50°C por 60 minutos e inmediatamente después a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima (Tatiana Olivares-Bañuelos, 2014).

El DNA complementario (cDNA) generado se amplificó mediante PCR con oligonucleótidos para el gen GLAST, y se utilizó el gen ribosomal 18 (R18S) como control de expresión constitutivo de genes. La secuencia de los cebadores oligonucleótidos para el gen GLAST de equinodermos y R18S fue proporcionada por la Dra. Tatiana Olivares. En la Tabla I muestra las secuencias de estos iniciadores.

Tabla I. Especificaciones de los oligonucleótidos GLAST y R18S.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Tm (°C)	Contenido de G y C (%)
GLAST F	ATGACAATCACCGTCTCGCAA	21	67.8	47.6
GLAST R	GCCGAAGACGCAGAGAAA	19	67.8	57.8
R18S F	CGCTACACTGGCGGAATCA	19	67.3	57.8
R18S R	GTTTAGCGGATTACCCAGACCTT	23	65.1	47.8

La mezcla de reacción tuvo un volumen total de 10 µl, siguiendo el protocolo del fabricante, se colocó en un tubo para reacción de PCR 1 µl de Buffer de PCR (10X), 50 mM

de MgCl_2 , 10 mM de dNTP mix, 5 U de Taq DNA polimerasa, 10 μM de ambos iniciadores (sentido y antisentido), 1 μl de cDNA y agua destilada estéril. Tanto las reacciones de Retrotranscripción (RT) como las de PCR punto final se realizaron en un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA). Las condiciones de temperatura y tiempos para la amplificación de el gen GLAST se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Especificaciones de las condiciones de la PCR punto final de el gen GLAST, usando R18S como control de carga en cada corrida experimental.

Nombre	ciclos	Desnaturalización		Hibridación		Extensión	
		Tm ($^{\circ}\text{C}$)	tiempo (s)	Tm ($^{\circ}\text{C}$)	tiempo (s)	Tm ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)
GLAST/R18S	35	94	38	67	30	72	30

Se usaron controles negativos (sin cDNA) en cada corrida experimental para cada uno de los juegos de oligos a probar. Posteriormente se realizó una electroforesis de agarosa al 2.0% y buffer TAE (Tris-acetato-EDTA). Se cargaron los pozos con un volumen de carga de 12 μl con producto de la PCR. A cada tubo se añadió agua destilada estéril, 1 μl de SYBR Gold, 2 μl de buffer de carga y 1 μl de producto de la PCR. La electroforesis se realizó a 75 V por 45 minutos, se utilizó un transiluminador (Benchtop UV Transilluminatos, UVP, CA) para detectar las bandas sintetizadas (Tatiana Olivares-Bañuelos, 2014).

6.3 Cuantificación de la expresión del gen GLAST por PCR Tiempo Real (PCR-TR)

Con el RNA extraído de las galletas de mar se llevarán a cabo también la Retrotranscripción para los ensayos de PCR Tiempo Real (PCR-TR). Para esto se sintetizó cDNA mediante el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, CA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, en tubo se añadió 1 μg de RNA total al componente RT master mix (2X) que contiene: 10X RT Buffer, 100 mM dNTP Mix, RT iniciadores aleatorios (10X), y nucleasa libre de agua; se agregó un mix de enzimas 20X

integrado por los reactivos: 50 U transcriptasa reversa MultiScribe y agua destilada estéril, sin inhibidor de RNasa, para un volumen de 20 µl de reacción total. Las condiciones de optimización para la realización de la transcriptasa reversa fueron: 37°C durante 120 minutos para incubación y 85°C durante 5 minutos para inactivar la enzima. El cDNA se amplificó mediante PCR-TR en un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA) con iniciadores para el gen GLAST, utilizando Ribosomal 18 (R18S) como control de carga, las secuencias se encuentran descritas en la Tabla 1. Se realizaron las reacciones de PCR-TR utilizando el kit SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Warrington, UK) siguiendo el protocolo proporcionado por los fabricantes. La mezcla constó de 1 µg de cDNA, agua destilada estéril, 10X SYBR Green, 25 mM de MgCl₂, 12.5 mM de dNTP, 5 U TaqGold, 1 U Amperase UNG, y 10 µM de ambos iniciadores (sentido y antisentido). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR systems (Applied Biosystems, CA). Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla III. Se utilizó el programa StepOnePlus Software Real-time PCR Systems versión 2.3 para diseñar la distribución de las muestras en placas de 96 pocillos para realizar PCR-TR, se muestra un ejemplo en la Fig.1. En cada corrida experimental se emplearon controles negativos (sin cDNA y utilizando RNA total como templado). El control con RNA total como templado nos sirvió para demostrar que la amplificación de los oligonucleótidos proviene del cDNA y no del DNA genómico originado de las extracciones. De cada muestra se hicieron 3 pseudo réplicas y 3 réplicas independientes.

Tabla III. Condiciones de la PCR-TR de el gen GLAST, usando R18S como control de expresión constitutiva de genes en cada corrida experimental.

Nombre	ciclos	Desnaturalización		Hibridación		Extensión	
		Tm (°C)	tiempo (s)	Tm (°C)	tiempo (s)	Tm (°C)	Tiempo (s)
GLAST/R18S	40	95	15	67	60	95	15

