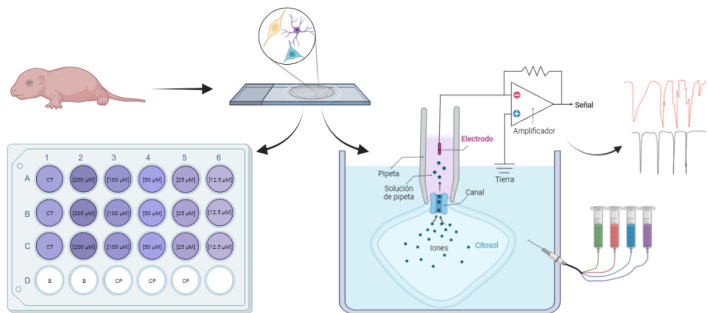


Puesta a punto de las condiciones para la medición de corrientes de calcio evocadas del receptor NMDA y evaluación de la viabilidad celular de un cultivo primario de neuronas de hipocampo en presencia del péptido sintético Pb53a.

Fine-tuning of conditions for the measurement of NMDA receptor-evoked calcium currents and assessment of cell viability of a primary culture of hippocampal neurons in the presence of the synthetic peptide Pb53a.

Graphical Abstract (GA)

GA Figura:



GA Texto: Estandarización para la medición de corrientes de calcio evocadas del receptor NMDA y evaluación de la viabilidad celular de un cultivo primario de neuronas de hipocampo en presencia del péptido sintético Pb53a.

Puesta a punto de las condiciones para la medición de corrientes de calcio evocadas del receptor NMDA y evaluación de la viabilidad celular de un cultivo primario de neuronas de hipocampo en presencia del péptido sintético Pb53a.

Fine-tuning of conditions for the measurement of NMDA receptor-evoked calcium currents and assessment of cell viability of a primary culture of hippocampal neurons in the presence of the synthetic peptide Pb53a.

Dayan Sofia Villate Vanegas

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por:
Edwin Alfredo Reyes Guzman PhD.
Maria Elisa Forero Vivas PhD.*

Resumen

La actividad del receptor de glutamato N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) se encuentra estrechamente relacionada con la plasticidad sináptica y los procesos de aprendizaje y memoria. La sobreactivación del NMDAR desencadena la entrada y un incremento sostenido de la concentración del ion calcio a nivel neuronal, provocando, entre otros, un aumento de la excitabilidad, alteración del metabolismo, daño y muerte neuronal, como se ha observado en patologías como esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia e Isquemia cerebral. En este trabajo se propuso poner a punto las condiciones para evaluar el efecto del péptido sintético Pb53a derivado de la toxina de la araña *Phoneutria boliviensis* sobre la actividad del receptor NMDA en neuronas hipocampales *in vitro* usando la técnica de Patch clamp. Los resultados muestran cultivos de neuronas de hipocampo que permitieron obtener corrientes de calcio evocadas del receptor NMDA,

así como la evaluación de la viabilidad celular de dichos cultivos en presencia del péptido Pb53a. El péptido no genera un efecto significativo sobre la viabilidad de las neuronas por lo que se sugiere que es seguro para las mediciones en torno a la actividad eléctrica de las neuronas.

Abstract

The activity of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR) is closely related to synaptic plasticity and learning and memory processes. Overactivation of NMDAR triggers the entry and sustained increase of calcium ion concentration at neuronal level, causing, among others, increased excitability, altered metabolism, neuronal damage and neuronal death, as observed in pathologies such as schizophrenia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, epilepsy and cerebral ischemia. In this work we proposed to set up the conditions to evaluate the effect of the synthetic peptide Pb53a derived from the spider toxin *Phoneutria boliviensis* on NMDA receptor activity in hippocampal neurons using the patch clamp technique. The results show hippocampal neuronal cultures that yielded NMDA receptor-evoked calcium currents, as well as the assessment of cell viability of these cultures in the presence of the Pb53a peptide. The peptide does not generate a significant effect on neuronal viability, suggesting that it is safe for measurements of neuronal electrical activity.

Keywords: Primary cultures, hippocampus, NMDA receptor, PB53a peptide, calcium, electrophysiology.

Introducción

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) son la segunda causa de muerte a nivel mundial, los cuales pueden ser clasificados como isquémicos o hemorrágicos. En el caso de los accidentes cerebrovasculares de tipo isquémicos estos son ocasionados por el bloqueo del flujo sanguíneo por un trombo o coágulo de sangre que impide el flujo continuo de oxígeno, glucosa y demás nutrientes generando un daño y lisis neuronal; a su vez, los accidentes de tipo hemorrágico se generan por la ruptura de una arteria de pequeño diámetro produciendo una hemorragia (Puentes Madera, I. C. 2014). El ACV de tipo isquémico es catalogado como la enfermedad neurológica que establece una gran parte de incapacidad y acompañamiento interinstitucional para la persona que la padece, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2019, murieron 6,2 millones de personas a causa a los accidentes cerebrovasculares. La isquemia cerebral puede catalogarse como el desarrollo fisiopatológico distinguido por la disfunción de una zona específica cerebral y el decrecimiento del flujo en una arteria concreta, ocasionando por déficits neurológicos transitorios o en algunos casos permanentes (Prieto-Arribas, R *et al.*, 2008). El avance de un proceso isquémico en algunos casos puede conducir a la necrosis del tejido y a un infarto cerebral propiamente (Prieto-Arribas, R *et al.*, 2008).

Este daño es promovido por la liberación excesiva, a nivel presináptico, de diversas moléculas incluyendo el glutamato (Glu), el cual es un aminoácido que actúa como neurotransmisor de receptores glutamatérgicos, como es el caso del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), el cual se encuentra situado en las membranas pre y postsinápticas de las neuronas y es uno de los receptores ionotrópicos de glutamato altamente permeable al ión calcio (Ca^{2+}) (Prieto-Arribas, R *et al.*, 2008; Hassel, B *et al.*, 2008). Una liberación excesiva de glutamato puede generar excitotoxicidad, que hace referencia a un proceso patológico mediante el cual las neuronas son afectadas a causa de la sobre activación del NMDAR el cual permite un influjo excesivo de Ca^{2+} y por consiguiente un incremento en las concentraciones de este ión por encima de los niveles basales causando la

activación de rutas de muerte celular (Stefan Bleich *et al.*, 2018). El NMDAR es un canal iónico, activado por la unión de glutamato, que presenta una serie de subunidades que lo hacen funcional; subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B. Durante la isquemia cerebral, aumenta la fosforilación de tirosinas y serinas en el carboxilo terminal de la subunidad GluN2B, permitiendo que la proteína DAPK1 interactúe física y funcionalmente con el aminoácido Ser 1303 de la subunidad GluN2B, esta interacción actúa como un mediador central para la sobreactivación del receptor y el daño excitotóxico (Tu *et al.*, 2010). El aminoácido glutamato, es entonces responsable de diversas funciones fisiológicas propias de la neurotransmisión glutamatérgica como la transmisión sináptica y proceso de memoria y aprendizaje, pero también se encuentra modulando funciones fisiopatológicas presentes en enfermedades neurológicas y/o psiquiátricas como sucede cuando sobre activa el NMDAR (Stefan Bleich *et al.*, 2003).

Un enfoque para tratar la isquemia cerebral por excitotoxicidad es mediante el uso de péptidos de origen animal ya que el NMDAR es blanco de múltiples sustancias químicas empleadas como mecanismos de defensa y caza por animales. Actualmente se intenta obtener compuestos antagonistas del NMDAR que regulen el flujo excesivo de calcio durante la isquemia, sin que este altere la comunicación neuronal (Li V *et al.*, 2016).

Los receptores neuronales como el NMDAR son blancos de múltiples sustancias químicas secretadas y empleadas como mecanismo de defensa o caza por diferentes especies de animales como las arañas, caracoles, serpientes, escorpiones, avispas, entre otros (Kotpal R.L *et al.*, 2012). Estas toxinas de origen animal se pueden clasificar en peptídicas y no-peptídicas, las primeras siendo comúnmente de secuencias entre 8 y 70 aminoácidos, que a su vez son primordialmente sintetizadas en los conductos venosos de los animales; y las segundas, por su lado, están presentes en organismos que acumulan alcaloides en su dieta siendo mayormente poliaminas (Bogin O *et al.*, 2005). En la actualidad las toxinas de origen animal están siendo empleadas como fármacos ya que poseen diferentes tipos de dianas en la superficie de la membrana neuronal con las que pueden interactuar, regulando la actividad de canales iónicos y modificando la fisiología neuronal. (Bogin

O *et al.*, 2005). Por tanto, las toxinas presentes en diferentes especies animales resultan importantes para el desarrollo de fármacos dirigidos a patologías neuronales.

