



**EVALUACIÓN DE LA VULNERABILIDAD DE POBLACIONES DE NEURONAS  
HIPOCAMPALES DE RATA AL PERÓXIDO DE HIDROGENO**

**FRANKLIN JAVIER LOZANO VARGAS**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
FARMACÉUTICAS  
QUÍMICA FARMACÉUTICA  
CALI  
2017**

**EVALUACIÓN DE LA VULNERABILIDAD DE POBLACIONES DE NEURONAS  
HIPOCAMPALES DE RATA AL PERÓXIDO DE HIDROGENO**

**FRANKLIN JAVIER LOZANO VARGAS**

**Proyecto de grado para optar por el título de Químico Farmacéutico**

**Tutor: Álvaro Barrera Ocampo, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
FARMACÉUTICAS  
CALI  
2017**



**APROBADO POR:**

---

Cristian Javier Yarce Castellanos  
Evaluador.

---

Álvaro Andrés Barrera Ocampo  
Tutor del Proyecto.

Santiago de Cali, 08 de Agosto de 2017.

## **Agradecimientos**

El proceso llevado a cabo durante estos dos últimos semestres no hubiera podido ser realizado únicamente por mí, por esta razón quiero agradecer inmensamente a todas las personas de que de una u otra manera hicieron posible terminar exitosamente mi proyecto de grado. En primer lugar, agradezco a la Universidad Icesi por su inconmensurable ayuda, porque sin el apoyo brindado desde el inicio de mi carrera, hoy no sería posible culminar esta actividad. Quiero agradecer al profesor Álvaro Barrera por su inigualable empeño y dedicación en todo el proceso investigación, ya que sus conocimientos y experiencia representaron una guía indispensable para mí. A aquellas personas quienes participaron y me colaboraron durante todo el periodo de investigación, en el desarrollo y escuchándome todas las veces que necesite practicar sin importar lo persistente que me volviera; aquellas que con su apoyo, guía y colaboración hicieron que culminar este proyecto se convirtiera en una experiencia muy enriquecedora. Por último y no menos importante, a mi familia quiero agradecerles inmensamente por todas las palabras de aliento, por el apoyo, por siempre estar preocupados por el avance de esta investigación y por el sentimiento de orgullo que expresan cada vez que escuchan sobre este trabajo. Gracias porque este no es un logro de una sola persona, sino de todos los que con su participación y presencia aportaron su granito de arena.

## CONTENIDO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUCCION.....   | 11 |
| 2     | DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....   | 13 |
| 2.1   | Planteamiento y justificación del problema de investigación .....   | 13 |
| 2.2   | Marco teórico y estado del arte.....  | 15 |
| 2.2.1 | La enfermedad de Alzheimer .....  | 15 |
| 2.2.2 | Etiología de la EA.....   | 16 |
| 2.2.3 | Mecanismo de estrés oxidativo en la EA.....   | 17 |
| 2.2.4 | El hipocampo .....  | 18 |
| 2.2.5 | Yoduro de Propidio.....   | 19 |
| 2.2.6 | Microscopía de Epifluorescencia.....  | 19 |
| 2.3   | Objetivos.....  | 21 |
| 2.3.1 | Objetivo General .....  | 21 |
| 2.3.2 | Objetivos Específicos .....   | 21 |
| 2.4   | Metodología .....   | 22 |
| 2.4.1 | Medios e insertos .....   | 22 |
| 2.4.2 | Cortes de cultivos organotípicos de hipocampo.....  | 22 |
| 2.4.3 | Tinción con Yoduro de Propidio (PI).....  | 23 |
| 2.4.4 | Ensayo de toxicidad .....   | 24 |
| 2.4.5 | Cuantificación de la muerte neuronal en el hipocampo y análisis estadístico.....                              | 24 |
| 2.4.6 | Matriz de marco lógico .....  | 26 |
| 2.5   | Resultados.....   | 28 |
| 2.5.1 | Evaluación de la toxicidad del peróxido de hidrogeno en el hipocampo (Tiempo de exposición: 60 minutos).....  | 28 |
| 2.5.2 | Evaluación de la toxicidad del peróxido de hidrogeno en el hipocampo (Tiempo de exposición: 120 minutos)..... | 32 |
| 2.6   | Discusión .....   | 36 |
| 2.7   | Conclusiones .....  | 40 |
| 2.8   | Recomendaciones .....   | 41 |
| 2.9   | Referencias.....  | 42 |
| 3     | ANEXOS.....   | 45 |

## Lista de Tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Factores involucrados en la fisiopatogenia de la enfermedad del Alzheimer (García et al., 2009). .....    | 16 |
| <b>Tabla 2.</b> MML.....  | 26 |
| <b>Tabla 3.</b> Resultado de análisis estadístico para ensayo de toxicidad con tiempo de exposición de 60 minutos. ....   | 30 |
| <b>Tabla 4.</b> Resultados de análisis estadístico para ensayo de toxicidad con tiempo de exposición de 120 minutos. .... | 34 |

## Lista de figuras

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1. Fases de EA y trayectoria cognitiva.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>Figura 2. La señalización por ROS es esencial para la homeostasis y la adaptación al estrés. ....</b>   | <b>18</b> |
| <b>Figura 3. Funcionamiento del microscopio de epifluorescencia.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>Figura 4. Representación esquemática del tratamiento con Peróxido de Hidrógeno (ensayo de toxicidad). ....</b>  | <b>24</b> |
| <b>Figura 5. Imagen representativa de la plantilla para la medición de la intensidad de fluorescencia en OHSCs como modelo in vitro. ....</b>                | <b>25</b> |
| <b>Figura 6. Exposición a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno durante 60 minutos.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>Figura 7. Gráficas de comparación múltiple entre las intensidades de fluorescencia en los cortes de cultivos organotípicos hipocampales (HOSC). ....</b>  | <b>29</b> |
| <b>Figura 8. Exposición a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno durante 120 minutos.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>Figura 9. Gráficas de comparación múltiple entre las intensidades de fluorescencia en los cortes de cultivos organotípicos hipocampales (HOSC).. ....</b> | <b>33</b> |

## Lista de anexos

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Anexo 1. Análisis estadístico.....</b>                               | <b>45</b> |
| <b>Anexo 2. Carta de aprobación del proyecto de investigación. ....</b> | <b>51</b> |

## RESUMEN DEL TRABAJO

La Enfermedad del Alzheimer (EA) constituye uno de los principales problemas de salud, afectando a más de 35 millones de personas en el mundo. Una de las principales desventajas que tiene esto son los costos de cuidado y mantenimiento de personas con esta patología, además de la calidad de vida que tienen estas personas y su círculo social más cercano.

Los depósitos del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), los ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada, la disminución de sinapsis neuronales, la degradación granulovacuolar, la angiopatía amiloide y la atrofia son los resultados del progreso de la enfermedad, los cuales tienen hipotéticamente múltiples causas.

El estrés oxidativo es causado por un desbalance en el equilibrio homeostático entre la cantidad de especies reactivas de oxígeno que se producen y la cantidad que se eliminan por medio de los diferentes sistemas como el de los antioxidantes.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una de las especies reactivas de oxígeno que difunden libremente. La actividad oxidante de  $H_2O_2$  puede llegar a generar la pérdida de la función sináptica que se observa distintivamente en la EA, causada a través de modificaciones de proteínas, lípidos y ADN. En el presente estudio, el  $H_2O_2$  se utilizará para estimular las neuronas hipocampales primarias de ratas Wistar con 6 a 8 días de nacidas (P6 – P8) como un modelo celular de estrés oxidativo.

Con esta investigación se busca evaluar si existe una diferencia en la tasa de muerte celular de las diferentes subregiones del hipocampo, inducida por el peróxido de hidrógeno. Esto se llevará a cabo en cultivos organotípicos de hipocampos de ratas, utilizando diferentes concentraciones y tiempos de exposición al agente oxidante.

Determinar cuál es el área más susceptible del hipocampo como las características moleculares y genéticas de las neuronas que la conforman representa un gran avance para la búsqueda de futuras dianas terapéuticas hacia las cuales enfocar el desarrollo de un tratamiento efectivo, que sea capaz de retardar o detener totalmente el avance de la EA. Aquí radica la importancia de obtener una diferencia significativa en la muerte de neuronas por cada área. Se espera que esta sea mayor en el área CA1 donde, estudios anteriores basados en la actividad de neurotransmisores, se encontró la mayor toxicidad.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is one of the major health problems, affecting more than 35 million people worldwide. One of the main disadvantages of this is the costs of care and maintenance of people with this pathology, in addition to the quality of life that these people have and their social circle.

Deposits  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ), neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated Tau protein, decreased neuronal synapses, granulovacuolar degradation, amyloid angiopathy and atrophy are the results of progress of the disease, which have hypothetically multiple Causes.

Oxidative stress caused by an imbalance in the homeostatic balance between the amount of reactive oxygen species produced and the amount being removed by means of different systems such as antioxidants.

Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is one of the reactive oxygen species that diffuse freely. Oxidative activity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may lead to loss of synaptic function that is distinctly observed in AD, caused by modifications of proteins, lipids and DNA. In the present study, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is used to stimulate hippocampal neurons primary Sprague-Dawley rats with 6 to 8 days old (P6 - P8) as a cellular model of oxidative stress.

This research aims to evaluate whether there is a difference in cell death rate of the different subregions of the hippocampus, induced by hydrogen peroxide. This is carried out in organotypic cultures of hippocampal neurons of rats, using different concentrations and times of exposure to the oxidizing agent.

To determine which is the most susceptible area of the hippocampus as the molecular and genetic characteristics of the neurons that constitute it represents a great advance for the search of future therapeutic targets towards which to focus the development of an effective treatment, which is able to delay or completely stop the progression of AD. Herein lies the importance of obtaining a significant difference in neuron death per area. It is expected to be higher in the CA1 area where, in previous studies based on neurotransmitter activity, the highest rate of excitotoxicity was found.

## 1 INTRODUCCION

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por un deterioro de las funciones cognitivas y pérdida de memoria. EA es la causa más común de demencia. La edad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Hroudová, Singh, Fišar, & Ghosh, 2016). Esta enfermedad puede conducir a la muerte en un promedio de 6 años después de diagnosticada.

Existen varias teorías a las cuales se les atribuye la causa del inicio de la enfermedad, pero aún ninguna ha sido demostrada completamente. EA posee principalmente dos indicadores neuropatológicos: presencia de depósitos extracelulares del péptido  $\beta$ -amiloide  $A\beta$  (placas seniles) y agregados de la proteína tau hiperfosforilada (ovillos neurofibrilares) (Hroudová et al., 2016). Una de las hipótesis es la del estrés oxidativo, mecanismo que puede afectar directamente en la oxidación y disfunción de determinadas enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo energético (Tramutola, Lanzillotta, Perluigi, & Butterfield, 2016).  $A\beta$  es un potente productor de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y constituye uno de los principales iniciadores de este daño. Estas especies reactivas dañan determinadas dianas moleculares. Por ejemplo, la peroxidación de lípidos de membrana produce aldehídos tóxicos los cuales alteran a algunas enzimas mitocondriales. Por otro lado, el incremento de la permeabilidad del calcio, el desbalance de otros iones y el transporte alterado de glucosa perjudicando aún más el equilibrio energético (Querfurth & LaFerla, 2010).

De esta manera, la exposición crónica a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno genera un ambiente con un elevado nivel de estrés oxidativo y constituye una herramienta adecuada para realizar la investigación. En algunos estudios se han trabajado concentraciones que oscilan entre 0 y 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Liu & Zhao, 2014), sin embargo, al utilizar un rango de 200 a 800  $\mu\text{M}$  se espera alcanzar concentraciones más acercadas a un estado de estrés, con un mayor rango de diferencia entre concentraciones. Los tratamientos actuales son pocos y se basan en la administración de inhibidores de la colinesterasa (donezepil, rivastigmina, galantamina) y antagonistas de receptores NMDA (memantina) (Hroudová et al., 2016).

