



**EVALUACIÓN DE LA VULNERABILIDAD DE POBLACIONES DE NEURONAS  
HIPOCAMPALES FRENTE AL GLUTAMATO EN LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

Steven Alexander David Jiménez

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
CALI  
2017

**EVALUACIÓN DE LA VULNERABILIDAD DE POBLACIONES DE NEURONAS  
HIPOCAMPALES FRENTE AL GLUTAMATO EN LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

Steven Alexander David Jiménez

Trabajo de grado para optar por el título de pregrado en Química Farmacéutica

Tutor: Álvaro Andrés Barrera Ocampo, PhD.

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
CALI  
2017



APROBADO POR:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Juliana Rengifo Gómez".

---

Juliana Rengifo Gómez  
Evaluadora

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Alvaro Andrés Barrera Ocampo".

---

Alvaro Andrés Barrera Ocampo  
Tutor del Proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer sincera y profundamente a la Universidad Icesi por permitirme llevar a cabo este trabajo. También, agradezco a todas las personas que con su ayuda han colaborado en la realización del mismo. Sin embargo, dirigiré las siguientes líneas a algunas personas en particular que merecen mi mayor gratitud. Primero, quiero dar infinitas gracias a mis padres, mi hermano y a mi familia, ya que ellos han sido mi apoyo y fuerza en todo el camino de mi formación profesional y personal, también, han sido motivo de mi inspiración y la energía que he necesitado para lograr mis sueños y metas. Segundo, doy muchas gracias a mi tutor el Dr. Álvaro Andrés Barrera Ocampo, por acompañarme durante todo el proceso de investigación y brindarme su apoyo, además, por ser un excelente maestro del cual aprendí mucho. Finalmente, agradezco inmensamente a mis amigos más queridos, Andrea, Lina, Wyner, Camila, Sandra, María Constanza (Coco), Daniela, Alejandro, Luis Enrique y Gustavo, y mis compañeros de PDG Tatiana, Franklin, Alejandra y Juan camilo ya que, ellos, con sus consejos, conocimientos, afecto y paciencia han aportado un granito de arena, para que este proyecto llegue con éxito a su culminación.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN DEL TRABAJO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUCCIÓN.....	11
2 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO .....	12
2.1 Planteamiento y justificación del problema .....	12
2.2 Marco Teórico y estado del arte .....	14
2.2.1 Enfermedad de Alzheimer.....	14
2.2.2 Señalización Glutamatérgica.....	15
2.2.3 Excitotoxicidad del Glutamato .....	16
2.2.4 Estructuras cerebrales implicadas en el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.....	18
2.3 Objetivos.....	21
2.3.1 Objetivo general .....	21
2.3.2 Objetivos específicos .....	21
2.4 METODOLOGÍA .....	22
2.4.1 Animales Experimentales.....	22
2.4.2 Cultivos organotípicos de secciones de hipocampo.....	22
2.4.3 Tinción con Yoduro de Propidio (PI) para los cultivos organotípicos de hipocampo. ....	23
2.4.4 Ensayo de excitotoxicidad.....	24
2.4.5 Cuantificación de la muerte neuronal en el hipocampo.....	24
2.4.6 Análisis estadístico.....	26
2.5 Resultados.....	27
2.6 Discusión .....	33
2.7 Conclusiones .....	39
2.8 Recomendaciones .....	40
2.9 Referencias.....	41
ANEXOS.....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Mecanismo de excitotoxicidad del Glutamato. ....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 2. Anatomía del hipocampo y su conexión trisináptica.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3. Ensayo de excitotoxicidad. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4. Plantilla para la medición de intensidad de fluorescencia.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 5. Imágenes de los cultivos organotípicos de hipocampo (OHSCs) de rata Wistar en campo claro a las 0 horas, para el tratamiento con glutamato durante 1 hora.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 6. Excitotoxicidad del glutamato durante 1 hora de tratamiento en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo (OHSCs) de ratas Wistar..</b>	<b>29</b>
<b>Figura 7. Imágenes de los cultivos organotípicos de hipocampo (OHSCs) de rata Wistar en campo claro a las 0 horas, para el tratamiento con glutamato durante 2 horas.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 8. Excitotoxicidad del glutamato durante 2 horas de tratamiento en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo (OHSCs) de ratas Wistar..</b>	<b>32</b>

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Análisis estadístico del ensayo de excitotoxicidad realizado a los OHSCs, para el tratamiento con glutamato durante 1 hora de exposición. ....	45
<b>Anexo 2.</b> Análisis estadístico del ensayo de excitotoxicidad realizado a los OHSCs, para el tratamiento con glutamato durante 2 horas de exposición.....	48
<b>Anexo 3.</b> Matriz de Marco Lógico.....	51
<b>Anexo 4.</b> Carta de aval del comité de ética.....	54

## GLOSARIO

**EA:** Enfermedad de Alzheimer

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**DG:** (Dentate Gyrus) – Giro Dentado

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

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

**CE:** Corteza Entorrinal

**nbM:** (Nucleus Basalis of Meynert) – Núcleo Basal de Meynert

**DCL:** Deterioro Cognitivo Leve

**ACV:** Accidente Cerebrovascular

**A $\beta$ :** Péptido Beta Amiloide

**PPA:** Proteína Precursora Amiloide

**MAP:** (Microtubule – Associated Protein) – Proteína Asociada a Microtúbulos

**LTP:** (Long – Term Potentiation) – Potenciación a Largo Plazo

**LTD:** (Lon – Term Depression) – Depresión a Largo Plazo

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato

**NOS:** (Nitric Oxide Synthase) – Óxido Nítrico Sintasa

**ROS:** (Reactive Oxygen Species) – Especies Reactivas de Oxígeno

**PI:** (Propidium Iodide) – Yoduro de Propidio

**OHSCs:** (Organotypic Hippocampal Slice Cultures) – Cultivos Organotípicos de Cortes de Hipocampo

## RESUMEN DEL TRABAJO

El glutamato es el neurotransmisor excitador por excelencia del Sistema Nervioso Central. Este es el más abundante, puesto que media casi el 70% de las transmisiones sinápticas en la corteza cerebral y el 90% en el hipocampo. Sin embargo, su acumulación en la hendidura sináptica, debido a una perturbación en su equilibrio homeostático conduce a la aparición de un proceso excitotóxico, que produce muerte neuronal y contribuye al desarrollo de la fisiopatología presente en la Enfermedad de Alzheimer (EA). Dicha muerte neuronal puede ser medida usando Yoduro de Propidio (PI), el cual es un agente intercalante que emite un color fluorescente rojo. La fluorescencia se produce cuando se intercala en el DNA o RNA de las células que presentan deficiencia en la integridad de la membrana celular debido al proceso de apoptosis y/o necrosis que se genera por el mecanismo de excitotoxicidad.

La estructura anatómica más afectada en la EA es el hipocampo, por tal razón, es la más estudiada en muchos grupos de investigación. Esta estructura se encuentra involucrada con el proceso de aprendizaje y el procesamiento de la memoria. No obstante, en dicha enfermedad, las poblaciones neuronales de esta región son afectadas causando disfunción en la transmisión sináptica y muerte neuronal, lo cual conduce a una pérdida de la memoria y finalmente demencia. El hipocampo posee una estructura anatómica definida, compuesta por tres subregiones principales: Giro Dentado (DG), Cuerno de Amón 3 (CA3) y Cuerno de Amón 1 (CA1). Estas subregiones presentan características citoarquitectónicas, funcionales, morfológicas, y moleculares distintas, las cuales contribuyen a su vulnerabilidad diferencial frente a varios agentes patógenos. Por tal razón, este estudio evaluó la presencia de muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo de ratas frente a la excitotoxicidad generada por el glutamato. Para representar esta enfermedad, se usó un modelo celular organotípico (*in vitro*), el cual consistió en cortes de hipocampo de rata Wistar (P6) que fueron expuestos a diferentes concentraciones de glutamato, durante periodos de tiempo establecidos. Además, se determinó la viabilidad neuronal y la muerte celular basal a partir de la fluorescencia emitida por el marcador PI en cada subregión. Los resultados de esta investigación, confirmaron que las subregiones del hipocampo DG, CA3 y CA1 son afectadas de manera diferencial por el neurotransmisor glutamato. Además, se determinó que la concentración de glutamato y el tiempo necesario para producir muerte neuronal diferencial es 1 mM y 1 hora, respectivamente. También, se encontró que la subregión más susceptible a este compuesto es la CA1, en comparación con DG y CA3.

**PALABRAS CLAVE:** Enfermedad de Alzheimer, Glutamato, Hipocampo, Disfunción Sináptica, Cultivos organotípicos de hipocampo, Pérdida de la memoria.

## ABSTRACT

Glutamate is the excitatory neurotransmitter for excellence of the Central Nervous System. This is the most abundant since it mediates almost 70% of synaptic transmissions in the cerebral cortex and 90% in the hippocampus. However, its accumulation in the synaptic cleft, due to a disturbance in its homeostatic balance, leads to the appearance of an excitotoxic process that causes neuronal death and contributes to the development of the pathophysiology present in Alzheimer's disease. Such neuronal death can be measured using propidium iodide (PI), which is an intercalating agent that emits a fluorescent red color. Fluorescence occurs when PI intercrosses into the DNA or RNA of cells that have cell membrane integrity deficiency due to the process of apoptosis and / or necrosis that is generated by the mechanism of excitotoxicity.

The anatomic structure most affected in AD is the hippocampus, for this reason, it is the most studied in many research groups. This structure is involved in the process of learning and memory formation. However, in this disease, the neuronal populations of this region are affected by dysfunction in the synaptic transmission and neuronal death, which leads to a loss of memory and finally dementia. The hippocampus has a defined anatomical structure, composed of three main subregions: Dentate Gyrus (DG), Horn of Ammon 3 (CA3) and Horn of Ammon 1 (CA1). These subregions present different cytogenetic, functional, morphological and molecular characteristics that contribute to their differential vulnerability to several pathogens.

For this reason, this study evaluated the presence of differential neuronal death in rat hippocampal subregions exposed to glutamate-induced excitotoxicity. To represent this disease, we used an organotypic cell model (in vitro), which consisted of cuts of Wistar rat hippocampus (P6) that were exposed to different concentrations of glutamate, during established periods of time. In addition, neuronal viability and basal cell death were determined from the fluorescence emitted by the PI marker in each subregion. The results of this investigation confirmed that the subregions of the hippocampus DG, CA3 and CA1 are differentially affected by the neurotransmitter glutamate. In addition, the concentration of glutamate and the time required to produce differential neuronal death were determined to be 1 mM and 1 hour, respectively. Also, it was found that the subregion most susceptible to this compound was CA1, compared to DG and CA3.

**KEYWORDS:** Alzheimer's disease, glutamate, Hippocampus, Synaptic dysfunction, Organotypic Hippocampal Slice Culture, Memory loss.

## 1 INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos nacionales e internacionales han reportado que la Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia, la cual afecta principalmente a las personas en edad avanzada (Budson & Solomon, 2016). La prevalencia de la enfermedad ha aumentado a través del tiempo y los pronósticos realizados en dichos estudios han demostrado que esta se incrementará en los siguientes años; por tal razón, la EA se ha convertido en el objeto de estudio en varios proyectos de investigación (Association, 2015).

La fisiopatología de la EA es compleja, multifactorial y está asociada a varios mecanismos (Danysz & Parsons, 2012), uno de ellos es, la excitotoxicidad causada por el glutamato, el cual es el principal neurotransmisor excitador del Sistema Nervioso Central (SNC) y su presencia en este tejido se ha vinculado con diversas funciones (Danysz & Parsons, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que su acumulación en la hendidura sináptica, provoca la despolarización continua de las neuronas post-sinápticas y la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$ , generando un incremento en la concentración de este ion en el citosol, el cual produce la expresión de genes apoptóticos y daño en las funciones metabólicas de la célula, que al final desencadenan la muerte neuronal (Jia, Njapo, Rastogi, & Hedna, 2015).

La principal región del cerebro que se ve afectada en la EA, es la formación hipocampal, la cual tiene un papel esencial en el aprendizaje, la consolidación y formación de la memoria, por lo que un daño en esta área puede producir deterioro cognitivo leve, uno de los síntomas más importantes en los inicios de la enfermedad y luego pérdida de la memoria en los estadios más avanzados (Strange, Witter, Lein, & Moser, 2014) (Bartsch & Wulff, 2015). Actualmente, no existe claridad completa sobre por qué algunas poblaciones neuronales de las subregiones del hipocampo son más susceptibles a compuestos patogénicos como el glutamato. Por tal razón, este proyecto busca determinar, si la exposición al glutamato produce muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo, Giro dentado (DG) y Cuerno de Amón 1 y 3 (CA1, CA3).

## 2 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

### 2.1 Planteamiento y justificación del problema

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia, debido a que se presenta en un 75% de los casos, ya sea por sí misma o en combinación con otros desórdenes (Budson & Solomon, 2016). Esta enfermedad afecta al 2% de la población de los países industrializados y según datos recientes, más del 10% de la población mayor de 65 años y el 50% de la población mayor de 85 años padece esta enfermedad (Albert Cabrera, Martínez Pérez, Gutiérrez Ravelo, Hakim Rodríguez, & Pérez Davison, 2014). La EA aparece como la sexta causa de muerte en los Estados Unidos (Association, 2015). Teniendo en cuenta lo anterior, se puede decir que, esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud grave que afecta no solo a la persona que la padece sino también, a la familia, a la comunidad y a los recursos en salud que se debe emplear para tratar a los pacientes.