Estrada-Gómez *et al.*, 2015, en un estudio de caracterización del veneno de la araña colombiana conocida como *Phoneutria boliviensis*, por medio de espectrometría de masas lograron hallar la presencia de dos péptidos: Ctenitoxina-Pb48 y Ctenitoxina-Pb53, los cuales presentaban una homología con la secuencia de toxinas de la especie *Phoneutria nigriventer* que interactúan con el NMDAR, por lo que se plantearon de manera preliminar que las toxinas Ctenitoxina-Pb48 y Ctenitoxina-Pb53 podrían presentar algún efecto sobre el NMDAR (Estrada-Gómez *et al.*, 2015; Rajendra W *et al.*, 2004; Rash LD *et al.*, 2002). Sin embargo, la secuencia de los péptidos Ctenitoxina-Pb48 y Ctenitoxina-Pb53 no fue elucidada completamente, por lo que Carvajal J y Reyes-Guzmán propusieron una secuencia a partir de estudios *in silico*, específicamente la secuencia CDLAMGNCICK para la Ctenitoxina-Pb48 y denominada como Pb48 y la secuencia ESNFKIGMAIR para Ctenitoxina-Pb53 denominada Pb53a (Carvajal J y Reyes-Guzmán, 2020). Posteriormente, Bermúdez S y colaboradores realizaron un análisis de la citotoxicidad del péptido sintético Pb53a en la línea celular HEK293, en donde los resultados indicaron que dicho péptido no tenía efecto significativo que afectará la viabilidad de la línea celular (Bermúdez S, *et al.*, 2021). Por lo tanto, el péptido Pb53a resulta ser un candidato interesante para evaluar su efecto sobre la actividad del NMDAR en modelos *in vitro* y específicamente en modelos que expresen las subunidades GluN2B como lo son las neuronas hipocampales de rata.

Teniendo presente que hasta entonces no se dispone de un tratamiento efectivo para el daño neuronal a lo largo de un ACV donde la subunidad GluN2B del NMDAR está involucrada (Vyklícky V *et al.*, 2014; MacDougall G *et al.*, 2019) y al potencial de las toxinas de origen animal como agentes farmacológicos especialmente de la especie *Phoneutria boliviensis*, en este estudio se evaluó el efecto del péptido Pb53a sobre la viabilidad celular de un cultivo primario de neuronas hipocampales y la puesta a punto de condiciones para la medición de la amplitud y cinética de corrientes de calcio evocadas por el NMDAR.

1. Materiales y Métodos

1.1. Cultivo primario de neuronas hipocampales

Para la estandarización de los cultivos primarios de neuronas hipocampales se usaron neonatos de rata Wistar. El procedimiento de extracción y el cultivo se realizó de acuerdo con lo reportado por Longart *et al.*, 2004 y Beaudoin III *et al.*, 2012 y a las modificaciones de Reyes Guzmán, E. A *et al.*, 2017, teniendo presente los lineamientos y en correspondencia con el aval del comité de ética de la Universidad Antonio Nariño.

1.1.1. Extracción de hipocampos

Por cada cultivo se usaron 4 neonatos (recién nacidos o de máximo 1 día desde el nacimiento) con un peso promedio de entre 6-7 g. Los neonatos se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia. Los neonatos fueron sacrificados por decapitación (Close B. *et al.*, 1997). Posteriormente se hizo la extracción del conjunto cerebro-cerebelo, se retiraron las meninges para acceder al hipocampo y se removieron los hipocampos de cada hemisferio, los cuales se colectaron en un tubo Falcon de 15 mL con 2 mL de medio de disección frío (DPBS, 1X, (Buffer fosfato salino Dulbecco, libre de calcio y magnesio, Gibco) en presencia de Penicilina/Estreptomicina (Gibco)) al 1% de (Reyes Guzmán, E. A *et al.*, 2017).

1.1.2. Disociación y cultivo de las células hipocampales

Se realizó la disociación enzimática de los hipocampos obtenidos con 300 μ L de tripsina 0.25% (Gibco) a 37°C por 15 minutos con rotación constante. Seguido a esto se realizó la inhibición de la tripsina adicionando 5 mL de medio Neurobasal completo (Medio Neurobasal (Gibco) suplementado con 2% de B27 (Gibco), 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco) y 0.5 mM de Glutamax (Gibco)) (Reyes Guzmán, E. A *et al.*, 2017). Luego se hicieron dos lavados, cada uno

con 3 mL de medio neurobasal completo. Los hipocampos se disociaron mecánicamente en este volumen final, usando pipetas Pasteur de vidrio cuyas puntas fueron previamente pulidas al fuego. La suspensión celular obtenida después de la disociación se pasó por un filtro de 70 μm (Cell Strainer, BD Falcon) para separar el tejido no disociado. Consecutivamente se realizó el conteo celular y se determinó la viabilidad celular usando el método de azul de tripano. Las células fueron sembradas a una densidad de 20.000-30.000 células por pozo (380.000 células/mL) en laminillas circulares de 12 mm para posterior experimento de electrofisiología. Previamente las laminillas fueron recubiertas con una mezcla de Poli-D-lisina (37.5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich) y Laminina (2.5 $\mu\text{g/ml}$, Invitrogen) y fueron mantenidas placas de 24 pozos. Finalmente los cultivos se mantuvieron a 37°C, 95% de humedad, 5% de CO₂ haciendo cambios de la mitad del medio de cultivo cada día de por medio (Reyes Guzmán, E. A *et al.*, 2017).

1.2. Registro de corrientes iónicas de calcio a través del NMDAR

1.2.1. Composición de las soluciones de registro

El NMDAR ionotrópico comúnmente presenta una alta permeabilidad al ion Calcio, la cual es bloqueada por el ion Magnesio, por lo tanto, se omitió la presencia del magnesio durante los registros electrofisiológicos para prevenir el bloqueo voltaje dependiente del paso del ion calcio a través del NMDAR (Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984). Durante el registro de las corrientes de calcio las neuronas fueron conservadas en medios salinos: intracelular (110 mM Cs-gluconato, 20 mM CsCl, 10 mM Hepes, 10 mM EGTA, 4 mM Mg-ATP, 0.4 mM Na-GTP, pH 7.3, ajustado con CsOH) y extracelular (140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 10 mM D-glucosa, pH 7.4, Huang *et al.*, 2010). A la solución extracelular, se le adicionó 1 μM Tetrodotoxina (Sigma) para bloquear la actividad de canales de Na⁺ dependientes de voltaje; 20 μM CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, Sigma) para eliminar la actividad de los receptores glutamatérgicos AMPA y Kainato; así mismo, se adicionó 50 μM Bicuculina (Sigma) junto con 100 μM Picrotoxina (Sigma) para eliminar las corrientes de cloruro

inhibitorias de los receptores GABAA, y 1 μ M Estricnina para inhibir la actividad de los canales de glicina (Reyes Guzmán, E. A *et al.*, 2017).

1.2.2. Registros electrofisiológicos

Los estudios electrofisiológicos se realizaron en cultivos de neuronas de hipocampo de neonatos de rata entre 1-28 días *in vitro* (DIV) empleando la configuración de célula entera, en modo voltage clamp (voltaje sostenido), de la técnica Patch clamp (Hamill *et al.*, 1981; Sackmann y Neher., 1983) y pipetas de registro de 2-4 M Ω de resistencia, una vez llenadas con la solución intracelular. Las corrientes iónicas de calcio se registraron en el soma de neuronas de hipocampo a través de un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los pulsos de voltaje y las corrientes iónicas registradas se digitalizaron por una interfase analógico-digital, Digidata 1550B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Las señales de corriente registradas fueron filtradas y almacenadas en una computadora compatible IBM. Para la generación de los estímulos/pulsos de voltaje, registros de corriente iónica y análisis de resultados se utilizó el paquete de software electrofisiológico Pclamp10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los registros en configuración de célula entera se digitalizaron a 20 kHz y fueron filtrados a 1 kHz. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

1.2.3. Amplitud y Cinética de corrientes de calcio activadas por NMDA

Una vez obtenido el sello de alta resistencia eléctrica (> 1 G Ω) en el soma de la neurona, se hiperpolarizó la membrana a -60 mV accediendo a la configuración de célula entera. Seguidamente, se registraron las corrientes de calcio evocadas por la presencia de agonistas (NMDA. Sigma) y co-agonistas (Glicina. Sigma) del NMDAR-ionotrópico (5 segundos de interacción). La aplicación de estas sustancias se hizo mediante un sistema de perfusión (Perfusión pencil).