Una de las regiones del cerebro, que se ve más afectada en EA es la hipocampal-parahipocampal, que es la encargada de la codificación, consolidación y reparación de la memoria declarativa. Sin embargo, en la actualidad no se tiene claro por qué algunas poblaciones neuronales de estas áreas son más susceptibles al estrés oxidativo. Es por esta razón que se realiza un análisis de las subregiones del hipocampo, entre las cuales están el Giro Dentado (DG) y Cuerno de Amón 1 y 3 (CA1 y CA3). Los cultivos organotípicos de hipocampo de rata se expusieron a diferentes concentraciones peróxido de hidrógeno (200, 400 y 800  $\mu\text{M}$ ) y el daño

celular se marcó mediante la tinción con Yoduro de Propidio y se cuantificó a través del programa ImageJ.

## 2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 Planteamiento y justificación del problema de investigación

La EA constituye uno de los principales problemas de salud, afectando a más de 35 millones de personas en el mundo (Querfurth et al., 2010). La EA se caracteriza por el daño cognitivo, por la degradación neuronal progresiva y por la formación de placas que contienen A $\beta$  y ovillos neurofibrilares compuestos de tau hiperfosforilada. El proceso neurodegenerativo de la enfermedad está caracterizado inicialmente por el daño sináptico acompañado de pérdida neuronal. (Crews & Masliah, 2010). Se describe como un síndrome clínico, de evolución crónica que se caracteriza por el deterioro de las funciones cognitivas, sobre todo la memoria. El proceso por el cual se genera es casi siempre progresivo (García et al., 2009).

Al ser una enfermedad progresiva se desarrolla en etapas, cada una caracterizada por generar en la persona dificultades específicas que aumentan de severidad conforme esta progresa. En la etapa temprana o leve, la persona puede valerse por sí misma y realizar actividades como conducir, trabajar y hacer parte de actividades sociales. A pesar de esto, puede tener lapsos de memoria, olvidar algunas palabras o la localización de algunos objetos. En la etapa media o moderada, la persona ya requiere un nivel de cuidado alto debido a que confunde palabras, presenta cambios comportamentales importantes y actúa de forma inesperada. De este modo se le dificulta llevar a cabo actividades o tareas sin ayuda. Por último, en la etapa tardía o grave el paciente pierde la habilidad de responder al entorno, de llevar a cabo una conversación (aunque puede decir palabras o frases) y eventualmente la capacidad de controlar sus movimientos (Blass, 1984).

Con propósitos socioeconómicos, en la Universidad Icesi se realizó una investigación en la cual se determinó el Costo Monetario del tratamiento de la EA para Colombia basados en la etapa en cual se encuentre. El costo mínimo directo promedio por paciente/año por estado de severidad estimado es: \$1.5 millones (leve), \$4 millones (moderado) y \$8.5 millones (severo). El costo por paciente del tratamiento total para los 8 años, a precios constantes de 2013 sería de \$33.3 millones, sin incluir los costos del cuidador y de \$99 millones de pesos incluyéndolos. Para 2010, si todos los pacientes según prevalencia estimada hubieran recibido el tratamiento mínimo, el costo para la sociedad ascendería a \$2 billones de pesos en el escenario donde una mayor proporción de pacientes estaría en estado leve o a \$2.6 billones de pesos en el escenario donde la mayor proporción se encuentre en estado moderado (Prada, Takeuchi, & Ariza, 2014). El desarrollo de un tratamiento efectivo para esta enfermedad significaría no solo un ahorro millonario al sistema de salud global sino también la posibilidad de mejorar la calidad

de vida de las personas que actualmente padecen la enfermedad y evitar que sus cifras sigan en aumento.

Actualmente la EA no tiene cura. Se prevé que en las próximas décadas aumente el número de casos por lo que actualmente se continúa investigando acerca de esta enfermedad y por el desarrollo de tratamientos apropiados. Estos tratamientos están dirigidos a disminuir o detener por completo el progreso de la enfermedad y mantener la calidad de vida del paciente ya que con los actuales tratamientos esto no se ha podido lograr efectivamente (Albert, Martínez, Gutiérrez, Hakim & Pérez 2014).

Las causas de esta enfermedad aún no han sido totalmente descritas ya que posee una fisiopatología multifactorial. Por tal razón esta investigación se enfocará en proporcionar información sobre una de las hipótesis de la aparición de la enfermedad: El estrés oxidativo. Este es un proceso que aumenta en el cerebro con el envejecimiento, inducido por un desequilibrio en el estado redox, que implica la generación de un exceso de especies de oxígeno reactivo (ROS) o la disfunción del sistema antioxidante, produciendo lesiones en los tejidos neuronales (Huang, Zhang, & Chen, 2016). Mediante la exposición de cortes de cultivos organotípicos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se espera evaluar si alguna de las subregiones del hipocampo (DG, CA1 y CA3) es más vulnerable que otras a las ROS.

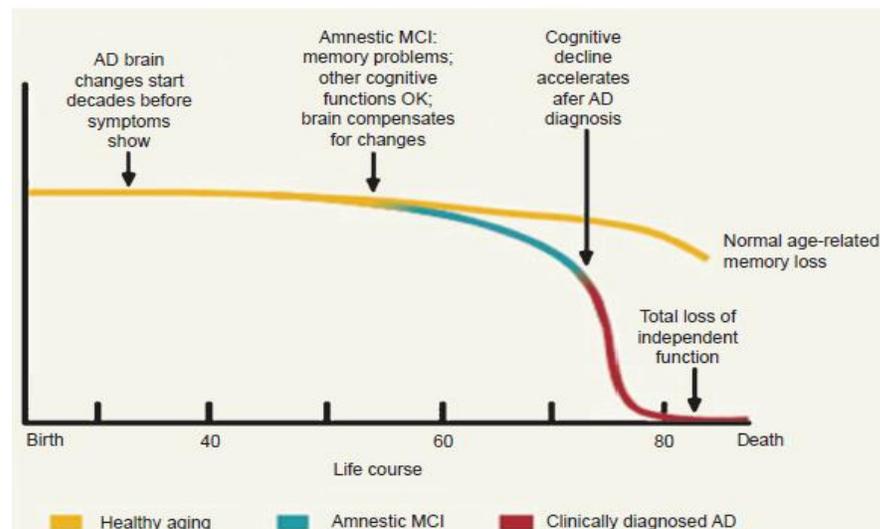
Al determinar una diferencia en la susceptibilidad entre estos grupos de neuronas al proceso de estrés oxidativo, se contribuiría para investigaciones posteriores se enfoquen en el desarrollo de un tratamiento mucho más efectivo que haga frente a los actuales y futuros problemas que radican en la EA.

## 2.2 Marco teórico y estado del arte

### 2.2.1 La enfermedad de Alzheimer

EA es la principal causa de demencia, un grupo de condiciones que gradualmente destruyen las células cerebrales y degradan de manera progresiva algunas funciones mentales importantes (Fallis, 2013). Algunas de las funciones que son afectadas en pacientes con la EA son la memoria, las habilidades de resolución de problemas y se presentan cambios en la personalidad que no solo afectan el desarrollo de una vida normal sino que a menudo tiene un pronóstico fatal (Bayeva, Gheorghide, & Ardehali, 2013).

Como ya se mencionó, esta enfermedad se desarrolla en tres etapas cada una de las cuales viene acompañada de cambios específicos en las funciones cognitivas. Con fines comparativos, en la siguiente figura se contrastan los niveles cognitivos normales frente a los que se presentan en pacientes con la EA.



**Figura 1. Fases de EA y trayectoria cognitiva**  
(Aggarwal, Shah, & Bennett, 2015)

La EA conlleva a la pérdida total del funcionamiento independiente de la persona, de manera que se hace imprescindible encontrar un tratamiento efectivo que detenga el progreso de la enfermedad y se eviten los costos de mantenimiento y tratamiento con los que corren los sistemas de salud a nivel mundial.

## 2.2.2 Etiología de la EA

Ésta patología presenta cambios tanto a nivel fisiopatológicos como morfológicos. Los primeros se subdividen a su vez en cambios estructurales, transformaciones funcionales y modificaciones genéticas. Los cambios estructurales comprenden la formación de ovillos neurofibrilares, placas neuríticas, entre otros; las transformaciones funcionales corresponden a la reducción en la producción o funcionamiento de sustancias neurotransmisoras; las modificaciones genéticas se deben a una serie de alteraciones en el programa genético neuronal que cambian la estructura y la neurotransmisión del cerebro; los depósitos de A $\beta$ , la disminución de la sinapsis neuronal, la degradación granulovacuolar, la angiopatía amiloide y la atrofia son algunos de los cambios histológicos o morfológicos más representativos de la EA (García et al., 2009).

Los mecanismos por los cuales los monómeros de A $\beta$ , oligómeros y otros metabolitos de las proteínas precursoras de A $\beta$  (APP, por sus siglas en inglés) llevan a un daño sináptico y neurodegeneración no están completamente claros. Un amplio número de posibilidades están bajo investigación, dentro de las cuales se encuentran la formación de estructuras porosas con actividad de canales, hiperexcitabilidad de los circuitos, disfunción mitocondrial, fallos lisosomales y alteraciones en las vías de señalización relacionadas con la plasticidad sináptica, muerte neuronal y neurogénesis (Crews et al., 2010).

Por otro lado, las funciones y procesos en los cuales están involucrados los péptidos A $\beta$  si están definidas. Entre estas se encuentran la activación de las enzimas quinasas, la regulación del transporte del colesterol, la mediación de la plasticidad sináptica, la actividad pro-inflamatoria y se cree que los depósitos de péptidos A $\beta$  mantienen la integridad de las membranas vasculares cerebrales. Interrupciones en esta última función pueden subyacer en una angiopatía amiloid cerebral (Aggarwal et al., 2015).

La EA es una patología multifactorial, por lo que involucra factores genéticos, bioquímicos y sinápticos los cuales son mostrados en la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Factores involucrados en la fisiopatogenia de la enfermedad del Alzheimer (García et al., 2009).

|                      |   |
|----------------------|---|
| Factores genéticos   | Mutaciones en APP 1 y 2, proteínas tau, ApoE E4 |
| Factores Bioquímicos | Inflamación                                     |
|                      | Radicales Libres                                |
|                      | Calcio y Sodio                                  |
|                      | Deficiencia de factores de crecimiento neural   |
|                      | Deficiencia estrogénica                         |

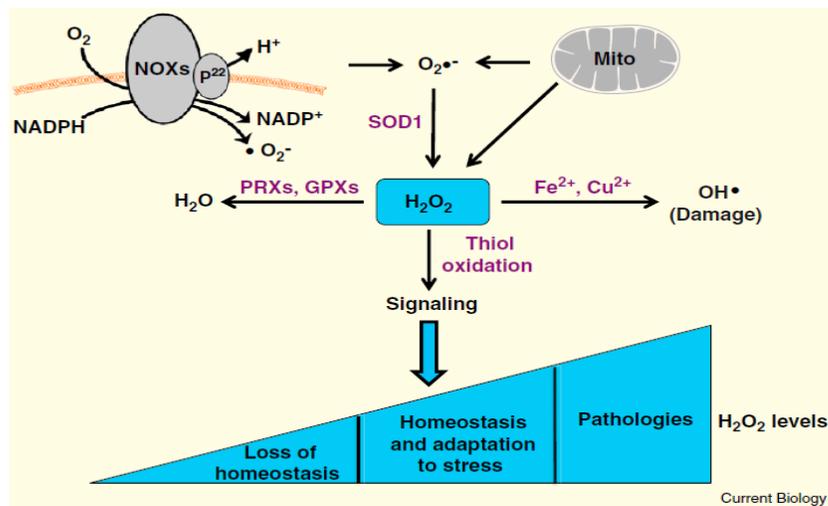
|                                     |               |
|-------------------------------------|---------------|
| Alteración de los Neurotransmisores | Acetilcolina  |
|                                     | Noradrenalina |
|                                     | Serotonina    |
|                                     | Dopamina      |
|                                     | GABA          |
|                                     | Glutamato     |

### 2.2.3 Mecanismo de estrés oxidativo en la EA

De esta manera, esta investigación se enfoca en el mecanismo por el cual los radicales libres, un factor bioquímico, conduce al desarrollo de la EA. Los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Son moléculas químicamente activas que contienen oxígeno en su estructura y son producidas en todos los tipos de células aeróbicas (Xu et al., 2012). Dentro de las ROS encontramos al radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), al peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y al radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), los cuales son principalmente producidos a nivel fisiológico por la mitocondria (Bayeva et al., 2013).

