



ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL
AISLAMIENTO Y CULTIVO DE DIFERENTES POBLACIONES DE NEURONAS
HIPOCAMPALES DE RATA

ELIANA MARÍA CEBALLES BURBANO

UNIVERSIDAD ICESI, FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2017

ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL
AISLAMIENTO Y CULTIVO DE DIFERENTES POBLACIONES DE NEURONAS
HIPOCAMPALES DE RATA

ELIANA MARÍA CEBALLES BURBANO

Trabajo de grado para optar al título de pregrado en Biología

ASESOR

Alvaro Andrés Barrera Ocampo, *Ph. D.*,

Docente Universidad Icesi

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2017



APROBADO POR:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paola Caicedo Burbano', written in a cursive style.

Paola Caicedo Burbano, Ph. D.,
Evaluador.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alvaro Andrés Barrera Ocampo', written in a cursive style.

Alvaro Andrés Barrera Ocampo, Ph. D.,
Director del proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a el Dr. Alvaro Barrera por el apoyo incondicional, la paciencia y el conocimiento brindado en todo el tiempo en el que se llevó a cabo la investigación. Admiro su trabajo y su invaluable guía a través de este proceso. También agradezco al profesor Carlos Cardozo por el acompañamiento y orientación brindada en el laboratorio de cultivo celular. Así mismo, a todas las investigaciones previas, las cuales fueron imprescindibles para la realización de este proyecto.

Agradezco de manera especial y sincera a todas las personas que contribuyeron de alguna forma en este recorrido académico, tanto en el ámbito profesional como personal. Su incondicional cariño, ánimo y apoyo fueron indispensables para la formación de un mejor ser humano, además para una culminación satisfactoria de mi pregrado.

A mis padres, mi razón de ser. Sin ustedes nada de esto sería posible, gracias por formarme como una mujer llena de valores que se esfuerza por aportar algo bueno a la sociedad. Por ustedes y para ustedes todos mis éxitos.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen	7
2. Introducción	9
3. Descripción del proyecto	10
3.1 Planteamiento de la investigación y justificación	10
3.2 Marco teórico y estado del arte.....	11
3.2.1 Enfermedad de Alzheimer	11
3.2.2 Funciones y anatomía del hipocampo	11
3.2.3 Cultivos primarios de células neuronales	14
3.2.4 Caracterización molecular del hipocampo de rata.....	16
4. Objetivos	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos	19
5. Metodología	20
5.1 Estandarización del protocolo	20
5.1.1 Cultivos primarios de neuronas hipocampales	20
5.1.2 Verificación del aislamiento mediante pruebas moleculares	22
5.1.2.1 Extracción RNA de las muestras	22
5.1.2.2 Síntesis de cDNA y reacción en cadena de la polimerasa	23
5.1.2.3 Análisis estadístico	23
6. Resultados	24
6.1 Protocolo cultivo primario de neuronas hipocampales de rata.....	24
6.1.1 Protocolo disección cerebro de rata y aislamiento subregiones del hipocampo.....	26
6.2 Verificación aislamiento mediante pruebas moleculares	28
7. Discusión	30
8. Conclusiones y Recomendaciones	33
8.1 Conclusiones.....	33
8.2 Recomendaciones.....	33
9. Referencias citadas	37

10. Anexos	43
10.1 Composición de los medios empleados para el cultivo primario de neuronas hipocampales	43
10.2 Mezcla reactivos RT- PCR	44
10.3 Secuencias y temperaturas de fusión de primers utilizados en RT-PCR ...	44
10.4 Condiciones y reactivos utilizados para PCR estándar	45
10.5 Análisis estadístico de datos	45
10.6 Aprobación comité de ética Universidad Icesi	48

1. RESUMEN

Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo permiten realizar estudios de disección morfológica y funcional, así como el análisis electrofisiológico de las neuronas individuales. Por tanto, son un modelo ideal para la investigación de la fisiología neuronal. El presente estudio, proporciona un método para el aislamiento y cultivo de diferentes poblaciones de neuronas hipocampales de rata postnatales (P0-P2), con el objetivo de implementar una metodología para futuros experimentos, los cuales evaluarían cuál es la subregión del hipocampo más vulnerable ante diversos estímulos nocivos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, tanto a nivel molecular, como fisiológico.

Se obtuvieron cultivos de neuronas granulares (Giro dentado) y piramidales (CA3 y CA1) aisladas, las cuales fueron mantenidas por 14 días, estas neuronas maduran y poseen un abundante crecimiento dendrítico. Para el aislamiento de las subregiones, se implementó una técnica de disección a pulso, la cual asegura un enriquecimiento celular representativo de cada subregión del hipocampo.

Para verificar que la técnica de disección propuesta fuera efectiva, se emplearon marcadores moleculares propuestos por Lein y colaboradores, los cuales son tejido-específicos para cada subregión del hipocampo. MCM6 para giro dentado, PKC δ para la subregión CA3 y CCN3 para la subregión CA1. Para lo anterior, se tomaron muestras de neuronas en cultivo para realizar la extracción de RNA y posteriormente realizar una síntesis de cDNA a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

Se encontraron diferencias significativas en la expresión de CCN3 en las diferentes subregiones del hipocampo. Es decir, que el gen CCN3 es un marcador tejido-específico de la subregión CA1 del hipocampo de rata. La expresión de genes es diferencial en las distintas etapas de desarrollo y también varía entre los distintos planos anatómicos del hipocampo. Se recomiendan estudios adicionales sobre las propiedades moleculares de las tres subregiones de hipocampo y cómo estas varían durante procesos de desarrollo. Lo anterior, para conocer cómo una modificación en estas propiedades puede afectar el funcionamiento del hipocampo. Se propone para estudios posteriores, la evaluación de diferentes genes como marcadores moleculares.

Palabras clave: *Cultivos primarios de células neuronales, Giro dentado, CA3, CA1, RT-PCR, MCM6, PKC δ , CCN3, Enfermedad de Alzheimer.*

ABSTRACT

Primary cultures of hippocampal neurons allow to perform studies of morphological and functional dissection, as well as electrophysiological analysis of individual neurons. Therefore, it is an ideal model for the investigation of neuronal physiology. The present study provides a method for the isolation and culture of different populations of postnatal rat hippocampal neurons (P0-P2), with the aim of implementing a methodology for future experiments, which would evaluate the subregion of the hippocampus most vulnerable to various noxious stimuli related to Alzheimer's disease, both molecularly and physiologically.

Cultures of isolated granular (Dentate gyrus) and pyramidal neurons (CA3 and CA1) were obtained, these were maintained for 14 days, these neurons mature and possess an abundant dendritic growth. For the isolation of the subregions, a manual dissection technique was implemented, which ensures a representative cell enrichment of each subregion of the hippocampus.

To verify that the proposed dissection technique was effective, were used molecular markers reported by Lein et al., which are tissue-specific for each subregion of the hippocampus. MCM6 for dentate gyrus, PKC δ for the CA3 subregion and CCN3 for the CA1 subregion. To evaluate the gene expression, cultured neuron samples were taken to perform the RNA extraction and then cDNA synthesis through the polymerase chain reaction with reverse transcriptase.

Significant differences were found in the expression of CCN3 in the subregions of the hippocampus. That is, the CCN3 gene is a tissue marker specific of the CA1 subregion of the rat hippocampus. Gene expression is differential at distinct stages of development and varies between anatomical planes of the hippocampus. Further studies are recommended on the molecular properties of the three hippocampal subregions and how they vary during developmental processes. This to know how a modification in these properties can affect the functioning of the hippocampus. The evaluation of different genes as molecular markers is proposed for later studies.

Key words: *Primary neuronal cells cultures, Dentate gyrus, CA3, CA1, RT-PCR, MCM6, PKC δ , CCN3, Alzheimer disease.*

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente, alrededor de 47 millones de personas padecen demencia en todo el mundo. Se prevé que este número aumente a más de 131 millones en 2050, a medida que las poblaciones envejecen (World Alzheimer Report, 2016). El tipo más común de demencia es la enfermedad de Alzheimer, además de ser considerado un problema para la salud mundial, también ha tenido un impacto económico elevado. Ya que, hasta el momento este trastorno neurológico irreversible, no posee ningún tipo de tratamiento que retrase o alivie los diversos síntomas (Toledo et al., 2017). Por ende, encontrar un marcador para el diagnóstico temprano, así como también la causa principal de la enfermedad se ha vuelto de vital importancia para la comunidad científica.

