Evaluación del grado de toxicidad de β-amiloide en las neuronas de las diferentes sub-regiones del hipocampo relacionadas con la enfermedad de Alzheimer

Yeraldin Chaparro Colorado

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Química Farmacéutica

2016

Evaluación del grado de toxicidad de β-amiloide en las neuronas de las diferentes sub-regiones del hipocampo relacionadas con la enfermedad de Alzheimer

Yeraldin Chaparro Colorado

Trabajo de Grado para optar al título de pregrado en Química Farmacéutica

Tutor: Álvaro Andrés Barrera Ocampo

Doctor en Ciencias Naturales

Universidad Icesi

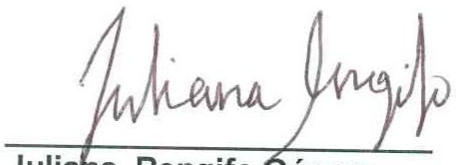
Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Química Farmacéutica

2016

UNIVERSIDAD ICESI

Aprobado Por:



Juliana Rengifo Gómez
Evaluador

Álvaro Andrés Barrera Ocampo
Director del Proyecto

Santiago de Cali, 13 de septiembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad ICESI, por la formación académica brindada. Doy muchas gracias a mi tutor Álvaro Andrés Barrera Ocampo por su continuo acompañamiento, apoyo y por todas las enseñanzas brindadas a lo largo de esta investigación. Su contribución hizo posible este proyecto. Agradezco a mi familia que me ha apoyado y acompañado siempre, principalmente a mi madre quien es uno de mis principales motores en la vida.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN DEL TRABAJO....10
ABSTRACT....11
1. INTRODUCCIÓN....12
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO....13
2.1 Planteamiento y justificación del problema....13
2.2 Marco Teórico y estado del arte....15
2.3 Objetivos....22
2.3.1 Objetivo General....22
2.3.2 Objetivos Específicos....22
2.4 Metodología Propuesta....23
2.4.1 Animales experimentales....23
2.4.2 Cultivos organotípicos de secciones de hipocampo....23
2.4.3 Preparación de oligómeros solubles Aβ 1-42....24
2.4.4 Análisis de oligómeros solubles Aβ 1-42 por western blotting....24
2.4.5 Tinción con Yoduro de Propidio (PI) para los cultivos organotípicos de hipocampo....26
2.4.6 Cuantificación de la lesión neuronal del hipocampo y análisis estadístico....27
2.5 Resultados....29
2.6 Discusión....35
2.7 Conclusiones....40
2.8 Recomendaciones....41
3. BIBLIOGRAFÍA....42
ANEXOS....49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Siembra de las muestras de oligómeros solubles del Aβ 1-42 en el gel de Tricina. 25

Tabla 2. Experimentos realizados para la estandarización de los HOSC.....55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de Formación de péptido Beta- Amiloide…….. 17

Figura 2. Diagrama esquemático del mecanismo de la disfunción sináptica inducida por oligómeros Aβ……. 18

Figura 3. Anatomía intrínseca del hipocampo con la vía trisináptica y diagrama del flujo de información a través del hipocampo……20

Figura 4. Esquema de Tratamiento farmacológico……. 27

Figura 5. Imagen de muestra con la organización espacial de las subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de rata seguida en el análisis de las fotografías obtenidas en los diferentes ensayos con el programa Image J……... 28

Figura 6. Western Blot para la verificación de la obtención de oligómeros solubles de Aβ 1-42…….. 29

Figura 7. Citotoxicidad a la exposición por 1 hora de oligomeros Aβ 1-42 y controles en cultivos de cortes organotípicos de hipocampo de ratas Sprague-Dawley…… 31

Figura 8. Fotografías de HOSC en campo claro, con variación en los resultados de la estandarización de los cultivos…… 33

Figura 9. Cambio en la intensidad de fluorescencia entre los cortes basales sin tratamiento y los cortes a las 24 horas después del tratamiento obtenido en cada subregión del hipocampo GD, CA1 y CA3…… 34

Figura 10. Cambio en la intensidad de fluorescencia entre los cortes basales sin tratamiento y los cortes a las 24 horas después del tratamiento obtenido en cada subregión del hipocampo GD, CA1 y CA3…… 54

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cambio de Medio para cultivos 18.05.2016, 19.05.2016 y 25.05.2016 .49

Anexo 2. Análisis Estadístico del tratamiento farmacológico realizado a los HOSC 50

Anexo 3. HOSC con variación en la respuesta preparados el 25.05.2016 54

Anexo 4. Experimentos realizados para la estandarización de los HOSC.....55

Anexo 5. Matriz de Marco Lógico.....56

Anexo 6. Carta de aval del comité de ética.....58

GLOSARIO

Aβ: Péptido Beta Amiloide

AD: (Alzheimer's Disease) – Enfermedad de Alzheimer

ADI: Alzheimer's Disease International

APP: (Amyloid Precursor Protein) - Proteína precursora Amiloide

CA1: (Cornu Ammonis 1) – Cuerno de Amón 1

CA3: (Cornu Ammonis 3) – Cuerno de Amón 3

GD: (Gyrus Dentatus) – Giro dentado

OHSC: (Organotypic Hippocampal Slice Culture) – Cultivos de cortes organotipicos de Hipocampo

NMDA: N-metil-D-aspartato

PI: (Propidium iodide) - Yoduro de propidio

RESUMEN DEL TRABAJO

Los oligómeros solubles del péptido β-Amiloide (Aβ) son formas neurotóxicas, características en la patología de la enfermedad de Alzheimer (AD). Cuando los oligómeros solubles se encuentran en el espacio extracelular, inhiben la trasmisión sináptica mediada por NMDA, causando perdida de la transmisión sináptica y finalmente la muerte neuronal. Esta muerte puede ser medida con el agente intercalante yoduro de Propio (PI). En una célula apoptótica, se presenta la fragmentación del ADN y, en consecuencia, la pérdida del contenido de ADN nuclear, el PI se intercala entre los pares de bases del ADN o el RNA y debido a que es una molécula fluorescente, permite marcar esta muerte. En continuos estudios se ha demostrado que una de las zonas que más se ve afectada en pacientes con AD es el hipocampo, encargado de la memoria declarativa. Esta enfermedad ataca preferentemente a las neuronas de esta región del cerebro, afectándose desproporcionadamente la sinapsis y observándose una pérdida de neuronas, que es la que finalmente conlleva a la demencia. El hipocampo presenta una anatomía muy definida, encontrándose en ella diferentes subregiones que son Giro dentado (GD), Cuerno de Amón 1 (CA1) y Cuerno de Amón 3 (CA3). En este estudio se ha examinado si se presenta una vulnerabilidad diferencial entre las subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de ratas ante la neurotoxicidad inducida por el péptido Aβ. Para representar la patología de la AD, se expusieron cortes organotípicos del hipocampo de ratas Sprague-Dawley P6, a diferentes concentraciones del péptido, durante tiempos determinados. Para esto se realizó la preparación de los oligómeros solubles del péptido, verificando su obtención por el método Western Blot. Adicionalmente, la muerte celular basal se evaluó a partir de la cuantificación de la fluorescencia del marcador PI en cada subregión hipocampal. Nuestros resultados sugieren que no se presenta vulnerabilidad diferencial significativa entre las subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de ratas, pero si hay un leve cambio entre la fluorescencia obtenida entre las regiones GD y CA1 en comparación con CA3. Siendo en las dos primeras subregiones mayor que en la última mencionada. Además también se obtuvo que a partir de 30 minutos y a una concentración de 100 nM del péptido Aβ ya se presenta muerte neuronal en las secciones de hipocampo. Con esto se recomienda ampliar la investigación de este patógeno, para corroborar y complementar los resultados obtenidos en esta investigación, para un mayor entendimiento de la enfermedad de Alzheimer.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Alzheimer, Perdida sináptica, Oligómeros Aβ, Cultivos de cortes organotípicos de hipocampo, declive cognitivo.

ABSTRACT

Soluble oligomers of the amyloid β-protein (Aβ) are neurotoxic forms, characteristic in the pathology of Alzheimer's disease (AD). When soluble oligomers are in the extracellular space, they inhibit synaptic transmission mediated by NMDA, causing loss of synaptic transmission and finally neuronal death. This death can be measured with propidium iodide (PI) an intercalating agent. In an apoptotic cell, DNA fragmentation occurs and therefore the loss of nuclear DNA content, the PI is insert between the base pairs of DNA or RNA and because it is a fluorescent molecule, can mark the death. In studies it has been shown that one of the brain areas most affected in patients with AD is the hippocampus, responsible for declarative memory. This disease preferentially attacks the neurons of this brain region, thereby affecting disproportionately the synapsis and generating the loss of neurons, which is what leads to dementia. The hippocampus has a definite anatomy, different subregions among that are dentate gyrus (DG), Cornu Ammonis 1 (CA1) and Cornu Ammonis 3 (CA3). This study has examined whether it exists a differential vulnerability among GD, CA1 and CA3 subregions of the rat hippocampus, due to neurotoxicity induced by Aβ. To represent the pathology of AD, hippocampal organotypic slice cultures from Sprague-Dawley rats-P6 were exposed to different concentrations of the peptide during definite time points. For this, the preparation of soluble oligomers of the peptide was made and the oligomerization was verified by western blotting. Additionally, basal cell death was evaluated from the quantification of the PI fluorescence marker in each hippocampal subregion. Our results suggest that there is not significant differential vulnerability among GD, CA1 and CA3 subregions of the rat hippocampus, but there is a slight change between the fluorescence obtained between the regions GD and CA1 compared with CA3. This seemed to be higher in DG and CA1 than CA3. In addition, it was also observed that after 30 minutes and 100 nM of the peptide Aβ neuronal death occurs in hippocampal slices. It is recommended to continue the investigation of this pathogen to corroborate and complement the results obtained in this investigation, for a greater understanding of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer’s disease, Synaptic loss, Aβ oligomers, Hippocampal Organotypic Slice Culture, Cognitive decline.

1. INTRODUCCIÓN

Se ha reportado que la enfermedad de Alzheimer (AD), es una de las formas de demencia más comunes y afecta principalmente a personas con edad avanzada (Most & High, 2015). Actualmente se cuenta con estudios a nivel nacional y mundial que demuestran que su prevalencia tendera a aumentar en la población en los próximos años, por esto se vuelve un foco principal en los estudios de investigación (Organización Mundial de la Salud and Alzheimer's Disease International, 2013).

Esta enfermedad presenta una fisiopatología muy compleja en la que se incluyen varios mecanismos, en los que principalmente se encuentra la acumulación de proteínas mal plegadas como, la deposición de placas extracelulares del péptido β-amiloide (Aβ), producido por un desequilibrio en la proteólisis de la Proteína Precursora Amiloide (APP) (Chow, Mattson, Wong, & Gleichmann, 2010) (Querfurth & Laferla, 2010) (Ittner & Götz, 2011). Así mismo, se ha demostrado que la forma Aβ 1-42 es una de las más toxicas para las neuronas, produciendo una falla en la sinapsis que desencadena la muerte neuronal (Wang et al., 2002) (Bitan et al., 2003). Una de las regiones del cerebro, que se ve más afectada en AD es la formación hipocampal, que es la encargada de la codificación, consolidación y reparación de la memoria declarativa (van Strien, Cappaert, & Witter, 2009), por lo que un fallo en esta región contribuye primero al deterioro cognitivo leve, uno de los principales síntomas de los pacientes que presentan estadios iniciales de la enfermedad y luego la pérdida de memoria, cuando la enfermedad ya se encuentra avanzada (Jessen et al., 2014) (Alzheimer's Association, 2015). Sin embargo, en la actualidad no se tiene claro por qué algunas poblaciones neuronales de las áreas del hipocampo, son más susceptibles a agentes patogénicos como Aβ. Por esta razón se planteó como objetivo general hacer una evaluación de la susceptibilidad de las subregiones del hipocampo, Giro Dentado (DG) y Cuerno de Amón 1 y 3 (CA1 y CA3) al ser expuestas a oligómeros del péptido Aβ 1-42.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 Planteamiento y justificación del problema

La enfermedad de Alzheimer es la forma de demencia más común que existe en el mundo. **Una de cada tres** personas mayores, muere de esta enfermedad u otra demencia (Most & High, 2015). Por esta razón esta enfermedad actualmente es reconocida como uno de los problemas médicos y sociales más importantes de las personas mayores en los países industrializados y en vía de desarrollo (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2013).

En la actualidad esta enfermedad es la única causa de muerte en los Estados Unidos que no se puede **prevenir, curar o desacelerar** y sólo el 45% de las personas con AD han sido diagnosticas con su condición específica, por lo tanto la mayoría de las personas no son conscientes de su diagnóstico a diferencia de otras enfermedades como el cáncer, en donde más del 90% de las personas con los cuatro tipos más comunes de este, han sido diagnosticas (Most & High, 2015).

Actualmente, los tratamientos que existen para la enfermedad son sólo sintomáticos, todos buscando minimizar o contrarrestar la falla sináptica y la interrupción de la liberación de los neurotransmisores importantes en la sinapsis (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2013). Se encuentran disponibles tres inhibidores de la enzima acetil-colinesterasa aprobados para el tratamiento de la enfermedad en estadios leve a moderado que son galantamina, rivastigmina y donepezilo (Kaduszkiewicz, 2005). La memantina, es también utilizada para el tratamiento de pacientes con AD de moderado a severo; este fármaco es un antagonista no competitivo del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR), se ha estudiado como una monoterapia, pero no en pacientes que ya son tratados con inhibidores de la colinesterasa (Tariot et al., 2004). Hay otros tratamientos que están relacionados con los mecanismos patogénicos de la enfermedad y lo que buscan es inhibir los pasos de la formación de estos agentes patogénicos como la deposición de placas extracelulares de Aβ. Algunos de estos compuestos incluyen el tramiprosato y la colostrinina, agentes anti agregación amiloidea; inhibidores de β- y γ-secretasa como AZD3293, CTS-21166 y LY-450139 (Yan & Vassar, 2014) (Barten, Meredith, Zaczek, Houston, & Albright, 2006). Además de tratamientos para evitar la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares, la inflamación, el daño oxidativo y la desregulación de hierro (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2013). Como se observa, los tratamientos hasta ahora empleados están enfocados en controlar los síntomas de los pacientes cuando ya está la enfermedad; sin embargo, menos del 50 % de los pacientes que tiene la enfermedad son diagnosticados, esto replantea las líneas de investigación hacia un correcto y rápido diagnóstico de los pacientes y llegar a entender qué hace que los pacientes presenten Alzheimer esporádico, enfocándonos en las zonas del cerebro más vulnerables a la enfermedad.

A partir de este proyecto se podrá corroborar, si las regiones del hipocampo GD, CA1 y CA3 son diferencialmente afectadas y cuál de estas presenta mayor susceptibilidad al péptido Aβ. Buscando explicar estos resultados con las características de cada subregión y su diferenciación de las demás. Esto se realiza con el fin de proveer mayor conocimiento sobre el efecto deletéreo del péptido Aβ, sobre la formación hipocampal, una de las zonas que primero se ve afectada en pacientes con AD. Buscando aportar al desarrollo de la siguiente hipótesis: **El péptido Aβ 1-42 afecta diferencialmente a las subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo.**

La hipótesis se basa en estudios de investigación publicados, realizados en cerebros de ratones con el uso de electrodos y en un estudio de imagen de Resonancia Magnética en pacientes con AD que sugieren que la región CA1 parece ser más susceptible al daño que DG y CA3 (Chong et al., 2011) (Greene & Killiany, 2012).

