

Evaluación de los niveles de expresión de los genes que codifican las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor de AMPA en neuronas hipocampales de rata expuestas a concentraciones excitotóxicas de glutamato

Bryan Alexander Escobar Victoria

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Química Farmacéutica

Santiago de Cali

2017

Evaluación de los niveles de expresión de los genes que codifican las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor de AMPA en neuronas hipocampales de rata expuestas a concentraciones excitotóxicas de glutamato

Bryan Alexander Escobar Victoria

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN QUÍMICA
FARMACÉUTICA

Álvaro Andrés Barrera Ocampo, PhD

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Química Farmacéutica

Santiago de Cali

2017



Aprobado por:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paola Caicedo', written over a horizontal line.

Paola Andrea Caicedo Burbano

Evaluadora

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Álvaro Andrés Barrera Ocampo', written over a horizontal line.

Álvaro Andrés Barrera Ocampo

Director del Proyecto

Santiago de Cali, 3 de Noviembre de 2017

Agradecimientos

En este apartado quiero hacer mención de todas las personas que estuvieron presentes en mi formación como profesional y poderles agradecer su apoyo incondicional. A mis padres, agradezco su paciencia, su colaboración, dedicación y confianza durante este proceso académico; a mi hermano por recordarme que siempre debemos lograr nuestra meta por muy agotador que sea el camino. A mi tía Maria del Pilar por sus consejos y por siempre creer en mí y en las capacidades que poseo. Aunque, ya no está conmigo en su forma física, doy gracias a mi abuela materna, Ana Otilia, por ser ese ser especial quien estuvo presente desde el momento de mi nacimiento hasta el día de su despedida, brindándome siempre lo mejor de ella.

A mis amigos, con quienes compartí alegrías y tristezas, quienes me brindaron una mano en mis momentos de agotamiento y me obsequiaron sonrisas pese a los momentos por los que pasábamos. Al profesor Álvaro Barrera, por haberme permitido realizar este proyecto con su colaboración y por su dedicación durante este año, para la realización de mi proyecto. A Tatiana Rodriguez y a Steven David por su colaboración en la ejecución de las diferentes actividades en el laboratorio, para el cumplimiento de los objetivos de este proyecto. A los diferentes profesores que compartieron sus conocimientos. A la Universidad Icesi, por brindarme las instalaciones para la culminación de las diferentes actividades requeridas para el desarrollo de este proyecto.

Finalmente, y no menos importante a Dios, a Jesús, a la Virgen María y a Santa Martha por estar siempre presente en mi vida y darme las fuerzas necesarias para lograr llevar a cabo el cumplimiento de mis objetivos. Todos los aquí mencionados, les agradezco con el alma y el corazón, no sólo por formar parte de mi vida y el haber estado de forma incondicional, sino también por haberme inspirado a querer construir un futuro, en una época de sentimientos y emociones encontradas, de sacrificios y satisfacciones.

¡Gracias!

Contenido

RESUMEN DEL PROYECTO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	12
2.1. Planteamiento del problema	12
2.2. Marco teórico y estado del arte	14
2.2.1. Glutamato: neurotransmisor excitador por excelencia	14
2.2.2. Receptores glutamatérgicos	15
2.2.3. Excitotoxicidad por glutamato	16
2.2.4. Enfermedad de Alzheimer	17
2.2.5. Epilepsia	19
2.3. Objetivos	21
2.3.1. Objetivo General	21
2.3.2. Objetivos Específicos	21
2.4. Metodología	22
2.4.1. Cultivos primarios de neuronas hipocampales	22
2.4.2. Inducción de excitotoxicidad con glutamato	22
2.4.3. Evaluación de la viabilidad celular con MTT	22
2.4.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA	23
2.4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
2.4.6. Densitometría y análisis estadístico	25
2.4.7. Matriz de marco lógico	25
2.5. Resultados	29
2.6. Discusión	34
2.7. Conclusiones	37
2.8. Recomendaciones	38
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Lista de Tablas

Tabla 1. Condiciones para la síntesis de cDNA.....	23
Tabla 2. Condiciones para la PCR.	24
Tabla 3. Primers a utilizar en la PCR.....	24
Tabla 4. Matriz de Marco Lógico	26

Lista de Figuras

Figura 1. Síntesis de glutamato.....	15
Figura 2. Mecanismo de excitotoxicidad del glutamato.....	17
Figura 3. Comparación de un cerebro normal y uno con Alzheimer, señalándose las zonas relacionadas con el lenguaje y el aprendizaje.	18
Figura 4. Evaluación de la viabilidad celular con MTT.	30
Figura 5. Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes Gria1, Gria2 y β III tubulina.....	31
Figura 6. Evaluación de la expresión de los genes Gria1 y Gria2 en neuronas hipocampales de rata tratadas con glutamato.....	33

Lista de Anexos

Anexo 1. Prueba de Normalidad Glutamato 0,5 horas	41
Anexo 2. Prueba de Normalidad Glutamato 2,0 horas	42
Anexo 3. Análisis Glutamato 0.5 horas	43
Anexo 4. Análisis Glutamato 2.0 horas	44
Anexo 5. Prueba de Dunnet Glutamato 0.5 h	45
Anexo 6. Prueba de Dunnet Glutamato 2,0 horas.....	46
Anexo 7. Análisis estadístico Gria1	47
Anexo 8. Análisis estadístico Gria2.....	48

RESUMEN DEL PROYECTO

El glutamato es empleado por los mamíferos como neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central. Sin embargo, su sobreactividad puede conducir al deterioro de las células como consecuencia de su interacción exacerbada con los receptores glutamatérgicos a los que tiene unión en la sinapsis. Esta actividad se encuentra implicada en enfermedades neurodegenerativas como lo son la enfermedad de Alzheimer y la Epilepsia. Las funciones mediadas por los receptores glutamatérgicos ionotrópicos, como los receptores de AMPA, en la región del hipocampo cumplen papeles importantes como por ejemplo en la potenciación a largo plazo, el cual es un mecanismo que subyace en funciones como la memoria y el aprendizaje. Por tales razones, el estudio y proyectos de investigación encaminados a la comprensión de estos mecanismos en regiones tan relevantes en el cerebro como lo es el hipocampo, resulta ser de gran interés. Debido a que los conocimientos que de ahí se generen pueden contribuir al desarrollo futuro de nuevas terapias farmacológicas en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Con base a lo anterior y teniendo en cuenta el interés de este proyecto, se buscó evaluar la expresión de los genes *Gria1* y *Gria2*, los cuales codifican para la subunidades *GluA1* y *GluA2* del receptor de AMPA, respectivamente. Para esto, se procedió a realizar un ensayo de excitotoxicidad donde se determinó la concentración de glutamato y tiempo requerido de exposición para inducir muerte neuronal. De ello, se obtuvo que se requería de 500 μM y 2 h de exposición. Sin embargo, para poder llevarse a cabo la evaluación de la expresión génica se seleccionó la concentración subtóxica de glutamato de 50 μM a 0.5 h.

Por otro lado, se determinaron las temperaturas óptimas de alineamiento en el proceso de amplificación de los genes de interés, las cuales fueron 59°C y 57.3°C, para los genes *Gria1* y *Gria2*, respectivamente. Este proceso junto con la determinación del tiempo de exposición a glutamato y la concentración del mismo, fueron requeridos realizarse previamente para llevarse a cabo posteriormente la evaluación de la expresión génica. De ello, se obtuvo que no se evidenció diferencia estadísticamente significativa en la expresión de los genes, sin embargo si se apreció un incremento al emplearse glutamato. La posible obtención de este último resultado pudo ser consecuente a razón de realizarse solo una réplica en el experimento de la expresión génica.

Palabras clave: excitotoxicidad, glutamato, receptores AMPA, genes *Gria1* y *Gria2*, subunidades *GluA1* y *GluA2*, expresión génica, enfermedad de Alzheimer y Epilepsia.

ABSTRACT

Glutamate is used by mammals as an excitatory neurotransmitter in the central nervous system. However, excitatory hyperactivity can lead to cellular deterioration because of its exacerbated interaction with the glutamatergic receptors that binds at the synapse. This activity is involved in neurodegenerative diseases such as Alzheimer and Epilepsy. The functions mediated by the ionotropic glutamatergic receptors, as AMPA receptor, in the hippocampal region play important roles such as in the long-term potentiation, which is a mechanism that underlies functions such as memory and learning. For these reasons, the study and research projects aimed to the understanding of these mechanisms in relevant regions in the brain as the hippocampus, are of great interest. The knowledge generated there can contribute to the future development of new pharmacological therapies in the treatment of neurodegenerative diseases.

Based on the above and taking into account the interest of this project, it was sought to evaluate the expression of the Gria1 and Gria2 genes, which code for the GluA1 and GluA2 subunits of the AMPA receptor, respectively. For this, an excitotoxicity test was carried out where the concentration of glutamate and the time required for exposure to induce neural death were determined. From this, it was obtained that it required 500 μM of glutamate and 2 hours of exposure. However, in order to be able to carry out the evaluation of gene expression, the subtoxic concentration of glutamate from 50 μM to 0.5 h was selected.

On the other hand, the optimal alignment temperatures were determined in the amplification process of the genes of interest, which were of 59°C and 57.3°C, for the Gria1 and Gria2 genes, respectively. This process, along with the determination of the time of exposure to glutamate and its concentration, were previously required to be able to carry out the evaluation of gene expression. From this, it was obtained that there was no statistically significant difference in the expression of the genes; however a trend towards increased expression was observed when using glutamate. Further experiments are needed in order to determine whether the changes observed represent a significant biological effect.