Sin embargo, estos desórdenes neurológicos son difíciles de estudiar *in vivo*. Por esta razón, muchas de las metodologías utilizadas para el estudio de neuronas se basan en cultivos *in vitro*, debido a que se pueden manipular de manera fácil y específica el entorno celular de las neuronas o células gliales cultivadas (Kaar et al., 2017). Esto permite determinar el efecto de una intervención farmacológica y/o hormonal particular en ausencia de cualquier otro factor. De hecho, una manipulación cuidadosa y selectiva del entorno celular proporciona información más específica de las células de estudio (Kaar et al., 2017).

La técnica utilizada para lograr lo anteriormente nombrado, son los cultivos primarios neuronales dado que se observan las células en una monocapa, lo cual hace más sencilla la visualización individual de las neuronas y su sinapsis (Nunez, 2008). Este método es ampliamente utilizado para aplicaciones en neurociencias como estudios farmacológicos y neurotoxicológicos (Beaudoin et al., 2012; Nunez, 2008; Brewer & Torricelli, 2007). Se utiliza la corteza cerebral y el hipocampo para esta clase de estudios, debido a que el mal funcionamiento de estas estructuras puede desencadenar en diversos desórdenes neurológicos como Parkinson y Alzheimer (Brewer, 1998).

Estudios anteriores (Brewer, 1997; Kaech & Banker, 2006; Beaudoin et al., 2012), han planteado diversos métodos para la disección y el aislamiento del hipocampo de rata, así como su determinada metodología de cultivo. No obstante, este estudio tiene como objetivo implementar una herramienta de investigación neuronal eficaz a través del aislamiento y cultivo de diferentes poblaciones de neuronas hipocampales de rata postnatales (P0-P2). Es decir, estandarizar una técnica para la disección y el aislamiento de las diferentes regiones del hipocampo (DG, CA3, CA1). Así mismo, examinar la pureza de la disección mediante pruebas moleculares (RT-PCR) considerando que trabajos anteriores han confirmado la existencia de RNAm tejido-específicos para cada subregión del hipocampo (Lein, Zhao, & Gage, 2004).

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

3.1 PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las principales causas de muerte en la población de adultos-mayores (World Alzheimer Report, 2016). La creciente preocupación por entender la disfunción sináptica y la muerte generalizada de neuronas (Querfurth & Laferla, 2010), así como los mecanismos moleculares ligados a la EA, han llevado a múltiples investigaciones para tratar de encontrar un tratamiento efectivo y/o un marcador de diagnóstico temprano.

La zona del cerebro mayoritariamente afectada por la enfermedad, es el hipocampo, el cual está relacionado con la memoria y el aprendizaje (Bartsch & Wulff, 2015). Anatómicamente, el hipocampo consta de dos subregiones: el giro dentado y el asta de Amón constituida por tres subregiones CA1, CA2 y CA3. Cada una de estas poblaciones neuronales pueden ser caracterizadas teniendo como base la morfología, propiedades electrofisiológicas y diferencias moleculares (Lein et al., 2004).

Sin embargo, a pesar de los avances realizados en el estudio de neuronas hipocampales, no ha sido posible establecer los mecanismos que contribuyen a que ciertos tipos de poblaciones neuronales sean más vulnerables que otras (Schrötter et al., 2017). Por tanto, muchas de estas investigaciones han tenido como objetivo el estudio del hipocampo, desde diferentes perspectivas: morfológica, molecular, fisiológica, bioquímica y genética. La metodología más utilizada para el estudio *in vitro* de las neuronas hipocampales son los cultivos primarios, puesto que son predilectos para la investigación, ya que las poblaciones de neuronas piramidales expresan muchas de sus características fenotípicas en los cultivos celulares (Kaech & Banker, 2006)

Por este motivo, el presente estudio proporciona un método para el aislamiento y cultivo de las diferentes subregiones hipocampales y así implementar una herramienta eficaz para futuros experimentos, los cuales evaluarían cuál es la subregión del hipocampo más vulnerable ante diversos estímulos nocivos relacionados con la EA, tanto a nivel molecular, como fisiológico.

3.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.2.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA es un trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad; clínicamente se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo, tanto en la pérdida de memoria, como cambios en la personalidad y comportamiento que pueden derivar a un déficit de dominios cognitivos como el juicio, la orientación y el lenguaje (Deters et al., 2017). Esta enfermedad se ha convertido en un importante problema de salud y ha tenido un enorme impacto económico. Los costos de este tipo de demencia han alcanzado un total de 818 mil millones de dólares en todo el mundo en 2016 y puede alcanzar el billón de dólares en el 2018 (World Alzheimer Report, 2016). A pesar de la extensa investigación sobre la EA, aún no se han encontrado fármacos o agentes que puedan retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad y tampoco se tienen biomarcadores detectables para un diagnóstico temprano (Reddy et al., 2016).

La causa exacta subyacente de la EA no se conoce, ni se entiende en su totalidad; sin embargo, se asocia con la pérdida sináptica y la alteración de diversos procesos bioquímicos como la acumulación de proteína beta amiloide ($A\beta$), acumulación de la proteína tau hiperfosforilada, disfunción mitocondrial, entre otros (Toledo et al., 2017). Estudios anatómicos con varias líneas de ratones transgénicos han revelado que la enfermedad comienza en el hipocampo (región implicada en el aprendizaje y la memoria), se extiende en la corteza temporal, corteza frontoparietal y finaliza en los núcleos subcorticales (Giau & An, 2016).

3.2.2 Funciones y anatomía del hipocampo

El hipocampo se encuentra dentro del lóbulo temporal medial del cerebro, siendo parte del sistema límbico. Sus funciones principales incluyen la consolidación de recuerdos declarativos, el aprendizaje y la regulación de emociones (El-Falougy & Benuska, 2006). Estudios *in vivo* en roedores, han demostrado una localización funcional a lo largo del eje longitudinal del hipocampo, donde las lesiones a la zona anterior perjudican el aprendizaje espacial, mientras que las lesiones en la zona posterior afectan comportamientos como el miedo o la ansiedad (Bannerman et al., 2002).

El hipocampo, se divide en dos regiones principales: el giro dentado (DG) que consiste principalmente en células granulares, y el asta de Amón la cual se divide en tres subregiones CA1, CA2 y CA3 (Figura 1B), donde se encuentran neuronas piramidales excitatorias (Lein et al., 2004). La conectividad funcional diferencial y la función celular intrínseca son patrones específicos de cada subregión del

hipocampo. Por lo tanto, también existe una amplia evidencia de la expresión génica que delimita específicamente las subregiones del hipocampo CA1, CA2, CA3 y DG. Recientemente, se han identificado varios genes con expresión diferencial en CA1, CA3 y DG (Thompson et al., 2008).

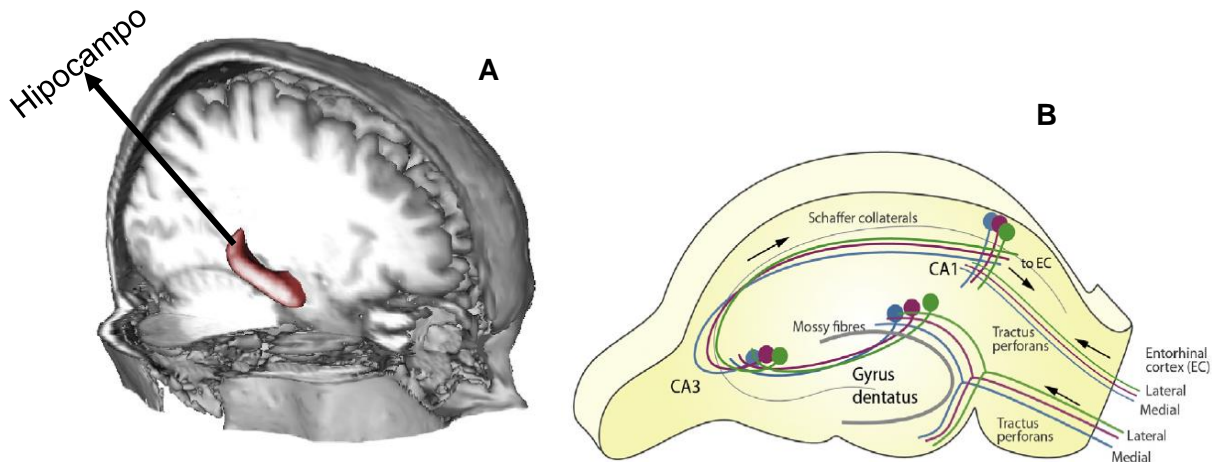


Figura 1. A. Imágenes de resonancia magnética de alta resolución del hipocampo con un análisis de las diferentes regiones del hipocampo. B. Dibujo de las subregiones del hipocampo de rata. Se muestra el flujo unidireccional de la información dentro del circuito hipocampal. Tomado de: (Bartsch & Wulff, 2015).