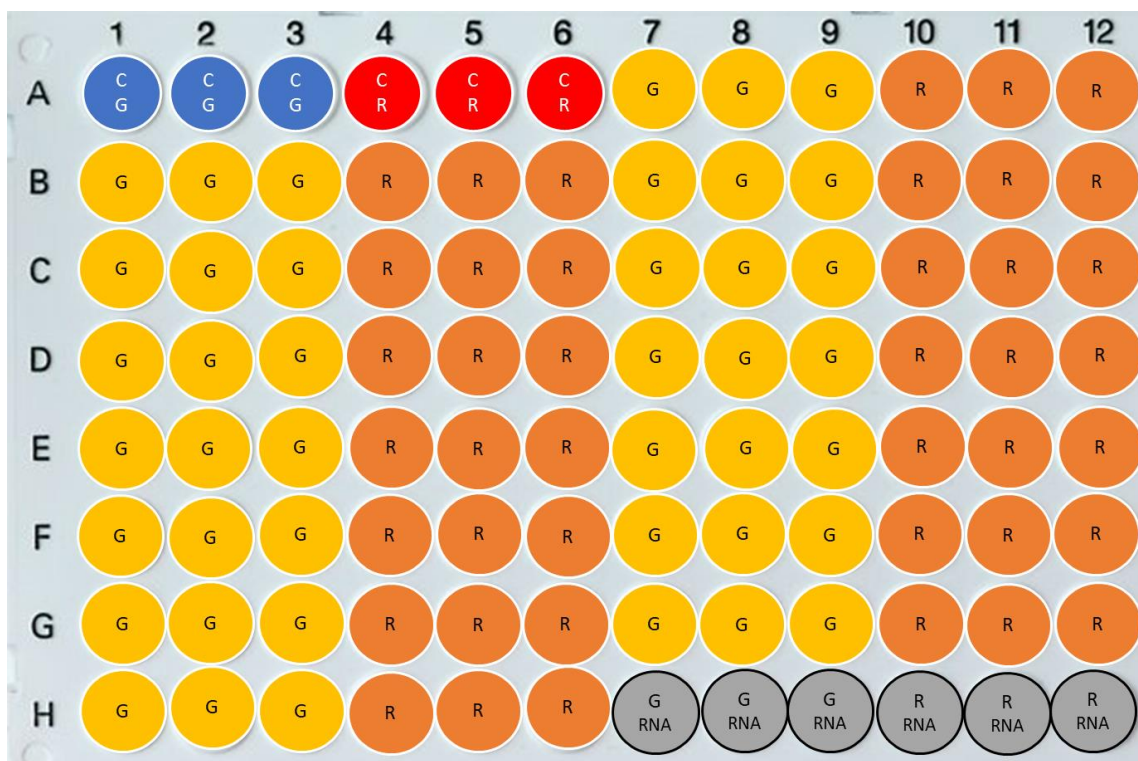


FIGURA 1. Esquema modelo de la distribución de las muestras en una placa de 96 pocillos para PCR-TR..

En la figura 1 se indica con círculo azul en donde se colocó el control negativo del oligonucleótido GLAST (sin cDNA), con círculo rojo el control negativo del R18S (sin cDNA), en amarillo las muestras de cDNA con GLAST, en naranja las muestras de cDNA con R18S y en gris el control negativo utilizando RNA total como templado.

6.4 Análisis estadísticos

Todos los datos obtenidos fueron analizados usando el programa PRISM GraphPad (San Diego, California, USA) para determinar el valor promedio y el error estándar de cada una de las muestras analizadas. Primeramente, se realizaron análisis de homocedasticidad y homogeneidad para decidir si se utilizaran análisis paramétricos o no paramétricos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Análisis del RNA total en etapa adulta y larvales de la galleta de mar *Dendraster excentricus*.

La integridad de RNA total extraído de los diferentes estadios de desarrollo de las larvas de la galleta de mar *Dendraster excentricus* fueron analizadas cualitativa y cuantitativamente, con electroforesis de agarosa y espectrofotometría, respectivamente. Se seleccionaron muestras al azar de todas las etapas de las larvas de galleta de mar para observar su integridad mediante electroforesis de agarosa al 1.0%.

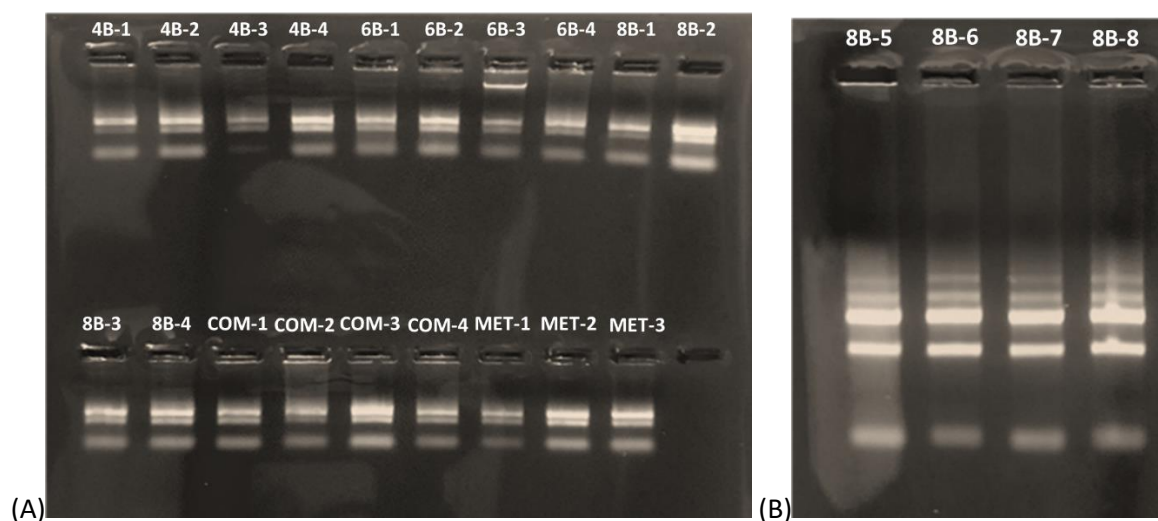


FIGURA 2. Imagen representativa de la electroforesis de RNA total de los diferentes estadios de desarrollo de las larvas de la galleta de mar *Dendraster excentricus* en gel de agarosa. (A) Pseudoréplicas de las larvas de 4-brazos, 6-brazos, 8-brazos, larvas competentes y larvas metamorfoseadas. (C) Pseudoreplicas de larvas de 8-brazos.

Como primer análisis, se encontró RNA total en condiciones óptimas en la mayoría de las muestras seleccionadas, mostrandose dos bandas intensas que corresponden a las subunidades mayor y menor del RNA ribosomal y una banda superior tenue que corresponde al RNA de transferencia. Sin embargo, cuando se muestra una banda indefinida, correspondiente a la subunidad mayor o RNA total retenido en los pocillos del

gel denota degradación parcial, como se pueden observar en la Fig.2 en las pseudoreplicas 6B-3, COM-2 y 8B-5.

Una vez verificada la integridad de las muestras seleccionadas, se analizaron cuantitativamente mediante espectrofotometría. Se observaron variaciones en las concentraciones de las pseudoreplicas de los diferentes estadios de desarrollo de las larvas de galleta de mar (Tabla IV).