Key words: excitotoxicity, glutamate, AMPA receptors, Gria1 and Gria2 genes, GluA1 and GluA2 subunits, gene expression, Alzheimer's disease and Epilepsy

1. INTRODUCCIÓN

El glutamato es un neurotransmisor excitatorio por excelencia en el sistema nervioso central, el cual propaga el potencial de acción en la sinapsis, mediante su acoplamiento con receptores ionotrópicos como los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico (AMPA). Sin embargo, ante una descarga continua de glutamato y la sobreexcitación de estos receptores, se ha evidenciado su asociación con eventos que desencadenan enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la epilepsia (J. Rodríguez, 2000), debido a que dicha acción conlleva al ingreso excesivo de calcio al espacio citosólico en las neuronas, lo que a su vez conduce a la muerte neuronal (Lorigados et al., 2013). Por ello, para la ejecución de este proyecto se determinó las concentraciones excitotóxicas de glutamato y el tiempo de exposición, al que se induce la muerte neuronal.

Por otra parte, los receptores AMPA son estructuras tetraméricas conformadas por subunidades GluA1-4 y su composición resulta del ambiente sináptico. Estos receptores se encuentran involucrados en la potenciación a largo plazo en eventos relacionados con el aprendizaje y la memoria (Whitehead, Regan, Whitcomb, & Cho, 2017). De ahí a que los niveles anormales de glutamato conjunta con la activación de estos receptores deriven en enfermedades neurodegenerativas (Lorigados et al., 2013). Por tal motivo, en este proyecto se planteó evaluar las condiciones óptimas para la detección de los genes *Gria1* y *Gria2* que codifican para las subunidades GluA1 y GluA2, respectivamente, en los receptores de AMPA mediante RT-PCR. Para, así, finalmente evaluar la expresión de dichos genes ante la exposición a la concentración de glutamato subtóxica seleccionada.

Lo anterior resulta relevante para comprender eventos moleculares que subyacen en patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA), la cual es una de las demencias más comunes que afecta del 60% al 80% de los 46.8 millones de personas alrededor del mundo que se les ha diagnosticado demencia, ello sin tener en cuenta los pacientes mal diagnosticados o que se encuentran en etapas tempranas de la enfermedad, según estadísticas reportadas en el 2015 (Barrera-Ocampo & Lopera, 2016). Del mismo modo, la epilepsia, la cual es el desorden neurológico grave más común. La Organización Mundial de la Salud le otorga el 1% de la carga mundial de morbilidad, medida por el número de años perdidos debido a la discapacidad y a la muerte temprana (Dixit, Tripathi, Chandra, & Banerjee, 2015). Todo lo anterior remite a la importancia de los estudios que se lleven a cabo para la comprensión de estas enfermedades, ya que podrían determinar el desarrollo de estrategias farmacológicas efectivas.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. Planteamiento del problema

Las enfermedades neurodegenerativas son el resultado de diversos factores poco entendidos en su totalidad en la actualidad, debido a la diversidad de estos mismos y a todas las moléculas que se encuentran implicadas, por lo que resulta a su vez difícil encontrar un tratamiento efectivo a las enfermedades producto del deterioro neuronal. Por tal razón, es indispensable el continuo aporte a los conocimientos base de estas enfermedades, para así fortalecer técnicas y mejorar sustancias farmacológicas que se encuentren en procesos de investigación o en fases de ensayos clínicos.

Actualmente, en los países desarrollados, con el incremento de la población adulta mayor, a causa de las mejoras en las condiciones de vida, ha aumentado el número de reportes de enfermedades neurodegenerativas en algunos casos como consecuencia del envejecimiento cerebral. La demencia la padecían alrededor de 46,8 millones de personas alrededor del mundo en el 2015, sin tener en cuenta, aquellas personas que habían sido mal diagnosticadas o aquellas que se encontraban en fases tempranas de la enfermedad, siendo el 60% al 80% de estos casos correspondiente a la EA . Además, se espera un número total de 131.5 millones de personas afectadas para el año 2050 (Barrera-Ocampo & Lopera, 2016).

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud aboga para que las enfermedades de este tipo sean acogidas por la atención primaria de salud, ya que los costos provocados, por ejemplo en Europa, para el año de 2004 fueron de 139.000 millones de euros. En adición, se ha solicitado la mejora en la atención en salud en países en vía de desarrollo, ya que las personas que sufren de estos padecimientos no reciben los cuidados respectivos (World Health Organization, 2006).

Con base a lo anterior, y entendiendo que las enfermedades neurodegenerativas ocurren debido a la muerte neuronal y a fallas de las funciones de estas células. Es importante mencionar que en estos eventos se encuentran involucradas actividades anómalas como la excitotoxicidad inducida por glutamato. El glutamato como neurotransmisor excitatorio cumple un papel fundamental, ya que su producción a niveles excitotóxicos genera una sobreexcitación de las neuronas post-sinápticas, lo que finalmente se traduce en eventos de muerte celular. A sí mismo, la mediación que cumplen receptores glutamatérgicos como los receptores de AMPA, los cuales se encuentran implicados en estos eventos patológicos. Por ello, se busca responder ¿Cuáles son los cambios que sufre la expresión de los receptores de AMPA, a nivel de sus subunidades GluA1 y GluA2, ante los niveles excitotóxicos de

glutamato?, ¿Tendrán algún papel de neuroprotección cuando estos eventos comienzan a suceder o simplemente se sobreactivan?

2.2. Marco teórico y estado del arte

2.2.1. Glutamato: neurotransmisor excitador por excelencia

El glutamato es un aminoácido no esencial incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por tal razón debe ser sintetizado por las células nerviosas, para poder cumplir su papel como neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central (SNC). Este aminoácido es abundante en regiones como el hipocampo y en la corteza cerebral (J. Rodríguez, 2000).

El glutamato puede ser sintetizado por transaminación a partir del α -cetoglutarato en el ciclo de Krebs, por ende es posible decir que la glucosa se emplea como esqueleto carboxílico para la síntesis del glutamato. Sin embargo, su síntesis neuronal también puede ser a partir de la glutamina (sintetizada en las células gliales) que se convierte en glutamato, por acción de la glutaminasa. De este modo la síntesis de glutamato dependerá de las interacciones entre los astrocitos y las neuronas (J. Rodríguez, 2000).

Una vez el glutamato es sintetizado en la terminal sináptica se acumula en vesículas dependientes de adenosina trifosfato (ATP) y magnesio. Posterior a ello, estas vesículas se liberan desde la terminal al espacio sináptico por despolarización de la membrana. Esta despolarización es causada por la entrada de iones de calcio a la terminal que induce la exocitosis de las vesículas (J. Rodríguez, 2000).

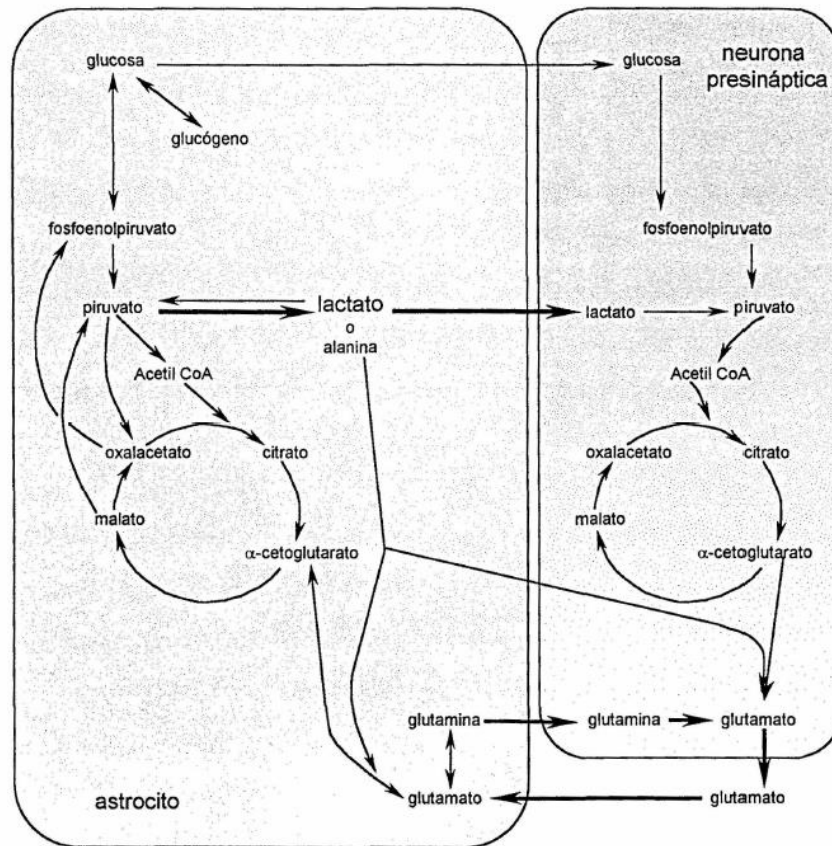


Figura 1. Síntesis de glutamato. Tomado de Rodríguez, J. (2000). Progresividad de los Efectos del Glutamato en el Sistema Nervioso Central: Aspectos Experimentales y Clínicos, 10.

2.2.2. Receptores glutamatérgicos

Para que el glutamato ejerza su función debe de unirse a receptores que se encuentran en la terminal postsináptica, estos pueden ser ionotrópicos o metabotrópicos. Se les denomina así, ya que los primeros son canales iónicos y los segundos se encuentran acoplados a proteínas G y a sistemas de segundos mensajeros. Los receptores ionotrópicos han sido clasificados bajo criterios farmacológicos y electrofisiológicos en tres grupos: receptores kainato (KAR), receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) y los receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico (AMPA). Cuando estos receptores se activan se traduce en una apertura de canales selectivos a determinados iones. Los KAR y AMPAR son permeables a iones de sodio y potasio; mientras que los NMDAR al calcio, sodio y potasio (J. Rodríguez, 2000). Los NMDAR exhiben mayor afinidad por el glutamato en comparación con los AMPAR, y a su vez tardan más tiempo en abrirse y además están abiertos por más tiempo (J. Rodríguez, 2000).