El hipocampo se ha considerado durante mucho tiempo, como un ejemplo clásico para el estudio de neuroplasticidad funcional (capacidad de adaptar y reorganizar la estructura o función a estímulos internos o externos, lo cual ocurre a nivel celular), dado que se han observado muchos modelos de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) los cuales se piensa que son fundamentales para el aprendizaje y la memoria (Bartsch & Wulff, 2015).

La plasticidad estructural en las neuronas del hipocampo y los circuitos incluye modificaciones del número de sinapsis, así como la formación de nuevas neuronas (Van Strien, Cappaert, & Witter, 2009). De hecho, la zona sub-granular (SGZ) del giro dentado (DG) en el hipocampo, es una de las dos regiones del cerebro adulto que conserva la capacidad de producir neuronas a lo largo de la edad adulta (Lie et al., 2004). Por otra parte, este alto grado de plasticidad del hipocampo conlleva a la alta vulnerabilidad de condiciones deletéreas tales como isquemia, epilepsia y neurodegeneración. Lo anterior, sugiere que las propiedades intrínsecas de las neuronas del hipocampo y los circuitos críticos para la neuroplasticidad, tales como la excitabilidad glutamatérgica, también pueden predisponer a lesiones metabólicas que ocurren en el proceso de diversas enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Koch et al., 2016).

No obstante, la vulnerabilidad del hipocampo aumenta en el envejecimiento (Figura 2) donde el aumento en la pérdida neuronal y la disminución de la neuroplasticidad, puede resultar por cambios morfológicos (disminución volumen hipocampo) o alteraciones funcionales (Bettio, Rajendran, & Gil-Mohapel, 2017). Consecuentes en parte, por cambios neurovasculares e inflamatorios que ocurren en esta estructura cerebral con la edad (Zhang et al., 2012). En los cambios neurovasculares, se destaca la ruptura de la barrera hematoencefálica y la consiguiente fuga vascular que permite que las proteínas neurotóxicas entren en el sistema nervioso central, lo que a su vez puede resultar en neuroinflamación, estrés oxidativo y muerte celular, todos asociados con la neurodegeneración temprana y el deterioro cognitivo (Enciu et al., 2013).

Ha sido reportado que estos cambios vasculares impactan particularmente al hipocampo humano, lo cual se demostró con imágenes de resonancia magnética de contraste dinámico avanzado (Montagne et al., 2015). De hecho, mientras que otras estructuras cerebrales parecen relativamente poco afectadas por el envejecimiento normal, el hipocampo parece ser particularmente afectado, siendo la primera estructura del cerebro en sufrir la ruptura de la barrera hematoencefálica durante el proceso de envejecimiento (Montagne et al., 2015). Una posible explicación para esta localización preferencial, puede ser el hecho de que el hipocampo es más vulnerable a eventos patológicos que pueden causar disfunción endotelial, como un aumento en la concentración de glucocorticoides y/o la acumulación de agregados de péptidos A β (Iadecola, 2015).

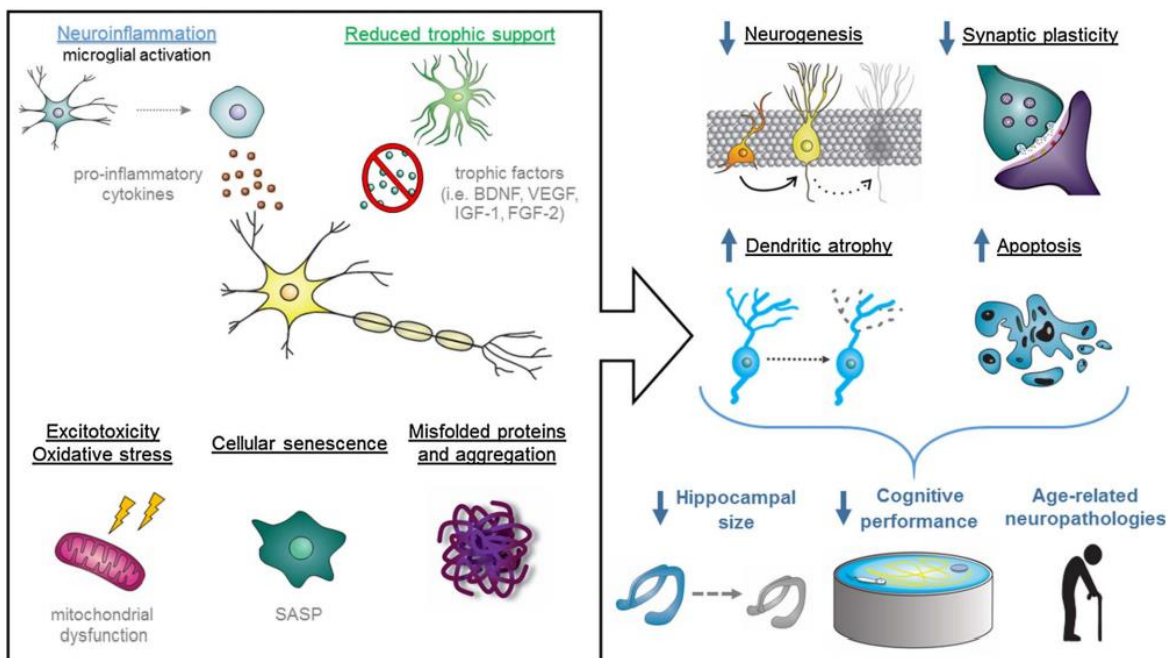


Figura 2. Mecanismos subyacentes que ocurren en el hipocampo debido al envejecimiento. Tomado de: (Bettio et al., 2017).

3.2.3 Cultivos primarios de células neuronales

La complejidad de las estructuras cerebrales hace que sean difíciles de analizar y manipular fácilmente *in vivo*. Las líneas celulares derivadas de los precursores del sistema nervioso central tienen limitaciones debido a que las neuronas derivadas de estas líneas no pueden recapitular las características de las neuronas centrales, incluyendo la capacidad de formar axones bien definidos, dendritas y sinapsis. En su lugar, las técnicas de cultivo de células primarias se han desarrollado con éxito para estudiar estas neuronas *in vitro* (Kaech & Banker, 2006).

Estos cultivos *in vitro*, han proporcionado una gran herramienta para diversas investigaciones en neuronas con aplicaciones en neurociencias incluyendo, entre otros, estudios farmacológicos, electrofisiológicos, inmunohistoquímicos, neurotoxicológicos, de desarrollo y señalización celular (Beaudoin et al., 2012; Nunez, 2008; Brewer & Torricelli, 2007) . Ya que los cultivos neuronales primarios permiten la conversión de un tejido cerebral tridimensional complejo, que es difícil de estudiar *in vivo*, en una monocapa de células bidimensional, lo que permite un fácil acceso y visualización de las neuronas individuales y su respectiva sinapsis (Nunez, 2008).

Además, junto con los avances en las tecnologías de imagen y la manipulación de la expresión génica, estos cultivos han permitido comprender el funcionamiento interno de células neuronales. Por consiguiente, esta técnica ha sido muy utilizada para diseccionar varios aspectos de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la morfogénesis y la conectividad neuronal (Kaech & Banker, 2006). Así mismo, el cultivo de células neuronales elimina, o al menos reduce, potenciales influencias hormonales, vasculares y/o inflamatorias que se pueden encontrar cuando se usan tejidos cerebrales intactos o enteros (Brewer & Torricelli, 2007); lo cual puede ser un factor importante cuando se investiga la localización subcelular y el tráfico de proteínas neuronales tales como receptores de neurotransmisores (Chen et al., 2008).