Bajo condiciones fisiológicas normales, estas ROS cumplen un papel importante en el organismo ya que se encargan de contribuir con los mecanismos de defensa del huésped, en la transcripción génica, en la regulación de la plasticidad sináptica y en la muerte celular programada (apoptosis). En concentraciones normales estas ROS no representan un riesgo y con ayuda de los sistemas antioxidantes del cuerpo se mantiene un estado de homeóstasis (Jiang, Sun, & Chen, 2016). Las ROS parecen estar involucradas en el desencadenamiento y mantenimiento del ciclo de degeneración de la EA, causando el daño del ADN mitocondrial y de la cadena de transporte de electrones, lo que conduce a una mayor producción de ROS (Barbagallo, Marotta, & Dominguez, 2015).

Un desequilibrio entre la producción de ROS y su eliminación por los diferentes sistemas conlleva al mecanismo de estrés oxidativo. Este es una secuencia de reacciones que se caracterizan por un incremento considerable en la cantidad de compuestos oxidados. Este mecanismo es importante debido a que está involucrado en el proceso de envejecimiento y puede causar daños directos a nivel del sistema nervioso central. No hay duda de que el estrés oxidativo está ampliamente implicado en el deterioro neurológico y en daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN en el sistema nervioso central (SNC) de pacientes que sufren de la EA (Jiang et al., 2016).



**Figura 2. La señalización por ROS es esencial para la homeostasis y la adaptación al estrés.**  
(Jiang et al., 2016)

El cerebro es particularmente susceptible al daño oxidativo debido a que tiene un alto requerimiento energético y, de esta manera, consume alrededor del 20% del oxígeno total corporal. Además, es muy rico en ácidos grasos poliinsaturados fácilmente oxidables y en metales de transición, como el hierro y el ascorbato, que juegan un papel clave en la oxidación y facilitan la formación de radicales libres de oxígeno (Barbagallo et al., 2015). El cerebro también se caracteriza por tener pocos sistemas antioxidantes, lo que lo hace un órgano muy propenso a este tipo de lesiones.

#### 2.2.4 El hipocampo

El hipocampo es una estructura del lóbulo temporal medial que participa de manera crítica en la memoria episódica y la navegación espacial (Strange, Witter, Lein, & Moser, 2014). La formación hipocampal es una estructura en forma de C que se encuentra en la parte caudal del cerebro. En esta se distinguen tres subregiones distintas: el giro dentado (DG), el hipocampo propiamente dicho (compuesto por CA3, CA2 y CA1) y el subículo. (van Strien, Cappaert, & Witter, 2009).

Claramente se ha establecido la existencia de atrofia en el hipocampo durante la EA. La zona hipocampal es una de las primeras regiones en el cerebro en donde aparecen los ovillos neurofibrilares tanto en sujetos enfermos como en personas que no padecen de la patología en el momento de la muerte. Esto indica que estas personas posiblemente estaban en el proceso de desarrollar la EA y que esta área es relevante para esta patología. (Greene & Killiany, 2012)

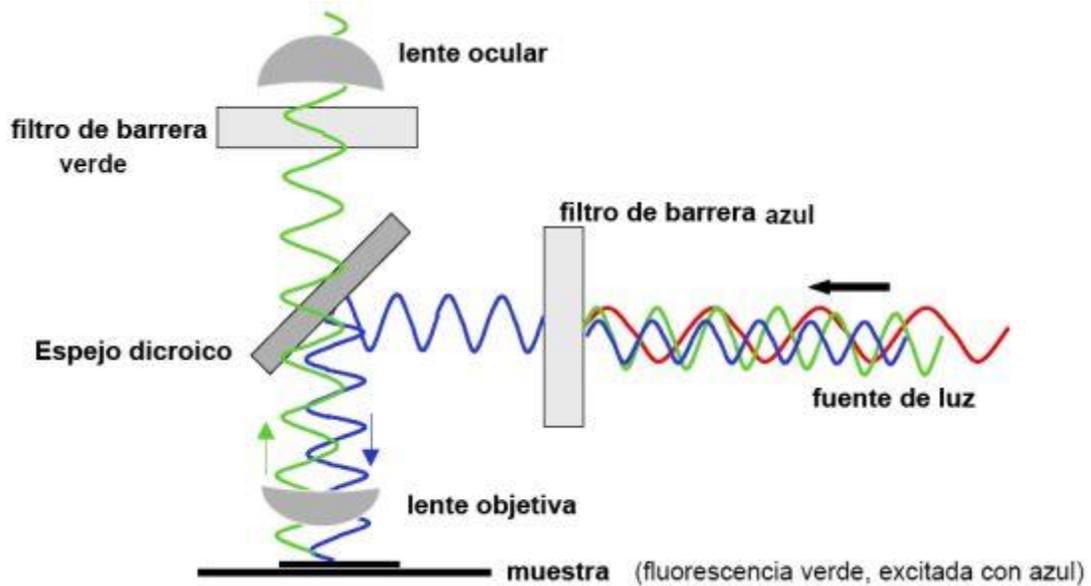
Como el estrés oxidativo tiene gran importancia a nivel cerebral, es importante analizar el efecto citotóxico que este tiene en las neuronas hipocampales. Como cada subregión del hipocampo tiene determinado tipo de células, todas no responderán de igual manera a los estímulos producidos por los agentes oxidantes a los que estén expuestos. De este modo, mediante la estimulación de cultivos de hipocampos de rata se evaluará la susceptibilidad de los diferentes tipos de neuronas del hipocampo a una especie reactiva de oxígeno en especial: el peróxido de hidrogeno.

### **2.2.5 Yoduro de Propidio**

El yoduro de propidio (PI), un agente intercalante catiónico y fluorescente comúnmente utilizado para teñir las células, se une a un estequiometricamente a 4 o 5 pares de bases de ADN con escasa o ninguna preferencia de secuencia. Además, PI también se une al ARN. Una vez que PI está unido a ADN o ARN, su fluorescencia se incrementa 20-30 veces y tal cambio de señal puede ser fácilmente detectado por microscopía de fluorescencia (535 nm a 617 nm). El mecanismo de muchos agentes intercalantes fue descrito en 1961 (LERMAN, 1961): En una solución isotónica, el intercalador catiónico es atraído electrostáticamente a la superficie del ADN polianiónico. El ligando se desliza al catión de sodio y / o magnesio presente en la "nube de condensación" de dichos cationes que rodea al ADN (para equilibrar parcialmente la suma de las cargas negativas transportadas por cada oxígeno de fosfato), formando así una asociación electrostática débil con la superficie externa de ADN. A partir de esta posición, el ligando difunde a lo largo de la superficie del ADN y puede deslizarse hacia el entorno hidrofóbico encontrado entre dos pares de bases que pueden "abrirse" transitoriamente para formar un sitio de intercalación, permitiendo que el agente se aleje del medio hidrófilo, rodeando el ADN y entrando en el sitio de intercalación. Los pares de bases forman transitoriamente dichas aberturas debido a la energía absorbida durante las colisiones con moléculas de disolvente.

### **2.2.6 Microscopía de Epifluorescencia**

El microscopio de epifluorescencia es un microscopio óptico. En un microscopio óptico convencional la luz atraviesa la muestra estudiada, mientras que en un microscopio de epifluorescencia la luz que incide sobre la muestra estudiada no la atraviesa, sino que el mismo lente ilumina y recibe la luz emitida por la muestra. Su funcionamiento se basa en la propiedad de fluorescencia que tienen ciertas moléculas denominadas fluorocromos.



**Figura 3. Funcionamiento del microscopio de epifluorescencia.**

La luz procedente de la fuente (lámpara de mercurio o xenón), atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo, antes de incidir sobre la muestra. Esta luz se refleja en un espejo dicromático (o dicroico) e incide sobre la muestra, excitando al fluorocromo, el que emite fotones de una longitud de onda mayor que la incidente. La luz emitida por la muestra no se refleja, sino que atraviesa el espejo dicroico y llega a un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. Finalmente, la luz ingresa a un fotomultiplicador que la convierte en una señal eléctrica (Republica, 2007).

## **2.3 Objetivos**

### **2.3.1 Objetivo General**

Evaluar la tasa de muerte celular diferencial en cultivos organotípicos de neuronas hipocampales de rata, inducida por la exposición a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno.

### **2.3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la concentración y el tiempo de exposición al peróxido de hidrógeno que inducen la mayor tasa de muerte de neuronas hipocampales de rata.
- Evaluar la diferencia en la selectividad del peróxido de hidrogeno para inducir la muerte neuronal en las sub-regiones del hipocampo.

## **2.4 Metodología**

### **2.4.1 Medios e insertos**

#### **2.4.1.1 Preparación del medio de disección (50 mL)**

- 48,5 mL de MEM 1X
- 1,25 mL de HEPES

Se guardan a 4°C hasta la disección.

#### **2.4.1.2 Preparación del medio de cultivo (50 mL)**

- 27,37 mL de MEM (Earle's + L-Glu) 1X
- 9 mL EBSS 1X
- 630 µL de D-glucosa
- 12,5 mL de suero de caballo
- 500 µL de penicilina/estreptomicina/anfotericina B

Antes de utilizar, el medio debe precalentarse en la incubadora.

#### **2.4.1.3 Preparación de insertos de membrana**

Adicionar 1 mL del medio de cultivo preparado a 4 de los pozos de un plato multiwell de 6 pozos. Luego adicionar un inserto de membrana de plato de cultivo a cada pozo preparado de manera que éste toque el medio sin quedar cubierto. Lleva el plato a la incubadora para aclimatarlo.

### **2.4.2 Cortes de cultivos organotípicos de hipocampo**

El diseño se basa en 3 cultivos organotípicos independientes (diferentes animales y días) con 3 repeticiones (secciones por pozo). Las ratas Wistar P6 – P8 fueron anestesiadas con isofluorano e introducir las en un baño de hielo para generar hipotermia. Bajo condiciones asépticas se extrajo el cerebro, depositándolo en el medio de disección (MD) frío. Con ayuda del estereoscopio y herramientas de disección se separaron los hemisferios, se retiraron las secciones de los ganglios basales y, por último, se aislaron los hipocampos de cada uno de los hemisferios. Uno a uno los hipocampos se colocaron en la placa de teflón del micrótopo sanitizado, donde se cortaron transversalmente obteniendo cortes con un grosor de 400 µm. Los cortes se transfirieron a MD frío, haciendo lavados con ayuda de una pipeta pasteur. Se seleccionaron, con ayuda del estereoscopio, los cortes que presenten mejor morfología, conservando perfectamente las subregiones CA1, CA3

y DG. Se transfirieron a un plato de 6 pozos las secciones seleccionadas, ubicando de a tres cortes por pozo (4 Pozos utilizados). Se incubaron empleando CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C por 1 día.

### **2.4.3 Tinción con Yoduro de Propidio (PI)**

Este método de tinción se basa en el principio de las células apoptóticas, las cuales se caracterizan por la fragmentación del ADN y en consecuencia, la pérdida de ADN nuclear. El PI se une al ADN por intercalación entre las bases con poca o ninguna preferencia secuencia. Dado que el PI no es permeante a las células vivas, también se utiliza comúnmente para detectar células muertas en una población.