Finalmente es importante resaltar que este proyecto podría tener una gran aplicación en el entorno nacional en un contexto actual, tomando como bibliografía, un estudio realizado por la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Icesi del año 2013 (Takeuchi, Ariza-Araujo, & Prada, 2014). Se puede llegar a concluir que AD es un problema de salud pública en Colombia. En el año 2005, 216.380 colombianos mayores de 60 años tenían algún tipo de demencia, y 70% de éstos AD. En la investigación se pronostica que para el año 2020, 342.956 personas mayores de 60 años sufrirán de algún tipo de demencia, 258.498 de ellos tendrán AD, que será más frecuente en mujeres. Con estas cifras y con las condiciones de salud actuales de nuestro país, Colombia no está preparada para costear pacientes que padecen AD. (Silva, 2014). En otro estudio también realizado por Prada y colaboradores, se realizó una estimación del costo directo e indirecto de la AD en Colombia para el periodo 2010-2020; los resultados fueron que el costo por paciente para 8 años de tratamiento seria de $99 millones de pesos, incluyendo los costos del cuidador; lo cual es una cifra alarmante para Colombia (Prada, Takeuchi, & Ariza, 2014). La alerta no es solo enfocada hacia Colombia, sino también hacia los gobiernos de diferentes países (Alzheimer's Disease International, 2013), la OMS advierte que el deterioro cognitivo será uno de los mayores desafíos para Latinoamérica. En un informe desarrollado en conjunto con la ADI, (Organización Mundial de la Salud and Alzheimer's Disease International, 2013) se busca crear conciencia sobre la demencia como una prioridad de salud pública y abogar a que estos gobiernos puedan enfrentar el impacto de la demencia como una amenaza creciente para la salud, mediante el desarrollo de políticas y su implementación a través de planes que mejoren el cuidado de la enfermedad. La AD, genera un gran impacto social y económico tanto para los pacientes y sus familias, como también para los sistemas de salud. Con lo dicho anteriormente, este proyecto de investigación, junto con otros podría llegar a ser una alternativa aquí en Colombia, para obtener nuevas terapias o técnicas de diagnóstico, más económicas para la AD.

2.2 Marco Teórico y estado del arte

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa y es la forma más común de demencia; entendiéndose por demencia como la pérdida de memoria y otras habilidades intelectuales (Jessen et al., 2014). Esto se debe principalmente a la alteración en la sinapsis de las neuronas, generando insuficiencia sináptica (Querfurth & Laferla, 2010). En pacientes con un deterioro cognitivo leve, que es el estadio anterior a la demencia y generalmente la señal temprana de AD, se ha encontrado que comienza a presentarse una disminución del número de sinapsis del hipocampo (S. W. Scheff, Price, Schmitt, Dekosky, & Mufson, 2007). Cuando la enfermedad empieza a avanzar la sinapsis se ve desproporcionadamente afectada y se observa una pérdida de neuronas que es la que finalmente conlleva a la demencia (Stephen W. Scheff & Price, 2003).

La AD se puede desarrollar por causas como antecedentes familiares, por genética (debido a una mutación) o de forma esporádica, por factores como la edad (Alzheimer's Association, 2015). Esta enfermedad ocurre en mayor proporción en personas de avanzada edad, debido al progresivo deterioro de las funciones mentales, característico de los cambios neurobiológicos en el sistema nervioso central durante el envejecimiento normal (Jurgens & Johnson, 2012). Incluyendo un conjunto de problemas de memoria asociados al compromiso en la función del hipocampo (Adams et al., 2008) específicamente en la alteración de los procesos normales de sinapsis en las diferentes subregiones y tipos de neuronas del hipocampo (Burke & Barnes, 2010). Por esta razón el hipocampo se vuelve un foco principal en estudios relacionados con la AD, ya que es una estructura cerebral implicada en el aprendizaje y la memoria y es altamente susceptible a alteraciones dependientes de la actividad sináptica (Blaise & Bronzino, 2003).

La fisiopatología de AD es asociada a varios mecanismos, principalmente debido a la acumulación de proteínas mal plegadas como lo son la deposición de placas extracelulares del péptido Aβ y la acumulación de ovillos neurofibrilares intracelulares de la proteína estabilizadora de microtúbulos tau. (Ittner & Götz, 2011), además se ha asociado a daño oxidativo neuronal y a cascadas de inflamación, todo lo anterior relacionado al envejecimiento del cerebro (Esteban, 2004). Finalmente se cree que también está implicado el glutamato, ya que se presenta un estado crónico de activación del receptor de NMDA que agrava el daño neuronal en la enfermedad en la etapa tardía. El glutamato aumenta el calcio citosólico, que a su vez estimula los canales de liberación de calcio en el retículo endoplásmico. (Querfurth & Laferla, 2010). Lo anterior activa las proteínas reguladoras de calcio para restaurar los niveles basales de este, además de activar quinasas como la calmodulin-quinasa II y la proteína quinasa C, a través de la calmodulina, lo que provoca un desequilibrio de la homeostasis neuronal de calcio y esto causa fosforilación proteica. La regulación incorrecta de la señalización de calcio contribuye a la disfunción sináptica y la excitotoxicidad y/o muerte apoptótica

de las poblaciones neuronales. (Rapaka, Bitra, Medapati, & Akula, 2014). Es decir que estos niveles excesivos de calcio producidos por el glutamato como se mencionó anteriormente, pueden conducir a la muerte celular.

Péptido Beta Amiloide

En esta investigación nos enfocaremos en los daños causados por el péptido Aβ. Este se produce normalmente por la proteólisis de APP, que genera Aβ de 36 a 43 aminoácidos. Siendo los monómeros Aβ 1-40 los más prevalentes y los Aβ 1-42 los más tóxicos para las células (Querfurth & Laferla, 2010). El proceso de proteólisis de APP se puede dar por dos vías, la no amiloidogénica y la amiloidogénica que termina en la formación de Aβ. En la primera vía, la proteína APP que es una proteína transmembrana recibe un corte en la parte extracelular por la proteasa α-secretasa en el aminoácido 687, produciendo dos fragmentos uno aminoterminal, que es sAPPα (soluble) y uno carboxiterminal CTF83, este último por la acción del complejo γ-secretasa tiene como producto P3. En la segunda vía actúa inicialmente la β-secretasa que recibe el nombre de BACE-1, realizando un corte en el aminoácido 671, dando la formación de los fragmentos sAPPβ, que es 16 aminoácidos más corto que sAPPα y el fragmento C-terminal 99 (CTF99), finalmente al igual que en la primera vía, el complejo γ-secretasa realiza el corte en el fragmento carboxiterminal (CTF99) pero obteniendo como producto Aβ y el dominio intracelular de APP (AICD). (Chow et al., 2010). Por lo tanto como se ve, las proteasas α y β secretasa tienen como diana la APP; un desequilibrio que lleve a una mayor proteólisis por la vía amiloidogénica, genera una acumulación de Aβ que puede crecer formando fibras insolubles de placas amiloideas o puede auto agregarse y formar oligómeros solubles (Querfurth & Laferla, 2010). Este exceso de péptido Aβ se cree que es la mayor causa de disfunción y degeneración que se produce en AD (Chow et al., 2010). Según los estudios más recientes, los oligómeros solubles y los amiloides intermedios son las formas más neurotóxicas de Aβ. (Tu, Okamoto, Lipton, & Xu, 2014b). Los oligómeros solubles se forman en el espacio extracelular e inhiben la trasmisión sináptica mediada por NMDA, causando perdida de la transmisión sináptica y finalmente la muerte neuronal (Chow et al., 2010). A continuación se presenta un esquema de la proteólisis de la proteína APP, explicada anteriormente.

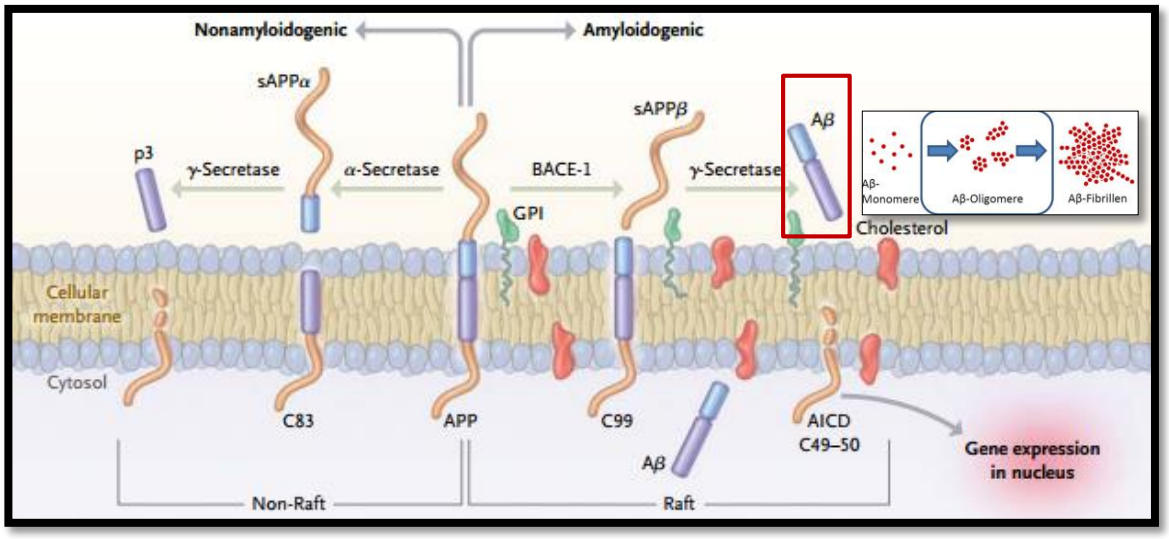


Figura 1. Mecanismo de Formación de péptido Beta- Amiloide

Imagen extraída de: (Querfurth & Laferla, 2010)

Fallo sináptico debido a la acumulación del péptido Beta Amiloide

El fallo sináptico en AD, es debido a la alteración de la transmisión basal de los impulsos individuales y a la potenciación a largo plazo (LTP) que junto a la depresión a largo plazo (LTD), son dos mecanismos de plasticidad sináptica, que están relacionados con el almacenamiento del aprendizaje y la memoria en el cerebro, así como con la formación y modificación de los mapas cognitivos (Blaise & Bronzino, 2003). La expresión de Aβ, especialmente los oligómeros, producen múltiples efectos; entre los más importantes se encuentra el deterioro de la plasticidad sináptica mediante la alteración del equilibrio entre la LTP y LTD, más la reducción del número de espinas dendríticas, de las cuales se hablara posteriormente. (Querfurth & Laferla, 2010). Además, altas concentraciones de Aβ pueden suprimir la transmisión sináptica por la endocitosis de receptores de α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPAR), ubicados en varias regiones del cerebro, estos son los encargados de mediar la transmisión sináptica excitatoria rápida en el SNC, por lo tanto la transmisión se ve suprimida especialmente en la sinapsis del hipocampo (Hsieh et al., 2006). Igualmente reduce la transmisión glutamatérgica, por la endocitosis de los NMDAR en las neuronas, produciendo una depresión rápida y constante de las corrientes evocadas por NMDA, que puede causar disfunción sináptica y contribuir a la patología de AD (Snyder et al., 2005); finalmente, Aβ afecta la señalización del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChr) y la liberación de acetilcolina de las terminales presinápticas (Querfurth & Laferla, 2010). Los procesos mencionados anteriormente producen a su vez la interrupción de la liberación de neurotransmisores presinápticos y postsinápticos, que en definitiva es la causa por la que se ve interrumpida la transmisión sináptica neuronal. Es importante conocer que cambios similares en el equilibrio entre la potenciación

y la depresión en las sinapsis se producen con el envejecimiento normal, por eso es que a edades avanzadas se aumenta la probabilidad de padecer AD.

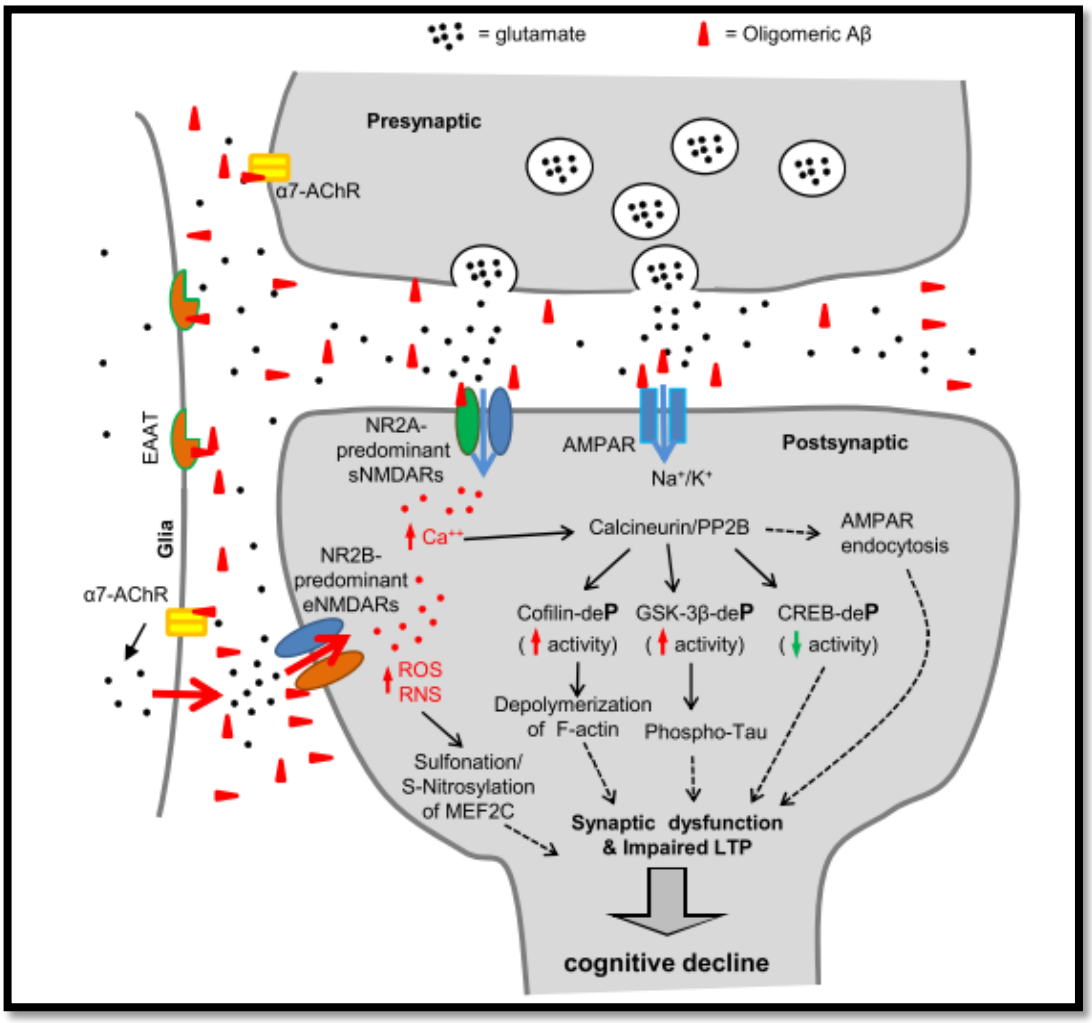


Figura 2. Diagrama esquemático del mecanismo de la disfunción sináptica inducida por oligómeros Aβ.