Para interés de este proyecto, se hará principal énfasis en los AMPAR. Los AMPAR son estructuras tetraméricas, formados por subunidades denominadas GluA1-4. Las subunidades que se ensamblan son condicionadas por el ambiente sináptico. En el hipocampo adulto, los AMPAR se conforman habitualmente de subunidades de GluA1 y GluA2, o GluA2 y GluA3. Las funciones de los AMPAR dependen de la composición de estos, ya que aquellos que poseen la subunidad de GluA2 son impermeables a los iones calcio. Los AMPAR resultan ser esenciales en la inducción y expresión de la plasticidad durante la estimulación sináptica. Se encuentran involucrados en los eventos moleculares que subyacen en la potenciación a largo plazo en eventos relacionados con el aprendizaje y la memoria (Whitehead et al., 2017). Los perfiles de expresión de las subunidades de AMPAR en las principales neuronas hipocámpales (células piramidales CA3, células musgosas hiliares) difieren de los que se encuentran en las interneuronas. Así como, en las etapas de formación del sistema nervioso central, ya que se ha evidenciado baja expresión de las subunidades GluA2 durante las primeras etapas de desarrollo, en el cerebro inmaduro (Szczurowska & Mareš, 2013).

2.2.3. Excitotoxicidad por glutamato

La descarga persistente de glutamato genera cambios neurodegenerativos que se asocian con enfermedades como EA y la epilepsia (Lorigados et al., 2013). La liberación en exceso de glutamato induce una despolarización y repolarización repetitiva, que conlleva a la sobreactivación de los receptores de glutamato ionotrópicos y con ello un ingreso excesivo de calcio al espacio intracelular. Este calcio pasa del citosol al interior de la mitocondria, generando una disfunción metabólica, producción de radicales libres, activación de proteasas, fosfolipasas, la óxido nítrico sintasa y endonucleasas, y la inhibición de la síntesis de proteínas. Todo ello sucede como pérdida de la homeostasis del calcio, cuando los sistemas de regulación se saturan, ocasionando un colapso en el potencial quimiosmótico mitocondrial por acumulación de estos iones divalentes en la matriz mitocondrial (Lorigados et al., 2013).

Lo anterior ocasiona una pérdida en la producción de adenosín trifosfato (ATP) y una apertura irreversible del poro de transición en la membrana mitocondrial, que permite el retorno del calcio previamente secuestrado al espacio citosólico. Ello promueve la generación de radicales libres que a su vez inducen la peroxidación de los lípidos de la membrana, la síntesis de óxido nítrico y la activación de enzimas involucradas en eventos catabólicos de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos. De igual forma se activan las procaspasas ocurriendo la muerte neuronal, ya sea por necrosis o apoptosis (Lorigados et al., 2013).

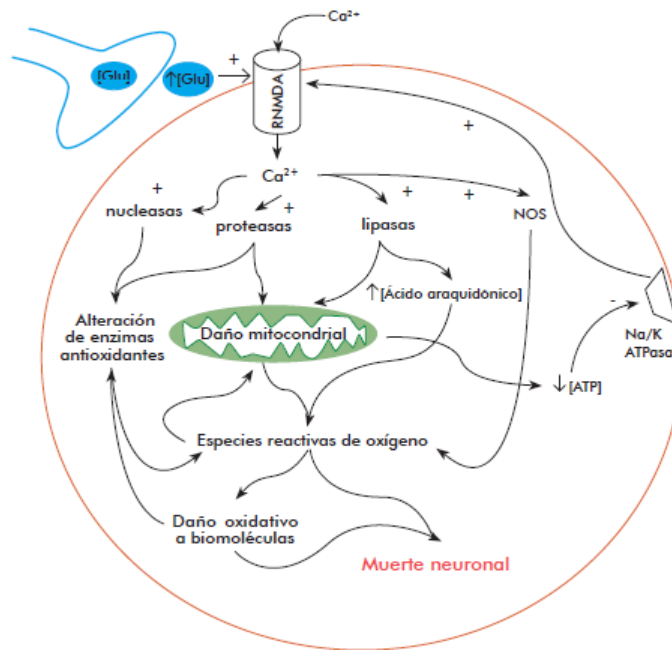


Figura 2. Mecanismo de excitotoxicidad del glutamato. Tomado de Lorigados, L., Orozco, S., Morales, L., Estupiñán, B., García, I., & Rocha, L. (2013). Excitotoxicidad y muerte neuronal en la epilepsia. *Biología Aplicada*, 30(1), 2.

Como se mencionó antes, los eventos excitotóxicos desencadenan la pérdida neuronal y con ello el resultado de diversas enfermedades neurodegenerativas.

2.2.4. Enfermedad de Alzheimer

La EA es el tipo de demencia más común, caracterizada por el deterioro progresivo de la memoria y la capacidad cognitiva. Entre el 60% al 80% de los diversos casos de demencia corresponden a EA. Los afectados pueden encontrarse en países desarrollados como en los Estados Unidos de América, en los países de Europa y China, de igual forma en países en vía de desarrollo como en América Latina (Barrera-Ocampo & Lopera, 2016).

En la EA han sido detectados diversos eventos moleculares, sin embargo es la acumulación de proteínas mal plegadas durante el envejecimiento cerebral en general, lo que provoca un daño oxidativo e inflamatorio, que desencadena en fallas energéticas y disfunciones en la sinapsis (Querfurth & LaFerla, 2010). La EA comienza con la muerte neuronal en la corteza entorrinal, la cual se encuentra conectada con el hipocampo, por lo cual se altera la transformación de las memorias a corto plazo a memorias a largo plazo (Barrera-Ocampo & Lopera, 2016). A nivel anatómico la corteza cerebral se reduce y regiones tales como el hipocampo, donde

se medía actividades como la memoria, se encoge y los ventrículos se agrandan (Ver Figura 3) (Alzheimer's Association, 2017).

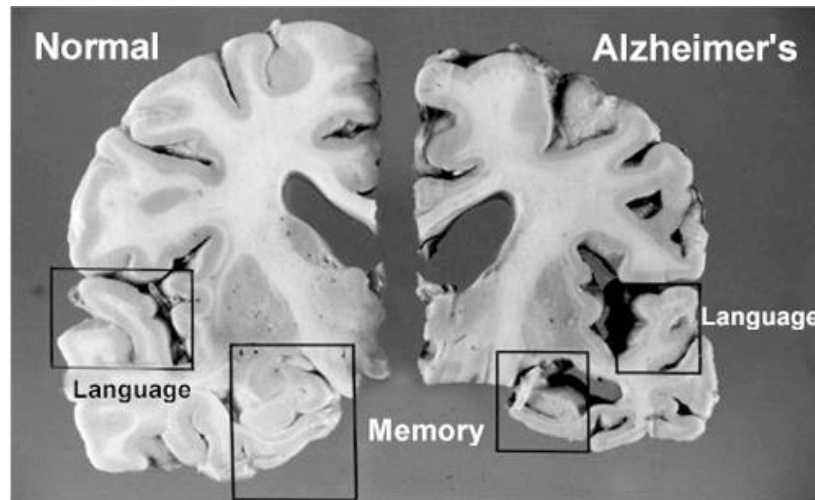


Figura 3. Comparación de un cerebro normal y uno con Alzheimer, señalándose las zonas relacionadas con el lenguaje y el aprendizaje. Tomado de: <http://www.corporacionalzheimer.cl/alzheimer.html>

La EA se encuentra clasificada en dos tipos: espontánea y familiar. En la primera se ha evidenciado la implicación patológica de la agregación de proteínas $A\beta$, las cuales son productos metabólicos que poseen de 36 a 43 aminoácidos (Querfurth & LaFerla, 2010). Los monómeros $A\beta_{40}$ se encuentran con mayor prevalencia y ocasionan mayor daño que las especies $A\beta_{42}$. Estos péptidos resultan de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés *Amyloid Precursor Protein*) en una continua acción enzimática por β -secretasa (BACE-1) y γ -secretasa, un complejo proteico con presenilina como dominio catalítico. Cuando $A\beta$ se acumula en exceso, debido a un desbalance entre la producción y el aclaramiento, y la agregación de estos péptidos, puede darse el inicio a la EA. Las proteínas $A\beta$ pueden formar oligómeros y crecer en fibrillas conformando placas insolubles. Los oligómeros solubles e intermedios resultan ser las formas más neurotóxicas (Querfurth & LaFerla, 2010).

Por otro lado, un evento importante en la EA, debido a su citotoxicidad y daño cognitivo, es la fosforilación de las proteínas tau, las cuales se encargan de promover el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos y vesículas de transporte. Cuando aquellas sufren un proceso de fosforilación se tornan insolubles y pierden afinidad por los microtúbulos, afectándose procesos de transporte axonal (Querfurth & LaFerla, 2010).

Otros eventos y/o factores que pueden significar un riesgo en el desarrollo de la EA son la intolerancia a la glucosa, la diabetes tipo 2, defectos en el metabolismo del colesterol, lesiones vasculares, inflamaciones parenquimatosas, isquemia, entre

otras (Querfurth & LaFerla, 2010). Cabe resaltar que la pérdida en la regulación de la homeostasis de calcio, y la elevada concentración de este en el espacio citosólico estimula la agregación de las proteínas A β y la amiloidogénesis (Querfurth & LaFerla, 2010).