1.3. Medición de la viabilidad celular por ensayo MTT

Se realizó un ensayo de viabilidad celular usando el método MTT de neuronas de hipocampo de rata neonatal en presencia de 5 concentraciones del péptido Pb53a. Las neuronas previamente fueron sembradas en placa de 24 pozos a una densidad de 26.600 células/pozo. Las neuronas se mantuvieron en incubadora a 37 °C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda durante 8 días *in vitro* (DIV 8) con medio de cultivo neurobasal suplementado con B27 y antibióticos, el volumen de medio durante el ensayo fue de 300 µL por pozo. El diseño del ensayo incluyó la exposición de las neuronas al péptido Pb53a en concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12.5 µM (diluciones seriadas). Como control negativo se dejaron neuronas sin aplicación de péptidos. Como control positivo o de muerte celular se dejaron neuronas expuestas a etanol al 70% durante 2 minutos y como blanco se dejaron pozos sin neuronas y solo medio de cultivo. En todos los estímulos se realizó triplicado con las mismas concentraciones en la misma placa. La placa fue incubada durante 24 horas a 37 °C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Transcurridas las 24 horas de interacción se adicionaron 30 µL de MTT (5 mg/mL en PBS) por cada pozo y se incubaron durante 4 horas a 37 °C y 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Seguidamente se retiró el medio dejando los cristales de formazan formados en cada pozo y se adicionaron 300 µL de DMSO, se incubó toda la noche a 37 °C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Una vez se evidenció la solubilización de los cristales de formazán se determinó la viabilidad celular con un lector de microplatos multimodal Modelo FLUOstar Omega a una longitud de onda de 570 nm (Vistica VT, *et al.*, 1991). Los valores de absorbancia fueron normalizados usando la fórmula: Viabilidad (%) = (media OD de las células tratadas)/(media OD de las células control) × 100.

1.4. Análisis estadístico de los resultados de viabilidad celular.

Los resultados de absorbancia y viabilidad celular se presentan como la media y el error estándar de la media (mean ± SEM). La significancia estadística se determinó mediante una prueba

t-student pareada suponiendo varianzas desiguales cuando se compararon las diferentes concentraciones del péptido Pb53a, respecto a los grupos control; y entre grupos control. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas sólo cuando $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó usando el módulo de análisis de datos de Microsoft excel para mac versión 16.59.

2. Resultados y Discusión

2.1. Obtención y mantenimiento del cultivo primario de neuronas hipocampales

- Extracción y disociación de hipocampos

Los cultivos primarios de neuronas hipocampales y de corteza de embriones de rata son modelos que han contribuido significativamente en la investigación científica en campos como la neurobiología y electrofisiología. Es sin embargo un reto, para muchos laboratorios el poder estandarizar cultivos primarios de neuronas que tengan las condiciones óptimas que permitan obtener resultados ya sea de la excitabilidad eléctrica o de diferentes procesos intracelulares. Hay reportes que indican que un ligero cambio en el medio y las condiciones del cultivo puede ser responsables en la orientación de numerosos aspectos como en la diferenciación, el fenotipo neuronal y la supervivencia (Sahu, M P. *et al.*, 2019). En el caso de cultivos primarios de neuronas hipocampales de embriones de rata (E18), se pueden diferenciar desde los primeros días *in vitro*, neuronas con axones, dendritas, espinas dendríticas, sinapsis claramente separables y como lo reporta Reyes *et al.*, 2017, son cultivos bastante sanos y resistentes incluso hasta 30 días de cultivo *in vitro* (30 DIV).

En caso de emplear neonatos para el cultivo primario es óptimo trabajarlos a partir del primer o segundo día como máximo de que estos hayan nacido puesto que si se dejan avanzar los días de nacimiento en los neonatos, se corre el riesgo de que las neuronas no logren adaptarse a las condiciones *in vitro*, esto se debe en parte a que sus procesos neuronales están relativamente menos desarrollados en comparación con los animales postnatales. Las meninges también están

más adheridas al tejido en animales posnatales. Por lo tanto, los cultivos posnatales tienden a ser menos robustos y tienen un menor rendimiento de células sanas viables en comparación con las neuronas hipocampales de rata embrionaria (Beaudoin III *et al.*, 2012). A pesar de que son 3-5 días de diferencia entre los embriones y los neonatos se puede apreciar un cambio significativo en el tamaño de estos y de igual modo en el desarrollo neuronal, por tal motivo, las neuronas de los neonatos tienden a ser menos viables en comparación a las neuronas embrionarias.

En este estudio, sin embargo, a diferencia de protocolos previos en los que se usan embriones (E18) (Beaudoin III *et al.*, 2012; Reyes-Guzman, *est al.*, 2017), se realizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales usando neonatos de rata Wistar (Figura 1A). Posteriormente a la decapitación de cada neonato se obtuvieron los cerebros como se pueden apreciar en la (Figura 1B y C) de los cuales a su vez se obtuvieron los 2 hipocampos por cada cerebro (Figura 1D y E), en donde se puede ver la forma característica de caballito de mar o tipo c, la extracción de los hipocampos fue minuciosa para separar la corteza del hipocampo (Figura 1F), con lo cual se garantizó que los cultivos fueran principalmente de células hipocampales.

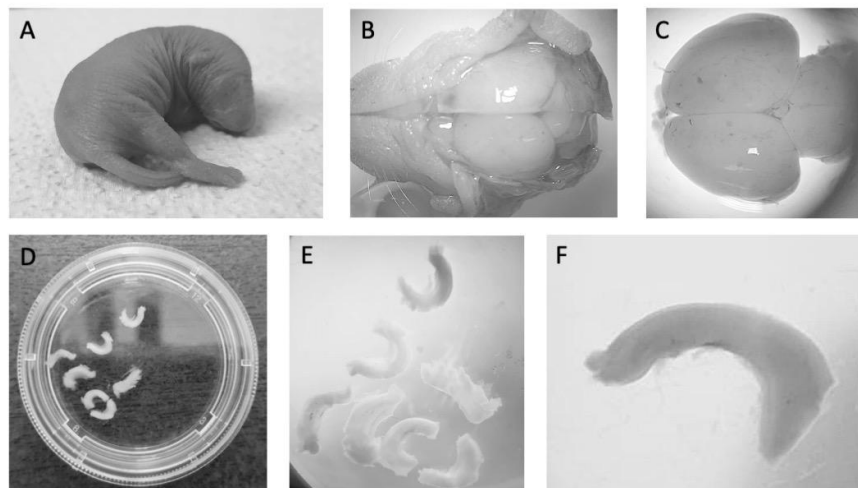


Figura 1. Extracción de hipocampos a partir del cerebro de rata neonatal. **A)** Neonato de rata Wistar (posnatal P0). **B)** Exposición del cerebro de la rata durante la extracción. Se observa en la parte superior la mitad del cráneo muy bien formado. **C)** Cerebro del neonato una vez se ha extraído, se puede apreciar las meninges por la vascularización, cada uno de los hemisferios y el cerebelo. **D y E)** Conjunto de hipocampos extraídos. **F)** Hipocampo aislado, se aprecia la forma característica, con mínimo tejido cortical y libre de meninges.

- Cultivo de neuronas hipocampales

A partir de la disociación de los hipocampos se logró obtener un cultivo primario de neuronas las cuales se adhirieron de forma exitosa sobre las laminillas circulares gracias a la matriz de PDL y laminina, esto es importante ya que para ensayos de Patch clamp, las neuronas deben trasladarse a la cámara de registro. La población neuronal por laminilla se estimó entre 20.000 y 30.000 células, lo que indica una población celular adecuada (Figura 2) con neuronas lo suficientemente aisladas unas de otras para evitar agrupamientos y lo suficiente para mantener interacciones tróficas y procesos de comunicación intercelular, las dos condiciones anteriores resultan adecuadas para el registro de corrientes de calcio empleando la técnica de patch clamp.