Imagen extraída de: (Tu et al., 2014b)

Concentraciones patológicas de oligómeros Aβ pueden interactuar con múltiples proteínas sinápticas de astrocitos, microglias y neuronas, incluyendo α7-AChRs y NMDARs, desencadenando una serie de eventos sinápticos tóxicos. Estos eventos incluyen grandes activaciones de NMDARs (especialmente NR2B), aumento de la entrada de calcio a la neurona, la activación calcio dependiente de calcineurina/PP2B. Este resultado desencadena reacciones redox, hiperfosforilacion de tau endocitosis de AMPARs y finalmente produciendo disfunción sináptica y deterioro cognitivo. Imagen extraída de: (Tu et al., 2014b)

Hipocampo y la AD

Una de las zonas que más se ve afectada en pacientes con AD es el hipocampo, como ya se mencionó anteriormente, esta enfermedad ataca preferentemente a las neuronas de esta región del cerebro; aunque es importante saber que el hipocampo no es el sitio inicial desde donde se desarrolla la enfermedad. Realmente se conoce que en trastornos de demencia tales como AD, la pérdida de neuronas inicia en el núcleo colinérgico basal de Meynert (nbM) y esto se correlaciona con el deterioro cognitivo en la enfermedad (Gratwicke et al., 2013), sin embargo, la problemática alrededor de esto, es que existe una confusión desde hace décadas, con respecto a la terminología y la localización exacta del nbM, específicamente en el cerebro humano. Todo esto debido a la amplia y difusa estructura de este núcleo. A pesar de que existen estudios sobre este tema (Kuhn et al., 2015) y existen proyecciones topográficas del nbM en primates, no existen correlaciones directas clínico-patológicas entre la subregión nbM y la disminución específica cognitiva que se ha realizado en tejidos humanos (A. K. L. Liu, Chang, Pearce, & Gentleman, 2015). Por esta razón es que se sustenta que el enfoque de este proyecto está en el hipocampo y no en los nbM.

Formación Hipocampal

Otros investigadores han plateado una hipótesis que intenta explicar por qué el hipocampo es mayormente afectado en la AD y si este presenta una susceptibilidad que lo hace más propenso a sufrir daños; todo en relación a la fisiopatología estudiada hasta ahora de la enfermedad. En nuestra investigación nos enfocamos en la formación hipocampal, específicamente en el GD y las subregiones CA1 y CA3 del Cuerno de Amón. La formación parahipocampal e hipocampal tienen como principal función la codificación, consolidación y reparación de la memoria a largo plazo, más específicamente la memoria declarativa (recuerdos conscientes) (van Strien et al., 2009).

Con relación a la anatomía de la formación hipocampal, es una estructura en forma de C que está ubicada en la parte caudal del cerebro, esta se divide en diferentes subregiones: GD, el subículo y propiamente el hipocampo que tiene tres subdivisiones CA1, CA2 y CA3 (van Strien et al., 2009), algunos otros autores afirman que la región CA2 es una zona de transición entre CA1 y CA3 y que además existe una cuarta subdivisión CA4; sin embargo, esto último no se ha esclarecido en su totalidad. Adicionalmente, el presubículo, el parasubículo y la corteza entorrinal también hacen parte de la formación hipocampal (Anderson, Morris, Amaral, Bliss, & O'Keefe, 2007). La corteza entorrinal es considerada el primer paso del circuito intrínseco hipocampal, del que se hablará posteriormente, proyectando axones hasta el GD; estas conexiones tienen la peculiaridad de tener un camino unidireccional. El hipocampo tiene 3 capas (poliforma, piramidal y molecular) a diferencia de la corteza cerebral que tiene 6. (Anderson et al., 2007).

Subregiones del Hipocampo (GD, CA1 y CA3)

Se cree que cada una de estas subregiones se ve afectada de manera diferente, cuando se da la acumulación de oligómeros solubles Aβ en el espacio extracelular en la AD, sin embargo, a pesar de que en la actualidad existen investigaciones con respecto a este tema; no se ha podido esclarecer en su totalidad esta diferenciación. Por esta razón en este proyecto se busca evaluar si estas subregiones son diferencialmente afectadas y determinar cuál es más susceptible ante una exposición con oligómeros solubles de péptido Aβ 1-42.

Se sabe que estas subregiones presentan unas diferencias marcadas en su morfología. El GD está compuesto por células granulares, las cuales son pequeñas y redondas pero densamente pobladas lo que hace que sean fácilmente distinguibles. A partir del GD se proyecta a CA3, este último está compuesto de células piramidales, que son de forma triangular, además esta subregión presentan un gran árbol detrítico que se dirige al centro del hipocampo y proyecta hacia CA1 (Duvernoy, Cattin, & Risold, 2013). En estas dendritas se encuentran numerosas espinas dendríticas y existe una relación entre la cantidad de estas y el número de sinapsis. Las células piramidales en CA1 proyectan al subículo y ambos proyectan hacia la corteza entorrinal (Taupin, 2007). La vía trisináptica se da desde GD a CA3, a través de las fibras musgosas y de ahí hasta CA1 a través de las vías colaterales de Schaffer; este es el principal circuito envuelto en el procesamiento de información a través del hipocampo (Bartsch & Wulff, 2015) (Figura 2).

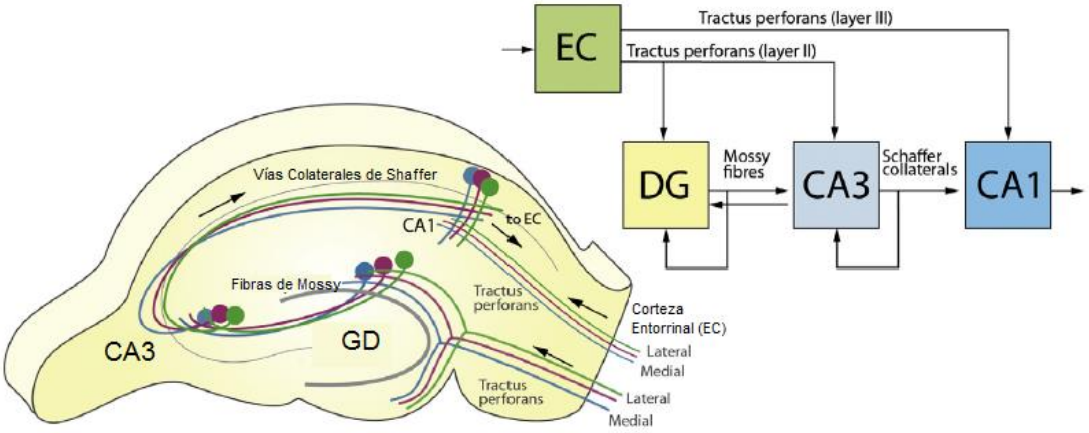


Figura 3. Anatomía intrínseca del hipocampo con la vía trisináptica y diagrama del flujo de información a través del hipocampo.

Imagen extraída de: (Bartsch & Wulff, 2015)

La estructura del circuito mostrado anteriormente, puede ser crítica para el aprendizaje y la memoria, pero a su vez puede contribuir a la vulnerabilidad durante el daño (Lavenex & Amaral, 2000). Como ya se mencionó, el GD está compuesto

de células granulares, este es sensitivo, lo que quiere decir que toda la información va a llegar allí y la parte motora es el Cuerno de Amón (Anderson et al., 2007). Con estos axones colaterales de CA3, se forma una auto-asociación y una hetero-asociación con GD y CA1 de la información proveniente de GD, finalmente CA1 recibe la información que ha sido pre-procesada por GD y CA3, pero también recibe proyecciones directas desde la corteza entorrinal (Lee, Rao, & Knierim, 2004), lo que ha sugerido que la función de las neuronas de CA1, incluye la comparación de la nueva información desde la corteza entorrinal con la información almacenada por la vía de CA3, detectando los errores y las novedades. (Bartsch & Wulff, 2015)

Las subregiones CA1 y CA3, están separadas en 4 capas (piramidal, stratum oriens, stratum lucidum y stratum radium) y GD en 3 capas (molecular, granular y polimórfica). Los procesos de aprendizaje y memoria que se dan en el circuito hipocampal, son regulados por mecanismos de plasticidad que requieren la activación de cascadas moleculares. Por ejemplo, la inducción de LTP en la subregión CA1 envuelve la entrada de calcio postsináptico, por los receptores NMDA y la posterior activación de las protein quinasas; como se mencionó anteriormente. En resumen el hipocampo se compone de subcampos anatómicamente distintos, con diferente morfología, forma y tamaño de la célula, con diferencias en su conectividad, propiedades electrofisiológicas y diferencias en la susceptibilidad en cada una de estas subregiones (Taupin, 2007). Por lo cual es posible postular que estas variaciones hacen que algunas subregiones tengan mayor susceptibilidad al péptido Aβ. Futuras investigaciones podrían estar enfocadas en establecer los mecanismos moleculares de esta zona específica, que la llevan a ser más susceptible a la muerte neuronal.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Evaluar la susceptibilidad neuronal entre las regiones GD, CA1 y CA3 en cultivos de cortes organotípicos de hipocampo y/o cultivos primarios de poblaciones neuronales hipocampales de ratas, ante la exposición a oligómeros del péptido β-Amiloide 1-42

2.3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar la metodología de obtención de cortes organotípicos del hipocampo y/o cultivos primarios de poblaciones neuronales hipocampales de ratas Sprague-Dawley, en las instalaciones de la Universidad Icesi.

- Preparar oligómeros solubles del péptido β-Amiloide 1-42 a partir del péptido sintético Aβ 1-42, verificando su obtención mediante el método Western Blot.

- Comparar la porción de los niveles de muerte neuronal, en cada subregión del hipocampo GD, CA1 y CA3 en cortes y/o cultivos primarios hipocampales de ratas Sprague-Dawley, antes y después del tratamiento a diferentes concentraciones con oligómeros sintéticos β-Amiloide 1-42.

2.4 Metodología Propuesta

2.4.1 Animales experimentales

El estudio se llevó a cabo en ratas correspondientes a la cepa Sprague- Dawley procedentes del Bioterio de la Universidad ICESI, temperatura de 22 ± 2°C, con comida y agua ad libitum. Las ratas se seleccionaron bajo las siguientes condiciones: Neonatos de 6 días de nacidos.

2.4.2 Cultivos organotípicos de secciones de hipocampo

El animal fue anestesiado mediante hipotermia, posteriormente fue decapitado, exponiendo el cerebro con una incisión sagital del cráneo, e inmediatamente colocado en Medio de Disección (MD) frío. Con ayuda de un estereomicroscopio y herramientas de disección se retiró el cerebelo y se separaron los hemisferios cerebrales, en cada hemisferio se retiraron los ganglios basales y posteriormente el hipocampo (derecho e izquierdo). Con un especial cuidado de que las pinzas no tocaran el hipocampo, se procedió a retirar los hipocampos con un pincel y a pasarlos a otra placa con medio de disección. Cada hipocampo fue colocado en la placa del micrótomo previamente sanitizado, con su lado cóncavo hacia abajo. Con un paño suavemente se retiró el exceso de medio de los bordes del hipocampo. A continuación, se cortó el hipocampo en secciones transversales de 400 µm de grosor. Una vez terminado, se tomó suavemente la placa con las secciones de hipocampo y fueron sumergidas en MD frío. Para finalizar, con el uso de un estereomicroscopio, se separaron las secciones del hipocampo, que conservaban mejor la morfología, preferiblemente de la parte medial del mismo.

En un plato de 6 pozos con membrana en cada pozo y medio de cultivo, fueron depositadas cuatro secciones de hipocampo. Guardando una distancia razonable. Finalmente, fueron incubadas a 37ºC en 5% de CO_2 durante 1 día antes de comenzar el experimento de toxicidad (cultivos agudos).

Preparación Medio de Disección (Solución de 50 mL): Solución balanceada de Hank 1X, 250 µL de bicarbonato de sodio 0,3 %. Filtrada a través de una membrana de 0,22 µm y guardada a 4ºC hasta disección.

Preparación de Medio de Cultivo (Solución de 50 mL): 36.3 mL de MEM (Earle's + L-Glu) 1X, 500 µL de solución penicilina/estreptomicina/anfotericina B, 12.5 mL de suero de caballo al 25%, 250 µL de L-glutamina, 500 µL de D- glucosa. El medio fue precalentado en incubadora antes de su uso.

Preparación de insertos de membrana (30 minutos aproximadamente)

Se preparó el medio de cultivo, luego fue adicionado 1 mL de medio de cultivo en cada pozo del plato de 6 pozos. A continuación, se adiciono un inserto de membrana de plato de cultivo a cada pozo preparado, colocando mucha atención a que la membrana de inserción tocara el medio de cultivo, pero no estuviese cubierto por él. Finalmente, se colocó el preparado de plato de 6 pozos dentro de la incubadora de cultivos celulares.

2.4.3 Preparación de oligómeros solubles Aβ 1-42

La proteína β-Amiloide (1-42) (HFIP-Tratada) (0,5 mg) fue resuspendida mediante la adición de DMSO para obtener una solución stock de concentración 1 mM. De allí se tomó una alícuota para preparar una solución de concentración 500 µM usando DMSO. A partir de esta solución se preparó una solución 5 µM en PBS, la cual se mezcló y se dejó a 4°C toda la noche para que se llevara a cabo el proceso de oligomerización. Luego de esto, la solución fue centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de remover el material insoluble. A partir del sobrenadante se prepararon soluciones de oligómeros con las concentraciones a evaluar (100 nM, 250 nM y 500 nM).

NOTA: Todo el proceso anterior también fue realizado con la la proteína β-Amiloide 1-42 (Scrambled).

El peptido β-Amiloide 1-42 scrambled, es el péptido β- amiloide (1-42) con la secuencia invertida. Por lo tanto, tiene la misma composición de aminoácidos, pero la secuencia es diferente y es utilizado en este estudio como un péptido de control. En esta investigación es un control negativo al igual que el vehiculo, con lo que se esperaría que los cortes organotipicos de hipocampo de rata expuestos a estos dos controles no desencadenen muerte neuronal.

2.4.4 Análisis de oligómeros solubles Aβ 1-42 por western blotting

Se utilizó esta metodología, para determinar la presencia de oligómeros solubles de Aβ 1-42, en las preparaciones del ítem 2.4.3.

Tratamiento de la muestra

Los oligómeros Aβ 1-42 y scrambled preparados en las fechas 02.04.2016, 25.05.2016 y 07-06.2016, fueron descongelados y centrifugados. Se les adicionó

buffer de carga compuesto por 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% de glicerol, 2% SDS, 284 mM de β-mercaptoetanol, 0.04% de azul de Coomassie G-250. Se conservó una proporción 1:2 con el buffer.

Electroforesis en gel de Tricina (10%-20%)

Esta técnica permite separar las proteínas de acuerdo con su peso molecular. El gel utilizado fue un gel de Tricina de gradiente (10%-20%). Se cargó 30 µL de cada muestra en los pozos del gel y 7 µL de marcador de peso molecular (Broad Range Molecular Weight Marker, Santa Cruz Biotech SC-236) en los extremos.

El orden de siembra de las muestras en el gel se resume en la tabla 1.

