



Caracterización de neuronas hipocampales a través de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Tatiana Rodríguez Velásquez

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

QUÍMICA FARMACÉUTICA

Santiago de Cali

2017

Caracterización de neuronas hipocampales a través de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Tatiana Rodríguez Velásquez

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

Álvaro Barrera Ocampo PhD.

Santiago de Cali

2017



Aprobado Por:

Juliana Rengifo Gómez PhD.

Evaluador.

Álvaro Barrera Ocampo PhD.

Tutor del proyecto.

Santiago de Cali, 9 de Agosto de 2017

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi familia, especialmente a mis padres y a mi abuela Carlina por haber sido un apoyo incondicional todos estos años de carrera y, aunque desgraciadamente ya no está con nosotros, sé que habría estado muy orgullosa de verme al fin culminar este proceso tan enriquecedor; quiero agradecer además, a la empresa Gases de Occidente S.A. ESP por haberme brindado la oportunidad de estudiar la carrera de mis sueños en la universidad de mis sueños; al profesor Álvaro Barrera por haber confiado en mí, haber tenido la paciencia que la docencia requiere y haber sido un gran apoyo durante el año que duró la elaboración de este proyecto; también quiero agradecer a la universidad Icesi por facilitar sus instalaciones para mi desarrollo profesional durante estos nueve semestres, que con gran nostalgia recuerdo pues fueron los mejores tiempos de mi vida y por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis amigos y compañeros de laboratorio que siempre estuvieron presentes en los buenos y malos días.

Tabla de contenido

RESUMEN DEL TRABAJO.....	9
Abstract.....	11
1. INTRODUCCION	12
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO.....	14
2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia:.....	14
2.2. Marco teórico y estado del arte:	16
2.3. Objetivos:.....	24
2.3.1. <i>Objetivo general:</i>	24
2.3.2. <i>Objetivos específicos:</i>	24
2.4. Metodología Utilizada:	25
2.4.1. Estandarización de los primers	25
2.4.2. Determinación de la expresión diferencial de los genes de estudio en cortes sagitales de hipocampo.	26
2.4.3. Determinación de la expresión diferencial de los genes de estudio en cortes coronales de hipocampo.....	27
2.4.3. Análisis semicuantitativo de la expresión de genes	28
2.4.4. Análisis estadístico	28
2.5. Resultados.....	29
2.6. Discusión:	33
2.7. Conclusiones:	36
2.8. Recomendaciones:	37
3.11. Bibliografía:	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Algunas enfermedades ocasionadas por anomalías en el hipocampo. Tomado de: (Strange, et al., 2014)	22
Tabla 2: Primers sintetizados para el estudio.....	25
Tabla 3: Condiciones de la RT-PCR	25
Tabla 4: Condiciones de la PCR y temperaturas de alineamiento de los primers ..	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte coronal a través del eje transversal del hipocampo. Las líneas negras trazan el clásico "bucle trisináptico". Las líneas rojas representan otras vías importantes en el hipocampo, incluyendo las proyecciones directas de la corteza entorrinal (CE) a las tres áreas CA, la retroalimentación a la CE a través del subículo, los circuitos colaterales recurrentes de CA3 y la retroalimentación de CA3 a DG. Por simplicidad, muchos otros detalles de la conectividad del hipocampo son omitidos. Tomada de (Knierim, 2015).....	16
Figura 2: comparación de la anatomía del hipocampo entre ratas, macacos y humanos. Tomada de (Strange, et al., 2014)	17
Figura 3: Modelado tridimensional de la anatomía molecular del hipocampo donde CA1 se marca en rojo, CA3 en verde y giro dentado en Amarillo. Tomada de (Thompson, et al., 2008).....	19
Figura 4: fronteras genéticas dentro de las subáreas del hipocampo. Tomado de:	19
Figura 5: Subregion-specific patterns of gene expression within the hippocampo. Tomado de:.....	21
Figura 6: Proceso de estandarización de las condiciones de amplificación de los genes MCM6, PKC δ , CCN3, β III-Tubulina y GAPDH. a) electroforesis en gel de agarosa que reúne los resultados del proceso de estandarización. b) electroforesis a partir de las cuales se obtuvo la temperatura óptima de alineamiento de cada gen de estudio	29
Figura 7: Análisis de la expresión de los genes de estudio en muestras obtenidas tras una disección sagital del hipocampo. a) imágenes representativas de las electroforesis en gel de agarosa realizadas para la determinación semicuantitativa de la expresión de los genes en cada una de las subáreas del hipocampo. b) Histogramas que permiten evidenciar la tendencia de expresión de los genes en cada una de las subáreas para PKC δ : CA3, MCMC: DG y CCN3: CA1.....	30
Figura 8: Análisis de la expresión de los genes de estudio en muestras obtenidas tras una disección coronal del hipocampo. a) imágenes representativas de las electroforesis en gel de agarosa realizadas para la determinación semicuantitativa de la expresión de los genes en cada una de las subáreas del hipocampo. b) Histogramas que permiten evidenciar la tendencia de expresión de los genes en cada una de las subáreas para PKC δ : CA3, MCMC: DG y CCN3: CA1.....	31

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Listado de genes obtenidos a partir del trabajo de (Lein, et al., 2004) ..41
Anexo 2: Detalles del análisis estadístico42

RESUMEN DEL TRABAJO

El hipocampo es una de las áreas del cerebro más extensamente investigadas, no sólo por sus características especiales, sino por las enfermedades en las que está implicado como la epilepsia del lóbulo temporal y la Enfermedad de Alzheimer (EA), entre otras. La EA es una amenaza latente para la población mundial ya que la esperanza de vida ha aumentado considerablemente; además, la obesidad y la diabetes, factores de riesgo para la aparición de la forma esporádica, son enfermedades con un alta prevalencia en la población adulta de la actualidad. Varios estudios han concluido, que la población hipocampal del subárea CA1 es más vulnerable que CA3 o el Giro dentado (DG); no solo en estudios de la EA sino en la epilepsia del lóbulo temporal, algunas formas de isquemia, entre otras enfermedades; por lo anterior, surge la pregunta de por qué esta población, incluso cuando presenta características similares a CA3, es más vulnerable a los insultos de estas enfermedades; por lo que un estudio detallado del hipocampo permitirá determinar las diferentes características, no solo fisiológicas de las diferentes poblaciones neuronales que lo componen, sino también las diferencias eléctricas, genéticas y epigenéticas, que hacen que se dé la formación y almacenamiento de memorias, la ubicación espacio-tiempo, además de determinar los factores que llevan a que se desarrollen las diferentes patologías y determinar dianas para posibles fármacos.

Para llevar a cabo estudios en las diferentes poblaciones hipocampales en la universidad Icesi, este proyecto tiene como objetivo general, establecer una herramienta molecular que permita determinar la pureza de las áreas CA1, CA3 y Giro Dentado disecadas de tejido hipocampal de rata. A partir de este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos: determinar una metodología para la extracción de RNA a partir de muestras de tejido hipocampal de rata, las condiciones óptimas para la detección de los genes de estudio mediante RT-PCR y la relación entre la magnitud de la expresión del gen de estudio y el área del tejido hipocampal en la cual se expresa.

Investigaciones realizadas por otros grupos establecen que los genes PKC δ , CCN3 y MCM6 se expresan de manera restrictiva, es decir únicamente, en las subáreas CA3, CA1 y DG respectivamente. A partir de un corte tanto sagital como coronal, se obtuvo como resultados para este proyecto, que MCM6 se expresa de manera casi uniforme en las 3 subáreas, CCN3 se expresa mayoritariamente en CA1 y PKC δ , contrario a lo indicado en otros estudios, se expresa mayoritariamente en CA1. Por lo anterior se concluyó que no se logró establecer una herramienta molecular que permita marcar límites entre las subáreas CA1, CA3 y Giro Dentado de forma que sirvan como un marco de referencia para futuros estudios, principalmente porque el estudio se llevó a cabo en ratas P2 y

P8, donde la expresión de los genes de estudio no sigue el patrón descrito en otros trabajos, por lo cual deberá llevarse a cabo experimentos posteriores con animales al menos P14 y evaluar un conjunto de genes diferente.

Palabras clave: hipocampo, PKC δ , CCN3, MCM6

Abstract

The hippocampus is one of the brain areas most extensively investigated, not only for its special characteristics, but also for the diseases in which it is involved such as temporal lobe epilepsy and Alzheimer's disease (AD), among others. AD is a latent threat to the world population as life expectancy has increased considerably, and obesity and diabetes, risk factors for the appearance of the sporadic form of the disease, are diseases with a high prevalence in the adult population nowadays. Several studies have concluded that the hippocampal population of CA1 subarea is more vulnerable than CA3 or Dentate Girus (DG), not only in AD studies but in temporal lobe epilepsy, some forms of ischemia, among other diseases; Therefore the question arises as why this neuronal population, even when it presents similar characteristics to CA3, is more vulnerable to the insults of these diseases; So a detailed study of the hippocampus will allow to determine the different physiological characteristics of the different neuronal populations that compose it, but also the electrical, genetic and epigenetic differences that cause the formation and storage of memories, space-time navigation and find out the factors that lead to the development of different pathologies and identify targets for possible drugs.

In order to carry out studies in the different hippocampal populations at Icesi University, this project aims to establish a molecular tool to determine the purity of the CA1, CA3 and DG areas dissected from rat hippocampal tissue. From this general objective the following specific objectives were set: to determine a methodology for the extraction of RNA from samples of rat hippocampal tissue, the optimal conditions for the detection of study genes by RT-PCR and the relationship between the magnitude of the expression of the study gene and the area of hippocampal tissue in which it is expressed.

The theory states that the genes PKC δ , CCN3 and MCM6 are expressed restrictively, what means only in the sub-areas CA3, CA1 and DG respectively. From a sagittal as well as a coronal section, the results that were obtained for this project were that MCM6 is almost uniformly expressed in the 3 subareas, CCN3 is expressed mainly in CA1 and PKC δ , contrary to what the theory indicates, it is expressed mainly in CA1. Therefore, it was concluded that it was not possible to establish a molecular tool to mark the boundaries between the CA1, CA3 and DG subareas in order to serve as a frame of reference for future studies, mainly because the study was carried out in P2 and P8 rats where the expression of the study genes does not follow the pattern described in the theory, whereby further experiments with at least P14 animals should be carried out and with a different set of genes.

Key words: hippocampus, PKC δ , CCN3, MCM6

1. INTRODUCCION

La EA es una patología caracterizada por el deterioro de la memoria y otros dominios cognitivos, que lleva a la muerte del paciente de 6 a 9 años tras el diagnóstico (Querfurth & LaFerla, 2010). Esta enfermedad tiene dos formas, una esporádica y una familiar; el principal factor de riesgo para presentar la forma esporádica de la EA es la edad, además se ha demostrado que condiciones como la obesidad y la diabetes, por mecanismos aún desconocidos, parecen contribuir al padecimiento de la EA en la vejez (Carrillo, 2015).

