Evaluación de la expresión de genes GRIN2A y GRIN2B en neuronas hipocampales de rata expuestas a concentraciones excitotóxicas de glutamato relacionadas con la enfermedad de Alzheimer

Maria Camila Aljure Alvear

Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales,
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Cali

2017

Evaluación de la expresión de genes GRIN2A y GRIN2B en neuronas hipocampales de rata expuestas a concentraciones excitotóxicas de glutamato relacionadas con la enfermedad de Alzheimer

Maria Camila Aljure Alvear

Trabajo de grado para optar al titulo de pregrado en Química Farmacéutica

Tutor : Alvaro Andrés Barrera Ocampo, PhD.

Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales,
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Cali

2017

Aprobado por :

Julián Arbey González Ospina

Evaluador

Álvaro Andrés Barrera Ocampo

Director del Proyecto

Santiago de Cali, 29 de noviembre de 2017

AGRADECIEMIENTOS

Agradezo profundamente al Profesor Alvaro Andres Barrera por permitirme hacer parte de su equipo de trabajo, por apoyarme en todo momento durante la relizacion de este mismo, por su conocimiento y su gran carácter.

Agradezco tambien a mi madre y hermana porque siempre han estado conmigo en todo momento, apoyandome, guiandome, amandome y brindandome su apoyo moral durante mi proceso, ellas son mi fuente de insporacion para todo en mi vida.

Agradezco a mi Tio Miguel que se conviertio en mi Angel de la guarda y esta siempre conmigo, gracias por tu apoyo incondicional.

Agradezco a Isabella Palacio y Daniela Montes por su lealtad conmigo y su paciencia.

Agradezco a todos mis compañeros por permitirme ser quien soy, por brindarme espacios de tranquilidad y confianza, especialmente a mis queridos amigos Bryan, Karen, Daniela,Camila, Jimena, Sara, Jessica, Maria constanza por su honestidad, por apoyarme durante mi proceso, por sus conocimientos y sus maneras de ser comigo.

Agradezco a Steven Alexander David Jimenez por ayudarme a llevar a cabo la realizacion de mi trabajo.

Agradezco a Dios y a la Virgen Maria por no dejarme caer y por darme fuerzas para culminar con mi proceso.

Finalmente gracias a todos los que hicieron parte de este gran logro, gracias por ayudarme a crecer como persona y porque este proyecto concluyó de una manera exitosa.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN DEL PROYECTO 9
ABSTRACT 10
1. INTRODUCCIÓN 11
2. DESCRIPCION DEL TRABAJO 12
2.1. Planteamiento y justificación del problema 12
2.2. Marco Teórico y estado del arte 14
2.2.1. La Enfermedad de Alzheimer: 14
2.2.2. El hipocampo en la EA: 15
2.2.3. Excitotoxicidad del glutamato en EA: 15
2.2.4. Glutamato y NMDAR 16
2.3. OBJETIVOS 20
2.3.1. Objetivo general 20
2.3.2. Objetivos específicos 20
2.4. METODOLOGÍA 21
2.4.1. Cultivos primarios de neuronas hipocampales 21
2.4.2. Inducción de excitotoxicidad con glutamato 21
2.4.3. Evaluación de la viabilidad celular con MTT 21
2.4.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA 22
2.4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 23
2.4.6. Densitometría y análisis estadístico 23
2.5. RESULTADOS 25
2.6. DISCUSIÓN 29
2.7. CONCLUSIONES 32
2.8. RECOMENDACIONES 33
2.9. REFERENCIAS 34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones para la síntesis de cDNA. 22
Tabla 2. Condiciones para la PCR. 23
Tabla 3. Primers a utilizar en la PCR. 23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sinapsis de glutamato 17
Figura 2. Complejo de señalización NMDAR macromolecular en las sinapsis excitatorias. 18
Figura 3. Ensayo de excitotoxicidad por glutamato y evaluación de la viabilidad celular. 25
Figura 4. Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes GRIN2A, GRIN2B y βIII-Tubulina. Electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, corridos con un voltaje de 120 V durante 100 min 27
Figura 5. Expresión de los genes de estudio en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata con el tiempo y la concentración de glutamato estandarizada 28

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aprobación comité de ética Universidad Icesi 36
Anexo 2. Matriz de Marco Lógico 37
Anexo 3. Análisis Estadístico 39

RESUMEN DEL PROYECTO

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en el adulto. La demencia, está asociada al deterioro progresivo de las funciones superiores, caracterizándose por la pérdida de la memoria y otras funciones cognitivas como el habla, el lenguaje, el razonamiento, el juicio y el pensamiento. La alteración de estas funciones, interfiere con la realización de actividades cotidianas. Los marcadores histológicos más importantes de EA son las placas β-amiloide que son agregados generados de manera extracelular y los ovillos neurofibrilares (NFT), que son agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada. Sin embargo, estos no son los únicos eventos patológicos que ocurren en la enfermedad.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC), siendo además el más abundante. Está involucrado en muchas funciones del cerebro, entre ellas la cognición, la plasticidad sináptica y la formación de la memoria dependiente de la potenciación a largo plazo (LTP). Estas funciones se ven afectadas por elevadas concentraciones de este neurotransmisor debido a una perturbación en su equilibrio homeostático generando un efecto excitotóxico. La excitotoxicidad genera muerte neuronal y afecta la plasticidad sináptica, lo que contribuye al desarrollo de la fisiopatología presente en la EA.

Por tal razón, este proyecto evaluó si concentraciones elevadas de glutamato tienian efecto excitotóxico sobre neuronas hipocampales. Para esto se analizó la expresión de los genes GRIN2A y GRIN2B que codifican las subunidades GluN2A y GluN2B de NMDAR, exponiendolos a concentraciones subtóxicas de este neurotransmisor por un tiempo determinado, 50 μM y 0.5 horas respectivamente, dando como resultado que bajo estas condiciones, que el gen GRIN2B tiene una tendencia a incrementar su expresión en comparación con el gen GRIN2A.

Palabras clave: Glutamato, Hipocampo, Receptor N-metil-D-aspartato, subunidad GluN2A, subunidad GluN2B.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AE) is the most common form of adult dementia. Dementia is associated with the progressive deterioration of the upper functions, characterized then by memory loss and other cognitive functions such as speech, language, reasoning, judgment and thought. The alteration of these functions interferes with the accomplishment of daily activities. The most important histological markers of EA are β-amyloid plaques that are aggregates generated in an extracellular way and neurofibrillary tangles (NFT), which are intracellular aggregates of the hyperphosphorylated tau protein. However, these are not the only pathological events that occur in the disease.

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter of the CNS and is also the most abundant. It is involved in many functions of the brain, including cognition, synaptic plasticity and the formation of memory dependent on long-term potentiation (LTP). These functions are affected by high concentrations of this neurotransmitter due to a disturbance in its equilibrium homeostatic generating an excytotoxic effect. Excytoxicity generates neuronal death and affects synaptic plasticity, which contributes to the development of the pathophysiology present in the AE.

For this reason, this project evaluated whether high concentrations of glutamate had an excitotoxic effect on hippocampal neurons. For this, the expression of the GRIN2A and GRIN2B genes encoding the GluN2A and GluN2B subunits of NMDAR was analyzed, exposing them to subtoxic concentrations of this neurotransmitter for a determined time, 50 μM and 0.5 hours respectively, resulting in that under these conditions, the GRIN2B gene has a tendency to increase its expression compared to the GRIN2A gene.

Keywords: glutamate, hippocampus, N-methyl-D-aspartate Receptor, subunit GluN2A, subunit GluN2B.

1. INTRODUCCIÓN

La EA puede definirse como un padecimiento neurodegenerativo del SNC y está caracterizado por un deterioro progresivo de las funciones cerebrales superiores (Guimerà et al., 2002). Esta enfermedad se ha convertido en un problema muy grande de salud pública en todo el mundo, siendo una de las enfermedades con mayor impacto social y económico para los grupos familiares.