Tabla 1. Siembra de las muestras de oligómeros solubles del Aβ 1-42 en el gel de Tricina.

POZO	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
MUESTRA	MP	Sc 02.04	AβO 02.04	Sc 25.05	AβO 25.05	Sc 07.06	AβO 07.06	MP

La electroforesis se efectuó a 90 V durante 1 hora y 40 minutos.

Trasferencia de los oligómeros a la membrana de PVDF

Después de la electroforesis los oligómeros fueron transferidos a membranas sintéticas de PVDF (polifluoruro de vinilideno, BioRad), con tamaño de poro de 0,2 µm. La membrana fue previamente activada con metanol durante un minuto. La transferencia se llevó a cabo a 250 mA durante 70 min.

Bloqueo de la membrana e incubación con los anticuerpos primario y secundario.

El bloqueo de la membrana se realizó con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios y secundarios a esta. La membrana fue incubada con una solución al 5 % de leche libre de grasa durante una hora (solución de bloqueo), posteriormente lavada e incubada con el anticuerpo primario 6E10 (Anti-Aβ) con una proporción final de 1:1000, toda la noche a 4°C. Al día siguiente, fue retirado el anticuerpo primario y se hicieron 3 lavados con TTBS (TBST, en sus siglas en español Tris-Buffer Salino y Tween), durante 5 minutos cada uno y agitación constante. Luego se incubo con anticuerpo secundario (Anti-ratón IgG) con una

proporción final de 1:3000, por una hora a temperatura ambiente. Con posteriores lavados de igual forma que con el anticuerpo primario.

Revelado

El proceso de revelado se llevó a cabo en el cuarto oscuro de las instalaciones de la universidad ICESI, empleando un kit de quimioluminiscencia (Thermo Scientific). La membrana se incubó en la solución durante 5 minutos. Luego se expuso a una película autorradiográfica durante 5 y 10 minutos. Después se expuso la membrana a la película y esta última fue colocada en la máquina de revelado.

2.4.5 Tinción con Yoduro de Propidio (PI) para los cultivos organotípicos de hipocampo

Antes del tratamiento con los oligómeros

Un día antes del ensayo de viabilidad neuronal en secciones de hipocampo, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo PI a una concentración de 3.74 µM. Las secciones fueron incubadas toda la noche y luego de esto se hizo el registro fotográfico de los niveles basales de fluorescencia empleando un microscopio de epifluorescencia y el software NIS Elementes (Nikon). Las condiciones de adquisición de la imagen fueron establecidas con anterioridad y siempre fueron las mismas durante todos los experimentos.

Tratamiento con los oligoméros

Luego de la adquisición de la fluorescencia basal, las secciones fueron tratadas durante tiempos establecidos (30 y 60 minutos) con los oligómeros solubles Aβ 1-42 anteriormente preparados y su respectivo vehículo. (Ítem 2.4.6)

Después del tratamiento, se reemplazó el medio por medio Neurobasal conteniendo PI. Las secciones se incubaron por 24 h. Al día siguiente se evalúo de nuevo la muerte neuronal mediante microscopía de fluorescencia.

Preparación de solución de yoduro de propidio:

Solución Stock 1 mM: Se pesó 6,7 mg de PI y se adicionó con micropipeta en proporciones de 1 mL (10 veces), 10 mL de agua, en cada adición se mezcló suavemente evitando la formación de burbujas, hasta homogeneizar la solución.

El diseño de los tratamientos se realizó por 4 cultivos independientes (diferentes animales y días) con 4 repeticiones (cortes por pozo).

Los grupos experimentales fueron cortes expuestos a: Vehículo (I), Glutamato (II), Aβ Scrambled (III), Aβ 100 nM (IV), Aβ 250 nM (V), Aβ 500 nM (VI). Como se muestra a continuación:

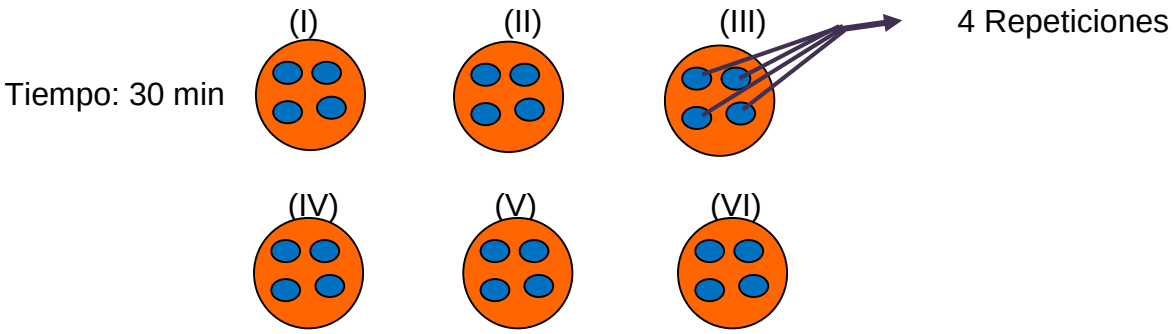


Figura 4. Esquema de Tratamiento farmacológico.

2.4.6 Cuantificación de la lesión neuronal del hipocampo y análisis estadístico.

En el día dos y tres se analizó y cuantificó la fluorescencia de PI en la subregiónes CA1, CA3 y GD de cada corte del hipocampo, de cada tratamiento independiente. El día 1 será el T0 (cero horas), que representa la muerte celular basal; el día 2 el T24 (24 horas). Una vez obtenida esta imagen, el porcentaje de citotoxicidad se calculó empleando el programa Image J (Procesamiento de imagen digital, NIH). Utilizando densitometría, se seleccionaron cada una de las subregiones del hipocampo GD, CA1 y CA3 de cada fotografía de los cortes y se halló la densidad de fluorescencia. Utilizando la fórmula: F24-F0 (F24: Densidad de fluorescencia de la subregión del corte después del tratamiento, F0: Densidad de fluorescencia de la subregión del corte antes del tratamiento).

El ensayo presenta resultados en forma de cálculo del área y las estadísticas de valor de píxel de selecciones definidas (cada subregión GD, CA1 y CA3). Se graficaron los promedios de las densidades de fluorescencia y la desviación estándar, para cada tratamiento obteniendo un histograma de densidad.

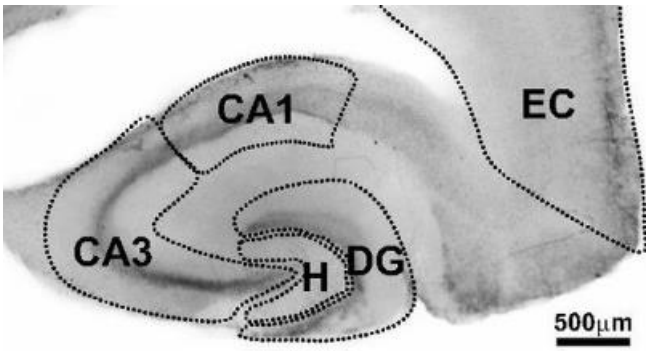


Figura 5. Imagen de muestra con la organización espacial de las subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de rata seguida en el análisis de las fotografías obtenidas en los diferentes ensayos con el programa Image J.

Imagen extraída de: (Gafurov & Bausch, 2013)

Se realizó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un análisis post-hoc de Dunn para comparar entre grupos (DG, CA3 y CA1). Para todos los grupos experimentales evaluados, incluyendo el control positivo (Glutamato) que en investigaciones se ha demostrado su efecto toxico en las células neuronales a altas concentraciones por excitotoxicidad y a los controles negativos el péptido β-Amiloide 1-42 scrambled y el vehículo (PBS). Los resultados obtenidos se encuentran detallados en el Anexo 2.

2.5 Resultados

Análisis de oligómeros solubles Aβ 1-42 por western blotting

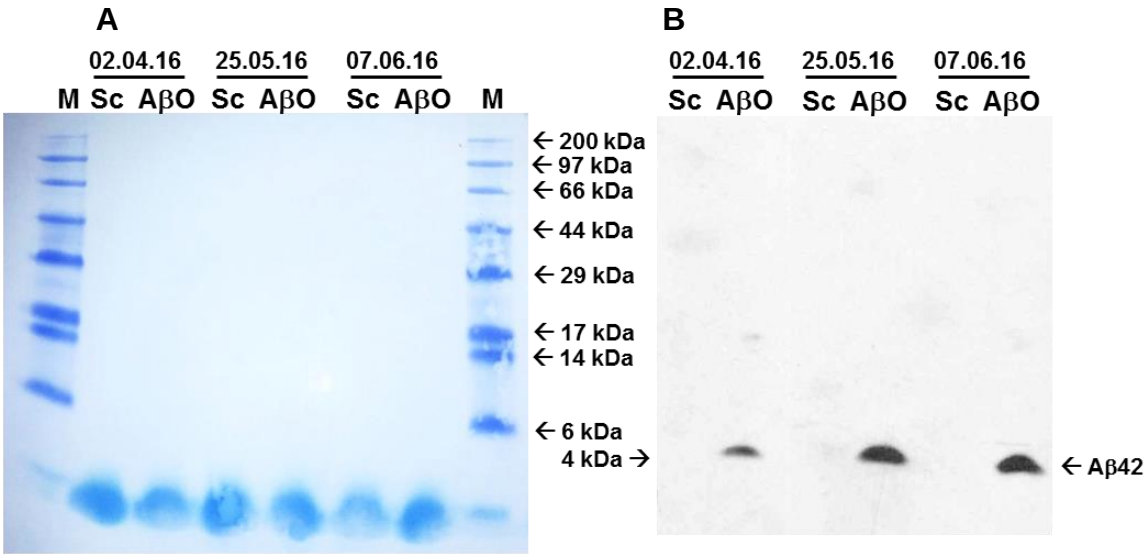
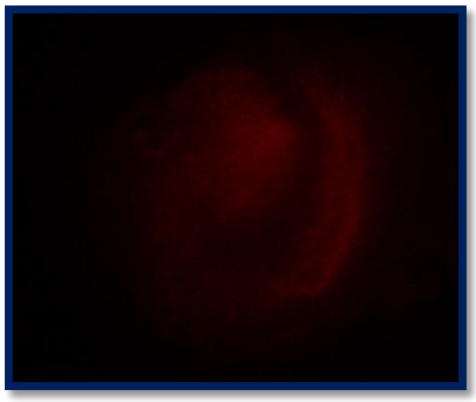


Figura 6. **Western Blot para la verificación de la obtención de oligómeros solubles de Aβ 1-42. (A)** Membrana obtenida en el proceso de western blot. Se utilizó un gel de Tricina de gradiente (10%-20%). La electroforesis fue a 90 V durante 1 h y 40 min. Los oligómeros fueron transferidos a membranas sintéticas de PVDF, a 250 mA por 70 min. La membrana obtenida fue incubada con solución al 5 % de leche libre de grasa por 1 hora (solución de bloqueo). Posteriormente se incubo con anticuerpo primario 6E10 (Anti-Aβ) 1:1000, toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se lavó con TTBS. Luego se incubo con anticuerpo secundario (Anti-ratón IgG) 1:3000, por 1 h, a temperatura ambiente. Finalmente se realizó el revelado. **(B)** Autorradiografia mostrando monómeros de Aβ 1-42. Sin presencia de la banda en 40 KDa que demostraría la presencia de oligomeros de Aβ 1-42 q

Efecto de los oligomeros solubles Aβ 1-42 sobre cortes organotípicos de hipocampo de ratas en exposición de 1 hora

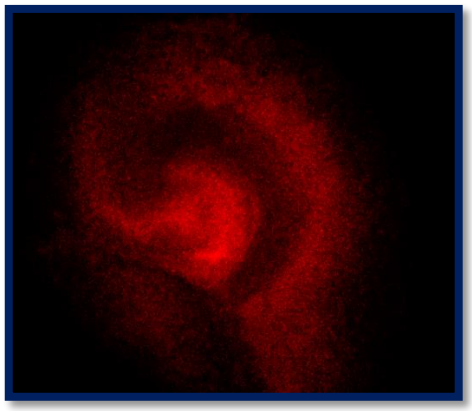
A

Vehículo (Control Negativo)



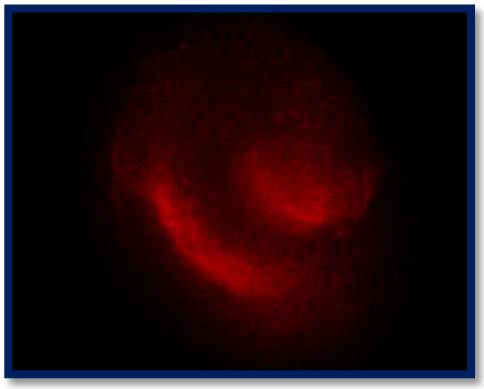
B

Glutamato (Control Positivo)

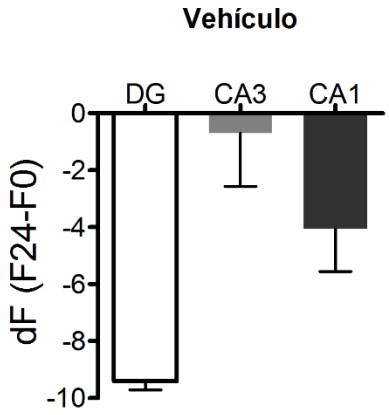


C

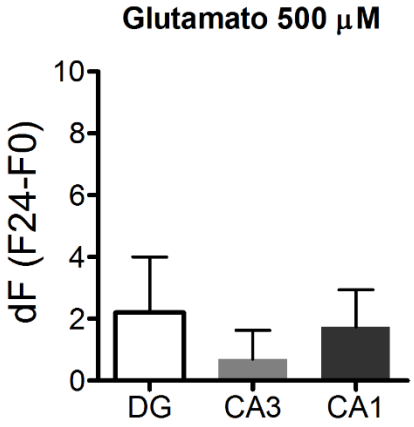
Aβ-42 Scrambled (Control Negativo)