El principal factor de riesgo que predispone a la EA es la edad. La incidencia de la enfermedad se duplica cada cinco años después de los 65 años, con el diagnóstico de 1275 nuevos casos al año por cada 100.000 personas mayores de esta edad. Los datos muestran que la EA no es necesariamente el resultado del envejecimiento; sin embargo, este puede contribuir a su desarrollo después de los 85 años de edad (Querfurth & LaFerla, 2010).

Hasta el momento, no existen intervenciones terapéuticas dirigidas a detener la progresión o revertir el deterioro neuronal causado por la EA. Sin embargo, en la actualidad los únicos fármacos para tratar la EA aprobados por la FDA (Food and Drug Administration, EE.UU.) son paliativos y no modifican el deterioro cognitivo, funcional y conductual que presentan los pacientes (Albert Cabrera et al., 2014). Dentro de los medicamentos disponibles para su uso, se encuentran los inhibidores de la colinesterasa (donepezilo, rivastigmina y galantamina), los cuales se usan principalmente en pacientes con EA leve a moderada, y el antagonista del receptor NMDA (Memantina), el cual es aprobado para el tratamiento de pacientes con EA moderada a severa (Howard et al., 2012).

Otras estrategias para combatir la EA incluyen los tratamientos enfocados en los procesos fisiopatológicos de la enfermedad, tales como la formación de placas seniles extracelulares (agregados de péptidos A $\beta$  y neuritas distroficas) y ovillos neurofibrilares intracelulares (agregados de la proteína hiperfosforilada tau). Para el primer caso, se encuentran compuestos con mecanismo de acción específica en los procesos de formación, inhibición y eliminación de A $\beta$ , tales como Posifen, PBT2 y Neprelisina respectivamente. En el segundo aparecen inhibidores de quinasas, inhibidores de la agregación y estabilizadores de los microtubulos

(Aggarwal, Shah, & Bennett, 2015). A partir de lo mencionado anteriormente, se puede evidenciar que todas las estrategias terapéuticas actuales, están dirigidas principalmente hacia el tratamiento sintomatológico de la enfermedad, cuando esta ya se encuentra presente, y no a la interrupción de su progresión. Además, la incidencia creciente, propone a los grupos de investigación, realizar un estudio más detallado de las áreas del cerebro que se encuentran mayormente relacionadas con la aparición y progresión de la enfermedad, para así encontrar un tratamiento más acertado frente a este problema de salud.

Este proyecto permitirá identificar, si el neurotransmisor glutamato afecta de forma diferencial las subregiones del hipocampo DG, CA1 y CA3, y cuál de estas presenta mayor vulnerabilidad a este compuesto. Buscando correlacionar los resultados obtenidos con la arquitectura diferencial de cada subregión, esta investigación se realiza con el objetivo de proveer más información acerca del deterioro neuronal en el hipocampo, ocasionado por el glutamato, el cual está asociado con la pérdida cognitiva en la EA, y contribuir al desarrollo de la siguiente hipótesis: **El neurotransmisor glutamato produce muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo (DG, CA1, CA3).**

Otros estudios en cultivos organotípicos de hipocampo de ratas Sprague-Dawley de 6 días de nacidas, mostraron que las neuronas de la subregión CA1 son más vulnerables al glutamato que las de la subregión CA3, lo cual sustenta la hipótesis planteada para el proyecto de investigación (Stanika, Winters, Pivovarova, & Andrews, 2010).

Por último, se puede decir que esta línea de investigación tiene aplicación en el entorno colombiano, debido a que estudios realizados a nivel nacional, revelan que la EA se ha convertido en un problema de salud importante. La prevalencia de la enfermedad se encuentra entre 1,8 y 3,4% en pacientes mayores de 65 y 75 años respectivamente. Teniendo en cuenta las cifras anteriores y los datos pronosticados por el DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística) en relación con el crecimiento poblacional esperado, los casos de demencia serán de 263.000, cifras que tendrán un alto impacto para los sistemas de salud en términos de costos para el tratamiento y el cuidado del paciente (Sánchez, Nariño, Fernando, & Cerón, 2010). Lo anteriormente mencionado deja de manifiesto que, esta investigación, servirá de base en estudios posteriores relacionados con el desarrollo de nuevos fármacos que sean efectivos, seguros y económicos para el tratamiento de EA.

## **2.2 Marco Teórico y estado del arte**

### **2.2.1 Enfermedad de Alzheimer**

La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, irreversible y reconocida a nivel mundial como la forma más común de demencia (Aggarwal et al., 2015). La demencia, se define como un síndrome de evolución crónica, caracterizado por la pérdida de la cognición y las habilidades funcionales (García et al., 2009). La EA presenta características patológicas tanto macroscópicas como microscópicas, que son típicas de la enfermedad. Dentro de las primeras se encuentra la reducción de la masa cerebral, la atrofia de los lóbulos temporal, frontal y parietal, así como el hipocampo, y el incremento del sistema ventricular. En las segundas, se presentan la formación de placas seniles, ovillos neurofibrilares, la pérdida selectiva de las neuronas y la transmisión sináptica, y un incremento en el número y actividad de los astrocitos (Budson & Solomon, 2016). De todas las características neuropatológicas mencionadas, el deterioro cognitivo es el que se encuentra más estrechamente asociado con la pérdida de la transmisión sináptica en el neocórtex y el sistema límbico (Crews & Masliah, 2010). Dicha pérdida se comienza a presentar en las personas que manifiestan déficits cognitivos sutiles diferentes de los que aparecen durante el envejecimiento normal, encontrándose entonces en un etapa anterior a la demencia llamada deterioro cognitivo leve (DCL) (Scheff, Price, Schmitt, Dekosky, & Mufson, 2007).

La EA como sucede con otras patologías, se presenta en varias etapas, comienza con una fase asintomática preclínica, luego continúa con una fase de deterioro cognitivo leve y finaliza en la demencia. Sin embargo, esta última presenta a su vez cuatro etapas más. La primera se conoce como demencia muy leve, en esta los pacientes tienen un leve deterioro cognitivo y dificultad en el conocimiento de las fechas. La segunda se llama demencia leve, en la cual se presenta pérdida de la memoria, confusión en la ubicación o lugares familiares, cambios en el estado de ánimo y la personalidad e incremento de la ansiedad. Luego aparece la demencia moderada, en la cual se incrementa la pérdida de la memoria y la confusión, y se generan problemas para el reconocimiento de los amigos y familiares. Finalmente, está la demencia severa, en la cual se presenta una completa incapacidad para el reconocimiento de familiares y amigos, pérdida de peso, falta del control autonómico, entre otros (Budson & Solomon, 2016).

El principal factor de riesgo que predispone a la población al desarrollo de la EA es la edad. Sin embargo, otros factores como la historia familiar, ser mujer, los accidentes cerebrovasculares (ACV), los niveles elevados de homocisteína en plasma y otros factores de riesgo de enfermedad cerebrovascular, la depresión de inicio tardío, y la herencia de ciertas formas alélicas del gen que codifica la

apolipoproteína E, han sido relacionados con el desarrollo de esta enfermedad (Budson & Solomon, 2016).

### **2.2.2 Señalización Glutamatérgica**

Nuevos trabajos experimentales han mostrado que la señalización glutamatérgica puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de la EA, desde las etapas tempranas de la enfermedad. Además, varios datos experimentales junto con el uso clínico del antagonista del receptor NMDA, memantina, sustentan dicha hipótesis. Desafortunadamente, datos definitivos sobre la participación de la transmisión glutamatérgica en la EA aún están incompletos (Esposito et al., 2013). Por tal razón, el estudio sobre la contribución de esta vía de señalización neuronal al desarrollo de la EA, se ha convertido en un foco para muchas líneas de investigación que quieren esclarecer los procesos fisiopatológicos asociados a esta enfermedad. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, este proyecto de investigación se enfocará en el estudio de los daños neuronales causados por el neurotransmisor glutamato.

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia del sistema nervioso central (SNC), casi el 70% de las transmisiones sinápticas usan glutamato como neurotransmisor excitador. Está involucrado en casi todas las funciones del SNC y se ubica especialmente en las regiones corticales y en el hipocampo (Danysz & Parsons, 2012). Además, el glutamato está involucrado en la plasticidad sináptica, el aprendizaje dependiente del hipocampo y la formación de la memoria mediante la potenciación a largo plazo (LTP) (Rudy, Hunsberger, Weitzner, & Reed, 2015).

Este neurotransmisor actúa a través de receptores que se encuentran presentes en las neuronas tanto pre- como post-sinápticas. Las dos principales familias de receptores de glutamato son los ionotrópicos (canales iónicos dependientes de ligando) y los metabotrópicos (receptores acoplados a proteína G). Los receptores ionotrópicos, se dividen en tres clases: el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), el cual es permeable al ion calcio ( $Ca^{2+}$ ) y posee siete subunidades NR1, NR2A-D y NR3A-B que forman heterómeros, el receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) y el kainato, los cuales son permeables a los iones sodio ( $Na^+$ ) y potasio ( $K^+$ ). Los receptores metabotrópicos, se dividen en tres subgrupos dependiendo de su función y su estructura: el grupo 1 (mGluRs1 y 5), el grupo 2 (mGluRs2 y 3) y el grupo 3 (mGluR4 mGluR6-8). Los receptores ionotrópicos se hallan principalmente en las neuronas post-sinápticas y median la transmisión excitatoria rápida, mientras que los receptores metabotrópicos se encuentran en varios compartimientos, en las neuronas y las células gliales (Esposito et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, el glutamato desempeña un papel central en el hipocampo durante el proceso de formación de la memoria y el aprendizaje. La activación del receptor NMDA es importante para la regulación de los mecanismos de plasticidad sináptica, potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD). Estos procesos son generados por la fuerte estimulación de las neuronas pre-sinápticas que incrementa la liberación de glutamato a la hendidura sináptica. El aumento en la concentración de este neurotransmisor produce la activación en primera instancia de los receptores AMPA y mGluRs, y posteriormente los receptores NMDA. Una vez estos se encuentran activados, se permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol, provocando dentro de la neurona cambios bioquímicos que están relacionados con la inducción del LTP. Por el contrario, los estímulos que induzcan una disminución de las sinapsis excitadoras, produce la internalización de los receptores NMDA post-sinápticos y la activación de los receptores NMDA extra-sinápticos que contienen NR2B, lo que causa una disminución de la concentración y el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol de la neurona post-sináptica. Estos mecanismos son los responsables de la inducción del LTD, el cual en condiciones patológicas puede estar asociado con el fallo sináptico (Esposito et al., 2013).

### **2.2.3 Excitotoxicidad del Glutamato**

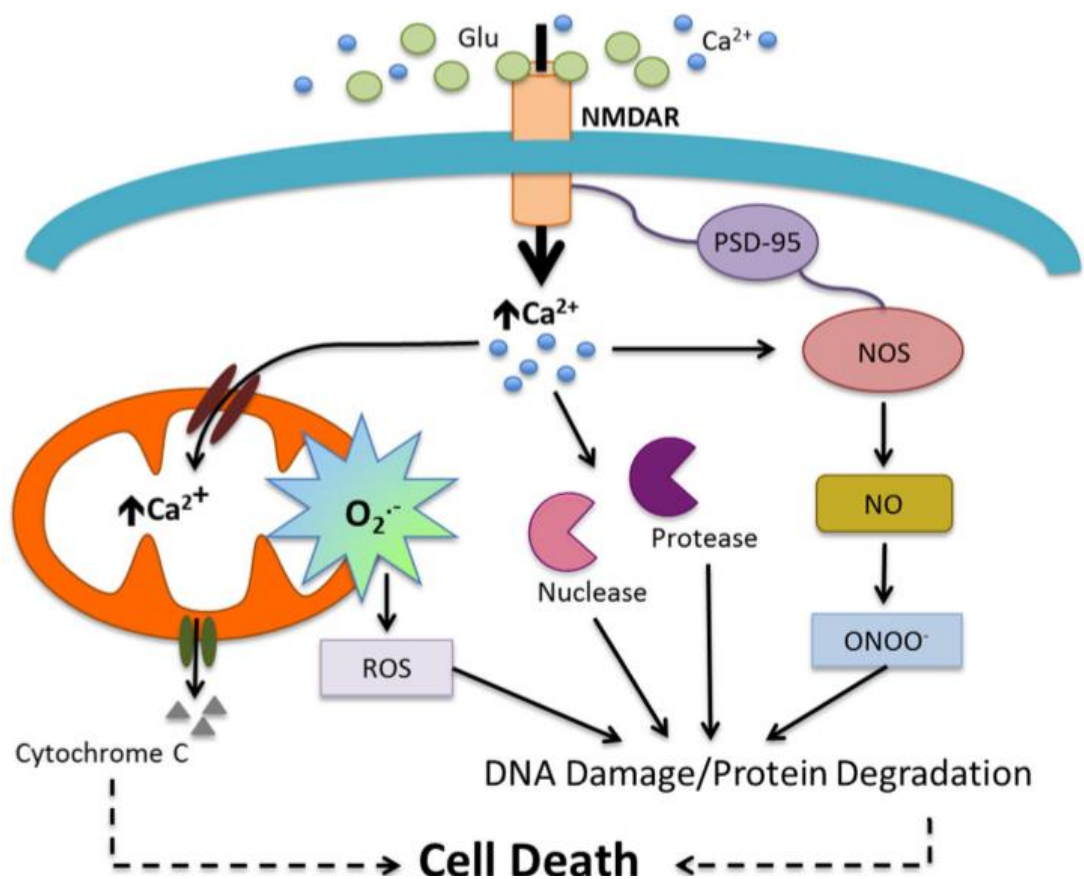
El glutamato a concentraciones fisiológicas está involucrado en diferentes funciones en el SNC. Sin embargo, una liberación prolongada de este neurotransmisor en la hendidura sináptica, puede generar excitotoxicidad y muerte neuronal. Por esta razón, se ha postulado que el glutamato puede desempeñar un rol muy importante en la neurodegeneración crónica de enfermedades como la EA (Butterfield & Pocernich, 2003). La excitotoxicidad del glutamato se presenta cuando el balance homeostático de este neurotransmisor es perturbado y sus niveles extracelulares comienzan a incrementarse (Jia et al., 2015). Uno de los factores que puede estar asociado con este desbalance homeostático es el envejecimiento, como se mencionó antes, debido a los cambios neuroquímicos, fisiológicos y estructurales que se presentan en el cerebro y que alteran los componentes básicos de regulación del calcio como lo es el glutamato (Rapaka, Bitra, Medapati, & Akula, 2014).