Por otro lado, se ha comprobado en diversos estudios post-mortem que la regulación de la localización celular de los receptores de NMDA en las regiones sinápticas y extra-sinápticas presentan diversas funciones, desde modular la memoria hasta neurotoxicidad y neuroprotección (Morin, Díaz-Cintra, Bermudez-Rattoni, & Delint-Ramirez, 2016). En adición, en la actualidad algunos de los tratamientos farmacológicos prescritos para el control de la EA tienen como blanco farmacológico los receptores glutamatérgicos ionotrópicos, específicamente NMDAR, ya que en la EA se ha evidenciado niveles excesivamente altos de glutamato, resultando ser patológica la actividad de este neurotransmisor (Folch et al., 2015).

El segundo tipo de variante de Alzheimer, es el antes mencionado familiar. Este es causado por una mutación en el gen codificador de la APP, presenilina-1 o presenilina-2. Se caracteriza por desarrollarse antes de los 60 años, por la heredabilidad autosómica dominante y representa al menos el 1% de los casos de EA (Barrera-Ocampo & Lopera, 2016).

2.2.5. Epilepsia

Otra de las enfermedades donde la excitotoxicidad del glutamato es importante, tal y como se había mencionado previamente, es la epilepsia. La cual es considerada como el desorden neurológico grave más común. La Organización Mundial de la Salud otorga a la epilepsia el 1% de la carga mundial de morbilidad, medida por el número de años perdidos debido a la discapacidad y a la muerte temprana (Dixit et al., 2015).

Los ataques o eventos de epilepsia refieren a las alteraciones sensoriales o motoras, debido a una amplificación de las descargas neuronales, que a su vez se encuentran en sincronización (J. Rodríguez, 2000).

Algunas evidencias argumentan la hipótesis que relaciona a la sobreactividad inducida por concentraciones excitotóxicas de glutamato y la epilepsia. Además, se ha asociado la actividad convulsiva prolongada por elevación del glutamato con la duración del estado epiléptico (Lorigados et al., 2013). Los NMDAR se encuentran implicados en la epileptogénesis y se ha demostrado que la sub-regulación de las subunidades de estos receptores ionotrópicos contribuye a la hiperexcitabilidad (Dixit et al., 2015). Además, la aplicación directa de glutamato en la amígdala simula la activación propagada, mientras que el uso de antagonistas de los AMPAR retarda el desarrollo de la activación propagada amigdalina en ratones (Lorigados et al., 2013). En adición a lo anterior, en la epilepsia ha sido reportado la mediación de los

AMPAAR como inductores de la excitación sináptica rápida en el cerebro (Han et al., 2016).

Finalmente, con base a todo lo anterior y con el apoyo literario aquí citado es posible decir que es importante entender los eventos moleculares que subyacen a partir de las concentraciones excitotóxicas de glutamato como de la mediación de los AMPAR, para el desarrollo de tratamientos y/o alternativas a diversas patologías que se vean originadas o intensificadas por lo previamente descrito.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo General

Determinar si la exposición al glutamato produce cambios en la expresión de los genes que codifican las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor de AMPA en neuronas hipocampales de rata.

2.3.2. Objetivos Específicos

- 2.3.2.1. Establecer la concentración de glutamato y el tiempo necesario para inducir muerte en un modelo *in vitro* de neuronas hipocampales de rata.
- 2.3.2.2. Determinar las condiciones óptimas para la detección de los genes Gria1 y Gria2 mediante RT-PCR.
- 2.3.2.3. Evaluar la expresión de los genes de estudio a la concentración de glutamato estandarizada mediante un método semi-cuantitativo.

2.4. Metodología

2.4.1. Cultivos primarios de neuronas hipocampales

Los cultivos que se realizaron corresponden a cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata. Para esto, se sacrificó ratas recién nacidas (día postnatal P0 a P2), debido a que las neuronas de neonatos de rata pueden crecer más fácilmente *in vitro* que las neuronas de ratas adultas. Posteriormente se hizo una fractura al cráneo con el propósito de extraer el cerebro, e inmediatamente se colocó en un medio de disección frío que ayuda a prevenir la muerte de las neuronas mientras se disecciona el hipocampo.

Las células se separaron del tejido y se evitó la agregación entre ellas mismas, utilizando DNAsa (0,1 mg/mL) y tripsina (0.25%). Después se realizó el cultivo, para lo cual sembraron las células en platos tratados con poli-L-lisina (1 mg/mL) para promover la adhesión. Las células fueron sembradas en medio mínimo esencial (MEM) suplementados con glucosa (20 mM) como fuente de carbohidratos, piruvato de sodio (1 mM) y suero fetal bovino (10%).

El MEM se reemplazó a las cuatro horas de haber sembrado las neuronas con medio neurobasal suplementado con B27 (1X) y glutamina (1 mM). El medio fue reemplazado tres veces a la semana.

2.4.2. Inducción de excitotoxicidad con glutamato

Las neuronas se sembraron en platos de 96 pozos y después de mantenerlas 8 días *in vitro*, se trataron con HBSS (vehículo) y glutamato, diluido en el vehículo, a diferentes concentraciones (5, 50 y 500 μ M) incubándolas durante un tiempo establecido (0,5 y 2 h) a 37°C y 5% de CO₂. Después de este tiempo se retiró el tratamiento y se adicionó nuevamente medio neurobasal suplementado.

2.4.3. Evaluación de la viabilidad celular con MTT

Al día siguiente del tratamiento con glutamato, se adicionó MTT (12 mM) a los cultivos, el cual es un tetrazol de color amarillo que se convierte en un formazán de color morado cuando las células son viables. Tras la adición, se incubaron los platos por cuatro horas a 37°C. Una vez realizada la incubación, se adicionaron 50 μ L de DMSO (100%) que se usa para disolver los cristales de formazán que se encuentran dentro de las células. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm para determinar la viabilidad celular y se comparó con un control que contiene Triton X-100 (0.001%) que produce muerte celular disolviendo las membranas.

2.4.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Las neuronas hipocampales se sembraron en platos de 6 pozos y después de 8 días in vitro se trataron con el glutamato a la concentración y tiempo determinados en el ensayo de excitotoxicidad. Al día siguiente del tratamiento, se realizó la extracción de RNA empleando el kit E.Z.N.A Total RNA (Omega BioTek) y se siguió el protocolo descrito por el fabricante para efectuar este procedimiento en células en cultivo.

Se tomó aproximadamente de 1×10^6 células previamente tripsinizadas y se agregaron a un tubo de 1,5 mL para su lisis con 700 μ L del buffer de lisis TRK. Se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto. A continuación, se adicionó la muestra a una columna de RNA HiBind para luego centrifugar a 10.000 x g por 30 segundos. El lavado se realizó con 500 μ L de buffer de lavado (RNA Wash Buffer II) pipeteando directamente sobre la columna, luego se centrifugó nuevamente a 10.000 x g durante 30 segundos, se descartó el sobrenadante. Se transfirió la columna a un tubo de 1,5 mL limpio y se le adicionó agua libre de nucleasas, se centrifugó a 13.000 x g por 2 minutos. La muestra se almacenó a -80°C hasta realizar la RT-PCR.

A partir del RNA extraído, se obtuvo el cDNA por medio de la acción de la enzima transcriptasa inversa. Para esto se tomaron 500 ng de RNA, 0.5 μ g de oligo-dT y agua, se incubaron a 70°C por 5 minutos y luego se colocaron en hielo por otros 5 minutos. A continuación, se tomaron 5 μ L y se adicionaron a la mezcla descrita en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones para la síntesis de cDNA.

RT-PCR [μ f]	Muestra (uL)
GS 1X Buffer	8,0
MgCl ₂ (2,0 mM)	3,2
dNTPs (0,5 mM)	2,0
GS Rev Trans	2,0
H ₂ O	14,8
Total	30,0
RNA	10,0

2.4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR se tomaron 120 ng de cDNA sintetizado previamente y se adicionó a la mezcla descrita en la tabla 2. Las muestras se llevaron al termociclador donde se incubaron a 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C-65°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Las secuencias de los primers a utilizar aparecen en la tabla 3. Los primers fueron previamente elaborados por el grupo de neurofarmacología de la Universidad Icesi.

Los fragmentos amplificados en la PCR se separaron en un gel de agarosa (1.2%) a 120 V por 35 min. Posterior a ello, se incubó en una solución de bromuro de etidio (5 µL/100mL Buffer TAE). Luego de esto los geles fueron fotografiados y a partir de estas imágenes se hizo el análisis densitométrico.

Tabla 2. Condiciones para la PCR.

PCR	Muestra (uL)
Buffer 10X	2,0
10 mM dNTPs	0,4
25 mM MgCl ₂	1,5
Fprimer	0,4
Rprimer	0,4
Taq	0,1
H ₂ O	14,2
Total	18,0
Muestra	2,0

Tabla 3. Primers a utilizar en la PCR.

Proteína	Primer	Secuencia (5'...3')	pb	Tm (°C)
GluA1	Gria1 2F	TCCACGTGATCGAAATGAAA	480	60.05
	Gria1 2R	GCTTGGACTTCTGTGGCTTC		60.00
GluA2	Gria2 1F	GGCGTGTAATCCTGGACTGT	340	60.00
	Gria2 1R	CTCTGCTTCCGAAGGTTACG		60.01
βIII-Tubulina	TUBB3 1 F	TGAGGCCTCCTCTCACAAGT	237	59.99
	TUBB3 1 R	TGCAGGCAGTCACAATTCTC		59.99

2.4.6. Densitometría y análisis estadístico

A partir de las fotografías de los geles se determinó la intensidad de las bandas y esta se cuantificó con el programa ImageJ (NIH). Los valores de intensidad de cada gen se normalizaron con los valores de intensidad del gen de expresión constitutiva (β III-Tubulina).

