

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE *Salvia divinorum* COMO AGENTE
NEUROPROTECTOR EN UN MODELO CELULAR DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER**

Juan Camilo Solarte Ramírez

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA FARMACÉUTICA
Santiago de Cali
2017**

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE *Salvia divinorum* COMO AGENTE
NEUROPROTECTOR EN UN MODELO CELULAR DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER**

Juan Camilo Solarte Ramírez

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

Álvaro Andrés Barrera Ocampo. PhD

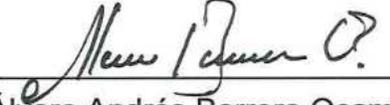
**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA FARMACÉUTICA
Santiago de Cali
2017**



APROBADO POR:



Julián Arbey González Ospina
Evaluador



Álvaro Andrés Barrera Ocampo
Tutor del proyecto

AGRADECIMIENTOS

Este es un logro que por sí solo nunca podría haber llegado a culminar. Debo este trabajo a Dios primeramente, por permitirme llegar hasta este punto. Fue su voluntad la que hoy me permite con orgullo entregar un proyecto en el cual plasmo los años de aprendizaje, dedicación, esfuerzo y disciplina entregados a la universidad, para así cumplir mi sueño tan anhelado de ser un Químico Farmacéutico.

Al mismo tiempo fue él quien puso las personas más indicadas en mi caminar universitario. Entre ellos, mis padres, a quienes les agradezco por su arduo trabajo para brindarme la oportunidad de estudiar. Gracias, por que depositaron toda su confianza en mí durante todo estos años y creyeron sin límite en que yo podría finiquitar esta maravillosa carrera.

También puso en mi camino a un profesor ejemplar, comprometido y profesional en su trabajo. Agradezco al Dr. Álvaro Andrés Barrera Ocampo, quien me transmitió el conocimiento necesario para que este proyecto aporte un pequeño grano de arena al amplio campo de la investigación.

Por último, doy gracias a mis compañeros y amigos de la universidad: Alejandro, Camila, Juliana y Daniela. Porque llegar hasta este punto de mi carrera me ha dado entender que es mejor llegar al éxito acompañado, que solo.

CONTENIDO

CONTENIDO	1
LISTA DE TABLAS	3
LISTA DE GRÁFICAS.....	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ANEXOS	6
RESUMEN DEL PROYECTO	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	9
2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	10
2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia:.....	10
2.2 Marco teórico y estado del arte:.....	12
2.2.1 Enfermedad del Alzheimer	12
2.2.2 Glutamato y su relación con la EA	15
2.3 Objetivos.....	19
2.3.1 Objetivo General	19
2.3.2 Objetivos Específicos	19
2.4 Metodología Propuesta:.....	20
2.4.1 Preparación de los medios de cultivo.....	20
2.4.2 Cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata.....	21
2.4.3 Determinación de la concentración de glutamato	21
2.4.4 Evaluación de la concentración de extractos de <i>S. divinorum</i>	22
2.4.5 Análisis estadístico de los resultados.....	22
2.4.6 Matriz Lógica.....	23
2.5 Resultados.....	26
2.6 Discusión	32
2.7 Conclusiones	36
2.8 Recomendaciones.....	37
3 BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXOS.....	41
Anexo 1. Análisis estadístico sobre las pruebas de excitotoxicidad en neuronas hipocampales de rata	41
Anexo 2. Acta de aprobación del proyecto por el Comité de Ética de la Universidad Icesi.....	47

Anexo 3. Cartal de aval del proyecto de grado.....48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer (Rang & Dale, 2012).....	15
Tabla 2. Preparación de los medios de cultivo	20
Tabla 3. Matriz de marco lógico.....	23

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Prueba de toxicidad del Glutamato en células de hipocampo de rata, en condiciones de 1 hora de tratamiento.	26
Gráfica 2. Prueba de toxicidad del Glutamato en células de hipocampo de rata, en condiciones de 2 horas de tratamiento	27
Gráfica 3. Prueba de toxicidad de la <i>Salvia</i> en células de hipocampo de rata, bajo concentraciones de ug/mL y en condiciones de 1 hora de tratamiento	28
Gráfica 4. Prueba de toxicidad de la <i>Salvia</i> en células de hipocampo de rata, bajo concentraciones de ug/mL y en condiciones de 2 horas de tratamiento.....	29
Gráfica 5. Prueba de toxicidad de la <i>Salvia</i> en células de hipocampo de rata, bajo concentraciones de ng/mL y en condiciones de 1 hora de tratamiento	30
Gráfica 6. Prueba de toxicidad de la <i>Salvia</i> en células de hipocampo de rata, bajo concentraciones de ng/mL y en condiciones de 2 horas de tratamiento.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de excitotoxicidad.	16
---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico sobre las pruebas de excitotoxicidad en neuronas hipocampales de rata.....	41
Anexo 2. Acta de aprobación del proyecto por el Comité de Ética de la Universidad Icesi	48
Anexo 3. Cartal de aval del proyecto de grado	49

RESUMEN DEL PROYECTO

La propuesta de encontrar mecanismos por los cuales se reduzca la excitotoxicidad del glutamato frente a las células neuronales ha sido un reto en los últimos 20 años. Y no es de menos el auge de las investigaciones encaminadas a lograr dicha reducción, ya que es una de las causas principales por la cual se genera la enfermedad del Alzheimer. Enfermedad que a diario, en todo el mundo, genera miles de muertes y desquebraja el sistema de salud de los países con alto porcentaje de este tipo de demencia en su población, por su alto costo de tratamiento. En el momento no existe una cura definitiva para esta enfermedad. Hasta el momento solo se han planteado soluciones o respuestas para revertir en un bajo grado sus síntomas y el progreso inminente que tiene, especialmente en las personas mayores de 65 años. Una posible solución es la de inhibir la acción del glutamato sobre los receptores glutamatérgicos, como el NMDA. Sin embargo, ha sido un desafío para muchos investigadores encontrar moléculas que por su composición no causen otros daños colaterales y cumplan específicamente la misión de reducir los efectos del glutamato en las células. Entre las posibles opciones de moléculas capaces de generar un antagonismo competitivo frente al neurotransmisor excitatorio por excelencia, se encuentran los metabolitos secundario de la planta *Salvia divinorum*, la Salvinorina A, B Y C.

Por tal razón, este proyecto se ha trazado el objetivo de determinar si existe un efecto neuroprotector de los extractos de *Salvia divinorum* frente a un exceso constante de glutamato, en un modelo *in vitro* de cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata. Para lograrlo, se estableció una concentración de glutamato y el tiempo necesario para inducir muerte en un modelo *in vitro* de neuronas hipocampales de rata y luego, se determinó la concentración y el tiempo al cual los extractos de *Salvia divinorum* aumentan el número de neuronas hipocampales de rata que sobreviven frente a una concentración excitotóxica de glutamato. La viabilidad y supervivencia neuronal se midió mediante el ensayo MTT, que por espectrofotometría mide las sales de formazán generadas por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células vivas. Los resultados encontrados en este proyecto, estipulo por una parte, que la concentración de 100 mM de glutamato en 1 hora fue la que en mayor proporción indujo a una muerte por excitotoxicidad en el hipocampo de rata. Por otra parte, los extractos de *Salvia divinorum* al no encontrarse puros, ocasionaron una alta mortalidad de neuronas. Lo que llevo a concluir, que este extracto es altamente citotóxico para las células y que nulamente logra conseguir un efecto neuroprotector frente al glutamato.

Palabras clave: Excitotoxicidad, Enfermedad del Alzheimer, Receptores glutamatérgicos, Extractos de *Salvia divinorum*, Ensayo MTT.

ABSTRACT

The approach of finding mechanisms to reduce the glutamate excitotoxicity among neuronal cells has been a challenge in the last 20 years. And it is not surprising the peak in research towards reaching its decreasing, due to be one of the main causes of Alzheimer Disease. This is a disease that daily, all over the world, causes thousands of deaths and bankrupts the health care system of nations with a high percentage of this type of dementia in its population, because of the high costs of the treatment. At the moment, there is not cure for the disease. So far, there are only solutions or answers to reverse in a low level their symptoms and their imminent progress, especially in adults that are 65 years and older. A possible solution is to inhibit the action of glutamate on the glutamic receptors, such as NMDA. However, it has been a challenge for many researchers to find molecules that based on their composition do not cause side effects and meet specifically the target of reducing the effects of glutamate in cells. Between the possible options of molecules capable of generating such competitive antagonism on a excitatory neurotransmitter by excellence, there are found the secondary metabolites of the plant *Salvia divinorum*, Salvinorine A, B and C.

For such reason, this project has been launched with the objective of looking whether there is a neuroprotector effect from extracts from *Salvia divinorum* in front of a constant excess of glutamate, in an *in vitro* model of primary cultures of hippocampal neurons from rat and then, it was determined the concentration and time in which the extracts from *Salvia divinorum* increased the survival of hippocampal neurons on a excitotoxic concentration of glutamate. The viability and survival of the neurons was measured through MTT assay, which by spectrophotometry measures formazan salts generated by the mitochondrial enzyme succinate-dehydrogenase of living cells. The results found on this project, on a side were, that the concentration of 100 mM glutamate for 1 hour produced higher proportion of death by excitotoxicity in the hippocampus of mice. In the other hand, the extracts of *Salvia divinorum* due to impurities, caused a high mortality of neurons. Therefore, this extract is highly toxic for the cells and barely reaches a neuroprotector effect of glutamate.

Key words: Excitotoxicity, Alzheimer's disease, Glutamatergic receptors, Extracts of *Salvia divinorum*, MTT assay.

1 INTRODUCCIÓN

Salvia divinorum es una planta herbácea, perteneciente a la familia lamiáceas, también conocida como “ska pastora”, “ska María”, “hierba María”, “hierba de los dioses”. Originaria del sur de México. Es considerada como una hierba de gran alcance con valor medicinal y espiritual dentro de su contexto indígena; ellos utilizan la *Salvia* para el tratamiento de la irregularidad intestinal, dolores de cabeza y el reumatismo, entre otros males, aunque el uso médico es menor que el utilizado para la adivinación. Sin embargo, como ha ocurrido en otros contextos, los rituales tradicionales con alucinógenos han sido transformados hacia fines recreativos modernos; entre ellos el uso de los extractos de *Salvia*, que a pequeñas dosis generan una potente depresión del SNC (Sistema Nervioso Central) y que su vez los han convertido en sustancias de abuso (Comisión Nacional Contra las Adicciones, 2012).

Entre los principios activos de la *S. divinorum* se encuentra un grupo conformado por la Salvinorina A, B y C que presentan una acción farmacología única, son agonistas de los receptores opioide kappa (KOP) y son los principales responsables del efecto alucinógeno de la planta (Yan, Bikbulatov, Mocanu, Dicheva, Parker, & Wetsel, 2009). A diferencia de los alucinógenos, no son alcaloide, es decir, su molécula no contiene nitrógeno y de hecho se dice que son los primeros agonistas opioide no nitrogenados de origen natural, aunque sus efectos psicomiméticos son similares a los agonistas serotoninérgicos (LSD) y antagonistas de los receptores de NMDA (PCP) (Fernández & Torrens, 2005).