La Organización Mundial de la Salud ha establecido que en todo el mundo existen 47,5 millones de personas que padecen demencia y cada año se registran 7,7 millones de casos nuevos (OMS, 2010). La supervivencia media de esta enfermedad desde el diagnóstico hasta la muerte es de 10.3 años, dependiendo de los cuidados recibidos y de que tan rápido avanzan los diversos procesos patológicos en el paciente (Barrera- ocampo, 2017).

La fisiopatologia de la EA es compleja y esta asociada a varios mecanismos, uno de ellos es la excitotoxicidad inducida por glutamato, que es el principal neurotransmisor del SNC. Los receptores de glutamato están distribuidos por todo el sistema nervioso, encargándose de la gran mayoría de transmisiones sinápticas excitatorias en el cerebro y la médula espinal, entre ellos se encuentran los NMDAR que son clasificados como receptores ionotrópicos (Marco et al., 2011). Bajo condiciones fisiológicas normales, los NMDAR sinápticos (NMDARs) son más activos, pero en episodios patológicos como la EA se reduce la actividad de estos y se aumenta la actividad en lugares extrasinápticos (NMDARe) (Lau et al., 2007).

Actualmente, no existe claridad completa sobre los mecanismos moleculares que conlleva esta enfermedad y el papel que tiene el glutamato sobre la sobreexitación de los NMDAR. Por ello, se analizó la expresión de los genes GRIN2A y GRIN2B que codifican las subunidades GluN2A y GluN2B de NMDAR, con el fin de identificar si existe alguna variación de expresión génica en el hipocampo cuando se exponen a concentraciones elevadas de glutamato.

2. DESCRIPCION DEL TRABAJO

2.1. Planteamiento y justificación del problema

La Organización Mundial de la Salud ha establecido que en todo el mundo existen 47,5 millones de personas que padecen demencia, y cada año se registran 7,7 millones de casos nuevos (OMS, 2010). La EA es la forma de demencia más común, ya que se estima que representa entre el 60% y el 80% de los casos. Esta enfermedad, está caracterizada por un deterioro cognitivo leve en la etapa temprana de la enfermedad, causada por una neurodegeneración progresiva la cual evoluciona y culmina con la muerte. La supervivencia media de esta enfermedad desde el diagnóstico hasta la muerte es de 10.3 años, dependiendo de los cuidados recibidos y de que tan rápido avanzan los diversos procesos patológicos en el paciente (Barrera- ocampo, 2017).

En esta enfermedad existen dos variantes; una es de herencia autosómica dominante, conocida como EA familiar (EAF) , esta caracterizada por presentar un inicio temprano y un desarrollo en personas menores de 65 años de edad, además presenta una prevalencia del 5%. Por otro lado, la EA esporádica (EAE) no tiene un patrón de herencia, se presenta en personas mayores de los 65 años y representa una mayor prevalencia correspondiente al 95% (Barrera- ocampo, 2017).

Son muchos los factores implicados en la EA, sin embargo, la mayoría de los casos han sido diagnosticados en pacientes de edad avanzada, por encima de los 60 años (Moisés De La Serna, 2015), afectando al 2% de la población mayor de 65 años y al 25% de la población mayor de 90 años (ciencias medicas y nutrición Salvador Zubirán, 2008). Por consiguiente, el principal factor de riesgo de la EA es la edad (Querfurth et al.,2010).

El informe mundial sobre la EA del 2009, estimo que 35,6 millones de personas en todo el mundo padecerían de demencia en 2010 y que cada 20 años se duplicaría esta cifra hasta llegar a los 65,7 millones en 2030 y los 115,4 millones en 2050 (Honyashiki., 2009). En el informe mundial sobre Alzheimer de 2015 hubo un aumento de un 12%-13% más que en el 2009, se estimó que 46.8 millones de personas tenían demencia y se espera que esta cifra se duplique cada 20 años, alcanzando los 74.7 millones en el 2030 y los 131.5 millones en el 2050 (Martin, 2015). Por esta razón, la demencia es uno de los problemas más impactantes a nivel mundial y evidentemente va aumentando paulatinamente a medida que la población mundial envejece (OMS, 2010).

Hasta el momento no existe cura alguna o un tratamiento eficiente que modifique la progresión del deterioro neuronal causado por la EA. No obstante, la FDA (Food and Drug Administration, EE.UU.) (Cabrera et al., 2014) y la EMEA (Agencia Europea de Medicamentos) ha aprobado algunos medicamentos para el tratamiento sintomático de la EA, entre ellos están: los inhibidores de la acetilcolinesterasa (donepecilo, rivastigmina y galantamina) y el antagonista de los NMDAR (memantina). Los primeros han demostrado una mejoría clínica sobre el comportamiento, la cognición, y actividades de la vida diaria, aunque con un bajo efecto. Por otro lado, la memantina se ha utilizado en la enfermedad moderada-severa, mostrando una pequeña mejoría en las actividades de la vida diaria. Ambos son bien tolerados (Llanero et al.,2011).

La EA se ha convertido en un problema muy grande de salud pública en todo el mundo y además es una de las enfermedades con mayor impacto social y económico para los grupos familiares, el sistema de salud y lo más importante para las personas que la padecen disminuyendo su calidad de vida (Sánchez et al., 2010). Todas las cifras mencionadas, entre otras, apuntan a que la EA será una potente pandemia en el siglo XXI por lo que es un campo de investigación que ha recibido mucha atención (Folch et al., 2015).

Muchas funciones del cerebro, entre ellas la cognición y la memoria, se ven afectadas por elevadas concentraciones de glutamato. Varias investigaciones indican que elevadas concentraciones de este neurotransmisor del SNC, tiene un efecto excitotóxico generando muerte neuronal y afectando la plasticidad sináptica. El NMDAR, es un receptor ionotrópico controlado por el glutamato que media la neurotransmisión rápida excitatoría y desempeña un papel fundamental en la plasticidad sináptica, especialmente en la potenciación a largo plazo (LTP) que al parecer es uno de los mecanismos a través de los cuales se forma la memoria (Havekes et al., 2009).

Este proyecto podrá contribuir a la investigación científica generando nuevo conocimiento acerca de mecanismos moleculares relacionados con los NMDAR, específicamente estableciendo si concentraciones elevadas de glutamato tienen efecto excitotóxico sobre neuronas hipocampales de rata y cómo este neurotransmisor se ve involucrado en la vulnerabilidad de neuronas de esta región del cerebro. Para esto, se analizará la expresión de los genes GRIN2A y GRIN2B que codifican las subunidades GluN2A y GluN2B de NMDAR con el fin de identificar si existe alguna variación de expresión génica en el hipocampo. El estudio de estos mecanismos permitirá conocer mejor la EA y así diseñar estrategias terapéuticas que mejoren la calidad de vida de los pacientes que la padecen.

2.2. Marco Teórico y estado del arte

2.2.1. La Enfermedad de Alzheimer:

La EA puede definirse como un padecimiento neurodegenerativo del sistema nervioso central y está caracterizado por un deterioro progresivo de las funciones cerebrales superiores (Guimerà et al., 2002), además es la forma más frecuente de demencia de inicio en el adulto (Alzheimer Association, 2016). La demencia está asociada al deterioro progresivo de las funciones superiores, caracterizándose entonces por la pérdida de la memoria y otras funciones cognitivas como el habla, el lenguaje, el razonamiento, el juicio y el pensamiento. La alteración de estas funciones interfiere con la realización de actividades cotidianas (Martin, 2015).