Tabla IV. Resultados de la cuantificación de RNA total de los diferentes estadios de la galleta de mar *Dendroaster excentricus* mediante NanoDrop ND-100 (Biolab, Mulgrave, VIC, Australia).

Muestra	Concentración (ng/μl)	A260/A280	Muestra	Concentración (ng/μl)	A260/A280
A-1	582.8	2.12	8B-2	1946	1.99
A-2	316	2.09	8B-3	2203	2.02
A-3	409.2	1.95	8B-4	1776.8	2.07
A-4	455.2	2.22	8B-5	1430	1.97
A-5	747.6	2.17	8B-6	1287.6	2.01
A-6	821.6	2.29	8B-7	1650.8	1.99
4B-1	1254.8	1.96	8B-8	1168.4	2.05
4B-2	1103.2	1.87	COMP-1	810.8	2.03
4B-3	544.8	1.94	COMP-2	3911.6	1.81
4B-4	1086.8	1.99	COMP-3	3183	2.11
6B-1	2123.4	1.99	COMP-4	549.6	2.02
6B-2	1317	1.97	MET-1	741.8	1.8
6B-3	1724.2	1.89	MET-2	3022.6	1.92
6B-4	2211.6	1.86	MET-3	3402	1.89
8B-1	2221.6	1.95			

De las 29 muestras seleccionadas sólo 21 se tomaron para los ensayos posteriores. Estas muestras se seleccionaron de acuerdo con el criterio de la relación de absorbancias A260/A280 (RNA/DNA), por lo que las muestras óptimas se encuentran dentro del intervalo: $1.7 < A260/A280 < 2.2$. Posteriormente, se realizaron los cálculos para tomar 1 μg de muestra de RNA total para producir la transcriptasa reversa.

7.2 Estandarización de las condiciones de reacción para los ensayos de RT-PCR.

Se realizaron pruebas de estandarización de oligonucleótidos en PCR punto final para obtener una adecuada polimerización en el producto y, posteriormente, realizar PCR-TR de las muestras obtenidas.

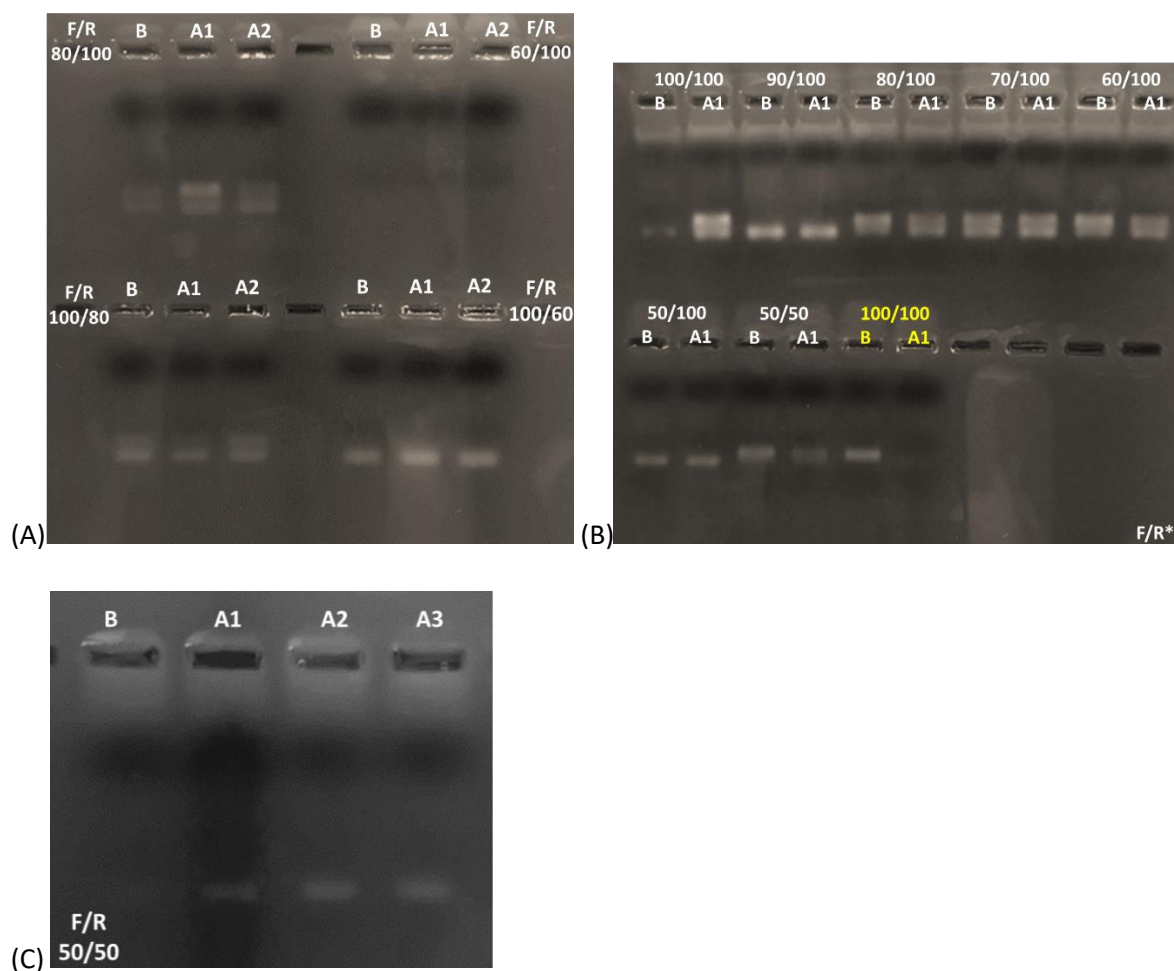


FIGURA 3. Electroforesis de PCR punto final en gel de agarosa al 2.0% Estandarización de la concentración del oligonucleótido GLAST en RT-PCR de punto final.

En la figura 3 se utilizaron cDNA de galleta de mar adulto *Dendraster excentricus* (A1, A2, A3) y un control negativo (sin cDNA) en cada corrida experimental. En la figura 3(A) se

muestra la estandarización de la concentración de GLAST forward y GLAST reverse a 60, 80 y 100%; en la figura 3(B) se muestra la estandarización de la concentración de GLAST forward y GLAST reverse a (50, 60, 70, 80, 90 y 100%), y R18S forward y reverse ambos al 50% (marcado en amarillo); y en la figura 3(C) se muestra la estandarización de la concentración de GLAST forward y reverse ambos al 50%.