Dado el uso alucinógeno que se le da a la *Salvia*, pocos estudios de investigación se encuentran sobre otras de sus posibles utilidades que pueden tener estos potentes opiáceos. No obstante, se conoce previamente de una estrecha relación inhibitoria que tiene la estimulación de KOP sobre los receptores NMDA (Yan, Bikbulatov, Mocanu, Dicheva, Parker, & Wetsel, 2009). Este hecho tiene gran importancia a nivel terapéutico por las grandes ventajas que brinda esta vía alterna para controlar ciertos agonistas de los receptores NMDA, como el glutamato, que en altas concentraciones, afecta células involucradas en algunas enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer (EA). Con el propósito de determinar si los extractos de la planta *Salvia divinorum* producen un efecto neuroprotector frente a un estrés tóxico producido por glutamato en células involucradas en la EA, se evaluó diferentes concentraciones de *S. divinorum* en un modelo *in vitro* de neuronas hipocampales de rata, sometidas a un exceso constante de glutamato. El principal resultado que se esperó obtener, fue encontrar una concentración de *S. divinorum* a la cual hubiera una disminución en la muerte de células sometidas a una concentración excitotóxica de glutamato.

2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia:

La EA contribuye al 60%-70% de los casos de demencia en el mundo. Se caracteriza por una neurodegeneración progresiva que se evidencia clínicamente por un deterioro cognitivo leve en la etapa inicial de la enfermedad, la cual evoluciona hasta una forma severa que hace que el paciente pierda casi por completo sus funciones cognitivas y se vuelva dependiente del cuidado de otras personas. Eso incluye al 11% de las personas de 65 años y a un tercio de las personas de 85 años en el mundo (Alzheimer's Association, 2015). La EA no tiene cura y por esta razón la búsqueda de alternativas terapéuticas es uno de los campos de investigación más activos. Entre las estrategias terapéuticas se encuentra la despotencialización de la neurotransmisión glutamatérgica. Dado que el glutamato potencia la toxicidad de los péptidos beta-amiloide ($A\beta$), los cuales inducen la oxidación proteica, peroxidación lipídica, formación de especies reactivas de oxígeno, estimulación de la óxido nítrico sintetasa, alteración mitocondrial y otros marcadores de lesión oxidativa (Butterfield & Pocernich, 2005). Este efecto podría reflejar la mayor producción de radicales libres luego de la estimulación del receptor NMDA (receptor N-metil-D-aspartato). El exceso de estimulación del receptor inducida por glutamato puede ser tóxico. Por tanto, un tratamiento paliativo de la enfermedad consiste en el bloqueo con antagonistas selectivos de los receptores NMDA (Rang & Dale, 2012).

La hipótesis que se ha planteado en este proyecto investigativo es evaluar si los metabolitos extraídos de la *Salvia divinorum* pueden actuar como posibles antagonistas indirectos de los receptores NMDA. Monografías basadas sobre agonistas de los receptores opiáceos, plantean que al ser estos activados, propician una cadena de señalización inhibitoria sobre los receptores NMDA, lo que generaría una disminución en la activación de dichos receptores (Fernández & Torrens, 2005). Sin embargo, hasta el momento no se conoce experimentalmente en un modelo biológico el poder antagonista de los extractos de *S. divinorum* sobre los receptores NMDA, ni tampoco el mecanismo de acción por el cual KOP generan una señalización inhibitoria sobre los receptores NMDA. Por lo tanto, el conocimiento que se tiene actualmente es simplemente teórico.

Este proyecto busca brindar las suficientes pruebas experimentales en un modelo *in vitro*, que permitan evaluar la acción de los extractos de *S. divinorum* sobre los receptores NMDA y reconocer si pueden proteger o no contra el daño inducido por glutamato en un modelo celular de la EA.

De ser así, las estrategias terapéuticas encaminadas a la despotencialización de las neurotransmisiones glutamatérgicas con los metabolitos de la *S. divinorum*

será una alternativa viable en un futuro, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, especialmente en personas que padecen EA. En general, la línea investigativa de enfermedades neurodegenerativas implica una enorme importancia actual desde diferentes ámbitos: sociales, familiares, económicos y los relacionados con la salud. Los costes de tratamientos y asistencia social para enfermedades como EA, son superiores a los 60 mil millones de dólares anuales. Además, estimándose que un tratamiento que pudiera retrasar el comienzo de la enfermedad en cinco años supondría un ahorro del 50% de esa cantidad anualmente (Segovia & Mora, 2002).

2.2 Marco teórico y estado del arte:

2.2.1 Enfermedad del Alzheimer

La demencia se define como el deterioro adquirido en las capacidades cognitivas que entorpece la realización satisfactoria de actividades de la vida diaria (Flint Beal, Richardson, & Martin, 1998). La EA es una demencia progresiva que produce el déficit de la memoria como uno de sus síntomas más tempranos y pronunciados. Comúnmente, el paciente empeora progresivamente, mostrando problemas perceptivos, del lenguaje y emocionales a medida que la enfermedad va avanzando. La EA se ha convertido en un problema social muy grave para millones de familias y para los sistemas nacionales de salud de todo el mundo. Es una causa importante de muerte en los países desarrollados, por detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo, lo que hace que esta demencia tenga un impacto tan fuerte en el sistema de salud y en el conjunto de la sociedad es, sin duda alguna, su carácter irreversible, la falta de un tratamiento curativo y la carga que representa para las familias de los afectados (Kettl, 2007). La enfermedad suele tener una duración media aproximada de 10-12 años, aunque ello puede variar mucho de un paciente a otro (Romano, Nissen, Huerto, & Parquet, 2007).

2.2.1.1 Epidemiología

La EA es la demencia más frecuente en la población anciana, representando un 60 al 70 % de las demencias. Se calcula que en el mundo hay 44 millones de personas que la padecen y que en tres décadas habrá el doble. Según la Asociación de Alzheimer Internacional, la enfermedad puede comenzar a una edad aproximada a los 50 años (Eisendrath & Lichtmacher, 2006). En EE.UU., entre el 1 y el 6% de las personas mayores de 65 años padecen la enfermedad. El 10% de personas mayores de 70 años y 20 a 40% de quienes tienen más de 85 años tienen amnesia clínicamente identificable (Flint Beal, Richardson, & Martin, 1998). La posibilidad de cada individuo de padecer la EA aumenta con la edad (Romano, Nissen, Huerto, & Parquet, 2007).

2.2.1.2 Etiología

La etiología de la enfermedad es desconocida. En función de la edad de aparición de los síntomas se clasifica en (Romano, Nissen, Huerto, & Parquet, 2007):

- Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz, si el comienzo es ante de los 65 años.
- Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, si comienza después de los 65 años.

A su vez estas dos formas se clasifican en dos subtipos (Romano, Nissen, Huerto, & Parquet, 2007):

- Familiar, si hay historia familiar.
- Esporádica, si no hay antecedentes familiares.

En torno al 1% de los casos la enfermedad es hereditaria con una transmisión autosómica dominante, es decir, que se puede presentar la enfermedad con solo heredar el gen anormal de uno de los padres, (Servicio de Neurología. Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, 2000). Se han identificado varios casos de EA familiar con herencia de tipo autosómico dominante, relacionados con los cromosomas 1, 14, 21, pero la gran mayoría de casos no muestran patrones familiares tan claros. Se ha sugerido un componente genético en casos de EA familiar pero no autosómicos dominantes. Para este último caso se evalúan lo que se denominan Factores de riesgo, como por ejemplo: la edad o ser familiar en primer grado de los pacientes. Tienen una incidencia acumulativa de la enfermedad que se aproxima al 50%. Los individuos con un familiar afectado tienen 4 veces más riesgo de desarrollar la EA (Servicio de Neurología. Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, 2000).

Además, se reconocen múltiples locus genéticos asociados con la EA: presenilina 1 y 2, apolipo-proteína E4, proteína precursora de amiloide. Los cuales demuestran que la expresión patológica de la EA es una vía final común para varias anormalidades estructurales y metabólicas. (Servicio de Neurología. Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, 2000)

2.2.1.3 Patogenia

La EA se estudia bajo 2 criterios de observación. Macroscópicamente, el cerebro presenta una disminución de su tamaño a consecuencia de la pérdida progresiva de terminaciones sinápticas y neuronas que componen la sustancia gris. Esto produce atrofia cortical que es más pronunciada y temprana en el córtex temporal medial (hipocampo) y posteriormente en el resto del cerebro (Villara, Molinuevo, & Gómez, 2008).

Microscópicamente, se observa una extensa pérdida neuronal (sobre todo de neuronas colinérgicas) y 2 lesiones características: una por la formación de placas amiloideas y la otra, por formación de ovillos neurofibrilares. Las primeras son placas extracelulares, presentes también en ancianos sin EA, formadas por depósitos del fragmento proteico A β 1-42, asociados a dendritas y axones dismórficos, astrocitos reactivos y microglía activada. Este péptido es insoluble y procede de la proteólisis de la proteína precursora amiloidea (APP), una glucoproteína de membrana, cuya función fundamental *in vivo* se desconoce. Los ovillos neurofibrilares (ONF) son algunos de los marcadores más importantes de la EA. Las células que los contienen pierden sus funciones fisiológicas y con el paso del tiempo, se produce la muerte neuronal (Brion, 1998). Su distribución en el

cerebro se relaciona con la evolución de la enfermedad. En las fases iniciales de la EA se encuentran en la corteza y el hipocampo (áreas implicadas en la memoria y el aprendizaje), y a medida que la enfermedad avanza y el déficit cognitivo empeora, se encuentran ONF en cortezas asociativas y áreas subcorticales. El número de ONF está estrechamente relacionado con el grado de demencia, lo que indica una relación directa entre su formación y el grado de disfunción neuronal (Villara, Molinuevo, & Gómez, 2008).

2.2.1.4 Cuadro clínico

Los síntomas de la EA son variables y se pueden agrupar en 3 áreas: cognitiva, conductual y funcional. Si los déficit cognitivos y las alteraciones conductuales conllevan a una alteración en las actividades de la vida diaria del paciente, puede establecerse el diagnóstico de demencia (Villara, Molinuevo, & Gómez, 2008).

En el área cognitiva, la mayoría de pacientes con EA (60-70%) siguen un patrón evolutivo típico. Se inicia con una pérdida insidiosa de la memoria episódica, de manera que el paciente es incapaz de recordar hechos recientes, mientras que la memoria a largo plazo (remota) se mantiene hasta estadios avanzados. Posteriormente, aparecen déficit cada vez más marcados en otros dominios cognitivos, como la orientación, el lenguaje, las praxias, la función ejecutiva (de hecho, para el diagnóstico de demencia son necesarios déficit en 2 dominios), que se traducen en dificultad para orientarse en lugares familiares, problemas con el manejo del dinero o instrumentos cotidianos, como el teléfono o la lavadora, dificultades para leer y escribir, o para reconocer caras familiares (Villara, Molinuevo, & Gómez, 2008).