La EA 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 (Budson et al., 2011). Sin embargo, esta última presenta a su vez tres etapas que traerán cambios en la vida de la persona y de su familia: la etapa temprana o “fase inicial”, la etapa media y la etapa tardía o “avanzada”. La primera se refiere a las personas de cualquier edad que tienen un leve deterioro, los síntomas más comunes incluyen falta de memoria, dificultades de comunicación, y los cambios en el estado de ánimo y el comportamiento, en esta etapa las personas conservan muchas de sus capacidades funcionales y requieren un mínimo de ayuda. La segunda etapa, aporta un mayor deterioro de las capacidades cognitivas y funcionales de la persona, tales como la memoria y otras habilidades cognitivas seguirán deteriorándose, a pesar de que el paciente todavía puede tener un cierto conocimiento de su condición. En la tercera etapa, la persona se vuelve incapaz de comunicarse verbalmente o cuidar de sí mismos, por lo tanto requiere de atención las 24 horas (Canada Society, 2016).

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 del 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, la transmisión sináptica, y un incremento en el número y actividad de los astrocitos (Budson et al., 2011).

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, 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 et al., 2011).

2.2.2. El hipocampo en la EA:

El hipocampo es la parte del cerebro encargada del aprendizaje, la memoria y el procesamiento espacial. En la EA el hipocampo es una de las primeras partes que se ve afectada, generando cambios en mecanismos moleculares importantes de la plasticidad sináptica y la formación de la memoria dependiente de LTP.

El hipocampo se divide en dos regiones principales: el giro dentado (DG), compuesto principalmente por células granulares, y el cuerno de Amón, formado por neuronas piramidales excitatorias que puede dividirse en sub-regiones CA1, CA2 y CA3. Cada una de estas poblaciones neuronales se puede distinguir en base a la morfología, la conectividad y las propiedades electrofisiológicas. Las neuronas excitatorias en cada subregión del hipocampo son también molecularmente distintas (Barrera- ocampo, 2017).

2.2.3. Excitotoxicidad del glutamato en EA:

La excitotoxicidad está vinculada a varios trastornos neurodegenerativos, entre ellos la EA. Este proceso se lleva a cabo debido a la sobreexcitación causada por glutamato. Cuando esto ocurre se promueve el fallo de la enzima sodio-potasio ATPasa de la membrana plasmática, la inversión del funcionamiento de los transportadores de glutamato, y el final de la conversión glutamato-glutamina en los astrocitos. Estos fenómenos provocan el aumento de glutamato en el medio extracelular, generando la sobreactivación de receptores ionotrópicos con entrada de sodio, potasio y calcio, en consecuencia a esto se da una despolarización prolongada de la neurona lesionada, la liberación del glutamato vesicular, la estimulación de canales de calcio voltaje-dependientes y NMDAR, el mayor ingreso de calcio en la neurona y la movilización de sus depósitos celulares. La falla de todos esos procesos genera una acumulación excesiva de glutamato fuera de la célula y calcio dentro de ella, con lo que se inicia un proceso tóxico que puede propagarse y perpetuarse. La presencia de calcio en las células es necesaria para muchas funciones, pero cantidades excesivas pueden provocar daños neuronales. Se han identificado dos componentes en la toxicidad inducida por glutamato. El efecto más precoz, reversible, es el edema celular, resultante de

la acumulación de sodio, cloro y agua, y el segundo, más tardío, la degeneración y muerte neuronal causadas por sobrecarga de calcio intracelular, secundaria a la activación de receptores ionotrópicos, principalmente NMDAR (Gazulla et al., 2006).

Investigaciones recientes han postulado que la muerte neuronal selectiva en la EA está involucrada directamente con la sobre activación de los NMDAR, ya que estimula la producción del péptido Aβ (Aβ). El exceso de Aβ deriva en neurotoxicidad por estrés oxidativo. La depresión sináptica por la excesiva cantidad del péptido Aβ puede contribuir al deterioro cognitivo durante la EA temprana (Butterfield et al., 2003).

2.2.4. Glutamato y NMDAR

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, se encarga de muchas funciones del cerebro entre ellas la cognición, la plasticidad sináptica y la formación de la memoria dependiente de LTP. El glutamato puede ser sintetizado a través del ciclo de Krebs o ser reciclado por el ciclo astrocito-neuronal, glutamato-glutamina. En el ciclo glutamato-glutamina, el glutamato después de ser liberado presinápticamente es absorbido por astrocitos circundantes, donde se convierte en glutamina, un aminoácido no neuroexcitatorio, y se transfiere a las neuronas para su conversión en glutamato. Posteriormente, el glutamato se empaqueta en vesículas sinápticas por transportadores de glutamato vesicular (vGLUT) (Rudy et al., 2015), este proceso es dependiente de ATP y magnesio. Tras su encapsulación, se promueve la liberación de glutamato en la sinapsis a través de un mecanismo dependiente de la concentración intracelular de calcio mediante un proceso de exocitosis, para interactuar con sus receptores específicos (Flores-Soto et al., 2012).

Los receptores de glutamato están distribuidos por todo el sistema nervioso, encargándose de la gran mayoría de transmisiones sinápticas excitatorias en el cerebro y la médula espinal, estos se clasifican en ionotrópicos y metabotrópicos. Los primeros están involucrados en la neurotransmisión rápida en el SNC, y en función de su agonista activador pueden clasificarse en tres tipos: receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspártico), receptores AMPA (ácido α- amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores de kainato. Los receptores ionotrópicos forman canales catiónicos que permiten el paso selectivo de iones como sodio, potasio ó calcio, produciendo finalmente la despolarización de la neurona (Marco et al., 2011). Por otro lado, los receptores metabotrópicos, están acoplados a proteínas G y se dividen en tres grupos, según la combinación de subunidades,

además son capaces de modular la actividad de segundos mensajeros celulares, como fosfatidilinositol y nucleótidos cíclicos (Gazulla et al., 2006)

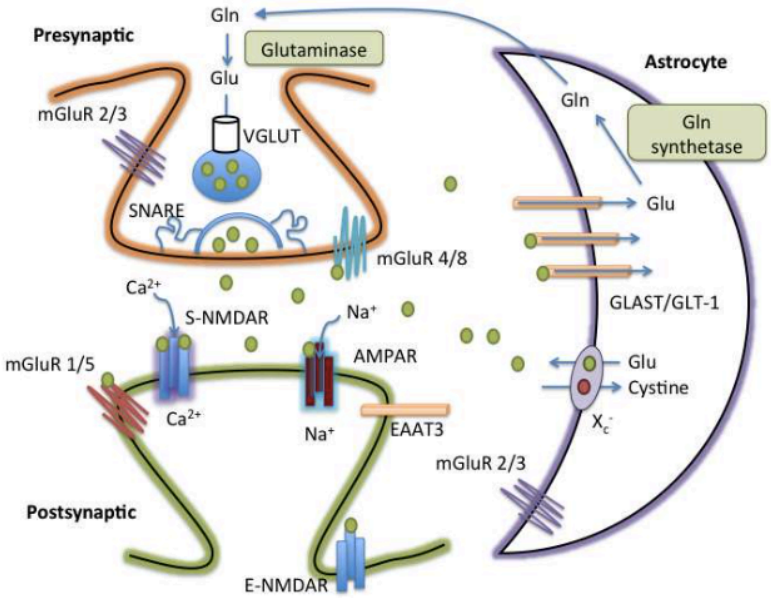

Figura 1. Sinapsis de glutamato. En la neurona presináptica, la glutamina (Gln) se convierte en glutamato (Glu) por glutaminasa y es encapsulado en vesículas sinápticas por el transportador de glutamato vesicular (VGLUT). Proteínas complejas como SNARE median la fusión de vesículas con la membrana presináptica. Tras la liberación en el espacio extracelular, el glutamato se une a sus receptores específicos. El glutamato es eliminado del espacio sináptico a través de transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs) en astrocitos vecinos (GLAST y GLT-1) y, en menor medida, en neuronas (EAAT3). El glutamato se convierte en glutamina por glutamina sintetasa dentro del astrocito antes de ser transportado a neuronas presinápticas, completando así el ciclo glutamato-glutamina. Tomado de: (Rudy et al., 2015).