El estudio de esta enfermedad a lo largo de los años, ha develado varias lesiones histológicas características de la EA como son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, la acumulación de estas estructuras en el cerebro resulta en daño oxidativo e inflamación, lo cual conduce a un déficit energético y por último la disfunción sináptica que llevará a la neurona a la muerte (Querfurth & LaFerla, 2010).

Estudios neuropatológicos han demostrado que la formación hipocampal (incluida la corteza entorrinal) es uno de los primeros sitios en desarrollar neurodegeneración en la EA, en particular, las neuronas piramidales CA1 son selectivamente vulnerables a la neurodegeneración, y presentan ovillos neurofibrilares en las primeras etapas de la EA. Debido a la especificidad celular de la neurodegeneración en la EA, es probable que los estudios llevados a cabo con células individuales o una población homogénea de células (denominada análisis de población celular) sean más informativos que los análisis regionales o globales que contienen una mezcla de células neuronales y no neuronales (Ginsberg, et al., 2012).

Para este enfoque de investigación del hipocampo, se deberá realizar una microdissección al hipocampo de rata de manera que se obtenga CA1, CA3 y Giro Dentado (DG) por separado; esta microdissección se lleva a cabo manualmente con la ayuda de pinzas, bisturí y un estereoscopio, de manera que la probabilidad de tener contaminación entre los cortes es alta; por lo cual, será de vital necesidad una herramienta que permita determinar, no solo si existe contaminación entre los cortes, sino también determinar la proporción en que se encuentra la población neuronal de estudio con respecto a las células no neuronales que también conforman el tejido.

Por lo anterior, el objetivo general de este proyecto fue establecer una herramienta molecular que permita determinar la pureza de las áreas CA1, CA3 y DG disecadas de tejido hipocampal de rata; a partir de este se plantearon los siguientes objetivos específicos: determinar una metodología para la extracción de RNA a partir de muestras de tejido hipocampal de rata; determinar las

condiciones óptimas para la detección de los genes de estudio mediante RT-PCR y determinar la relación entre la magnitud de la expresión del gen de estudio y el área del tejido hipocampal en la cual se expresa; de manera que el gen NOV se exprese únicamente en los cortes de CA1, PKC δ en CA3 y MCM6 en DG; además, la expresión de los genes GAPDH y β III-Tubulina permitirán determinar la proporción que existe entre células neuronales y no neuronales.

Para esto, se tomaron ratas Wistar de dos y ocho días post natales, se extrajo el hipocampo y se obtuvo el RNA, mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se obtuvo cDNA a partir del RNA extraído con anterioridad y se determinó la temperatura óptima de amplificación de los diferentes genes a evaluar, los cuales fueron elegidos de acuerdo con las investigaciones llevadas a cabo por Lein y colaboradores (Lein, et al., 2004); habiendo establecido las temperaturas, se extrajo por triplicado el RNA de las diferentes áreas del hipocampo y se analizó semicuantitativamente el patrón de expresión de los genes NOV, MCM6 y PKC δ mediante el programa Image J.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia:

El principal factor de riesgo para presentar la forma esporádica de la EA es la edad, además estudios recientes han develado que la obesidad, la vida sedentaria y la diabetes predisponen al paciente a la enfermedad (Carrillo, 2015). Con el avance de la tecnología y el aumento en la esperanza de vida, además de los hábitos de vida poco saludables del ciudadano común, no es difícil pensar que la EA será un problema de salud pública en los próximos años; en la actualidad, más de 5 millones de norteamericanos padecen esta enfermedad y se ha demostrado que ha cobrado más vidas que el cáncer de seno y de próstata; se estima que para el año 2050 en los Estados Unidos, una persona desarrollará la enfermedad cada 33 segundos. También es necesario tener en cuenta que esta enfermedad aún no cuenta con una cura (2016 Alzheimer's disease facts and figures, 2017).

La EA es una enfermedad neurodegenerativa, las cuales se caracterizan por desarrollarse en puntos específicos del cerebro; en el caso de la EA su punto específico de desarrollo es el hipocampo, especialmente el área CA1. El enigma de esta vulnerabilidad selectiva aún es un misterio para los investigadores; por lo anterior, ha surgido la necesidad de estudiar el hipocampo más profundamente y, más aún, estudiar las diferentes subáreas que lo componen, pues a partir de un estudio profundo de estas poblaciones neuronales, se podría elucidar el mecanismo molecular que pueda explicar la vulnerabilidad selectiva de las neuronas de CA1 o el mecanismo que protege a las neuronas de las áreas CA3 y DG, de manera que se llegue a un mayor entendimiento de la enfermedad y se pueda plantear nuevas estrategias para su tratamiento o incluso una cura.

Para el estudio detallado del hipocampo se debe se ha planteado que se debe microdisectar el Asta de Amón (CA1 y CA3) y DG; este procedimiento se puede llevar a cabo con novedosos instrumentos como los microscopios de microdissección láser, pero la Universidad Icesi aún no cuenta con este equipo, por lo cual la disección se llevó a cabo manualmente con la ayuda de un estereoscopio. Durante el proceso de disección existe la probabilidad de contaminación entre las diferentes subregiones, por lo cual es imperativo implementar una herramienta que permita determinar el grado de contaminación de los cortes obtenidos; de manera que, cuando se lleven a cabo estudios moleculares sobre estas áreas, se tenga certeza de que los resultados son representativos de la población neuronal que se esté estudiando.

A partir de esta problemática, surge la necesidad de desarrollar este proyecto pues se emplea la expresión diferencial de genes como herramienta para

determinar tanto la contaminación que pueda haberse dado en el proceso de microdissección, como la proporción que existe entre células neuronales y no neuronales así; los genes NOV, MCM6 y PKC δ sirven para identificar las poblaciones hipocampales CA1, DG y CA3, respectivamente; y los genes GAPDH y β III-Tubulina, como genes Housekeeping o genes constitutivos, se emplean para determinar la proporción de células no neuronales y neuronales en la muestra, respectivamente.

Con el desarrollo de estas herramientas, la investigación de la vulnerabilidad de poblaciones hipocampales a la EA, llevada a cabo en la Universidad Icesi, se podrá llevar a un mayor nivel de detalle, pues el análisis de los resultados se podrá ejecutar teniendo en cuenta tanto la pureza de la muestra, como la proporción de las neuronas de interés en esta, lo que permitirá al investigador determinar si los resultados obtenidos son representativos de la población neuronal de estudio o no.

2.2. Marco teórico y estado del arte:

El hipocampo es una de las estructuras cerebrales más ampliamente estudiada. Desde el descubrimiento accidental de su rol en la memoria, ha sido centro de numerosas investigaciones que buscan establecer las bases celulares y moleculares de dicha función neurológica. Estas investigaciones llevaron al descubrimiento de la potenciación a largo plazo en el hipocampo, el principal modelo de las bases celulares de la memoria. Además, el descubrimiento de diferentes células (como *neuronas piramidales, granulares, astrocitos, microglia, interneuronas*) en la formación hipocampal de roedores, estableció fundamentos firmes para la afirmación de que el hipocampo juega un papel crítico en la formación de la memoria, proveyendo al cerebro un marco de referencia espaciotemporal dentro del cual los componentes sensitivos, emocionales y cognitivos de una experiencia se unen. Este marco de referencia permite almacenar la experiencia de tal manera que pueda recuperarse posteriormente como un recuerdo consciente de esa experiencia (Knierim, 2015).

En humanos, el hipocampo es una estructura elongada, ubicada en lo más profundo del lóbulo medial temporal, al ser disecado groseramente se asemeja al caballito de mar por lo cual se le nombro en su honor (*Genus hippocampus*). En roedores, el hipocampo es una estructura relativamente larga, en forma de marañón, situado justo debajo del neocórtex. Una sección transversal de su eje longitudinal revela la descripción clásica de los libros de la conectividad anatómica del hipocampo, el llamado "bucle trisináptico" (trisynaptic loop) como se observa en la figura 1; Los mismos circuitos intrínsecos básicos se mantienen a lo largo del eje largo y a través de las especies como se ve en la figura 2, donde se hace una comparación entre el hipocampo en humanos, macacos y roedores.

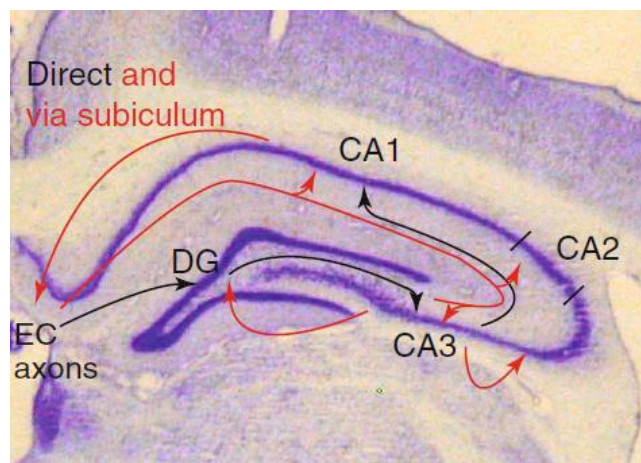


Figura 1: Corte coronal a través del eje transversal del hipocampo. Las líneas negras trazan el clásico "bucle trisináptico". Las líneas rojas representan otras vías importantes en el hipocampo, incluyendo las proyecciones directas de la corteza

entorrinal (CE) a las tres áreas CA, la retroalimentación a la CE a través del subículo, los circuitos colaterales recurrentes de CA3 y la retroalimentación de CA3 a DG. Por simplicidad, muchos otros detalles de la conectividad del hipocampo son omitidos. Tomada de (Knierim, 2015)

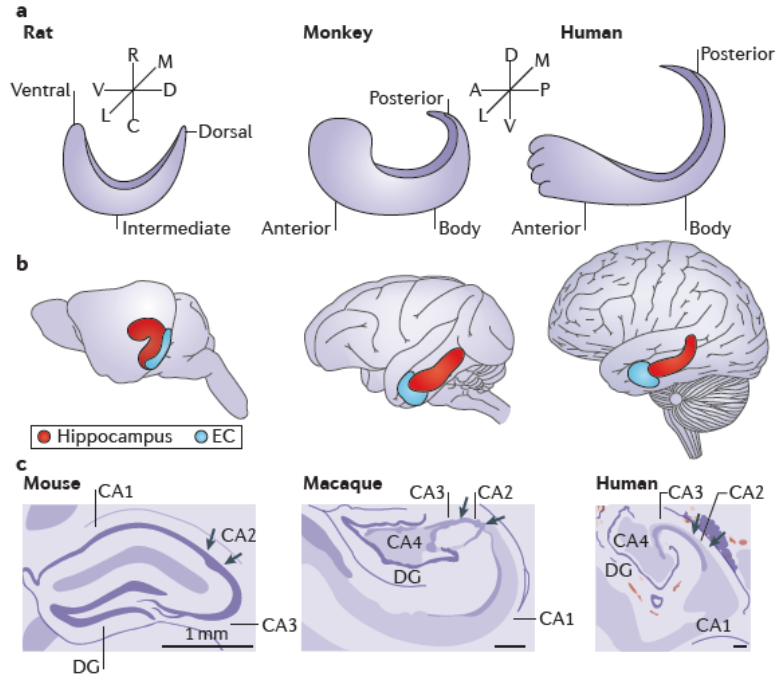


Figura 2: comparación de la anatomía del hipocampo entre ratas, macacos y humanos. Tomada de (Strange, et al., 2014)