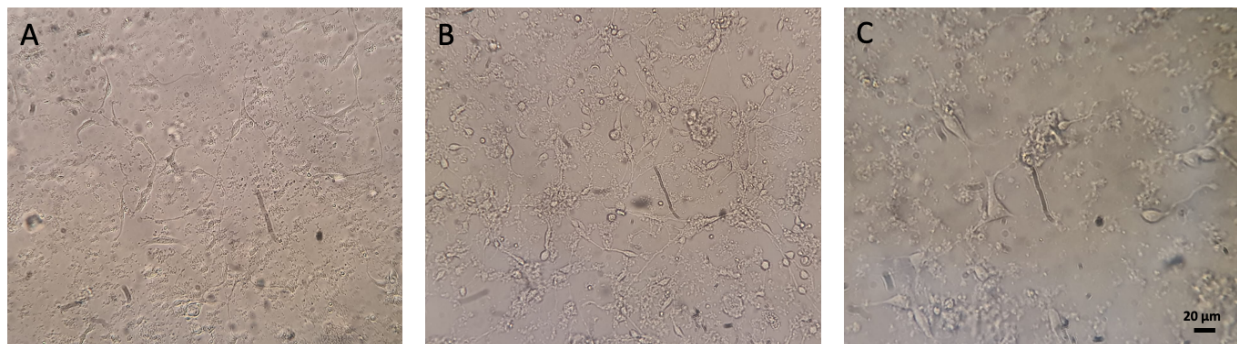


Figura 2. Cultivo primario de neuronas hipocampales. **A)** Neuronas al tercer día *in vitro* (DIV 3), se puede diferenciar claramente el soma y diferentes prolongaciones (axones y dendritas). Magnificación 20X. **B)** y **C)** Neuronas al DIV 10, se observa mayor número de ramificaciones y algo de debris celular producto de células que no sobrevivieron debido al estrés de condiciones asociadas al mantenimiento del cultivo. Magnificación 20X y 40X respectivamente. Barra 20 μm .

Por otro lado, dependiendo de si se usa suero (suero fetal bovino, SFB) o no, el tener cultivos más puros en relación al contenido de neuronas y células gliales presentes puede ser crítico dependiendo de los análisis que se vayan a realizar. El suero favorece la diferenciación neuronal y

supervivencia gracias a la proliferación de las células gliales, cabe recalcar que estas células proporcionan un soporte primordial a las neuronas que están siendo cultivadas (Sahu, M P. *et al.*, 2019).

Para ensayos de electrofisiología con la técnica Patch clamp es más favorable tener cultivos de neuronas libres de glía, ya que la glía puede cubrir la superficie de las neuronas y de esa manera impedir que se logre el contacto eléctrico entre el electrodo de registro y la membrana celular de las neuronas.

Los diversos cultivos realizados a lo largo del proyecto presentaron alta pureza, en donde la presencia de la glía fue mínima, esto debido al suplemento B27, el cual no solo aporta factores de crecimiento al cultivo, sino que también se encarga de promover el crecimiento de neuronas y no de otras células como lo es la glía. Si bien no se usaron marcadores específicos para identificar los tipos celulares presentes en el cultivo como NeuN (neuronas) y GFAP (células gliales), la presencia del suplemento B27 garantizó el tener cultivos con mínima presencia de células gliales (se estima de 4%) como lo reportan en varios estudios que usan B27 (Sahu, M P. *et al.*, 2019; Seibenhener y Wooten., 2012; Kaech y Banker., 2006; Brewer *et al.*, 1993).

De este modo, se lograron obtener cultivos viables que se mantuvieron a lo largo de 28 días *in vitro* sin que presentaran ningún tipo de contaminación lo cual resultó como una evolución interesante, debido a que este tipo de cultivos primarios requieren de un enorme cuidado. Hubo condiciones asociadas al mantenimiento de las neuronas que en algunos casos generaron estrés celular (Figura 3A), por ejemplo, problemas con la inyección de CO₂ de las incubadoras y el porcentaje de humedad dificultaron tener cultivos en las mejores condiciones. En general, se pudo distinguir dos tipos de morfologías de las neuronas, por un lado, neuronas de tipo fusiforme o neuronas de Von Economo (VEN o spindle en inglés) que corresponden a neuronas de proyección especializadas que se caracterizan por un soma en forma de huso con dendritas basales y apicales gruesas (Raghanti *et al.*, 2017) (Figura 3B y 3C) y por otro lado, neuronas de tipo piramidal; que

típicamente tienen un soma con forma de lágrima o pirámide redondeada, también tienden a tener dendritas que emergen del extremo puntiaguda del soma (dendritas apicales) y un grupo de dendritas más cortas que emergen del extremo redondeado (dendritas basales) (Spruton, N., 2018) como se observa en la figura 3A y 3C.

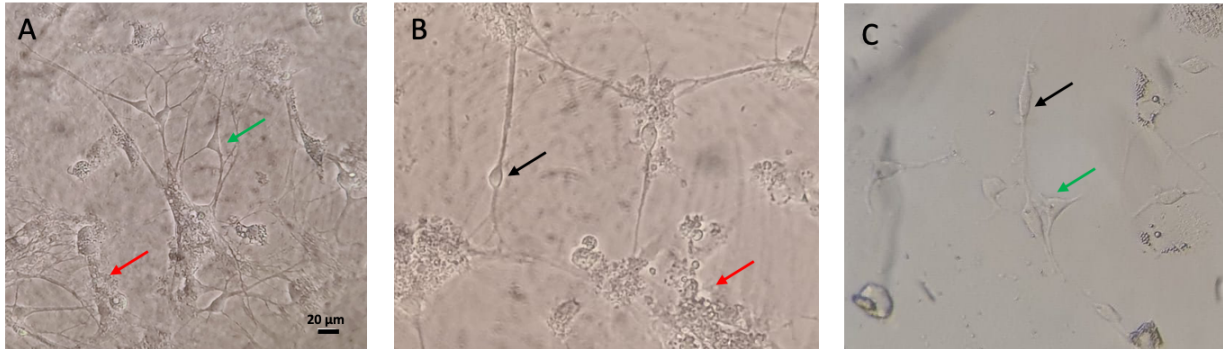


Figura 3. Morfología de las neuronas hipocámpales al día 28 *in vitro* (DIV 28). Se observan neuronas en condiciones no viables como debris y agrupamiento (flecha roja, paneles A y B) y neuronas viables con morfología fusiforme o en huso (flechas negras, paneles B y C) y neuronas viables piramidales (flechas verdes, paneles A y C). Magnificación 20X y barra 20 µm.

- Presencia del NMDAR en neuronas hipocámpales

La activación del NMDAR a nivel hipocámpal se cataloga como uno de los procesos moleculares críticos para la formación de la memoria espacial, por lo cual la sinapsis madura del hipocampo radica predominantemente en las subunidades GluN1/GluN2A y GluN1/GluN2B (Gao, C *et al.*, 2010). Tanto las subunidades GluN2A como la GluN2B se encuentran implicadas en procesos de la formación de la memoria. Mientras que los antagonistas en general del NMDAR e incluso los antagonistas específicos de la subunidad GluN2A afectan significativamente la formación de básicamente todo tipo de memoria en numerosas superficies del cerebro, los ensayos de comportamiento que manipulan el grado o la actividad de la subunidad GluN2B presentan efectos complejos (Gao, C *et al.*, 2010). En cuanto a la subunidad GluN2B esta se encuentra implicada en la formación de la memoria a largo plazo y por tanto se ha encontrado que la sobreexpresión a

nivel hipocampal de dicha subunidad fortalece enormemente el desempeño en diferentes labores de aprendizaje (Gao, C *et al.*, 2010). La subunidad GluN2B también se ha relacionado con procesos neuropatológicos como la isquemia cerebral (Tang *et al.*, 2018), por tanto el tener cultivos de neuronas de hipocampo donde se garantice la presencia de la subunidad GluN2B es importante en el marco del contexto del presente trabajo de grado y los otros trabajos articulados.

2.2. Puesta a punto de condiciones para caracterizar electrofisiológicamente las corrientes de entrada de calcio a través del NMDAR.