La muerte neuronal en el SNC se lleva a cabo por dos mecanismos: uno fisiológico y otro excitotóxico. La muerte fisiológica se produce principalmente por apoptosis, mientras que la muerte celular excitotóxica es un proceso patológico que involucra al glutamato y a sus receptores. Normalmente, el glutamato se encuentra almacenado en vesículas en el interior de las neuronas pre-sinápticas, cuando es liberado a la hendidura sináptica y su concentración comienza a aumentar, las células gliales, especialmente los astrocitos, se encargan de recapturarlos, procesarlos y reciclarlos para que posteriormente las neuronas vuelvan a usarlos, este es un proceso de regulación que mantiene la

concentración de glutamato extracelular balanceado (Jia et al., 2015). Sin embargo, cuando este proceso se encuentra inhabilitado por varios factores como la presencia de los oligómeros A $\beta$ , se produce una acumulación del neurotransmisor y se genera la excitotoxicidad (Rudy et al., 2015).

La acumulación del glutamato produce una sobre-activación de los receptores NMDA extrasinápticos que están ubicados en las espinas, dendritas o soma de la neurona, y que solo se activan con altas concentraciones del neurotransmisor, mientras los receptores NMDA sinápticos se internalizan en la célula por la sobre-estimulación generada, este proceso se conoce como desensibilización y es un mecanismo de protección celular. La causa principal de la excitotoxicidad neuronal, mediada por el glutamato, es el incremento en el flujo de iones Ca<sup>2+</sup> hacia el citosol a través de los receptores NMDA extrasinápticos.

El incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular puede conducir a la activación de varios mecanismos, dentro de los cuales está la óxido nítrico sintasa (NOS) y la toxicidad mitocondrial. Cuando el glutamato se une a los receptores NMDA extrasinápticos, se produce la apertura del canal iónico permeable a Ca<sup>2+</sup>, el flujo de este ion al citosol activa la NOS y en consecuencia se aumenta la producción óxido nítrico (NO), un compuesto que provoca la formación de agentes oxidantes dañinos que producen la nitración y oxidación de proteínas, la peroxidación lipídica, lesión directa al ADN, y la disminución de varias enzimas. Además, el Ca<sup>2+</sup> genera daño a nivel mitocondrial, lo cual desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres, la destrucción de proteínas y la activación de genes pro-apoptóticos que conducen a la muerte neuronal (Jia et al., 2015). A continuación, se presenta un esquema con el mecanismo de excitotoxicidad producido por el glutamato mencionado anteriormente.



**Figura 1. Mecanismo de excitotoxicidad del Glutamato.** Concentraciones elevadas de glutamato activan los receptores NMDAR, lo cual incrementa el flujo de iones Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hacia el citosol. El aumento de este ion intracelular, activa la óxido nítrico sintasa (NOS), la producción de óxido nítrico (NO) y peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ), produciendo degradación de las proteínas y el ADN. Además, la disfunción mitocondrial genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación del citocromo C, el cual activa cascadas señalización celular que inician apoptosis. Imagen tomada de: (Jia et al., 2015).

#### 2.2.4 Estructuras cerebrales implicadas en el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer

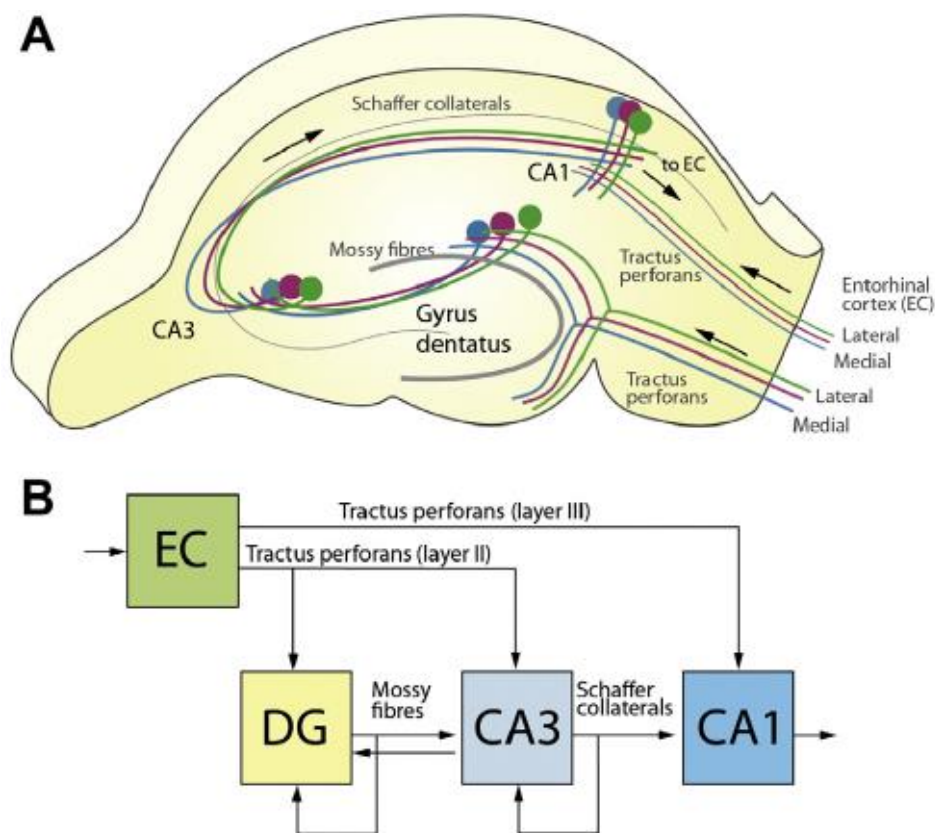
Una de las primeras regiones del cerebro que se ve afectada en la EA es el hipocampo, esto se debe al alto grado de neuroplasticidad que se produce en esta estructura, entendiendo por neuroplasticidad, la capacidad del SNC para responder a estímulos internos y externos mediante la reorganización de su estructura, función y conexiones nerviosas (Bartsch & Wulff, 2015). Sin embargo, se ha establecido que la primera región afectada en los inicios de la enfermedad es el núcleo colinérgico basal de Meynert (nbM) (García et al., 2009). La pérdida de hasta el 50% de neuronas colinérgicas en estudios histológicos *post mortem* de

la corteza cerebral (FitzGerald, Gruener, & Mtui, 2012) se ha correlacionado con el deterioro cognitivo en trastornos de demencia como la EA, no obstante, el problema con esta región se presenta por la confusión sobre su localización anatómica exacta en el cerebro humano, debido a que este posee una estructura amplia y difusa. Además, aunque estudios han trazado las proyecciones topográficas en primates, los resultados no muestran una correlación clínico-patológica directa entre el nbM, las regiones corticales, y la reducción cognitiva (Liu, Chang, Pearce, & Gentleman, 2015). Por tal razón, esta investigación se centrará específicamente en el estudio del hipocampo y no del nbM.

Muchos estudios han tratado de descifrar y comprender por qué el hipocampo es la región más afectada en la EA, y por qué esta es la más vulnerable al mecanismo fisiopatológico de la enfermedad ya descrito. Por tal motivo, esta investigación se enfocará en estudiar la formación hipocampal, específicamente el giro dentado (DG) y las subregiones del cuerno de Amón CA1 y CA3. La formación hipocampal comprende el giro dentado (DG), el subículo y el hipocampo propiamente dicho; mientras que la región parahipocampal se compone principalmente del presubículo, parasubículo y la corteza entorrinal (CE) (Andersen, Morris, Amaral, Bliss, & O'Keefe, 2007). El hipocampo es una estructura del lóbulo temporal medial que está involucrada en la memoria episódica (recolección de episodios que implican una experiencia personal) y la navegación espacial (Strange, Witter, Lein, & Moser, 2014). Esta estructura se encuentra dividida en cuatro capas (piramidal, estrato oriens, estrato lúcido, estrato radiatum) en comparación con la corteza cerebral que tiene seis, además posee cuatro subdivisiones con características morfológicas y citoarquitectónicas diferentes llamadas CA1, CA2, CA3 y CA4 (Cuerno de Amón) (Anand & Dhikav, 2012), sin embargo, la presencia de CA2 y CA4 aún continúa siendo cuestionada (Andersen, Morris, Amaral, Bliss, & O'Keefe, 2007).

El hipocampo recibe aferencias (entradas) desde casi todas las áreas de asociación neocortical y la CE. Conocer el circuito que se relaciona con la formación de la memoria y el aprendizaje es de vital importancia para entender cómo un daño en este podría estar relacionado con el deterioro cognitivo. Las neuronas de la capa II de la CE envían aferencias unidireccionales directamente hacia las neuronas granulares del DG a través de la vía perforante. Luego, los axones de las células granulares denominadas fibras musgosas, se proyectan hacia CA3, en donde hacen sinapsis con las neuronas piramidales que componen esta subregión; después, estas últimas se proyectan hacia CA1 a través de las colaterales de Schaffer, formando así el principal circuito involucrado en el procesamiento de la información en el hipocampo. No obstante, las neuronas de la capa III de la CE se proyectan directamente a CA1 por la vía temporoamónica. Por último, las neuronas piramidales de la subregión CA1, se proyectan a través del complejo subicular hacia la CE y de este último se envían las eferencias (salidas) hacia la corteza de asociación sensitiva. La estructura de este circuito puede ser crítica para el aprendizaje y la memoria, pero también puede contribuir a su

vulnerabilidad cuando se generan daños (ver figura 2). Los procesos de aprendizaje y memoria dentro los circuitos hipocampales están regulados por los mecanismos de plasticidad sináptica que requieren de la activación de cascadas moleculares específicas. Por ejemplo, la inducción del LTP requiere de la entrada de  $Ca^{2+}$  mediante la activación del receptor NMDA por el neurotransmisor glutamato (Bartsch & Wulff, 2015). Lo mencionado anteriormente pone de manifiesto que el hipocampo es una estructura que posee subregiones con características morfológicas, fisiológicas y citoarquitectónicas distintas. Por lo cual se puede pensar que estas diferencias producen en algunas subregiones una mayor susceptibilidad al glutamato.



**Figura 2. Anatomía del hipocampo y su conexión trisináptica. (A)** Representación anatómica del hipocampo y del principal circuito involucrado en el procesamiento de la información. **(B)** Diagrama del flujo de información a través del hipocampo.

Imagen tomada de: (Bartsch & Wulff, 2015).

## **2.3 Objetivos**

### **2.3.1 Objetivo general**

Determinar, si la exposición al glutamato produce muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo de rata (DG, CA1, CA3) en un modelo celular organotípico (*in vitro*), empleando un método semicuantitativo.

### **2.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar la concentración y el tiempo necesarios, para inducir la muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo de rata (DG, CA1, CA3) frente al glutamato en cultivos organotípicos (*in vitro*).
- Comparar los niveles de muerte neuronal, en las distintas subregiones del hipocampo de rata (DG, CA1, CA3) en cultivos organotípicos (*in vitro*), antes y después del tratamiento con glutamato a diferentes concentraciones.

## 2.4 METODOLOGÍA

### 2.4.1 Animales Experimentales

La investigación se realizó en ratas Wistar procedentes del Bioterio de la Universidad Icesi. Mantenido a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C, como comida y agua *libitum*. Las ratas se seleccionaron bajo las siguientes condiciones: Neonatos P6 – P8 (6 a 8 días post-natal). Se escogieron en este rango de edad, debido a que en ratas más jóvenes es muy difícil observar el hipocampo y, en animales más viejos el potencial regenerativo del tejido decrece, lo cual dificulta el cultivo.

### 2.4.2 Cultivos organotípicos de secciones de hipocampo

El animal fue anestesiado mediante hipotermia. Después este fue decapitado usando tijeras afiladas, se abrió el cráneo a través de un corte sagital y se expuso el cerebro. Luego, se retiró, e inmediatamente se puso en medio de disección (MD) frío. Con la ayuda de un estereoscopio y herramientas de disección se quitó el cerebelo y se separaron los hemisferios cerebrales. De cada uno de ellos se retiraron los ganglios basales y se aislaron los hipocampos (derecho e izquierdo). Cuidadosamente, usando un pincel, se tomaron los hipocampos y se colocaron en una placa nueva con MD frío. Posteriormente, cada hipocampo fue transferido a la placa de teflón del micrótomo previamente sanitizado, en donde se acomodaron por su lado cóncavo y perpendicular al plano de corte. Con un paño suavemente se retiró el exceso de MD que estaba alrededor del hipocampo. A continuación, se cortó el tejido en secciones coronales de 400  $\mu\text{m}$  de grosor. Una vez finalizó este proceso, se tomó la placa y con la ayuda de una pipeta pasteur, llena de MD, se hicieron suaves lavados, para retirar los cortes y depositarlos en una placa con MD. Por último, empleando un estereoscopio, se seleccionaron los mejores cortes, es decir, los que conservaron mejor su morfología.