#### **2.4.3.1 Preparación de la solución de Yoduro de Propidio**

Solución stock 1mM: Se pesó 6,7 mg de PI y con una micropipeta se adicionaron 10 mL de agua (de a 1mL a la vez), mezclando cuidadosamente en cada adición para evitar la formación de burbujas. Se tomaron 3,74 µL de la solución y se completaron a 1mL con medio fresco, para obtener una solución con la concentración deseada de PI (3.74 µM).

#### **2.4.3.2 Antes del ensayo de toxicidad**

El día anterior al ensayo de viabilidad neuronal de las secciones de hipocampo, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco que contenía PI a una concentración de 3,74 µM. Las secciones se incubaron durante 24h y después de este tiempo, se tomaron las fotografías de los niveles basales de fluorescencia empleando un microscopio de epifluorescencia y el software NIS Elements (Nikon). Las condiciones para la captura de las imágenes fueron preestablecidas, por tal razón, durante todos los experimentos éstas permanecieron constantes.

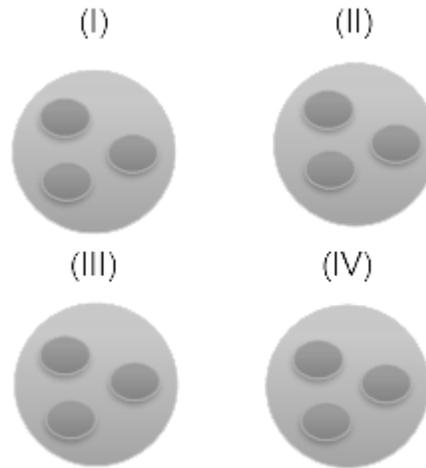
#### **2.4.3.3 Después del ensayo de toxicidad**

Después de medir la fluorescencia basal, las secciones de hipocampo fueron expuestas a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200, 400 y 800µM), junto con un blanco (vehículo) durante los tiempos 60 y 120 minutos.

Luego de finalizar el tratamiento, se reemplazó el medio por el que contenía PI y medio de cultivo, retirando cuidadosamente la solución anterior con ayuda de una micropipeta por las paredes del pozo y luego se incubó durante 24h. Terminado este periodo de tiempo se tomaron nuevamente las fotografías para determinar el nivel final de fluorescencia correspondiente a la etapa de muerte neuronal inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 2.4.4 Ensayo de toxicidad

Los grupos experimentales de secciones de hipocampo se exponen a: Vehículo (I), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM (II), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 µM (III) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800 µM (IV) (ver figura 4).



**Figura 4. Representación esquemática del tratamiento con Peróxido de Hidrógeno (ensayo de toxicidad).**

#### 2.4.5 Cuantificación de la muerte neuronal en el hipocampo y análisis estadístico

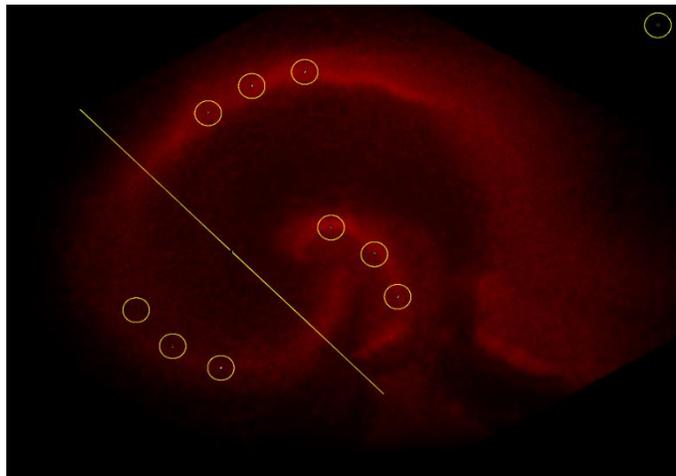
Para los días dos y tres se analizó y cuantificó la fluorescencia de PI en las subregiones CA1, CA3 y DG de cada sección de hipocampo. El día 2 es T<sub>0</sub> (cero horas), antes de agregar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para medir los niveles de muerte neuronal basal. El día 3 es T<sub>24</sub> (24 horas), después de agregar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las imágenes se toman a través de una cámara fotográfica acoplada al microscopio de fluorescencia.

Una vez obtenidas las imágenes, medió la intensidad de fluorescencia de cada subregión empleando el programa ImageJ, herramienta desarrollada por el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos diseñada especialmente para el análisis gráfico de imágenes en investigación. El análisis densitométrico (Figura 5) se debe realizar siguiendo el método para la cuantificación objetiva de muerte celular en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo (OHSCs, por sus siglas en inglés) expuestas a PI publicado anteriormente por otro grupo de investigación (Happ & Tasker, 2016).

Usando el programa ImageJ, se tomaron las imágenes y mediante una línea diagonal se separaron las subregiones de hipocampo. Se dibujaron tres círculos con

diámetro constante (100x100) y distancias equivalentes entre ellos en cada subregión, para obtener un total de nueve círculos. Además, se hizo un décimo círculo para substraer cualquier fluorescencia de fondo (background) presente en la imagen. A partir de esto, se creó una plantilla que es fácilmente adaptable a cada corte, aún si existen variaciones en el tamaño y la forma de las subregiones. Posteriormente se calculó la densidad integrada para cada círculo en cada corte de hipocampo (ver figura 5).

Después de determinar el valor de densidad integrada para cada círculo, se restó el valor del background a cada valor. Luego, se obtuvo el promedio de estas cantidades para cada subregión. Finalmente, se calculó la densidad integrada generada por el  $H_2O_2$  en cada subregión, mediante la siguiente fórmula:  $F_{24h} - F_{0h}$  ( $F_{24h}$ : Densidad de fluorescencia de la subregión después del tratamiento,  $F_{0h}$ : Densidad de fluorescencia de la subregión antes del tratamiento).



**Figura 5. Imagen representativa de la plantilla para la medición de la intensidad de fluorescencia en OHSCs como modelo in vitro.**

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos, se realizó a través de una prueba de normalidad (Shapiro – Wilk). Aquellos datos que tenían una distribución normal fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba post – hoc (Tukey), para comparar entre grupos (DG, CA3, CA1). Los datos no paramétricos fueron analizados mediante el Test de Friedman y una prueba de comparación múltiple de Dunn. Se asumió un valor  $p < 0,05$  para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados.

## 2.4.6 Matriz de marco lógico

Tabla 2. MML

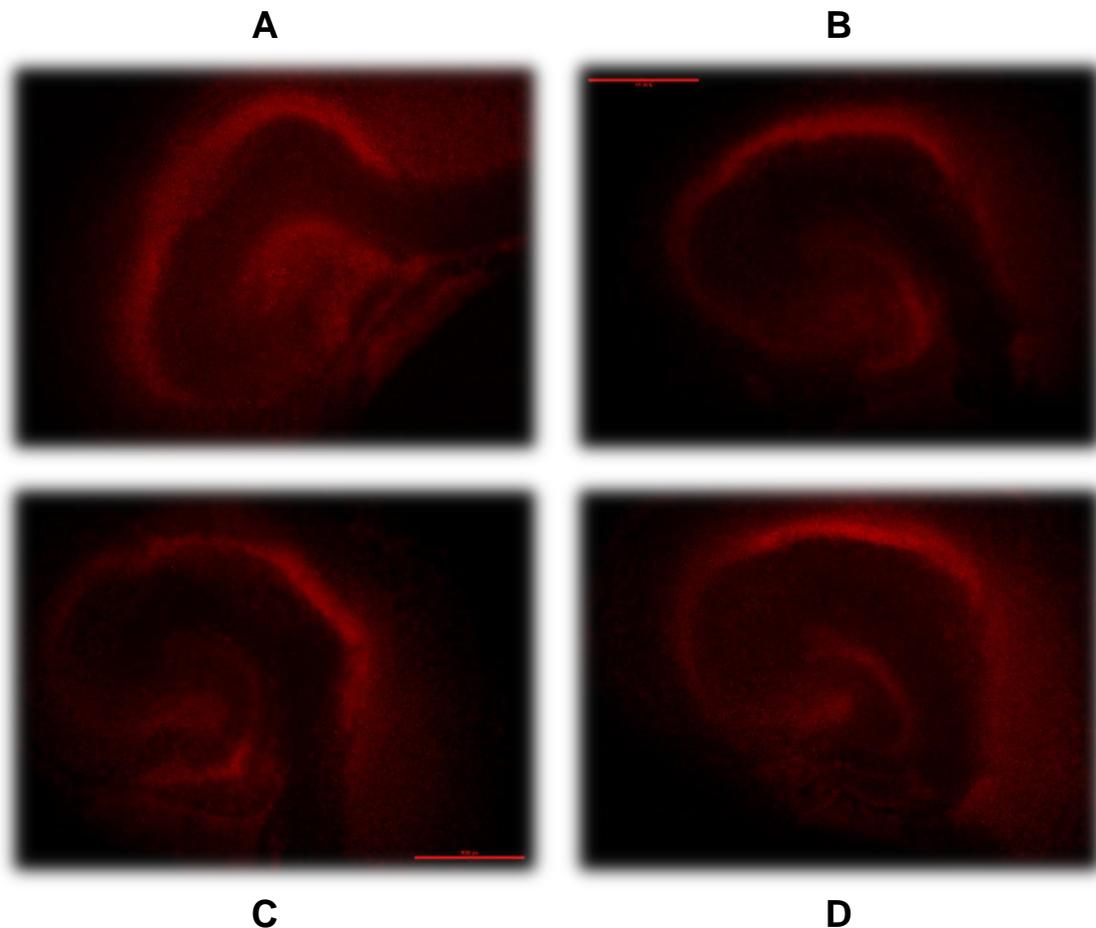
| OBJETIVOS   | ACTIVIDADES   | SUPUESTOS   | INDICADORES  |
|---|---|---|--|
| <p>Determinar la concentración y el tiempo de exposición al peróxido de hidrógeno que inducen la muerte de neuronas hipocampales de rata de rata.</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Preparar el medio de cultivo.</li> <li>- Obtener los cortes hipocampales a partir de Ratas P6-P8.</li> <li>- Incubar el cultivo en el medio adicionando Yoduro de Propidio y tomar fotografías del estado basal.</li> <li>- Incubar con Peróxido de Hidrógeno y tomar fotografías luego de la exposición.</li> <li>- Realizar replicas experimentales a diferentes concentraciones de Peróxido de hidrógeno y a diferentes tiempos de exposición.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ratas P6-P8 de 6-8 días de nacidas disponibles.</li> <li>- Reactivos para el medio de cultivo y experimentación disponibles y en buen estado.</li> <li>- Microscopio de fluorescencia disponible y funcionando correctamente.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Muerte celular inducida en el cultivo cuantificada.</li> <li>- Concentración de peróxido de hidrogeno letal determinada.</li> <li>- Tiempo de tratamiento necesario para producir la muerte determinado.</li> </ul> |

|  |   |   |   |
|--|---|---|---|
| <p>Evaluar la diferencia en la vulnerabilidad de las sub-regiones del hipocampo frente al peróxido de hidrogeno.</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cuantificar la muerte de neuronas en las diferentes áreas hipocampales a través de herramientas computacionales.</li> <li>- Establecer una diferencia en la vulnerabilidad de los diferentes grupos de neuronas, a la concentración y tiempo de exposición determinada a través análisis estadístico.</li> <li>- Comparar y graficar la diferencia en la intensidad de la fluorescencia entre las diferentes subregiones del hipocampo.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Computadores funcionando correctamente y con softwares adecuados para cuantificación.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Porcentaje de células muertas en el cultivo determinada.</li> <li>- Comparación de la cantidad de células muertas en cada sub-región del hipocampo realizada.</li> <li>- Gráficas comparativas realizadas</li> <li>- Categorización de la vulnerabilidad de las sub-regiones realizada.</li> </ul> |
|--|---|---|---|