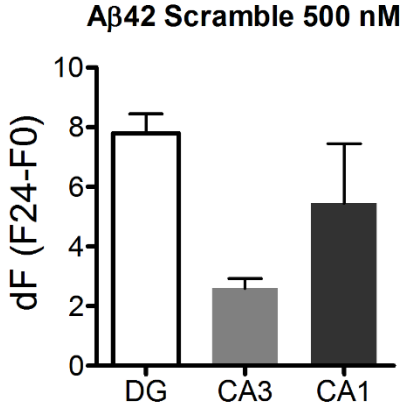
G



H



I



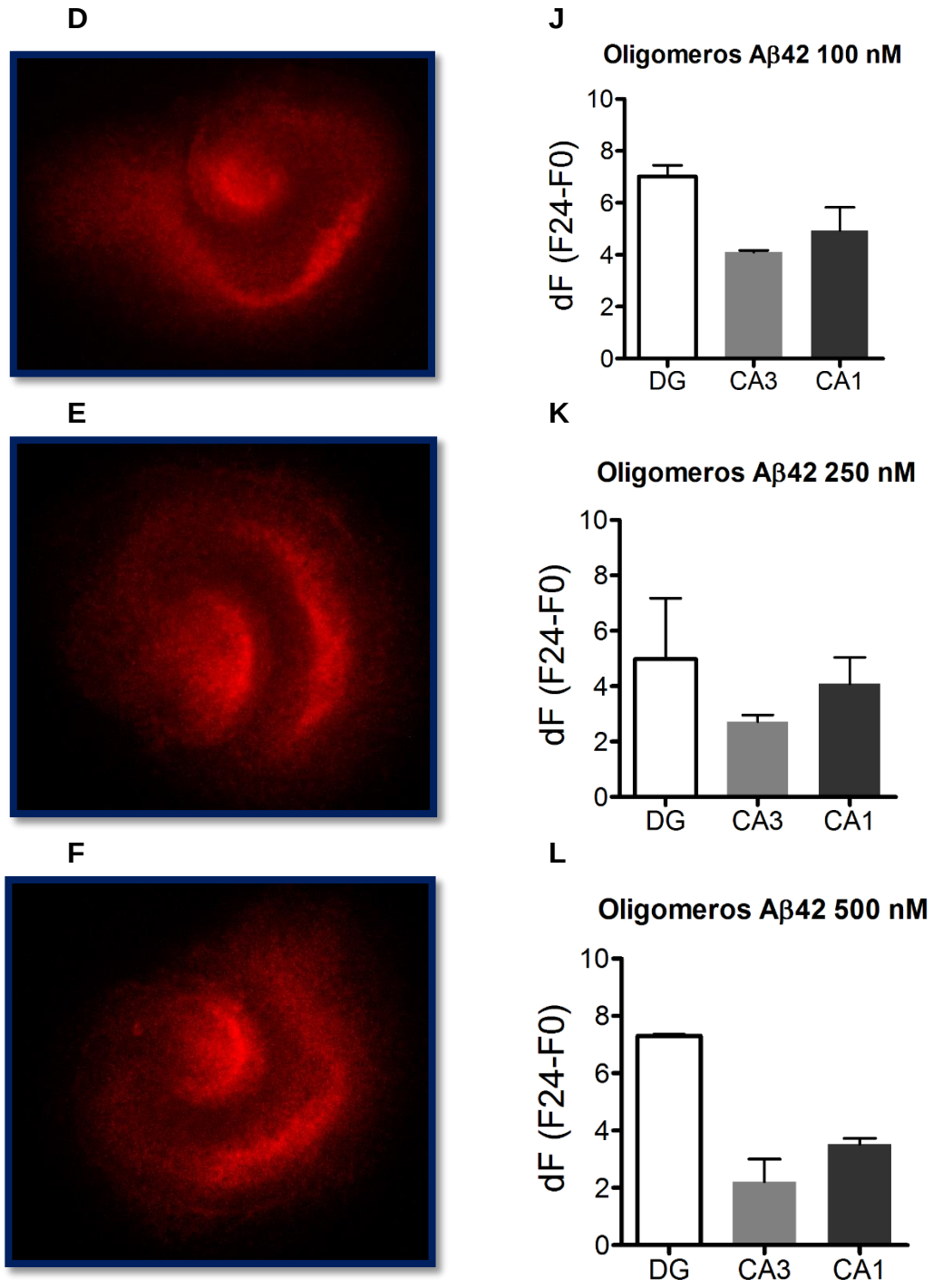


Figura 7. **Citotoxicidad a la exposición por 1 hora de oligomeros Aβ 1-42 y controles en cultivos de cortes organotípicos de hipocampo de ratas Sprague-Dawley.** Fotografías de la fluorescencia observada en el microscopio a las 24 horas de incubación con PI, después de tratamiento con exposición a (A)

Vehículo – PBS. (B) Glutamato 500 µM. (C) Aβ scramble 500 nM. (D) Oligómeros Aβ42 100 nM. (E) Oligómeros Aβ42 250 nM. (F) Oligómeros Aβ42 500 nM. Comparación del cambio en la intensidad de fluorescencia entre los cortes basales sin tratamiento y los cortes a las 24 horas después del tratamiento obtenido en cada subregión del hipocampo Giro Dentado (GD), Cuerno de Amon 1 (CA1) y Cuerno de Amón 3 (CA3), en HOSC expuestos a (G) Vehículo – PBS. (H) Glutamato 500 µM. (I) Aβ scramble 500 nM. (J) Oligómeros Aβ42 100 nM. (K) Oligómeros Aβ42 250 nM. (L) Oligómeros Aβ42 500 nM.

Los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad para realizar el ANOVA por lo tanto fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de kruskal Wallis seguido del test de comparación múltiple de Dunn's. Para determinar las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos se asumió un valor de $p<0,05$. Los análisis se realizaron para cada exposición desde los controles (Glutamato, vehículo, Aβ scramble) hasta las diferentes concentraciones de los oligomeros Aβ42 (100 nM, 250 nM y 500 nM). (Anexo 2)

De acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis realizada a cada tratamiento, no existen diferencias significativas en la vulnerabilidad de las subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo ante la citotoxicidad generada por el péptido Aβ 1-42, representado por el cambio en la intensidad de fluorescencia de los HOSC. (Figura 4, G, H, I, J, k y L). Tampoco se encuentra una relación entre la concentración del péptido Aβ con el grado de muerte neuronal presente en los cortes expuestos al tratamiento. Con respecto a los controles, el control positivo con glutamato, no presenta diferencias significativas en la vulnerabilidad de las subregiones GD, CA1 y CA3 (figura H), pero si, se presenta muerte neuronal como lo indica la fluorescencia obtenida después de las 24 horas, en todas las subregiones (Figura B). Para el control negativo con vehículo, se observa una diferencia de fluorescencia negativa, es decir mayor fluorescencia a las cero horas que a las 24 horas. Lo que indica que el corte presento una proporción de muerte debida a factores externos, no relacionados con el agente patogénico β- Amiloide 1-42. El segundo control negativo, el péptido Aβ 1-42 scrambled, presento cierta proporción de muerte, en este caso no se esperaba que con este control se presentara muerte ya que es el mismo péptido Aβ 1-42 pero con la secuencia de aminoácidos invertida, no debe presentar un efecto toxico para la célula

Variación de la respuesta entre ensayos en la estandarización del protocolo de cultivos de cortes organotípicos de hipocampo de rata

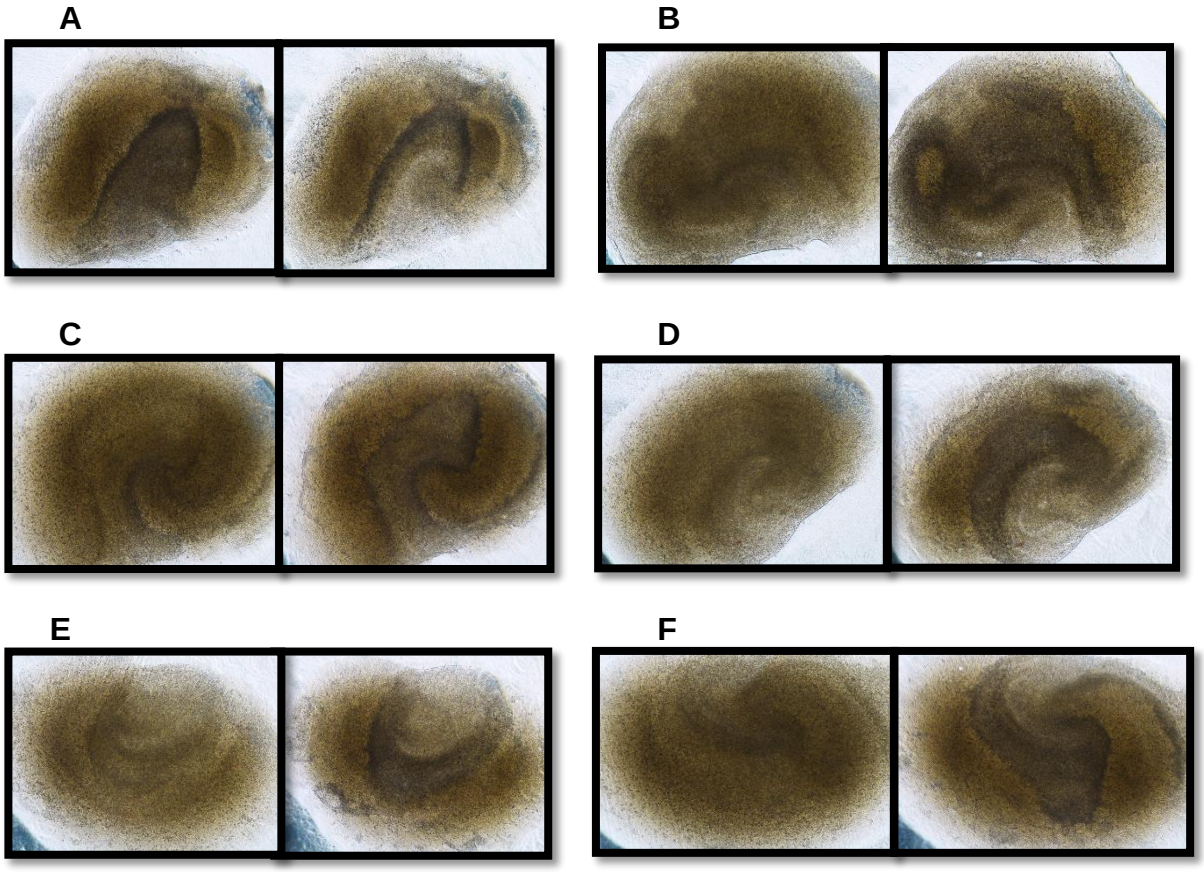


Figura 8. **Fotografías de HOSC en campo claro, con variación en los resultados de la estandarización de los cultivos.** Antes (imagen a la izquierda) y después (imagen a la derecha) de tratamiento con exposición a (A) Vehículo – PBS. (B) Glutamato 500 µM. (C) Aβ scramble 500 nM. (D) Oligómeros Aβ42 100 nM. (E) Oligómeros Aβ42 250 nM. (F) Oligómeros Aβ42 500 nM.

Para los datos obtenidos en la fecha 19.05.2016 no se realizó tratamiento estadístico debido a que los resultados de diferencia de fluorescencia entre las 24 horas y las ceros horas, arrojo valores negativos. Es decir que se presentó mayor muerte antes de las exposición al agente patogénico A β42 que después de la exposición de los cortes organotipicos a el. En la figura 8, se muestra los histogramas de diferencia de densidad para estos cortes.

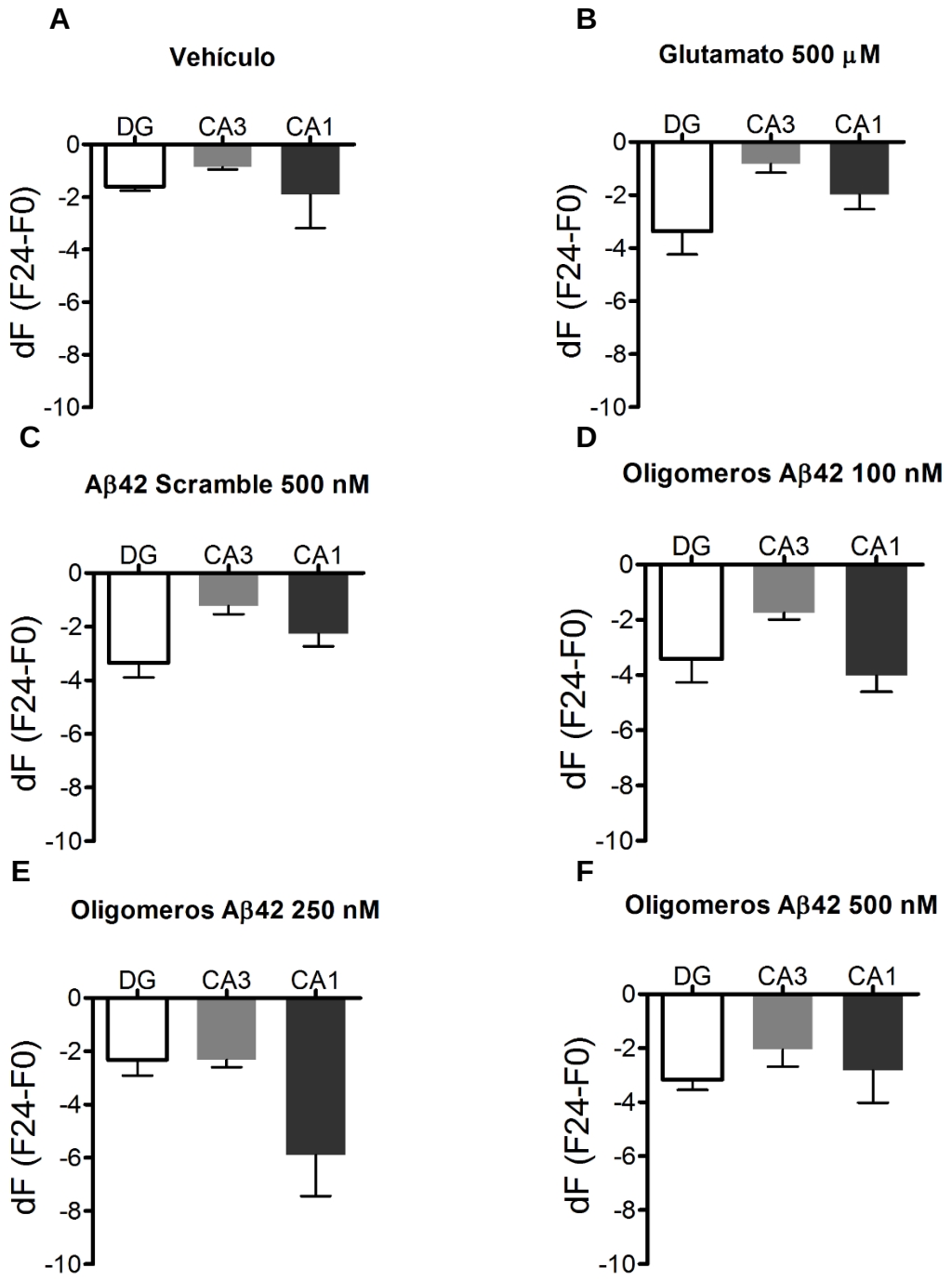


Figura 9. **Cambio en la intensidad de fluorescencia entre los cortes basales sin tratamiento y los cortes a las 24 horas después del tratamiento obtenido en cada subregión del hipocampo GD, CA1 y CA3.** En HOSC que presentaron variación en la respuesta preparados el 19.05.2016 expuestos a (G) Vehículo – PBS. (H) Glutamato 500 µM. (I) Aβ scramble 500 nM. (J) Oligómeros Aβ42 100 nM. (K) Oligómeros Aβ42 250 nM. (L) Oligómeros Aβ42 500 nM.

2.6 Discusión

En esta investigación se planteó la hipótesis que los oligómeros Aβ 1-42 afectan diferencialmente a las subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo, buscando aportar a la obtención de nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de la AD. Para esto, se evaluó la aparición de muerte neuronal en cada subregión después de la exposición al patógeno. Evidenciado como un aumento en la intensidad de fluorescencia en los cortes de hipocampo de rata. Reportado con más detalle en la metodología. Para esto fue necesario el cumplimiento de unos objetivos específicos que llevaron finalmente al objetivo general.