Luego, se tomó un plato de 6 pocillos, de los cuales se usó tan solo 4 pozos. En cada pozo, previamente preparado con una membrana y medio de cultivo, se depositó 3 secciones de hipocampo a una distancia razonable el uno del otro. Finalmente, fueron incubados a 37 °C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 1 día, antes de realizar el ensayo de excitotoxicidad.

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

48,75 mL de MEM 1X y 1,25 mL de HEPES. Filtrada a través de una membrana estéril con tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  y guardada a 4°C hasta la disección.

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

27,37 mL de MEM (Earle's + L-Glu) 1X, 9 mL EBSS 1X, 630  $\mu$ L de D-glucosa, 12,5 mL de suero de caballo y 500  $\mu$ L de penicilina/estreptomicina/anfotericina B. La preparación fue filtrada a través de una membrana estéril con tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m y almacenada a 4°C. El medio se precalentó en la incubadora antes de su uso.

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

Se tomó el medio de cultivo preparado previamente y se adicionó 1 mL a cada pozo del plato multiwell, en este caso se usaron 4 pozos. Posteriormente, se adicionó un inserto de membrana de plato de cultivo a cada pozo preparado, con precaución de que la membrana tocara el medio, pero no fuese cubierto por este. Por último, se colocó el plato multiwell en el interior de la incubadora de cultivos celulares para que se calentara.

### **2.4.3 Tinción con Yoduro de Propidio (PI) para los cultivos organotípicos de hipocampo.**

#### **Antes del ensayo de excitotoxicidad**

El día anterior al ensayo de viabilidad neuronal de las secciones de hipocampo, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco que contenía PI a una concentración de 3,74  $\mu$ M. Las secciones se incubaron durante 12h y después de pasado este tiempo, se realizó la toma de fotografías de los niveles basales de fluorescencia empleando un microscopio de epifluorescencia y el software NIS Elements (Nikon). Las condiciones para la captura de las imágenes habían sido previamente establecidas, por tal razón, durante todos los experimentos estas permanecieron constantes.

#### **Después del Ensayo de excitotoxicidad**

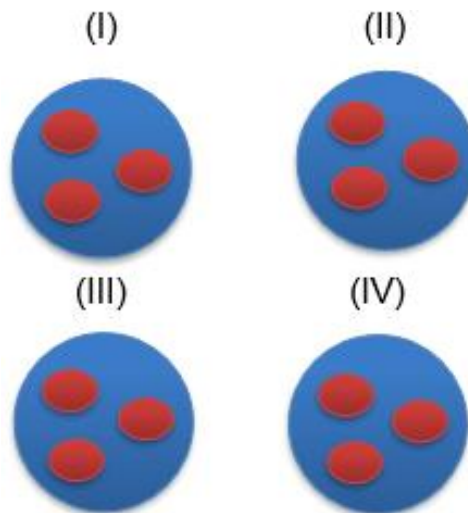
Después de medir la fluorescencia basal, las secciones de hipocampo fueron tratadas con Glutamato y vehículo (PBS) durante 1 hora y 2 horas. El glutamato fue preparado realizando una solución stock 1 M, usando como disolvente PBS. A partir de esta, se tomó 1  $\mu$ L y se llevó a un volumen de 1 mL de medio de cultivo, para obtener finalmente una concentración 1 mM. Para las concentraciones de 5 mM y 10 mM, se tomaron 5 y 10  $\mu$ L de la solución stock respectivamente, y se realizó el mismo procedimiento mencionado anteriormente.

Una vez finalizó el tratamiento, se reemplazó el medio por medio Neurobasal que contenía PI y se incubó durante 24h. Al día siguiente se midió nuevamente los niveles de fluorescencia, correspondientes a la muerte neuronal, usando microscopia de fluorescencia.

Preparación de la solución de Yoduro de Propidio: Solución stock 1 mM: se pesó 6,7 mg de PI y se adicionó con micropipeta proporciones de 1 mL (10 veces), 10 mL de agua, mezclando cuidadosamente en cada adición, para evitar la formación de burbujas. Luego, se tomó 3,74  $\mu$ L de la solución madre y se llevó a un 1 mL con medio fresco, para obtener una solución con la concentración deseada de PI. La solución fue filtrada a través de una membrana estéril con tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m y guardada a 4°C.

#### 2.4.4 Ensayo de excitotoxicidad

Se realizaron 4 cultivos organotípicos independientes (diferentes animales y días) con 3 repeticiones (secciones por pozo). Los grupos experimentales de secciones de hipocampo fueron expuestos a: vehículo (I), glutamato 1 mM (II), glutamato 5 mM (III) y glutamato 10 mM (IV) (ver figura 3).



**Figura 3. Ensayo de excitotoxicidad.** Representación esquemática del tratamiento con glutamato.

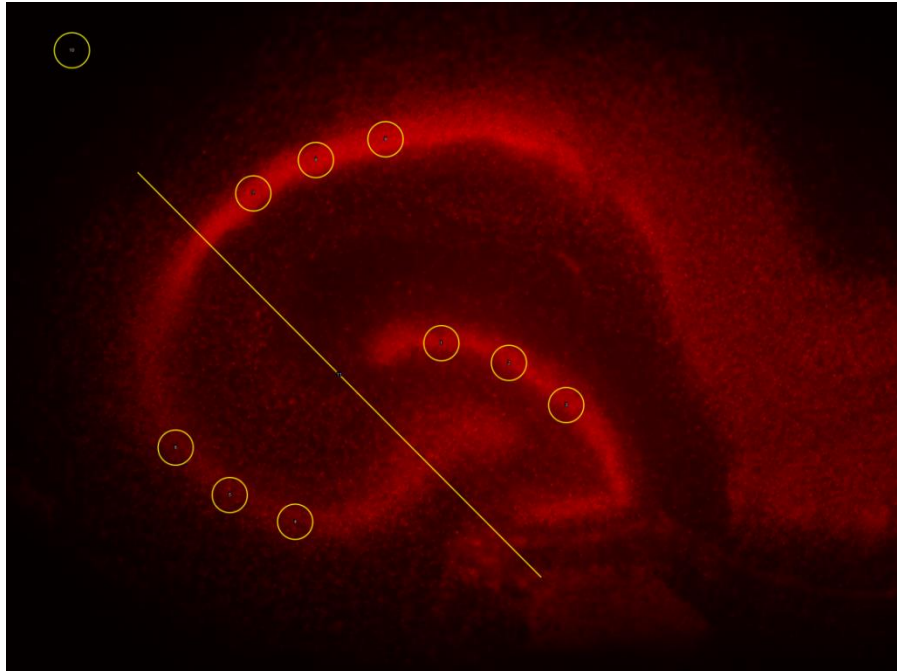
#### 2.4.5 Cuantificación de la muerte neuronal en el hipocampo

En los días dos y tres se analizó y cuantificó la fluorescencia de PI en las subregiones CA1, CA3 y DG de cada sección de hipocampo. El día 2 fue  $T_0$  (cero horas), antes de agregar el glutamato para medir los niveles de muerte neuronal basal. El día 3 fue  $T_{24}$  (24 horas), después de agregar glutamato. Las imágenes fueron tomadas a través de una cámara fotográfica acoplada al microscopio de fluorescencia. Una vez obtenidas las imágenes, se midió la intensidad de fluorescencia de cada subregión empleando el programa ImageJ desarrollado por

el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos. El análisis densitométrico, se realizó siguiendo un método para la cuantificación objetiva de muerte celular en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo (OHSCs, por sus siglas en inglés) expuestas a PI, como se reportó previamente (Happ & Tasker, 2016).

Usando el programa ImageJ, se tomaron las imágenes y mediante una línea diagonal se separaron las subregiones de hipocampo. Luego, se dibujaron tres círculos con diámetro constante (100x100) y distancias equivalentes entre ellos en cada subregión, para obtener un total de nueve círculos. Además, se dibujó un décimo círculo para substraer cualquier fluorescencia de fondo (background) presente en la imagen. A partir de esto, se creó una plantilla que es fácilmente adaptable a cada corte, aún si existen variaciones en el tamaño y la forma de las subregiones. Posteriormente, se calculó la densidad integrada para cada círculo en cada corte de hipocampo (ver figura 4).

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



**Figura 4. Plantilla para la medición de intensidad de fluorescencia.** Imagen representativa de la plantilla, para la medición de la intensidad de fluorescencia en las

subregiones del hipocampo (DG, CA1, CA3) usando PI como marcador de muerte neuronal y OHSCs como modelo *in vitro*.

#### **2.4.6 Análisis estadístico**

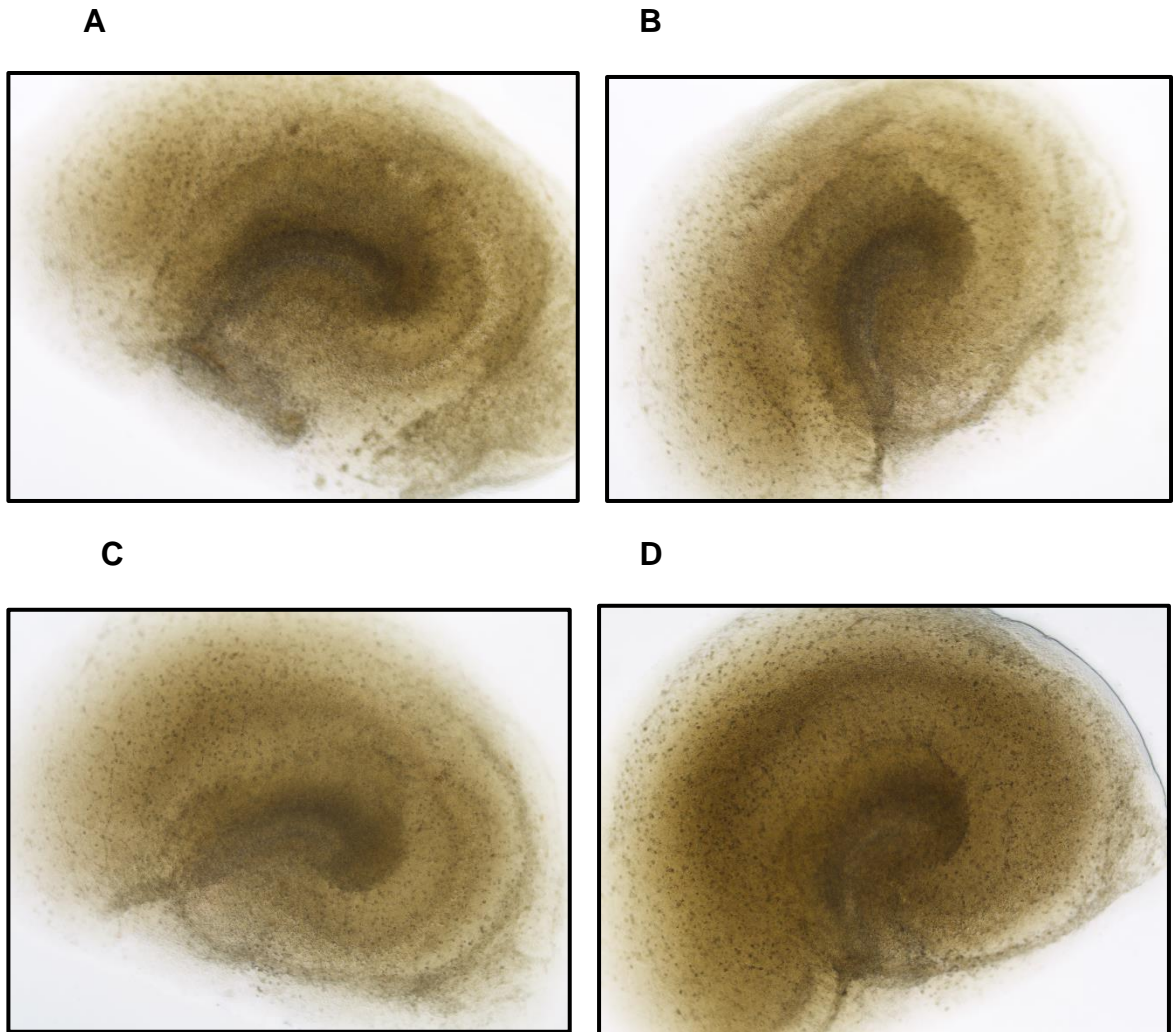
El tratamiento estadístico de los datos obtenidos, se realizó a través de una prueba de normalidad (Shapiro – Wilk). Aquellos datos que tenían una distribución normal fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba post – hoc (Tukey), para comparar entre grupos (DG, CA3, CA1). Los datos no paramétricos fueron analizados mediante el Test de Friedman y una prueba de comparación múltiple de Dunn. Se asumió un valor  $p < 0,05$  para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados (Anexos 1 y 2).