La corteza entorrinal proporciona la principal entrada cortical al hipocampo, con sus proyecciones más fuertes a través de la vía perforante a la región del giro dentado (DG) (sinapsis 1), DG se proyecta a la región CA3 a través de la vía de la fibra musgosa (mossy fiber) (sinapsis 2) y CA3 se proyecta a la región CA1 a través de la vía Schaffer Colateral (sinapsis 3); por último, CA1 se proyecta de nuevo a la corteza entorrinal para completar el bucle. Una adición importante al circuito trisináptico clásico es que los axones de CA3, además de sus proyecciones a CA1, envían colaterales que hacen sinapsis a otras neuronas CA3. Esta vía colateral recurrente inspiró una serie de teorías influyentes de CA3 como sistema de memoria auto asociativo, mostrando dinámicas atractoras que son críticas para soportar una memoria distribuida (Knierim, 2015).

Originalmente se creía que el circuito unidireccional del bucle trisináptico estaba principalmente contenido dentro de una sección transversal (o lamela) del hipocampo. La "hipótesis lamelar" propuso que el hipocampo se estructura como una pila de estas lamelas, organizadas como módulos independientes y funcionales a lo largo del eje longitudinal del hipocampo. Sin embargo, los estudios modernos de rastreo anatómico han revelado una conectividad

generalizada a lo largo del eje longitudinal, mostrando que las rebanadas transversales (secciones transversales, como en la Figura 1) a través del hipocampo no son funcionalmente independientes. La conectividad dentro del eje transversal es también más compleja, con múltiples circuitos de procesamiento en paralelo y circuitos de retroalimentación. La corteza entorrinal se proyecta no sólo a DG, sino también directamente a las regiones CA3 y CA1. CA3 proporciona una proyección de retroalimentación a DG, a través de las células musgosas excitatorias (excitatory mossy cells) del hilo dentado, violando así la noción anterior de que el procesamiento del hipocampo es exclusivamente unidireccional. Por último, los experimentos recientes han fomentado una nueva apreciación de la región CA2, que tradicionalmente se ha considerado una zona de transición entre CA1 y CA3; ahora está claro que CA2 tiene sus propias funciones y debe considerarse como una unidad computacional distinta a CA3 Y CA1; sin embargo, en este trabajo solo se hablará de CA3 y CA1 como subregiones del asta de Amón (Knierim, 2015).

Los primeros estudios electrofisiológicos en roedores indicaron que las partes más ventrales del hipocampo median las respuestas emocionales. La visión subsiguiente, que ha dominado el campo desde entonces, ha sido que las partes dorsales del hipocampo median funciones cognitivas -particularmente la memoria espacial- mientras que partes ventrales del hipocampo están involucradas en respuestas emocionales (Strange, et al., 2014).

Esta "visión dicotómica dorsal-ventral" se basaba, en parte, en observaciones que enfatizaban la segregación de entradas al hipocampo. Sin embargo, las diferencias en la conectividad con las estructuras corticales y subcorticales a lo largo del eje dorso-ventral del hipocampo son graduales más que absolutas, lo que sugiere que las diferencias funcionales a lo largo del eje largo también pueden presentar una organización similar al gradiente. Además, los datos recientes de expresión génica indican que hay múltiples subdivisiones dorsales-ventrales discretizadas a lo largo del eje largo del hipocampo. Por lo tanto, dada la potencialmente más compleja organización funcional del eje largo del hipocampo, el modelo de dicotomía dorsal-ventral actualmente aceptado requiere revisión (Strange, et al., 2014).

Un estudio mostró que hay nueve dominios dentro del área CA3 y otros dos estudios mostraron que el DG y el área CA1 están segregados en tres dominios moleculares principales: dorsal, intermedio y ventral (Con el dominio CA1 ventral que comprende cuatro subdominios). El interesante desafío que se nos planteará, será evaluar si estos patrones de expresión molecular se traducen en propiedades funcionales específicas a lo largo del eje largo del hipocampo. Los perfiles de expresión de los genes que codifican las moléculas de adhesión y los canales

iónicos, pueden determinar las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las poblaciones neuronales discretas del hipocampo, como las diferencias en la excitabilidad neuronal y la plasticidad sináptica que se han detectado a lo largo del eje largo (Strange, et al., 2014).

La disponibilidad de datos de hibridación *in situ* a escala genómica permite el análisis sistemático de la arquitectura neuroanatómica genética. La aplicación de análisis a los datos de expresión génica del hipocampo a escala genómica, reveló heterogeneidad molecular septotemporal robusta, lo que condujo a la identificación de una gran cohorte de genes con expresión regionalizada en el hipocampo (Thompson, et al., 2008)

El Allen Brain Atlas (ABA) provee un poderoso conjunto de datos para el análisis de relaciones estadísticas entre diferentes poblaciones neuronales separadas en el espacio. Estos datos consisten en ensayos de hibridación *in situ* con resolución celular para más de 20000 transcritos únicos muestreados a lo largo del cerebro de ratón adulto (P56) (Thompson, et al., 2008), además de una sección dedicada a los ejemplares en desarrollo donde se encuentra un subgrupo de estos genes.

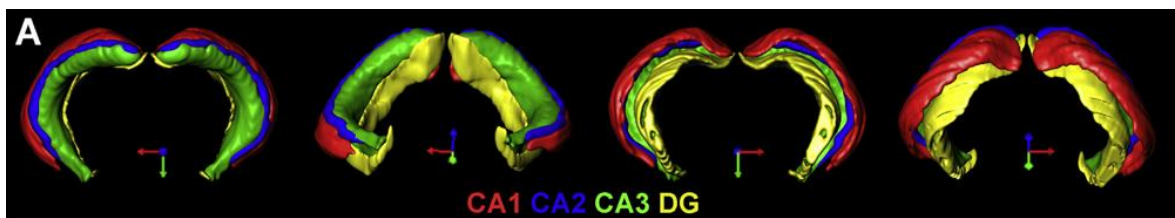


Figura 3: Modelado tridimensional de la anatomía molecular del hipocampo de ratón adulto donde CA1 se marca en rojo, CA3 en verde y giro dentado en Amarillo. Tomada de (Thompson, et al., 2008)

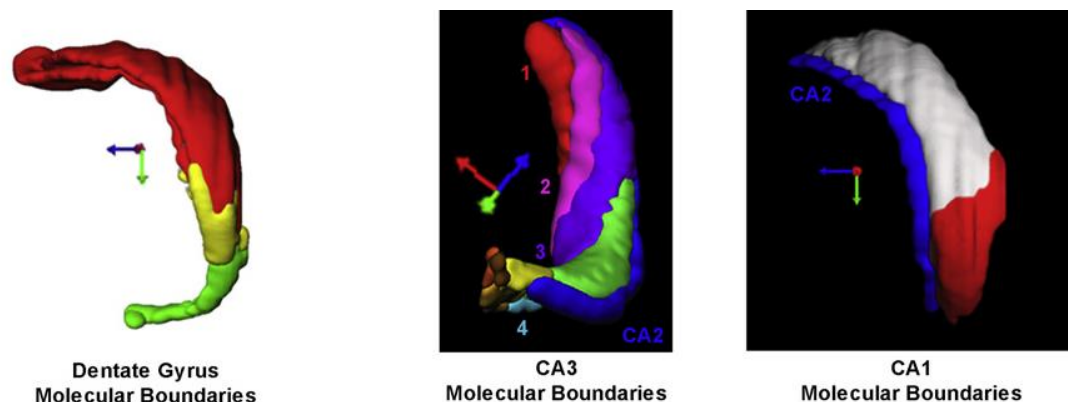


Figura 4: fronteras genéticas dentro de las subáreas del hipocampo de ratón adulto. Tomado de: (Thompson, et al., 2008)

También se ha dividido las diferentes subáreas en regiones; DG se ha dividido en tres dominios al igual que CA1, y CA3 por su parte se ha dividido en 9 por diferentes genes que marcan límites entre estos dominios dentro de cada subárea en el hipocampo, como se observa en la figura 4 (Thompson, et al., 2008)

En trabajos realizados por Lein y colaboradores, se predice un conjunto de genes que se expresará en mayor medida en CA1, CA3 o DG y han probado seguir un patrón de expresión restringida a esas regiones. El conjunto de genes de la figura 5 ejemplifica una expresión genética específica en las poblaciones neuronales primarias excitatorias, de cada subregión, que sirven para identificar los diferentes límites citoarquitectónico utilizados para el resto del manuscrito. Estos trabajos se realizaron empleando la técnica de hibridación *in situ*, una técnica que involucra el apareamiento de hebras complementarias de ácidos nucleicos (ADN o ARN) (Mesa, 2013) que han sido sintetizadas de acuerdo a la secuencia que se desea detectar, sin embargo, esta técnica no es tan sensible como la reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo. Como resultado de este trabajo, se determinó que el gen NOV se expresa de manera restrictiva en la capa piramidal de CA1, CA3 está delimitada por la expresión del gen PKC δ y la expresión del gen MCM está restringida al DG; además de estos genes, en el anexo 1 se encuentra una lista más amplia de candidatos para establecer límites genéticos entre estos dominios. Lo más interesante de estos resultados es que estos límites de expresión genética se ajustan perfectamente a los límites citoarquitectónicos observados por tinción con violeta de cresilo, con la excepción del límite CA2 / CA3, que no es posible ver usando tinciones histológicas estándar (Lein, et al., 2004).

La mayoría de los genes estudiados siguen patrones de expresión más complejos que los descritos anteriormente. Primero, algunos genes están expresados en solo una (o varias) subregiones del hipocampo y pueden ser clasificadas como “restringidas” a esa o esas regiones. Muchos genes se expresan altamente en una o más regiones y uniformemente en las otras, por lo tanto pueden ser clasificados como “enriquecidos” en dicha región (o regiones). Aunque esta clasificación es algo arbitraria, ya que puede haber problemas de sensibilidad o antecedentes relacionados con la hibridación *in situ* que conducen a una clasificación de enriquecido o restringido pero, de acuerdo a los autores, es una clasificación útil para denotar la expresión genética altamente específica dentro de tipos de células particulares. La expresión dentro de poblaciones menos prominentes de células tales como interneuronas, astrocitos y oligodendrocitos añade otro nivel importante de complejidad a los patrones de expresión observados (Lein, et al., 2004), que deberá tenerse en cuenta para el análisis de los resultados obtenidos de este proyecto.