Los NMDAR son fundamentales en la regulación de la función sináptica en el SNC, ya que, tienen un papel importante en la mediación de plasticidad sináptica y neuronal. Son canales heteroméricos compuestos por subunidades que se ensamblan en el retículo endoplásmico para formar receptores funcionales con diferentes factores fisiológicos y farmacológicos, este siempre requiere de glutamato y glicina para su activación y para poder permitir el paso de iones de calcio a través del canal iónico. Las subunidades que lo componen son GluN1, GluN2A-D y GluN3A-B. Aunque la mayoría de los NMDAR están compuestos por las subunidades GluN1/GluN2, este proyecto de investigación se va a centrar en el estudio de las subunidades GluN2A y GluN2B. En el prosencéfalo las subunidades GluN2A y GluN2B son las más abundantes. Durante el desarrollo postnatal se producen cambios de expresión de GluN2A en comparación con GluN2B, investigaciones recientes indican que esto se debe a la actividad cortical y las cascadas intracelulares. En la corteza de roedores adultos predominan los

GluN2A en lugares sinápticos mientras que los GluN2B lo hacen en lugares extrasinápticos. La subunidad GluN2A tiene una cinética rápida, los receptores que la contienen se encuentran ligeramente abiertos pero se abren completamente una vez se libera el glutamato, mientras que la subunidad GluN2B, confiere una cinética al canal más lenta, presentan baja probabilidad de apertura, tienen una alta afinidad por el glutamato y una alta permeabilidad al calcio (Ref). Los NMDAR más activos bajo condiciones fisiológicas son los NMDAR sinápticos (NMDARs), pero en episodios patológicos como la EA se reduce la actividad de estos y se aumenta la actividad en lugares extrasinápticos (NMDARe). Los NMDARe comprometen el potencial de membrana mitocondrial, promueven una sobrecarga de calcio y favorecen la hiperfosforilación de tau, contribuyendo así al proceso de neurodegeneración (Lau et al., 2007).

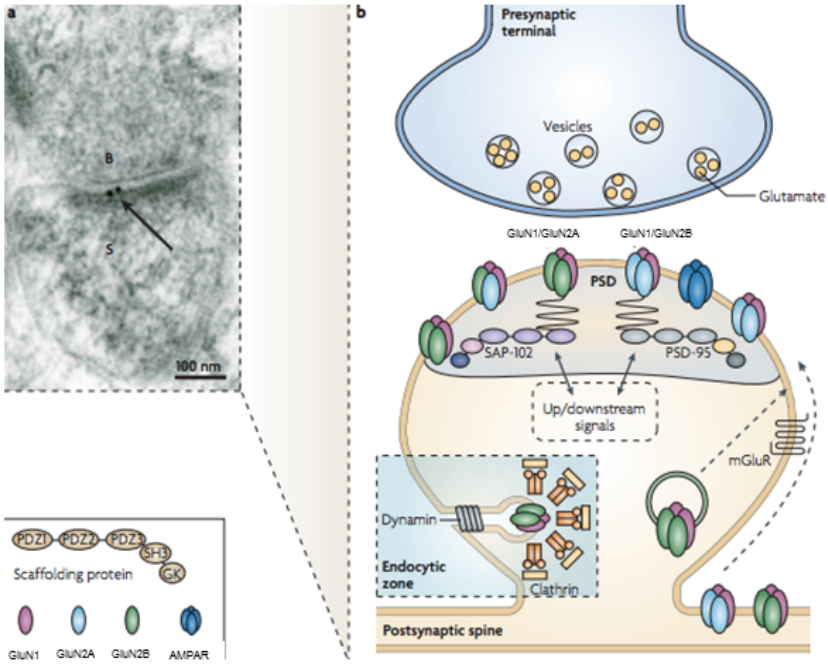

Figura 2. Complejo de señalización NMDAR macromolecular en las sinapsis excitatorias. a) Micrografía electrónica mostrando la localización de las subunidades GluN2A en la densidad postsináptica (PSD) en espinas dendríticas (S) en la subregión CA1de el hipocampo. La flecha en la imagen indica moléculas de GluN2A marcadas con partículas de oro. **b)** Los NMDAR sinápticos y AMPAR están ubicados en el PSD (zona gris) donde se encuentran organizados estructuralmente y comprende grandes complejos de andamios y proteínas adaptadoras. Los compuestos predominantes en la sinapsis madura son los NMDAR conformados por GluN1/ GluN2A o GluN1/GluN2A/GluN2B, estas subunidades que están asociadas con las proteínas de soporte PSD de 95 kDa (PSD-95) y proteína asociada con la sinapsis de 102 kDa (SAP-102). Estas proteínas de soporte son importantes en la regulación del número NMDAR y la función en los sitios sinápticos. Tomado de: (Lau et al., 2007).

El péptido Aβ tiene una estrecha relación con los NMDAR desajustando el balance de NMDARs y NMDARe a nivel postsináptico. El Aβ genera la

internalización de NMDARs a través de la activación de la proteína fosfatasa 2B (PP2B) y aumenta la endocitosis de estos generando una disminución de la expresión génica de supervivencia celular. El Aβ aumenta la proporción de NMDARe y reduce NMDARs. En estudios recientes se ha observado que los NMDARe tienen una relación directa en la patogénesis de la EA, pues su excesiva estimulación aumenta la producción de Aβ (Lau et al., 2007) y (Mené, 2014).

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 GluN2A y GluN2B del receptor de NMDA en neuronas hipocampales de rata.

2.3.2. Objetivos específicos

- Estandarizar las concentraciones excitotóxicas de glutamato y el tiempo necesario para inducir la muerte celular en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata.

- Determinar las condiciones óptimas para la detección de los genes GRIN2A y GRIN2B mediante RT-PCR.

- Determinar la expresión de los genes GRIN2A y GRIN2B con las concentraciones de glutamato estandarizadas.

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 sacrificaron ratas recién nacidas (día postnatal P0 a P2). Posteriormente se hizo una fractura al cráneo con el propósito de extraer el cerebro, e inmediatamente se colocaron en un medio de disección frio que ayudo a prevenir la muerte celular de las neuronas mientras se diseco el hipocampo.

Las células se separaron del tejido y de la agregación entre ellas mismas, para lo cual se utilizo DNAsa (0,1 mg/mL) y tripsina (0.25%). Después se realizo el cultivo, para lo cual se colocaron las células en platos tratados con poli-L-lisina (1 mg/mL) para promover la adhesión celular, y se siembraron en medio mínimo esencial (MEM). Este además contenia glucosa (20 mM) como fuente de carbohidratos, piruvato de sodio (1 mM) y suero fetal bovino (10%).

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

2.4.2. Inducción de excitotoxicidad con glutamato

Las neuronas (2×10^5 células) se sembraron en platos de 96 pozos y después de 8 días in vitro, se trataron con vehículo (HBSS) y glutamato a diferentes concentraciones (5, 50 y 500 µM) incubándolas durante un tiempo establecido (0.5 – 2h) a 37°C y 5% de CO_2. Después de este tiempo se retiro 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 adiciono a los cultivos MTT (0,5 mg/mL), 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 incubarón los platos por cuatro horas a 37°C. Una vez realizada la incubación, se adiciono 50 µL de DMSO (100%) que se usó para disolver los cristales de formazán que se encontraban dentro de las células. Finalmente, se midio la absorbancia a 570 nm

para determinar la viabilidad celular y se comparo con un control que contenia Triton X-100 (0.1%) que produjo 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 realizo la extracción de RNA empleando el kit E.Z.N.A Total RNA (Omega BioTek) y se siguio el protocolo descrito por el fabricante para efectuar este procedimiento en células en cultivo.