**Ver Anexo 3. Matriz de Marco Lógico**

## 2.5 Resultados

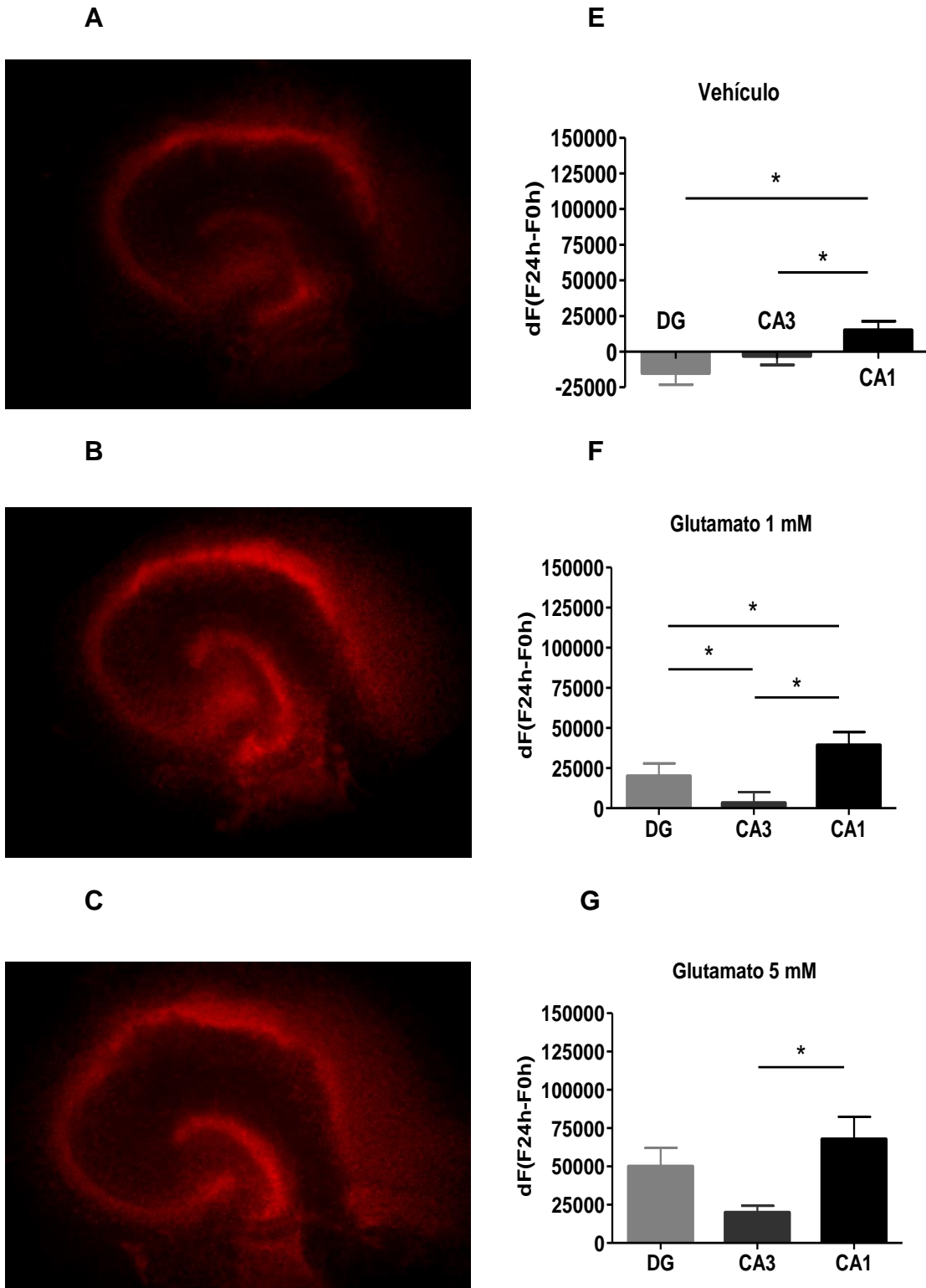
A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir del proyecto de investigación. Primero, se reportan las imágenes en campo claro, fluorescencia y las gráficas para el tratamiento con glutamato a diferentes concentraciones durante 1 hora de exposición. Después, se muestran los mismos resultados, pero para el tratamiento con el agente patógeno durante 2 horas de exposición

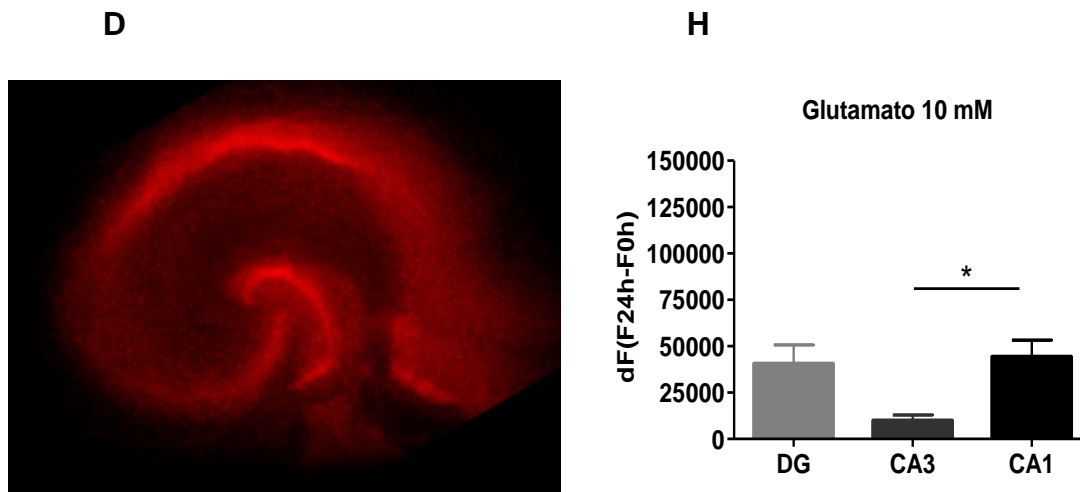
### Cultivos organotípicos de cortes de hipocampo de ratas Wistar en Campo Claro



**Figura 5. Imágenes de los cultivos organotípicos de hipocampo (OHSCs) de rata Wistar en campo claro a las 0 horas, para el tratamiento con glutamato durante 1 hora. (A) Vehículo, (B) Glutamato 1 mM, (C) Glutamato 5 mM y (D) Glutamato 10 mM.**

**Ensayo de excitotoxicidad: evaluación del efecto del neurotransmisor glutamato en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo de ratas**

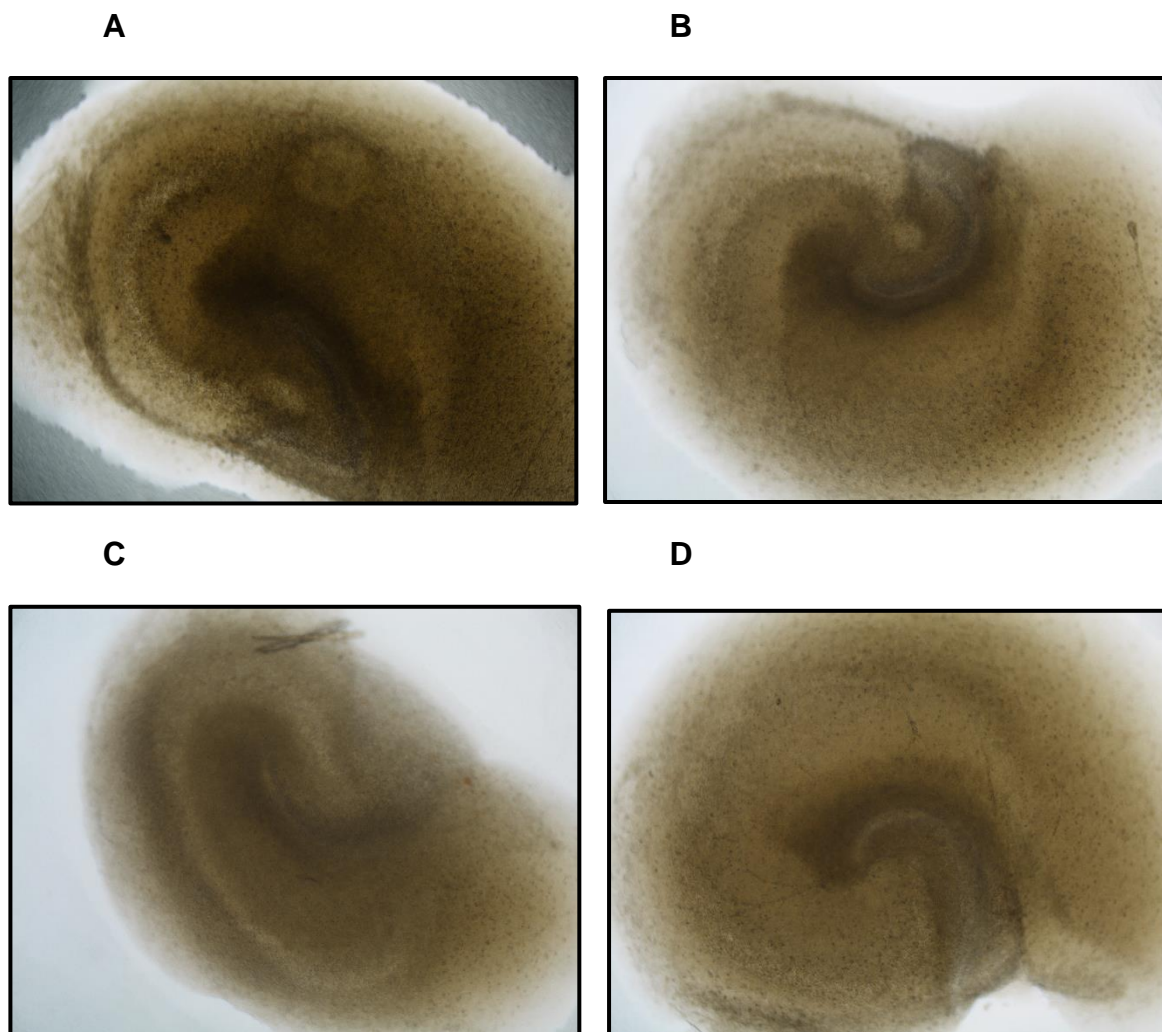




**Figura 6. Excitotoxicidad del glutamato durante 1 hora de tratamiento en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo (OHSCs) de ratas Wistar.** Imágenes de fluorescencia observada en el microscopio, luego de 24 horas de incubación con PI, después del tratamiento con (A) Vehículo, (B) Glutamato 1 mM, (C) Glutamato 5 mM y (D) Glutamato 10 mM. Comparación del cambio de intensidad de fluorescencia a las 0 horas y 24 horas en cada subregión del hipocampo, giro dentado (DG), Cuerno de Amón 1 (CA1) y Cuerno de Amón 3 (CA3), expuestos al tratamiento con (E) Vehículo, (F) Glutamato 1 mM, (G) Glutamato 5 mM y (H) Glutamato 10 mM.

El ANOVA mostró que, en los tratamientos, Vehículo, Glutamato 1 mM y 5 mM existe una diferencia significativa en la susceptibilidad neuronal de cada subregión, DG, CA1 y CA3 del hipocampo frente a la excitotoxicidad del glutamato, puesto que los valores  $p$  eran menores que 0,05. De acuerdo con la prueba de Tukey se encontró que para el Vehículo (DG vs CA3:  $p=0,2022$ ; DG vs CA1:  $p<0,0171$ ; CA3 vs CA1:  $p<0,0018$ ) (Figura 6. A, E), existía diferencias en la intensidad de fluorescencia en las subregiones del hipocampo. Con glutamato 1 mM (DG vs CA3:  $p<0,0158$ ; DG vs CA1:  $p<0,0217$ ; CA3 vs CA1:  $p<0,0038$ ) (Figura 6. B, F) se encontró que existían diferencias en la fluorescencia en las tres subregiones. Para glutamato 5 mM (DG vs CA3:  $p=0,0626$ ; DG vs CA1:  $p=0,1641$ ; CA3 vs CA1:  $p<0,0220$ ) (Figura 6. C, G), se observó diferencias en la intensidad de fluorescencia entre dos subregiones. Sin embargo, en el tratamiento con Glutamato 10 mM el ANOVA mostró que no existía una diferencia significativa en la vulnerabilidad neuronal de cada subregión, ya que el valor  $p$  era mayor que 0,05 (Figura 6. D, H) (Anexo 1). Además, se pudo observar que la diferencia de intensidad de fluorescencia para el vehículo es negativa, es decir la intensidad de fluorescencia a las 0h es mayor que a las 24h (Figura 6, E). Finalmente, se encontró una relación entre la concentración de glutamato, hasta 5 mM, y el grado de muerte neuronal presente en los cortes de hipocampo sometidos al tratamiento.