El cultivo neuronal también permite sembrar un número relativamente grande de poblaciones neuronales idénticas a partir de una sola pieza de tejido cerebral, esta técnica representa un método altamente eficiente para aumentar el tamaño de la muestra a la vez que reduce la variabilidad (Brewer & Torricelli, 2007).

Se han descrito dos tipos de métodos para el cultivo de neuronas. En un método, las neuronas se cultivan intercaladas sobre una capa alimentadora astrocítica. Lo cual permite que las neuronas no estén en contacto directo con los astrocitos, sino que se expongan a factores secretados por astrocitos en el medio. En el segundo método, las neuronas se mantienen en un medio de cultivo suplementado con B27

(Figura 3), el cual posee los cofactores necesarios para el crecimiento neuronal y su mantenimiento (Beaudoin et al., 2012).

Ambas técnicas han sido empleadas con éxito. Si bien el primer método es complejo y se ha utilizado ampliamente en estudios que evalúan las interacciones neurona-glia. Aunque las neuronas pueden usarse para una variedad de aplicaciones como se ha mencionado anteriormente, también existen desventajas al utilizar estos cultivos; puesto que es muy difícil mantener más de 28 días el cultivo *in vitro*. En consecuencia, los estudios deben ser por un periodo limitado de tiempo, además las neuronas cultivadas son altamente sensibles a cambios sutiles en los reactivos o en el medio ambiente (Beaudoin et al., 2012).

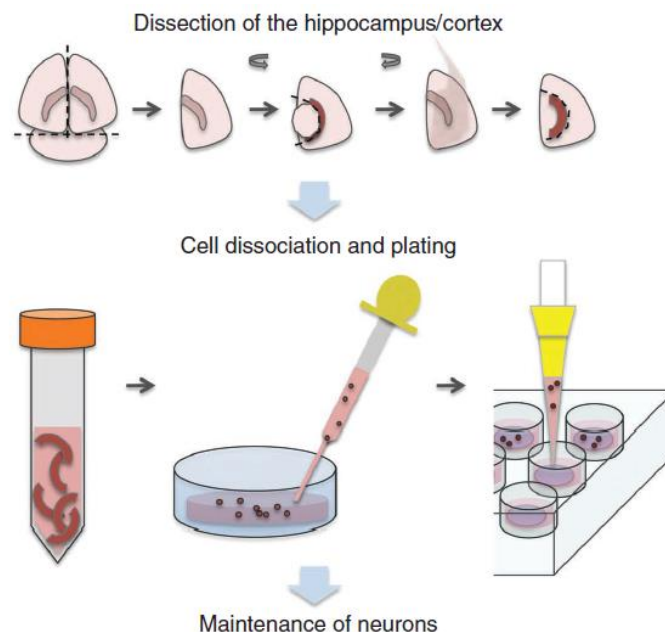


Figura 3. Disección y cultivo del hipocampo completo. Tomado de: (Beaudoin et al., 2012).

La variación en la calidad de los cultivos primarios neuronales está influenciada en cierta medida al tejido que se utilice. Esta calidad mejora utilizando tejido embrionario en lugar de tejido postnatal, pues las neuronas embrionarias tienen una mayor plasticidad, es decir, que poseen menor complejidad en las neuritas, una menor conectividad inter-neuronal y una menor dependencia de los factores neutróficos. Estos factores, hacen que los cultivos embrionarios adquieran una mayor resistencia y una mayor tasa de supervivencia después de la disociación química y mecánica de los tejidos (Brewer & Torricelli, 2007; Zhang et al., 2006; Kivell et al., 2000).

Aunque el uso del cultivo neuronal embrionario puede ser relevante en diversos estudios genéticos o de desarrollo, suele ser mucho más apropiado utilizar tejido postnatal para investigar la función de las neuronas desarrolladas o estudios relacionados con patologías como la enfermedad de Alzheimer. Por otra parte, el

tejido postnatal es relativamente sensible al proceso de cultivo, lo anterior se cree que se debe al hecho de que a medida que las neuronas se desarrollan, se vuelven más susceptibles a la excitotoxicidad mediata por glutamato (Brewer, 1998) y exhiben una mayor tasa de apoptosis (Brewer et al., 2005). Por ello, los cultivos primarios de hipocampo de ratón postnatal tienen aplicaciones de amplia difusión, particularmente en los campos de aprendizaje, memoria y neurodegeneración (Kaar et al., 2017).

3.2.4 Caracterización molecular del hipocampo de rata

Las neuronas de cada subregión del hipocampo son molecularmente distintas. Muchos estudios de expresión génica en animales embrionarios y adultos han demostrado una notable expresión genética específica de cada región. Este hallazgo sugiere que tal regulación discreta de la expresión génica subyace a las diferencias funcionales entre estas poblaciones neuronales. La descripción génica es útil para determinar las diferencias funcionales entre los subtipos neuronales y potencialmente permitir la manipulación genética específica de estas células (Lein et al., 2004). Lein y colaboradores han confirmado la existencia de RNAm tejido-específicos para cada subregión del hipocampo (Lein et al., 2004). De esta lista de genes, para el desarrollo de este estudio se escogieron tres, CCN3 para la región CA1, PKC δ para la región CA3 y MCM6 para DG. De igual manera, se utilizó el gen TUBB3 como control ya que es un marcador neuronal.

3.2.4.1 Gen MCM6 (Minichromosome maintenance complex component 6)

El complejo MCM está compuesto de 6 subunidades (MCM2-7). Son un conjunto de genes altamente conservados presentes en el dominio Eukarya (Wei & Zhao, 2016). Este complejo proteico es vital en la replicación del DNA, donde algunas de las subunidades poseen actividad helicasa (MCM4/6/7) y otras inhiben esta actividad (MCM2/3/5) (You & Masai, 2005). Los niveles de MCM son susceptibles a la inestabilidad genómica, ya que una desregulación de estos podría causar cáncer o defectos en el desarrollo (Harvey et al., 1996).

La fracción de las proteínas MCM ligadas a la cromatina es más alta al final de la fase G1 o al comienzo de la fase S del ciclo celular, pero disminuye gradualmente a medida que avanza la fase S (Holthoff et al., 1998). En *Drosophila*, se ha demostrado que estos genes se expresan en células proliferantes en el embrión temprano, neuroblastos del sistema nervioso central y las células de discos imaginales (Ohno et al., 1998).

La expresión de MCM6 en tejidos humanos es significativa y varía en los estadios de desarrollo, ya que existe mayor expresión en fetos (placenta) que en individuos adultos (Harvey et al., 1996). Esta diferencia en la expresión, se cree que causa

un polimorfismo en LCT el cual está relacionado en la tolerancia a la lactosa (Raz et al., 2013). Por otra parte, en los organismos adultos este gen se expresa en todo el tracto gastrointestinal, musculo esquelético, musculo cardíaco, pulmones, cerebro, entre otros (Harvey et al., 1996).

3.2.4.2 Gen PKC δ (Proteína quinasa C-delta)

La proteína quinasa c es una familia de enzimas clasificadas en 3 tipos: clásicas/convencionales (cPKC), nuevas (nPKC) y atípicas (aPKC). La subfamilia clásica (alpha, beta y gamma), requiere la activación de segundos mensajeros tales como Ca²⁺ y diacilglicerol (DAG), en cambio, la activación de la subfamilia nueva (delta, épsilon, eta, theta y mu) es independiente de Ca²⁺, pero dependiente de DAG y sensible de ésteres de forbol. En la subfamilia atípica (seta, iota y lambda), su activación es independiente de Ca²⁺ y de DAG, pero requiere fosfatidilserina (Park & Patel, 2010; Barmack et al., 2000). Las PKCs de células en reposo se encuentran predominantemente en el citosol, en un estado inactivo. Sin embargo, tras un estímulo, se translocan a posiciones subcelulares como la membrana plasmática, vesículas membranosas, citoesqueleto, mitocondrias, núcleo y actúa como una quinasa activa (Suh et al., 2003).

Estas proteínas regulan diversas funciones celulares, como la proliferación, apoptosis, migración, transcripción y traducción de genes, alteración de la morfología celular, regulación de canales y receptores iónicos, además del contacto célula-célula y la polaridad celular (Mayati et al., 2017). La expresión de las distintas isoformas de proteína quinasa c, difiere entre tejidos, además, la actividad y la expresión de estas proteínas se regulan de forma distinta durante la diferenciación celular así como el desarrollo de órganos (Mizutani, Nakashima, & Nozawa, 1998).