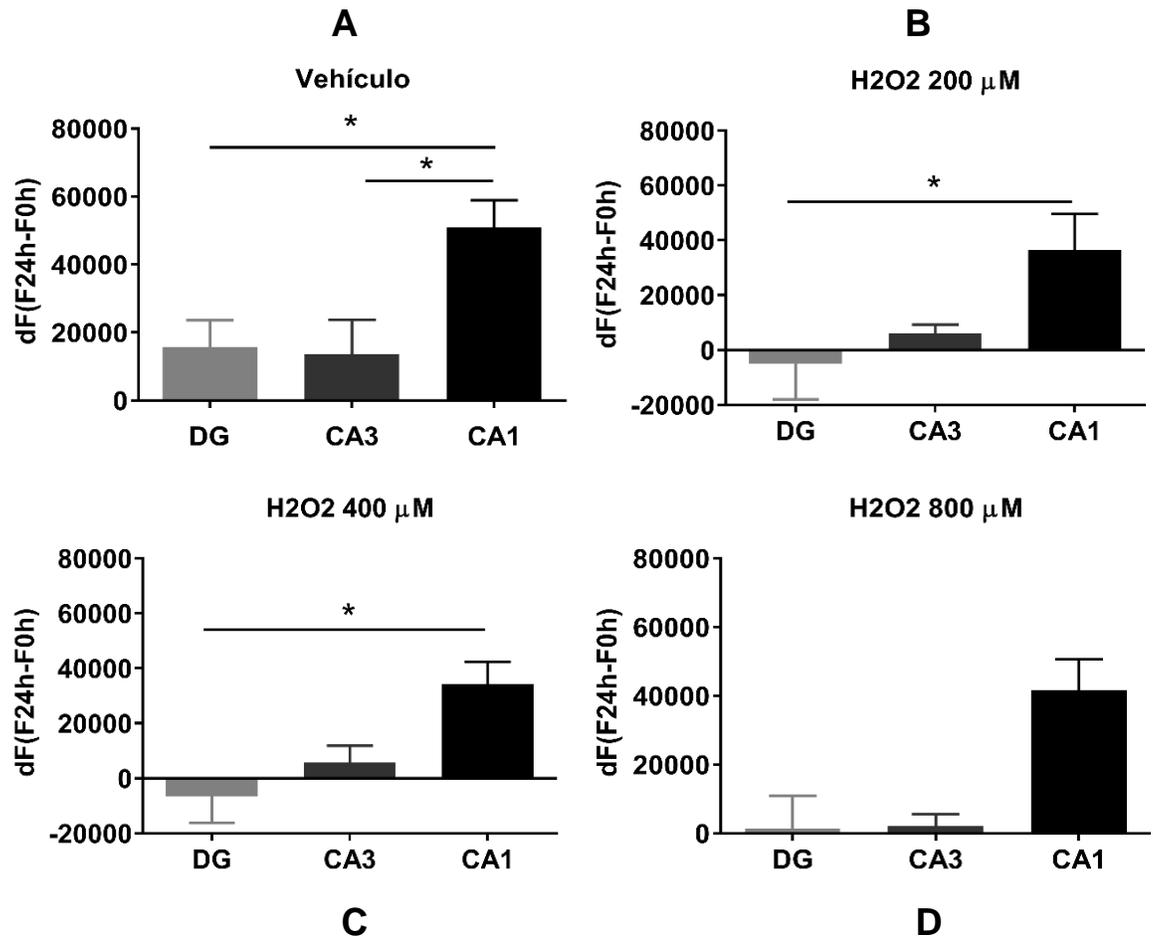
## 2.5 Resultados

Durante la experimentación se probaron dos modelos para determinar la variación en la muerte neuronal entre las diferentes áreas del hipocampo, basándonos en dos factores: la concentración y el tiempo de exposición al agente oxidante. En seguida se muestran los resultados obtenidos, donde se evaluaron concentraciones de 200, 400 y 800  $\mu\text{M}$  y tiempos de exposición de 60 y 120 minutos.

### 2.5.1 Evaluación de la toxicidad del peróxido de hidrogeno en el hipocampo (Tiempo de exposición: 60 minutos).



**Figura 6. Exposición a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno durante 60 minutos.** Fotografías tomadas a través de microscopía de fluorescencia en las cuales se muestra en el ensayo de toxicidad. El tratamiento realizado fue Vehículo (A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200  $\mu\text{M}$  (B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400  $\mu\text{M}$  (C) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800  $\mu\text{M}$  (D) por un tiempo de 60 minutos y posteriormente se cambió el medio a medio basal con Yoduro de Propidio (IP) por 24h.



**Figura 7. Gráficas de comparación múltiple entre las intensidades de fluorescencia en los cortes de cultivos organotípicos hipocampales (HOSC).** En las gráficas se muestra la comparación de la intensidad de la fluorescencia entre las diferentes subregiones del hipocampo (DG, CA3 y CA1) expuestas a Vehículo **(A)**, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200  $\mu$ M **(B)**, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400  $\mu$ M **(C)** y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800  $\mu$ M **(D)** por un tiempo de 60 minutos.

A continuación, se muestran las tablas con los resultados obtenidos luego de realizar el Análisis de Varianza (ANOVA) (o prueba de Friedman en su lugar) y la respectiva prueba de comparación múltiple (Tukey o Dunn respectivamente) para determinar cuáles son las diferencias más significativas.

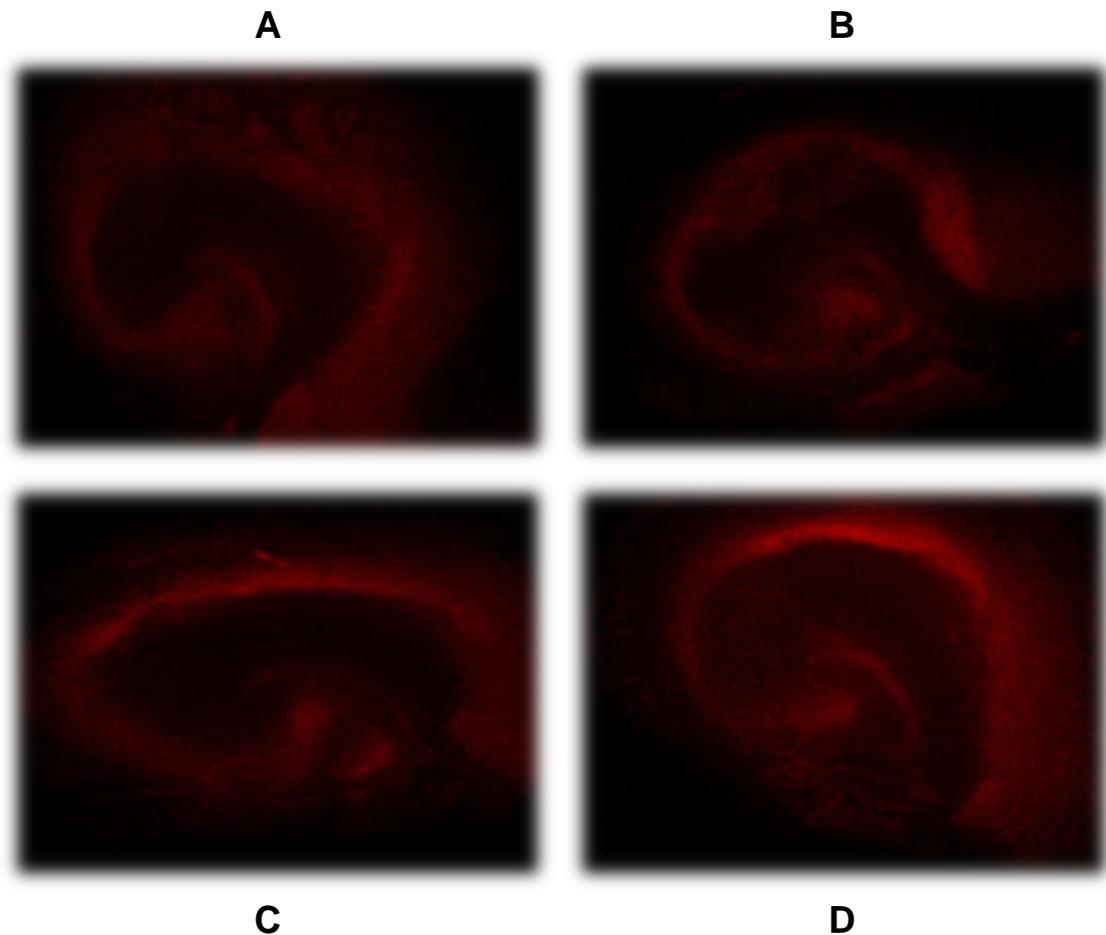
**Tabla 3.** Resultado de análisis estadístico para ensayo de toxicidad con tiempo de exposición de 60 minutos.

| <b>ANOVA / Prueba de Friedman (PF) para ensayo de toxicidad (60 minutos)</b> |                |   |  |
|--|----------------|---|--|
| <b>Tratamiento</b>   | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>Vehículo</b>  | 0,0081         | X   |  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM (PF)</b>                                | 0,0055         | X   |  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 µM (PF)</b>                                | 0,0017         | X   |  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800 µM (ANOVA)</b>                             | 0,0170         | X   |  |
| <b>Prueba de Dunn para VEHÍCULO</b>  |                |   |  |
| <b>Comparación</b>   | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>DG vs. CA3</b>  | >0.9999        |   | X  |
| <b>DG vs. CA1</b>  | 0,0281         | X   |  |
| <b>CA3 vs. CA1</b>   | 0,0281         | X   |  |
| <b>Prueba de Dunn para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM</b>                 |                |   |  |
| <b>Comparación</b>   | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>DG vs. CA3</b>  | >0.9999        |   | X  |
| <b>DG vs. CA1</b>  | 0,0117         | X   |  |
| <b>CA3 vs. CA1</b>   | 0,0628         |   | X  |
| <b>Prueba de Dunn para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 µM</b>                 |                |   |  |
| <b>Comparación</b>   | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>DG vs. CA3</b>  | 0,7446         |   | X  |
| <b>DG vs. CA1</b>  | 0,0045         | X   |  |
| <b>CA3 vs. CA1</b>   | 0,1299         |   | X  |
| <b>Prueba de Tukey para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800 µM</b>                |                |   |  |
| <b>Comparación</b>   | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>DG vs. CA3</b>  | 0,9965         |   | X  |
| <b>DG vs. CA1</b>  | 0,0779         |   | X  |
| <b>CA3 vs. CA1</b>   | 0,0574         |   | X  |