Se tomaron aproximadamente de 1 x 10^6 células previamente tripsinizadas y se agregaron a un tubo de 1,5 mL para su lisis con 700 µL del buffer de lisis TRK. Se centrifugo a 10.000 x *g* durante 1 minuto. posteriormente, se aplico la muestra a una columna de RNA HiBind para luego centrifugar a 10.000 x *g* por 30 segundos. El lavado se realizo con 500 µL de buffer de lavado (RNA Wash Buffer II) pipeteando directamente sobre la columna, luego se centrifugo nuevamente a 10.000 x *g* durante 30 segundos, se descarto el sobrenadante. Se transfierio la columna a un tubo de 1,5 mL limpio y se le adiciono agua libre de nucleasas, se centrifugo a 13.000 x *g* por 2 minutos. La muestra se almaceno 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 µg 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 µL y se adicionan a la mezcla descrita en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones para la síntesis de cDNA.

RT-PCR [ ]f	1 Muestra (uL)
GS 1X Buffer	4,0
$MgCl_2$ (2,0 mM)	1,6
dNTPs (0,5 mM)	1,0
GS Rev Trans	1,0
H_2O	7,4
Total	15,0
RNA	5,0

2.4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR se tomaron 60 ng de cDNA sintetizado previamente y se adiciono 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 35 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 utilizados aparecen en la tabla 3.

Los fragmentos amplificados en la PCR se separaron en un gel de agarosa (1.5%) a 120 V por 90 min. Luego de esto los geles fueron fotografiados y a partir de estas imágenes se realizó el análisis densitométrico.

Tabla 2. Condiciones para la PCR.

PCR	1 Muestra (uL)
Buffer 10X	2,0
10 mM dNTPs	0,4
25 mM MgCl2	1,5
Fprimer	0,4
Rprimer	0,4
Taq	0,3
H2O	14,0
Total	19,0
Muestra	1,0

Tabla 3. Primers a utilizar en la PCR.

Proteína	Primer	Secuencia (5'…3')	Longitud (pb)	Tm (°C)
GluN2A	**Grin2a 2F**	ATACCGGCAGAACTCCACAC	20	60.00
GluN2A	**Grin2a 2R**	TCTTGCTGTCCTCCAGACCT	20	59.99
GluN2B	**Grin2b 1F**	CTGTACGACATCAGCGAGGA	20	60.01
GluN2B	**Grin2b 1R**	GTTGGCAAAGGAGCTCTCAC	20	60.00
βIII-Tubulina	**TUBB3 1 F**	TGAGGCCTCCTCTCACAAGT	20	59.99
βIII-Tubulina	**TUBB3 1 R**	TGCAGGCAGTCACAATTCTC	20	59.99

2.4.6. Densitometría y análisis estadístico

A partir de las fotografías de los geles se determino la intensidad de las bandas y esta se cuantifico con el programa ImageJ (NIH). Los valores de intensidad de cada gen se normalizaron con los valores de intensidad del gen de expresión constitutiva (βIII-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 $p<0.05$.

Ver Anexo 3. Matriz de Marco Lógico.

2.5. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el proyecto de investigación.

En primer lugar, se llevo a cabo el ensayo de excitotoxicidad con glutamato a diferentes concentraciones (figura 3). Para esto, las neuronas fueron sembradas en platos de 96 pozos y después de 8 días in vitro fueron tratadas con vehículo o glutamato (5 µM, 50 µM y 500 µM) por 0.5 h y 2.0 h. Después de este tiempo se retiro el tratamiento y se adiciono medio neurobasal suplementado. Las células tratadas con Triton X-100 0.1% y las no tratadas fueron usadas como control negativo y positivo, respectivamente. Después de 24 h se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular con MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Para esto, se adicionó medio fresco y 10 µL de la solución de MTT (12 mM). Posteriormente, Las células se incubaron a 37°C por 4.0 h, y luego, se retiró 85 µL de medio y se agregó 50 µL de DMSO. Finalmente, las células se incubaron nuevamente a 37°C por 10 min y luego se midió la absorbancia en un lector de platos a 570 nm.

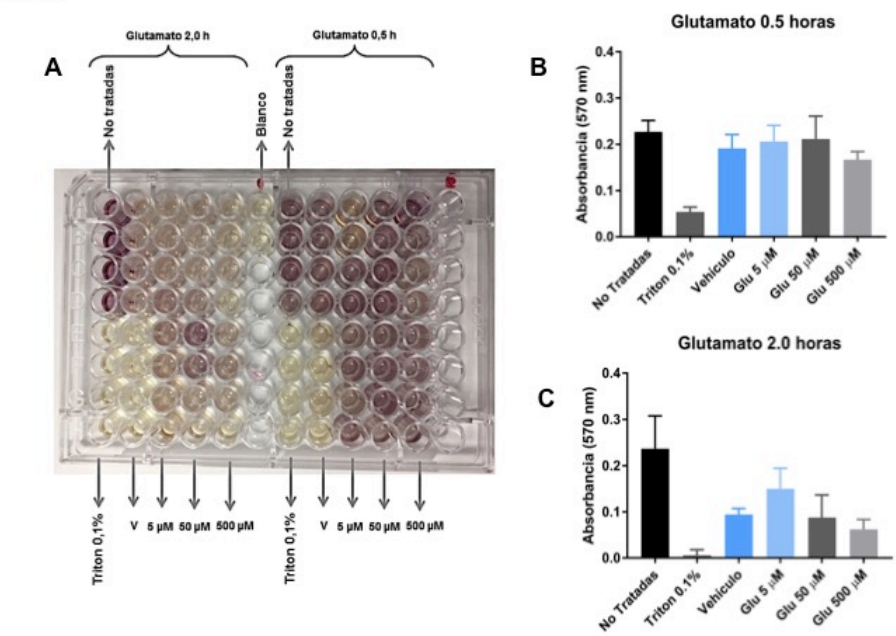

Figura 3. Ensayo de excitotoxicidad por glutamato y evaluación de la viabilidad celular. (A) Ensayo de viabilidad celular con MTT a 37°C **(B)** Histograma que representa la viabilidad celular después del tratamiento con glutamato por 0.5 horas **(C)** Histograma que representa la viabilidad celular después del tratamiento con glutamato por 2.0 horas.

En la Figura 3A, se puede observar el ensayo de viabilidad celular. Los resultados reflejan que la exposición de las neuronas hipocampales a diferentes concentraciones de glutamato durante 2.0 horas redujo la viabilidad de las células comparado con el mismo tratamiento llevado a cabo durante 0.5 horas. En la figura 3B,C, se observan los resultados obtenidos a partir de las mediciones de absorbancia.

El ANOVA mostró que, el resultado para 0.5 horas obtuvo un valor p=0,1117, lo que indica que no existen diferencias significativas entre la absorbancia de los tratamientos y el vehículo. En contraste, el tratamiento de 2.0 horas si mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados ya que el valor p=0.0009. De acuerdo con la prueba de Dunnett, se encontro que durante 0.5 horas de exposición (Vehículo vs. Glu 5 µM: p=0,8323; Vehículo vs. Glu 50 µM: p= 0,6922; Vehículo vs. Glu 500µM: p=0,5698), no existia diferencias significativas entre la absorbancia del vehiculo y de los tratamientos. simultaneamente, durante 2 horas, (Vehículo vs. Glu 5 µM: p=0,0622; Vehículo vs. Glu 50 µM: p=0,9846; Vehículo vs. Glu 500µM: p=0,386) tampoco se encontro diferencias entre la absorbancia de los tratamientos y el vehiculo. Sin embargo, en la figura 3 A,B, se evidencia que el tratamiento con 500µM obtuvo menor absorbancia que el vehiculo, por lo tanto a esta concentracion empieza a presentarse muerte celular.

En segundo lugar, se procedio a realizar la estandarización de los primers, para esto se llevó acabo la amplificacion de los genes de estudio mediante PCR, aplicando un gradiente para determinar la temperatura de alineamiento óptima (figuras 4A-D). En la figura 4D se muestra la electroforesis que confirma el resultado del proceso de estandarización de las condiciones de amplificación de cada gen. El rango de temperatura que se utilizo para el gen GRIN2A, GRIN2B y βIII-Tubulina fue de 55°C a 65°C. La banda mas limpia, es decir sin amplificaciones inespecificas, se mostró a la temperatura de 61.3°C para el gen GRIN2A, 65.0°C para GRIN2B y 57.0°C para βIII-Tubulina. Por esta razón, se tomaron estas como las temperaturas de estandarizacion de los primers.