Para la caracterización electrofisiológica de las corrientes de entrada de calcio a través del NMDAR se empleó la técnica de fijación en parche de membrana o como se conoce de forma más extendida “Patch clamp”. Esta técnica es una herramienta electrofisiológica versátil para comprender el comportamiento de los canales iónicos como es el caso del NMDAR en presencia de agentes que pueden o bien activar (agonistas) o bloquear su actividad (antagonistas o bloqueadores). Una variante del Patch-clamp es la técnica *Whole cell* en modo Voltage Clamp (O pinza de voltaje de célula completa) en esta técnica se usa una micropipeta de vidrio que forma un sello hermético de gigaohmios ($G\Omega$) con la membrana celular. Esta micropipeta contiene un electrodo bañado en una solución electrolítica que permite la conducción de iones. Mientras el microelectrodo está sellado a la membrana celular (*cell attached*), el parche o sello puede romperse dando al electrodo acceso eléctrico a toda la célula (*whole cell*), lo que permite controlar el voltaje transmembrana y evaluar el paso de iones a través de los canales iónicos presentes en la membrana celular, lo que vendría siendo la suma de todas las corrientes iónicas (Kornreich BG., 2007).

Esta configuración básicamente permite el acceso directo al citoplasma de la célula, de tal forma que la solución interna contenida en la pipeta automáticamente reemplaza el contenido del citoplasma de la célula, por lo cual es de gran importancia que las concentraciones presentes en la

solución interna correspondan a las concentraciones fisiológicas para no estresar a las neuronas en el momento de obtener esta configuración de *whole cell*.

El Patch clamp aporta resultados valiosos sobre el comportamiento biofísico de las células (registros electrofisiológicos), sin embargo, la técnica en sí, presenta una serie de retos técnicos, como el estandarizar las condiciones para hacer micropipetas de registro empleadas en dichos registros. Las micropipetas deben tener resistencias específicas que permitan generar un contacto adecuado con la membrana celular, así, mediante el proceso de estandarización se logró la obtención de micropipetas de resistencia entre 2.5-4.0 M Ω al ser llenadas con la solución interna. Micropipetas con valores de resistencia cercanos a los 3.5 M Ω fueron las más favorables para lograr el sello de alta resistencia con la membrana de las neuronas. Otros retos técnicos en el desarrollo del Patch clamp incluyen el controlar el ruido eléctrico y mecánico que puede afectar la estabilidad del sello y la detección eficiente de las pequeñas señales eléctricas de las neuronas.

Las células neuronales por su parte representan una de las condiciones más críticas para la obtención de resultados, en este caso representados como registros electrofisiológicos. Si las neuronas de hipocampo se mantienen en condiciones óptimas, sus procesos de funcionamiento celular y morfología en general permite tener membranas celulares bastante estables y aptas para lograr los sellos de alta resistencia. Como se aprecia en la Figura 4A, a pesar de que las neuronas se observan en buenas condiciones, la membrana de la neurona seleccionada para el registro electrofisiológico no es estable al momento de realizar el acercamiento con la micropipeta, por lo tanto, la célula se lisa y la membrana es succionada fácilmente por la micropipeta. Lo anterior indica que dicho cultivo fue sometido a algún tipo de estrés, en este caso las condiciones de incubación (problemas con la inyección de CO₂) fueron críticas para tener neuronas en muy buenas condiciones. Pero en neuronas viables (Figura 4B), se logró el sello de alta resistencia y conseguir el acceso eléctrico a la célula. Sobre el día 10 *in vitro* se logró realizar el mejor Patch clamp, con una estabilidad del sello entre la membrana y la pipeta de cerca de 60 minutos.

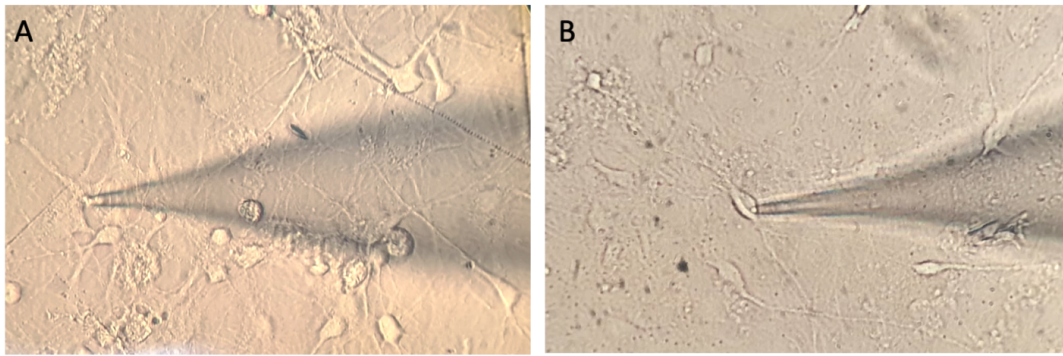


Figura 4. Estabilidad de la membrana celular de neuronas durante el sello de alta resistencia. A) Neurona lisada y succionada por la punta de la micropipeta. B) Neurona spindle que permitió tener un sello de alta resistencia y posteriormente el whole cell. En los dos casos se observa la sombra de la micropipeta.

Los resultados del registro electrofisiológico de la neurona presentada en la figura 4B, muestran corrientes de entrada de calcio a través del NMDAR (Figura 5). La presencia en la solución externa de una serie de bloqueadores para canales de calcio, sodio, cloro y otros canales ionotrópicos, garantizó tener señales (corrientes) que corresponden solamente al NMDAR, son además, corrientes evocadas gracias a la aplicación del agonista NMDA (250 μM) y co agonista Glicina (50 μM), los cuales fueron aplicados solo una vez al inicio de cada registro. En la Figura 5, se muestran cuatro registros obtenidos de la misma célula, con variación en la frecuencia de aparición de las señales o corrientes de cada registro claramente distinguibles en relación a la línea base. En el caso del primer registro solo hubo una corriente de entrada en 40 segundos de grabación (Figura 5A), un comportamiento similar se ve en el cuarto registro (Figura 5D). Por su parte, el segundo registro muestra tres corrientes de entrada cada una sobre los 27 segundos (Figura 5B) y el tercer registro muestra cuatro corrientes (Figura 5C), separadas entre sí a los 18, 23 y 26 segundos. La frecuencia de las corrientes iónicas que se observan en los registros pueden ser debidas a procesos de activación, disociación y desensibilización del NMDAR por la presencia sostenida de NMDA/Glicina (Nahum-Levy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2020). La desensibilización

es una reducción en la respuesta en presencia de un estímulo sostenido, por lo que el receptor no permite el flujo iónico a pesar de que la molécula agonista permanezca unida (Nahum-Levy *et al.*, 2001). Todas las señales presentan cinéticas de apertura y cierre características del NMDAR (Paoletti *et al.*, 2013), con aperturas de entre 1 y 2 segundos. La señal con una cinética de cierre más lenta corresponde a la primera señal del segundo registro (Figura 5C), todas las demás señales presentaron cinéticas más rápidas.