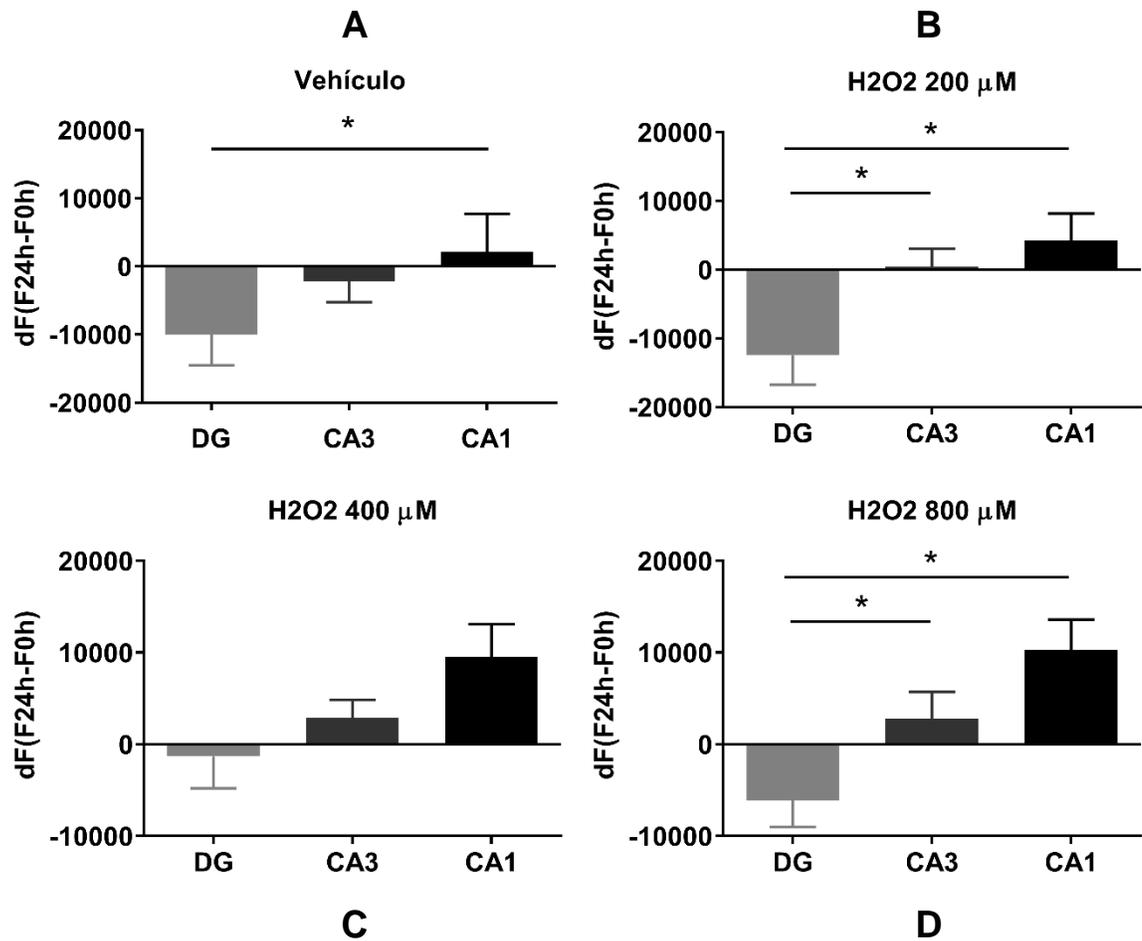
Se determinó estadísticamente la diferencia en la toxicidad del peróxido de hidrogeno, como agente oxidante, en las distintas subregiones del hipocampo (DG, CA3 y CA1). Para el primer ensayo de toxicidad realizado (Fig. 7, Tabla 3), con un tiempo de exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 60 minutos, se encontró que existía diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia para la mayoría de los tratamientos (Vehículo, 200 y 400 μM). A través de las pruebas de Dunn y Tukey se determinó que, en el Vehículo, las diferencias significativas se presentaron entre las áreas DG y CA1 ( $p = 0,0281$ ) y las áreas CA3 y CA1 ( $p = 0,0281$ ). Para 200 μM, la única diferencia significativa que se presentó se dio entre las áreas DG y CA1 ( $p = 0,0117$ ). Para 400 μM también se presentó una única diferencia significativa entre las áreas DG y CA1 ( $p = 0,0045$ ). Para 800 μM, no se presentó ninguna diferencia significativa y, aunque se evidenció que hay un mayor grado de muerte en la región CA1 comparada con CA3 y DG, estas diferencias no son estadísticamente significativas. De este modo el análisis concluye que se presentó muerte diferencial de neuronas entre las subregiones del hipocampo mencionadas para el Vehículo, 200 y 400 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no se dio para la concentración de 800 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Adicionalmente, se observó una tendencia dosis dependiente en la tasa de muerte celular, sobretodo en el área del hipocampo denominada como CA1. Para el área CA3 se mantuvo la tendencia dosis dependiente únicamente hasta alcanzar los 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A diferencia de la tendencia que se observó en estas dos áreas, para el DG se obtuvo una media de dF negativa, es decir que la medida de intensidad antes de la exposición al agente oxidante fue mayor que la que se obtuvo luego a la exposición a condiciones oxidativas.

**2.5.2 Evaluación de la toxicidad del peróxido de hidrogeno en el hipocampo (Tiempo de exposición: 120 minutos).**



**Figura 8. Exposición a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno durante 120 minutos.** Fotografías tomadas a través de microscopía de fluorescencia en las cuales se muestra en el ensayo de toxicidad. El tratamiento realizado fue Vehículo **(A)**, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM **(B)**, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 μM **(C)** y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800 μM **(D)** por un tiempo de 120 minutos y posteriormente se cambió el medio a medio basal con Yoduro de Propidio (IP) por 24h.



**Figura 9. Gráficas de comparación múltiple entre las intensidades de fluorescencia en los cortes de cultivos organotípicos hipocámpales (HOSC).** En las gráficas se muestra la comparación de la intensidad de la fluorescencia entre las diferentes subregiones del hipocampo (DG, CA3 y CA1) expuestas a Vehículo (A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200  $\mu$ M (B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400  $\mu$ M (C) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800  $\mu$ M (D) por un tiempo de 120 minutos.

A continuación, se muestran las tablas con los resultados obtenidos luego de realizar el Análisis de Varianza (ANOVA) y la respectiva prueba de comparación múltiple (Tukey) para determinar cuáles son las diferencias más significativas.

**Tabla 4.** Resultados de análisis estadístico para ensayo de toxicidad con tiempo de exposición de 120 minutos.

| <b>ANOVA para ensayo de toxicidad (120 minutos)</b>           |                |   |  |
|---|----------------|---|--|
| <b>Tratamiento</b>  | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>Vehículo</b>   | 0,0536         | X   |  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM</b>                      | 0,0021         | X   |  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 µM</b>                      | 0,0356         | X   |  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800 µM</b>                      | 0,0001         | X   |  |
| <b>Prueba de Tukey para VEHÍCULO</b>                          |                |   |  |
| <b>Comparación</b>  | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>DG vs. CA3</b>   | 0,1011         |   | X  |
| <b>DG vs. CA1</b>   | 0,0260         | X   |  |
| <b>CA3 vs. CA1</b>  | 0,7210         |   | X  |
| <b>Prueba de Tukey para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM</b> |                |   |  |
| <b>Comparación</b>  | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>DG vs. CA3</b>   | 0,0219         | X   |  |
| <b>DG vs. CA1</b>   | 0,0170         | X   |  |
| <b>CA3 vs. CA1</b>  | 0,4855         |   | X  |
| <b>Prueba de Tukey para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 µM</b> |                |   |  |
| <b>Comparación</b>  | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>DG vs. CA3</b>   | 0,2520         |   | X  |
| <b>DG vs. CA1</b>   | 0,0906         |   | X  |
| <b>CA3 vs. CA1</b>  | 0,1339         |   | X  |
| <b>Prueba de Tukey para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800 µM</b> |                |   |  |
| <b>Comparación</b>  | <b>Valor p</b> | <b>Existe diferencia significativa en la dF</b> | <b>No existe diferencia significativa en la dF</b> |
| <b>DG vs. CA3</b>   | 0,0077         | X   |  |
| <b>DG vs. CA1</b>   | 0,0015         | X   |  |
| <b>CA3 vs. CA1</b>  | 0,0572         |   | X  |

Se determinó estadísticamente la diferencia en la toxicidad del peróxido de hidrogeno, como agente oxidante, en las distintas subregiones del hipocampo (DG, CA3 y CA1). En este segundo ensayo de toxicidad realizado (Fig. 9, Tabla 4), con un tiempo de exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 120 minutos, también se encontró que existía diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia para la mayoría de los tratamientos (Vehículo, 200 y 800 μM). A través de la prueba de Tukey se determinó que, en el Vehículo, la única diferencia significativa que se presentó se dio entre las áreas DG y CA1 (p = 0,0260). Para 200 μM, las diferencias significativas se presentaron entre las áreas DG y CA3 (p = 0,0219) y las áreas DG y CA1 (p = 0,0170). Para 400 μM no se presentó ninguna diferencia significativa al comparar las áreas. Por último, para el ensayo de 800 μM, las diferencias significativas se presentaron entre las áreas DG y CA3 (p = 0,0077) y las áreas DG y CA1 (p = 0,0015). De este modo el análisis concluye que se presentó muerte diferencial de neuronas entre las subregiones del hipocampo mencionadas para el Vehículo, 200 y 800 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no se dio para la concentración de 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En este ensayo se presentaron tendencias dependientes de la concentración desde el Vehículo hasta alcanzar concentraciones de 800 μM de peróxido de hidrógeno en todas las subregiones del hipocampo, exceptuando al DG en la concentración de 800 μM, el cual no siguió esta tendencia.

Con este experimento se logra determinar que la presencia de peróxido de hidrógeno en concentraciones de 200 a 800 μM en el medio de cultivo, conduce a un incremento en la tasa de muerte celular en el hipocampo, mayoritariamente en el área CA1, comparada frente al área DG. En términos de selectividad, se observa mediante el análisis estadístico que la concentración y el tiempo de exposición que provoca una muerte diferencial del área CA1 del hipocampo frente al área DG demás fueron 800 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 120 minutos respectivamente (Fig. 9D), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en la selectividad en CA1 vs CA3.

## 2.6 Discusión

Para justificar el resultado obtenido en el ensayo de 60 minutos para el Vehículo (Fig. 7A), debemos entender el mecanismo por el cual actúa la molécula fluorescente que utilizamos en el análisis, el Yoduro de Propidio. Como es un agente de inclusión que requiere atravesar la membrana plasmática, por ejemplo en condiciones de necrosis o necrosis secundaria a apoptosis (Caro, 2014), algunas condiciones externas traumáticas pudieron provocar este tipo de muerte celular antes de realizar el tratamiento con el agente oxidante, y de este modo provocar un aumento de la intensidad inicial de la fluorescencia. Considerar este factor a la hora de realizar cualquier investigación con cultivos celulares es muy importante, porque lo que se busca con el agente oxidante es provocar un deterioro celular lo más próximo a las condiciones fisiológicas, y esto se logra induciendo mecanismos de muerte celular programada o apoptosis y no a través de necrosis. Segundo, la manera en que fueron obtenidos los cortes de este tejido pudo influir en el proceso por el cual las células realizan el proceso de muerte celular, y por tal razón, se pudo ver afectada la intensidad de la fluorescencia obtenida con el IP.

Los resultados muestran una gran vulnerabilidad al peróxido de hidrogeno en las células del área CA1 del hipocampo frente a DG y en menor grado en CA3 frente a DG, la cual se mantuvo durante los dos ensayos realizados y para todas las concentraciones evaluadas. Varias investigaciones han evidenciado la susceptibilidad de esta área específica a las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Por ejemplo, a través de la cuantificación del anión superóxido, usando el método de dihidroetidio (DHE), se determinó que las neuronas del área CA1 contenían una concentración mucho mayor del anión superóxido que regiones como CA3 o DG. A pesar de esto, el estudio no obtuvo los resultados estadísticos esperados para demostrar la diferencia entre CA1 Y CA3. Sin embargo, el hecho de que en el área CA1 se encuentre una mayor concentración de superóxido indica que, al incrementar las condiciones de estrés oxidativo por factores endógenos o exógenos, la célula será mucho más susceptible a sufrir daños. Este factor es denominado como un factor intrínseco de estrés oxidativo y depende de las necesidades específicas de cada subregión, y para este caso, es un factor determinante de la vulnerabilidad de determinadas áreas en el hipocampo como la CA1, donde por su elevada producción de ROS, presenta mayor susceptibilidad cuando los niveles de estas especies se ven incrementados por el tratamiento al cual fueron expuestas.