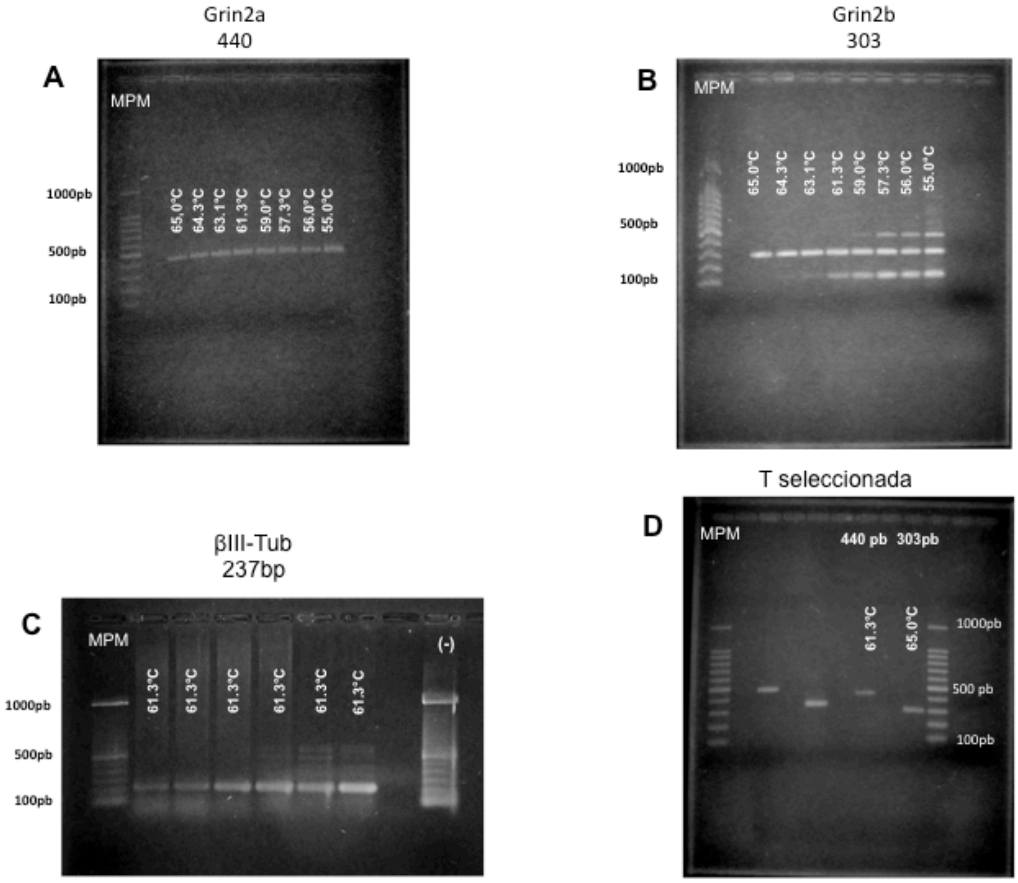

Figura 4. Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes GRIN2A, GRIN2B y βIII-Tubulina. Electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, corridos con un voltaje de 120 V durante 100 min A) electroforesis a partir de las cuales se obtuvo la temperatura óptima de alineamiento del gen GRIN2A. B) electroforesis a partir de las cuales se obtuvo la temperatura óptima de alineamiento del gen GRIN2B. C) electroforesis a partir de las cuales se obtuvo la temperatura óptima de alineamiento de βIII-Tubulina. D) electroforesis en gel de agarosa que reúne los resultados del proceso de estandarización.

Teniendo estas condiciones se procedió al análisis de los genes de estudio, para esto, se llevó a cabo la amplificación de cada uno de los genes mencionados anteriormente y mediante un análisis densitométrico (Image J) se determinaron los niveles de expresión relativa de cada gen (Figura 5). Estos valores fueron posteriormente normalizados con respecto a los niveles de expresión del gen constitutivo βIII-Tubulina.

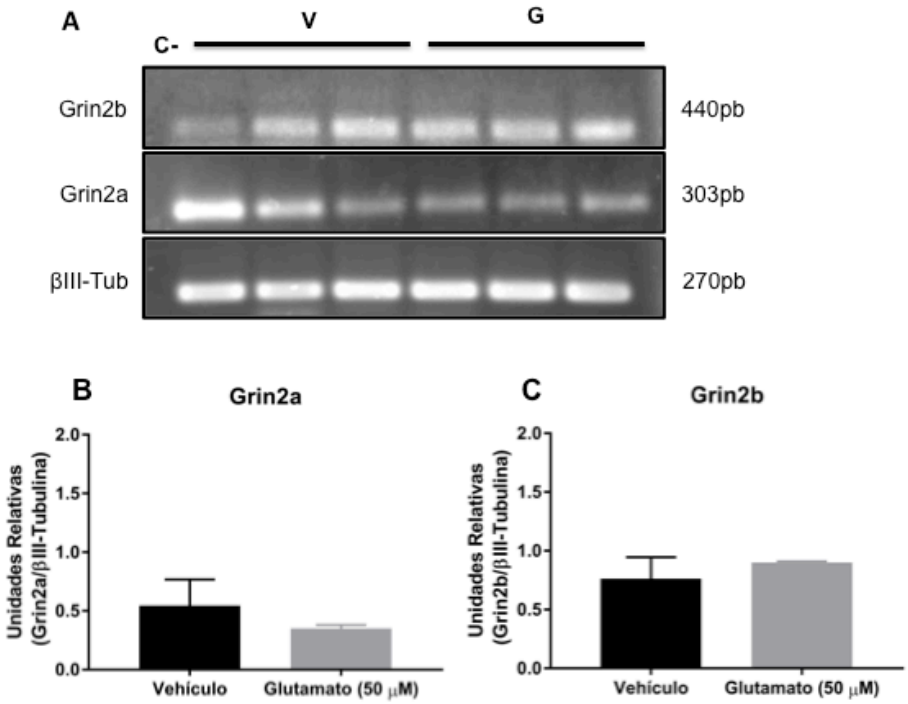

Figura 5. **Expresión de los genes de estudio en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata con el tiempo y la concentración de glutamato estandarizada.** A) imágenes representativas de las electroforesis en gel de agarosa realizadas para la determinación semicuantitativa de la expresión de los genes en neuronas hipocampales. B) Histograma que permiten evidenciar la tendencia de expresión del gen GRIN2A en cultivos neuronales de hipocampo de rata. C) Histograma que permiten evidenciar la tendencia de expresión del gen GRIN2B en cultivos neuronales de hipocampo de rata.

En los resultados de la Figura 5A y B, se puede evidenciar que el gen GRIN2B tiende a tener un mayor nivel de expresión en comparación con el gen GRIN2A, en el tiempo y las concentraciones de glutamato evaluadas, 0.5 horas y 50 μM respectivamente. El análisis estadístico reveló que no existen diferencias estadíscamente significativas en la expresión del gen GRIN2A cuando se comparan los datos obtenidos a partir de los controles y los tratamientos (p=0,5). Sin embargo, la expresión de este gen muestra una tendencia a disminuir con las condiciones de estudio (Figura 5A y B). El análisis estadístico de la expresión del gen GRIN2B no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las neuronas tratadas con el vehículo y con glutamato bajo las condiciones mencionadas anteriormente (p=0.99). Pero si es posible observar que la expresión de GRIN2B tiende a incrementarse por el tratamiento con glutamato 50 μM (figura 5A y C).