El primer objetivo planteado en esta investigación era estandarizar la metodología de obtención de cortes organotípicos del hipocampo de ratas Sprague-Dawley, en las instalaciones de la Universidad Icesi. En la estandarización se obtuvo una variación en la respuesta entre los ensayos realizados en diferentes fechas. En el tratamiento realizado sobre cultivos de 3 fechas diferentes (Anexo 4), se encontraron valores negativos en el cambio de la intensidad de fluorescencia (Figura 9). Es decir que la intensidad de fluorescencia en los cortes basales (Antes del tratamiento con los oligómeros - ítem 2.4.5) fue mayor que la intensidad de fluorescencia después del tratamiento. Significando una mayor muerte neuronal en las subregiones sin el agente patogénico que con él. Para el caso de exposición a vehículo (control negativo), Aβ scramble (control negativo 2) y glutamato (control positivo) los datos arrojados también son negativos, lo que indica que esta tendencia puede estar relacionada con el proceso de preparación de los HOSC. Una posible explicación a este evento puede ser la muerte acelerada de las células neuronales en los cortes de hipocampo. Esta afirmación se basa en las imágenes de las secciones hipocampales adquiridas en campo claro (Figura 78). En esta figura se observa que los cortes presentaban gran cantidad de muerte (Zonas negras) inclusive antes de comenzar el tratamiento con los oligómeros, perdiéndose la morfología del hipocampo casi desde el principio y dificultando el reconocimiento de las regiones después de las 24 horas. En consecuencia, si las neuronas se encuentran muertas desde antes del tratamiento, el PI no puede ser captado, ni se puede intercalar entre los pares de bases del ADN por lo cual no se presenta fluorescencia o su intensidad disminuye. Es importante tener en cuenta que antes de estas fechas se había tomado la determinación de cambiar la preparación de los medios de cultivo y disección (Anexo 1) para la obtención de los cortes organotípicos de hipocampo, ya que se había observado que los cultivos no sobrevivían el período de incubación planteado inicialmente (2 semanas) y antes de aplicar el tratamiento estos estaban muertos. Con los cambios hechos al protocolo los cortes mostraron una mejor morfología; a pesar de esto, se presentó una variación en la respuesta con relación a lo obtenido en los primeros cultivos (Figura 7 - cultivos iniciales, Figura 9 -Variación). Esta variación en la respuesta se atribuye exclusivamente a los protocolos de preparación y no al efecto del péptido Aβ 1-42.

Por lo tanto los datos de la investigación, se dividieron entre las fechas mencionadas en el anexo 4. Tomando como referente para los resultados de este estudio solo los cortes que dieron un valor de cambio de fluorescencia positivo (Figura 7). Es decir que se presentó (0 horas) menor que a las 24 horas después del tratamiento con agente patogénico β- amiloide 1-42.

Para el segundo objetivo, se buscaba llevar a cabo la preparación de los oligómeros solubles a partir del péptido sintético Aβ 1-42, verificando su obtención mediante el método de western blot. Esta forma en particular de agregación fue seleccionada con base en estudios (Dahlgren et al., 2002) (Carrero et al., 2012) (Fa et al., 2010) (Haass & Selkoe, 2007) (Perez et al., 2010) (Tu et al., 2014b) (Hyeon-Jin Kim, Soo-Cheon Chae, Dae-Kwon Lee, Brett Chromy, Sam Cheol Lee, Yeong-Chul Park, William Klein, Grant A. Krafft, 2003) que demuestran que los oligómeros son las formas más citotóxicas para las neuronas. Inhiben la viabilidad neuronal 10 veces más que las fibrillas y en promedio 40 veces más que el péptido no agregado. También se ha evidenciado que la forma oligomérica Aβ 1-42, tiene un efecto significativamente mayor sobre la viabilidad neuronal que las preparaciones de Aβ 1-40 (Dahlgren et al., 2002) (Bitan et al., 2003). En el western blot realizado (Figura 6) , se observó una banda a los 4 kDa (Figura 6 – B) que indica la presencia de monómeros del péptido Aβ 1-42 pero no la banda correspondiente a la forma de agregación oligomérica que tiene un peso molecular promedio de 40 kDa (Barghorn et al., 2005). La ausencia de la banda a los 40 kDa pudo deberse a la baja concentración que presentaban los oligómeros Aβ 1-42 en la muestra utilizada, lo cual no descarta su presencia durante los tratamientos. En algunos estudios se recomienda hacer la oligomerización a una concentración de 10 µM a temperatura ambiente. En el protocolo realizado (ítem 2.4.4) se utilizó una concentración de 5 µM y la oligomerización se realizó a 4°C. Otro factor que puede afectar los resultados, es la pérdida en la cantidad de muestra debida al proceso de trasferencia de la proteína desde el gel a la membrana.

Finalmente, se buscaba comparar la porción de los niveles de muerte neuronal, en cada subregión del hipocampo GD, CA1 y CA3 en los cortes, antes y después del tratamiento a diferentes concentraciones con oligómeros sintéticos β-Amiloide 1-42. Los resultados del análisis estadístico realizado, arrojaron que no existen diferencias significativas en el grado de muerte neuronal entre las subregiones, por lo cual, no se puede corroborar que el grado de toxicidad de los oligómeros de Aβ 1-42 varía según la población de neuronas del hipocampo (DG, CA1 o CA3) de ratas, ni establecer cuál subregión neuronal es la más susceptible. Estos resultados difieren de lo encontrado hasta el momento (Hyeon-Jin Kim, Soo-Cheon Chae, Dae-Kwon Lee, Brett Chromy, Sam Cheol Lee, Yeong-Chul Park, William Klein, Grant A. Krafft, 2003). En el estudio realizado por Jin Kim y colaboradores, se evalúo la degeneración selectiva neuronal inducida por oligómeros solubles de la proteína Aβ en cortes organotípicos de cerebro de ratón. Se detectó la muerte neuronal con homodímero de etidio y las neuronas sanas con tinción de calcetina. Se observó además que la región CA1 es más vulnerable a los oligómeros solubles que CA3 y

que esta última presentó una proporción sustancialmente mayor de células vivas en relación con la subregión CA1. A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas en la vulnerabilidad de las subregiones hipocampales, en nuestra investigación, si se evidenció una diferencia a nivel visual, entre la fluorescencia de la región GD y CA1 en comparación con la región CA3. En las dos primeras regiones se observa una intensidad mucho mayor (Figura 7, B-F). Cuando se comparan estos resultados con la literatura, se encuentra que la región CA1 del hipocampo es la más susceptible al daño con los oligómeros solubles de Aβ, en comparación de DG y CA3 (Greene & Killiany, 2012). Un estudio de imagen de Resonancia Magnética en pacientes con AD que corrobora que efectivamente la región CA1 es la más susceptible al péptido Aβ, confirmando el estudio de Jin Kim.

Para comprender que hace más susceptible a la región CA1 al daño, es necesario ampliar a más detalle cada una de estas subregiones. Dentro de las funciones que diferencian las subregiones, se ha planteado que CA3 gracias a su amplia red de vías colaterales, juega el papel de autoasociador y comparador (Bartsch & Wulff, 2015). Es capaz de recuperar patrones enteros de información, a partir de una entrada parcial o degradada desde GD y compararlos con la entrada sensorial que llega a esta subregión desde la corteza entorrinal. Lo que indica que CA3 actúa como un filtro de control de la información que es trasmitida a CA1. (Vazdarjanova & Guzowski, 2004). Tales propiedades autoasociativas no se encuentran en la zona CA1. El hipocampo como se mencionó con anterioridad es importante para el procesamiento y consolidación de la memoria declarativa, este tipo de memoria puede ser subdividida en dos categorías, la memoria episódica y la memoria semántica. (Eichenbaum, 2004). La memoria episódica almacena un tipo de representación relacional que proporciona información no sólo sobre el "qué" de los acontecimientos, sino también sobre el "dónde" y el "cuándo" se produjeron (Lee et al., 2004). El papel de la subregión CA1, no ha sido entendido en su totalidad. En una investigación donde se estudiaron los efectos de la inactivación reversible por la lidocaína de las áreas CA3 o CA1 del hipocampo se sugiere que la región CA1 tiene una posible implicación en el procesamiento de la memoria de "cuándo" se produjo el evento (Daumas, Halley, Francés, & Lassalle, 2005). Este estudio produjo otro hallazgo importante; estas dos subregiones del hipocampo están claramente implicadas en la consolidación de la memoria contextual, aunque la inactivación de CA1 conduce a una mayor alteración de la memoria contextual. También se cree que la función de las neuronas de CA1, incluye la comparación de la nueva información desde la corteza entorrinal con la información almacenada por la vía de CA3, detectando los errores y las novedades. (Bartsch & Wulff, 2015).

Claramente las subregiones GD, CA1 y CA3 tienen funciones diferentes aunque relacionadas entre sí. Otra de las diferencias evidentes entre estas subregiones son los tipos celulares presentes en cada uno, en GD se encuentran principalmente neuronas granulares (Duvernoy et al., 2013), en CA3, una red recurrente de células piramidales densamente interconectados y en CA1, una red de alimentación hacia adelante casi sin conexiones excitatorias intrínsecas. (Leutgeb, Leutgeb, Treves,

Moser, & Moser, 2004). Ya en un plano molecular, se sabe que las vías excitadoras dentro del hipocampo se componen de neuronas glutamatérgicas. Tanto la formación de la memoria y la muerte celular excitotóxicas son dependientes de estas neuronas y en particular de los receptores de glutamato de tipo NMDA (X. Liu, Gu, Duan, & Li, 2014). Esto hace a estos receptores claves para la buena función de cada subregión y del hipocampo en general. Se ha sugerido según estudios que hay diferencias significativas en el mecanismo por el que la LTP se expresa en estas subregiones. La LTP en CA1 implica la inserción del receptor NMDA (subunidades NR1, NR2A, y NR2B) y una inserción selectiva del casete C2 (exón 22) (Muller, Tokay, Porath, Kuhling, & Kirschstein, 2013). La subunidad NR1 se expresa en todo el SNC, sin embargo, la expresión de las variantes de empalme de NR1 (que se dan por la inclusión o exclusión de tres casetes N1, C1 y C2) es regulada y desarrollada a nivel regional en el hipocampo. (Xia et al., 2016) . Estos casetes son expresados diferencialmente entre las subregiones del hipocampo. Se presenta una mayor expresión de los casetes C1 y C2 y una menor expresión del casete N1 en CA1 con relación a CA3 y GD (Coultrap, Nixon, Alvestad, Valenzuela, & Browning, 2005). Este patrón de expresión juega un importante papel en la regulación de la función del receptor NMDA. El casete C1 es importante para la regulación de los receptores NMDA por la fosforilación, ya que contiene los principales sitios de fosforilación dentro de la subunidad NR1 (Flores et al., 2013) . Por lo tanto, es posible que el aumento de la expresión del casete de C1 en la subregión CA1 pueda aumentar a su vez la sensibilidad del NMDAR en esta región a la regulación por fosforilación. La subunidad fosforilada promueve el transporte del receptor y su expresión luego de varias horas. (Lau & Zukin, 2007). El casete C2 juega un papel especial en la LTP. En estudios de animales de edad avanzada que tienen deficiencias en la expresión de LTP se da la pérdida selectiva del casete C2 (Clayton, Mesches, Alvarez, Bickford, & Browning, 2002). Al estar expresado en mayor medida en CA1, puede generar en casos de excitotoxicidad un desequilibrio en la LTP. En CA1 como se dijo la expresión de N1 es menor en relación a las otras subunidades, se ha observado, que cuando hay presencia de N1 los receptores de NMDA se vuelven menos sensibles a la inhibición por protones y potenciación de poliaminas (Dravid et al., 2007). La presencia del casete de C2 y la ausencia del casete de N1 esta correlacionada con el aumento de toxicidad de NMDA (Rameau, Akaneya, Chiu, & Ziff, 2000) . Este aumento puede llegar a ser la causa de la mayor susceptibilidad de la subregión CA1 del hipocampo. Continuando con las diferencias entre las subregiones del hipocampo, se ha visto que hay una mayor expresión de NR2B en CA1 con relación a CA3 o GD (Coultrap et al., 2005). La expresión de subunidades NR2 influye en la farmacología del receptor NMDA, la cinética y la permeabilidad al Ca^{2+}. Consistente con un mayor componente NR2B en el CA1, se ha demostrado la desensibilización y más lenta desactivación de las corrientes de NMDA en el CA1 que en CA3 (Coultrap et al., 2005).

Todos los factores explicados anteriormente a nivel molecular pueden dar una idea de por qué la región CA1, es más susceptible que GD y CA3 a la excitotoxicidad de agentes patogénicos como el péptido Aβ, estudiado en esta investigación. Otro

hecho que puede explicar esta susceptibilidad está relacionado con el receptor AMPA, otro receptor que al igual que NMDA se sabe contribuye a la plasticidad sináptica y la excitotoxicidad (Malinow & Malenka, 2002). Se ha encontrado que las subunidades del receptor de AMPA, GluA1 y GluA2/3, se expresaron a mayores niveles en el CA1 que en CA3 o GD (Coultrap et al., 2005). Más receptores AMPA en CA1 podrían conducir a una mayor despolarización de la membrana postsináptica, por tanto, a una mayor activación de corrientes de NMDAR mediadas por Ca^{2+} tras la liberación de glutamato (Mattison et al., 2014) (Menigoz et al., 2016)

Con relación a los grupos control utilizados en esta investigación, se tenían 3, dos controles negativos y uno positivo. El control positivo con glutamato, no presentó diferencias significativas en la vulnerabilidad de las subregiones GD, CA1 y CA3 (figura 7,H), pero si, se presenta muerte neuronal como lo indica la fluorescencia obtenida después de las 24 horas, en todas las subregiones (Figura 7,B). Para el control negativo con vehículo (PBS), se observa una diferencia de fluorescencia negativa, es decir mayor fluorescencia a las cero horas que a las 24 horas. Lo que indica que el corte presento una proporción de muerte debida a factores externos, no relacionados con el agente patogénico β- Amiloide 1-42. El segundo control negativo, el péptido Aβ 1-42 scrambled, es el mismo péptido β- amiloide (1-42) pero con la secuencia invertida. Por lo tanto, tiene la misma composición de aminoácidos, pero la secuencia es diferente y es utilizado en este estudio como un péptido de control. El péptido β- amiloide (1-42), es un agente toxico bajo ciertas concentraciones a las neuronas, en cambio el péptido Aβ 1-42 scrambled, al tener la secuencia invertida no es toxico para la neuronas, porque no activa a los receptores NMDA, ni AMPAR. Sin embargo, para este estudio se encontró que en los cortes expuestos a este grupo control se presentó cierta proporción de muerte (Figura 7 – C, I).

En esta investigación se buscaba también determinar, cuál concentración de Aβ 1-42 (100 nM, 250 nM o 500 nM) y que tiempo de tratamiento (30 o 60 minutos) es necesario para desencadenar muerte celular. En relación a los resultados obtenidos, la muerte de las neuronas hipocampales se puede presentar después de 30 minutos de tratamiento con oligómeros a una concentración de 100 nM. Con los análisis realizados a los resultados, no es posible afirmar si se encuentra una relación lineal o exponencial entre la concentración y el daño. De acuerdo con Ikeyama y colaboradores, se esperaba que la concentración más toxica fuera 500 nM, y la toxicidad disminuyera a medida que lo hace la concentración del péptido (SHIZUO IKEYAMA, GERTRUDE KOKKONEN, SONSOLES SHACK, 2002). Contrario a lo encontrado, Como se muestra en la figura 6. J, K y L la concentración mayor (500 nM), no presenta los valores más grandes de cambio de intensidad de fluorescencia para todas las subregiones. Este resultado variable se presenta en las tres subregiones lo que sugiere que a mayor concentración de oligómeros Aβ no necesariamente se genera mayor daño celular. Este resultado contrasta con otros, en los cuales se encontró que en ratones transgénicos de AD la pérdida de sinapsis es inducida por la elevación de Aβ (Selkoe, 2002) y aunque los mecanismos

moleculares no se entienden todavía, se ha encontrado una relación entre la concentración de oligómeros Aβ y la muerte neuronal desencadenada probablemente por la receptores extrasinápticos de NMDA y cascadas de señalización asociadas (Tu, Okamoto, Lipton, & Xu, 2014a).