El síntoma conductual más frecuente es la apatía, sin una clara afeción del estado de ánimo, lo que permite diferenciarla del síndrome depresivo. A pesar de que estos síntomas son los más conocidos, la EA cursa, con frecuencia, con otros síntomas conductuales y afectivos, como alucinaciones visuales o auditivas e ideas delirantes (en el 40-70%), generalmente de robo o infidelidad. Otros son agitación psicomotriz, irritabilidad y desinhibición. Hasta aquí, se ha descrito la forma más frecuente de EA, pero esta enfermedad es clínicamente muy heterogénea, y su expresión clínica puede variar ampliamente, ya sea por la edad de inicio (antes de los 65 años), por los síntomas iniciales o por la localización focal (Boller, Mizutani, Roessman, & Gambetti, 2004)

2.2.1.5 Tratamiento

Tabla 1. Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer (Rang & Dale, 2012)

Inhibidores de la acetilcolinesterasa central	
Tacrina, Donepecilo, Rivastigmina, Galantamina	Se utilizan en formas leves a moderadas de la enfermedad. Registran efectos colinérgicos adversos
Antagonistas del receptor NMDA	
Memantina	Utilizado en formas graves de la enfermedad. No registra retraso en la neurodegeneración.
Anticuerpos beta-amiloide y de la proteína Tau	
Bapineuzumab, Crenezumab, Ponezumab, Solanezuma.	Nuevas estrategias terapéuticas. Se encuentran en ensayos clínicos. Tóxicos para el sistema inmunológico y tubo digestivo

Los avances recientes y los medicamentos disponibles, permiten la estabilización y la mejoría del funcionamiento cognitivo, e incluso de manifestaciones conductuales y de las habilidades funcionales del paciente, cuando estos tratamientos se inician en las fases tempranas de la enfermedad. Desafortunadamente, aún falta muchos años de investigación para que se alcance la cura de la enfermedad. (Llibre & Guerra, 1999)

2.2.2 Glutamato y su relación con la EA

El glutamato es el principal aminoácido excitatorio en el SNC y tiene una estrecha relación con las células piramidales, que son las neuronas más vulnerables en la EA. Ellas utilizan glutamato como neurotransmisor y reciben aferencias glutamatérgicas. La pérdida de estas neuronas, ocasionada por altas concentraciones de glutamato, resulta un hecho fundamental en la fisiopatología de la EA por la importancia de estas en el proceso del aprendizaje (Gazulla & Nagore, 2006).

La muerte neuronal ocasionada por los altos niveles de glutamato en la hendidura sináptica se denomina excitotoxicidad. La excitotoxicidad ocurre por una sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, que en consecuencia permiten una excesiva entrada de calcio a la célula. La elevación anormal de los niveles de

Ca^{2+} intracelular (Figura 1), altera diferentes vías de señalización, aumenta la liberación de glutamato y explica la causa de muerte neuronal por mecanismos excitotóxicos. También, produce una alteración citoesquelética que semeja la degeneración neurofibrilar característica de la EA (Tovar, 2006)

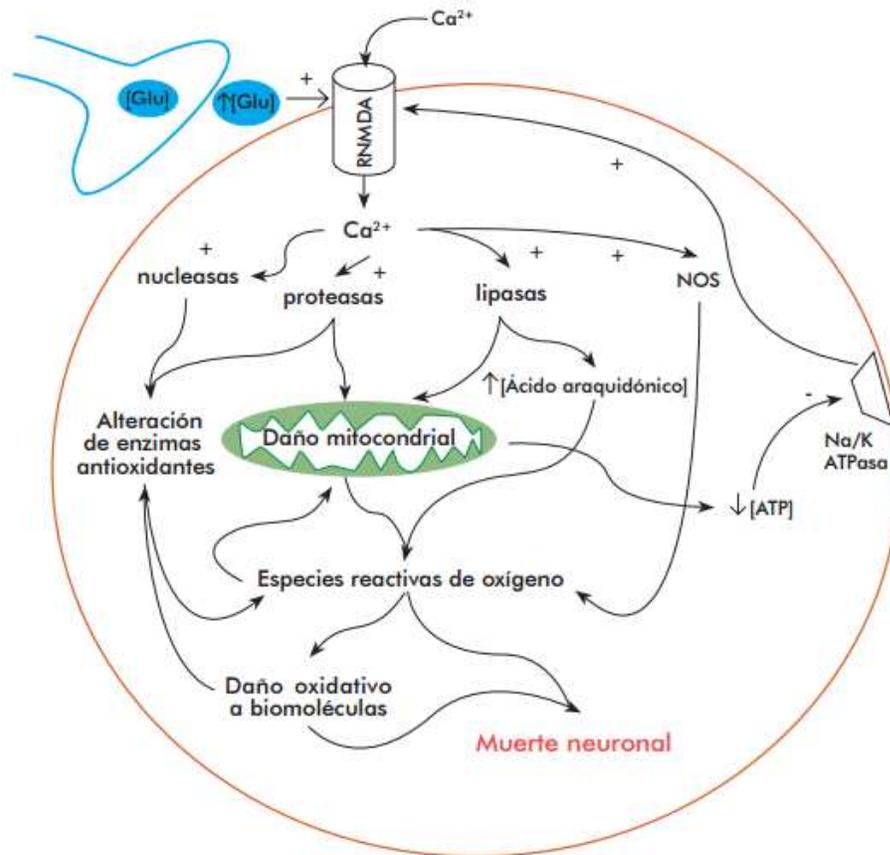


Figura 1. Mecanismo de excitotoxicidad. La sobreactivación de los receptores NMDA, permite un incremento anormal de calcio intracelular. Esto ocasiona un aumento del calcio mitocondrial y de la concentración de ácido araquidónico, factores implicados en la disfunción metabólica, la producción de radicales libres, la activación de proteasas, fosfolipasas, la óxido nítrico sintasa y endonucleasas, y la inhibición de la síntesis de proteínas. También por la acumulación de calcio en la matriz mitocondrial, se genera una despolarización neuronal liberando más glutamato al espacio extracelular y se inhibe o invierte la captación de glutamato. Por último, dado la alteración mitocondrial y en el retículo endoplásmico, se reduce la síntesis de ATP, ocasionando un déficit energético (Lorigados, Orozco, & Morales, 2013).

2.2.2.1 Expresión de receptores NMDA en el hipocampo

Las neuronas hipocampales están relacionadas con los procesos de memoria y aprendizaje y son capaces de establecer un tipo distinto de sinapsis que necesita la expresión de un tipo especial de receptores de membrana. En estado de reposo las neuronas del hipocampo tienen dos tipos de receptores a los que se une el glutamato. Unos se abren inmediatamente al reconocer y unirse al glutamato permitiendo la entrada de Na^+ que produce la despolarización de la célula postsináptica. El otro tipo de receptor, el NMDA, que se encuentra bloqueado por Mg^{2+} en estado de reposo, sólo se abre si el estímulo es prolongado e intenso (una hora o más), lo que se denomina “potenciación a largo plazo” (Bustamante, 2007). Ante un estímulo prolongado se libera el Mg^{2+} y se produce la apertura de estos receptores NMDA y entra Ca^{2+} hacia el interior de la neurona postsináptica. Es fundamental que se den las dos condiciones para la entrada del Ca^{2+} , la unión de glutamato a NMDA y el desbloqueo del canal por un estímulo prolongado (FIBAO, 2008).

2.2.2.2 Receptores opiáceos y su relación con los receptores NMDA

Actualmente se conocen 4 tipos de receptores opiáceos μ , δ , κ , ORL_1 . Todos ellos son acoplados a proteínas G (G_i/G_o). Tras la estimulación de un receptor opiáceo se produce una inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, con reducción de la concentración del AMPc y de la actividad de la proteinquinasa dependiente de AMPc (PKA), lo que resulta en una disminución de la fosforilación de proteínas. Además, se produce una facilitación del cierre de los canales de calcio en las neuronas presinápticas, por lo que se reduce la liberación de neurotransmisor, así como, la apertura de canales de potasio (GIRK) de las neuronas postsinápticas, lo que provoca una hiperpolarización de la membrana y como consecuencia una reducción de su activación. Por tanto, son receptores que median acciones inhibitorias (Villarejo & Murillo, 2000). No obstante, aumentan la actividad en algunas vías neuronales. Ello ocurre por un proceso de desinhibición mediante el cual causan excitación de las neuronas de proyección por supresión de las descargas de las interneuronas inhibitorias, que inhiben las neuronas de proyección (Rang & Dale, 2012). Esta es una respuesta por la cual puede ocurrir una actividad inhibitoria sobre neuronas que poseen receptores glutamatérgicos.

Un potente agonista de los KOP con propiedades físicas únicas es la Salvinorina A. El cual es un metabolito secundario encontrado en los extractos de la *Salvia divinorum*. Se encuentra en mayor proporción al resto de metabolitos secundarios que están contenidos en la planta. Se conoce que este ligando lipófilo carece de una amina ionizable, característica clave de la mayoría de los ligandos opiáceos. Aunque se ha aprendido mucho sobre la base estructural para el reconocimiento de los opiáceos y ligandos aminérgicos relacionados, nuestra comprensión de cómo la Salvinorina A y otros ligandos no básicos reconocen a los receptores

opioides es limitada. Aunque varios residuos transmembrana (TM) II y VII han sido implicados en el reconocimiento de los KOP (Yan, Bikbulatov, Mocanu, Dicheva, Parker, & Wetsel, 2009)

En el presente proyecto se ha considerado un posible efecto que genera la Salvinorina A al unirse a su receptor y explicaría por qué se puede encontrar una respuesta neuroprotectora en la neuronas hipocampales sometidas a una concentración excitotóxica de glutamato. Dicha hipótesis se ha basado en el mecanismo de acción de la Metadona, el cual ya se conoce. Por una parte, se tiene el receptor opioide, el cual esta acoplado a proteínas G inhibitorias. Al unirse la Salvinorina A al KOP se desencadena una modulación inhibitoria en la transmisión sináptica a la proteína efectora, en este caso la Adenil ciclasa. Consecuentemente se genera una disminución en el AMPc. Esto lleva a varias implicaciones, entre la más destacada es que la proteína quinasa, en especial la dependiente de AMPc (PKA), permanece inactiva a bajas concentraciones de este segundo mensajero y por lo cual no podría fosforilar proteínas, como los receptores NMDA. A su vez, los receptores NMDA se encuentran bloqueados por Mg^{2+} en estado de reposo, la única forma de activarlos sería con la translocación y activación de la proteína quinasa, pero al estar estas últimas intactas, dicho receptor permanecerá inhibido (Davis & Inturrisi, 1998).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Determinar si existe un efecto neuroprotector de extractos de *Salvia divinorum* frente a un exceso constante de glutamato, en un modelo *in vitro* de cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata.

2.3.2 Objetivos Específicos

2.3.2.1 Establecer la concentración de glutamato y el tiempo necesario para inducir muerte en un modelo *in vitro* de neuronas hipocampales de rata

2.3.2.2 Determinar la concentración y el tiempo al cual los extractos de *Salvia divinorum* aumentan el número de neuronas hipocampales de rata que sobreviven frente a una concentración excitotóxica de glutamato.