Anteriormente se mencionó que la producción de ROS está altamente ligada a la producción energética por parte de la mitocondria y, como las neuronas requieren altos niveles de energía con el fin de operar, los niveles de ROS también serán altos en los lugares donde exista más gasto energético. Así mismo, una excesiva demanda o una baja producción de ATP pueden afectar la función neuronal normal

y la respuesta de las neuronas frente a condiciones de estrés oxidativo como el envejecimiento, el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas o como en nuestro experimento, la exposición a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En un área como CA1, donde los niveles de ROS son elevados, la célula debe estar en capacidad para responder a la alta demanda energética que se genera ya sea por la producción de proteínas antioxidantes o por la reparación y degradación de biomoléculas oxidadas. Si estos mecanismos no son capaces controlar la proliferación de ROS, se genera un desbalance energético y las células de esa área entran en un proceso de muerte celular, en una mayor proporción que las células de otras áreas. Esto se demuestra a través de un análisis transcriptómico realizado en la Universidad de Kansas, en el que se encontró que la expresión de genes relacionados con el daño y reparación de ADN y ARN, con la respuesta a proteínas mal plegadas y con el metabolismo de lípidos, se encuentra significativamente más activa en neuronas de área CA1 (Wang & Michaelis, 2010). Este proceso se pudo evidenciar a lo largo de todas las áreas del hipocampo, pero a diferencia de CA1 y CA3, la magnitud del daño en DG fue significativamente menor.

Además de lo ya mencionado, en la Universidad de Málaga se realizó un estudio inmunohistoquímico en donde se evidencia que el progreso de la EA se da inicialmente por el Hipocampo, específicamente en el área CA1. A través del anticuerpo AT8, un marcador específico de la proteína tau fosforilada (fosfo-tau), se realiza un estudio cualitativo de la expresión de fosfo-tau en el hipocampo y giro parahipocampal de muestras post mortem de individuos en diferentes estadios de EA (Braak I a IV). Los resultados mostraron que para las muestras analizadas de pacientes en estadio leve (Braak II), se observan cambios en la forma de los ovillos neurofibrilares (acumulados de fosfo-tau), que afectan de manera específica a las neuronas piramidales de CA1 dentro del hipocampo. Conforme aumentaba el estadio de la enfermedad, la especificidad del deterioro neuronal disminuyó y se esparció hacia todas las áreas del hipocampo (Mejías, 2015). Aunque no es un estudio directamente basado en la exposición a una ROS, es ampliamente conocida la relación de estas con el progreso de la EA y por lo tanto, indirectamente se evidencia que una de las áreas principalmente afectadas tanto por las ROS como por la EA es la CA1.

Por otro lado, se tiene evidencia de la relación entre los receptores GABA y el peróxido de hidrógeno. Hasta el momento la sensibilidad de los receptores GABA<sub>A</sub>ρ1 a ROS se desconocía, pero estudios recientes evidenciaron que las ROS son capaces de modular la neurotransmisión GABAérgica, presumiblemente a través de mecanismos presinápticos y postsinápticos. (Sah, Galeffi, Ahrens, Jordan, & Schwartz-Bloom, 2002) mostraron que la exposición de cortes de hipocampo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alteraba las características de binding del receptor GABA<sub>A</sub> e incrementaba la entrada de Cl<sup>-</sup> mediada por el receptor GABA<sub>A</sub> en células piramidales CA1. Los receptores GABA<sub>A</sub> están presumiblemente ensamblados en una estructura pentamérica a partir de una serie de clases de subunidades. Cuatro clases de

subunidades, con múltiples isoformas, han sido identificadas por su homología de secuencia hasta el momento. En roedores, comprenden seis subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ), tres subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ), tres subunidades  $\gamma$  ( $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ) y una subunidad  $\delta$ . LA distribución de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en la formación del hipocampo de las ratas control presentada en (Wenk, 2006)(Wenk, 2006)(Wenk, 2006)(Avshalumov & Rice, 2002) es la posible razón por la cual la mayor actividad se da en el área CA1, concentrando gran cantidad de subunidades relacionadas a esta (subunidades  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\alpha 5$ -,  $\beta 3$ - y  $\gamma 2$  presentes en altas concentraciones a lo largo de los estratos oriens y radiata CA1 a CA3). Tiene sentido si observamos en las gráficas obtenidas para los dos ensayos, ya que los valores más altos de intensidad se obtuvieron para CA1 y en menor grado CA3.

En la subregión denominada como DG, los valores negativos en la intensidad de la fluorescencia se deben posiblemente a que se trabaja con cultivos organotípicos agudos, en los que, debido a la falta de factores de crecimiento y medios especializados, entran en un proceso de muerte celular lo que genera un incremento en la fluorescencia basal. Como se sumergen en un medio nutritivo, inicia un proceso adaptativo donde se detiene la muerte celular y se estabiliza, disminuye la mortalidad de neuronas y se genera una disminución en la fluorescencia.

Vemos que los resultados estadísticos también muestran que, para un tiempo de exposición de 60 minutos, el tratamiento a 400  $\mu\text{m}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se presenta diferencia en la muerte celular entre DG vs CA3 pero, al aumentar el tiempo de exposición a 120 minutos esta diferencia desaparece. Inicialmente se eligió realizar el estudio analizando los datos que fueran paramétricos y no paramétricos como tal, sin realizar una normalización de los datos no paramétricos. Esta decisión puede estar relacionada con la variación en los resultados estadísticos que se obtuvieron para para esta y para otras concentraciones, ya que como este, en varios tratamientos se obtuvieron resultados en los que visualmente se puede evidenciar ampliamente las diferencias en las intensidades de las áreas evaluadas, pero que, al someterlos a análisis estadísticos, no cumplen con los parámetros necesarios para concluir que presentan una diferencia considerable. Para futuros análisis en los se trabaje con este tipo de experimentación y, basados en otros estudios similares, se recomienda trabajar con un mayor número de ensayos para obtener más datos para analizar (aproximadamente 100) y normalizar los datos no paramétricos para eliminar la posible variabilidad que se presente entre los datos a analizar.

Finalmente y en aras de prevenir errores y cuantificar de manera más diferencial, eficiente y precisa la tasa de muerte celular en experimentos como este, se han desarrollado algunas técnicas de tinción como por ejemplo la de la anexina V (Nakagawa, 1994). Esta es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática, y es un biomarcador efectivo en células apoptóticas. La anexina V puede ser combinada con un marcador de ADN que no sea permeable

a la membrana a menos que esta se vea comprometida, con el fin de distinguir células apoptóticas de necróticas. Se ha evidenciado que la combinación de anexina V-FITC y el marcador catiónico yoduro de propidio (IP) puede garantizar esta diferenciación, registrando células no apoptóticas (anexina V-FITC negativo / IP negativo), células en apoptosis temprana (anexina V-FITC positivo / IP negativo) y células necróticas (anexina V-FITC positivo / IP positivo) (Martínez Salazar, 2009). De esta manera, la cuantificación podría ser más efectiva como por ejemplo para el caso del experimento de 60 minutos, donde se obtuvo para en vehículo tasas de muerte muy elevadas, inclusive mayores que los tratamientos donde se adicionó peróxido de hidrogeno, y de esta manera realizar la cuantificación diferenciada únicamente para células que siguen la vía apoptótica de muerte celular.

## 2.7 Conclusiones

- Mediante la exposición de cortes de cultivos organotípicos hipocampales (HOSC) a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, se determinó que existe una tasa de muerte celular mayor en los cultivos expuestos a una concentración de 800  $\mu\text{M}$  de este agente oxidante por 120 minutos.
- Mediante el análisis estadístico se logró concluir que el peróxido de hidrogeno presenta mayor selectividad, en términos de toxicidad, sobre el área CA1 del hipocampo frente al área DG.

## **2.8 Recomendaciones**

Para llevar a cabo de mejor manera investigaciones como esta se debe tener en cuenta los posibles errores por parte del experimentador y la manera en que pueden influir en los resultados. Por ejemplo, el buen estado de los equipos tanto de corte como de incubación, fotografía y de más, se deben revisar y asegurar su correcto funcionamiento con frecuencia.

Uno de los principales factores mencionados que puede alterar de alguna manera los resultados de la investigación es la presencia de contaminantes externos en el medio de cultivo, razón por la cual, se debe evitar al máximo situaciones o procedimientos que incrementen este riesgo. El área total donde se llevó a cabo la experimentación presentaba la falencia que existía una gran distancia desde el lugar donde se incubaba el tejido hasta el lugar donde se realizaba la toma de fotografías en el microscopio de fluorescencia; y aunque se les dio el mejor manejo posible a los cultivos, factores como este pueden incrementar ampliamente el riesgo de contaminación de la muestra. Por esta razón, en condiciones ideales se debe evitar a toda costa este tipo de falencias.

Finalmente, el buen estado de los reactivos, medios de cultivo y demás debe ser verificado con anterioridad para obtener resultados de la mejor calidad posible.

## 2.9 Referencias

- Aggarwal, N. T., Shah, R. C., & Bennett, D. A. (2015). Alzheimer's disease: Unique markers for diagnosis & new treatment modalities. *Indian J Med Res*, 142(October), 369–382. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.169193>
- Albert Cabrera, M. J., Martínez Pérez, R., Gutiérrez Ravelo, A., Hakim Rodríguez, D., & Pérez Davison, G. (2014). Patogenia y tratamientos actuales de la enfermedad de Alzheimer. (Spanish). *Pathogenesis and Current Treatment of Alzheimer's Disease. (English)*, 48(3), 508–518. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=102033754&lang=en&site=ehost-live>
- Avshalumov, M. V., & Rice, M. E. (2002). NMDA receptor activation mediates hydrogen peroxide-induced pathophysiology in rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 87(6), 2896–2903. <https://doi.org/10.1152/jn.01011.2001>
- Ballatore, C., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9), 663–672. <https://doi.org/10.1038/nrn2194>
- Barbagallo, M., Marotta, F., & Dominguez, L. J. (2015). Oxidative Stress in Patients with Alzheimer ' s Disease : Effect of Extracts of Fermented Papaya Powder, 2015.
- Bayeva, M., Gheorghiade, M., & Ardehali, H. (2013). Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 61(6), 599–610. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.08.1021>
- Blass, J. P. (1984). Stages of Alzheimer's disease. *Journal of the American Geriatrics Society*, 32(1), 4. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1984.tb05141.x>
- Burgos Pérez, L. V. (2013). *Diagnóstico de los impactos ambientales de los servicios generales de la Universidad Icesi*. Icesi. Retrieved from [https://repository.icesi.edu.co/biblioteca\\_digital/bitstream/10906/76617/1/diagnostico\\_impacto\\_ambiental.pdf](https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/76617/1/diagnostico_impacto_ambiental.pdf)
- Caro, A. (2014). *Mecanismos moleculares de la muerte celular inducida por privacion de glucosa*. Universitat de Barcelona. Retrieved from [http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2322/ACM\\_TESIS.pdf?sequence=1](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2322/ACM_TESIS.pdf?sequence=1)
- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 19(R1), 12–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>
- Fallis, A. . (2013). About Alzheimer's disease. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- García, S., Vázquez, R., Dávalos, E., Castillo, J., Bertin Martínez, S., & De Jesús Villagómez Ortiz, A. (2009). Enfermedad de Alzheimer: una panorámica desde su primera descripción hacia una perspectiva molecular, *25*(4), 300–312.
- Greene, S. J., & Killiany, R. J. (2012). Hippocampal subregions are differentially affected in the progression to Alzheimer's disease. *Anatomical Record*, *295*(1), 132–140. <https://doi.org/10.1002/ar.21493>
- Happ, D. F., & Tasker, R. A. (2016). A method for objectively quantifying propidium iodide exclusion in organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, *269*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.05.006>
- Hroudová, J., Singh, N., Fišar, Z., & Ghosh, K. K. (2016). Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *121*, 774–784. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.084>
- Huang, W., Zhang, X., & Chen, W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). *Biomedical Reports*, 519–522. <https://doi.org/10.3892/br.2016.630>
- Jiang, T., Sun, Q., & Chen, S. (2016). Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.07.005>
- LERMAN, L. S. (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*, *3*, 18–30.
- Liu, T., & Zhao, H. (2014). [Setting up the oxidative cell mode with hippocampal cell of primary culture induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*, *43*(5), 719–723,731.
- Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., & Barbeito, L. (2001). The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Archives of Medical Research*, *32*(5), 367–381. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00316-2](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00316-2)
- Martínez Salazar, M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *11*(2), 152–166. Retrieved from <http://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11762/38369>
- Mejías, E. S. (2015). *ESTUDIO NEUROPATOLÓGICO DEL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: DE MODELOS TRANSGÉNICOS A HUMANOS*. Universidad de Málaga.
- Nakagawa, Y. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, *3*(c), 11–12.
- Prada, S. I., Takeuchi, Y., & Ariza, Y. (2014). Costo monetario del tratamiento de la