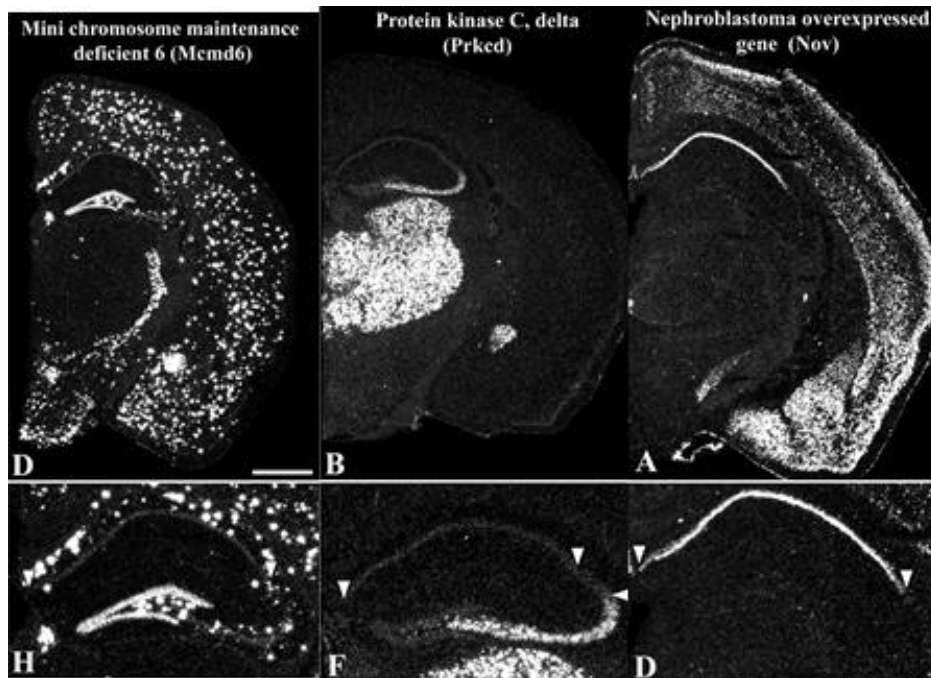


Figura 5: Subregion-specific patterns of gene expression within the hippocampo. Tomado de: (Lein, et al., 2004)

Es importante enfatizar que las diferentes subáreas del hipocampo estudiadas en este proyecto, poseen una morfología distintiva, están compuestas por diferentes capas y éstas por diferentes tipos de células neuronales como neuronas piramidales o interneuronas; así el DG está compuesto por una capa molecular, una capa de células granulares y una capa de células polimórficas; CA1 y CA3, por su parte, están compuestos por el Stratum lacunosum-moleculare, el Stratum Radiatum, la Capa de células piramidales, el Stratum Oriens y, únicamente en el caso de CA3, se puede observar una capa adicional entre el Stratum Radiatum y la Capa de células piramidales denominada Stratum Lucidum. Además de las neuronas también se encuentra la neuroglia, células presentes en todo el tejido neuronal encargadas de mantener la homeostasis celular, la formación de mielina y proveer soporte y protección a las neuronas, entre ellas se encuentran los oligodendrocitos, astrocitos, células epidermales y la microglia, en el sistema nervioso central (Andersen, Morris, Amaral, Bliss, & O'Keefe, 2007).

Por su parte, el hipocampo ha sido ampliamente estudiado ya que anomalías estructurales en esta región se observan en una amplia gama de enfermedades; con la evolución de técnicas volumétricas para mediciones del hipocampo humano y la aplicación de imagenología funcional a poblaciones de pacientes, están surgiendo evidencias de la severidad relativa de los cambios estructurales y funcionales del hipocampo en diversas condiciones psiquiátricas y neurológicas, algunas de estas enfermedades y sus cambios característicos, tanto en animales

modelo como en humanos, se encuentran resumidas en la tabla 1 (Strange, et al., 2014)

Tabla 1: Algunas enfermedades ocasionadas por anomalías en el hipocampo. Tomado de: (Strange, et al., 2014)

Table 1 Preclinical animal studies provide insights into the locus of hippocampal damage in different patient populations		
Condition	Abnormality along hippocampal long axis	
	Animal	Human
Medial temporal lobe epilepsy	Greater spontaneous epileptiform bursting in the ventral hippocampus than in the dorsal hippocampus ^{15,104}	<ul style="list-style-type: none"> Chronic intracranial recordings in patients indicate that seizure initiation is more frequent in the anterior hippocampus than in the posterior hippocampus¹⁸⁵ Neuronal loss is greater in the anterior hippocampus than in the posterior hippocampus^{186–188} (expressed as an anterior–posterior gradient¹⁸⁹)
Depression	Behavioural effects of chronic antidepressant treatment are critically dependent on adult neurogenesis in the hippocampus ¹⁸⁹ , and this has been suggested to occur specifically in the ventral hippocampus ¹⁹⁰	Post-mortem studies on patients with major depressive disorder show that antidepressants increase neurogenesis in the anterior dentate gyrus ¹⁹¹
Schizophrenia	<ul style="list-style-type: none"> Lesioning of the ventral hippocampus is used to model several features of schizophrenia¹⁹² Schizophrenia-related biomarkers are present in the ventral hippocampus at birth⁴⁴ 	Increasingly thought that the primary pathology is in the anterior hippocampus ¹⁹³ , but there is also considerable evidence for abnormalities in the posterior hippocampus (for example, see REFS 193–194)
Ischaemia	<ul style="list-style-type: none"> Ventral-to-dorsal increase in hippocampal vulnerability to ischaemia¹⁹⁵ May be related to an increasing gradient for NMDA receptor expression from ventral to dorsal in area CA1 (REF. 196), as NMDA receptor activation has been proposed to have a role in hypoxic excitotoxicity¹⁹⁷ Cerebral blood flow is greater in the ventral hippocampus than in the dorsal hippocampus during reperfusion following ischaemia, which may contribute to dorsal hippocampus damage¹⁹⁸ 	Posterior hippocampus volume is decreased in patients who have had cardiac arrest with successful subsequent resuscitation ¹⁹⁹ (but note previous reports of cardiac arrest-induced ischaemia affecting the entire hippocampal long axis ²⁰⁰)

Además de las enfermedades listadas anteriormente, se encuentra la EA que es la forma más común de demencia, y cuyo principal factor de riesgo para la aparición de la forma espontánea de la enfermedad es la edad. Muchas lesiones moleculares se han detectado en la EA, desde su primera descripción por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer en 1901, que llevan a una acumulación de proteínas mal plegadas en el cerebro envejecido dando lugar a daño oxidativo e inflamatorio, que a su vez conducen a la falta de energía y la disfunción sináptica del cerebro (Querfurth & LaFerla, 2010). Placas cerebrales cargadas con péptido β -amiloide ($A\beta$) y neuritas distróficas en las áreas terminales neurocorticales al igual que prominentes ovillos neurofibrilares en el lóbulo temporal-medial son importantes características patológicas de la EA (Querfurth & LaFerla, 2010).

En los últimos años se ha determinado que la EA comienza décadas antes de la aparición de los síntomas, sin embargo estudiar la neuropatología de la EA humana en etapas preclínicas tan tempranas no es una tarea fácil, para esto el uso de animales transgénicos puede ser una valiosa fuente de información para determinar factores que aceleran o desencadenan el apareamiento de la enfermedad y su progresión; también pueden ser útiles para la identificación de biomarcadores o potenciales dianas farmacológicas (Carmo & Cuello, 2013).

Basándose en la identificación de las mutaciones en los genes Proteína precursora amiloide (APP), Presenilina 1 (PS1) y Presenilina 2 (PS2), los cuales están implicados en la forma tanto familiar como esporádica de la enfermedad, se logró desarrollar el primer modelo transgénico de la EA en ratón a mediados de los años 90; estos modelos reflejan varios aspectos de la EA incluyendo la acumulación amiloide, la fosforilación tau anormal, la inflamación o los déficit de comportamiento (Carmo & Cuello, 2013).

A pesar de la gran valía que representan estos biomodelos para el estudio de la enfermedad, la patología que exhiben los ratones transgénicos presenta diferencias significativas con la forma humana, principalmente porque se desarrollaron a partir de mutaciones presentes en la forma esporádica y la familiar; sin embargo hoy es ampliamente discutido que estas formas son diferentes. Por lo anterior resulta imperativo el desarrollo de un modelo superior de la EA, el cual debe imitar múltiples aspectos de la enfermedad, incluyendo su etiología y una progresión tiempo-dependiente de la patología, involucrando células y estructuras similares a la forma humana (Carmo & Cuello, 2013).

El modelo inicial se desarrolló en ratones por razones más técnicas que científicas, sin embargo, un modelo en rata podría ser más útil dado que la rata es fisiológicamente, morfológicamente y genéticamente más cercana al humano que el ratón, además, la rata presenta un cuerpo más grande y el tamaño de su cerebro permite administración intratecal de fármacos, microdiálisis, muestreo múltiple de líquido cefalorraquídeo, electrofisiología *in vivo*, así como procedimientos neuroquirúrgicos y de neuroimagen. Por lo anterior, a pesar de las dificultades técnicas, se ha logrado desarrollar un modelo transgénico de la EA en ratas, sin embargo este sigue careciendo de las características mencionadas anteriormente (Carmo & Cuello, 2013).

Por otra parte, múltiples autores (Davolio & Greenamyre, 1995) (Bartsch, et al., 2015) (Padurariu, et al., 2012) han descrito que la población neuronal del área CA1 del hipocampo resulta ser más vulnerable a los insultos de la EA que las otras poblaciones, el mecanismo de esta vulnerabilidad selectiva no se conoce con exactitud en la actualidad por lo cual resulta pertinente evaluar las diferencias tanto genéticas como fisiológicas entre los diferentes tipos celulares que componen estos tejidos para determinar las causa de esta muerte selectiva; para esto se hace necesario hacer un estudio a fondo de las características individuales de cada subárea donde será imperativo que la contaminación entre ellas sea mínima por lo que establecer una herramienta que permita identificar estas contaminaciones se hace fundamental.

2.3. Objetivos:

2.3.1. Objetivo general:

Establecer una herramienta molecular que permita determinar la pureza de las áreas CA1, CA3 y Giro Dentado disecadas de tejido hipocampal de rata.

2.3.2. Objetivos específicos:

- Determinar una metodología para la extracción de RNA a partir de muestras de tejido hipocampal de rata.
- Determinar las condiciones óptimas para la detección de los genes de estudio mediante RT-PCR.
- Determinar la relación entre la magnitud de la expresión del gen de estudio y el área del tejido hipocampal en la cual se expresa.