En la estandarización de los oligonucleótidos en PCR punto final se realizaron pruebas con concentraciones combinadas entre forward y reverse de los oligonucleótidos GLAST y R18S. En el primer grupo superior izquierdo de la Fig. 3A, se colocó una concentración de 80% de GLAST forward (0.16 μ M), en el cual, se obtuvieron dos bandas en el blanco y las pseudo-réplicas de galleta adulto (A1 y A2). En el grupo superior derecho de la Fig. 3A, se agregó una concentración de 60% de GLAST forward (0.12 μ M), en esta prueba no se obtuvieron bandas en las muestras A1 y A2. Colocando una concentración de 100% de GLAST reverse (0.2 μ M). Por otro lado, se agregó el 100% de la concentración de GLAST forward en los grupos inferiores de la Fig.3A: en el grupo inferior izquierdo se colocó el 80% de GLAST reverse (0.16 μ M), observándose dos bandas en el blanco y en las pseudoreplicas de galleta de mar adulto A1 y A2, y en el grupo inferior derecho se colocó el 60% de la concentración de GLAST reverse obteniendo una banda en las muestras A1 y A2, pero también en el blanco.

Se realizaron diversas combinaciones en las concentraciones del oligonucleótido GLAST con solo una muestra de galleta adulto (A1) y un control negativo (B) (Fig.3B). Se colocó una concentración de 100% de GLAST reverse (0.2 μ M), variando la concentración de GLAST forward en 6 grupos (Fig.3B), en los cuales cinco de ellos se observaron dos bandas. Sin embargo, en las concentraciones de 50%/50% de GLAST forward y reverse (0.1%), se obtuvo una banda en la muestra y blanco. Se realizó otra prueba con la concentración de GLAST 50% forward y 50% reverse en las tres pseudo-réplicas de galleta de mar adulto (A1, A2 y A3) y un control negativo (sin cDNA).

A partir de este ensayo, se determinó que las concentraciones adecuadas para la PCR-TR es de 0.1 μ M, es decir, el 50% del oligonucleótido GLAST y, de igual manera, 0.1 μ M, el

50% del oligonucleótido R18S. Adecuando esas concentraciones en las reacciones de PCR punto final se obtienen una banda en las muestras seleccionadas y ninguna banda en los blancos (controles negativos) (Fig.3C).

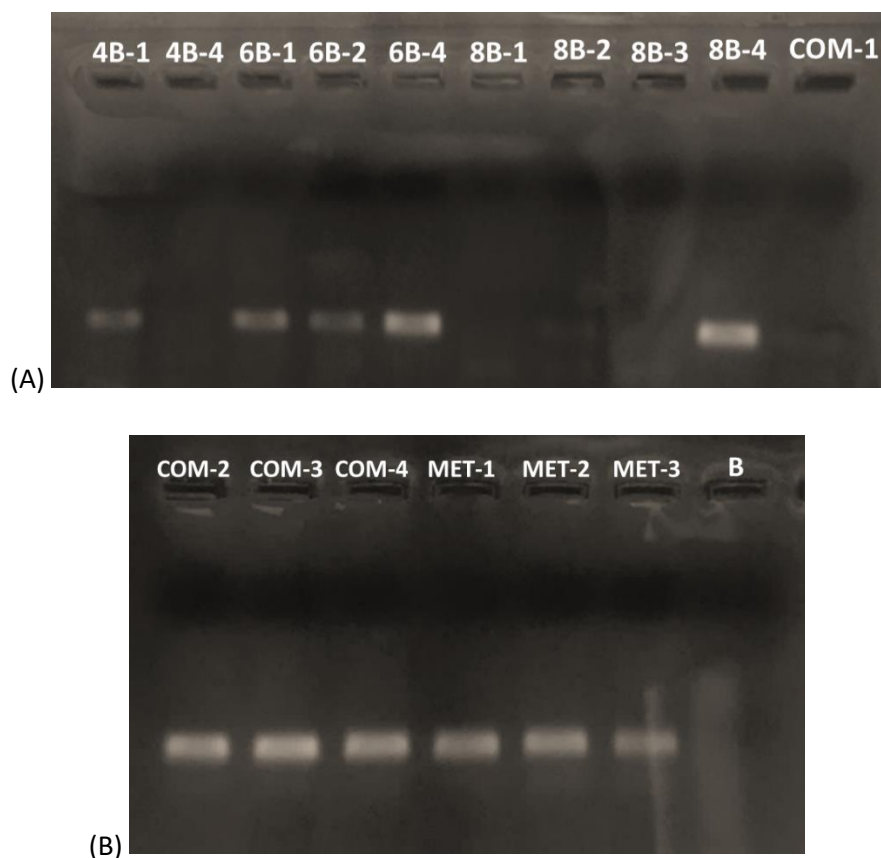


FIGURA 4. Imagen representativa de electroforesis de los productos de PCR punto final en gel de agarosa 2.0%. (A) muestras de 4-brazos, 6-brazos y 8-brazos. (B) muestras de larvas competentes y larvas metamorfoseadas.

Verificando el porcentaje de la concentración del oligonucleótido requerido de las reacciones de PCR punto final para llevarla a cabo en PCR-TR, en la Fig. 4 (A y B) muestra el análisis cualitativo en cada una de las muestras en las etapas larvales. De los resultados de PCR punto final se obtuvieron pseudo-réplicas que no se polimerizaron correctamente tales como la pseudo-réplica 4 de cuatro brazos, las pseudoreplicas 1, 2 y 3 de ocho brazos y la pseudo-réplica 1 de las larvas competentes.

En consideración con los resultados obtenidos de los ensayos de PCR punto final se demuestra, por una parte, la existencia de células gliales en el SNC en cada una de las etapas de desarrollo de la galleta de mar *Dendraster excentricus*.