El perfil de expresión específica de PKC δ , es una consecuencia de sus diversas funciones celulares, tales como la señalización de células B, la regulación del crecimiento, apoptosis, secreción, desarrollo de tumores y la diferenciación celular. Además, la expresión de PKC δ , es ubicua en tejidos de mamíferos, incluyendo epidermis, placenta, útero, cerebro, pulmones, sistema hematopoyético y riñones (Zaid et al., 2016).

3.2.4.3 Gen CCN3/NOV (Cysteine-rich 61/Connective tissue growth factor 3)

El gen CCN3 o también llamado nephroblastoma overexpressed en inglés; es miembro de la familia CCN, compuesta por proteínas de la matriz extracelular que poseen un papel importante en diversos procesos biológicos fundamentales como proliferación, diferenciación, adhesión, migración y supervivencia celular (Roddy & Boulter, 2015). Estas proteínas están compuestas por 4 dominios conservados (Un factor de crecimiento similar a insulina que se une a un dominio proteico, un

dominio Von Willebrand factor C, un dominio Trombospondina-1 y un dominio C-terminal que contiene un grupo cisteína) (Chen & Lau, 2009).

El gen CCN3 se identificó a partir de un nefroblastoma de pollo, se encontró que la sobreexpresión de esta proteína inducía una proliferación y diferenciación anormal en el riñón de estos organismos (Chevalier et al., 1998). Los niveles de la proteína CCN3 están altamente regulados por estímulos extracelulares y ambientales, incluyendo varios factores de crecimiento (Jun & Lau, 2011).

También se conoce que CCN3 juega un rol importante en el desarrollo esquelético, cardíaco y neuronal (específicamente en el sistema nervioso central) (Le Dréau et al., 2010). De hecho, análisis transcriptómicos realizados en cerebros humanos y de ratón en desarrollo, demuestran que CCN3 está implicado en la diferenciación y migración neuronal (Park et al., 2015).

3.2.4.4 Gen TUBB3 (Tubulina β clase III)

Las neuronas, así como las células gliales deben proliferar y migrar a las áreas apropiadas de la corteza cerebral, además de proyectar múltiples extensiones celulares como axones y dendritas para formar sinapsis, permitiendo así la comunicación con otras neuronas. Para el desarrollo de estos procesos complejos, los microtúbulos poseen un papel clave (Romaniello et al., 2015). Los microtúbulos son estructuras polarizadas, compuestas de dímeros de tubulina α y β . La β -Tubulina III, posee una expresión limitada principalmente a neuronas, donde el patrón de expresión espacio-temporal de TUBB3 podría ser regulado con precisión para la neurogénesis y el mantenimiento del axón. Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo regulador de la expresión de este gen (Cao et al., 2017).

El gen TUBB3 es un marcador de diferenciación neuronal, en las neuronas post-mitóticas (Hansen et al., 2016). La abundancia relativa de este microtúbulo en el cerebro aumenta constantemente, al parecer por la relación entre la tasa de supervivencia y la diferenciación neuronal. La proliferación y diferenciación, continúan en ciertas regiones cerebrales de mamíferos adultos, como la zona subventricular (SVZ) (Bu & Lephart, 2005).

Se cree que la dinámica relativamente alta de los microtúbulos que contienen β III-Tubulina permite que las neuronas respondan apropiadamente a la orientación del axón. Se ha encontrado que TUBB3 puede desempeñar un papel importante en la protección del estrés en las células del neuroblastoma que experimentan después del tratamiento con glutamato o glicina. Este estrés se puede desencadenar en radicales libres y especies reactivas de oxígeno, aunque, puede que existan otras explicaciones posibles ante esta neuroprotección (Guo, Qiang, & Ludueña, 2011).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar un método para el aislamiento y cultivo de diferentes poblaciones de neuronas hipocampales de rata, durante el primer semestre del año 2017.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar una técnica de disección para aislar y cultivar subregiones del hipocampo de rata.
2. Caracterizar molecularmente cultivos neuronales de las subregiones del hipocampo de rata.

5. METODOLOGÍA

5.1 ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO

La estandarización del protocolo consistió en dos fases: la primera fue el desarrollo del cultivo primario de neuronas hipocampales de rata tomando como base el trabajo de (Beaudoin et al., 2012) y (Kaech & Banker, 2006). Donde se realizó la disección y cultivo de las diferentes subregiones del hipocampo. La segunda fase, consistió en la verificación del aislamiento de estas subregiones del hipocampo por medio de pruebas moleculares estandarizadas previamente a este estudio.

5.1.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES

Para los cultivos primarios de neuronas hipocampales se utilizaron ratas recién nacidas o máximo con dos días de nacidas (P0-P2). Las cuáles fueron sacrificadas por decapitación, con tijeras especiales para este procedimiento. Posteriormente, se realizó una fractura al cráneo con el propósito de extraer el cerebro, e inmediatamente este se depositó en un medio de disección frío, el cual ayuda a prevenir la muerte celular de las neuronas. En este medio, se realizó la respectiva disección de las subregiones del hipocampo.

Luego de esto, las subregiones del hipocampo ya aisladas se retiraron del medio de disección para depositarlas en una solución enzimática, donde las células son separadas del tejido y de la agregación entre ellas mismas, para lo cual se utilizó DNAsa (0,1 mg/mL) y tripsina (0.25%).

Para el desarrollo del cultivo, se realizó un conteo celular a través de una cámara de Neubauer para calcular el número de células que se sembrarían en cada pozo. Después, se dispusieron las células en platos recubiertos con poli-L-lisina (1 mg/mL) que promueve la adhesión celular, y se sembraron en un medio mínimo esencial (MEM) usado como medio de cultivo. Este además posee glucosa (20 mM) como fuente de carbohidratos, piruvato de sodio (1 mM) y suero fetal bovino al 10%. Los platos con las muestras se ubicaron en incubadora de CO₂, a una temperatura de 37°C y un porcentaje de CO₂ del 5%.

El medio de cultivo (MEM) se reemplazó a las cuatro horas de haber sido utilizado a un nuevo medio de cultivo (Neurobasal), el cual está suplementado con B27 para dar estabilidad contra radicales libres y apoptosis, además contiene glutamina (1 mM). Cabe resaltar, que la renovación del medio de cultivo neurobasal se realizó cada tres veces a la semana. En el anexo 11.1 se puede observar de manera detallada la composición de los medios de disección y de cultivo que se utilizaron

para el desarrollo del protocolo. En la Tabla 1 y 2 se encuentran todos los materiales, reactivos y equipos necesarios para la disección y el cultivo primario de neuronas hipocampales de rata.

Tabla 1. *Materiales y reactivos utilizados en el cultivo de neuronas hipocampales de rata*

Materiales y Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> • Ratas P0-P2 • Nevera icopor con hielo • Isoflurano • Etanol al 70% • Platos multipozos recubiertos con Poli-L-Lisina • Solución de disección (HBSS sin rojo fenol, sin Ca⁺², ni Mg⁺²) • Solución de tripsinización (8 mL HBSS 1X sin rojo fenol, 1 mL tripsina, 100 uL DNAsa) • MEM-Platting (Antibióticos 100X – 1%, Suero de caballo – 10%, DMEM) • Neurobasal-B27 (B27 – 2%, Glutamina 1%, Antibioticos 1%, Neurobasal) • Solución de azul de tripano (75 uL azul tripano + 15 uL plating medium) • 20 uL cytosine B-D- arabinofuranoside (Ara-C; Sigma) • Pipetas pasteur de vidrio y de plástico • Gradilla • Micropipetas 20, 200 uL y 1000 uL • Puntas micropipetas de 20, 200 uL y 1000 uL • Tubos Falcon de 50 y 15 ml • Placas de Petri plástico, estériles 35x10mm y 150x25mm • Recipiente de descarte

Tabla 2. *Instrumentos de disección y equipos utilizados en el cultivo de neuronas hipocampales de rata*

Instrumentos de disección y equipos
<ul style="list-style-type: none"> • Cabina flujo laminar • Estereoscopio • Microscopio invertido • Cámara Neubauer • Incubadora CO₂ • Baño María para laboratorio • Kit de disección: Tijera quirúrgica, pinzas curvas y rectas (tamaño mediano y pequeño), tijeras de microdisección de punta curva (nº 7), hoja de bisturí No. 11, pinzas de titanio Dumont nº 5, espátula de laboratorio.