2.4. Metodología Utilizada:

2.4.1. Estandarización de los primers

Inicialmente se diseñaron los primers para los genes GAPDH, β III-Tubulina, PKC δ , CCN3 y MCM6 cuya información se muestra en tabla 2.

Tabla 2: Primers sintetizados para el estudio

Primer	Secuencia (5'...3')	Longitud	Tm (°C) Teo	pb
CCN3 1 F	ACCTGTGGCTCAGAGGAGAA	20	59.99	375
CCN3 1 R	ACTGCAGATCCCACAGAACC	20	60.12	
PKCd 1 F	GGAAGCCAGAGACACCAGAG	20	59.99	457
PKCd 1 R	GCATAAAACGTAGCCCGGTA	20	59.99	
MCM6 2 F	TGAGGAGCAGACAGCTGAGA	20	60.01	241
MCM6 2 R	ATCCCCAACAATGCAAACAT	20	60.06	
GPDH 1 F	ATGGGAAGCTGGTCATCAAC	20	59.93	440
GPDH 1 R	GGATGCAGGGATGATGTTCT	20	59.89	
TUBB3 1 F	TGAGGCCTCCTCTACAAGT	20	59.99	237
TUBB3 1 R	TGCAGGCAGTCACAATTCTC	20	59.99	

Se extrajo RNA a partir de hipocampo de rata Wistar de 2 y 8 días post natales utilizando el kit para extracción de RNA de Promega ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System; a partir del RNA extraído, se obtuvo el cDNA por medio de la acción de la enzima transcriptasa inversa. Para esto se tomaron 500 ng de RNA, 0.5 μ g de oligo(dt) y agua, se incubaron a 70°C por 5 minutos y luego se colocaron en hielo por otros 5 minutos. A continuación, se tomaron 5 μ L y se adicionaron a la mezcla descrita en la tabla 3.

Tabla 3: condiciones de la RT-PCR

RT-PCR [μ l]	1 Muestra (uL)
GS 1X Buffer	4,0
MgCl₂ (2,0 mM)	1,6
dNTPs (0,5 mM)	1,0
GS Rev Trans	1,0
H₂O	7,4
Total	15,0
RNA	5,0

	Temperatura	Tiempo
Alineamiento	25°C	5 min
Extension	42°C	60 min
Inactivation	70°C	15 min

Con el cDNA obtenido se llevó a cabo ensayos de PCR probando la amplificación de los primers a diferentes gradientes de temperatura, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando el buffer TAE al 0,5X durante 90 minutos para determinar la temperatura de alineamiento óptima de cada gen.

2.4.2. Determinación de la expresión diferencial de los genes de estudio en cortes sagitales de hipocampo.

Se llevó a cabo cortes sagitales para la microdissección manual del hipocampo de 6 ratas Wistar de 2 días post natales; a partir de esto se obtuvo 6 ejemplares de DG, 6 de CA3 y 6 de CA1, se agruparon en parejas formado así 3 grupos de estudio como se ilustra en el esquema 1.

Rata 1	DG	DG-1	Grupo 1
Rata 2	DG		
Rata 1	CA3	CA3-1	
Rata 2	CA3		
Rata 1	CA1	CA1-1	
Rata 2	CA1		
Rata 3	DG	DG-2	Grupo 2
Rata 4	DG		
Rata 3	CA3	CA3-2	
Rata 4	CA3		
Rata 3	CA1	CA1-2	
Rata 4	CA1		
Rata 5	DG	DG-3	Grupo 3
Rata 6	DG		
Rata 5	CA3	CA3-3	
Rata 6	CA3		
Rata 5	CA1	CA1-3	
Rata 6	CA1		

Esquema 1: determinación de los grupos de evaluación a partir de las muestras.

Se llevó a cabo la extracción del RNA del tejido de la misma manera que se hizo durante la estandarización de los primers y se cuantificó el RNA de la muestra

mediante un lector de platos Take3™ Multi-Volume Plate de BioTek; con esta cuantificación se determinó la muestra de RNA a utilizar para la RT-PCR (500ng).

Se efectuó la RT-PCR de la misma manera que en la estandarización de los primers con las temperaturas de la tabla 3. Nuevamente se cuantificó el cDNA obtenido con el lector de platos para determinar la cantidad a diluir y lograr una concentración de la muestra de 60ng/μL.

Se amplificó los genes mediante PCR utilizando las temperaturas y concentraciones de reactivos determinadas tras la estandarización de los primers listadas en la tabla 4.

Tabla 4: Condiciones de la PCR y temperaturas de alineamiento de los primers

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

Primer	T _m (°C) experimental	pb
CCN3	65	375
PKCd	68	457
MCM6	58	241
GPDH	54	440
TUBB3	57	237

Con los amplicones obtenidos se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, por cada gen, con TAE al 0,5X como buffer de corrida por 100 minutos.

2.4.3. Determinación de la expresión diferencial de los genes de estudio en cortes coronales de hipocampo.

Como prueba suplementaria se hizo cortes coronales del hipocampo de 2 ratas Wistar de 8 días post natales y a partir de cada corte coronal se hizo la

microdissección manual de cada subárea del hipocampo; se agrupó cada corte correspondiente a DG, CA3 o CA1 de cada rata por separado y se obtuvo dos grupos de estudio.

Se extrajo el RNA como se describió anteriormente y se cuantificó en el lector de platos determinando así la muestra para llevar a cabo la RT-PCR (500 ng). Se cuantificó también el cDNA obtenido tras la RT-PCR y se determinó la muestra a diluir para obtener una concentración de 60ng/μL.

Se llevó a cabo la PCR para cada gen con las temperaturas de la tabla 4 y se corrió una electroforesis en gel de agarosa bajo las mismas condiciones que se describieron en la sección 2.4.2.

2.4.3. Análisis semicuantitativo de la expresión de genes

La cuantificación de la expresión se llevó a cabo empleando el programa ImageJ (NIH, USA). Donde se determinaron los valores de densidad (número de píxeles) de las bandas correspondientes a la amplificación de cada gen de interés y esta fue normalizada con respecto a la densidad de las bandas de los genes de expresión constitutiva (βIII-Tubulina y GAPDH).

2.4.4. Análisis estadístico

El procesamiento de los datos se llevó a cabo en Microsoft Excel[®] y el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 7. Debido a que el N era muy bajo se asumió que los datos no tenían una distribución normal. En consecuencia se realizó una prueba de Friedman con un análisis post-hoc de Dunn para establecer si existían diferencias entre los grupo de estudio. Se asumió un valor de $p < 0.05$ como significancia estadística y los datos se reportaron como la media \pm SEM.

2.5. Resultados

Para la estandarización de los primers se amplificó los genes de estudio mediante PCR aplicando un gradiente de temperatura para determinar la temperatura de alineamiento óptima, en la figura 6a se tiene la electroforesis que ilustra el resultado del proceso de estandarización de las condiciones de amplificación de cada gen, cuya temperatura de alineamiento se determinó a partir de las electroforesis que se ilustran en la figura 6b siendo las temperaturas determinadas 65°C, 68°C, 58°C, 54°C y 57°C para los genes CCN3, PKC δ , MCM6, GAPDH y β III-Tubulina respectivamente.

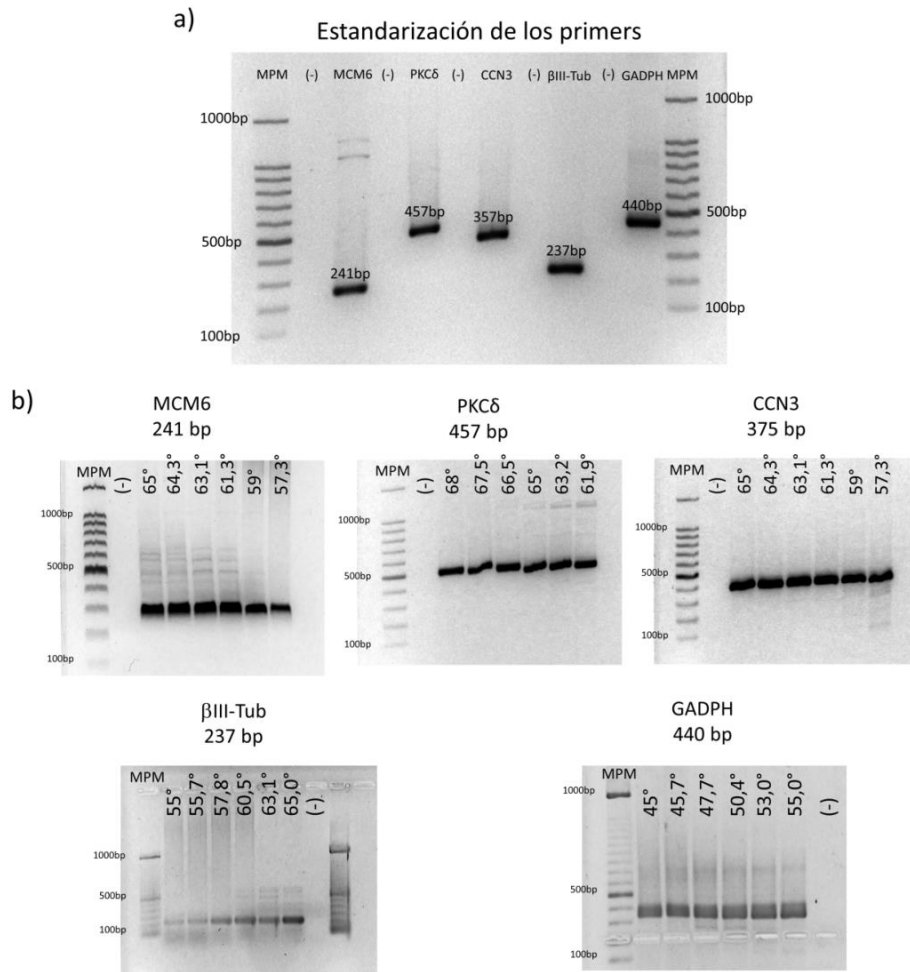


Figura 6: Proceso de estandarización de las condiciones de amplificación de los genes MCM6, PKC δ , CCN3, β III-Tubulina y GAPDH. **a)** electroforesis en gel de agarosa que reúne los resultados del proceso de estandarización. **b)** electroforesis a partir de las cuales se obtuvo la temperatura óptima de alineamiento de cada gen de estudio

Además de lo anterior también se determinó que la cantidad de muestra óptima a adicionar a la PCR es 60ng/ μ L ya que a concentraciones mayores se evidencia

una cantidad importante de cDNA sin amplificar además de bandas inespecíficas que alteran la calidad de los resultados.