Después de realizar pruebas con PCR punto final se continuo con los ensayos de PCR-TR, se utilizaron al menos tres pseudo-réplicas de cada estadio de desarrollo de la galleta de mar *Dendraster excentricus*, se utilizaron tres placas de 96 pocillos (Fig. 5) para distribuir de manera ordenada las pseudo-réplicas por triplicado con el oligonucleótido GLAST y su control de carga R18S, los controles negativos de GLAST y R18S (sin cDNA y con RNA total como templado).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-GLAST	C-GLAST	C-GLAST	C-R18S	C-R18S	C-R18S						
B	A1-G	A1-G	A1-G	A1-R	A1-R	A1-R	6B-1G	6B-1G	6B-1G	6B-1R	6B-1R	6B-1R
C	A2-G	A2-G	A2-G	A2-R	A2-R	A2-R	6B-2G	6B-2G	6B-2G	6B-2R	6B-2R	6B-2R
D	A3-G	A3-G	A3-G	A3-R	A3-R	A3-R	6B-4G	6B-4G	6B-4G	6B-4R	6B-4R	6B-4R
E	4B-1G	4B-1G	4B-1G	4B-1R	4B-1R	4B-1R						
F	4B-2G	4B-2G	4B-2G	4B-2R	4B-2R	4B-2R	GLAST-RNA	GLAST-RNA	GLAST-RNA	R18S-RNA	R18S-RNA	R18S-RNA
G	4B-3G	4B-3G	4B-3G	4B-3R	4B-3R	4B-3R						
H	4B-4G	4B-4G	4B-4G	4B-4R	4B-4R	4B-4R						

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-GLAST	C-GLAST	C-GLAST	C-R18S	C-R18S	C-R18S						
B	COM-1G	COM-1G	COM-1G	COM-1R	COM-1R	COM-1R	8B-1G	8B-1G	8B-1G	8B-1R	8B-1R	8B-1R
C	COM-2G	COM-2G	COM-2G	COM-2R	COM-2R	COM-2R	8B-2G	8B-2G	8B-2G	8B-2R	8B-2R	8B-2R
D	COM-3G	COM-3G	COM-3G	COM-3R	COM-3R	COM-3R	8B-3G	8B-3G	8B-3G	8B-3R	8B-3R	8B-3R
E	COM-4G	COM-4G	COM-4G	COM-4R	COM-4R	COM-4R	8B-4G	8B-4G	8B-4G	8B-4R	8B-4R	8B-4R
F	MET-1G	MET-1G	MET-1G	MET-1R	MET-1R	MET-1R	GLAST-RNA	GLAST-RNA	GLAST-RNA	R18S-RNA	R18S-RNA	R18S-RNA
G	MET-2G	MET-2G	MET-2G	MET-2R	MET-2R	MET-2R						
H	MET-3G	MET-3G	MET-3G	MET-3R	MET-3R	MET-3R						

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-GLAST	C-GLAST	C-GLAST	C-R18S	C-R18S	C-R18S	8B-8G	8B-8G	8B-8G	8B-8R	8B-8R	8B-8R
B	4B-1G	4B-1G	4B-1G	4B-1R	4B-1R	4B-1R	MET-3G	MET-3G	MET-3G	MET-3R	MET-3R	MET-3R
C	4B-4G	4B-4G	4B-4G	4B-4R	4B-4R	4B-4R	8B-1G	8B-1G	8B-1G	8B-1R	8B-1R	8B-1R
D	6B-1G	6B-1G	6B-1G	6B-1R	6B-1R	6B-1R	8B-2G	8B-2G	8B-2G	8B-2R	8B-2R	8B-2R
E	6B-2G	6B-2G	6B-2G	6B-2R	6B-2R	6B-2R	8B-3G	8B-3G	8B-3G	8B-3R	8B-3R	8B-3R
F	6B-4G	6B-4G	6B-4G	6B-4R	6B-4R	6B-4R	8B-5G	8B-5G	8B-5G	8B-5R	8B-5R	8B-5R
G	COM-4G	COM-4G	COM-4G	COM-4R	COM-4R	COM-4R	8B-6G	8B-6G	8B-6G	8B-6R	8B-6R	8B-6R
H	MET-1G	MET-1G	MET-1G	MET-1R	MET-1R	MET-1R	8B-7G	8B-7G	8B-7G	8B-7R	8B-7R	8B-7R

FIGURA 5. Distribución de las pseudo-réplicas por triplicado de los diferentes estadios de la galleta de mar *Dendraster excentricus* en placa de 96 pocillos para PCR-TR.

En la figura 5 se muestra el orden de las pseudo-réplicas para la PCR de tiempo real, colocando los controles negativos del oligonucleótido GLAST y de R18S en las celdas de color azul y rojo respectivamente, usando R18S como control de expresión constitutiva de genes representado en las celdas con "R" y utilizando un control negativo con RNA total como templado representado en las celdas como GLAST-RNA y R18S-RNA.

7.3 Análisis de la expresión génica de GLAST en larvas y adultos de la galleta de mar *Dendraster excentricus*.

Los resultados obtenidos pueden ser interpretados tomando como grupo control el valor de las larvas de galleta de mar de cuatro brazos como mínima expresión de GLAST, se compararon los datos obtenidos de cada etapa de desarrollo.

De manera interesante, en la figura 6 se observa una gran diferencia entre las etapas de desarrollo de las larvas y en las galletas de mar adulto, teniendo una mayor expresión relativa de GLAST en las muestras de galleta de mar adulto, seguidas de las metamorfoseadas y las larvas de seis brazos. Por otro lado, se obtiene una baja concentración de GLAST en larvas de 4-brazos, 8-brazos y una escasa concentración en la expresión de GLAST en larvas competentes.