Para el ensayo de excitotoxicidad se realizó 1 cultivo (empleando 2 animales) con 8 réplicas en cada tratamiento. Los valores de densitometría de cada muestra fueron empleados para calcular el promedio y la desviación estándar de cada tratamiento. Mediante la prueba de Shapiro-Wilk se determinó que los datos tenían una distribución normal por lo tanto se aplicó una ANOVA con una pruebas post-hoc de Dunnett para determinar si existían diferencias entre los tratamientos y el vehículo. Para establecer si las diferencias eran estadísticamente significativas se asumió un intervalo de confianza del 95% y una $p < 0.05$.

Para los análisis de expresión de genes se realizó 1 cultivo (empleando 4 animales) con 3 réplicas en cada tratamiento. Los valores de densitometría de cada muestra fueron empleados para calcular el promedio y la desviación estándar de cada tratamiento. Se hizo una prueba no paramétrica de Wilcoxon y se asumió que había significancia estadística cuando $p < 0.05$.

2.4.7. Matriz de marco lógico

En este apartado del proyecto, se presenta la matriz de marco lógico, donde se evidencian las actividades que se debieron llevar a cabo para lograr los objetivos previamente escritos. Además, de los supuestos u obstáculos que se pudieron presentar durante el desarrollo del proyecto.

Tabla 4. Matriz de Marco Lógico

<p>Objetivo General: Determinar si la exposición al glutamato produce cambios en la expresión de los genes que codifican las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor de AMPA en neuronas hipocampales de rata.</p>			
Objetivos	Actividades	Supuestos	Indicadores
<p>1. Establecer la concentración de glutamato y el tiempo necesario para inducir muerte en un modelo <i>in vitro</i> de neuronas hipocampales de rata.</p>	<p>-Capacitación para la realización de los cultivos hipocampales primarios de ratas.</p> <p>-Realización de cultivos primarios hipocampales de rata.</p> <p>-Evaluar la muerte celular, empleando el reactivo MTT, de los cultivos sometidos a las concentraciones arbitrarias de glutamato.</p> <p>-Determinar el tiempo necesario de exposición de glutamato en la inducción de la muerte celular.</p>	<p>-Disponibilidad de las ratas Wistar para realizar los cultivos primarios hipocampales.</p> <p>-Posible contaminación de los cultivos celulares.</p> <p>-Crecimiento lento de las células cultivadas.</p>	<p>Tiempo y concentraciones de glutamato a los cuales se induce muerte neuronal, establecidos.</p>

	<p>-Identificar las concentraciones efectivas excitotóxicas de glutamato en neuronas hipocampales de rata.</p>		
<p>2. Determinar las condiciones óptimas para la detección de los genes Gria1 y Gria2 mediante RT-PCR.</p>	<p>-Extracción del RNA de hipocampo y conversión en cDNA.</p> <p>-Estandarización de las condiciones de detección de los genes de estudio mediante PCR.</p> <p>-Selección del gel de mayor efectividad en el proceso de electroforesis.</p>	<p>-Disponibilidad de reactivos necesarios para realizar las PCR respectivas.</p> <p>-Disponibilidad del material biológico.</p>	<p>Temperatura y concentraciones óptimas de los distintos componentes de una PCR en la detección de los genes de estudio, determinadas.</p>
<p>3. Evaluar la expresión de los genes de estudio a la concentración de glutamato estandarizada mediante un método semi-cuantitativo.</p>	<p>-Someter los cultivos celulares a las concentraciones subtóxicas de glutamato estandarizadas.</p> <p>-Cuantificación de los niveles de</p>	<p>-Disponibilidad de material biológico.</p>	<p>Expresión de los genes de estudio a la concentración de glutamato determinada.</p>

	<p>expresión de los genes de interés cuando los cultivos han sido sometidos a concentraciones subtóxicas de glutamato.</p> <p>-Análisis de resultados empleando una prueba no paramétrica (Wilcoxon) y de acuerdo con los resultados se establecer si existe diferencia entre los controles y los tratamientos.</p>		
--	---	--	--

2.5. Resultados

Para determinar la concentración excitotóxica de glutamato se expusieron cultivos de neuronas hipocampales de rata a diferentes concentraciones de glutamato (5, 50 y 500 μM) durante 0.5 y 2h. A continuación, se evaluó la viabilidad celular empleando MTT, el cual por acción mitocondrial se torna en formazán, logrando ser medido mediante absorbancia espectrofotométrica a 570 nm. Para ello, se emplearon dos controles uno positivo, el cual consistía en no adicionar tratamiento a los pozos con las neuronas y el otro era el control negativo con Tritón X-100. A su vez, se empleó como vehículo HBSS contra el que se evaluaría la excitotoxicidad producida por las diferentes concentraciones de glutamato.

En las Figuras 4a y 4b, se presentan los resultados obtenidos. En la Figura 4a, se puede observar que la mayor absorbancia, es decir, la mayor viabilidad celular se obtuvo con las células que no fueron tratadas (control positivo), como era de esperarse, y aquellas que estuvieron expuestas a una concentración de glutamato de 50 μM . Mientras, que las células a las que se les adicionó Triton X-100 se evidenció baja absorbancia, lo que implicó una mayor muerte celular. En el tratamiento con glutamato 500 μM se determinó una menor viabilidad celular en un tiempo de exposición de 0.5 h. En la Figura 4b se presenta el tiempo de incubación de 2 h, lográndose resaltar la disminución de la absorbancia, es decir, se redujo la viabilidad celular en todos los tratamientos a excepción de la células no tratadas. Con el Triton X-100 se obtuvo la menor viabilidad, seguido por el tratamiento con glutamato 500 μM . En esta ocasión, con glutamato 5 μM se presentó una mayor absorbancia caso contrario a lo que se visualizó en la Figura 4a, donde el glutamato 50 μM era el de mayor absorbancia.

En cuanto a los resultados estadísticos, se obtuvo mediante ANOVA que a un tiempo de exposición de 0.5 h no había diferencia significativa entre los tratamientos mientras que a 2 h con un valor-p de 0,0009 se demostró todo lo contrario. Sin embargo, mediante la prueba de Dunnet no se comprobó que los tratamientos a diferentes concentraciones de glutamato presentaran diferencia con el tratamiento en que únicamente se empleó el vehículo (HBSS) (ver Anexos). De este procedimiento experimental, y con base a los resultados obtenidos, se escogió la concentración 50 μM de glutamato a un tiempo de exposición de 0,5 h, ya que con estos se evidenció viabilidad celular, la cual es requerida para poder evaluar la expresión génica.

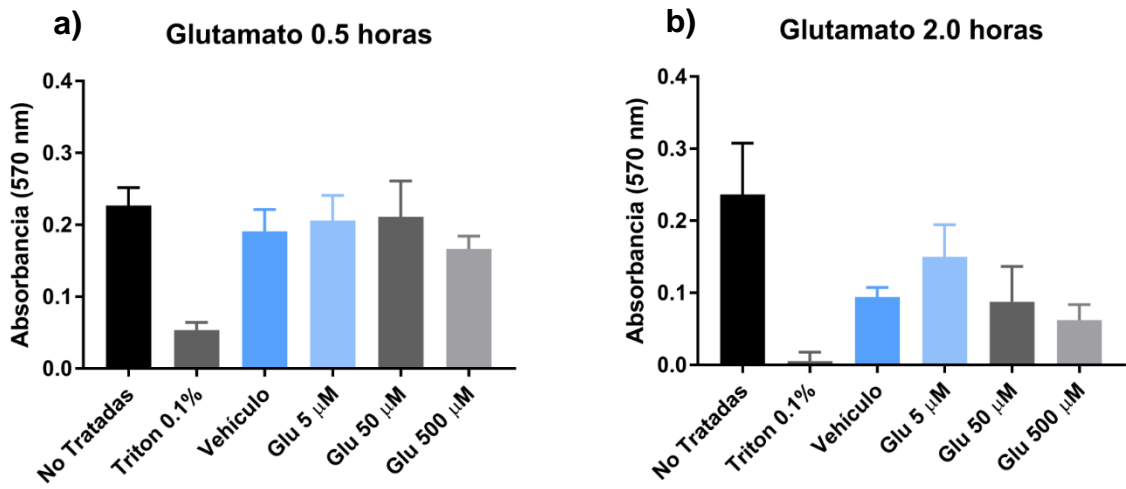


Figura 4. Evaluación de la viabilidad celular con MTT. **a)** Gráfico de barras de la absorbancia de las células tratadas con MTT previamente expuestas a concentraciones de 5, 50 y 500 μ M de glutamato durante 0.5 h en contraste con aquellas que fueron tratadas con el vehículo (HBSS) y los respectivos controles, no tratadas (control positivo) y Triton X-100 (control negativo). **b)** Gráfica de barras de la absorbancia a 570 nm de las células expuestas durante 2.0 h a diferentes concentraciones de glutamato (5, 50 y 500 μ M), al vehículo (HBSS), a Triton X-100 y sin tratamiento.