2.4 Metodología Propuesta:

2.4.1 Preparación de los medios de cultivo

Para empezar, es fundamental la preparación previa de los medios de cultivos en donde se sembrarán las células hipocampales extraídas de la rata. Son células muy vulnerables, que al no tener el medio nutritivo correspondiente, mueren rápidamente generando un sesgo en los resultados esperados.

Los medios de cultivo que se emplearan son:

Tabla 2. Preparación de los medios de cultivo

Enzyme Solution			
Name	Concent. 1	Concent. 2	Vol (1 mL)
Hanks BSS	-	1 X	1700 uL
EDTA pH 7	50 mM	0,5 mM	20 uL
DNase I	0,01 mg/mL	2x10 ⁻⁴ mg/mL	40 uL
Trypsine	2.5%	0.3%	240 uL
Plating Medium			
Name	Concent. 1	Concent. 2	Vol (50 mL)
MEM (Earle's + L-Glu)	-	1 X	43,5 mL
D-Glucose	50%	0,5%	500 uL
Sodium pyruvate	100 mM	1 mM	500 uL
FBS	100%	10%	5 mL
Pen/Strep/Amph B	100 X	1 X	500 uL
Neuronal Medium			
Name	Concent. 1	Concent. 2	Vol (50 mL)
Neurobasal	-	1 X	47,5 mL
Glutamax-I	100 X	1 X	500 uL
D-Glucose	50%	0,5%	500 uL
Pen/Strep/Amph B	100 X	1 X	500 uL
B27	50 X	1 X	1 mL
AraC	1000 uM	0,4 uM	20 uL

2.4.2 Cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata

Los cultivos que se realizaron corresponden a cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratas Wistar pertenecientes al Bioterio de la Universidad Icesi.

Para esto, se sacrificaron ratas recién nacidas (día postnatal P0 a P2), dado que según el protocolo, las ratas con un mayor rango de edad, sus células al estar más adultas tienden a morir con mayor brevedad y no se podría realizar el ensayo completo asegurando una determinada cantidad de células vivas. Además, una ventaja de trabajar con ratas recién nacidas es que sus células neuronales se encuentran más puras y hay menor probabilidad de crecimiento de otras células.

Posteriormente se hizo una fractura al cráneo con el propósito de extraer el cerebro, e inmediatamente se colocó en un medio de disección frío que ayuda a prevenir la muerte celular de las neuronas mientras se extrae el hipocampo.

Las células deben ser separadas del tejido y de la agregación entre ellas mismas, para lo cual se utilizó una solución enzimática (Enzyme solution), que las separen de su matriz extracelular.

Después se realizó el cultivo, para lo cual se colocó las células en platos especializados con poli-L-lisina 1 mg/mL que promueva la adhesión celular, y se sembraron en medio de siembra (Plating medium).

El medio de siembra fue reemplazado a las cuatro horas de haber sido utilizado. El nuevo medio corresponde a medio neuronal (Neuronal médium). El medio fue cambiado 2 veces a la semana.

2.4.3 Determinación de la concentración de glutamato

Inicialmente se determinó la concentración de glutamato capaz de matar a las células hipocampales de rata. Para ello se empleó el ensayo MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa; ella genera un compuesto coloreado de color azul denominado formazán, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Catro, 2006).

El ensayo se realizó en una placa de microtitulación, la cual previamente contenía el respectivo medio de cultivo y en donde se distribuyeron las diferentes concentraciones de glutamato a evaluar. Por último, por medio de una determinación espectrofotométrica de las sales de formazán, se midió las

absorbancias con un lector de platos. Las absorbancias obtenidas indican la cantidad de células vivas por cada tratamiento.

Las concentraciones de glutamato evaluadas fueron entre: 1 mM, 10 mM y 100 mM. Se evaluaron 2 tiempos: 1 hora y 2 horas de exposición al glutamato.

2.4.4 Evaluación de la concentración de extractos de *S. divinorum*

Se prosiguió con la determinación de la concentración y el tiempo al cual los extractos de *Salvia divinorum* aumentan el número de neuronas hipocámpales de rata que sobreviven frente a la concentración excitotóxica de glutamato, ya determinada.

Para esto, de nuevo se utilizaron 2 placas de microtitulación, dado que el ensayo se realizó en 2 tiempos diferentes, 1 hora y 2 horas. Las concentraciones de extracto que se evaluaron variaron entre 1 ng/mL y 100 ug/mL.

Los extractos de *S. divinorum* fueron obtenidos en el laboratorio de productos naturales y fitoquímica de la facultad de ciencias naturales de la Universidad Icesi. Allí se realizó la extracción de los metabolitos principales de dicha planta. Debido a que los extractos se encuentran en forma sólida, se implementó un vehículo líquido, DMSO, que sea capaz de solubilizar al extracto y además su composición no influya en los resultados del experimento.

Después, se realizó el ensayo de viabilidad celular con MTT, tal como se realizó para el glutamato, para así determinar si los extractos protegen frente al estrés inducido por glutamato

2.4.5 Análisis estadístico de los resultados

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se organizaron 6 grupos de datos, que recibieron los nombres de Glutamato 1 hora, Glutamato 2 horas, extracto de *Salvia divinorum* 1 hora (SD 1h), extracto de *Salvia divinorum* 2 horas (SD 2h), extracto de *Salvia divinorum* 1 hora en escala de ng/mL (SD 1h ng/mL) y extracto de *Salvia divinorum* 2 horas en escala de ng/mL (SD 2h ng/mL). Se sometieron a una prueba de normalidad. En este caso, debido a la poca cantidad de datos obtenidos en la prueba ($n < 50$), se aplicó el test de Shapiro-Wilk, que se implementa para contrastar la normalidad de un conjunto de datos para muestras pequeñas.

A aquellos grupos de datos que pasaron la prueba de normalidad se les realizó una ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey para comparar todos los tratamientos entre sí.

A los grupos de datos que no pasaron la prueba de normalidad se les realizó una prueba de Kruskal-Wallis con una prueba post-hoc de Dunn. Las cuales se caracterizan, porque permiten determinar si las medianas de dos o más grupos difieren cuando tienen datos que no son simétricos. La prueba de Kruskal-Wallis es una alternativa no paramétrica al ANOVA de un solo factor. La prueba no requiere que los datos sean normales, sino que utiliza la clasificación de los valores de los datos en lugar del valor real de los datos para el análisis (Minitab Inc., 2016).

Para todos los grupos de datos se tomó el vehículo como control positivo y todos los datos fueron comparados contra este.

2.4.6 Matriz Lógica

Tabla 3. Matriz de marco lógico

OBJETIVO GENERAL			
Determinar si existe un efecto neuroprotector de extractos de <i>Salvia divinorum</i> frente a un exceso constante de glutamato, en un modelo in vitro de cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata.			
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	ACTIVIDADES	SUPUESTOS	INDICADOR
Objetivo específico 1: Establecer la concentración de glutamato y el tiempo necesario para inducir muerte en un modelo in vitro de neuronas hipocampales de rata	<ul style="list-style-type: none"> Investigar en libros y artículos qué relación tiene la muerte celular causada por glutamato y la generación de la enfermedad del Alzheimer. Conocer y distinguir el modelo celular en estudio Practicar en el implemento de cultivos in vitro de células animales con personas expertas Investigar las condiciones adecuadas para la conservación de los cultivos in vitro celulares 	<ul style="list-style-type: none"> Cumplir con el protocolo de manejo adecuado de modelos neuronales de animal Existencia de sesgo a la hora de adicionar y cuantificar las concentraciones excitotóxicas de glutamato en las células. Correcta implementación de la metodología para reconocer la muerte celular No se cuente 	<p>Protocolo de buenas prácticas de elaboración en un modelo de cultivo celular animal</p> <p>Obtención de muerte celular en tejidos hipocampales de rata por una concentración de glutamato inducido en un tiempo determinado</p>

	<ul style="list-style-type: none"> • Estudiar los protocolos de esterilización de un cuarto de cultivo • Solicitar los reactivos necesarios para realizar el estudio sobre el cultivo <i>in vitro</i> • Asesoramiento con personal experto en la utilización de equipos, reactivos y materiales a manipular en el cuarto de cultivo • Encontrar en la bibliografía valores de concentración y tiempo en donde el glutamato sea excitotóxico en las células de un organismo animal • Conocer y ensayar la metodología por la cual se verificara la muerte o degeneración celular 	<p>con las condiciones necesarias para la supervivencia del cultivo celular</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ocurra una contaminación en la fase de estudio sobre el cultivo <i>in vitro</i> 	
Objetivo específico 2:	<ul style="list-style-type: none"> • Investigar artículos científicos sobre el mecanismo de acción de los extractos más importantes de la <i>Salvia divinorum</i> • Solicitar la muestra de extractos de <i>Salvia divinorum</i> • Asesoramiento sobre las condiciones químicas, físicas, biológicas y microbiológicas adecuadas para realizar una correcta utilización de la muestra • Realizar la adición 	<ul style="list-style-type: none"> • Implementar una adecuada metodología estadística comparativa que permita determinar si la muestra de extractos de <i>Salvia divinorum</i> generan un efecto neuroprotector frente al glutamato 	<p>Analizar el número de células sobrevivientes luego de la adición de extractos de <i>Salvia divinorum</i> frente a una concentración excitotóxica de glutamato</p>

	<p>de los extractos de <i>Salvia divinorum</i> bajo concentraciones y tiempos controlados</p> <ul style="list-style-type: none"> • Implementar metodologías colorimétricas para la diferenciación de células que sobreviven o mueren durante el tratamiento con la muestra y el glutamato • Realizar un conteo de células sobrevivientes al tratamiento por medio de técnicas espectrofotométricas • Emplear un análisis estadísticos que permita realizar comparaciones múltiples, para evidenciar si los extractos de <i>Salvia divinorum</i> generan un efecto neuroprotector frente al glutamato 		
--	---	--	--

2.5 Resultados

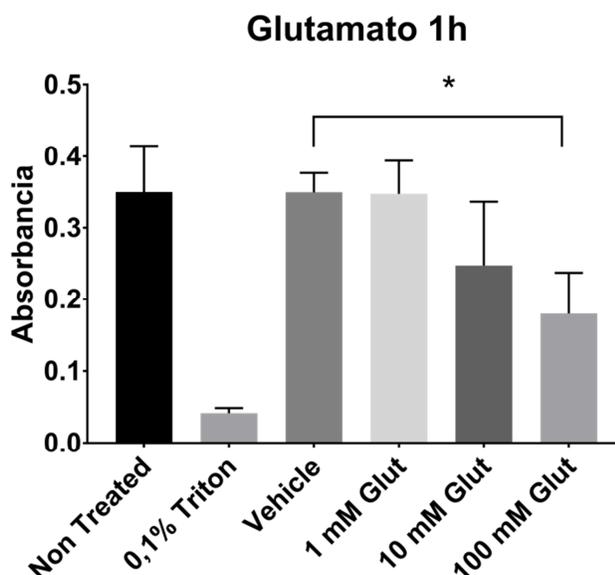
El primer resultado que se encontró fue parametrizar la concentración necesaria de glutamato capaz de producir degeneración y muerte en un modelo *in vitro* de neuronas hipocampales de rata, dado que con ella se evaluó la funcionalidad del compuesto de interés.