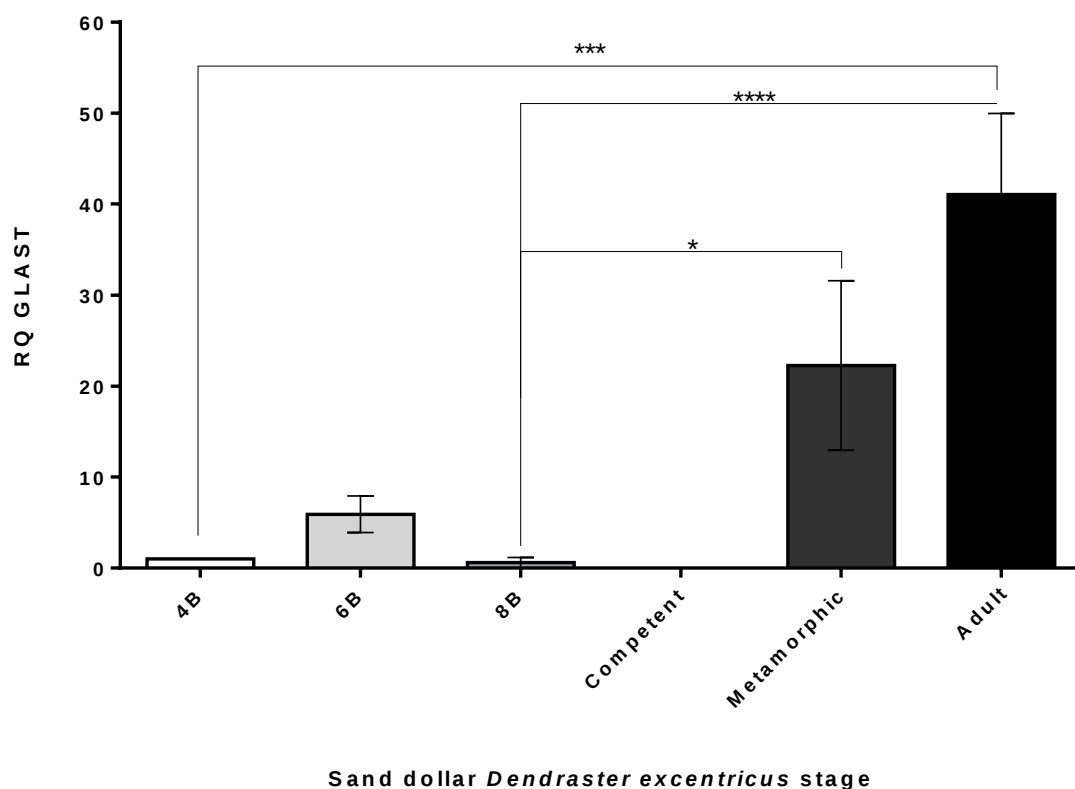


FIGURA 6. Gráfica de la expresión relativa de GLAST de las diferentes etapas de la galleta de mar *Dendraster excentricus*.

Se ha documentado que la expresión de los transportadores de glutamato está regulada por el desarrollo, en organismos vertebrados el transportador GLAST se ve expresado abundantemente en las primeras etapas de desarrollo (Furuta et al., 1997). Sin embargo, nuestros resultados indican que la máxima expresión de GLAST durante las distintas etapas de desarrollo del equinodermo *D. excentricus* se obtiene en su etapa adulta, es decir, que aumenta en la última etapa de su desarrollo.

8. CONCLUSIONES

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo determinar los niveles de expresión del transportador de glutamato GLAST en las células gliales de la galleta de mar *Dendraster excentricus*. En esta investigación demostramos mediante ensayos de PCR la presencia de células gliales en este equinodermo. Además, encontramos mayor expresión del gen GLAST en las células gliales de la galleta de mar adulta en comparación con las larvas de 4-brazos, 6-brazos, 8-brazos, larvas competentes y larvas metamorfoseadas. El estudio de organismos marinos representa una estrategia metodológica viable para identificar mecanismos en el SNC que se pueden utilizar como estudio para tratamientos contra enfermedades neurodegenerativas. El uso de la galleta de mar *Dendraster excentricus*, un equinodermo que se encuentra en las costas de Baja California, es uno de los ejemplos de organismos marinos invertebrados que puede ser útil y de gran relevancia en el área biomédica para el estudio de los transportadores de glutamato dentro del sistema nervioso central.

9. PERSPECTIVAS

- Purificar y secuenciar los fragmentos amplificados con los primers de GLAST, utilizando tejido de galleta de mar *Dendraster excentricus*. Esto servirá para corroborar la presencia de la secuencia identificada en otros organismos y la cual, aún no ha sido reportada en esta especie de galleta de mar.
- Buscar la expresión de GLT-1 en tejido de galleta de mar *Dendraster excentricus*. La identificación de este otro gen de otro transportador de glutamato servirá para la mejor caracterización de las células gliales en la galleta de mar.
- Hacer ensayos de Western Blot e Inmunofluorescencias para las proteínas GLAST y GLT-1 con el objetivo de verificar la expresión de la proteína y de identificar la localización de dichos transportadores de glutamato en el tejido de las galletas de mar *Dendraster excentricus*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Arimoto, A., & Tagawa, K. (2015). Hedgehog Expression During Development and Regeneration in the Hemichordate, *Ptychodera flava*. *Zoological Science*. <https://doi.org/10.2108/zs140157>
- Arimoto, A., & Tagawa, K. (2018). Regeneration in the enteropneust hemichordate, *Ptychodera flava*, and its evolutionary implications. In *Development Growth and Differentiation*. <https://doi.org/10.1111/dgd.12557>
- Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P., & Amara, S. G. (1994). Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-09-05559.1994>
- BancoADN. (2015). *BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III*. Programa Control de Calidad de Muestras.
- Birur, B., Kraguljac, N. V., Shelton, R. C., & Lahti, A. C. (2017). Brain structure, function, and neurochemistry in schizophrenia and bipolar disorder- A systematic review of the magnetic resonance neuroimaging literature. In *npj Schizophrenia*. <https://doi.org/10.1038/s41537-017-0013-9>
- Blankenship, J. E., & Houck, B. (2014). *Nervous system (invertebrate)*. McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.449210>
- Brand, A. H., & Livesey, F. J. (2011). Neural Stem Cell Biology in Vertebrates and Invertebrates: More Alike than Different? In *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.016>
- Brasnjo, G., & Otis, T. S. (2004). Isolation of glutamate transport-coupled charge flux and estimation of glutamate uptake at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308149101>
- Brusca, R. C., Moore, W., & Shuster, S. M. (2016). *Invertebrates* (Third Edit). Sinauer Associates Incorporated.
- Byrne, M., & Cisternas, P. (2002). Development and distribution of the peptidergic system in larval and adult *Patiriella*: Comparison of sea star bilateral and radial nervous systems. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.10315>
- Campana, W. M., Mantuano, E., Azmoon, P., Henry, K., Banki, M. A., Kim, J. H., Pizzo, D. P., & Gonias, S. L. (2017). Ionotropic glutamate receptors activate cell signaling in response to glutamate in Schwann cells. *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.201601121R>
- Campbell, K., & Götz, M. (2002). Radial glia: Multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences*, 25(5), 235–238.