2.6. DISCUSIÓN

La finalidad de este proyecto era determinar si la exposición al glutamato produce cambios en la expresión de los genes que codifican las subunidades GluN2A y GluN2B del receptor de NMDA en neuronas hipocampales de rata, con el fin de contribuir a la investigación científica acerca de nuevos conocimiento sobre mecanismos moleculares de muerte neuronal relacionados con dichos receptores. Para lograr esto, se usó un modelo *in vitro* de cultivos primarios de neuronas hipocampales.

Los cultivos fueron expuestos a diferentes concentraciones de glutamato durante un tiempo determinado y se evaluó la viabilidad celular a través de un método colorimétrico cuantitativo con MTT, el cual consiste en un tetrazol que se reduce en la mitocondria de las células, dando como resultado una coloración violeta. En la figura 3A, se puede evidenciar de manera cualitativa que la mayor proporción de muerte celular fue causada por concentraciones de 500 µM a las 2.0 horas de exposición con glutamato, puesto que, no hubo formación de formazán por alteración de la actividad mitocondrial de las neuronas. Adicionalmente, se midió la absorbancia en un lector de platos a 570 nm y se comprobó los cambios colorimétricos observados en el plato con las células (Figura 3C).

En este proyecto fue de vital importancia seleccionar una concentración y tiempo de exposición subtóxicos con el fin de evaluar el estrés inducido por el glutamo sobre las neuronas hipocampales. A concentraciones tóxicas, las células sufrirían un proceso necrótico que impediría la evaluación de la expresión de los genes de interés. Por consiguiente, las condiciones seleccionadas para llevar a cabo los análisis de expresión fueron 50 µM de glutamato y 0.5 horas de exposición.

La exitotoxicidad de glutamato ha sido estudiada desde hace muchos años, debido a que es un neurotransmisor excitatorio por excelencia de la corteza cerebral humana. En un estudio realizado por White y colaboradores en el año 1996, se evidencio que en neuronas cultivadas, la exposicion por 5 min a concentraciones de 100 µM de glutamato producia un efecto excitotoxico. Por otro lado, De acuerdo con la literatura, concentraciónes de 500 µM y un tiempo de exposición de 30 minutos, genera muerte neuronal diferencial en las diferentes subregiones del hipocampo (Stanika et al.,2010). Por consiguiente, se puede decir que las concentraciones y tiempos de glutamato pueden variar y que los resultados obtenidos se acercan a los resultados publicados por otras investigaciones.

Una vez establecidas las concentraciones subtóxicas de glutamato, se procedió a realizar la estandarización de los primers de interés para posteriormente llevar a cabo la amplificación de los genes GRIN2A y GRIN2B mediante PCR. Para esto

se aplicó un gradiente de temperatura, con el fin de determinar la temperatura de alineamiento óptima (Figuras 4A, 2B, y 2C).

Finalmente se evaluó la expresión de los genes GRIN2A y GRIN2B. En este estudio se esperaba identificar si existía alguna variación de expresión génica cuando los cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata eran expuestos a las concentraciones de glutamato determinadas. Al evaluar la expresión de estos dos genes, con 50 µM de glutamato y 0.5 horas de exposición, se encontró que el gen GRIN2B no se reduce en comparacion con el gen GRIN2A (Figura 5,B,C). Sin embargo, estadisticamente no se encontraron diferencias significativas.

La reducción significativa de los recepetores sinápticos que contiene las subunidades GluN2A se apoya con varias revisiones e investigaciones cientificas relizadas recientemente. Una revisión elaborada por Hardingham y colaboradores del año 2010, se basa en la señalización del receptor NMDA sináptico versus extrasináptico, en donde se menciona que las respuestas inducidas por los receptores NMDA dependeran en gran medida de la ubicación del receptor (Hardingham et al., 2010). Además, como se mencionó anteriormente, en la EA los receptores extra-sinapticos (subunidades GluN2B) se encuentran presentes en mayor número en comparación con los receptores sinápticos (subunidades GluN2A), puesto que los segundos tienden a reducirce debido a que se internalizan para proteger la célula de la excesiva acumulacion por glutamato o por otros factores dañinos que se desencadenan en esta enfermedad. Siguiendo con esta idea, de acuerdo con el trabajo publicado por Esposito y colaboradores en el año 2013, cuando los niveles de glutamato se ven aumentados se da la activación excesiva de los receptores NMDA enriquecidos con GluN2B extra-sinápticos (codificado por el gen GRIN2B) y señala que se ha demostrado que la activación excesiva de estos son responsables del deterioro de la plasticidad sináptica.

Por otro lado, un estudio realizado por Bi y colaboradores, tenía como finalidad probar la hipótesis de que en la EA se ve alterada la expresión de los genes de las subunidadades GluN1, GluN2A y GluN2B del receptor NMDA, especialmente en en el hipocampo y la corteza entorrinal de tejido post-mortem, los niveles de expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B se encontraron significativamente reducidos. Sin embargo, la subunidad que se encontraba menos reducida era la subunidad GluN2B (Bi et al., 2002). En el estudio realizado en neuronas hipocampales de rata y en tejido post-mortem, los resultados de la expresion de los genes es muy similar, por lo tanto esta investigacion es de gran importancia y puede estar muy cerca al comportamiento real de la enfermedad de Alzheimer en seres humanos.

Esta teoria apoya a nuestra investigacion, puesto que en nuestros resultados el gen GRIN2A tuvo una tendencia a reducise más que el gen GRIN2B, corroborando entonces que los receptores extra-sinápticos estan en mayor proporción cuando hay daño en la sinapsis neuronal.

La EA es causada por varios factores que afectan a las neuronas, entre ellos la excitotoxicidad por glutamato, este proyecto evaluó específicamente si la exposición a elevadas concentraciones de glutamato produce cambios en la expresión de los genes que codifican las subunidades GluN2A y GluN2B del receptor de NMDA en neuronas hipocampales de rata. Se obtuvo como resultado que la subunidad que más se vio afectada fue la GluN2b codificada por el gen GRIN2B.

Los resultados obtenidos están muy cercanos con varias investigaciones y revisiones que evalúan como la expresión de genes se ve afectada en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la expresión de los genes puede variar, debido a condiciones ambientales y a diferentes factores que sean responsables del daño neuronal, por esta razón es de gran importancia para la investigación, estandarizar las condiciones con las que se va a trabajar y abarcar todos los mecanismos moleculares que se desencadenan en la EA.

2.7. CONCLUSIONES

Se estableció que la concentración de glutamato y el tiempo necesario para inducir la muerte celular en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata es 50 µM y 0.5 horas, respectivamente.

Se determinó que las temperaturas de alineamiento necesarias para la amplificación de los genes GRIN2A y GRIN2B son 61.3°C y 57.0°C, respectivamente.

Se encontró que la expresión de los genes GRIN2A y GRIN2B no varía con el tratamiento realizado. Sin embargo, los niveles de expresión del gen GRIN2A tienden a disminuir y los del gen GRIN2B a aumentar por el tratamiento con glutamato bajo las condiciones establecidas.

2.8. RECOMENDACIONES

Continuar relizando más experimentos para comprobar si la tendencia de la expresion del gen GRIN2B se ve aumentada bajo condiciones subtoxicas de glutamato.

Se debe ajustar las condiciones del cuarto de cultivo para evitar contaminaciones durante la realizacion de la investigacion.

Otra area del cerebro que se podria proponer para la investigacion de la enfermedad de Alzheimer es la corteza entorrinal, ya que también es una de las principales areas afectadas en esta enfermedad y tiene relación estrecha en la red de la memoria y la orientación.

2.9. REFERENCIAS

Alzheimer Association. (2016). 2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia 2016*, *12*(4), 1–80. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001

Barrera- ocampo, A. (2017). Determinación de las bases moleculares de la vulnerabilidad del Hipocampo en la Enfermedad de Alzheimer, 1–15.