5.1.2 VERIFICACIÓN DEL AISLAMIENTO MEDIANTE PRUEBAS MOLECULARES

En los cultivos primarios del hipocampo de rata, se sembraron 1×10^6 células/pozo en platos de 6 pozos. Para obtener este número de células, se aislaron de 3 neonatos (P0-P2) las diferentes subregiones del hipocampo (DG: Giro dentado; CA1: Cuerno de Amón 1; CA3: Cuerno de Amón 3) y se agruparon. Los cultivos fueron mantenidos por 14 días y luego de esto se llevó a cabo la extracción de RNA. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados se realizaron 3 experimentos independientes. En total se requirieron 12 neonatos de rata.

Tabla 3. Diseño experimental de la verificación del aislamiento mediante pruebas moleculares.

Región	DG	CA3	CA1
Gen			
MCM6	3 R		
PKC δ		3 R	
CCN3			3 R
Beta III Tub	3 R		

R: Réplica

5.1.2.1 Extracción RNA de las muestras

Para la extracción de RNA de las muestras se utilizó E.Z.N.A Total RNA kit I (R6834-01) de la empresa Omega bio.tek y se siguió el protocolo para células en cultivo, descrito por el kit.

Se tomaron aproximadamente de 1×10^6 células previamente tripsinizadas y fueron agregadas a un tubo de 1,5 mL para su lisis con 700 μ L del buffer de lisis TRK. Se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto.

Se aplicó la muestra a una columna de ARN HiBind para luego centrifugar a 10.000 x g por 30 segundos. Para el lavado, el cual se repitió por tres veces consecutivas, se añadió 500 μ L del buffer de lavado (RNA Wash Buffer II) pipeteando directamente sobre la columna, para luego centrifugar nuevamente a 10.000 x g durante 30 segundos, se descartó el sobrenadante.

Se transfirió la columna a un tubo de centrifuga de 1,5 mL limpio con agua DEPC tratada, para luego centrifugar a 13.000 x g por 2 minutos. La muestra fue guardada a -80°C hasta que se realizó la RT-PCR.

5.1.2.2 Síntesis de cDNA y reacción en cadena de la polimerasa

A partir del RNA extraído, se prosiguió a obtener cDNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. Para la obtención del cDNA se utilizó el protocolo de Promega, GoScript™.

Se tomaron 500 ng de la muestra de RNA en un tubo de 1.5 mL junto con oligodt y agua DEPC para incubarla a 65°C por 5 minutos, luego se dispuso en hielo por 1 minuto. Después, se preparó una mezcla con todos los reactivos necesarios para la PCR (Anexo 11.2). Posteriormente se llevó al termociclador con un protocolo establecido, el cual consta de 5 minutos a 25°C; 60 minutos a 42°C y por último 15 minutos a 70°C.

La elección de los primers se basó en el trabajo de Lein y colaboradores, los cuales confirman la existencia de RNAm tejido-específicos para cada subregión del hipocampo. CCN3 para la región CA1, PKC δ para la región CA3 y MCM6 para DG así mismo, se utilizó 1 control (TUBB3) para el experimento. (Secuencias y temperaturas de fusión utilizadas en anexo 11.3).

Antes de proseguir con la PCR estándar, se dispuso a verificar la concentración de cDNA contenido en cada una de las muestras, se comparó con un blanco para evitar contaminaciones. A partir de la lectura, se prosiguió a diluir las muestras con agua DEPEC para evitar bandas inespecíficas.

Posteriormente, se realizó la PCR estándar (Condiciones y reactivos en anexo 11.4) en un termociclador para cada gen escogido en la investigación (CCN3, PKC δ y MCM6) además del control (TUBB3). Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio.

Los resultados de la RT-PCR fueron analizados en el software ImageJ (NIH, USA).

5.1.2.3 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 número de datos era muy bajo, se asumió que los datos no poseían una distribución normal. Por lo tanto, se realizó una prueba de Friedman con un análisis post-hoc de Dunn para establecer si existían diferencias entre los grupos de estudio. Se asumió un valor de $p < 0.05$ como significancia estadística y los datos se reportaron como la media \pm SEM.

6. RESULTADOS

6.1 Protocolo cultivo primario de neuronas hipocampales de rata

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de ética de la Universidad Icesi (Anexo 10.6)

Se obtuvo un cultivo de neuronas granulares (DG) y piramidales (CA3, CA1). En este cultivo las neuronas maduran y poseen un abundante crecimiento dendrítico. Estas neuronas pueden ser mantenidas en cultivo alrededor de 28 días.

Disección de cerebro y aislamiento de las subregiones del hipocampo (DG, CA3, CA1)

- 1) Inducir anestesia por hipotermia colocando a los neonatos sobre papel absorbente en una nevera con hielo por 10 minutos. **Nota:** También se puede someter a frío y anestésicar con Isoflurano. El neonato no debe morir en el transcurso de este procedimiento.
- 2) Con tijera quirúrgica, decapitar al neonato. Tomar la cabeza y apoyar con la pinza nº5 en la parte nasal. Con pinza Kelly curva, realice una incisión en la línea media de la cabeza, desde la región posterior hasta la región anterior del encéfalo y retirar la piel sobrante con unas pinzas.
- 3) Realizar una pequeña incisión en la base del cráneo y siga a lo largo de la línea media. Con pinzas retirar el cráneo **Nota:** Ser cuidadoso, no dañar el tejido cerebral, si precisa hacer más cortes para retirar el cráneo, puede hacerlo.
- 4) Introducir la pinza curva nº7 en la región del bulbo olfatorio y tirar hacia atrás. El cerebro sale fácilmente. Poner el cerebro completo en medio de disección a 4°C.
- 5) Colocar la solución enzimática en equipo baño maría a 37°C e iniciar la disección, observando a través de un estereoscopio. **Nota:** La disección debe ser rápida para asegurar una mayor viabilidad celular.
- 6) Tener una vista dorsal del cerebro. Con una micro espátula retirar cerebelo y separar los dos hemisferios realizando un corte entre estos. Tomar un hemisferio y colocar en plano sagital.
- 7) Extraer los ganglios basales con la pinza nº7 hasta observar una concavidad. Retirar las meninges. **Nota:** Asegurarse de retirar todas las meninges, con esto

se asegura que el cultivo solo tenga células neuronales. En algunas ocasiones, si el bulbo olfatorio aún se identifica, se puede cortar y con este retirar más fácil las meninges.

- 8) A partir de la parte posterior, extraer el hipocampo con la pinza nº 7. Realizar un corte coronal en uno de los extremos del hipocampo para identificar las subregiones Giro dentado, CA3 y CA1. **Nota:** Evitar cualquier daño en la estructura del tejido.
- 9) Empleando una hoja de bisturí No. 11 y pinzas curvas No. 7, cortar de manera septo-temporal la región CA3 y colocarla en un tubo de 1.5 mL con medio de disección frío.
- 10) Empleando las pinzas No.7, retirar el Giro dentado y colocarlo en un tubo de 1.5 mL con medio de disección frío.
- 11) El tejido restante corresponde a la región CA1, tomarlo y colocarlo en un tubo de 1.5 mL con medio de disección frío.
- 12) Repita los pasos 8 al 11 en el hemisferio restante. **Nota:** Al obtener tan poco tejido, se sugiere realizar la disección al menos a 3 individuos por cultivo.

Disgregación del tejido y tripsinización

- 13) Sumergir el tejido correspondiente a cada región del hipocampo en la correspondiente solución enzimática y seccionar con herramienta (espátula). **Nota:** Tener una espátula para cada subregión del hipocampo, así se evitan contaminaciones.
- 14) Incubar el tejido por 20 minutos en la solución enzimática, agitando cada 5 minutos. **Nota:** Marcar los tubos de manera adecuada para evitar confusiones.
- 15) Terminada la incubación, realizar 3 lavados cada uno con 4 mL de plating médium. Resuspender el tejido en 2 mL de plating medium. **Nota:** Trabajar en cabina flujo laminar.
- 16) Realizar disgregación mecánica con la pipeta Pasteur de vidrio de mayor poro (10 pasos carga-descarga). **Nota:** Evitar burbujas.
- 17) Cambiar a la pipeta de poro medio. Realizar 10 pasos de disgregación. **Nota:** Evitar burbujas.
- 18) Cambiar a la pipeta de poro pequeño. Realizar 10 pasos de disgregación. **Nota:** Evitar burbujas. Dejar decantar por 120 segundos.