- enfermedad de Alzheimer en Colombia Monetary cost of treatment for Alzheimer ' s disease in Colombia. *Acta Neurológica Colombiana*, 30(1), 247–255.
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- Republica, U. de la. (2007). Microscopio de Fluorescencia. Retrieved from <https://iie.fing.edu.uy/investigacion/grupos/gti/timag/trabajos/2007/proteus/epifluorescencia.html>
- Sah, R., Galeffi, F., Ahrens, R., Jordan, G., & Schwartz-Bloom, R. D. (2002). Modulation of the GABAA-gated chloride channel by reactive oxygen species. *Journal of Neurochemistry*, 80(3), 383–391. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00706.x>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2016). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.005>
- van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(4), 272–82. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>
- Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>
- Wenk, G. L. (2006). Neuropathologic Changes in Alzheimer's Disease: Potential Targets for Treatment. *Clinical Trials*, 67 Suppl 3, 3–7. Retrieved from <http://faculty.psy.ohio-state.edu/wenk/documents/JClinPsychiatry2006.pdf>
- Xu, S., Zhang, R., Niu, J., Cui, D., Xie, B., Zhang, B., ... Zhang, Q. (2012). Oxidative stress mediated-alterations of the microRNA expression profile in mouse hippocampal neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16945–16960. <https://doi.org/10.3390/ijms131216945>

### 3 ANEXOS

#### Anexo 1. Análisis estadístico

##### Análisis estadístico para la prueba de toxicidad al peróxido de hidrogeno con un tiempo de exposición de 60 minutos.

Es importante tener en cuenta que para poder realizar un análisis de varianza o ANOVA es necesario que se cumpla los supuestos de homogeneidad de varianza y una distribución normal de los datos.

| <b>Supuesto de homogeneidad de varianzas</b>  | <b>Supuesto de distribución normal de los datos</b>   |
|---|---|
| <b>H<sub>0</sub></b> : Las varianzas son iguales<br><b>H<sub>A</sub></b> : Las varianzas no son iguales | <b>H<sub>0</sub></b> : Los datos tienen una distribución normal<br><b>H<sub>A</sub></b> : Los datos no tienen una distribución normal |

En ambos casos la hipótesis nula o  $H_0$  se rechaza si el valor p es menor al grado de significancia con el que se trabaja, es decir si **valor p < 0.05**.

Al realizar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se obtuvo para los tratamientos Vehículo, 200  $\mu\text{M}$  y 400  $\mu\text{M}$  valores p menores que el grado de significancia (**valor p < 0.05**), razón por la cual se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  y se dice que los datos no presentan una distribución normal; se les aplicó la prueba de Friedman y la prueba de comparación múltiple de Dunn. Por otro lado, en el análisis realizado a la concentración de 800  $\mu\text{M}$  se encontró que el valor p fue mayor a al grado de significancia (**valor p > 0.05**), se acepta la hipótesis nula y se dice que los datos tienen una distribución normal. Seguidamente se realiza el ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

##### Hipótesis a probar (ANOVA y Friedman)

**H<sub>0</sub>**: Las medianas de las diferencias de la intensidad de fluorescencia (dF) en cada subregión son iguales.

**H<sub>A</sub>**: La mediana de las diferencias de la intensidad de fluorescencia (dF) en cada subregión no son iguales.

Se rechaza  $H_0$  si: **valor p < 0,05**

Cada uno de los tratamientos se sometieron a esta prueba y los resultados se muestran a continuación.

## Vehículo

| Friedman test                           |        |
|---|--------|
| P value                                 | 0,0081 |
| P value summary                         | **     |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes    |
| Number of treatments (columns)          | 3      |
| Number of subjects (rows)               | 6      |

| Dunn's multiple comparisons test | Rank sum diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|----------------------------------|----------------|--------------|---------|------------------|
| DG vs. CA3                       | 0              | No           | ns      | >0.9999          |
| DG vs. CA1                       | -9             | Yes          | *       | 0,0281           |
| CA3 vs. CA1                      | -9             | Yes          | *       | 0,0281           |

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ . Existen diferencias significativas en la dF entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

## Peróxido de Hidrogeno 200 $\mu$ M

| Friedman test                           |        |
|---|--------|
| P value                                 | 0,0055 |
| P value summary                         | **     |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes    |
| Number of treatments (columns)          | 3      |
| Number of subjects (rows)               | 6      |

| Dunn's multiple comparisons test | Rank sum diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|----------------------------------|----------------|--------------|---------|------------------|
| DG vs. CA3                       | -2             | No           | ns      | >0.9999          |
| DG vs. CA1                       | -10            | Yes          | *       | 0,0117           |
| CA3 vs. CA1                      | -8             | No           | ns      | 0,0628           |

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ . Existen diferencias significativas en la dF entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata

### Peróxido de Hidrogeno 400 $\mu$ M

| Friedman test                           |        |
|---|--------|
| P value                                 | 0,0017 |
| P value summary                         | **     |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes    |
| Number of treatments (columns)          | 3      |
| Number of subjects (rows)               | 6      |

| Dunn's multiple comparisons test | Rank sum diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|----------------------------------|----------------|--------------|---------|------------------|
| DG vs. CA3                       | -4             | No           | ns      | 0,7446           |
| DG vs. CA1                       | -11            | Yes          | **      | 0,0045           |
| CA3 vs. CA1                      | -7             | No           | ns      | 0,1299           |

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ . Existen diferencias significativas en la dF entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata

### Peróxido de Hidrogeno 800 $\mu$ M

| One-way ANOVA                         |        |
|---------------------------------------|--------|
| P value                               | 0,0170 |
| P value summary                       | *      |
| Statistically significant (P < 0.05)? | Yes    |
| Number of treatments (columns)        | 3      |
| Number of subjects (rows)             | 5      |
| R square                              | 0,6741 |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|-----------------------------------|------------|--------------|---------|------------------|
| DG vs. CA3                        | -704,8     | No           | ns      | 0,9965           |
| DG vs. CA1                        | -40181     | No           | ns      | 0,0779           |
| CA3 vs. CA1                       | -39476     | No           | ns      | 0,0574           |

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ . Existen diferencias significativas en la dF entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

## Análisis estadístico para la prueba de toxicidad al peróxido de hidrogeno con un tiempo de exposición de 120 minutos.

Es importante tener en cuenta que para poder realizar un análisis de varianza o ANOVA es necesario que se cumpla los supuestos de homogeneidad de varianza y una distribución normal de los datos.

### Supuesto de homogeneidad de varianzas

**H<sub>0</sub>**: Las varianzas son iguales  
**H<sub>A</sub>**: Las varianzas no son iguales

### Supuesto de distribución normal de los datos

**H<sub>0</sub>**: Los datos tienen una distribución normal  
**H<sub>A</sub>**: Los datos no tienen una distribución normal

En ambos casos la hipótesis nula o H<sub>0</sub> se rechaza si el valor p es menor al grado de significancia con el que se trabaja, es decir si **valor p < 0.05**.

Al realizar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se obtuvo para todos los tratamientos valores p menores que el grado de significancia (**valor p < 0.05**), razón por la cual se acepta la hipótesis nula y se dice que los datos tienen una distribución normal. Seguidamente se realiza el ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

### Hipótesis a probar (ANOVA)

**H<sub>0</sub>**: La mediana de las diferencias de la intensidad de fluorescencia en cada subregión son iguales.

**H<sub>A</sub>**: La mediana de las diferencias de la intensidad de fluorescencia en cada subregión no son iguales.

Se rechaza H<sub>0</sub> si: **valor p < 0,05**

Cada uno de los tratamientos se sometieron a esta prueba y los resultados se muestran a continuación.

### Vehículo

| One-way ANOVA                         |        |
|---------------------------------------|--------|
| P value                               | 0,0536 |
| P value summary                       | ns     |
| Statistically significant (P < 0.05)? | No     |
| Number of treatments (columns)        | 3      |
| Number of subjects (rows)             | 6      |
| R square                              | 0,5059 |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|-----------------------------------|------------|--------------|---------|------------------|
| DG vs. CA3                        | -7779      | No           | ns      | 0,1011           |
| DG vs. CA1                        | -11633     | Yes          | *       | 0,0260           |
| CA3 vs. CA1                       | -3854      | No           | ns      | 0,7210           |

**Conclusión:** El valor p es mayor que 0,05 por tanto se acepta  $H_0$  y no existen diferencias significativas en la dF entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

#### Peróxido de Hidrogeno 200 $\mu\text{M}$

| One-way ANOVA                         |        |
|---------------------------------------|--------|
| P value                               | 0,0021 |
| P value summary                       | **     |
| Statistically significant (P < 0.05)? | Yes    |
| Number of treatments (columns)        | 3      |
| Number of subjects (rows)             | 6      |
| R square                              | 0,7279 |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|-----------------------------------|------------|--------------|---------|------------------|
| DG vs. CA3                        | -12862     | Yes          | *       | 0,0219           |
| DG vs. CA1                        | -16651     | Yes          | *       | 0,0170           |
| CA3 vs. CA1                       | -3789      | No           | ns      | 0,4855           |

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ . Existen diferencias significativas en la dF entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

#### Peróxido de Hidrogeno 400 $\mu\text{M}$

| One-way ANOVA                         |        |
|---------------------------------------|--------|
| P value                               | 0,0356 |
| P value summary                       | *      |
| Statistically significant (P < 0.05)? | Yes    |
| Number of treatments (columns)        | 3      |
| Number of subjects (rows)             | 6      |
| R square                              | 0,5527 |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|-----------------------------------|------------|--------------|---------|------------------|
| DG vs. CA3                        | -4185      | No           | ns      | 0,2520           |
| DG vs. CA1                        | -10824     | No           | ns      | 0,0906           |
| CA3 vs. CA1                       | -6639      | No           | ns      | 0,1339           |

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ . Existen diferencias significativas en la dF entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

### Peróxido de Hidrogeno 800 $\mu$ M

| One-way ANOVA                         |        |
|---------------------------------------|--------|
| P value                               | 0,0001 |
| P value summary                       | ***    |
| Statistically significant (P < 0.05)? | Yes    |
| Number of treatments (columns)        | 3      |
| Number of subjects (rows)             | 6      |
| R square                              | 0,858  |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|-----------------------------------|------------|--------------|---------|------------------|
| DG vs. CA3                        | -8880      | Yes          | **      | 0,0077           |
| DG vs. CA1                        | -16365     | Yes          | **      | 0,0015           |
| CA3 vs. CA1                       | -7485      | No           | ns      | 0,0572           |

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_A$ . Existen diferencias significativas en la dF entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

## Anexo 2. Carta de aprobación del proyecto de investigación.



Santiago de Cali, 05 de marzo de 2016  
CICUAE 0011/2016

**Sr(a). Alvaro Andres Barrera Ocampo**  
Investigador Principal- Universidad Icesi

**ASUNTO:** *Aprobación proyecto: “Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocampales a compuestos patogénicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer”.*

El 18 de febrero del presente año, los miembros de **CIECUAE** de la Universidad Icesi revisaron y aprobaron el siguiente proyecto de investigación, dando cumplimiento a la ley 84 de 1989 y a la resolución de rectoría N° 847 (9 de Julio de 2012):

**Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocampales a compuestos patogénicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer”.**

La presente se firma, el día (10), mes (**Marzo**), del año (**2016**)

Cordialmente,

Juliana Rengifo  
Presidente –CIECUAE- Universidad Icesi