Adicionalmente, se realizó las mismas pruebas de toxicidad hechas para el glutamato, pero aplicadas al extracto de *S. divinorum* en las células neuronales en estudio. Con el fin de tener un control y balance de la acción de la *Salvia* sobre las células, dados los pocos antecedentes encontrados.

El resultado definitivo fue encontrar la concentración de extracto de *Salvia divinorum* que aumente el número de neuronas hipocampales sobrevivientes a una concentración excitotóxica de glutamato, ya estipulada.

A continuación se muestran los resultados destacados de las pruebas realizadas durante todo el proyecto, llevadas a cabo con el fin de cumplir los objetivos propuestos.

Mediante un test de normalidad Shapiro–Wilks, se analizaron estadísticamente los datos. Con un $\alpha = 0,05$, se determinó qué grupo de datos cumplió con el supuesto de normalidad.

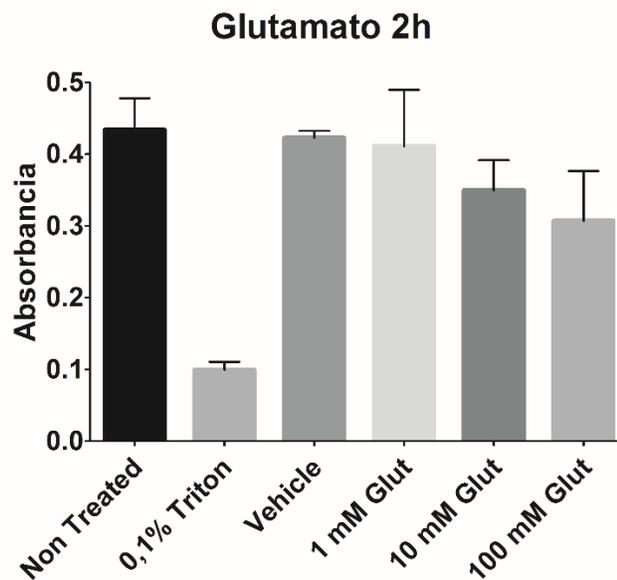


Gráfica 1. Prueba de toxicidad del Glutamato en células de hipocampo de rata. Absorbancias obtenidas después de 1 hora de tratamiento y sometida al ensayo MTT 24 horas después. En la prueba se evaluó células no tratadas; 0,1% de Tritón, como control positivo; vehículo del glutamato, que fue un buffer salino y control negativo de la prueba; y concentraciones de 1, 10 y 100 mM de glutamato.

El grupo de datos de glutamato 1h cumplió el supuesto de normalidad. Se realizó un ANOVA junto a la prueba de comparación múltiple de Tukey, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

El ANOVA mostró que en el único grupo de datos que se observa una diferencia estadísticamente significativa es en el que las células fueron tratadas con Glutamato 100 mM por 1h. En el resto de resultados solo se observan tendencias.

De acuerdo con la prueba de Tukey, tal como se aprecia en el anexo 1, se encontró que para Glutamato 1h, las comparaciones que dieron con valores p menores de 0,05 fueron: A-B ($p < 0.0001$); A-F ($p = 0,0108$); B-C ($p < 0.0001$); B-D ($p < 0.0001$); B-E ($p = 0,0023$); B-F ($p = 0,0450$); C-F ($p = 0,0182$); y D-F ($p = 0,0197$). En los cuales, existe diferencias entre dichos tratamientos comparados. Las comparaciones que dieron valores p mayores a 0.05 fueron: E-F ($p = 0,6528$); D-E ($p = 0,2720$); C-D ($p > 0.9999$); C-E ($p = 0,2546$); A-C ($p > 0.9999$); A-D ($p > 0.9999$); y A-E ($p = 0,1949$). En los cuales, no existe diferencias entre dichos tratamientos comparados.

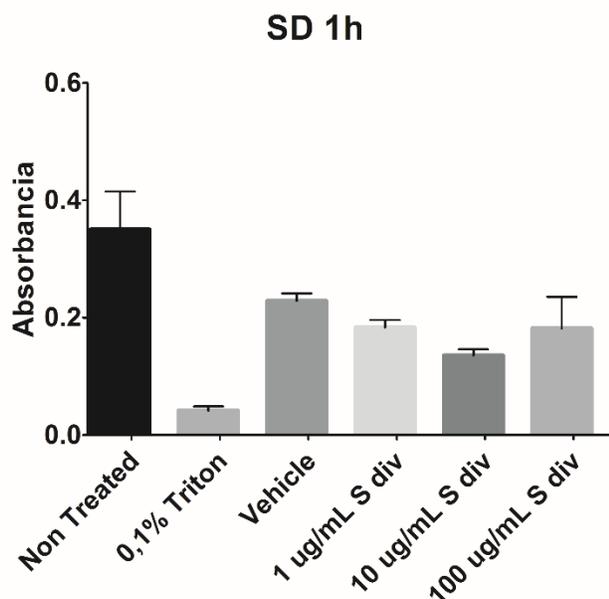


Gráfica 2. Prueba de toxicidad del Glutamato en células de hipocampo de rata. Absorbancias obtenidas después de 2 horas de tratamiento y sometida al ensayo MTT 24 horas después. En la prueba se evaluó células no tratadas; 0,1% de Tritón, como control positivo; vehículo del glutamato, que fue un buffer salino y control negativo de la prueba; y concentraciones de 1, 10 y 100 mM de glutamato.

El grupo de datos de glutamato 2h no cumplió el supuesto de normalidad. Por lo cual, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con una prueba post-hoc de Dunn, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

De acuerdo con la prueba de múltiple comparación de post-hoc de Dunn, tal como se aprecia en el anexo 1, se encontró que para Glutamato 2h, la comparación que

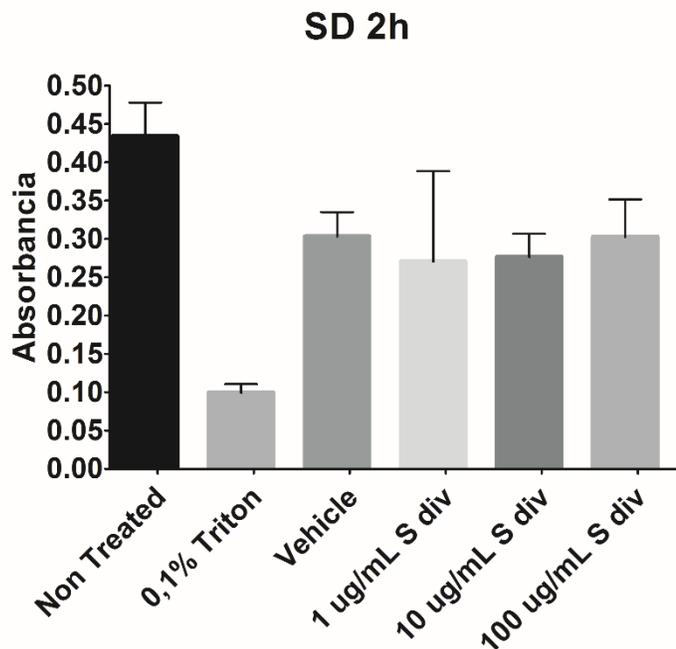
dio con valor p menor de 0,05 fue: A-B ($p=0,0343$); En el cual, existe diferencia entre dichos tratamientos comparados. Las comparaciones que dieron valores p mayores a 0.05 fueron: A-C ($p>0.9999$), A-D ($p>0.9999$), A-E ($p>0.9999$), A-F ($p>0.9999$), B-C ($p=0,0672$), B-D ($p=0,1057$), B-E ($p>0.9999$), B-F ($p>0.9999$), C-D ($p>0.9999$), C-E ($p>0.9999$), C-F ($p>0.9999$), D-E ($p>0.9999$), D-F ($p>0.9999$), E-F ($p>0.9999$). En los cuales, no existe diferencias entre dichos tratamientos comparados.



Gráfica 3. Prueba de toxicidad de los extractos de *Salvia* en células de hipocampo de rata. Absorbancias obtenidas después de 1 hora de tratamiento y sometida al ensayo MTT 24 horas después. En la prueba se evaluó células no tratadas; 0,1% de Tritón, como control positivo; vehículo del extracto, que fue DMSO y control negativo de la prueba; y concentraciones de 1, 10 y 100 ug/mL de extractos de *Salvia d.*

El grupo de datos de SD 1h cumplió el supuesto de normalidad. Se realizó un ANOVA junto a la prueba de comparación múltiple de Tukey, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

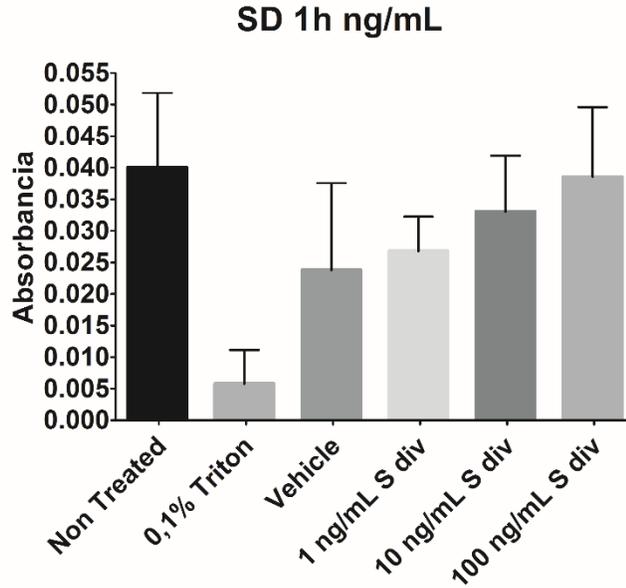
De acuerdo con la prueba de Tukey, tal como se aprecia en el anexo 1, se encontró que para SD 1h, las comparaciones que dieron con valores p menores de 0,05 fueron: A-B ($p<0.0001$), A-C ($p=0,0083$), A-D ($p=0,0005$), A-E ($p<0.0001$), A-F ($p=0,0004$), B-C ($p=0,0001$), B-D ($p=0,0023$), B-E ($p=0,0485$), B-F ($p=0,0025$). En los cuales, existe diferencias entre dichos tratamientos comparados. Las comparaciones que dieron valores p mayores a 0.05 fueron: C-D ($p=0,6694$), C-E ($p=0,0730$), C-F ($p=0,6439$), D-E ($p=0,6311$), D-F ($p>0.9999$), E-F ($p=0,6567$). En los cuales, no existe diferencias entre dichos tratamientos comparados.