- 19) Tomar 1 mL del sobrenadante y llevarlo a un tubo nuevo de 15 mL. A la solución con tejido restante, agregar 1 mL de plating medium.
- 20) Realizar disgregación mecánica adicional al tejido restante con pipeta de poro pequeño. Dejar decantar por 120 segundos.

Determinación del porcentaje de células viables

- 21) Tomar 1 mL adicionarlo al tubo nuevo de 15 mL y mezclar. Realizar 10 pasos adicionales de disgregación a la suspensión celular del tubo nuevo de 15 mL. Tomar 10 uL de la suspensión celular y mezclar con 75 uL de plating médium y 15 uL de la solución de azul de tripano. Factor de dilución 1:10.
- 22) Tomar 8 uL de la mezcla de azul de tripano con células y poner en la cámara de Neubauer. Realizar en microscopio el conteo celular.
- 23) Repetir del paso 15 al 22 a las dos subregiones del hipocampo restantes.
- 24) Prepare la suspensión celular en la densidad deseada de células viables diluyendo la suspensión en plating medium.

Cultivo celular

- 25) Dejar los platos de cultivo en incubadora. **Nota:** marcar los platos debidamente para evitar confusiones entre las subregiones.
- 26) A las 4 horas cambiar el medio a Neurobasal-B27.
- 27) El segundo cambio de medio se realiza al segundo día *in vitro*. Recambiar 30% del medio. Aplicación medio neuronal, donde la concentración de AraC sea de 0,4 uM por pozo.
- 28) Al cuarto día retirar AraC y adicionar medio nuevo.
- 29) Renovación medio Neurobasal-B27 cada 3 veces a la semana. **Nota:** En cada cambio de medio, revisar el estado del cultivo. Ser cuidadoso en la renovación del cultivo después de las primeras dos semanas.

6.1.1 Protocolo disección cerebro de rata y aislamiento subregiones del hipocampo

El procedimiento que se llevó a cabo para obtener el aislamiento de las subregiones del hipocampo (DG, CA3, CA1), es decir de los pasos 6 a 11 del protocolo, se muestran en la figura 4.

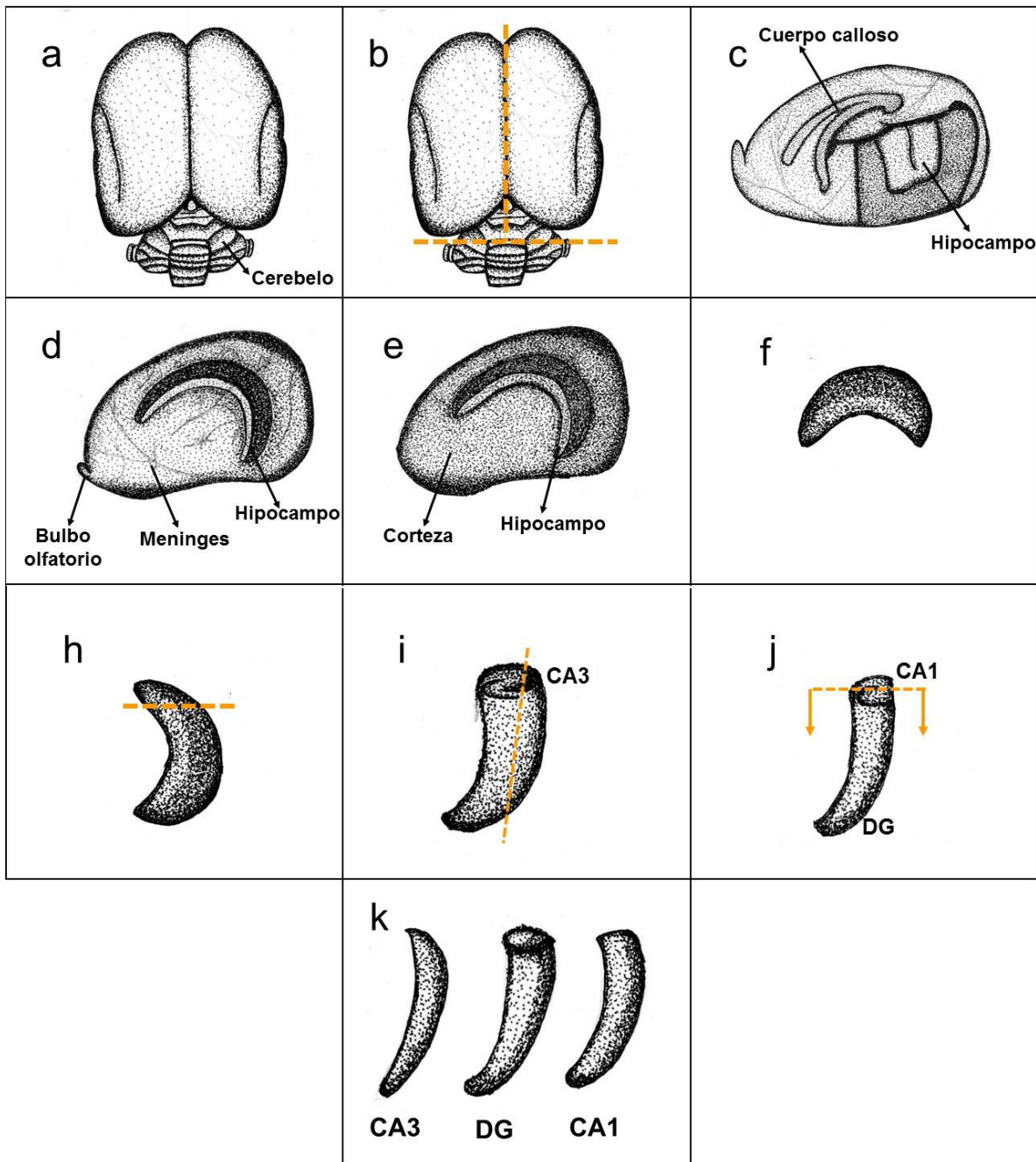


Figura 4. Pasos disección subregiones del hipocampo de rata. **a.** Vista dorsal del cerebro de rata. **b.** Retirar cerebelo y separar los dos hemisferios realizando un corte sagital entre estos. **c.** Vista medial hemisferio derecho. **d.** Retirar ganglios basales. **e.** Retirar meninges (si observa el bulbo olfatorio puede retirarlo para más facilidad en la extracción de las meninges). **f.** Extraer hipocampo. **g.** Corte coronal en uno de los extremos del hipocampo. **h.** Corte septo-temporal para extraer CA3. **i.** Corte sagital para separar DG de CA1. **j.** Aislamiento subregiones del hipocampo de rata (CA3, DG, CA1).

6.2 Verificación aislamiento mediante pruebas moleculares

Se verificó la estandarización de la PCR para los diferentes primers utilizados en el estudio (Figura 5). Se comprobó que las condiciones para la PCR estándar planteadas anteriormente por (Rodríguez, 2017), eran las adecuadas para la debida amplificación de los genes de interés. Para los genes MCM6, PKC δ , CCN3 y TUBB3 se utilizaron las temperaturas de alineación de los primers 58°C, 68°C, 65°C y 57°C respectivamente.

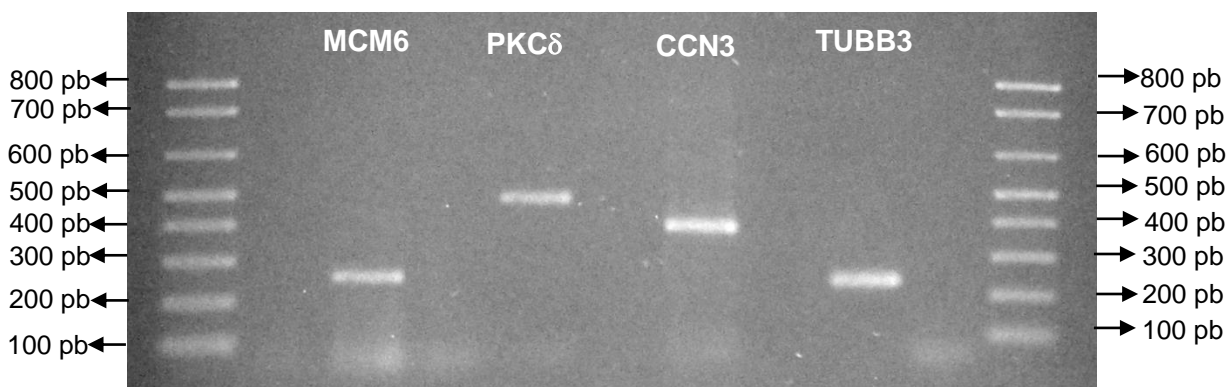


Figura 5. Estandarización primers utilizados en la PRC estándar. MCM6 (241pb), PKC δ (457pb), CCN3 (375pb), TUBB3 (237 pb).