Posterior a ello, se llevó a cabo la estandarización de las temperaturas de hibridación de los primers, haciendo uso de la técnica PCR. En la Figura 5a, se muestra el resultado obtenido de la estandarización de las temperaturas de hibridación de los primers y se observa el peso molecular de los genes, siendo 480 pb para Gria1 y 340 pb para Gria2. En la Figura 5b, se puede observar en el gel de agarosa las bandas de los genes de interés amplificados a distintas temperaturas. Estas temperaturas fueron 55°C, 56°C, 57.3°C, 59°C, 61.3°C, 63.1°C, 64.3°C y 65°C. Los pesos moleculares de los genes amplificados debieron coincidir con el peso buscado, empleando un marcador de peso molecular (MPM) de 12000 pb. Para el gen Gria1, a 55°C se observó una banda inespecífica por debajo del peso molecular del gen, en temperaturas mayores a 59°C las bandas se observaron un poco difusas y no se encontraban completamente horizontales. Con base a esos criterios se escogió que la temperatura de alineamiento óptima era 59°C. En el caso del gen Gria2 fácilmente se puede distinguir que a 64.3°C no se aprecia ninguna banda, a temperaturas superiores a 57,3°C las bandas se encuentran inclinadas y menos definidas que en las otras temperaturas. Por tal razón, se escogió 57,3°C como la temperatura de alineamiento óptima para la amplificación del gen Gria2. Para el caso de β III-Tubulina, cuyo peso molecular era de 237 pb, la temperatura fue de 57°C, para llegar a dicha conclusión se tuvo en cuenta los mismos criterios presentados previamente en las consideraciones de elección de las temperaturas óptimas para los genes Gria1 y Gria2 (T. Rodríguez, 2017).

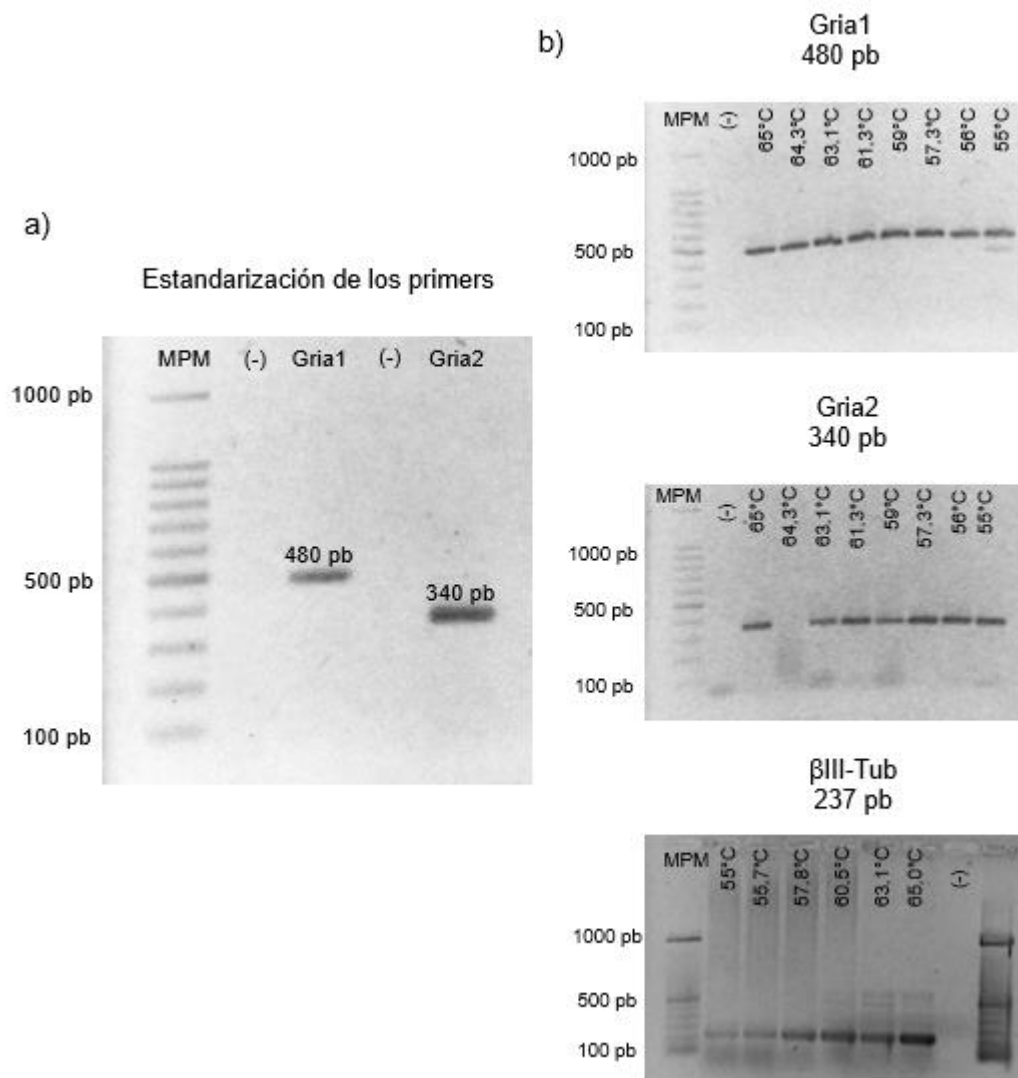


Figura 5. Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes Gria1, Gria2 y β III tubulina. **a)** Imagen de la electroforesis donde se muestra los resultados obtenidos del proceso de estandarización. **b)** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, 35 min y 120V, donde se evidencia el proceso de estandarización para poder determinar la temperatura de alineamiento óptima en la amplificación de los diferentes genes.

Una vez obtenidas las temperaturas de alineamiento óptimas para la amplificación de los genes junto con la concentración subtóxica de glutamato estandarizada, se llevó a cabo la amplificación de los genes Gria1 y Gria2 al exponer las células a 50 μ M de glutamato durante 0,5 h y otras a HBSS (vehículo). Posterior a ello, mediante análisis densitométrico, empleando ImageJ, se determinó la expresión de los genes. Luego, el resultado obtenido de dicho procedimiento fue normalizado con el nivel de expresión del gen constitutivo β III-Tubulina. En la Figura 6a se presenta la expresión relativa de los genes y en la Figura 6b se observa que no hay diferencia significativa

en la expresión de los genes Gria1 y Gria2. Sin embargo, si se ve una tendencia a aumentar la expresión de ambos genes al tratarse las células con glutamato comparado con el vehículo.

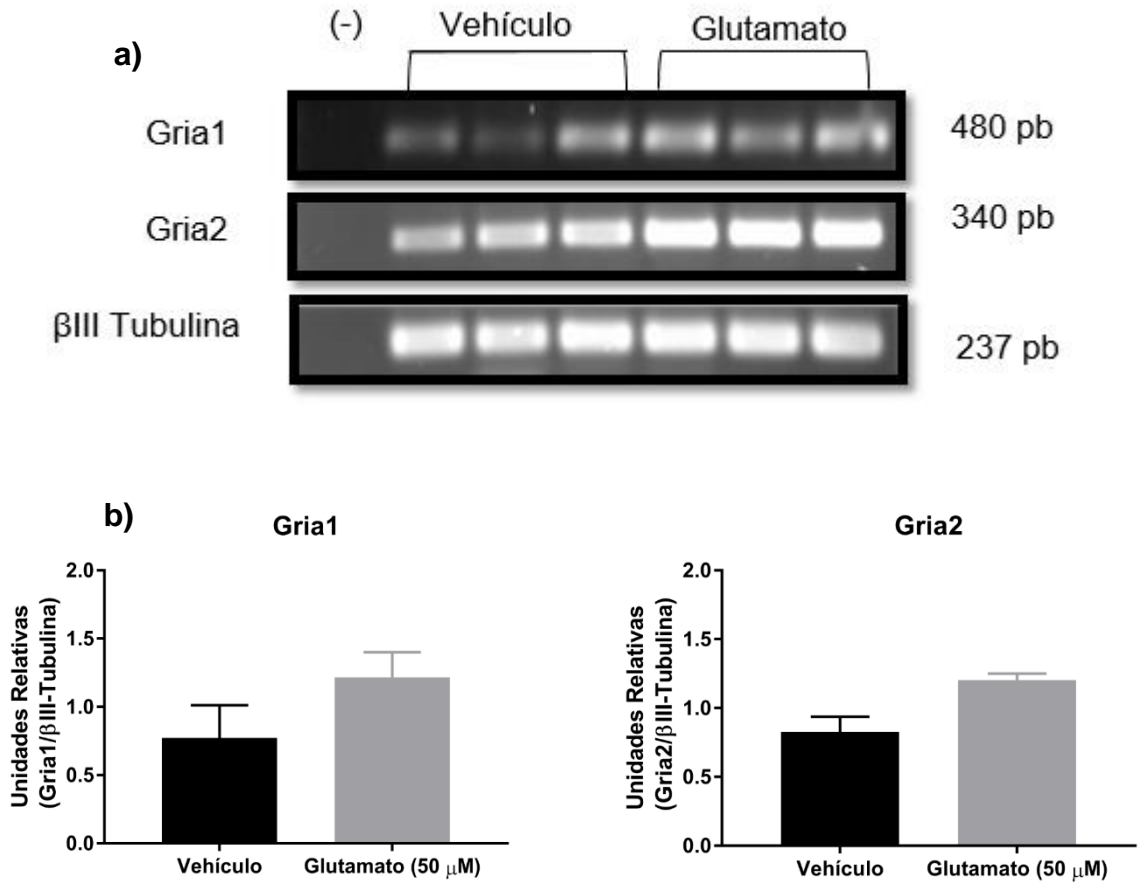


Figura 6. Evaluación de la expresión de los genes Gria1 y Gria2 en neuronas hipocampales de rata tratadas con glutamato. **a)** Electroforesis en gel de agarosa empleada para la evaluación semi-cuantitativa de los niveles de expresión. De izquierda a derecha se observa el control negativo (H_2O), los tres grupos de bandas siguientes corresponden a los fragmentos de DNA amplificados previamente que fueron tratados con el vehículo y los últimos tres grupos de bandas son de los genes sometidos a glutamato 50 μ M por 0.5h. **b)** Histogramas que presentan la expresión de los genes Gria1 y Gria2 en neuronas hipocampales de rata al someterse a glutamato o HBSS.