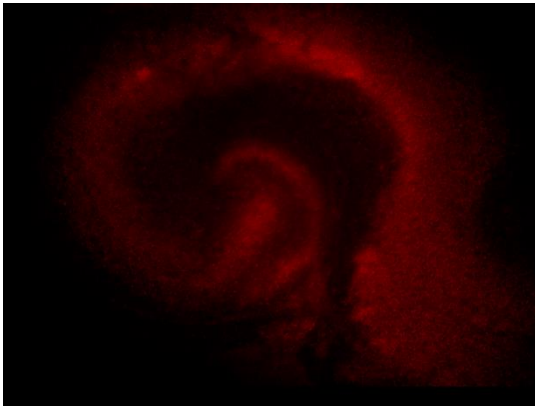
## Cultivos organotípicos de cortes de hipocampo de ratas Wistar en Campo Claro



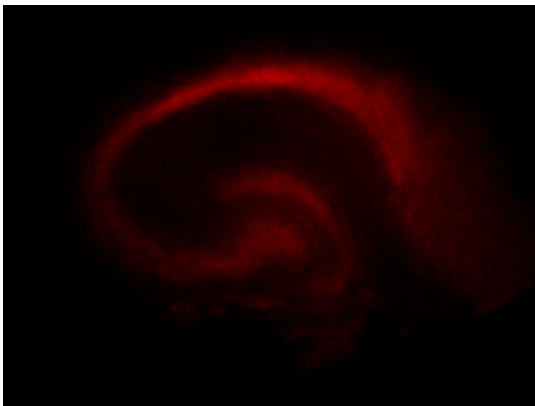
**Figura 7. Imágenes de los cultivos organotípicos de hipocampo (OHSCs) de rata Wistar en campo claro a las 0 horas, para el tratamiento con glutamato durante 2 horas. (A) Vehículo, (B) Glutamato 1 mM, (C) Glutamato 5 mM y (D) Glutamato 10 mM.**

# Ensayo de excitotoxicidad: evaluación del efecto del neurotransmisor glutamato en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo de ratas

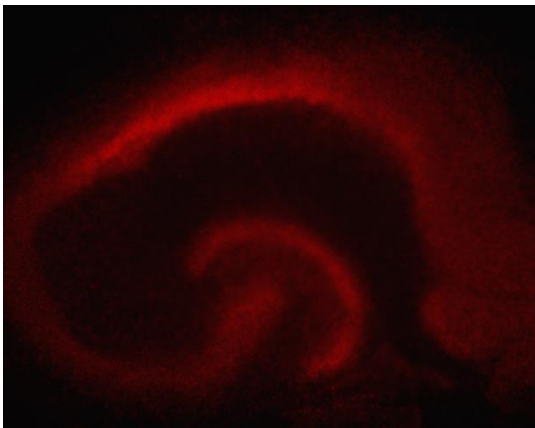
A



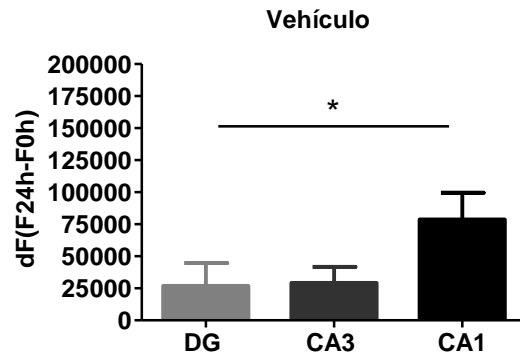
B



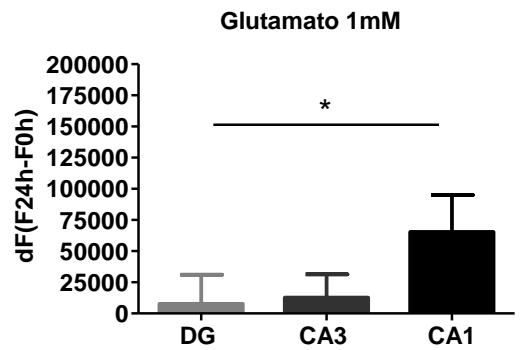
C



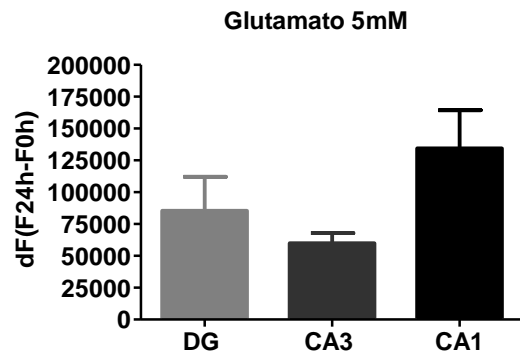
E

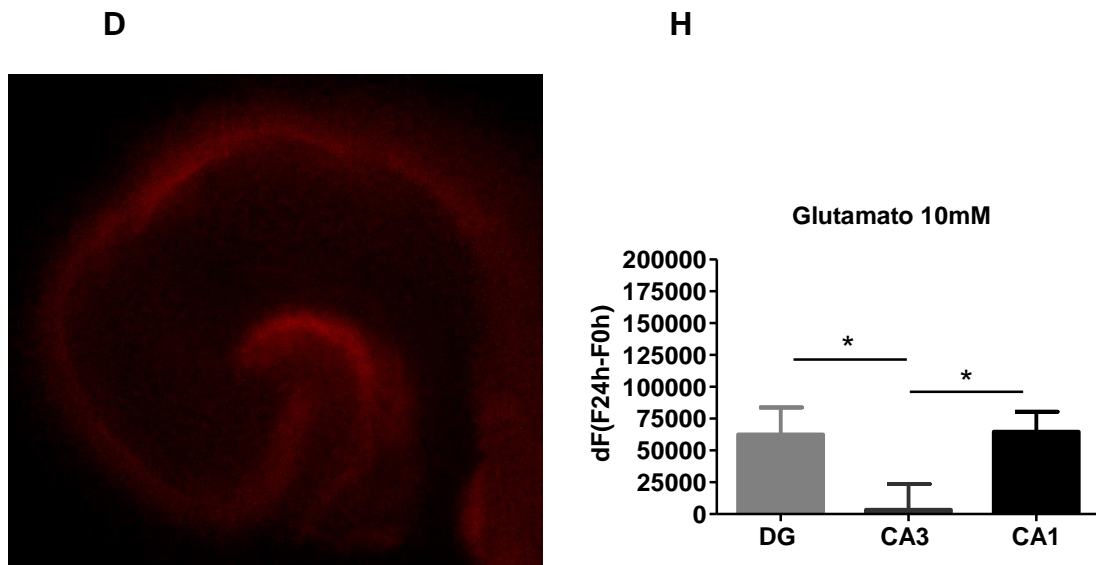


F



G





**Figura 8. Excitotoxicidad del glutamato durante 2 horas de tratamiento en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo (OHSCs) de ratas Wistar.** Imágenes de fluorescencia observada en el microscopio, luego de 24 horas de incubación con PI, después del tratamiento con (A) Vehículo, (B) Glutamato 1 mM, (C) Glutamato 5 mM y (D) Glutamato 10 mM. Comparación del cambio de intensidad de fluorescencia a las 0 horas y 24 horas en cada subregión del hipocampo, giro dentado (DG), Cuerno de Amon 1 (CA1) y Cuerno de Amon 3 (CA3), expuestos al tratamiento con (E) Vehículo, (F) Glutamato 1 mM, (G) Glutamato 5 mM y (H) Glutamato 10 mM.

El ANOVA mostró que, en los tratamientos, Vehículo, Glutamato 1 mM y 10 mM existe una diferencia significativa en la susceptibilidad neuronal de cada subregión, DG, CA1 y CA3 del hipocampo frente a la excitotoxicidad del glutamato, puesto que los valores  $p$  eran menores que 0,05. Por otra parte, los resultados de la prueba de Tukey evidenciaron que el Vehículo (DG vs CA3:  $p=0,9885$ ; DG vs CA1:  $p<0,0221$ ; CA3 vs CA1:  $p=0,1027$ ) (Figura 8. A, E), presentaba diferencias en los niveles de muerte entre dos subregiones del hipocampo. Con glutamato 1 mM (DG vs CA3:  $p=0,8477$ ; DG vs CA1:  $p<0,0196$ ; CA3 vs CA1:  $p=0,0808$ ) (Figura 8. B, F) se encontró que existían diferencias en los niveles de muerte en dos subregiones del hipocampo. Para glutamato 10 mM (DG vs CA3:  $p<0,0019$ ; DG vs CA1:  $p=0,9816$ ; CA3 vs CA1:  $p<0,0153$ ) (Figura 8. D, H), se observó diferencias en la intensidad de fluorescencia entre las subregiones del hipocampo. Por otro lado, en el tratamiento con Glutamato 5 mM el Test de Friedman mostró que no existía una diferencia significativa en la vulnerabilidad neuronal de cada subregión, ya que el valor  $p$  era mayor que 0,05 (Figura 6. C, G) (Anexo 2). También, se pudo observar que la diferencia de intensidad de fluorescencia para el vehículo en las subregiones DG y CA3 es mayor que en el tratamiento con glutamato 1 mM (Figura 8, E, F). Finalmente, se encontró una relación entre la concentración de glutamato, hasta 5 mM, y el grado de muerte neuronal presente en los cortes de hipocampo sometidos al tratamiento.

## 2.6 Discusión

Esta investigación buscaba determinar si el neurotransmisor glutamato producía muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo (DG, CA1, CA3), con el fin de generar nuevos conocimientos acerca de los procesos fisiopatológicos involucrados en la EA. Para lograr esto, se usó un modelo celular *in vitro*, a través del cual se evaluó la producción de muerte neuronal después del tratamiento con el agente patógeno. En este caso, se encontró que la intensidad de fluorescencia, la cual ha sido correlacionada con los niveles de muerte neuronal en los OHSCs, se incrementó luego de la exposición al glutamato.

En primer lugar, se quería encontrar la concentración de glutamato (1 mM, 5 mM y 10 mM) y el tiempo (1 hora y 2 horas) de exposición necesarios para inducir muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo de rata (DG, CA3 y CA1). En este caso, los resultados de los análisis estadísticos evidenciaron que la concentración y el tiempo que producían muerte diferencial en las tres subregiones del hipocampo correspondían a 1 mM y 1 hora, respectivamente (Figura 6, F). Estos valores hallados no están armonizados completamente en la literatura científica, puesto que esto depende de las condiciones experimentales que se manejan en cada laboratorio. Por tal razón, la concentración y el tiempo, reportados en este proyecto de investigación, corresponden a los datos obtenidos bajo las condiciones ambientales e instrumentales determinadas para el laboratorio de la Universidad Icesi. Sin embargo, un estudio reciente realizado por Happ y Tasker, en el cual evaluaron diferentes concentraciones de NMDA, un agonista del receptor NMDA al igual que el glutamato, demostró que este producía muerte neuronal diferencial a partir de la concentración 10  $\mu$ M hasta 1 mM con un tiempo de exposición de 4 horas. Además de esto, otro estudio realizado por Stanika y colaboradores, mostró que una concentración de 500  $\mu$ M y un tiempo de 30 minutos generaba muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo. A partir de lo anterior, se puede evidenciar que existen diferentes tiempos y concentraciones, que pueden producir dicha diferencia, pero estas dependerán de las condiciones bajo las cuales se realice el procedimiento experimental.

En segundo lugar, se compararon los niveles de muerte neuronal, en las distintas subregiones del hipocampo de rata, antes y después del tratamiento con glutamato a diferentes concentraciones. Los resultados de estos niveles de muerte neuronal, evidenciados como el cambio en la intensidad de fluorescencia, mostraron que la exposición a glutamato tiene un comportamiento dosis-dependiente hasta la concentración de 5 mM en los dos tiempos usados (Figura 6 y 8). Sin embargo, los niveles de muerte neuronal entre los dos tiempos no presentan una tendencia creciente, es decir, que al prolongar el tiempo de exposición a 2 horas el cambio en la intensidad de la fluorescencia no fue mayor, a pesar de que el corte estuvo más tiempo en contacto con el agente patógeno

(Figuras 6 y 8). Para explicar esto, se sugiere que dicha tendencia se perdió, debido a las fallas presentadas con la lámpara de fluorescencia del microscopio, cuando se incidía el corte que contenía el PI, ya que la intensidad de estos cortes era mucho menor en comparación con la presentada en el grupo de experimentos sometidos al tiempo de 1 hora. De la misma manera, se puede observar que los niveles de muerte para las concentraciones de 10 mM en los dos tiempos fue menor que el de 5 mM, lo cual no concuerda con lo reportado en otros estudios en los que se evidencia una tendencia dosis-dependiente con la muerte celular (Happ & Tasker, 2016). En este caso, se cree que, a dicha concentración de glutamato tan elevada, se pudo haber generado una muerte masiva en todas las subregiones, alterando el proceso de unión del PI al DNA, el cual es necesario para que se produzca la fluorescencia. En consecuencia, aunque probablemente se presentó mayor muerte con esta concentración la intensidad de fluorescencia no la refleja, debido a lo mencionado anteriormente.

Además, se observó que con el vehículo se generaban cambios en la intensidad de la fluorescencia negativa, es decir que el nivel de muerte neuronal a las 0 horas fue mayor que a las 24 horas. Para esto, se establece que dicho resultado puede estar relacionado con el proceso de preparación de los OHSCs. En este caso, se usaron cultivos agudos, debido a que el proceso de estandarización del protocolo para la preparación y mantenimiento de los OHSCs no se ha logrado con éxito hasta el momento. En consecuencia, los cultivos usados para los experimentos se encuentran bajo un nivel de estrés inicial debido al proceso de preparación que puede ocasionar mayor muerte neuronal. Sin embargo, esta última cesa cuando el cultivo se estabiliza con el medio de cultivo a las 24 horas siguientes. Por tal razón, la intensidad de fluorescencia es menor a las 24 horas, debido a que la muerte se reduce y la supervivencia neuronal se incrementa.

En tercer lugar, se identificó la presencia de muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo de rata frente a la exposición con glutamato. Los resultados de los análisis estadísticos mostraron que existen diferencias significativas en los niveles de muerte neuronal entre las subregiones, por lo cual, se pudo determinar que el glutamato, mediante el mecanismo de excitotoxicidad, produce muerte celular diferencial en las poblaciones de neuronas hipocampales de rata. Además, se evidenció que la subregión más afectada por este compuesto es la CA1, puesto que el cambio en la intensidad de fluorescencia es mayor en comparación a las otras.