2.7 Conclusiones

1. No se encontraron diferencias significativas en la susceptibilidad de las subregiones GD, CA1 y CA3 ante la citotoxicidad causada por el péptido Aβ 1-42 en cortes organotípicos de hipocampo de ratas.

2. Se presenta muerte neuronal en el hipocampo de ratas desde los 30 minutos y una concentración del péptido Aβ 1-42 de 100 nM.

3. No se halló una relación directa entre la concentración del péptido Aβ 1-42 y la proporción de muerte obtenida en los HOSC de ratas.

2.8 Recomendaciones

1. Continuar con el proceso de estandarización de la metodología de obtención de cortes organotípicos del hipocampo de ratas Sprague-Dawley, en las instalaciones de la Universidad Icesi para garantizar la supervivencia de los cultivos por más de 7 días en condiciones de incubación óptima.

2. Para el análisis de western Blot, determinar la concentración óptima que debe tener la muestra de los oligómeros Aβ, para su correcta visualización por este método.

3. Continuar con las investigaciones en esta misma temática, utilizando tanto oligómeros Aβ 1-42, como oligómeros Aβ 1-40 y Aβ 1-43. Realizar los ensayos en otros tipos de cultivos como primarios de poblaciones neuronales hipocampales de ratas.

4. Optimizar la respuesta ante el pedido de reactivos por parte de los encargados de esta labor en la universidad ICESI, al igual que la periodicidad de la obtención de los animales del bioterio.

3. BIBLIOGRAFÍA

Adams, M. M., Shi, L., Linville, M. C., Forbes, M. E., Long, A. B., Bennett, C., … Brunso-Bechtold, J. K. (2008). Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. *Experimental Neurology*, *211*(1), 141–149. http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.01.016

Alzheimer's Association. (2015). Basics of Alzheimer ' S Disease. Retrieved from http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp#basics

Alzheimer's Disease International. (2013). *La demencia en America: El coste y la prevalencia del Alzheimer y otros tipos de demencia*. *Informe ADI/Bupa: La demencia en América*.

Anderson, P., Morris, R. G. M., Amaral, D. G., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book*. *Oxford University Press*. http://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001

Barghorn, S., Nimmrich, V., Striebinger, A., Krantz, G., Keller, P., Janson, B., … Hillen, H. (2005). Globular amyloid ??-peptide1-42 oligomer - A homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *95*(3), 834–847. http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03407.x

Barten, D. M., Meredith, J. E., Zaczek, R., Houston, J. G., & Albright, C. F. (2006). Gamma-Secretase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Drugs in R & D*, *7*(2), 87–97. http://doi.org/10.2165/00126839-200607020-00003

Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, *309*, 1–16. http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084

Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., & Teplow, D. B. (2003). Amyloid β-protein (Aβ) assembly: Aβ40 and Aβ42 oligomerize through distinct pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(1), 330–335. http://doi.org/10.1073/pnas.222681699

Blaise, J. H., & Bronzino, J. D. (2003). Effects of stimulus frequency and age on bidirectional synaptic plasticity in the dentate gyrus of freely moving rats. *Experimental Neurology*, *182*(2), 497–506. http://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00136-5

Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends in Neurosciences*, *33*(3), 153–161. http://doi.org/10.1016/j.tins.2009.12.003

Carrero, I., Gonzalo, M. R., Martin, B., Sanz-Anquela, J. M., Arévalo-Serrano, J., & Gonzalo-Ruiz, A. (2012). Oligomers of beta-amyloid protein (Aβ1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Experimental Neurology*, *236*(2), 215–227. http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.05.004

Chong, S. A., Benilova, I., Shaban, H., De Strooper, B., Devijver, H., Moechars, D., … Callewaert, G. (2011). Synaptic dysfunction in hippocampus of transgenic mouse models of Alzheimer's disease: A multi-electrode array study. *Neurobiology of Disease*, *44*(3), 284–291. http://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.07.006

Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., & Gleichmann, M. (2010). An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *NeuroMolecular Medicine*, *12*(1), 1–12. http://doi.org/10.1007/s12017-009-8104-z

Clayton, D. a, Mesches, M. H., Alvarez, E., Bickford, P. C., & Browning, M. D. (2002). A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(9), 3628–37. http://doi.org/20026327

Coultrap, S. J., Nixon, K. M., Alvestad, R. M., Valenzuela, C. F., & Browning, M. D. (2005). Differential expression of NMDA receptor subunits and splice variants among the CA1 , CA3 and dentate gyrus of the adult rat, *135*, 104–111. http://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.12.005

Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Blaine Stine, W., Baker, L. K., Krafft, G. A., & Ladu, M. J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-β peptides differentially affect neuronal viability. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(35), 32046–32053. http://doi.org/10.1074/jbc.M201750200

Daumas, S., Halley, H., Francés, B., & Lassalle, J.-M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: Differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learning & Memory*, *12*(4), 375–382. http://doi.org/10.1101/lm.81905

Dravid, S. M., Erreger, K., Yuan, H., Nicholson, K., Le, P., Lyuboslavsky, P., … Traynelis, S. F. (2007). Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *The Journal of Physiology*, *581*(Pt 1), 107–128. http://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124958

Duvernoy, H. M., Cattin, F., & Risold, P.-Y. (2013). *The Human Hippocampus*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-33603-4

Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, *44*(1), 109–120. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.028

Esteban, J. a. (2004). Living with the enemy: A physiological role for the β-amyloid peptide. *Trends in Neurosciences*, *27*(1), 1–3. http://doi.org/10.1016/j.tins.2003.10.008

Fa, M., Orozco, I. J., Francis, Y. I., Saeed, F., Gong, Y., & Arancio, O. (2010). Preparation of oligomeric beta-amyloid 1-42 and induction of synaptic plasticity impairment on hippocampal slices. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (41), 3–5. http://doi.org/10.3791/1884

Flores, M. E., Chaparro, V., Escoto, M., Ureña, M. E., Camins, A., & Beas, C. (2013). Receptor to glutamate NMDA-type: the functional diversity of the nr1 isoforms and pharmacological properties. *Current Pharmaceutical Design*, *19*(38), 6709–19. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23530508

Gafurov, B., & Bausch, S. B. (2013). GABAergic transmission facilitates ictogenesis and synchrony between CA3, hilus, and dentate gyrus in slices from epileptic rats. *Journal of Neurophysiology*, *110*(2), 441–455. http://doi.org/10.1152/jn.00679.2012

Gratwicke, J., Kahan, J., Zrinzo, L., Hariz, M., Limousin, P., Foltynie, T., & Jahanshahi, M. (2013). The nucleus basalis of Meynert: A new target for deep brain stimulation in dementia? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *37*(10), 2676–2688. http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.09.003

Greene, S. J., & Killiany, R. J. (2012). Hippocampal subregions are differentially affected in the progression to Alzheimer's disease. *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)*, *295*(1), 132–40. http://doi.org/10.1002/ar.21493

Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(2), 101–112. http://doi.org/10.1038/nrm2101

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., & Malinow, R. (2006). AMPAR Removal Underlies Abeta-Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron*, *52*(5), 831–843. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.035

Hyeon-Jin Kim, Soo-Cheon Chae, Dae-Kwon Lee, Brett Chromy, Sam Cheol Lee, Yeong-Chul Park, William Klein, Grant A. Krafft, S.-T. H. (2003). Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17 no. 1*, 118–120. http://doi.org/10.1096/fj.01-0987fje

Ittner, L. M., & Götz, J. (2011). Amyloid-β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(2), 65–72. http://doi.org/10.1038/nrn2967

Jessen, F., Wolfsgruber, S., Wiese, B., Bickel, H., Mösch, E., Kaduszkiewicz, H., … Wagner, M. (2014). AD dementia risk in late MCI, in early MCI, and in subjective memory impairment. *Alzheimer's & Dementia*, *10*(1), 76–83. http://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.09.017

Jurgens, H. a., & Johnson, R. W. (2012). Dysregulated neuronal–microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Experimental Neurology*, *233*(1), 40–48. http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.11.014

Kaduszkiewicz, H. (2005). Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. *BMJ*, *331*(7512), 321–327. http://doi.org/10.1136/bmj.331.7512.321

Kuhn, J., Hardenacke, K., Shubina, E., Lenartz, D., Visser-Vandewalle, V., Zilles, K., … Freund, H.-J. (2015). Deep Brain Stimulation of the Nucleus Basalis of Meynert in Early Stage of Alzheimer's Dementia. *Brain Stimulation*, *8*(4), 838–839. http://doi.org/10.1016/j.brs.2015.04.002

Lau, C. G., & Zukin, R. S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(6), 413–26. http://doi.org/10.1038/nrn2153

Lavenex, P., & Amaral, D. G. (2000). Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus*, *10*(4), 420–430. http://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:4<420::AID-HIPO8>3.0.CO;2-5

Lee, I., Rao, G., & Knierim, J. J. (2004). A double dissociation between hippocampal subfields: Differential time course of CA3 and CA1 place cells for processing changed environments. *Neuron*, *42*(5), 803–815. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.010

Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Treves, A., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2004). Distinct Ensemble Codes in Hippocampal Areas CA3 and CA1. *Science*, *305*(5688), 1295–1298. http://doi.org/10.1126/science.1100265

Liu, A. K. L., Chang, R. C.-C., Pearce, R. K. B., & Gentleman, S. M. (2015). Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, *129*(4), 527–40. http://doi.org/10.1007/s00401-015-1392-5

Liu, X., Gu, Q.-H., Duan, K., & Li, Z. (2014). NMDA Receptor-Dependent LTD Is Required for Consolidation But Not Acquisition of Fear Memory. *Journal of Neuroscience*, *34*(26), 8741–8748. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2752-13.2014

Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA RECEPTOR TRAFFICKING AND SYNAPTIC PLASTICITY. *Annual Review of Neuroscience*, *25*(1), 103–126. http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758

Mattison, H. A., Bagal, A. A., Mohammadi, M., Pulimood, N. S., Reich, C. G., Alger, B. E., … Thompson, S. M. (2014). Evidence of calcium-permeable AMPA receptors in dendritic spines of CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, *112*(2), 263–275. http://doi.org/10.1152/jn.00578.2013

Menigoz, A., Ahmed, T., Sabanov, V., Philippaert, K., Pinto, S., Kerselaers, S., … Balschun, D. (2016). TRPM4-dependent post-synaptic depolarization is essential for the induction of NMDA receptor-dependent LTP in CA1 hippocampal neurons. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *468*(4), 593–607. http://doi.org/10.1007/s00424-015-1764-7

Most, F., & High, C. (2015). 2015 Alzheimer'S Disease Facts and Figures 1 3, (March), 2050.

Muller, L., Tokay, T., Porath, K., Kuhling, R., & Kirschstein, T. (2013). Enhanced NMDA receptor-dependent LTP in the epileptic CA1 area via upregulation of NR2B. *Neurobiology of Disease*, *54*, 183–193. http://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.011

Organización Mundial de la Salud and Alzheimer's Disease International. (2013). *Demencia: una prioridad de salud pública*.

Perez, J. L., Carrero, I., Gonzalo, P., Arevalo-Serrano, J., Sanz-Anquela, J. M., Ortega, J., … Gonzalo-Ruiz, A. (2010). Soluble oligomeric forms of beta-amyloid (A??) peptide stimulate A?? production via astrogliosis in the rat brain. *Experimental Neurology*, *223*(2), 410–421. http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.10.013

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. *The New England Journal of Medicine*, *392*, 329–344. Retrieved from http://www.nejm.org/doi/ref/10.1056/NEJMra0909142#t=article

Rameau, G. A., Akaneya, Y., Chiu, L. Y., & Ziff, E. B. (2000). Role of NMDA receptor functional domains in excitatory cell death. *Neuropharmacology*, *39*(12), 2255–2266. http://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00066-6

Rapaka, D., Bitra, V. R., Medapati, J. R., & Akula, A. (2014). Calcium regulation and Alzheimer's disease. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4*(Suppl 2), S513–S518. http://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60666-6

Scheff, S. W., & Price, D. a. (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: A review of ultrastructural studies. *Neurobiology of Aging*, *24*(8), 1029–1046. http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.002

Scheff, S. W., Price, D. a., Schmitt, F. a., Dekosky, S. T., & Mufson, E. J. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*, *68*(18), 1501–1508. http://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f

Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science*, *298*(5594), 789–791. http://doi.org/10.1126/science.1074069

SHIZUO IKEYAMA, GERTRUDE KOKKONEN, SONSOLES SHACK, X.-T. W. et al. (2002). Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *16*(1), 93–95. http://doi.org/10.1096/fj.01

Silva, F. (2014). Investigación sobre Alzheimer en Colombia. *Neuropilo*, *38*.

Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., … Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-β. *Nature Neuroscience*, *8*(8), 1051–1058. http://doi.org/10.1038/nn1503

Takeuchi, Y., Ariza-Araujo, Y., & Prada, S. (2014). Prevalence estimates of dementia in colombia (2005-2020): Transitions and stage of disease. *Alzheimer's & Dementia*, *10*(4), P758. http://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.05.1442

Tariot, P. N., Farlow, M. R., Grossberg, G. T., Graham, S. M., McDonald, S., Gergel, I., & for the Memantine Study Group. (2004). Memantine Treatment in Patients With Moderate to Severe Alzheimer Disease Already Receiving Donepezil. *JAMA*, *291*(3), 317. http://doi.org/10.1001/jama.291.3.317

Taupin, P. (2007). *The hippocampus : neurotransmission and plasticity in the nervous systemNo Title*. (N. B. Books, Ed.). New York: Nova Biomedical Books.