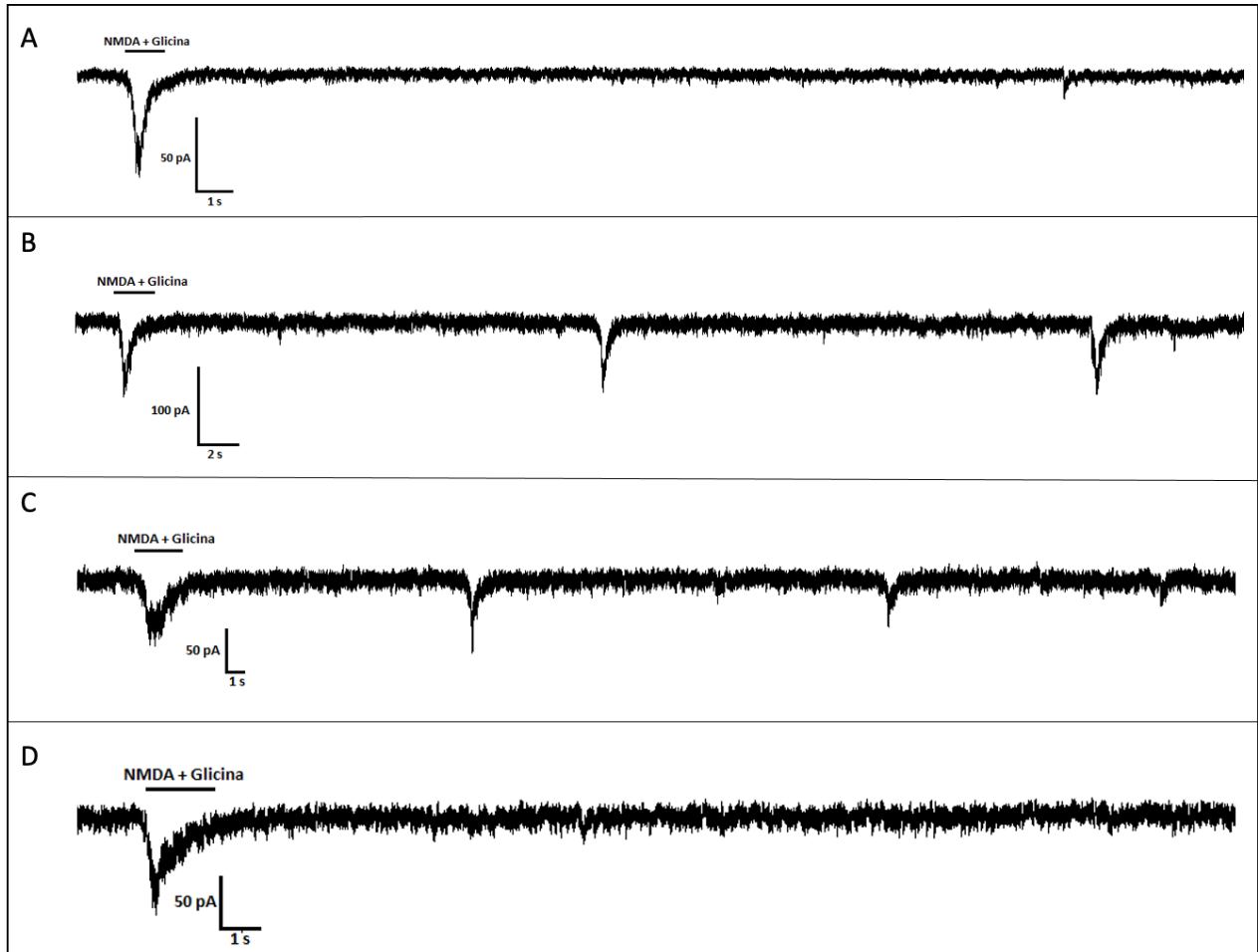


Figura 5. Corrientes de calcio evocadas del NMDAR. A) Primer registro en el que se observa solo una señal. B) Segundo registro. Se observan tres señales con una escala temporal similar entre ellas. C) Tercer registro, en dónde se aprecia claramente tres señales y una cuarta de muy baja amplitud. D) Cuarto registro, se observa una sola señal. A los 30 segundos de inicio de cada registro se realizó una aplicación de NMDA y Glicina para lograr la activación del canal.

En relación a la amplitud de las corrientes obtenidas, se observa en todos los casos que no superan los 100 pA, en la figura 6, se puede apreciar que el segundo registro presentó corrientes por encima de los 90 pA con amplitudes sostenidas a lo largo del registro. Una tendencia diferente se observa en el tercer registro dónde las amplitudes decrecen junto con el tiempo de aparición de la respuesta, este comportamiento puede estar asociado al proceso de desensibilización comentado anteriormente. Es interesante el tiempo de recuperación de la neurona para la activación de la señal, como se observa en el cuarto registro donde la amplitud máxima de la corriente llega a los 89.4 pA.

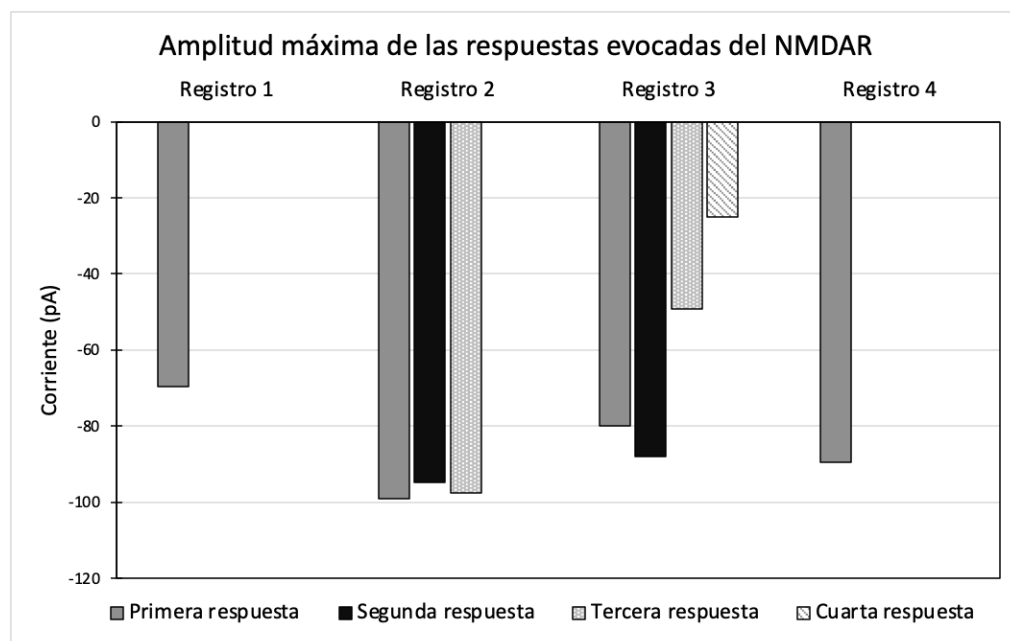


Figura 6. Amplitud máxima de las corrientes de calcio evocadas del NMDAR. Se muestra el comportamiento de cada registro electrofisiológico. Las corrientes se presentan de forma negativa debido a la adquisición de la señal o inward.

Todas las corrientes de calcio presentadas anteriormente servirán como controles para la evaluación del péptido Pb53a.

Por otra parte, se realizó la puesta a punto de un sistema de perfusión (ALA Scientific Instruments VC₃ 4), equipo que fue adquirido e implementado en el laboratorio de Potenciales extracelulares para lograr una rápida y eficiente aplicación de estímulos, lo que permitirá hacer la evaluación del

efecto del péptido Pb53a sobre la actividad del NMDAR en neuronas hipocampales.

2.3. Medición de la viabilidad celular de neuronas hipocampales en presencia del péptido Pb53a.

El ensayo de MTT se utiliza para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal amarilla de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán púrpura por células metabólicamente activas (Riss *et al.*, 2013). Las células viables contienen enzimas oxidoreductasa dependientes de NAD(P)H que reducen el MTT a formazán. Los cristales de formazán insolubles se disuelven usando una solución de solubilización y la solución coloreada resultante se cuantifica midiendo la absorbancia a 570 nm. Cuanto más oscura sea la solución, mayor será el número de células metabólicamente activas viables.

Los resultados del ensayo de viabilidad celular a partir de las absorbancias y los datos normalizados (Figura 7), indican que el péptido Pb53a en el rango de concentraciones 200-12.5 μM no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad celular de las neuronas de hipocampo de rata (DIV 8). Si bien en la figura 7A, se observa que en la concentración de 50 μM hay una ligera reducción de la absorbancia en relación con el control negativo, el análisis estadístico mediante la prueba t indica que no hay diferencias significativas, como sí ocurre entre el control positivo y el control negativo.

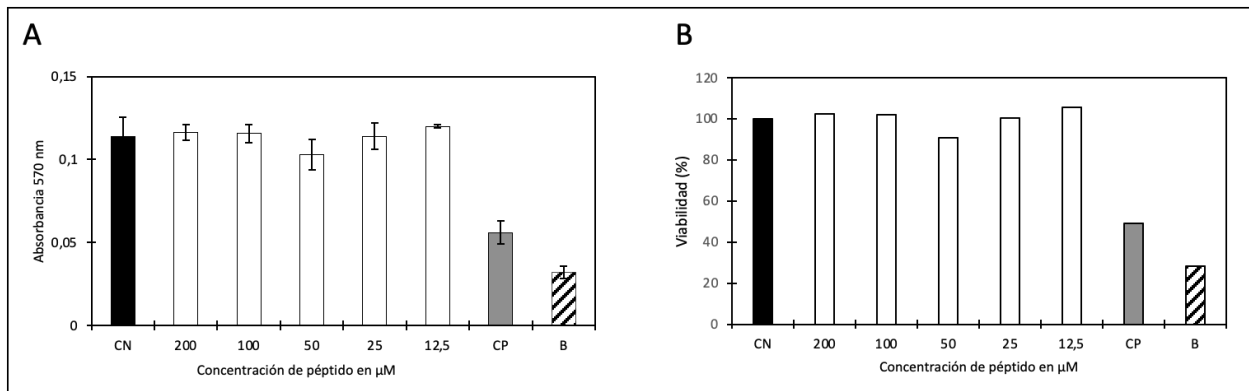


Figura 7. Efecto del péptido Pb53a sobre la viabilidad celular de neuronas hipocámpales. A) Se representan los valores de absorbancia a 570 nm para el control negativo (CN), concentraciones del péptido en el rango de 200-12.5 μM , Control Positivo (CP) y Blanco (B), el cual alcanza a absorber a 570 nm. B) Porcentaje de viabilidad celular. Los valores de absorbancia fueron normalizados teniendo en cuenta al control negativo como el 100% de viabilidad celular.