Bi, H., & Sze, C. I. (2002). N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, *200*(1–2), 11–18. https://doi.org/10.1016/S0022-510X(02)00087-4

Budson, A. E., & Solomon, P. R. (2011). Memory loss: A practical guide for clinicians. *Memory Loss: A Practical Guide for Clinicians.* Retrieved from http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=psyc8&NEWS=N&AN=2011-30510-000

Butterfield, D. A., & Pocernich, C. B. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *CNS Drugs*. https://doi.org/10.2165/00023210-200317090-00004

Cabrera, M. J. A., Rocío, I., Pérez, M., Ravelo, A. G., Dayleen, I., & Rodríguez, H. (2014). Pathogenesis and current treatment of Alzheimer's disease. *Revista Cubana de Farmacia*, *48*(2), 508–518. Retrieved from http://scielo.sld.cu

canada society, A. (2016). Stages-of-Alzheimer-s-disease @ www.alzheimer.ca. Retrieved from http://www.alzheimer.ca/en/About-dementia/Alzheimer-s-disease/Stages-of-Alzheimer-s-disease

Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurologia*. https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014

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 -amyloid protein. *Neurologia*. https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.03.012

Gazulla, J., & Cavero Nagore, M. (2006). Glutamato y enfermedad de Alzheimer. *Glutamate and Alzheimer S Disease*, *42*(7), 427–432. Retrieved from http://www.revneurol.com/VeureResum.asp?i=e&aof=549189755077866525044&Par1=ind.asp&Par2=42&Par3=07

Guimerà, A., Xavier, G., & Cruz-Sánchez, F. F. (2002). Actualización sobre la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Cuba. Med. Gen. Integr*, *18*(4), 21–48.

Retrieved from http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol18_4_02/mgi0742002.htm
Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(10), 682–696. https://doi.org/10.1038/nrn2911
Havekes, R., & Abel, T. (2009). Genetic dissection of neural circuits and behavior in Mus musculus. *Advances in Genetics*, *65*, 1–38. https://doi.org/10.1016/S0065-2660(09)65001-X
Honyashiki., Cleusa P Ferri., Renata Sousa., Emiliano Albanese., Wagner S Ribeiro., Mina. (2009). Informe Mundial sobre el Alzheimer. *Alzheimer's Disease International*.
Institucion nacional de ciencias medicas y nutrición Salvador Zubirán. (2008). Enfermedad de Alzheimer. Retrieved from http://alzheimer.medico-guia.com/tag/enfermedad-de-alzheimer
Lau, C., & Zukin, R. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(6), 413–426. https://doi.org/10.1038/nrn2153
Llanero Luque, M., Ruiz Sánchez de León, J. M., Medrano Izquierdo, P., & Fernández García, C. (2011). Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, *10*(76), 5138–5144. https://doi.org/10.1016/S0304-5412(11)70069-5
Marco, S., Pérez Otaño, I., & Luján, R. (2011). Artículo divulgativo: Los receptores de glutamato como dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas. *Sici*, 1–15.
Martin, P. (2015). The Global Impact of Dementia. *Alzheimer's Disease International*, *16*, 297–302.
Mené, P. G. (2014). receptores NMDA extrasinápticos en la toxicidad del péptido beta-amiloide Universidad Pompeu Fabra.
Moisés De La Serna, J. (2015). *Alzheimer, Últimas Investigaciones*. https://doi.org/10.4172/978-1-63278-056-0-057
OMS. (2010). Demencia: Una prioridad de salud pública.
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
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. https://doi.org/10.14336/AD.2014.0423
Sánchez, C. R. De, Nariño, D., Fernando, J., & Cerón, M. (2010). Epidemiology and Burden of Alzheimer Disease, *26*(3).
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. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.020
White, R. J., & Reynolds, I. J. (1996). Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(18), 5688–5697. https://doi.org/1996/09/15 00:01

Anexo 1. Aprobación comité de ética Universidad Icesi

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

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

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

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

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

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

Cordialmente,

Juliana Rengifo
Presidente –**CIECUAE**- Universidad Icesi

Anexo 2. Matriz de Marco Lógico

Objetivos	Actividades	Supuestos	nd Indicadores
Estandarizar las concentraciones excitotóxicas de glutamato y el tiempo necesario para inducir la muerte celular en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata.	Capacitación para realizar los cultivos primarios hipocampales de rata. Realización de cultivos primarios hipocampales de ratas. Identificar las concentraciones excitotóxicas de glutamato en neuronas hipocampales de rata. Evaluar la muerte celular generada por la excitotoxicidad del glutamato. Determinar el tiempo necesario de exposición de glutamato en la inducción de la muerte celular.	Disponibilidad de ratas Wistar, materiales y espacios para realizar los cultivos primarios hipocampales. Asegurar la muerte celular de neuronas hipocampales de rata.	Cultivos primarios hipocampales realizados. Efecto de la concentración de glutamato en neuronas hipocampales de rata determinado. Concentración optima de glutamato en neuronas hipocampales para causar muerte celular identificada. Tiempo necesario para causar muerte celular medida.

Determinar las condiciones óptimas para la detección de los genes GRIN2A y GRIN2B mediante RT-PCR.	Estandarización de las condiciones de detección de los genes de estudio mediante PCR. Realizar RT-PCR de los genes GRIN2A y GRIN2B Electroforesis para determinar la temperatura a la cual se logra amplificar específicamente el gen deseado.	Obtención de RNA de óptima calidad. Disponibilidad de reactivos para llevar a cabo la RT-PCR y la PCR. Disponibilidad de equipos de electroforesis y termociclador.	Cantidad óptima de RNA para la obtención de cDNA de los genes de interés, extraída. Temperatura y concentraciones optimas de los distintos componentes de una PCR establecidas. primers para los genes e interés diseñados.
Determinar la expresión de los genes Grin2a y Grin2b con las concentraciones de glutamato estandarizadas.	Cuantificación de los niveles de expresión de los genes de interés cuando los cultivos han sido sometidos a las concentraciones excitotóxicas de glutamato. Análisis de resultados	Disponibilidad de las herramientas necesarias para el análisis semi-cuantitativo.	Datos de la expresión normal de los genes de interés sin aplicar ninguna concentración de glutamato obtenidos. Expresión de los genes tratados con la concentración de glutamato estandarizada determinadas.

Anexo 3. Análisis Estadístico

Ensayo de excitotoxicidad para el tratamiento con glutamato durante 0.5 horas y 2.0horas de exposición.

Prueba de Normalidad Glutamato 0,5 horas						
	No Tratadas	Triton 0.1%	Vehículo	Glu 5 µM	Glu 50 µM	Glu 500 µM
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

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

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	Significant ?	Summary	Adjusted P Value
Vehículo vs. Glu 5 µM	-0,015	No	ns	0,8323
Vehículo vs. Glu 50 µM	-0,02032	No	ns	0,6922
Vehículo vs. Glu 500 µM	0,02439	No	ns	0,5698

Ensayo de excitotoxicidad para el tratamiento con glutamato durante 2.0horas de exposición.

Prueba de Normalidad Glutamato 2,0 horas						
	No Tratadas	Triton 0.1%	Vehículo	Glu 5 µM	Glu 50 µM	Glu 500 µM
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	-0,009012	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

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

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Vehículo vs. Glu 5 µM	-0,05563	No	ns	0,0622
Vehículo vs. Glu 50 µM	0,0065	No	ns	0,9846
Vehículo vs. Glu 500 µM	0,03213	No	ns	0,386

Análisis estadísticos del gen GRIN2A Y GRIN2B.

Table Analyzed Grin2b	
Column B	Glutamato (50 µM)
vs.	vs,
Column A	Vehículo
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	>0,9999
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	3 , -3
Sum of signed ranks (W)	0
Number of pairs	3
Median of differences	
Median	-0,02
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

Table Analyzed Grin2a	
Column B	Glutamato (50 µM)
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	1 , -5
Sum of signed ranks (W)	-4
Number of pairs	3
Median of differences	
Median	-0,24
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