Gráfica 4. Prueba de toxicidad de los extractos de *Salvia* en células de hipocampo de rata. Absorbancias obtenidas después de 2 horas de tratamiento y sometida al ensayo MTT 24 horas después. En la prueba se evaluó células no tratadas; 0,1% de Tritón, como control positivo; vehículo del extracto, que fue DMSO y control negativo de la prueba; y concentraciones de 1, 10 y 100 ug/mL de extractos de *Salvia d.*

El grupo de datos de SD 2h no cumplió el supuesto de normalidad. Por lo cual, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con una prueba post-hoc de Dunn, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

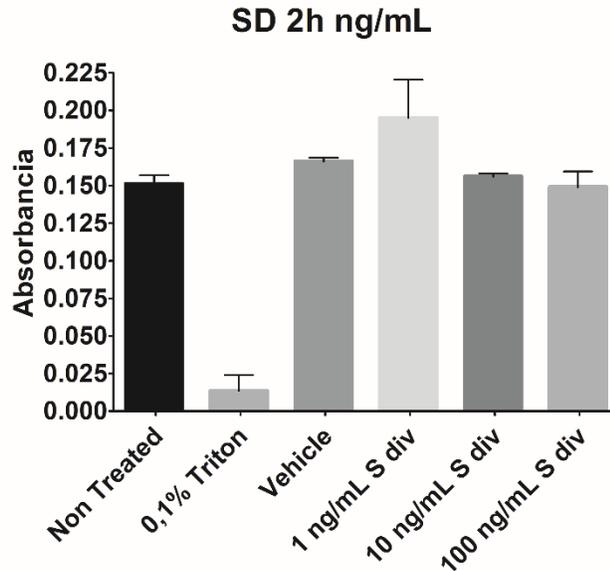
De acuerdo con la prueba de múltiple comparación de post-hoc de Dunn, tal como se aprecia en el anexo 1, se encontró que para SD 2h, la comparación que dio con valor p menor de 0,05 fue: A-B ($p=0,0025$). En el cual, existe diferencia entre dichos tratamientos comparados. Las comparaciones que dieron valores p mayores a 0.05 fueron: A-C ($p>0.9999$), A-D ($p=0,7255$), A-E ($p=0,7255$), A-F ($p>0.9999$), B-C ($p=0,5316$), B-D ($p>0.9999$), B-E ($p>0.9999$), B-F ($p=0,6362$), C-D ($p>0.9999$), C-E ($p>0.9999$), C-F ($p>0.9999$), D-E ($p>0.9999$), D-F ($p>0.9999$), E-F ($p>0.9999$). En los cuales, no existe diferencias entre dichos tratamientos comparados.



Gráfica 5. Prueba de toxicidad de los extractos de *Salvia* en células de hipocampo de rata. Absorbancias obtenidas después de 1 hora de tratamiento y sometida al ensayo MTT 24 horas después. En la prueba se evaluó células no tratadas; 0,1% de Tritón, como control positivo; vehículo del extracto, que fue DMSO y control negativo de la prueba; y concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL de extractos de *Salvia d.*

El grupo de datos de SD 1h ng/mL cumplió el supuesto de normalidad. Se realizó un ANOVA junto a la prueba de comparación múltiple de Tukey, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

De acuerdo con la prueba de Tukey, tal como se aprecia en el anexo 1, se encontró que para SD 1h ng/mL, las comparaciones que dieron con valores p menores de 0,05 fueron: A-B ($p=0,0128$), B-E ($p=0,0070$). En los cuales, existe diferencias entre dichos tratamientos comparados. Las comparaciones que dieron valores p mayores a 0.05 fueron: A-C ($p=0,6486$), A-D ($p=0,6430$), A-E ($p=0,3127$), A-F ($p>0,9999$), B-C ($p=0,3586$), B-D ($p=0,1159$), B-F ($p=0,0764$), C-D ($p=0,9983$), C-E ($p=0,8056$), C-F ($p=0,8121$), D-E ($p=0,9309$), D-F ($p=0,4016$), E-F ($p=0,9705$). En los cuales, no existe diferencias entre dichos tratamientos comparados.



Gráfica 6. Prueba de toxicidad de los extractos de *Salvia* en células de hipocampo de rata. Absorbancias obtenidas después de 2 horas de tratamiento y sometida al ensayo MTT 24 horas después. En la prueba se evaluó células no tratadas; 0,1% de Tritón, como control positivo; vehículo del extracto, que fue DMSO y control negativo de la prueba; y concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL de extractos de *Salvia d.*

El grupo de datos de SD 2h ng/mL cumplió el supuesto de normalidad. Se realizó un ANOVA junto a la prueba de comparación múltiple de Tukey, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

De acuerdo con la prueba de Tukey, tal como se aprecia en el anexo 1, se encontró que para SD 2h ng/mL, las comparaciones que dieron con valores p menores de 0,05 fueron: A-B ($p=0,0019$), B-C ($p=0,0003$), B-D ($p=0,0044$), B-E ($p=0,0007$), B-F ($p=0,0023$). En los cuales, existe diferencias entre dichos tratamientos comparados. Las comparaciones que dieron valores p mayores a 0.05 fueron: A-C ($p=0,1567$), A-D ($p=0,2421$), A-E ($p=0,4556$), A-F ($p=0,9994$), C-D ($p=0,3368$), C-E ($p=0,0976$), C-F ($p=0,1452$), D-E ($p=0,2661$), D-F ($p=0,0669$), E-F ($p=0,8444$). En los cuales, no existe diferencias entre dichos tratamientos comparados.

2.6 Discusión

Con el propósito de cumplir a cabalidad con los objetivos, en primera instancia se realizó una prueba que determinara el grado de toxicidad de las concentraciones de glutamato. En segunda instancia, se realizaron pruebas de toxicidad a los extractos de *Salvia*. En ambas pruebas, simultáneamente se evaluó el efecto de los vehículos de disolución implementados, como también, de los controles positivos y negativos aplicados a un cultivo celular de neuronas de hipocampo de rata. Por lo que se realizaron 3 pruebas de toxicidad divididas en: concentraciones de glutamato, extracto de *Salvia* en concentraciones de $\mu\text{g/mL}$ y extractos de *Salvia* en concentraciones de ng/mL . En cada una de las 3 pruebas se implementaron 2 placas de microtitulación con tratamientos de 1 y 2 horas.

Los primeros ensayos realizados del proyecto arrojaron resultados poco esperados y que no fueron del todo satisfactorios, porque presentaron alta desviación, datos atípicos e inconsistencia en las pruebas realizadas. Como se especificará más adelante, ha habido una constante de dificultades en el procedimiento experimental que han generado lo anterior. Por lo cual, se hizo necesario replicar los ensayos en la búsqueda de unos resultados concluyentes. En total se hicieron 3 cultivos independientes. En cada cultivo se hicieron 4 réplicas de cada tratamiento. Finalmente, se exponen los datos del último cultivo celular hecho, de los que se obtuvo resultados más robustos, consistentes al planteamiento del proyecto.

Para la primera prueba, en la que se evaluaron las concentraciones de glutamato, se resaltó lo siguiente: La grafica 1, muestra los resultados obtenidos del ensayo hecho con glutamato para 1 hora. Se observó que a medida que va aumentando la concentración de glutamato, disminuye la absorbancia. Lo que quiere decir que la cantidad de células neuronales vivas disminuyó. Por lo tanto, la concentración de 100 mM es la más excitotóxica. La grafica tiene un comportamiento lineal y con desviaciones poco relevantes.

Por su parte, el grafico 2 ilustra los resultados para un tratamiento de 2 horas. Se resalta que existe el mismo comportamiento del glutamato con respecto a la gráfica 1. Sin embargo, la proporción de las absorbancias entre estas dos gráficas, muestra que hay menores absorbancias en la gráfica 1 que en la 2. Esto indica que las concentraciones de glutamato para condiciones de 2 horas de tratamiento, consiguen una menor muerte excitotóxica en las células.

Los antecedentes en este tipo de ensayos han demostrado que existe una mayor muerte neuronal en el cultivo celular en estudio, cuando ocurre una excitotoxicidad causada por glutamato en altas concentraciones y con ascendentes tiempo de exposición a este neurotransmisor (Jacques, Rieger, Maestri, López, & Pérez, 2013). Sin embargo, experimentalmente se demostró lo contrario. Esto posiblemente pudo deberse a que el medio favoreció la proliferación de otras

células como astrocitos y microglia durante el tratamiento. Previamente, para evitar este tipo de errores en el laboratorio, los cultivos fueron tratados con AraC que impide el crecimiento de células proliferativas. Sin embargo, este agente también afectó el desarrollo de las neuronas.

Una variable persistente durante todos los ensayos realizados, fue la cantidad de células sembradas en cada tratamiento. Experimentalmente es complejo mantener dicha variable constante, ya que luego de realizar la disgregación de las células de interés y obtener una suspensión celular, se continúa con el conteo celular por medio de la cámara de Neubauer, método con un porcentaje considerable de incertidumbre y de poca sensibilidad. Consiste en realizar una aproximación de la cantidad de células en un volumen total de suspensión celular. Este método fue implementado con la finalidad de encontrar el volumen de suspensión celular que debe ser adicionado a cada pozo de la placa de microtitulación, dependiendo adicionalmente del número de células por pozo que se desea sembrar. Por tanto, las desviaciones en este tipo de métodos, deben ser tenidos en cuenta en las consideraciones de los resultados y más cuando se evalúa viabilidad celular. También, se convierte en una explicación de los comportamientos de las gráficas 1 y 2, en el que las tendencias de estas pueden ser las mismas, pero sus proporciones pueden ser mayores o menores.

En ambas gráficas se evidencia que el vehículo del glutamato, buffer salino, no tuvo ningún efecto sobre el ensayo, dado que los valores de absorbancia obtenidos para este, fueron muy similares a las absorbancias de las células no tratadas. Además, la desviación de los valores para el vehículo fue muy pequeña, indicando la precisión en los datos y la ausencia de factores extrínsecos que afectaran el resultado. También, se evidenció que el control positivo de la prueba, 0,1% de Tritón, mostró valores de absorbancia aproximados a cero, lo cual era lo esperado. El tritón es un detergente no iónico usado para desnaturalizar las membranas de las células. Este detergente rompe los conglomerados de proteínas para promover la actividad enzimática y muerte celular (Johnson, 2013).

Para la segunda prueba, en la que se evaluaron las concentraciones en ug/mL de los extractos de *Salvia d.*, se resaltó lo siguiente: La gráfica 3, muestra los resultados del ensayo hecho con los extractos de *Salvia* para 1 hora de tratamiento. No evidencia una tendencia concluyente entre las concentraciones manejadas, dado que hay comportamiento asimétrico entre ellas. A pesar de ese comportamiento, cabe mencionar que los valores de absorbancia obtenidos están pronunciadamente por debajo de la absorbancia del vehículo, de tal forma que están generando un efecto negativo en la supervivencia celular.

Por su parte, el gráfico 4 ilustra los resultados del ensayo hecho con los extractos de *Salvia* para un tratamiento de 2 horas. El ensayo muestra que no hubo una diferencia significativa entre las concentraciones del extracto. La concentración de 100 ug/mL es la que más se aproxima a la absorbancia promedio obtenida para el

vehículo y por lo cual, es en la que hay una menor toxicidad en las células neuronales.