Los resultados de viabilidad celular en neuronas son congruentes con lo reportado por Bermúdez S y Reyes-Guzmán en la línea celular HEK293, dónde en el mismo rango de concentraciones el péptido Pb53a no generó un impacto significativo sobre la viabilidad celular de la línea. Por tanto, se puede considerar que el péptido Pb53a en las condiciones probadas es seguro y puede usarse en la evaluación electrofisiológica del NMDAR sin afectar la viabilidad de las neuronas más allá de las implicaciones inherentes al Patch Clamp y al posible efecto antagonista del péptido ya que es derivado de una toxina de origen animal con blanco el NMDAR.

3. Conclusiones

- Se obtuvieron cultivos primarios de neuronas hipocampales de hasta 28 días *in vitro* (DIV 28), en los que se identificaron los principales tipos de neuronas (*spindle* y piramidales) con un desarrollo morfológico correspondiente a las etapas normales reportadas para este tipo de células en cultivo.
- Si bien las neuronas presentan buen aspecto al observarlas al microscopio como birrefringencia, membrana lisa y libres de contaminación, son altamente sensibles a ligeros cambios en las condiciones de mantenimiento y por consiguiente generando limitaciones al momento de obtener registro electrofisiológicos.
- Se logró obtener corrientes evocadas del receptor NMDA en configuración *cell attached* y *whole cell* con amplitudes cercanas a los 100 pA, estas corrientes servirán como controles para la evaluación del efecto del péptido Pb53a sobre la actividad del receptor.
- Se espera mejorar las condiciones en el mantenimiento de los cultivos primarios para lograr sellos de alta resistencia más estables y por consiguiente mejoras en la detección de las señales electrofisiológicas (amplitud y cinética).
- El péptido Pb53a en el rango de concentraciones 200-12.5 μ M no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad celular de las neuronas de hipocampo de rata.
- De acuerdo con los resultados de la viabilidad celular de las neuronas en presencia del péptido Pb53a, se sugiere que este péptido es seguro para las mediciones en torno a la actividad eléctrica de las neuronas.

4. Recomendaciones

El trabajo experimental asociado a mediciones biofísicas usando electrofisiología es altamente demandante, así como el uso en el área biológica de cultivos celulares que pueden ser afectados por varios factores, lo anterior genera retrasos en los procesos de investigación. En el contexto del presente trabajo de grado se ha tenido varios retratos, sin embargo, se tiene la expectativa de poder presentar registros electrofisiológicos del NMDA en presencia del péptido Pb53a por lo que se continuará con la investigación.

5. Agradecimientos

Al proyecto “Diseño, síntesis y evaluación de péptidos moduladores de la actividad del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA)”, código 57069, financiado por Minciencias, por los recursos aportados para el desarrollo de este trabajo de grado. Agradezco a mis directores el Dr. Edwin Alfredo Reyes y la Dra. Maria Elisa Forero por las asesorías, guías y apoyo que me brindaron durante todo este proceso, de igual manera agradezco al grupo de investigación de Biología celular y Funcional e Ingeniería de Biomoléculas en la línea de investigación de Biología de Membranas: Canales Iónicos y Modelos de Fisiopatologías Celulares de la Universidad Antonio Nariño por brindarme los medios para realizar este proyecto.

A todos los profesores que me proporcionaron los conocimientos necesarios para llegar hasta este punto.

A mi mamá Amparo Vanegas, mi papá Juan Villate, mi abuela Cecilia Palacio, mi abuelo Oscar Villate, a toda mi familia y amigos de la infancia que me acompañaron en este proceso de formación, por el apoyo incondicional que me brindaron durante todo este largo pero satisfactorio proceso animandome y aconsejandome a perseguir mis sueños, a nunca decaer sin importar que tan mal puedan llegar a estar las cosas, y por último pero no menos importante agradezco enormemente a mis amigos que conocí y me acompañaron durante mi proceso de formación como bioquímica por brindarme no solo el apoyo académico sino también moral especialmente en los últimos semestres.

Referencias

- Albensi, B. C. (2007). The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. *Current pharmaceutical design*, 13(31), 3185-3194.
- Baez, S. D. L. C., García del Barco, D., Hardy-Sosa, A., Guillen Nieto, G., Bringas-Vega, M. L., Llibre-Guerra, J. J., & Valdes-Sosa, P. (2021). Scalable Bio marker combinations for early stroke diagnosis: A systematic review. *Frontiers in neurology*, 12, 638693.
- Beaudoin, G. M., Lee, S. H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y. G., Reichardt, L. F., & Arikath, J. (2012). Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature protocols*, 7(9), 1741-1754.
- Bermúdez Urrego, Y. S. (2022). Evaluation of the effect of the Pb53a a synthetic peptide obtained from toxins of the spider *Phoneutria boliviensis* on the cell viability of the HEK293 line.
- Bermudez, S and Reyes-Guzman EA. (2020). Tesis de pregrado. Evaluation of the effect of the Pb53a, a synthetic peptide obtained from toxins of the spider *Phoneutria boliviensis* on the cell viability of the HEK-293 line
- Bleich, S., Römer, K., Wiltfang, J., & Kornhuber, J. (2003). Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *International journal of geriatric psychiatry*, 18(S1), S33-S40.
- Bogin, O. (2005). Venom peptides and their mimetics as potential drugs. *Modulator*, 19(9), 14-20.
- Brewer, G. J. Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in b27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, 35, 567-76.

- Carvajal, J and Reyes-Guzman EA. (2020). Tesis de pregrado. In silico analysis of the interacción of peptides derived from the Ctenitoxin-Pb48 and Ctenitoxin-Pb53 toxins of the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* with the NMDA receptor.
- Chen, Y. S., Tu, Y. C., Lai, Y. C., Liu, E., Yang, Y. C., & Kuo, C. C. (2020). Desensitization of NMDA channels requires ligand binding to both GluN1 and GluN2 subunits to constrict the pore beside the activation gate. *Journal of Neurochemistry*, 153(5), 549-566.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Laboratory animals*, 30(4), 293–316.
- Cull-Candy, S., Brickley, S. y Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Opinión actual en neurobiología*, 11 (3), 327-335.
- Donnan, G. A., Fisher, M., Macleod, M., & Davis, S. M. (2008). Stroke. *Lancet (London, England)*, 371(9624), 1612-1623.
- Estrada-Gomez, S., Vargas Munoz, L. J., Lancho, P., & Segura Latorre, C. (2015). Partial characterization of venom from the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* (Aranae: Ctenidae). *Toxins*, 7(8), 2872-2887.
- Feigin, V. L., Forouzanfar, M. H., & Krishnamurthi, R. (2014). Carga global y regional de accidente cerebrovascular durante 1990-2010: resultados del estudio Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 383, 245.
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurología*, 27(5), 301-310.

- Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*, 20(1), 122-128.
- Fouilloux, C., Contreras, F., Rivera, M., Terán, A., & Velasco, M. (2004). Receptores de glutamato: Implicaciones terapéuticas. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 23(2), 99-108.
- Fulop, F., Szatmári, I., Vámos, E., Zádori, D., Toldi, J., & Vécsei, L. (2009). Syntheses, transformations and pharmaceutical applications of kynurenic acid derivatives. *Current medicinal chemistry*, 16(36), 4828-4842.
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., & Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438 (7065), 185–192.
- Furukawa, H., & Gouaux, E. (2003). Mechanisms of activation, inhibition, and specificity: Crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO Journal*, 22(12), 2873–2885.
- Gao, C., Gill, M. B., Tronson, N. C., Guedea, A. L., Guzmán, Y. F., Huh, K. H., ... & Radulovic, J. (2010). Hippocampal NMDA receptor subunits differentially regulate fear memory formation and neuronal signal propagation. *Hippocampus*, 20(9), 1072-1082.
- Gaspar Toro, J. M. (2019). El papel de la neuroglia después de un accidente cerebrovascular isquémico: una revisión sistemática a partir de un modelo integrador. *Departamento de Ciencias Fisiológicas*.
- Gass, JT y Olive, MF (2008). Sustratos glutamatérgicos de la drogadicción y el alcoholismo. *Farmacología bioquímica*, 75 (1), 218-265.
- Gilquin, B., Bourgoïn, M., Ménez, R., Le Du, M. H., Servent, D., Zinn-Justin, S., & Ménez, A. (2003). Motions and structural variability within toxins: implication for their use as scaffolds for protein engineering. *Protein science*, 12(2), 266-277.

- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, 391(2), 85-100.
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in neurosciences*, 26(2), 81-89.
- Hardingham, GE (2009). Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Transacciones de la Sociedad Bioquímica* , 37 (6), 1147-1160.
- Hardingham, GE, Fukunaga, Y. y Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDAR oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Neurociencia de la naturaleza* , 5 (5), 405-414.
- Hassel, B., Tessler, S., Faull, R. L., & Emson, P. C. (2008). Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurochemical research*, 33(2), 232-237.
- Herman, Moreno y Moreno, Carlos B .. (2005). Transmisión sináptica-canales de calcio y liberación de neurotransmisores. *Revista Ciencias de la Salud* , 3 (1), 47-61.
- Iwasa, K., Ehrenstein, G., Moran, N., & Jia, M. (1986). Evidence for interactions between batrachotoxin-modified channels in hybrid neuroblastoma cells. *Biophysical journal*, 50(3), 531-537.
- Johnson, JW y Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Naturaleza* , 325 (6104), 529-531.
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols*, 1(5), 2406-2415.
- Kornreich, B. G. (2007). The patch clamp technique: principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1), 25-37.

- Lai, TW, Shyu, WC y Wang, YT (2011). Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Tendencias en medicina molecular* , 17 (5), 266-275.
- Leveille, F., Gaamouch, FE, Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O. y Buisson, A. (2008). Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *El Diario FASEB* , 22 (12), 4258-4271.
- Li V, Wang YT. Molecular mechanisms of NMDA receptor-mediated excitotoxicity: implications for neuroprotective therapeutics for stroke. *Neural Regen Res.* 2016 Nov;11(11):1752-1753.
- Llansola, M., Sanchez-Perez, A., Cauli, O., & Felipo, V. (2005). Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *The Cerebellum*, 4(3), 154-161.
- Longart, M., Liu, Y., Karavanova, I., & Buonanno, A. (2004). Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 472(2), 156-172.
- Luna Leal, A., & LUNA LEAL, A. L. D. O. (2016). *Estudio de la D-Tubocurarina sobre las corrientes activadas por NMDA en neuronas agudamente disociadas de núcleo estriado de rata* (Bachelor 's thesis).
- Lynch, D. R., & Guttman, R. P. (2001). NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Current drug targets*, 2(3), 215-231.
- MacDougall, G., Anderton, R. S., Mastaglia, F. L., Knuckey, N. W., & Meloni, B. P. (2019). Mitochondria and neuroprotection in stroke: Cationic arginine-rich peptides (CARPs) as a novel class of mitochondria-targeted neuroprotective therapeutics. *Neurobiology of Disease*, 121, 17-33.
- Mansbach, R. A., Travers, T., McMahon, B. H., Fair, J. M., & Gnanakaran, S. (2019). Snails in silico: A review of computational studies on the conopeptides. *Marine drugs*, 17(3), 145.

- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, *309*(5965), 261-263.
- M.A. Raghanti, ... P.R. Hof, in *Evolution of Nervous Systems (Second Edition)*, 2017
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, *130*, 1007S-15S.
- Michaelis, E. K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in neurobiology*, *54*(4), 369-415.
- Monaghan, D. T., Irvine, M. W., Costa, B. M., Fang, G., & Jane, D. E. (2012). Pharmacological Modulation of NMDA Receptor Activity and the Advent of Negative and Positive Allosteric Modulators. *Neurochemistry International*, *61*(4), 581–592.
- Moreno-González, G., & Zarain-Herzberg, A. (2006). Papel de los receptores de glutamato durante la diferenciación neuronal. *Salud mental*, *29*(5), 38-48.
- Nahum-Levy, R., Lipinski, D., Shavit, S., & Benveniste, M. (2001). Desensitization of NMDA receptor channels is modulated by glutamate agonists. *Biophysical Journal*, *80*(5), 2152-2166.
- Nowak, L. P. P. A. A., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, *307*(5950), 462-465.
- Oreiro García, M. T. (2006). Estudio electrofisiológico y neuroquímico del efecto de la eslicarbazepina acetato, un nuevo fármaco antiepiléptico, sobre las crisis inducidas por la Latrunculina A.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(6), 383-400.

- Pennington, M. W., Czerwinski, A., & Norton, R. S. (2018). Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(10), 2738-2758.
- Prieto-Arribas, R., Moreno-Gutiérrez, A., Simal-Hernández, P., Pascual-Garvi, J. M., Matías-Guiu, J., Roda, J. M., & Barcia-Albacar, J. A. (2008). Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev Neurol*, 47(08), 414.
- Puentes Madera, I. C. (2014). Epidemiología de las enfermedades cerebrovasculares de origen extracraneal. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vascul*, 15(2), 66-74.
- Rajendra, W., Armugam, A., & Jeyaseelan, K. (2004). Neuroprotection and peptide toxins. *Brain research reviews*, 45(2), 125-141.
- Rash, L. D., & Hodgson, W. C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, 40(3), 225-254.
- Reyes Guzmán, E. A., Vega Castro, N. A., & Reyes Montano, E. A. (2017). Diseño de péptidos inhibidores de interacciones de la subunidad GluN2B del receptor NMDA en isquemia. *Revista De Ciencia Y Tecnología*, 27(1), 11–22.
- Reyes-Guzman, E. A., Vega-Castro, N., Reyes-Montaño, E. A., & Recio-Pinto, E. (2017). Antagonistic action on NMDA/GluN2B mediated currents of two peptides that were conantokin-G structure-based designed. *BMC neuroscience*, 18(1), 1-13.
- Sahu, M. P., Nikkilä, O., Lågas, S., Kolehmainen, S., & Castrén, E. (2019). Culturing primary neurons from rat hippocampus and cortex. *Neuronal Signal*. 3, NS20180207.
- Scatton, B., Carter, C., Benavides, J. y Giroux, C. (1991). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: a novel therapeutic perspective for the treatment of ischemic brain injury. *Enfermedades cerebrovasculares*, 1 (3), 121-135.

- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. W. (2012). Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (65), e3634.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(3), 206-221.
- Tang, N., Wu, J., Zhu, H., Yan, H., Guo, Y., Cai, Y., ... & Lu, Y. (2018). Genetic mutation of GluN2B protects brain cells against stroke damages. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 2979-2990.
- Tomek, SE, LaCrosse, AL, Nemirovsky, NE y Olive, MF (2013). NMDA receptor modulators in the treatment of drug addiction. *Productos farmacéuticos* , 6 (2), 251-268.
- Tseng, W. P., & Lin-Shiau, S. Y. (2003). Activation of NMDA receptor partly involved in β -bungarotoxin-induced neurotoxicity in cultured primary neurons. *Neurochemistry international*, 42(4), 333-344.
- Tu W, Xu X, Peng L, Zhong X, Zhang W, Soundarapandian MM, Balel C, Wang M, Jia N, Zhang W, et al. 2010. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell*. 140:222–234.
- Tymianski M. (2011). Mecanismos emergentes de señalización celular interrumpida en isquemia cerebral. *Nat Neurosci*.
- Valencia, I., Mishra, O. P., Zubrow, A., Fritz, K., Katsetos, C. D., Delivoria-Papadopoulos, M., & Legido, A. (2006). Función del calcio en la lesión neuronal tras hipoxia o convulsiones neonatales. *Rev. neurol.(Ed. impr.)*, s11-s15.
- Villegas Bruguera, E. B. (2015). Estudio autorradiográfico de las alteraciones de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato en el sistema nervioso central en consumidores crónicos de alcohol.

- Vistica VT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 51(10):2515-20.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., ... & Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological research*, 63, S191.
- Williams, T. L., Stone, T. W., Burton, N. R., & Smith, D. A. S. (1988). Kynurenic acid and AP5 distinguish between NMDA receptor agonists. *Experimental neurology*, 102(3), 366-367.
- Wu, Q. J., & Tymianski, M. (2018). Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. *Molecular brain*, 11(1), 1-14.
- Wyllie, DJA, Livesey, MR y Hardingham, GE (2013). Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neurofarmacología* , 74 , 4-17.