2.6. Discusión

Establecer la concentración excitotóxica de glutamato era uno de los objetivos de este proyecto. Para ello, se evaluó la viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas hipocampales empleando MTT. En los resultados se demostró que a mayor concentración (500 μM) y tiempo de exposición al glutamato (2 horas) se presentó una mayor muerte celular (Figura 4b). Este resultado se asemeja a la absorbancia obtenida a partir de las células que fueron tratadas con Tritón X-100, el control negativo, el cual es un detergente no iónico utilizado para la desnaturalización de las membranas y proteínas. Como ya se ha mencionado anteriormente, la sobreactivación de los receptores ionotrópicos, debido a las altas concentraciones de glutamato en el espacio sináptico, conlleva a la entrada excesiva de calcio en las células, lo cual desencadena en muerte celular (Lorigados et al., 2013).

En la literatura se ha descrito que el tiempo de exposición al glutamato es un factor relevante para la inducción de muerte celular en ensayos de excitotoxicidad. Cinco minutos de exposición producen un incremento de calcio intracelular, pasadas dos horas se observa un periodo de latencia en la que los niveles de calcio se tornan normales, seguido de una subida gradual del calcio que conlleva la muerte celular (García, 2003). De esta forma se comprueba que al cabo de dos horas la viabilidad celular se ve disminuida, lo cual se pudo comprobar mediante los resultados obtenidos (Figura 4b). Por otro lado, no se encuentra suficiente información en la literatura que evidencie cuales son las concentraciones excitotóxicas o aquellas que son empleadas para inducir muerte celular, esto en términos de valores estándares, ya que estas concentraciones, dependen de los intereses con los que se realice cada estudio

Cabe mencionar, que las células que fueron tratadas únicamente con HBSS (vehículo), también sufrieron muerte celular. Esto pudo ser ocasionado por falta de nutrientes requeridos para el sostenimiento de las células, ya que al momento del tratamiento no presentaban el medio neurobasal suplementado, debido a que en su composición se pueden encontrar antioxidantes (por ejemplo, vitamina E, acetato de vitamina E, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión), los cuales afectan la evaluación de muerte celular ocasionada por daños oxidativos, que aquí se obtenían mediante el uso de glutamato.

Para llevar a cabo el análisis experimental de la expresión génica, la concentración de glutamato debía estar por debajo del nivel tóxico, ya que de otra forma no habría células vivas sobre las cuales se pudiera llevar a cabo el estudio de la expresión génica. Por tal motivo, se escogió un tiempo de exposición de 0,5 h y una concentración de glutamato de 50 μM . Con estas condiciones la absorbancia a 570 nm se asemejaba a las de las células tratadas con el vehículo, asegurando de este modo la viabilidad celular (Figura 4b).

Por otro lado, los análisis de expresión de los genes *Gria1* y *Gria2* no revelaron una diferencia estadísticamente significativa entre el vehículo (HBSS) y los tratamientos con glutamato. Sin embargo, se observó una tendencia a incrementar la expresión génica al emplearse glutamato a una concentración de 50 μM (Figura 6b). La falta de significancia estadística pudo deberse a que sólo se realizó una réplica del experimento, por lo tanto se necesitaría de más ensayos que completen los resultados del estudio.

En el hipocampo adulto gran parte de AMPAR son heterómeros compuestos fundamentalmente de GluA1/GluA2 con una fracción menor de receptores con subunidades GluA2/GluA3 (Lu, Wei and Roche, 2012). Debido a ello, el interés de este estudio fue evaluar la expresión de los genes que codifican dichas subunidades. En la literatura se ha descrito que los AMPAR que carecen de la subunidad GluA2, son permeables a los iones calcio, caso contrario de aquellos receptores que si los presentan (Caicoya, 2016).

Sin embargo, la composición de estos receptores se encuentra influenciada por el tipo de neurona, la plasticidad sináptica y la enfermedad (Granger, Gray, Lu, & Nicoll, 2011). Además, se ha descrito que las subunidades GluA1 no se transportan a la sinapsis en condiciones basales en neuronas piramidales del hipocampo, mientras que las subunidades GluA2 si lo hacen. No obstante, la liberación de GluA1 puede ser llevada a cabo tras la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés *Long-Term Potential*) (Granger et al., 2011). Esta actividad (LTP), involucrada en los procesos de memoria y aprendizaje, en sus etapas iniciales, requiere de la liberación incrementada de glutamato por la presinapsis y el consecuente reclutamiento adicional de AMPAR en la región postsináptica, acción denominada como actividad-dependiente (Penn et al., 2017). La actividad sináptica inducida por el glutamato podría explicar los resultados obtenidos en el presente estudio, debido a que la expresión de los genes *Gria1* y *Gria2* se vio incrementada en aquellos cultivos tratados con glutamato, caso que no se apreció con aquellos que solo fueron tratados con el vehículo (HBSS).

De este modo, con base a los resultados expuestos donde se observó que el gen *Gria2* se expresó de forma semejante al gen *Gria1*, podría decirse que en condiciones subtóxicas los AMPAR expresan indistintamente las subunidades. Sin embargo, se ha demostrado que en enfermedades como la epilepsia la subunidad GluA2 se encuentra subregulada debido a la internalización de AMPAR que contienen dichas subunidades a causa del incremento de la proteína endocitaria PICK1 citosólica. Motivo por el cual las células postsinápticas resultan ser más permeables al calcio, ya que disminuye en las postsinapsis los AMPAR que contienen GluA2, y esto se traduce, finalmente, en estrés oxidativo (Lorgen et al., 2017). Aunque los receptores de NMDA (NMDAR) son la fuente principal del incremento excitotóxico de calcio a nivel intracelular por su permeabilidad a dicho catión, y no los receptores AMPA quienes median la respuesta inmediata o la

despolarización de la postsinapsis, pero en condiciones anómalas favorece los eventos previamente descritos (Lorgen, Egbenya, Hammer, & Davanger, 2017).

Por otro lado, en la EA en estudios llevados a cabo en ratas los niveles altos de A β ocasionan la depresión de la transmisión por glutamato en la sinapsis, a su vez que conduce a la endocitosis de los AMPAR que contengan subunidades GluA1 y GluA2 como de los NMDAR. En consecuencia se ven afectadas las funciones de memoria y aprendizaje (Hsieh et al., 2007). Con base a todo lo anterior, es posible indicar que la presencia de las subunidades GluA2 disminuyó el impacto de muerte celular por excitotoxicidad en el estudio. Es decir, que la muerte celular observada en la Figura 4b, puede estar guiada por falta de nutrientes (medio neurobasal suplementado) en el medio, más que por la hiperexcitabilidad de las neuronas. Además, que en los cultivos no se garantizó únicamente la actividad de los AMPAR, por tanto pudo tener influencia la actividad mediada por NMDAR, quienes también pudieron contribuir a la muerte celular por la sobreactivación mediada por glutamato.

2.7. Conclusiones

- Se determinó que la concentración de glutamato y el tiempo de exposición a los cuales se observó menor viabilidad celular fue a 500 μM y 2 h.
- Se seleccionó la concentración 50 μM de glutamato y 0.5 h de exposición al aminoácido como condiciones subtóxicas que permitieran evaluar posteriormente la expresión génica de Gria1 y Gria2.
- Se estableció que las temperaturas óptimas de alineamiento en la amplificación de los genes Gria1 y Gria2, fueron 59°C y 57,3°C, respectivamente.
- No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión de los genes Gria1 y Gria2. Sin embargo, se observó una tendencia a incrementar la expresión génica en los cultivos tratados con glutamato.

2.8. Recomendaciones

- Verificar las condiciones del laboratorio para evitar contaminaciones de los cultivos primarios.
- Realizar otros experimentos complementarios en la evaluación de la expresión génica con el fin de confirmar si existe o no diferencias estadísticamente significativas.
- Adicionar medio neurobasal suplementado en menor concentración en los cultivos sobre los que se evaluará la viabilidad celular. Ello con el fin de garantizar, que la muerte celular no se produzca a causa de falta de nutrientes en el medio. Otra alternativa, sería emplear medio neurobasal suplementado sin antioxidantes.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzheimer's Association. (2017). Inside the brain. Retrieved October 23, 2017, from https://www.alz.org/espanol/about/inside_the_brain.asp
- Barrera-Ocampo, A., & Lopera, F. (2016). Amyloid-beta immunotherapy : the hope for Alzheimer disease? *Colombia Medica*, 47(4), 203–212.
- Caicoya, A. G. (2016). Búsqueda de innovación: antagonistas selectivos del receptor AMPA, 31(Supl 1), 9–13.
- Dixit, A. B., Tripathi, M., Chandra, P. S., & Banerjee, J. (2015). Molecular biomarkers in drug-resistant epilepsy: Facts & possibilities. *Int J Surg*, 36, 483–491. [https://doi.org/S1743-9191\(15\)01131-0](https://doi.org/S1743-9191(15)01131-0) [pii]10.1016/j.ijsu.2015.08.029 [doi]
- Folch, J., Ettcheto, M., Petrov, D., Abad, S., Pedrós, I., Marin, M., ... Camins, A. (2015). Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: strategies for combating β -amyloid protein. *Neurología (English Edition)*. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.03.019>
- García, E. (2003). *Muerte neuronal excitotóxica: interacción entre las rutas de señalización del IGF-I y el glutamato*. Madrid. Retrieved from <http://biblioteca.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26955.pdf>
- Granger, A. J., Gray, J. A., Lu, W., & Nicoll, R. A. (2011). Genetic analysis of neuronal ionotropic glutamate receptor subunits. *The Journal of Physiology*, 589(17), 4095–4101. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.213033>
- Han, X. J., Shi, Z. S., Xia, L. X., 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.011>
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., & Malinow, R. (2007). AMPA-R Removal Underlies A β -induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss, 52(5), 831–843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07804.x>.The
- Lorgen, J. Ø., Egbenya, D. L., Hammer, J., & Davanger, S. (2017). PICK1 facilitates lasting reduction in GluA2 concentration in the hippocampus during chronic epilepsy. *Epilepsy Research*, 137, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.08.012>
- Lorigados, L., Orozco, S., Morales, L., Estupiñán, B., García, I., & Rocha, L. (2013).