Teniendo estas condiciones se procedió al análisis de los grupos de estudio, se llevó a cabo la amplificación de cada uno de los genes mencionados anteriormente y mediante un análisis densitométrico se determinaron los niveles de expresión relativa de cada gen (figura 7a). Estos valores fueron posteriormente normalizados con respecto a los niveles de expresión de los genes constitutivos GAPDH y β III-Tubulina. Los resultados evidencian que para el corte sagital, hay diferencias significativas entre la expresión del gen PKC δ en las áreas CA3 y CA1 cuando el resultado de la densitometría se normaliza con respecto a GAPDH únicamente ($p=0,0429$) como se observa en la figura 7b.

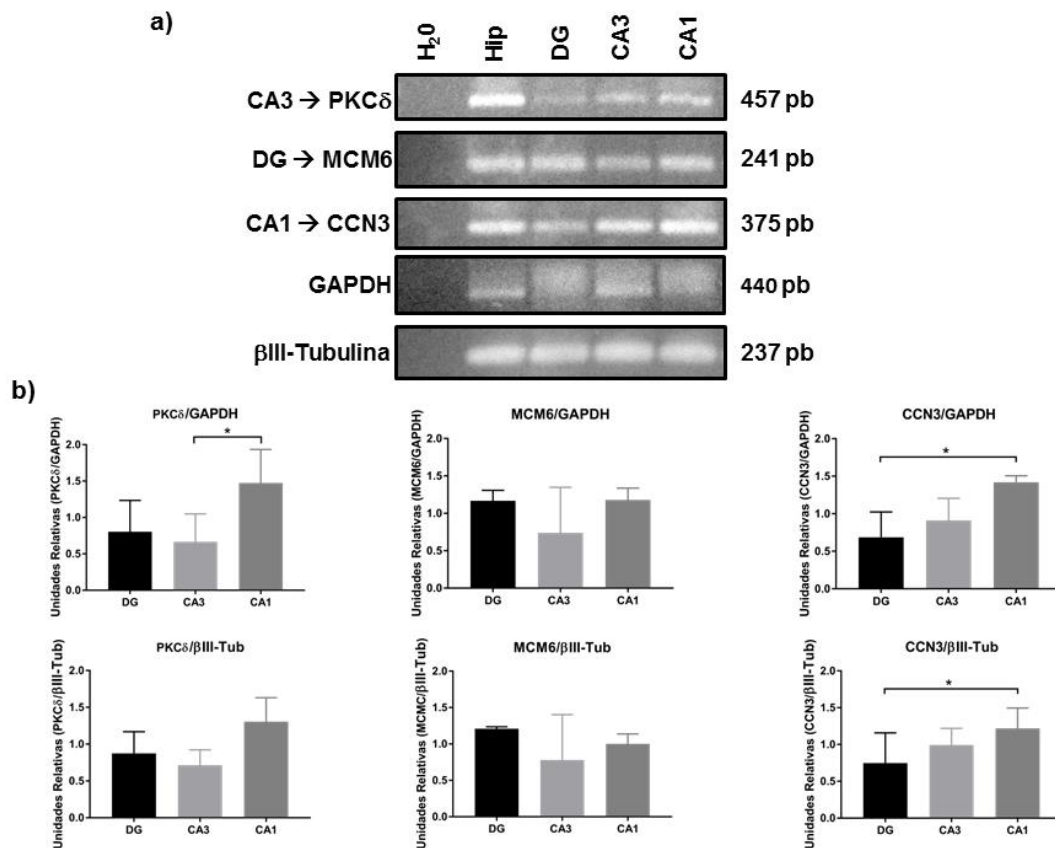


Figura 7: Análisis de la expresión de los genes de estudio en muestras obtenidas tras una disección sagital del hipocampo. **a)** imágenes representativas de las electroforesis en gel de agarosa realizadas para la determinación semicuantitativa de la expresión de los genes en cada una de las subáreas del hipocampo. **b)** Histogramas que permiten evidenciar la tendencia de expresión de los genes en cada una de las subáreas para PKC δ : CA3, MCMC: DG y CCN3: CA1, en los cuales se grafica el promedio de los datos \pm el error estándar de la media (SEM).

Por otra parte, también es evidente que la expresión del gen CCN3, normalizado con respecto a GAPDH ($p=0,0429$) y β III-Tubulina ($p=0,0429$), presenta diferencias estadísticamente significativas entre las áreas DG y CA1. PKC δ tiene una expresión enriquecida en las muestras del área CA1 al igual que CCN3 mientras que MCM6, si bien se esperaba que se expresara de manera enriquecida en las muestras de DG, también está presente en CA3 y CA1 (figura 7b). Si bien no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, se puede observar que la expresión de los 3 genes de estudio presenta una tendencia que se mantiene cuando se normaliza con respecto a las células neuronales con β III-Tubulina y no neuronales con GAPDH.

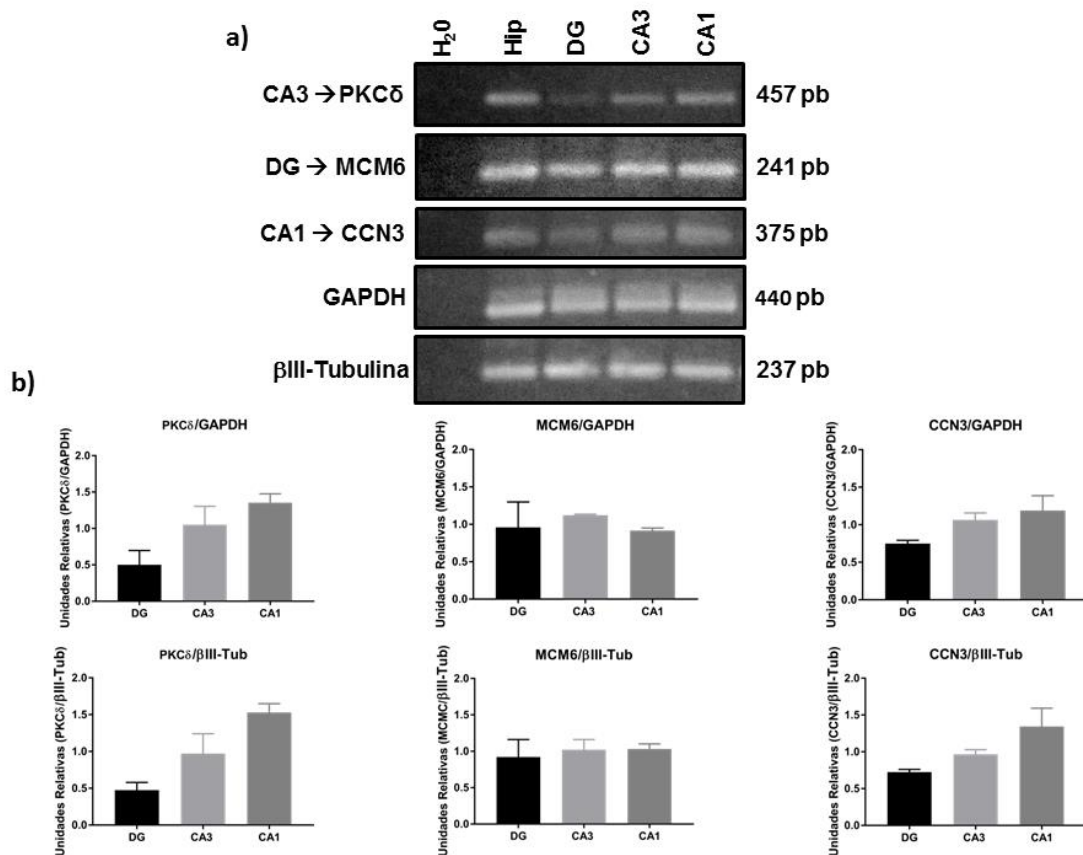


Figura 8: Análisis de la expresión de los genes de estudio en muestras obtenidas tras una disección coronal del hipocampo. **a)** imágenes representativas de las electroforesis en gel de agarosa realizadas para la determinación semicuantitativa de la expresión de los genes en cada una de las subáreas del hipocampo. **b)** Histogramas que permiten evidenciar la tendencia de expresión de los genes en cada una de las subáreas para PKC δ : CA3, MCM6: DG y CCN3: CA1, en los cuales se grafica el promedio de los datos \pm el error estándar de la media (SEM).

Por otra parte, cuando se analizaron los resultados del corte coronal, se obtuvieron resultados similares a los observados en los experimentos realizados con las muestras del corte sagital (figura 8a). Es importante aclarar que en este experimento adicional solo se analizó dos grupos, por lo cual no fue posible llevar a cabo un análisis estadístico, en consecuencia solo puede hacerse referencia a tendencias de cambio. Como se observa en a figura 8b PKC δ y CCN3 presentan una expresión enriquecida en CA1 y MCM6 se expresa de manera casi uniforme en las 3 subregiones del hipocampo.

2.6. Discusión:

La razón principal de llevar a cabo este proyecto era poder determinar si los genes MCM6, PKC δ y CCN3 servían como marcadores de pureza de subáreas del hipocampo de rata debido a que en la literatura (Lein, et al., 2004) se reporta que estos presentan una expresión restrictiva en las subáreas DG, CA3 y CA1 respectivamente. La identificación adecuada de cada sección del hipocampo es fundamental para futuros estudios encaminados a establecer las bases moleculares de su susceptibilidad en patologías como la EA.

Al analizar los resultados de las figuras 7 y 8, se puede ver claramente que la expresión de los genes evaluados no es restrictiva. Esto puede deberse a dos razones, la primera es que la microdissección realizada (sagital y coronal) se llevó a cabo manualmente y en consecuencia los cortes no eran completamente selectivos, es decir, que en cada subárea pudo haber secciones de las otras subáreas y muy seguramente de otras estructuras cercanas al hipocampo propiamente dicho como el subículo, la fimbria o el plexo coroideo.

La otra explicación es que al revisar las imágenes que provee el Allen Brain Atlas (Atlas de expresión de genes en cerebro de ratón) (Anon., 2017), se evidenció que la expresión de los genes PKC δ y CCN3 varía con el desarrollo del espécimen; siendo casi nula en P4 (por lo que se infiere que a P2 se tiene el mismo comportamiento), y alcanzando niveles detectables en los días P14 y posteriores. Es importante aclarar que en la literatura no se encuentran reportes sobre la expresión de MCM6 durante el neurodesarrollo, solo en cerebro de animales adultos (Lein, et al., 2004). Adicionalmente, los trabajos revisados emplean hibridización in situ para establecer la expresión de genes (Lein, et al., 2004) (Thompson, et al., 2008). Este método presenta una serie de inconvenientes (falta de sensibilidad, enmascaramiento de con proteínas o estructuras celulares, entre otros), que podrían conducir a falsos negativos (Lein, et al., 2004) (Thompson, et al., 2008). En contraste, nuestro estudio empleó PCR, la cual permite amplificar pequeñas cantidades de material genético y tiene un alto poder de detección.