[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02156-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02156-2)

- Cañestro, C., Bassham, S., & Postlethwait, J. (2005). Development of the central nervous system in the larvacean *Oikopleura dioica* and the evolution of the chordate brain. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.039>
- Chen, T., Tanaka, M., Wang, Y., Sha, S., Furuya, K., Chen, L., & Sokabe, M. (2017). Neurosteroid dehydroepiandrosterone enhances activity and trafficking of astrocytic GLT-1 via $\sigma 1$ receptor-mediated PKC activation in the hippocampal dentate gyrus of rats. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23175>
- Cobb, J. L. S. (1987). Neurobiology of the Echinodermata. In *Nervous Systems in Invertebrates*. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1955-9_17
- Coles, J. A. (2015). Glial Cells: Invertebrate. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.04613-4>
- Dakin, W. J. (1916). A new Species of Enteropneusta, *Ptychodera pelsarti*, from the Abrolhos Islands. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1916.tb00254.x>
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. In *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)
- Denes, A. S., Jékely, G., Steinmetz, P. R. H., Raible, F., Snyman, H., Prud'homme, B., Ferrier, D. E. K., Balavoine, G., & Arendt, D. (2007). Molecular Architecture of Annelid Nerve Cord Supports Common Origin of Nervous System Centralization in Bilateria. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.040>
- Diamond, J. S. (2001). Neuronal glutamate transporters limit activation of NMDA receptors by neurotransmitter spillover on CA1 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-21-08328.2001>
- Díaz-Balzac, C. A., García-Arrarás, J. E., Díaz-Balzac, C. A., & García-Arrarás, J. E. (2018). Echinoderm Nervous System. In *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.205>
- Durand, G. M., Kovalchuk, Y., & Konnerth, A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/381071a0>
- Eulenburg, V., & Gomeza, J. (2010). Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. In *Brain Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.01.003>
- Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., & Amara, S. G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/375599a0>
- Feng, D., Guo, B., Liu, G., Wang, B., Wang, W., Gao, G., Qin, H., & Wu, S. (2015). FGF2

- alleviates PTSD symptoms in rats by restoring GLAST function in astrocytes via the JAK/STAT pathway. *European Neuropsychopharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.04.020>
- Figiel, M., & Engele, J. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron- derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-10-03596.2000>
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain. In *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb09689.x>
- Furuta, A., Rothstein, J. D., & Martin, J. L. (1997). Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat cns development. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-21-08363.1997>
- García-Arrarás, J. E., Rojas-Soto, M., Jiménez, L. B., & Díaz-Miranda, L. (2001). The enteric nervous system of echinoderms: Unexpected complexity revealed by neurochemical analysis. *Journal of Experimental Biology*.
- Glowatzki, E., Cheng, N., Hiel, H., Yi, E., Tanaka, K., Ellis-Davies, G. C. R., Rothstein, J. D., & Bergles, D. E. (2006). The glutamate-aspartate transporter GLAST mediates glutamate uptake at inner hair cell afferent synapses in the mammalian cochlea. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1545-06.2006>
- Headley, P. M., & Grillner, S. (1990). Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. In *Trends in Pharmacological Sciences*.
[https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90116-P](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90116-P)
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., & Larson, A. (2001). Hickman, Roberts, Larson - Integrated Principles of Zoology. *Mc Graw Hill*. <https://doi.org/10.1039/b818618a>
- Huang, Y. H., Sinha, S. R., Tanaka, K., Rothstein, J. D., & Bergles, D. E. (2004). Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5217-03.2004>
- Humphreys, T., Sasaki, A., Uenishi, G., Tapparra, K., Arimoto, A., & Tagawa, K. (2010). Regeneration in the Hemichordate *Ptychodera flava* . *Zoological Science*.
<https://doi.org/10.2108/zsj.27.91>
- Johnson, J., Pajarillo, E. A. B., Taka, E., Reams, R., Son, D. S., Aschner, M., & Lee, E. (2018). Valproate and sodium butyrate attenuate manganese-decreased locomotor activity and astrocytic glutamate transporters expression in mice. *NeuroToxicology*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.007>
- Kanai, Y., & Hediger, M. A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/360467a0>
- Kanai, Y., Smith, C. P., & Hediger, M. A. (1993). A new family of neurotransmitter

- transporters: the high-affinity glutamate transporters. *The FASEB Journal*.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.7.15.7903261>
- Karki, P., Webb, A., Zerguine, A., Choi, J., Son, D. S., & Lee, E. (2014). Mechanism of raloxifene-induced upregulation of glutamate transporters in rat primary astrocytes. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.22679>
- Knight-Jones, E. W. (1951). On the nervous system of *Saccoglossus cambrensis*. *Society*.
- Komuro, H., & Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.8096653>
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annual Review of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
- Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., & Brand, M. (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development*, 138(22), 4831–4841.
- Lee, E. S. Y., Sidoryk, M., Jiang, H., Yin, Z., & Aschner, M. (2009). Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06105.x>
- Lehre, K. P., & Danbolt, N. C. (1998). The number of glutamate transport subtype molecules at glutamatergic synapses: Chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-21-08751.1998>
- Lehre, K. P., Davanger, S., & Danbolt, N. C. (1997). Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Research*.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01022-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01022-0)
- Leise, E. M. (1990). Modular construction of nervous systems: A basic principle of design for invertebrates and vertebrates. In *Brain Research Reviews*.
[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(90\)90009-D](https://doi.org/10.1016/0165-0173(90)90009-D)
- Levy, L. M., Warr, O., & Attwell, D. (1998). Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09620.1998>
- López-Bayghen, E., & Ortega, A. (2011). Glial glutamate transporters: New actors in brain signaling. *IUBMB Life*, 63(10), 816–823. <https://doi.org/10.1002/iub.536>
- Lowe, C. J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C. E., Gerhart, J., & Kirschner, M. (2003). Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00469-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00469-0)