Estos resultados concuerdan con los reportados hasta el momento por otros autores en sus investigaciones (Stanika et al., 2010) (Happ & Tasker, 2016). En la investigación realizada por Stanika y colaboradores, se evaluó la vulnerabilidad selectiva de CA1, en OHSCs, frente al incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular mediado por el receptor NMDA y glutamato. La muerte neuronal en las subregiones del hipocampo fue evaluada usando PI. Los resultados establecieron que las neuronas de CA1 fueron selectivamente más vulnerables a los daños

excitotóxicos. Mientras, que las neuronas en CA3 no fueron tan afectadas. Por otra parte, en el estudio realizado por Happ y Tasker, se evaluó la excitotoxicidad de NMDA a diferentes concentraciones (1, 10, 100 y 1000 $\mu$ M) en OHSCs. La muerte neuronal se evaluó y cuantificó usando PI. En esta, se encontró que la región CA1 fue más sensible a la muerte celular mediada por NMDA con concentraciones superiores a 10 $\mu$ M, en comparación a DG y CA3.

El hipocampo es una estructura que posee subregiones con características citoarquitectónicas, funcionales, morfológicas, y moleculares distintas. Por lo cual, es necesario profundizar y analizar con más detalle algunas de estas, para poder explicar por qué CA1 es más susceptible al glutamato que DG y CA3. Primero, la corteza de la formación hipocampal está dividida en tres capas. La capa más profunda se compone de una mezcla de fibras aferentes y eferentes e interneuronas. En el DG esta capa es llamada Hilus o polimórfica, mientras en las regiones CA se conoce como stratum oriens. Sobre esta se encuentra la capa celular, la cual se compone de células principales e interneuronas. En el DG esta se llama capa granular y en las regiones CA se conoce como capa celular piramidal o stratum piramidale. La capa más superficial es referida como capa molecular en el DG y el subículo. Pero, en las regiones CA se genera una subdivisión de la misma. En CA3 se produce una división en tres subcapas: el stratum lucidum, el cual recibe entradas desde el DG; el stratum radiatum, que comprende las dendritas apicales de las neuronas localizadas en el stratum piramidale; y la más superficial el stratum molecular-lacunosum, compuesto de las espinas apicales de las dendritas. Sin embargo, CA1 se diferencia de CA3, ya que no posee el stratum lucidum (van Strien, Cappaert, & Witter, 2009).

Por otro lado, la organización funcional de cada subregión varía, de acuerdo con las tareas que realizan durante el procesamiento de la información. Se ha propuesto que el DG durante el proceso de codificación se encarga de la separación de patrones, es decir, realiza una discriminación de patrones neuronales similares y superpuestos usando diferencias mínimas en las señales dadas. Por lo tanto, es una importante función cognitiva para obtener una representación no ambigua y distinta de recuerdos similares cuando se genera el proceso de aprendizaje y memoria, puesto que evita la interferencia de la memoria y permite la detección de información nueva. La región CA3, ha sido considerada como el circuito auto-asociativo, ya que está implicada en la unión de las representaciones disociativas y la terminación del patrón proveniente del DG. Esta es una función mnemotécnica que permite recordar un hecho solo por representación parcial o fragmentada de señales que estaban presentes durante el aprendizaje inicial (Bartsch & Wulff, 2015). Además, se ha sugerido que sus extensas redes de colaterales recurrentes le otorgan la función de comparador, puesto que recupera patrones completos de entradas parciales o degradadas del DG y las compara con las entradas sensoriales que llegan desde la CE. De esta manera, CA3 puede actuar como filtro controlando la información transmitida a CA1 (Vazdarjanova & Guzowski, 2004). La subregión CA1 se encarga de recibir

entradas desde CA3 y la CE, por lo cual ha sido implicada en la integración de entradas y detección de coincidencias entre las predicciones de CA3 y las entradas perceptivas de la CE, así como la detección de errores y novedades. También, ha sido involucrada en la recuperación de la memoria autobiográfica, la codificación espacial, la consolidación y el reconocimiento (Bartsch & Wulff, 2015).

Lo anteriormente mencionado, evidencia claramente que las subregiones presentan diferencias en su organización y función y pueden contribuir a su vulnerabilidad selectiva. Sin embargo, se ha propuesto que la característica más importante relacionada con la muerte selectiva de las poblaciones de neuronas hipocámpales en las subregiones se encuentra a nivel molecular. Como se mencionó previamente, el glutamato y sus receptores tienen un rol crucial en la transmisión sináptica, la plasticidad sináptica y las vías de señalización excitatoria, bajo condiciones fisiológicas normales, y la excitotoxicidad en condiciones patológicas (Han et al., 2016). Además, la vía trisináptica que conecta las tres subregiones se compone principalmente por neuronas glutamatérgicas. Estas se han relacionado con la formación de la LTP, una forma de plasticidad sináptica, que actúa como un mecanismo molecular para la formación de la memoria. Tanto este mecanismo como el proceso de excitotoxicidad se generan de forma diferente en CA1, CA3 y DG, y están mediados principalmente por el receptor NMDA (Coultrap, Nixon, Alvestad, Valenzuela, & Browning, 2005).

Los receptores NMDA son heteromultímeros formados por las subunidades NR1, NR2A-D, y NR3. La subunidad NR1 está codificada por un gen, pero existe en varias isoformas empalmadas alternativamente. Además, tiene un sitio de unión para glicina y no para glutamato. No obstante, las subunidades NR2A-D en comparación a las anteriores sí presentan un sitio de unión para glutamato. Dependiendo de la presencia de las subunidades NR2 y NR3, el receptor NMDA puede ser dividido en el subtipo NR2A (dos NR1 y dos NR2A) y el subtipo NR2B (dos NR1 y dos NR2B), ya que estos son los más abundantes en el hipocampo (Andersen, Morris, Amaral, Bliss, & O'Keefe, 2007). Por otra parte, el mRNA que codifica la subunidad NR1, mediante el proceso de empalme alternativo puede crear 8 posibles variantes de empalme por inclusión o exclusión de 3 casetes: N1 (exón 5), C1 (exón 21) y C2 (exón 22). Tanto la subunidad NR1, con sus respectivas variantes, como la subunidad NR2A-D son reguladas y expresadas de forma diferente en las subregiones (Coultrap et al., 2005).

En un estudio realizado por Coultrap y colaboradores se demostró que la expresión de las subunidades de NR1 y NR2B difiere entre las subregiones CA1, CA3 y DG del hipocampo. En este caso, se encontró que los niveles de expresión de NR2B en CA1 eran mayores que en CA3 y DG, lo cual puede explicar las diferencias funcionales del receptor en esta región. Además, esta subunidad ha sido relacionada con diferentes características tales como alta afinidad al glutamato, menos sensibilidad al bloqueo por zinc, mayor selectividad al ingreso de  $Ca^{2+}$  y desensibilización más lenta, en comparación con la subunidad NR2A.

Por otra parte, el mismo estudio evidenció que en CA1 se producía una alta expresión de los casetes C1 y C2, y una baja expresión del casete N1. Esto ha sido relacionado con la regulación de la función del receptor NMDA. El casete C1, ha sido implicado con el incremento en la sensibilidad del receptor NMDA a la regulación por fosforilación, ya que este contiene los sitios de fosforilación dentro de la subunidad NR1. El casete C2 tiene un papel importante en la producción de LTP y su deficiencia causa fallas en este mecanismo de plasticidad sináptica (Coultrap et al., 2005). Por último, el casete N1 ha sido asociado con la disminución en la sensibilidad a la inhibición por protones y la potenciación por poliaminas en los receptores NMDA. Además, otros estudios han demostrado que la alta expresión del casete C2 y baja expresión del casete N1 en CA1, está correlacionado con la susceptibilidad de esta subregión a la excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA (Rameau, Akaneya, Chiu, & Ziff, 2000).

Por otra parte, estudios recientes han mostrado que la activación de los subtipos NR2A, presentes en la sinapsis glutamatérgica, desencadenan señales de supervivencia celular, debido a que activan proteínas como CREB, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y genes supresores de muerte tales como Puma y FOXO (Han et al., 2016). Sin embargo, la activación de los subtipos NR2B, presentes a nivel extrasináptico, desencadena vías apoptóticas que causan un incremento en la expresión de ROS, disminución en la expresión de CREB y ERK e inhibición de la expresión de FOXO, lo cual conduce a la muerte neuronal (Gladding & Raymond, 2011) (Hardingham & Bading, 2010). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de comparación de los niveles de subtipos de receptores NMDA en cada subregión y lo mencionado anteriormente, se puede comprender mejor por qué CA1 es la subregión más susceptible.

Aunque los receptores NMDA son los principales involucrados en el proceso patológico y la muerte neuronal diferencial, se ha encontrado que el receptor AMPA también presenta un rol importante en estos mecanismos. Estudios han demostrado que las subunidades del receptor AMPA, GluA1 y GluA2/3, se encuentran más expresadas en CA1 que en DG y CA3. Tanto el receptor AMPA como NMDA, contribuyen a la plasticidad sináptica y la excitotoxicidad en el hipocampo. Por lo tanto, la alta expresión del receptor AMPA en CA1 en comparación con DG y CA3, puede incrementar la sensibilidad de CA1 a la muerte celular mediada por este receptor (Kristensen, Noraberg, & Zimmer, 2001).

Se ha propuesto que otro mecanismo involucrado con la resistencia de las subregiones CA3 y DG a la muerte causada por glutamato, se debe a la alta expresión del transportador-1 de glutamato glial (GLT-1) en estas subregiones. La GLT-1 es una proteína predominante, que remueve el glutamato desde el espacio extracelular y mantiene los niveles de glutamato bajos, para así evitar su neurotoxicidad. En un estudio realizado por Zhang y colaboradores, se encontró que después de una isquemia global cerebral inducida por 8 minutos, los niveles de expresión de GLT-1, en CA3 y DG eran mayores que en CA1. Cabe resaltar

que luego de un proceso isquémico se produce una acumulación de glutamato en la hendidura sináptica, la cual produce muerte celular. En este caso, casi todas las neuronas de la subregión CA1 fueron afectadas y la regulación por GLT-1 era baja. Por el contrario, las neuronas de CA3 y DG no se vieron afectadas y la regulación por GLT-1 era alta. Esto demuestra que la mayor expresión de GLT-1 en CA3 y DG contribuyen a su resistencia frente al glutamato (Zhang et al., 2011).

Finalmente, varias investigaciones indican que la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediada por el receptor NMDA tiene un rol clave en vulnerabilidad selectiva de la región CA1. La investigación realizada por Stanika y colaboradores, encontró que después de la exposición a glutamato durante 30 minutos, el nivel de una sonda fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó en el citosol de las neuronas de CA1. Para corroborar esto, ampliaron las imágenes y observaron que la fluorescencia provenía específicamente de las neuronas de dicha subregión. Sin embargo, no se detectaron elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas de CA3, lo cual establece que las diferencias en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de las neuronas de CA1 y CA3 puede contribuir a las razones que sustentan la susceptibilidad diferencial de estas subregiones frente al glutamato (Stanika et al., 2010).

## 2.7 Conclusiones

- Se estableció que la concentración de glutamato y el tiempo necesarios para inducir muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo de ratas es 1 mM y 1 hora, respectivamente.
- Se encontró diferencias significativas en la vulnerabilidad neuronal de las poblaciones de neuronas hipocampales presentes en las subregiones DG, CA3 y CA1, frente al glutamato en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo de ratas (OHSCs).
- Se halló que la subregión más afectada por el proceso de excitotoxicidad causado por el glutamato es la CA1.

## 2.8 Recomendaciones

- Continuar con el proceso de estandarización de la metodología para la obtención de los cultivos organotípicos de cortes de hipocampo de ratas Wistar, con el fin de obtener cultivos con un nivel de supervivencia de al menos 7 días en condiciones óptimas de incubación.
- Confirmar a través de un nuevo grupo de experimentos que la concentración de glutamato y el tiempo encontrados, para producir muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo de rata, bajo las condiciones del laboratorio de la Universidad Icesi, son 1mM y 1 hora, respectivamente.
- Realizar una revisión periódica y organizada del microscopio de fluorescencia, con el objetivo de obtener datos más fiables y acertados a partir de los experimentos realizados.
- Continuar con las investigaciones moleculares (Proteínas y expresión genética), que permitan elucidar cuales son los mecanismos que están involucrados en la vulnerabilidad diferencial de las subregiones del hipocampo frente a compuestos patógenos, tales como el glutamato.