Tu, S., Okamoto, S., Lipton, S. A., & Xu, H. (2014a). Oligomeric Aβ-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *9*(1), 48. http://doi.org/10.1186/1750-1326-9-48

Tu, S., Okamoto, S.-I., Lipton, S. A., & Xu, H. (2014b). Oligomeric Aβ-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *9*(48), 1–12. http://doi.org/10.1186/1750-1326-9-48

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), 272–282. http://doi.org/10.1038/nrn2614

Vazdarjanova, A., & Guzowski, J. F. (2004). Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(29), 6489–96. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0350-04.2004

Wang, H. W., Pasternak, J. F., Kuo, H., Ristic, H., Lambert, M. P., Chromy, B., … Trommer, B. L. (2002). Soluble oligomers of β amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Research*, *924*(2), 133–140. http://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03058-X

Xia, B., Zhang, H., Xue, W., Tao, W., Chen, C., Wu, R., … Chen, G. (2016). Instant and Lasting Down-Regulation of NR1 Expression in the Hippocampus is Associated Temporally with Antidepressant Activity After Acute Yueju. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1–8. http://doi.org/10.1007/s10571-015-0316-1

Yan, R., & Vassar, R. (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, *13*(3), 319–329. http://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X

Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2013). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *6*(1), 19–33. http://doi.org/10.1177/1756285612461679

ANEXOS

Anexo 1. Cambio de Medio para cultivos 18.05.2016, 19.05.2016 y 25.05.2016

Solución de Disección			
	Concentración 1	Concentración 2	Volumen (50 mL)
MEM	1X		45,5 mL
HEPES	2,5 M	25 mM	500 µL

Medio de Cultivo			
	Concentración 1	Concentración 2	Volumen (50 mL)
MEM (Earle's + L-glu)	1X		35,87 mL
HEPES	2,5 M	25 mM	500 µL
Suero de Caballo	100%	25%	12,5 mL
Pen/Strep/Amph B	100 X	1X	500 µL
D- Glucosa	50% (2,8 M)	35 mM	630 µL

Medio de Cultivo para tratamiento con oligómeros Aβ			
	Concentración 1	Concentración 2	Volumen (50 mL)
MEM (Earle's + L-glu)	1X		47,37 mL
HEPES	2,5 M	25 mM	500 µL
Suero de Caballo	100%	25%	1 mL
Pen/Strep/Amph B	100 X	1X	500 µL
D- Glucosa	50% (2,8 M)	35 mM	630 µL

Anexo 2. Análisis Estadístico del tratamiento farmacológico realizado a los HOSC

Tratamiento de Datos

ANOVA: Se realiza si se cumplen los dos supuestos siguientes:

- **Supuesto 1:** Homogeneidad de varianzas

Ho: Las varianzas son iguales
Ha: Las varianzas no son iguales

- **Supuesto 2:** Los datos tienen una distribución normal

Ho: Los datos tienen distribución normal
Ha: Los datos no tienen distribución normal

Se rechaza Ho si: Valor p < 0,05

Debido a que el valor p es menor que 0,05 en los datos de cada uno de los tratamientos realizados, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos no presentan distribución normal; por lo tanto no se puede aplicar el ANOVA. Se pasa a realizar la prueba de Kruskal- Wallis.

Hipótesis a probar

Ho: La mediana de las diferencias de la intensidad de fluorescencia en cada subregión GD, CA1 y CA3 son iguales

Ha: La mediana de las diferencias de la intensidad de fluorescencia en cada subregión GD, CA1 y CA3 no son iguales.

Se rechaza Ho, si: p < 0,05

A cada uno de los siguientes tratamientos se les realizo esta prueba.

Parameter

Table Analyzed **Vehículo**

Kruskal-Wallis test

P value	0,1561
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	**No**
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	3,714

Dunn's Multiple Comparison Test	**Difference in rank sum**	**Significant? P < 0.05?**	**Summary**
DG vs CA3	-3,5	No	ns
DG vs CA1	-2,5	No	ns
CA3 vs CA1	1	No	ns

Conclusión: p es mayor a 0,05, por tanto se aprueba Ho. No existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de la intensidad de fluorescencia F24-F0) entre las diferentes subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de ratas.

Parameter

Table Analyzed **Glutamato 500 µM**

Kruskal-Wallis test

P value	0,6514
Exact or approximate P value	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	**No**
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0,8571

Dunn's Multiple Comparison Test	**Difference in rank sum**	**Significant? P < 0.05**	**Summary**
DG vs CA3	1,5	No	ns
DG vs CA1	0	No	ns
CA3 vs CA1	-1,5	No	ns

Conclusión: p es mayor a 0,05, por tanto se aprueba Ho. No existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de la intensidad de fluorescencia F24-F0) entre las diferentes subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de ratas.

Parameter
Table Analyzed **Aβ scramble 500 nM**

Kruskal-Wallis test

P value	0,1561
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	**No**
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	3,714

Dunn's Multiple Comparison Test	**Difference in rank sum**	**Significant? P < 0.05?**	**Summary**
DG vs CA3	3,5	No	ns
DG vs CA1	1	No	ns
CA3 vs CA1	-2,5	No	ns

Conclusión: p es mayor a 0,05, por tanto se aprueba Ho. No existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de la intensidad de fluorescencia F24-F0) entre las diferentes subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de ratas.

Parameter
Table Analyzed **Concentración Aβ 100 nM**

Kruskal-Wallis test

P value	0,1561
Exact or approximate P value	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	**No**
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	3,714

Dunn's Multiple Comparison Test	**Difference in rank sum**	**Significant P < 0.05**	**Summary**
DG vs CA3	3,5	No	ns
DG vs CA1	2,5	No	ns
CA3 vs CA1	-1	No	ns

Conclusión: p es mayor a 0,05, por tanto se aprueba Ho. No existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de la intensidad de fluorescencia F24-F0) entre las diferentes subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de ratas.

Parameter	**Concentración Aβ**
Table Analyzed	**250 nM**

Kruskal-Wallis test

P value	0,3679
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	2

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant P < 0.05	Summary
DG vs CA3	2	No	ns
DG vs CA1	-0,5	No	ns
CA3 vs CA1	-2,5	No	ns

Conclusión: p es mayor a 0,05, por tanto se aprueba Ho. No existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de la intensidad de fluorescencia F24-F0) entre las diferentes subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de ratas.

Parameter	**Concentración Aβ**
Table Analyzed	**500 nM**

Kruskal-Wallis test

P value	0,1017
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	4,571

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant P < 0.05	Summary
DG vs CA3	4	No	ns
DG vs CA1	2	No	ns
CA3 vs CA1	-2	No	ns

Conclusión: p es mayor a 0,05, por tanto se aprueba Ho. No existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de la intensidad de fluorescencia F24-F0) entre las diferentes subregiones GD, CA1 y CA3 del hipocampo de ratas.

Anexo 3. HOSC con variación en la respuesta preparados el 25.05.2016

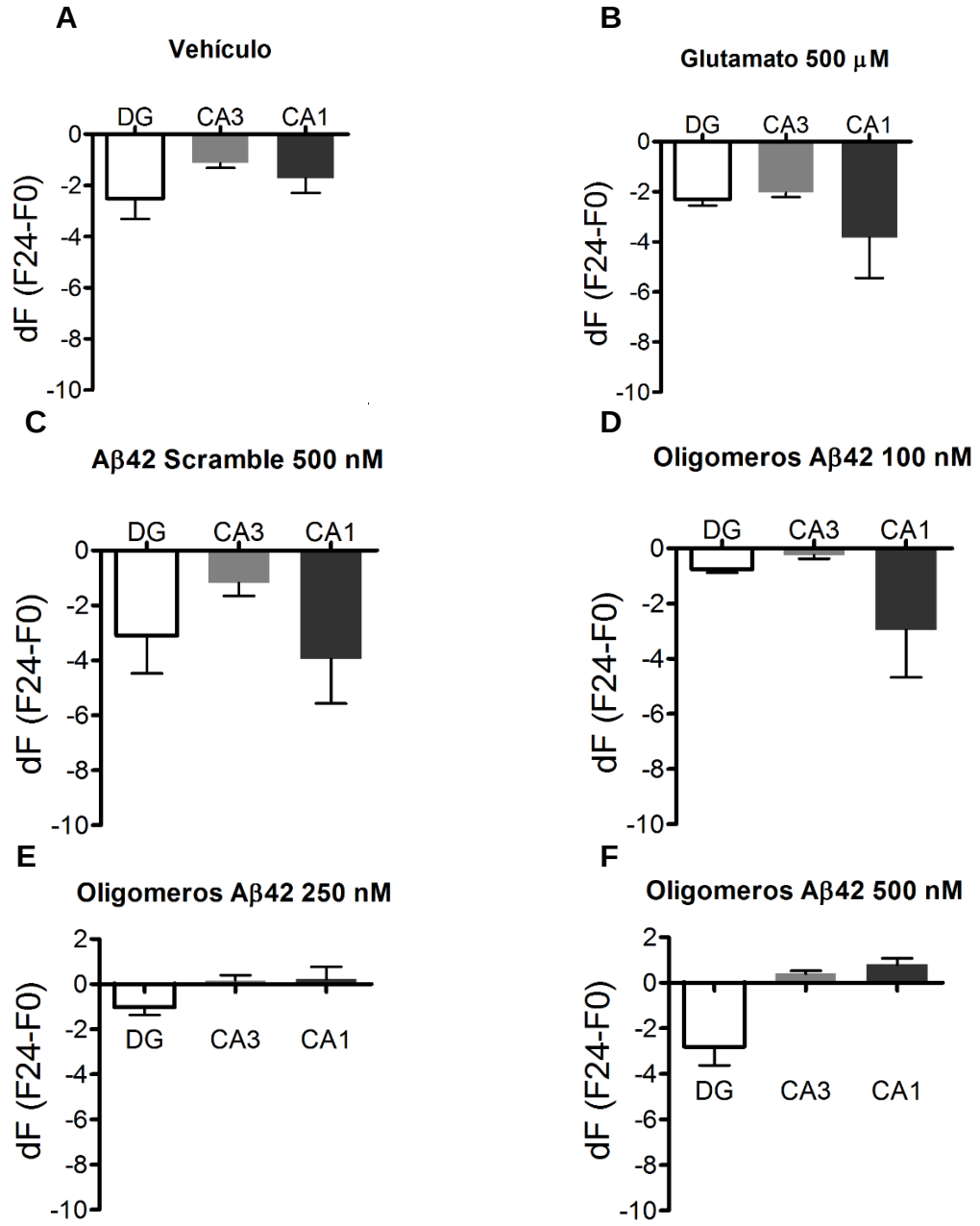


Figura 10. **Cambio en la intensidad de fluorescencia entre los cortes basales sin tratamiento y los cortes a las 24 horas después del tratamiento obtenido en cada subregión del hipocampo GD, CA1 y CA3.** En HOSC que presentaron variación en la respuesta preparados el 18.05.2016 expuestos a (A) Vehículo – PBS. (B) Glutamato 500 µM. (C) Aβ scramble 500 nM. (D) Oligomeros Aβ42 100 nM. (E) Oligomeros Aβ42 250 nM. (F) Oligomeros Aβ42 500 nM.

Anexo 4. Experimentos realizados para la estandarización de los HOSC

Tabla 2. Experimentos realizados para la estandarización de los HOSC

Fecha	**Medio utilizado**	**Tiempo de exposición al tratamiento**	**Tratamiento**	**Resultado**
Marzo 02/ 2016	Ítem 2.4.2	1 hora	Glutamato 500 µM	Presencia de fluorescencia. Sin cuantificación, solo una repetición. Estandarización de las condiciones del microscopio de fluorescencia
Marzo 08/2016	Ítem 2.4.2	x	x	Muerte de los Cultivos
Marzo 14/2016	Ítem 2.4.2	x	x	Muerte de los Cultivos
Abril 02/2016	Ítem 2.4.2	1 Hora	Ítem 2.4.6	Figura 6
Mayo 18/2016	Anexo 1	1 Hora	Ítem 2.4.6	Anexo 4, Figura 10 dF con valores negativos.
Mayo 19/2016	Anexo 1	30 minutos	Ítem 2.4.6	Figura 7 y 8 dF con valores negativos.
Mayo 25/2016	Anexo 1	30 minutos	Ítem 2.4.6	dF con valores negativos.

Anexo 5. Matriz de Marco Lógico

Objetivo General: Evaluar la susceptibilidad neuronal entre las regiones GD, CA1 y CA3 en cultivos de cortes organotípicos del hipocampo y/o cultivos primarios de poblaciones neuronales hipocampales de ratas, ante la exposición a oligómeros del péptido β-Amiloide 1-42				
Objetivos Específicos		**Actividades**	**Indicadores**	**Supuestos**
	Estandarizar la metodología de obtención de cortes organotípicos del hipocampo y/o cultivos primarios de poblaciones neuronales hipocampales de ratas Sprague-Dawley, en las instalaciones de la Universidad Icesi.	-Determinar la disponibilidad de los equipos necesarios. -Cotizar y comprar los reactivos. - Realizar la metodología para preparar los cultivos organotípicos de secciones del hipocampo - Incubar y cultivar las placas de cultivo en medio de cultivo 37ºC en 5% de CO_2 durante 2 semanas antes de comenzar el experimento de toxicidad. -Tratar las muestras con yoduro de propidio (marcador), antes del experimento de toxicidad con el fin de evaluar la integridad de las secciones, a partir de la visualización en un microscopio de fluorescencia.	-Obtención de los cultivos, que sobrevivan y no se encuentren contaminados. - Microscopias de fluorescencia de las regiones DG, CA1 y CA3 antes del ensayo de citotoxicidad.	-No tener disponibilidad de los equipos - Escases de los reactivos o demora en la llegada. - Muerte de las neuronas antes de la aplicación de beta-amiloide. - Contaminación de los cultivos.
	Preparar oligómeros solubles del péptido β-Amiloide 1-42 a partir del péptido sintético Aβ 1-42, verificando su obtención mediante el método Western Blot.	- Determinar la disponibilidad de los equipos necesarios. -Cotizar y comprar los reactivos. Proteína β- Amiloide (1-42) (HFIP- Tratada), Proteína β-Amiloide (1-42)(scrambled), Dimetilsulfoxido (DMSO) -Realizar la oligomerización de la proteína β- amiloide 1-42 - Realizar el análisis de los oligómeros solubles Aβ 1-42 por western blotting	-Obtención de la banda que representa la presencia de los oligomeros solubles β-Amiloide 1-42 en la muestra analizada por el método western Blot.	-Disponibilidad de los equipos y reactivos
		Actividades	**Indicadores**	**Supuestos**
		-Tratar lo cultivos con oligómeros solubles Aβ 1-42 en concentraciones de 50 a 500		-Muerte de las neuronas antes

	Comparar la porción de los niveles de muerte neuronal, en cada subregión del hipocampo GD, CA1 y CA3 en cortes y/o cultivos primarios hipocampales de ratas Sprague-Dawley, antes y después del tratamiento a diferentes concentraciones con oligómeros sintéticos β-Amiloide 1-42.	nM, por diferentes periodos de tiempo. -Tratar las muestras con el marcador yoduro de propidio por 24 horas, después del ensayo de citotoxicidad. Evaluar, en el día 2 la viabilidad neuronal mediante microscopía de fluorescencia y repetir el tratamiento con oligómeros solubles Aβ 1-42. -Determinar en el día 3, la extensión de la muerte neuronal usando microscopia de fluorescencia. - En el día 1,2 y 3, analizar y cuantificar la fluorescencia de PI en la subregión CA1, CA3 y GD de cada corte del hipocampo que representa la muerte celular basal y en cada día tomar fotografías de lo obtenido. - Las imágenes obtenidas se analizarlas por densitometría empleando el programa ImageJ - Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos.	-Obtención de los cultivos, que sobrevivan y no se encuentren contaminados. - Microscopias de fluorescencia de las regiones DG, CA1 y CA3 después de la exposición de los cultivos los oligomes Aβ	de la aplicación de beta-amiloide. -Contaminación de los cortes y/o cultivos hipocampales Muerte y lesión neuronal debida solamente a la exposición con oligómeros sintéticos Aβ 1-42 y no debida a otros factores diferentes de este. -Buena resolución de imagen en el microscopio de fluorescencia para determinar con precisión la zonas de mayor fluorescencia y poder hacer la relación directamente proporcional de a mayor intensidad, mayor muerte neuronal.

Anexo 6. Carta de aval del comité de ética

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

Calle 18 No. 122-135
PBX: (57-2) 555 2334, Fax (57-2) 555 2345
Cali - Colombia
www.icesi.edu.co