Esta segunda prueba permitió inferir: por un lado, sobre el efecto del DMSO, que es el vehículo del extracto, sobre las células hipocámpales. En la mayoría de los estudios encontrados sobre la funcionalidad, caracterización y separación por cromatografía líquida de los metabolitos de la *Salvia divinorum*, las investigaciones se han realizado mediante una dilución previa de los extractos en dimetilsulfóxido (Capasso, Borrelli, Capasso, & Siebert, 2006) (Braidá, Capurro, Zani, Rubino, & Viganò, 2009).

Para este proyecto los extractos se recibieron en estado sólido y era necesaria su dilución para poder realizar el ensayo de viabilidad celular. Los extractos al encontrarse en una matriz orgánica, conllevaba al uso del DMSO que es un disolvente aprótico y altamente polar. El cual, es miscible tanto con el agua como con disolventes orgánicos; puede formar complejos en sistemas biológicos. A pesar de las propiedades de dicho disolvente, solubilizar los extractos fue bastante complejo, ya que fue imposible desaparecer el precipitado. Por lo cual, no fue posible mantener una plena disolución de estos. Además, se debió tener muy en cuenta la apropiada dilución del DMSO, ya que en concentraciones considerables, tiene incidencia en la supervivencia celular, tal y como se pudo evidenciar en las gráficas 3 y 4. En donde, sus absorbancias estuvieron muy por debajo en comparación con las de las células no tratadas.

En pruebas anteriores dentro de esta investigación, se estipuló concentraciones iniciales de DMSO al 0,13%. No obstante, se evidenció una alta toxicidad del vehículo sobre las células y se planteó manejar una concentración final de 0,013%; concentración con la que se realizó la segunda y tercera prueba de este proyecto.

Por otro lado, se evidenció la reproducibilidad en la efectividad del control positivo, ya que fue el mismo que se implementó en la primera prueba, bajo la misma concentración. Las absorbancias para este control fueron aproximadamente de cero, para ambas gráficas, indicando una aproximada totalidad de la muerte celular en el cultivo.

Con el propósito de conseguir datos más concluyentes, se ejecutó experimentalmente la idea de manipular concentraciones menores de los extractos y se pasara de la escala ug/mL a ng/mL. Se buscó, de esta manera, evidenciar resultados que determinarán la supervivencia de las células frente a los extractos, más allá del efecto indirecto que pudo tener el vehículo sobre el cultivo.

Para la tercera prueba, en la que se evaluaron las concentraciones en ng/mL de los extractos de *Salvia d.*, se resaltó lo siguiente: La gráfica 5, muestra los resultados del ensayo hecho con los extractos de *Salvia* para 1 hora de tratamiento. Se obtuvieron datos por debajo de 0,1 de absorbancia para todos los

tratamientos evaluados. Valores que son muy bajos a comparación de los ensayos anteriormente hechos y que no permiten dar un criterio sobre la viabilidad celular, ya que hubo un alto porcentaje de muerte neuronal. Además, hubo una alta desviación en cada uno de los tratamientos, revelando la poca precisión que tuvo el ensayo.

Por su parte, el grafico 6 ilustra los resultados del ensayo hecho con los extractos de *Salvia* para un tratamiento de 2 horas. A diferencia de la gráfica 5, se obtuvo valores mayores de absorbancia. La tendencia que se marca en la gráfica permite deducir que a medida que aumenta la concentración de *Salvia*, disminuye en un bajo grado la absorbancia

Esta tercera prueba confirma un sesgo que se ha tenido en los ensayos realizados a lo largo de la parte experimental. En la mayoría de los resultados sobre la toxicidad de los extractos, el efecto que indirectamente se ha medido es la del vehículo. Y muy superficialmente se ha evaluado la toxicidad de la *Salvia*. Se reconoce que la planta genera toxicidad en las células, porque no se obtuvo ningún resultado de viabilidad celular que confirmara su inocuidad. Precisamente, las absorbancias obtenidas a lo largo de las concentraciones manejadas entre el rango de 1 ng/mL a 100 ug/mL de extracto, todas han sido iguales o menores a las del vehículo, aparte de los resultados que no generaron un criterio contundente sobre su efecto en las neuronas de hipocampo.

Por último, se tuvo especial relevancia durante todo el análisis es que los extractos no se encontraban puros. Por lo tanto, no solo se estaba evaluando los metabolitos de interés que se encuentran en mayor concentración en la planta, como la Salvinorina A, B y C, sino que también, se encontraban otro tipo de moléculas activas, que muy probablemente tenían influencia en la supervivencia de las neuronas en estudio. Además, porque al no estar puro, la concentración de metabolitos secundarios es alta.

Para finalizar, no se logró determinar la concentración y el tiempo al cual los extractos de *Salvia divinorum* aumentan el número de neuronas hipocampales de rata que sobreviven frente a una concentración excitotóxica de glutamato. Debido a que se presentó un contratiempo durante el desarrollo experimental del proyecto. Específicamente, porque se tuvo dificultad en contar con los animales neonatos, suministrados por el bioterio de la Universidad Icesi, requeridos para hacer los cultivos neuronales. En el semestre, las ratas Wistar que iban naciendo no se pudieron utilizar por restricciones de acceso que tenemos los estudiantes para trabajar en el proyecto durante ciertos días y horarios. Adicionalmente, los últimos animales que se lograron utilizar, luego de efectuar la siembra de las células hipocampales en el cultivo, las células murieron a la semana, imposibilitando realizar el ensayo MTT. Por lo tanto, estos inconvenientes generaron una prologa en la ejecución y obtención de resultados e imposibilitando el cumplimiento del segundo objetivo del proyecto propuesto.

2.7 Conclusiones

- Se encontró que el único grupo de datos en el que se observa una diferencia estadísticamente significativa es en el que las células fueron tratadas con Glutamato 100 mM por 1h. En el resto de resultados solo se observan tendencias.
- Se corroboró que los extractos de la planta *Salvia divinorum*, suministrados por el grupo de investigación de fitoquímica de la Universidad Icesi, afectan la viabilidad celular confirmando que no son inocuos y generan toxicidad en las células hipocampales de rata en un rango de concentraciones de 1 ng/mL hasta 100 ug/mL.

2.8 Recomendaciones

- Llevar un plan de trabajo en conjunto con el Bioterio de la Universidad Icesi, con el propósito de estimar y manipular los tiempos en los que se las ratas Wistar den cría.
- Evaluar la efectividad de las soluciones de AraC empleadas en los cultivos celulares, con el fin de disminuir la proliferación de otros tipos de células en los cultivos.
- Continuar con la estandarización de la concentración y tiempo en el que el glutamato genera excitotoxicidad en las neuronas hipocampales de rata.
- Confirmar a través de nuevos ensayos la toxicidad de los extractos de *Salvia divinorum*, bajo un estudio previo que rectifique la pureza de dichos extractos.
- Realizar un estudio de caracterización de los metabolitos de los extractos de *Salvia divinorum* de la Universidad Icesi.
- Continuar con el proceso de estandarización del vehículo apropiado y la concentración necesaria que sea capaz de solubilizar los extractos de *Salvia divinorum*.

3 BIBLIOGRAFÍA

- Agner, T. (1991). Susceptibility of atopic dermatitis patients to irritant dermatitis caused by sodium lauryl sulphate. *Acta Derm Venereol*, 296-300.
- Alzheimer's Association. (2015). *Información sobre la enfermedad del Alzheimer*. Recuperado el 19 de abril de 2016, de http://www.alz.org/national/documents/sp_brochure_basicsofalz.pdf
- American Cancer Society, Inc. (23 de Septiembre de 1998). *Debunking the Myth*. Recuperado el 16 de abril de 2016, de http://web.archive.org/web/20080704135520/http://www.cancer.org/docroot/nws/content/nws_2_1x_debunking_the_myth.asp
- Boller, F., Mizutani, Y., Roessman, U., & Gambetti, P. (2004). Parkinson disease, dementia and Alzheimer disease: clinicopathological correlates. *Ann Neurology*, 329-335.
- Braida, D., Capurro, V., Zani, A., Rubino, T., & Viganò, D. (2009). Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of salvinorin A, the main active ingredient of *Salvia divinorum*, in rodents. *British Journal of Pharmacology*, 844-853.
- Brion, J. (1998). The role of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease. *Acta Neurologica Belgica*, 165-74.
- Bustamante, E. (2007). Receptores NMDA. En *El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano* (pág. 224). Medellín : Universidad de Antioquia .
- Butterfield, D., & Pocernich, C. (2005). The Glutamatergic System and Alzheimer's Disease: Therapeutic Implications. *CNS Drugs*, 641-652.
- Capasso, R., Borrelli, F., Capasso, F., & Siebert, D. (2006). The hallucinogenic herb *Salvia divinorum* and its active ingredient salvinorin A inhibit enteric cholinergic transmission in the guinea-pig ileum. *Neurogastroenterol Motil* , 69-75.
- Catro, C. (1 de Diciembre de 2006). *Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the mtt test*. Recuperado el Noviembre de 2016, de http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf
- Comisión Nacional Contra las Adicciones. (2012). *Análisis del consumo de sustancias México*. México D.F: Conadic.

- Davis, A. M., & Inturrisi, C. E. (1998). d-Methadone Blocks Morphine Tolerance and N-Metil-D-Aspartate-Induced Hyperalgesia. *The journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1048-1053.
- Eisendrath, S., & Lichtmacher, J. (2006). Trastornos psiquiátricos: delirio, demencia y otros trastornos cognitivos. En L. Tierney, S. McPhee, & M. Papadakis, *Diagnóstico clínico y tratamiento* (págs. 955-956). Mexico D.F: El Manual Moderno, 41ª edición.
- Fernández, J., & Torrens, M. (2005). *Monografía opiáceos, Vol. 17, Suplemento 2*. Obtenido de http://www.psiquiatria.com.es/socidrogalcohol/monografia_opiaceos.pdf
- FIBAO. (26 de Marzo de 2008). *Potenciación A Largo Plazo (LTP)*. Recuperado el 26 de Abril de 2016, de <http://medmol.es/glosario/95/>
- Flint Beal, M., Richardson, E., & Martin, J. (1998). Enfermedad de Alzheimer y demencias afines. En *Principios de medicina interna* (págs. 2613-2616.). México D.F: Interamericana Mc Graw-Hill, 14ª edición, vol. II .
- Gazulla, J., & Nagore, M. (2006). Glutamato y enfermedad de Alzheimer. *Revista Neurología, Vol. 42*, 427-431.
- Jacques, A., Rieger, D., Maestri, M., López, M., & Pérez, T. (2013). Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. *ELSEIVER*, 836-842.
- Johnson, M. (18 de Enero de 2013). *Labome*. Recuperado el Noviembre de 2016, de <http://www.labome.es/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>
- Kettl, P. (2007). Helping families with end-of-life care in Alzheimer's. *Clin Psychiatry*, 428.
- Llibre, J., & Guerra, G. (Junio de 1999). *Revista cubana de medicina, Vol. 38*. Recuperado el 22 de abril de 2016, de Enfermedad de Alzheimer. Situación actual y estrategias terapéuticas: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75231999000200007
- Lorigados, L., Orozco, S., & Morales, L. (2013). Excitotoxicidad y muerte neuronal en la epilepsia. *Biotecnología Aplicada* , Vol.30, No.1.
- Marrakchi, S., & Maibach, H. (2006). Sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human face: regional and age-related differences. *Skin Pharmacol Physiol*, 177-180.