## 2.9 Referencias

- Aggarwal, N. T., Shah, R. C., & Bennett, D. A. (2015). Alzheimer ' s disease : Unique markers for diagnosis & new treatment modalities. *Indian Journal of Medical Research*, 142(October), 369–382. <http://doi.org/10.4103/0971-5916.169193>
- Albert Cabrera, M. J., Martínez Pérez, R., Gutiérrez Ravelo, A., Hakim Rodríguez, D., & Pérez Davison, G. (2014). Patogenia y tratamientos actuales de la enfermedad de Alzheimer. (Spanish). *Pathogenesis and Current Treatment of Alzheimer's Disease. (English)*, 48(3), 508–518. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=102033754&lang=es&site=ehost-live>
- Amemori, T., Jendelova, P., Ruzicka, J., Urdzikova, L. M., & Sykova, E. (2015). Alzheimer's disease: Mechanism and approach to cell therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26417–26451. <http://doi.org/10.3390/ijms161125961>
- Anand, K. S., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), 239–46. <http://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). The Hippocampus Book . En P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, & J. O'Keefe, *The Hippocampus Book* (págs. 41-43). Oxford : Oxford University Press .
- Association, A. (2015). 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 11(3), 332–384. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.02.003>
- Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, 309(August), 1–16. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>
- Budson, A., & Solomon, P. (2016). Memory Loss, Alzheimer's Disease and Dementia . En A. Budson, & P. Solomon, *Memory Loss, Alzheimer's Disease and Dementia* (págs. 48-58). Londres : Elsevier.
- Butterfield, D. a, & Pocernich, C. B. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS.Drugs*, 17(1172–7047), 641–652. <http://doi.org/10.2165/00023210-200317090-00004>
- Coultrap, S. J., Nixon, K. M., Alvestad, R. M., Valenzuela, F. C., & Browning, M. D. (2005). Differential expression of NMDA receptor subunits and splice variants

among the CA1, CA3 and dentate gyrus of the adult rat. *Molecular Brain Research*, 135(1–2), 104–111. <http://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.12.005>

- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 19(R1), 12–20. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>
- Danysz, W., & Parsons, C. G. (2012). Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine - Searching for the connections. *British Journal of Pharmacology*, 167(2), 324–352. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02057.x>
- Esposito, Z., Belli, L., Toniolo, S., Sancesario, G., Bianconi, C., & Martorana, A. (2013). Amyloid  $\beta$ , glutamate, excitotoxicity in alzheimer's disease: Are we on the right track? *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 19(8), 549–555. <http://doi.org/10.1111/cns.12095>
- García, S., Coral, R., Meza, E., Castillo, J., Martínez, B., & Villagómez, A. de J. (2009). Artículo de revisión Enfermedad de Alzheimer: una panorámica desde su primera descripción hacia una perspectiva molecular, 25(4), 300–312.
- Gladding, C. M., & Raymond, L. A. (2011). Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 48(4), 308–320. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.05.001>
- Han, X., Shi, Z., Xia, L., Zhu, L.-H., Zeng, L., Nie, J.-H., ... Ruan, Y.-W. (2016). Changes in synaptic plasticity and expression of glutamate receptor subunits in the ca1 and ca3 areas of the hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience*, 327, 64–78. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.011>
- Happ, D. F., & Tasker, R. A. (2016). Short communication A method for objectively quantifying propidium iodide exclusion in organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 269, 1–5. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.05.006>
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(10), 682–696. <http://doi.org/10.1038/nrn2911>
- Howard, R., McShane, R., RLindesay, J., Ritchie, C., Dening, T., Findlay, D., ... McKeith, I. (2012). Donepezil and Memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 366, 893–903. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1106668>
- Imbimbo, B. P., Lombard, J., & Pomara, N. (2005). Pathophysiology of Alzheimer's

- disease. *Neuroimaging Clinics of North America*, 15(4), 727–53, ix. <http://doi.org/10.1016/j.nic.2005.09.009>
- Jia, M., Njapo, S. A. N., Rastogi, V., & Hedna, V. S. (2015). Taming glutamate excitotoxicity: Strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs*, 29(2), 153–162. <http://doi.org/10.1007/s40263-015-0225-3>
- Kristensen, B. W., Noraberg, J., & Zimmer, J. (2001). Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research*, 917(1), 21–44. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02900-6](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02900-6)
- 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), 527–540. <http://doi.org/10.1007/s00401-015-1392-5>
- Querfurth, H., & LaFerla, F. (2010). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 56–67.
- 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](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(S2), S513–S518. [http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60666-6](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60666-6)
- Rudy, C. C., Hunsberger, H. C., Weitzner, D. S., & Reed, M. N. (2015). The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Aging and Disease*, 6(2), 131–48. <http://doi.org/10.14336/AD.2014.0423>
- Sánchez, C. R. De, Nariño, D., Fernando, J., & Cerón, M. (2010). Epidemiología y carga de la Enfermedad de Alzheimer. *Acta Neurológica Colombiana*, 26(3), 87–94. [http://doi.org/Acta Neurol Colomb 2010;26:Sup \(3:1\):87-94](http://doi.org/Acta Neurol Colomb 2010;26:Sup (3:1):87-94)
- 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>
- Stanika, R. I., Winters, C. A., Pivovarova, N. B., & Andrews, S. B. (2010). Differential NMDA receptor-dependent calcium loading and mitochondrial dysfunction in CA1 vs. CA3 hippocampal neurons. *Neurobiology of Disease*, 37(2), 403–411. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.020>

- Strange, B. a, Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Publishing Group*, 15(10), 655–669. <http://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(4), 272–82. <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*, 24(29), 6489–6496. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0350-04.2004>
- Zhang, M., Li, W., Liu, Y., Liang, C., Liu, L., Cui, X., & Gong, J. (2011). High expression of GLT-1 in hippocampal CA3 and dentate gyrus subfields contributes to their inherent resistance to ischemia in rats. *Neurochemistry International*, 59(7), 1019–1028. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.08.023>

## ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis estadístico del ensayo de excitotoxicidad realizado a los OHSCs, para el tratamiento con glutamato durante 1 hora de exposición.

**Anova:** se realiza si se cumplen los siguientes supuestos:

- **Supuesto 1:** homogeneidad de varianzas

$H_0$ : Las varianzas son iguales

$H_a$ : Las varianzas no son iguales

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

$H_0$ : Los datos tienen una distribución normal

$H_a$ : Los datos no tiene una distribución normal

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

Debido a que el valor  $p$  obtenido para cada tratamiento es mayor que 0,05, se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos tienen varianzas iguales y poseen una distribución normal. Por lo tanto, se puede realizar el ANOVA.

### **Hipótesis a probar**

$H_0$ : La mediana de las diferencias de la intensidad de fluorescencia en cada subregión CA1, CA3 y DG son iguales.

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

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

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

### Vehículo

One-way ANOVA	
P value	0,0032
P value summary	**
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	6
R square	0,4884

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
DG vs. CA3	-11972	No	ns	0,2022
DG vs. CA1	-30064	Yes	*	0,0171
CA3 vs. CA1	-18092	Yes	**	0,0018

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ . Por ende, existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de intensidad de fluorescencia F24h – F0h) entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

### Glutamato 1mM

One-way ANOVA	
P value	0,0005
P value summary	***
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	6
R square	0,491

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
DG vs. CA3	16818	Yes	*	0,0158
DG vs. CA1	-19236	Yes	*	0,0217
CA3 vs. CA1	-36053	Yes	**	0,0038

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ . Por ende, existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de intensidad de fluorescencia F24h – F0h) entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

### Glutamato 5mM

One-way ANOVA	
P value	0,0108
P value summary	*
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	6
R square	0,4528

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
DG vs. CA3	30177	No	ns	0,0626
DG vs. CA1	-17702	No	ns	0,1641
CA3 vs. CA1	-47879	Yes	*	0,0220

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ . Por ende, existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de intensidad de fluorescencia F24h – F0h) entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

### Glutamato 10mM

One-way ANOVA	
P value	0,9818
P value summary	ns
Is there significant matching (P < 0.05)?	No
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	6
R square	0,03517

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
DG vs. CA3	30586	No	ns	0,0883
DG vs. CA1	-3832	No	ns	0,9765
CA3 vs. CA1	-34419	Yes	*	0,0263

**Conclusión:** El valor p es mayor que 0,05 por tanto se acepta  $H_0$ . Por ende, no existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de intensidad de fluorescencia F24h – F0h) entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

**Anexo 2.** Análisis estadístico del ensayo de excitotoxicidad realizado a los OHSCs, para el tratamiento con glutamato durante 2 horas de exposición.

**Anova:** se realiza si se cumplen los siguientes supuestos:

- **Supuesto 1:** homogeneidad de varianzas

$H_0$ : Las varianzas son iguales

$H_a$ : Las varianzas no son iguales

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

$H_0$ : Los datos tienen una distribución normal

$H_a$ : Los datos no tiene una distribución normal

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

Debido a que el valor  $p$  obtenido para los tratamientos Vehículo, Glutamato 1 mM y 10 mM es mayor que 0,05, se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos tienen varianzas iguales y poseen una distribución normal. Por lo tanto, se puede realizar el ANOVA. Sin embargo, el tratamiento con Glutamato 5 mM mostró un valor  $p$  menor que 0,05, por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos no tienen varianzas iguales y no poseen una distribución normal. Por esta razón, no se realizó el ANOVA y se hizo una prueba no paramétrica, tal como el Test de Friedman.

### **Hipótesis a probar para el ANOVA y el Test de Friedman**

$H_0$ : La mediana de las diferencias de la intensidad de fluorescencia en cada subregión CA1, CA3 y DG son iguales.

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

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

Los tratamientos Vehículo, Glutamato 1 mM y 10 mM se sometieron al ANOVA y el tratamiento Glutamato 5 mM se sometió al Test de Friedman. Los resultados se muestran a continuación:

### Vehículo

One-way ANOVA	
P value	0,0215
P value summary	*
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	6
R square	0,5728

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
DG vs. CA3	-2257	No	ns	0,9885
DG vs. CA1	-51730	Yes	*	0,0221
CA3 vs. CA1	-49473	No	ns	0,1027

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ . Por ende, existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de intensidad de fluorescencia F24h – F0h) entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

### Glutamato 1mM

One-way ANOVA	
P value	0,0002
P value summary	***
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	6
R square	0,7177

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
DG vs. CA3	-5075	No	ns	0,8477
DG vs. CA1	-57742	Yes	*	0,0196
CA3 vs. CA1	-52666	No	ns	0,0808

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ . Por ende, existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de intensidad de fluorescencia F24h – F0h) entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

### Glutamato 5mM

<b>Friedman Test</b>	
P value	0,0521
P value summary	ns
Are means signif. different (P < 0.05)?	No
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	6
R square	0,4528

<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Rank sum Diff.</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
DG vs. CA3	1	No	ns	>0,9999
DG vs. CA1	-7	No	ns	0,1299
CA3 vs. CA1	-8	No	ns	0,0628

**Conclusión:** El valor p es mayor que 0,05 por tanto se acepta  $H_0$ . Por ende, no existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de intensidad de fluorescencia F24h – F0h) entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

### Glutamato 10mM

<b>One-way ANOVA</b>	
P value	0,0016
P value summary	**
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	6
R square	0,7856

<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
DG vs. CA3	59219	Yes	**	0,0019
DG vs. CA1	-2169	No	ns	0,9816
CA3 vs. CA1	-61388	Yes	*	0,0153

**Conclusión:** El valor p es menor que 0,05 por tanto se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ . Por ende, existen diferencias significativas entre la dF (diferencia de intensidad de fluorescencia F24h – F0h) entre las subregiones DG, CA1 y CA3 del hipocampo de rata.

### Anexo 3. Matriz de Marco Lógico.

<b>Objetivo general:</b> Determinar, si la exposición al glutamato produce muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo de rata (DG, CA1, CA3) en un modelo celular organotípico ( <i>in vitro</i> ), empleando un método semicuantitativo.			
<b>Objetivos específicos</b>	<b>Actividades</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Supuestos</b>
<p>1. Determinar la concentración y el tiempo necesarios, para inducir la muerte neuronal diferencial en las subregiones del hipocampo de rata (DG, CA1, CA3) frente al glutamato en cultivos organotípicos (<i>in vitro</i>).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obtener aprobación del comité de ética animal.</li> <li>• Buscar artículos científicos sobre protocolos para realizar cultivos organotípicos.</li> <li>• Buscar artículos científicos acerca de las concentraciones usadas habitualmente en cultivos organotípicos para evaluar la citotoxicidad del glutamato.</li> <li>• Entrenamiento en el manejo del cuarto de cultivo.</li> <li>• Entrenamiento en el manejo de los equipos necesarios para realizar los cultivos.</li> <li>• Conseguir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obtener cultivos que sobrevivan y no se encuentren contaminados.</li> <li>• Encontrar la concentración y tiempo necesario, para inducir muerte neuronal.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Correcto funcionamiento de los equipos.</li> <li>• Disponibilidad de los reactivos y materiales.</li> <li>• Contaminación de los cultivos.</li> <li>• Muerte neuronal antes de que se realice el tratamiento con glutamato.</li> </ul>

	<p>todos los reactivos y materiales para realizar los cultivos organotípicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Conseguir el tejido cerebral animal.</li> <li>• Definir un rango de concentraciones con las cuales se realizarán los experimentos.</li> <li>• Cultivar los cortes de hipocampo de rata.</li> <li>• Exponer los cultivos al compuesto citotóxico glutamato.</li> <li>• Exponer los cultivos al marcador de muerte neuronal yoduro de propidio.</li> </ul>		
<p>2. Comparar los niveles de muerte neuronal, en las distintas subregiones del hipocampo de rata (DG, CA1, CA3) en cultivos organotípicos (<i>in vitro</i>), antes</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entrenamiento en el manejo del microscopio de fluorescencia.</li> <li>• Entrenamiento en el manejo de un software para el análisis de la intensidad de fluorescencia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microscopia de fluorescencia de las subregiones del hipocampo (DG, CA1, CA3), después del tratamiento con glutamato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Correcto funcionamiento del software para el análisis de la intensidad de fluorescencia.</li> <li>• Muerte neuronal debida solamente al tratamiento con</li> </ul>

<p>y después del tratamiento con glutamato a diferentes concentraciones.</p>	<p>de los cultivos.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparar las muestras que se observarían en el microscopio de fluorescencia.</li> <li>• Observar las muestras usando el microscopio de fluorescencia.</li> <li>• Emplear un método estadístico adecuado para encontrar la(s) subregión(es) del hipocampo más susceptible(s) a morir por el glutamato.</li> </ul>		<p>glutamato y no por otros factores externos que pudiesen haberla causado.</p>
--	---	--	---

#### Anexo 4. Carta de aval del comité de ética



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