De acuerdo con la literatura, el gen CCN3 se expresa restrictivamente en la subárea CA1. Nuestros resultados pudieron confirmar que dicho gen se encuentra enriquecido en CA1 con respecto a las otras subregiones del hipocampo. Sin embargo, en nuestras muestras se observó expresión de este gen en CA3 y DG indiferente de la técnica de microdissección empleada. En el Allen Brain Atlas se observa que este gen se expresa a partir de P14, sin embargo, nosotros pudimos detectar el gen a edad temprana (P2 y P8). Estudios en fetos humanos y en embriones de pollo demuestran que CCN3 se expresa ampliamente en el SNC y que parece estar involucrado en procesos de diferenciación neuronal, sin

embargo, no establecen cómo son los niveles de este gen en el hipocampo (Katsubea, et al., 2001).

En este estudio se esperaba que la expresión de PKC δ estuviera restringida a la región CA3. Sin embargo, se pudo detectar la presencia de este gen en CA1 y en menor medida en DG. De acuerdo con el trabajo publicado por Lein y Zhao, la expresión de PKC δ es elevada en CA3 y también se puede encontrar en menor cantidad en el hilus y en el subículo. La presencia de PKC δ en CA1 podría ser un indicativo de que los cortes de esta región estuvieran contaminados por segmentos del subículo, pues de acuerdo con otros estudios, este gen no se expresa en CA1 de animales adultos. Otros autores han evaluado la expresión de PKC y sus isoformas (α , β , γ , δ , ϵ , η y θ) en roedores adultos (McNamara, et al., 1999) (Tang, et al., 2004), sin embargo, no existen estudios sobre la expresión de PKC δ en neonatos. PKC participa en la señalización que se desprende de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR). Varios autores describen un papel fundamental de la familia de enzimas PKC en el desplazamiento de los receptores de NMDA desde el cuerpo celular de la neurona hacia las dendritas para la formación de nuevas sinapsis, la dinámica de este movimiento y los cambios en la conformación de este receptor son más pronunciados durante los primeros días de vida del animal (Matta, et al., 2011) (Lau & Zukin, 2007). Debido a que PKC es un elemento clave en la función de NMDAR, es muy posible que PKC δ se exprese en bajos niveles durante el neurodesarrollo de neonatos. Nuestros resultados indican que es necesario realizar un estudio detallado de la expresión de este gen durante varias etapas del desarrollo con el fin de establecer su perfil de expresión en las subregiones del hipocampo.

Con respecto a MCM6, nuestros resultados evidencian que este gen se expresa en todas las subáreas del hipocampo neonatal (P2 y P8), sin embargo, de acuerdo con la literatura este gen se expresa restrictivamente en DG (Lein, et al., 2004) en animales adultos, pero se desconoce su perfil de expresión en neonatos. MCM6 hace parte de una serie de genes que codifica para un grupo de proteínas que funciona como helicasas, las cuales ayudan a desenrollar el DNA durante la replicación (Jacobberger, 2010). DG es una región caracterizada por su capacidad de neurogénesis lo que podría explicar la alta expresión de MCM6 en esta subregión. Lein y colaboradores determinaron que MCM6 se expresa únicamente en las células granulares del giro dentado relativas a las células piramidales del asta de Ammon. Sin embargo, también se expresa significativamente en las interneuronas del hilus, el stratum oriens y a lo largo de la mayoría del cerebro (Lein, et al., 2004); por lo tanto, MCM6 se expresa restrictivamente en DG únicamente entre células excitatorias; dado que las muestras analizadas contienen

toda la gama de células presentes en el hipocampo, entre ellas Interneuronas, es probable que esto explique la presencia de este gen en todas las subáreas estudiadas. Por lo tanto es necesario encontrar un marcador más específico que permita reconocer selectivamente DG de las demás subregiones del hipocampo.

2.7. Conclusiones:

- Se logró determinar una metodología para la extracción de RNA a partir de muestras de tejido hipocampal de rata.
- Se determinó las temperaturas de alineamiento necesarias para la amplificación de los genes de estudio mediante PCR, siendo estas 65°C, 68°C, 58°C, 54°C, 57°C para CCN3, PKC δ , MCM6, GAPDH y β III-Tubulina respectivamente; con las cuales es posible realizar la detección del gen por PCR y electroforesis en gel de agarosa.
- Se determinó la relación entre la magnitud de la expresión del gen de estudio y el área del tejido hipocampal en la cual se expresa, identificando que MCM6 no es un gen que se expresa de manera restrictiva en los cortes de DG ya que estos además de neuronas excitatorias también contienen interneuronas y demás células pertenecientes al tejido en las cuales, tanto en CA1 como en CA3 se expresa de manera uniforme; por su parte CCN3 se expresa de manera mayoritaria en CA1 mostrando diferencias significativas en su expresión en DG y CA1, y por último, PKC δ mostró un patrón de expresión diferente al reportado en la teoría, siendo expresado mayoritariamente en CA1 en lugar de CA3.
- Por lo anterior, no se logró establecer una herramienta molecular que permita determinar la pureza de las áreas CA1, CA3 y DG disecadas de tejido hipocampal de rata de menos de 14 días post natales, pues estos genes presentan una expresión diferencial en neuronas excitatorias de ratones p14 o más.

2.8. Recomendaciones:

Este proyecto tiene un papel fundamental para la formulación de futuros proyectos dentro del grupo de investigación; determinar genes que permitan establecer límites exactos entre cada subárea, proveerá un marco de referencia que permita determinar las diferencias en la expresión genética entre las subáreas después de determinados tratamientos, que asemejen los mecanismos de neurodegeneración propios de la EA; por lo anterior es fundamental que los genes que se elijan para este fin tengan una expresión completamente restringida al subárea de estudio; los genes MCM6 y PKC δ no presentan una expresión completamente restrictiva, en especial MCM6 que básicamente se expresa de manera general en cortes de hipocampo, por lo que se recomienda llevar a cabo este trabajo nuevamente con otros genes que tengan características más apropiadas para el fin que se está buscando.

Entre los genes que se podría proponer para iniciar nuevamente los ensayos se encuentran **Wfs1** (Wolfram syndrome 1 homolog (human)) (Anon., 2017) y **Lrmp** (lymphoid-restricted membrane protein) (Anon., 2017) expresados restrictivamente en CA1, especialmente Wfs1. En el caso de DG el gen **Fam163b** (family with sequence similarity 163, member B) (Anon., 2017) y por último, para CA3 no se logró identificar un gen que tuviera la especificidad y los altos niveles de expresión que presentan los genes de los que se habla con anterioridad pero se encontró que **Tex40** (testis expressed 40) (Anon., 2017) se expresa en forma enriquecida.

Para los ensayos a realizar con estos genes lo más recomendable es usar ratas de al menos 14 días de edad dado que a esta edad se logra evidenciar la expresión restrictiva en las referencias citadas; por otro lado, estos marcadores solo serían útiles para las pruebas que se lleven a cabo en animales al menos esa edad pues en animales menores no se tiene la certeza de si presentarán el mismo patrón de expresión o no, por lo tanto los cultivos celulares, por ejemplo, no podrán hacer uso de esta herramienta dado que se requiere animales de máximo 2 días de nacidos para esto y en ellos no se observa la expresión de los genes propuestos o su expresión no está restringida.

En el caso de los cultivos de neuronas, será fundamental iniciar una búsqueda de alguna característica medible que permita determinar la presencia de diferentes poblaciones hipocampales en los cultivos, si bien lo que se plantea con los genes es sencillo y económico, además de selectivo y bastante sensible; en el caso de animales con una edad tan corta no se tiene información que permita plantear esa característica como se hizo con los cultivos organotípicos, que si permiten el uso de animales mayores.

3. Bibliografía:

- 2016 Alzheimer's disease facts and figures. (2017). Alzheimer's association. Chicago, EU.: Alzheimer's Association. Recuperado de: <http://www.alz.org/facts/>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). The Hippocampus Book. Oxford: Oxford University Press.
- Bartsch, T., Döhring, J., Reuter, S., Finke, C., Rohr, A., Brauer, H., Jansen, O. (2015). Selective neuronal vulnerability of human hippocampal CA1 neurons: lesion evolution, temporal course, and pattern of hippocampal damage in diffusion-weighted MR imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(11), 1836–1845.
- Carrillo, M., (21 Diciembre 2015). América Latina no está lista para hacer frente al Alzheimer. *Scientific American*. Recuperado de: <https://www.scientificamerican.com/espanol/noticias/america-latina-no-esta-lista-para-hacer-frente-al-alzheimer/>
- Davolio, C., y Greenamyre, J. (1995). Selective vulnerability of the CA1 region of hippocampus to the indirect excitotoxic effects of malonic acid. *Neuroscience Letters*, 192(1), 29–32.
- Do Carmo, S., y Cuello, C. (2013) Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Molecular Neurodegeneration* 37(8), 1-11.
- Family with sequence similarity 163, member B. (2017). Allen Brain Atlas. Washington, EU.: Allen Institute for Brain Science. Recuperado de: <http://mouse.brain-map.org/gene/show/73508>
- Ginsberg, S. D., Alldred, M. J. y Che, S., (2012). Gene expression levels assessed by CA1 pyramidal neuron and regional hippocampal dissections in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 99–107.
- Jacobberger, J. W., y Phyllis, S.F, (2010). Cytometry of chromatin bound Mcm6 and PCNA identifies two states in G1 that are separated functionally by the G1 restriction point. *BMC Cell Biology*, 11(26), 3-13.
- Katsubea, K.-i., Chuaia, M.-L., Liua, Y.-C., Kabasawab, Y., Takagia, M., Perbalc, B., & Sakamoto, K. (2001). The expression of chicken NOV, a member of the CCN gene family, in early stage development. *Gene Expression Patterns*, 1(1), 61–65.