- Excitotoxicidad y muerte neuronal en la epilepsia. *Biotecnología Aplicada*, 30(1), 1–8.
- Lu, Wei and Roche, K. (2012). Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function, 22(3), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.008>.Posttranslational
- Morin, J. P., Díaz-Cintra, S., Bermúdez-Rattoni, F., & Delint-Ramírez, I. (2016). Decreased levels of NMDA but not AMPA receptors in the lipid-raft fraction of 3xTg-AD model of Alzheimer's disease: Relation to Arc/Arg3.1 protein expression. *Neurochemistry International*, 100, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.09.013>
- Penn, A. C., Zhang, C. L., Georges, F., Royer, L., Breillat, C., Hosy, E., ... Choquet, D. (2017). Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors. *Nature*, 549(7672), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature23658>
- Querfurth, H., & LaFerla, F. (2010). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 56–67. <https://doi.org/citeulike-article-id:6600078>\rdoi: 10.1056/NEJMra0909142
- Rodríguez, J. (2000). Progresividad de los Efectos del Glutamato en el Sistema Nervioso Central: Aspectos Experimentales y Clínicos, 9–12.
- Rodríguez, T. (2017). *Caracterización de neuronas hipocámpales de rata a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)*. Universidad Icesi.
- Szczurowska, E., & Mareš, P. (2013). NMDA and AMPA Receptors : Development and Status Epilepticus. *Physiol Res*, 62(Suppl 1), 21–38. Retrieved from www.biomed.cas.cz/physiolres
- Whitehead, G., Regan, P., Whitcomb, D. J., & Cho, K. (2017). Ca²⁺-permeable AMPA receptor: A new perspective on amyloid-beta mediated pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 112, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.022>
- World Health Organization. (2006). Neurological disorders: a public health approach. *Neurological Disorders: Public Health Challenges.*, 41–176. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2007.19>

Anexos

Anexo 1. Prueba de Normalidad Glutamato 0,5 horas

Prueba de Normalidad Glutamato 0,5 horas						
	No Tratadas	Triton 0.1%	Vehículo	Glu 5 μ M	Glu 50 μ M	Glu 500 μ M
Number of values	4	4	4	8	7	7
Minimum	0,206	0,046	0,16	0,142	0,14	0,145
25% Percentile	0,208	0,04625	0,1653	0,175	0,162	0,148
Median	0,2205	0,0505	0,1865	0,218	0,207	0,169
75% Percentile	0,2533	0,06525	0,222	0,234	0,259	0,177
Maximum	0,262	0,069	0,232	0,236	0,261	0,197
Mean	0,2273	0,054	0,1913	0,2063	0,2116	0,1669
Std. Deviation	0,02473	0,01061	0,03024	0,03485	0,04959	0,0178
Std.Error of Mean	0,01237	0,005307	0,01512	0,01232	0,01874	0,006727
Lower 95% CI of mean	0,1879	0,03711	0,1431	0,1771	0,1657	0,1504
Upper 95% CI of mean	0,2666	0,07089	0,2394	0,2354	0,2574	0,1833
Skewness	1,324	1,405	0,87	-1,189	-0,3183	0,4619
Kurtosis	1,587	1,5	1,344	0,1831	-1,694	0,1436
Sum	0,909	0,216	0,765	1,65	1,481	1,168
Shapiro-Wilk normality test						
W	0,9006	0,8522	0,96	0,8347	0,8779	0,9547
P value	0,434	0,2332	0,7788	0,0664	0,2171	0,7724
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Anexo 2. Prueba de Normalidad Glutamato 2,0 horas

Prueba de Normalidad Glutamato 2,0 horas						
	No Tratadas	Triton 0.1%	Vehículo	Glu 5 μ M	Glu 50 μ M	Glu 500 μ M
Number of values	4	4	4	8	8	8
Minimum	0,147	-0,008	0,078	0,094	0,034	0,035
25% Percentile	0,1635	-0,006	0,0815	0,1055	0,0555	0,048
Median	0,25	0,0045	0,0955	0,1465	0,0705	0,058
75% Percentile	0,2968	0,018	0,1065	0,197	0,12	0,07325
Maximum	0,3	0,021	0,109	0,204	0,185	0,105
Mean	0,2368	0,0055	0,0945	0,1501	0,088	0,06238
Std. Deviation	0,07105	0,01245	0,01303	0,04454	0,04886	0,02134
Std. Error of Mean	0,03553	0,006225	0,006513	0,01575	0,01727	0,007545
Lower 95% CI of mean	0,1237	-0,01431	0,07377	0,1129	0,04716	0,04453
Upper 95% CI of mean	0,3498	0,02531	0,1152	0,1874	0,1288	0,08022
Skewness	-0,6625	0,3938	-0,4127	0,00901	1,196	1,054
Kurtosis	-2,044	-0,7355	0,2533	-1,93	1,191	1,648
Sum	0,947	0,022	0,378	1,201	0,704	0,499
Shapiro-Wilk normality test						
W	0,911	0,9874	0,9919	0,8956	0,8984	0,9359
P value	0,4877	0,9439	0,967	0,2635	0,2793	0,5715
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Anexo 3. Análisis Glutamato 0.5 horas

Conjunto de datos analizados C: Vehículo D: Glu 5 µM E: Glu 50 µM F: Glu 500 µM

ANOVA summary	
F	2,243
P value	0,1117
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No
R square	0,2342

Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	2,008 (3, 22)
P value	0,1422
P value summary	ns
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No

Bartlett's test	
Bartlett's statistic (corrected)	5,193
P value	0,1582
P value summary	ns
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0,008534	3	0,002845	F (3, 22) = 2,243	P=0,1117
Residual (within columns)	0,0279	22	0,001268		
Total	0,03644	25			

Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	26

Anexo 4. Análisis Glutamato 2.0 horas

Conjunto de datos analizados C: Vehículo D: Glu 5 µM E: Glu 50 µM F: Glu 500 µM

ANOVA summary	
F	7,625
P value	0,0009
P value summary	***
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0,488

Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	2,425 (3, 24)
P value	0,0904
P value summary	ns
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No

Bartlett's test	
Bartlett's statistic (corrected)	7,877
P value	0,0486
P value summary	*
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0,03269	3	0,0109	F (3, 24) = 7,625	P=0,0009
Residual (within columns)	0,03429	24	0,001429		
Total	0,06698	27			

Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	28

Anexo 5. Prueba de Dunnet Glutamato 0.5 h

Número de familias 1
 Número de comparaciones por familia 3
 Alfa 0,05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	C-?	
Vehículo vs. Glu 5 μ M	-0,015	-0,07001 to 0,04001	No	ns	0,8323	D	Glu 5 μ M
Vehículo vs. Glu 50 μ M	-0,02032	-0,07662 to 0,03598	No	ns	0,6922	E	Glu 50 μ M
Vehículo vs. Glu 500 μ M	0,02439	-0,03191 to 0,08069	No	ns	0,5698	F	Glu 500 μ M

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Vehículo vs. Glu 5 μ M	0,1913	0,2063	-0,015	0,02181	4	8	0,6878	22
Vehículo vs. Glu 50 μ M	0,1913	0,2116	-0,02032	0,02232	4	7	0,9104	22
Vehículo vs. Glu 500 μ M	0,1913	0,1669	0,02439	0,02232	4	7	1,093	22

Anexo 6. Prueba de Dunnet Glutamato 2,0 horas

Número de familias 1
 Número de comparaciones por familia 3
 Alfa 0,05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	C-?	
Vehículo vs. Glu 5 μ M	-0,05563	-0,1137 to 0,002404	No	ns	0,0622	D	Glu 5 μ M
Vehículo vs. Glu 50 μ M	0,0065	-0,05153 to 0,06453	No	ns	0,9846	E	Glu 50 μ M
Vehículo vs. Glu 500 μ M	0,03213	-0,0259 to 0,09015	No	ns	0,386	F	Glu 500 μ M

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Vehículo vs. Glu 5 mM	0,0945	0,1501	-0,05563	0,0232	4	8	2,403	24
Vehículo vs. Glu 50 mM	0,0945	0,088	0,0065	0,0232	4	8	0,2808	24
Vehículo vs. Glu 500 mM	0,0945	0,06238	0,03213	0,0232	4	8	1,388	24

Anexo 7. Análisis estadístico Gria1

Tabla de Análisis Gria1	
Column B	Glutamato (50 mM)
vs.	vs,
Column A	Vehículo
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0,5
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	5 , -1
Sum of signed ranks (W)	4
Number of pairs	3
Median of differences	
Median	0,471
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0,5
P value (one tailed)	0,5
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

Anexo 8. Análisis estadístico Gria2

Tabla de Análisis Gria2	
Column B	Glutamato (50 mM)
vs.	vs,
Column A	Vehículo
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0,25
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	6 , 0
Sum of signed ranks (W)	6
Number of pairs	3
Median of differences	
Median	0,317
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	-0,866
P value (one tailed)	0,3333
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No