- Minitab Inc. (Junio de 2016). *Soporte técnico de Minitab 17*. Recuperado el Noviembre de 2016, de <http://support.minitab.com/es-mx/minitab/17/>
- Neira, F., & Ortega, J. (2004). NMDA glutamatergic receptor antagonists for the management of chronic pain. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 210-222.
- Rang, H., & Dale, M. (2012). Enfermedad de Alzheimer . En *Farmacología* (pág. 483). Barcelona: Elsevier, 7 edición.
- Romano, M., Nissen, M., Huerto, M., & Parquet, C. (2007). ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina. N° 175*, 9-12.
- Servicio de Neurología. Fundación Clínica Valle del Lili, Cali. (2000). Enfermedad de alzheimer. *REVISTA COLOMBIANA DE PSIQUIATRÍA. Vol XXIX, N° 2* , 119-126.
- Tovar, J. (2006). *Sistemas de neurotransmisores centrales y comportamiento*. Recuperado el 26 de abril de 2016, de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/glutamaspatato.htm>
- Villara, A., Molinuevo, J., & Gómez, T. (22 de Octubre de 2008). *JANO.es*. Recuperado el 22 de Abril de 2016, de DEMENCIA: UNA EPIDEMIA EN EL SIGLO XXI: <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/67/1537/28/1v67n1537a13067850pdf001.pdf>
- Villarejo, M., & Murillo, J. (Agosto de 2000). *Farmacología de los receptores opiodes*. Recuperado el 26 de Abril de 2016, de <http://www.medigraphic.com/pdfs/raza/lr-2000/lr002h.pdf>
- Yan, F., Bikbulatov, R., Mocanu, V., Dicheva, N., Parker, C., & Wetsel, W. C. (2009). Structure-Based Design, Synthesis, and Biochemical and Pharmacological characterization of Novel Salvinorin A Analogues as Active State Probes of the K-Opioid Receptor . *Biochemistry*, 6898 .

ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico sobre las pruebas de excitotoxicidad en neuronas hipocampales de rata

Se realiza el Anova si se cumplen los siguientes supuestos:

Supuesto 1: homogeneidad de varianzas

- H_0 : Las varianzas son iguales
- H_a : Las varianzas no son iguales

Supuesto 2: Los datos tienen una distribución normal

- H_0 : Los datos tienen una distribución normal
- H_a : Los datos no tiene una distribución normal

Se considera rechazar H_0 cuando el valor $p < 0,05$

Hipótesis a probar

H_0 : La mediana de cada uno de los tratamientos, para un grupo de datos, son iguales.

H_a : La mediana de cada uno de los tratamientos, para un grupo de datos, no son iguales.

- **Glut 1h**

ANOVA de una vía	
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0,8745
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	20

Tratamientos analizados	
A	Non Treated

B	0,1% Triton
C	Vehicle
D	1 mM Glut
E	10 mM Glut
F	100 mM Glut

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
A-B	0,3085	Yes	****	<0.0001
A-C	0,0006667	No	ns	>0.9999
A-D	0,002667	No	ns	>0.9999
A-E	0,1027	No	ns	0,1949
A-F	0,1703	Yes	*	0,0108
B-C	-0,3078	Yes	****	<0.0001
B-D	-0,3058	Yes	****	<0.0001
B-E	-0,2058	Yes	**	0,0023
B-F	-0,1382	Yes	*	0,0450
C-D	0,002	No	ns	>0.9999
C-E	0,102	No	ns	0,2546
C-F	0,1697	Yes	*	0,0182
D-E	0,1	No	ns	0,2720
D-F	0,1677	Yes	*	0,0197
E-F	0,06767	No	ns	0,6528

Conclusión: El valor p es menor que 0,05. Por tanto se rechaza H_0 y se acepta H_a . De tal forma que existen diferencias significativas entre los tratamientos analizados en las células de hipocampo de rata.

- **Glut 2:**

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0124
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	6

Kruskal-Wallis statistic	14,57
--------------------------	-------

Tratamientos analizados	
A	Non Treated
B	0,1% Triton
C	Vehicle
D	1 mM Glut
E	10 mM Glut

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
A-B	12,75	Yes	*	0,0343
A-C	-0,08333	No	ns	>0.9999
A-D	0,5833	No	ns	>0.9999
A-E	5,917	No	ns	>0.9999
A-F	8,25	No	ns	>0.9999
B-C	-12,83	No	ns	0,0672
B-D	-12,17	No	ns	0,1057
B-E	-6,833	No	ns	>0.9999
B-F	-4,5	No	ns	>0.9999
C-D	0,6667	No	ns	>0.9999
C-E	6	No	ns	>0.9999
C-F	8,333	No	ns	>0.9999
D-E	5,333	No	ns	>0.9999
D-F	7,667	No	ns	>0.9999
E-F	2,333	No	ns	>0.9999

Conclusión: El valor p es menor que 0,05. Por tanto se rechaza H_0 y se acepta H_a . De tal forma que existen diferencias significativas entre los tratamientos analizados en las células de hipocampo de rata.

- SD 1h ug/mL:

ANOVA de una vía	
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes

R square	0,9131
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	20

Tratamientos analizados	
A	Non Treated
B	0,1% Triton
C	Vehicle
D	1 mM Glut
E	10 mM Glut

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
A-B	0,3085	Yes	****	<0.0001
A-C	0,1213	Yes	**	0,0083
A-D	0,167	Yes	***	0,0005
A-E	0,2147	Yes	****	<0.0001
A-F	0,1683	Yes	***	0,0004
B-C	-0,1872	Yes	***	0,0001
B-D	-0,1415	Yes	**	0,0023
B-E	-0,09383	Yes	*	0,0485
B-F	-0,1402	Yes	**	0,0025
C-D	0,04567	No	ns	0,6694
C-E	0,09333	No	ns	0,0730
C-F	0,047	No	ns	0,6439
D-E	0,04767	No	ns	0,6311
D-F	0,001333	No	ns	>0.9999
E-F	-0,04633	No	ns	0,6567

Conclusión: El valor p es menor que 0,05. Por tanto se rechaza H_0 y se acepta H_a . De tal forma que existen diferencias significativas entre los tratamientos analizados en las células de hipocampo de rata.

- SD 2h ug/mL:

ANOVA de una vía	
P value	0,0116

Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	14,73

Tratamientos analizados	
A	Non Treated
B	0,1% Triton
C	Vehicle
D	1 mM Glut
E	10 mM Glut

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
A-B	15,75	Yes	**	0,0025
A-C	6,25	No	ns	>0.9999
A-D	8,917	No	ns	0,7255
A-E	8,917	No	ns	0,7255
A-F	6,583	No	ns	>0.9999
B-C	-9,5	No	ns	0,5316
B-D	-6,833	No	ns	>0.9999
B-E	-6,833	No	ns	>0.9999
B-F	-9,167	No	ns	0,6362
C-D	2,667	No	ns	>0.9999
C-E	2,667	No	ns	>0.9999
C-F	0,3333	No	ns	>0.9999
D-E	0	No	ns	>0.9999
D-F	-2,333	No	ns	>0.9999
E-F	-2,333	No	ns	>0.9999

Conclusión: El valor p es menor que 0,05. Por tanto se rechaza H_0 y se acepta H_a . De tal forma que existen diferencias significativas entre los tratamientos analizados en las células de hipocampo de rata.

- SD 1h ng/mL:

ANOVA de una vía	
P value	0,0361
P value summary	*
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,4079
R square	0,6657

Tratamientos analizados	
A	Non Treated
B	0,1% Triton
C	Vehicle
D	1 mM Glut
E	10 mM Glut

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
A-B	0,03425	Yes	*	0,0128
A-C	0,01625	No	ns	0,6486
A-D	0,01325	No	ns	0,6430
A-E	0,007	No	ns	0,3127
A-F	0,0015	No	ns	>0.9999
B-C	-0,018	No	ns	0,3586
B-D	-0,021	No	ns	0,1159
B-E	-0,02725	Yes	**	0,0070
B-F	-0,03275	No	ns	0,0764
C-D	-0,003	No	ns	0,9983
C-E	-0,00925	No	ns	0,8056
C-F	-0,01475	No	ns	0,8121
D-E	-0,00625	No	ns	0,9309
D-F	-0,01175	No	ns	0,4016
E-F	-0,0055	No	ns	0,9705

Conclusión: El valor p es menor que 0,05. Por tanto se rechaza H_0 y se acepta H_a . De tal forma que existen diferencias significativas entre los tratamientos analizados en las células de hipocampo de rata.

- SD 2h ng/mL:

ANOVA de una vía	
P value	0,0002
P value summary	***
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0,3054
R square	0,9729

Tratamientos analizados	
A	Non Treated
B	0,1% Triton
C	Vehicle
D	1 mM Glut
E	10 mM Glut

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
A-B	0,1375	Yes	**	0,0019
A-C	-0,015	No	ns	0,1567
A-D	-0,044	No	ns	0,2421
A-E	-0,005	No	ns	0,4556
A-F	0,002	No	ns	0,9994
B-C	-0,1525	Yes	***	0,0003
B-D	-0,1815	Yes	**	0,0044
B-E	-0,1425	Yes	***	0,0007
B-F	-0,1355	Yes	**	0,0023
C-D	-0,029	No	ns	0,3368
C-E	0,01	No	ns	0,0976
C-F	0,017	No	ns	0,1452
D-E	0,039	No	ns	0,2661
D-F	0,046	No	ns	0,0669
E-F	0,007	No	ns	0,8444

Conclusión: El valor p es menor que 0,05. Por tanto se rechaza H_0 y se acepta H_a . De tal forma que existen diferencias significativas entre los tratamientos analizados en las células de hipocampo de rata.

Anexo 2. Acta de aprobación del proyecto por el Comité de Ética de la Universidad Icesi



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

Anexo 3. Cartal de aval del proyecto de grado



Santiago de Cali, Febrero 27 de 2017

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Carta Aval de Corrección y Entrega del Documento Final de
Proyecto de Grado 2

Yo, **Alvaro Andrés Barrera Ocampo** director del proyecto de grado del estudiante **Juan Camilo Solarte Ramirez** del programa de Química Farmacéutica, certifico que he revisado y aprobado el documento final de PDG II.

Cordialmente,

Alvaro Barrera-Ocampo, PhD
Profesor/Investigador
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad ICESI
CII 18 # 122-135
Cali, Colombia
Tel. 57-2-5552334 Ext. 8856
aabarrera@icesi.edu.co

CALLE 18 No. 122-135 PANCE, A.A. 25608
PBX. 5552334 en Internet: <http://www.icesi.edu.co>
CALI - COLOMBIA