- Knierim, J. J., (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 7 Diciembre. R1107–R1125.
- Lau, C. G. y Zukin, R. S., (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature reviews | neuroscience*, 413-423.
- Lein, E. S., Zhao, X. y Gage, F. H., (2004). Defining a Molecular Atlas of the Hippocampus Using DNA Microarrays and High-Throughput In Situ Hybridization. *The Journal of Neuroscience*, 3879 –3889.
- Lymphoid-restricted membrane protein. (2017). Allen Brain Atlas. Washington, EU.: Allen Institute for Brain Science. Recuperado de: <http://mouse.brain-map.org/gene/show/16740>
- Matta, J. A., Ashby, M.C., Sanz-Clemente, A., Roche, K.W., y Isaac, J.T., (2011). mGluR5 and NMDA Receptors Drive the Experience- and Activity-Dependent NMDA Receptor NR2B to NR2A Subunit Switch. *Neuron*, 339–351.
- McNamara, R. K., Wees, E. A. y Lenox, R. H., (1999). Differential Subcellular Redistribution of Protein Kinase C Isozymes in the Rat Hippocampus Induced by Kainic Acid. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1735-43.
- Mesa, M. L. (2013). Características, ventajas y desventajas de la hibridación in situ para la identificación de agentes patógenos. *Revista médica veterinaria*, 25, 63-78.
- Padurariu, M., Ciobica, A., Mavroudis, I., Fotiou, D., & Baloyannis, S. (2012). Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatria Danubia*, 24(2), 152-8.
- Protein kinase C delta. (2017). Allen Brain Atlas. Washington, EU.: Allen Institute for Brain Science. Recuperado de: <http://developingmouse.brain-map.org/gene/show/18517>
- Querfurth, H. W. y LaFerla, F. M., (2010). Mechanisms of Disease Alzheimer's disease. *The new england journal of medicine*, 329 - 344.
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S. y Moser, E. I., (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature reviews neuroscience*, 655 - 666.
- Tang, F., Lee, W.L., Gao, H., Chen, Y., Loh, Y.T. y Chia, S.C., (2004). Expression of Different Isoforms of Protein Kinase C in the Rat Hippocampus After






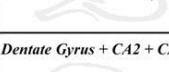
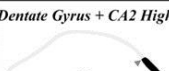



Pilocarpine-Induced Status Epilepticus With Special Reference to CA1 Area and the Dentate Gyrus. *Hippocampus*, Volumen 14, 87–98.

Testis expressed 40. (2017). Allen Brain Atlas. Washington, EU.: Allen Institute for Brain Science. Recuperado de: <http://mouse.brain-map.org/gene/show/42920>

Thompson, C. L., Pathak, S.D., Jeromin, A., Ng, L.L., MacPherson, C.R., Mortrud, M.T.,... Lein, E.S., 2008. Genomic Anatomy of the Hippocampus. *Neuron*, 1010–1021.

Wolfram syndrome 1 homolog (human). (2017). Allen Brain Atlas. Washington, EU.: Allen Institute for Brain Science. Recuperado de: <http://mouse.brain-map.org/gene/show/22150>

Anexo 1: listado de genes obtenidos a partir del trabajo de (Lein, et al., 2004)

	Genes Displaying Restricted Expression	Genes Displaying Enriched Expression	
Dentate Gyrus Highest 	Desmoplakin (Dsp) Protein phosphatase 1, regulatory subunit 1A (Ppp1r1a) Mini chromosome maintenance deficient 6 (Mcmd6) Insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5) Transient receptor potential cation channel C (Trpc6) P311 (D0H4S114)	Phosphodiesterase 1B (Pde1b) Endoplasmic reticulum membrane protein (Ermelin) EH-domain containing 1 (Ehd1) CCAAT/enhancer binding protein delta (Cebpd) Myelin basic protein (Mbp) AA223007 Jun oncogene (Jun) Somatostatin receptor 2 (Sstr2)	Ryanodine receptor 1 (Ryr1) CaMKII gamma (Camk2g) Diacylglycerol O-acyltransferase 2 (Dgat2) Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase alpha 1 (Atp1a1) AA673970 Protein tyrosine phosphatase, receptor type, O (Ptpro) Fibulin 1 (Fbln1) Protease, serine, 12 (Prss12)
CA1 - CA3 Highest 	Alpha-2,8-sialyltransferase E (Siat8e) AA611744 Neurogenic differentiation 6 (Neurod6) Lipoprotein lipase (Lpl) Zinc finger protein 312 (Zfp312) Meis-related gene 1b (Mrg1b) AA717225 Latexin (Lxn)	Seizure related gene 6 (Sez6)	
CA3 Highest 	Protein kinase C, delta (Prkcd) Bcl-2-related ovarian killer protein (Bok)	Myosin Vb (Myo5b) SH3-domain GRB2-like 2 (Sh3gl2) Copine VI (Cpne6) AA212774 Special AT-rich sequence binding protein 1 (SatB1)	
CA2 + CA3 Highest 	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like 1 (Spock1) ELAV-like 2 (Elavl2) Suppressor of cytokine signaling 2 (Socs2)	Neuropeptide Y receptor Y2 (Npy2r) Chromogranin B (Chgb) Gene trap PAT 12 (Gtpat12) Adaptor protein complex, AP-2, alpha 2 (Ap2a2) Lymphocyte antigen 6 complex, locus E (Ly6e) 14-3-3 eta polypeptide (Ywhah) Glypican 1 (Gpc1) Kit oncogene (Kit) Synaptosomal-associated protein 91 (Snap91) Protein kinase C, alpha (Prkca) Dihydrolipamide S-acyltransferase (Dlat) Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion (Cadps) Nel-like 2 homolog (Nel2)	ATPase, Ca ²⁺ transporting, slow twitch 2 (Atp2a2) Phosphofluorokinase, platelet (Pfkp) Adenylate kinase 4 (Aka4) Duffy blood group (Dfy) Serum/glucocorticoid regulated kinase (Sgk) Malic enzyme, superantant (Mod1) Spermine synthase (Sms) AA273803 Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1 (Gdi1) Neurofilament, light polypeptide (Nefl) Voltage-dependent calcium channel alpha 1A (Cacna1a) Cyclin D2 (Ccn2) ELAV-like 4 (Elavl4)
Dentate Gyrus + CA1 Highest 	B-cell translocation gene 1 (Btg1) Calbindin-28k (Calb1) Leucine rich repeat protein 1, neuronal (Lrrn1) GABA-A receptor, subunit delta (Gabbrd) Neuronal guanine nucleotide exchange factor (Ngef) Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate (Mareks)	Neuroepithelial cell transforming gene 1 (Net1) Nuclease sensitive element binding protein 1 (Nsep1) Transducin-like enhancer of split 1 (Tle1) Reduced expression 3 (Rex3) Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (Acta2) Potassium inwardly-rectifying channel, member 9 (Kcnj9) Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 (Itpr1)	
CA1 Highest 	Nephroblastoma overexpressed gene (Nov) Basic helix-loop-helix domain containing, class B2 (Bhlhb2)	Klotho (Kl) Thymosin, beta 10 (Tmsb10) Ets variant gene 1 (Etv1) Src homology three (SH3) and cysteine rich domain (Src)	Dual specificity phosphatase 1 (Dusp1) AA591428 Early growth response 1 (Egr1) Pre B-cell leukemia transcription factor 3 (Pbx3)
Dentate Gyrus + CA2 + CA3 Highest 	Frizzled-related protein (Frzb)	Neuroblastoma myc-related oncogene 1 (Nmyc1) Protein kinase inhibitor, alpha (Pki) Transforming growth factor, beta 2 (Tgfb2) Golgi phosphoprotein 2 (Golp2)	Syruclein, alpha (Snca) Heat shock protein 2 (Hspa2) Annexin A11 (Anxa11)
Dentate Gyrus + CA2 Highest 	Neurotrophin 3 (Ntf3) T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 (Tiam1) Purkinje cell protein 4 (Pcp4)	AA087715 Mitogen activated protein kinase 3 (Mapk3)	
CA1 + CA3 Highest 	Protease, serine, 19 (Prss19) TYRO3 protein tyrosine kinase 3 (Tyro3) Mannosidase 1, alpha (Man1a) Mannosidase 2, alpha 1 (Man2a1)	Carbonic anhydrase 4 (Car4)	
Dentate Hilus Highest 	Calretinin (Calb2)		

Anexo 2: Detalles del análisis estadístico

Table Analyzed **CCN3/BIII-Tub**

Friedman test	
P value	0,0278
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Friedman statistic	6

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	3

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
DG vs. CA3	-3	No	ns	0,6620	A-B
DG vs. CA1	-6	Yes	*	0,0429	A-C
CA3 vs. CA1	-3	No	ns	0,6620	B-C

Test details	Rank sum 1	Rank sum 2	Rank sum diff.	n1	n2
DG vs. CA3	3	6	-3	3	3
DG vs. CA1	3	9	-6	3	3
CA3 vs. CA1	6	9	-3	3	3

Table Analyzed**PKCd/BIII-Tub**

Friedman test	
P value	0,1944
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Friedman statistic	4,667

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	3

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
DG vs. CA3	1	No	ns	>0.9999	A-B
DG vs. CA1	-4	No	ns	0,3074	A-C
CA3 vs. CA1	-5	No	ns	0,1237	B-C

Test details	Rank sum 1	Rank sum 2	Rank sum diff.	n1	n2
DG vs. CA3	5	4	1	3	3
DG vs. CA1	5	9	-4	3	3
CA3 vs. CA1	4	9	-5	3	3

Table Analyzed

MCM6/BIII_Tub

Friedman test	
P value	0,5278
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Friedman statistic	2

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	3

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
DG vs. CA3	3	No	ns	0,6620	A-B
DG vs. CA1	3	No	ns	0,6620	A-C
CA3 vs. CA1	0	No	ns	>0.9999	B-C

Test details	Rank sum 1	Rank sum 2	Rank sum diff.	n1	n2
DG vs. CA3	8	5	3	3	3
DG vs. CA1	8	5	3	3	3
CA3 vs. CA1	5	5	0	3	3

Table Analyzed

PKCd/GAPDH

Friedman test	
P value	0,0278
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Friedman statistic	6

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	3

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
DG vs. CA3	3	No	ns	0,6620	A-B
DG vs. CA1	-3	No	ns	0,6620	A-C
CA3 vs. CA1	-6	Yes	*	0,0429	B-C

Test details	Rank sum 1	Rank sum 2	Rank sum diff.	n1	n2
DG vs. CA3	6	3	3	3	3
DG vs. CA1	6	9	-3	3	3
CA3 vs. CA1	3	9	-6	3	3

Table Analyzed**MCM6/GAPDH**

Friedman test	
P value	0,9444
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Friedman statistic	0,6667

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	3

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
DG vs. CA3	2	No	ns	>0.9999	A-B
DG vs. CA1	1	No	ns	>0.9999	A-C
CA3 vs. CA1	-1	No	ns	>0.9999	B-C

Test details	Rank sum 1	Rank sum 2	Rank sum diff.	n1	n2
DG vs. CA3	7	5	2	3	3
DG vs. CA1	7	6	1	3	3
CA3 vs. CA1	5	6	-1	3	3

Table Analyzed

CCN3/GAPDH

Friedman test	
P value	0,0278
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Friedman statistic	6

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	3

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
DG vs. CA3	-3	No	ns	0,6620	A-B
DG vs. CA1	-6	Yes	*	0,0429	A-C
CA3 vs. CA1	-3	No	ns	0,6620	B-C

Test details	Rank sum 1	Rank sum 2	Rank sum diff.	n1	n2
DG vs. CA3	3	6	-3	3	3
DG vs. CA1	3	9	-6	3	3
CA3 vs. CA1	6	9	-3	3	3