- Luttrell, S. M., Gotting, K., Ross, E., Alvarado, A. S., & Swalla, B. J. (2016). Head regeneration in hemichordates is not a strict recapitulation of development. *Developmental Dynamics*. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24457>
- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2004). Glutamate transporters: Animal models to neurologic disease. In *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.007>
- Martínez-Gómez, A. (2014). Comunicación entre células gliales y neuronas I. Astrocitos, células de Schwann que no forman mielina y células de Schwann perisinápticas. *Medicina e Investigación*. [https://doi.org/10.1016/s2214-3106\(15\)30002-9](https://doi.org/10.1016/s2214-3106(15)30002-9)
- Mashanov, V. S., & Zueva, O. (2018). Radial Glia in Echinoderms. *Developmental Neurobiology*, dneu.22659. <https://doi.org/10.1002/dneu.22659>
- Mashanov, V. S., Zueva, O. R., & Garcia-Arraras, J. E. (2010). Organization of glial cells in the adult sea cucumber central nervous system. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.21031>
- Mashanov, V. S., Zueva, O. R., & García-Arrarás, J. E. (2013). Radial glial cells play a key role in echinoderm neural regeneration. *BMC Biology*. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-49>
- Mashanov, V. S., Zueva, O. R., & García-Arrarás, J. E. (2015). Expression of pluripotency factors in echinoderm regeneration. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2040-4>
- Mashanov, V. S., Zueva, O. R., Heinzeller, T., Aschauer, B., & Dolmatov, I. Y. (2007). Developmental origin of the adult nervous system in a holothurian: An attempt to unravel the enigma of neurogenesis in echinoderms. *Evolution and Development*. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2007.00157.x>
- Mashanov, V. S., Zueva, O. R., Heinzeller, T., Aschauer, B., Naumann, W. W., Grondona, J. M., Cifuentes, M., & Garcia-Arraras, J. E. (2009). The central nervous system of sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) shows positive immunostaining for a chordate glial secretion. *Frontiers in Zoology*. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-11>
- Michel, S., Itri, J., Han, J. H., Gnietczynski, K., & Colwell, C. S. (2006). Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *BMC Neuroscience*. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-15>
- Miyamoto, N., & Wada, H. (2015). Hemichordates: Development. In *eLS*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0004110.pub2>
- Murphy-Royal, C., Dupuis, J. P., Varela, J. A., Panatier, A., Pinson, B., Baufreton, J., Groc, L., & Oliet, S. H. R. (2015). Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.3901>

- Northcutt, R. G., Noback, C. R., & Kallen, B. (2018). *Nervous system (vertebrate)*. McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.449300>
- Odintsova, N. A., Dolmatov, I. Y., & Mashanov, V. S. (2005). Regenerating holothurian tissues as a source of cells for long-term cell cultures. *Marine Biology*, 146(5), 915–921. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1495-3>
- Olivares-Bañuelos, T., Figueroa-Flores, S., & Carpizo-Ituarte, E. (2012). Gonad index and larval development of the sand dollar *Dendraster excentricus* (Echinodermata; Echinoidea) in Baja California, Mexico | Índice gonadal y desarrollo larvario de la galleta de mar *Dendraster excentricus* (Echinodermata; Echinoidea) en Baja Cali. *Ciencias Marinas*, 38(2). <https://doi.org/10.7773/cm.v38i2.1922>
- Olivares-Bañuelos, T. N., Chí-Castañeda, D., & Ortega, A. (2019). Glutamate transporters: Gene expression regulation and signaling properties. In *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.032>
- Olivares-Bañuelos, Tatiana. (2014). Effect of stress on the ecophysiological response of the sand dollar *Dendraster excentricus* from northwestern Mexico. *Ciencias Marinas*. <https://doi.org/10.7773/cm.v40i2.2360>
- Ortega, A., & Olivares-Bañuelos, T. N. (2020). Neurons and Glia Cells in Marine Invertebrates: An Update. In *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00121>
- Palmer, M. J., Taschenberger, H., Hull, C., Tremere, L., & Von Gersdorff, H. (2003). Synaptic activation of presynaptic glutamate transporter currents in nerve terminals. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-12-04831.2003>
- Pawlak, J., Brito, V., Küppers, E., & Beyer, C. (2005). Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Molecular Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.10.043>
- Pentreath, V. W., & Cobb, J. L. (1972). Neurobiology of echinodermata. In *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1972.tb00977.x>
- Pines, G., Danbolt, N. C., Bjørås, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., & Kanner, B. I. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/360464a0>
- Rabacchi, S., Bailly, Y., Delhay-Bouchaud, N., & Maraini, J. (1992). Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1352066>
- Raymond, M., Li, P., Mangin, J. M., Huntsman, M., & Gallo, V. (2011). Chronic perinatal hypoxia reduces glutamate-aspartate transporter function, astrocytes through the janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3179-11.2011>

- Rossi, D. J., & Slater, N. T. (1993). The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology*.
[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(93\)90018-X](https://doi.org/10.1016/0028-3908(93)90018-X)
- Rouach, N., & Giaume, C. (2001). Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets for neuroglial interaction. *Progress in Brain Research*.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(01\)32077-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(01)32077-0)
- Sild, M., & Ruthazer, E. S. (2011). Radial glia: Progenitor, pathway, and partner. In *Neuroscientist*. <https://doi.org/10.1177/1073858410385870>
- Song, M., Yu, S. P., Mohamad, O., Cao, W., Wei, Z. Z., Gu, X., Jiang, M. Q., & Wei, L. (2017). Optogenetic stimulation of glutamatergic neuronal activity in the striatum enhances neurogenesis in the subventricular zone of normal and stroke mice. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.11.005>
- Song, S., Luo, L., Sun, B., & Sun, D. (2020). Roles of glial ion transporters in brain diseases. *GLIA*, 68(3), 472–494. <https://doi.org/10.1002/glia.23699>
- Stanley, J. A., Burgess, A., Khatib, D., Ramaseshan, K., Arshad, M., Wu, H., & Diwadkar, V. A. (2017). Functional dynamics of hippocampal glutamate during associative learning assessed with in vivo 1H functional magnetic resonance spectroscopy. *NeuroImage*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.03.051>
- Stoffel, W., Muller, R., Binczek, E., & Hofmann, K. (1992). Moyse Apolipoprotein AI cDNA-Derived Primary Structure, Gene Organisation and Complete Nucleotide Sequence. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1992.373.1.187>
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., & Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10955>
- Takatsuru, Y., Iino, M., Tanaka, K., & Ozawa, S. (2007). Contribution of glutamate transporter GLT-1 to removal of synaptically released glutamate at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuroscience Letters*.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.04.062>
- Zerangue, N., & Kavanaugh, M. P. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/383634a0>
- Zhang, S. C. (2001). Defining glial cells during CNS development. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/35097593>