Las pruebas moleculares planteadas para la verificación del aislamiento de las diferentes subregiones del hipocampo se realizaron a los 14 días después de realizado el cultivo *in vitro*. Estas se realizaron a tres grupos de muestras. Los resultados fueron observados en geles de agarosa como muestra la figura 6a, en todos los casos se incluyó un control (H₂O), para descartar cualquier tipo de contaminación.

El análisis densitométrico de los geles mostrados en la figura 6a se realizó con el software ImageJ (NIH, USA). Los resultados fueron tabulados en Microsoft Excel[®] y se realizó el respectivo análisis estadístico (Anexo 10.5) con el programa GraphPad Prism 7[®], a partir del cual se obtuvieron histogramas de la expresión de cada gen en las diferentes subregiones del hipocampo de rata (Figura 6b).

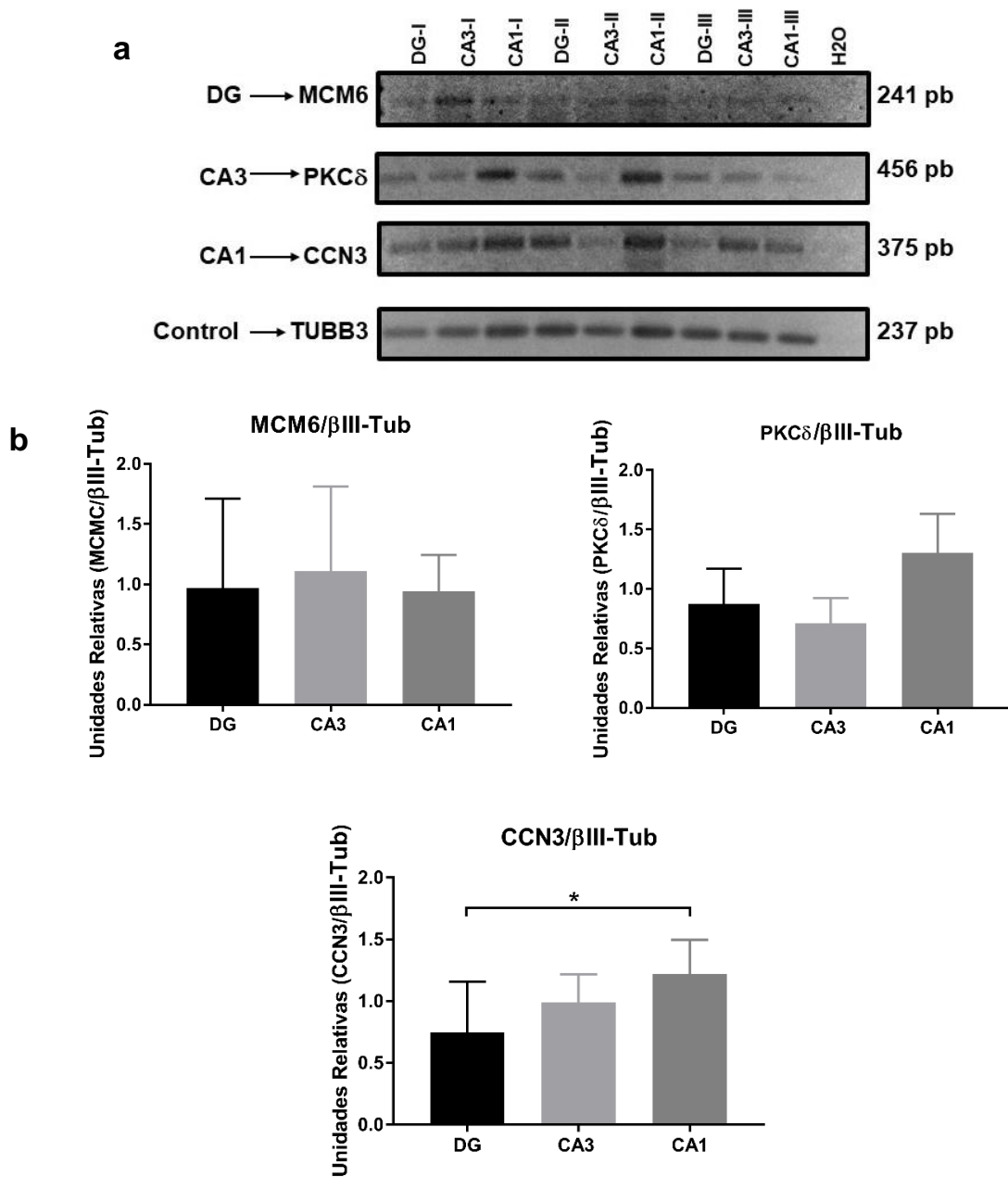


Figura 6 a. Resultados amplificación genes visualizados en geles de agarosa. **b.** Histogramas de la expresión de los genes MCM6, PKCδ y CCN3 en las diferentes subregiones del hipocampo de rata.

El análisis estadístico muestra que solo se obtuvieron diferencias significativas en el gen CCN3 con un valor $p = 0,0278$. Es decir, que existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CCN3 entre las subregiones del hipocampo CA1 y DG.

Los resultados indican que el gen MCM6 se expresa en una forma homogénea en el hipocampo de rata y no existen diferencias significativas entre las subregiones. El gen PKC δ se encuentra enriquecido en la subregión CA1, seguido por DG. Por otra parte, estas diferencias fallan en alcanzar una diferencia estadísticamente significativa. Por último, el gen CCN3 se expresa en una mayor proporción en la subregión CA1.

7. DISCUSIÓN

La preparación y el mantenimiento de los cultivos primarios de células neuronales no es sencillo. Sin embargo, es una metodología ampliamente utilizada para diversas aplicaciones en el área de neurociencias. Los cultivos con neuronas aisladas ofrecen distintas ventajas comparados con el tejido completo, ya que en este hay gran variedad de células (ej. astrocitos, oligodendrocitos, microglía, etc) que pueden causar una interpretación errónea de los datos en experimentos relacionados con proteínas que están presentes en diferentes poblaciones celulares (Yang et al., 2017). Así mismo, las neuronas aisladas en cultivo permiten el acceso directo para la aplicación de agentes farmacológicos y el registro electrofisiológico (Brewer, 1997).

Existen dos pasos críticos en la preparación de cultivos neuronales. El primero, es la disgregación del tejido y el segundo es el cambio del medio neuronal a B27/Neurobasal, (el cual ayuda en el crecimiento y diferenciación de las neuronas) (Ahlemeyer & Baumgart-Vogt, 2005), ya que una incubación más corta en el medio neuronal impide la unión celular y una incubación prolongada impide tanto la unión celular como la formación de neuritas (Chen et al., 2011). Por tanto, los tiempos establecidos, así como las cantidades de reactivos utilizadas son vitales para la obtención de un cultivo *in vitro* eficaz.

Las neuronas en cultivo pasan por distintas etapas de desarrollo, desde la extensión de lamelipodios, seguido por la especificación de axones y dendritas hasta la formación de la sinapsis y posterior maduración. La población celular no está completamente sincronizada, por lo tanto, todas las neuronas no están simultáneamente en la misma etapa de desarrollo, lo cual puede afectar la expresión génica (Beaudoin et al., 2012).

Las neuronas del hipocampo pueden distinguirse entre sí debido a características moleculares, morfológicas y fisiológicas (Lein et al., 2004). Estas diferencias proporcionan información sobre la función específica de cada subregión y como la conectividad entre estas hacen posible el funcionamiento del hipocampo (Thompson et al., 2008). En la actualidad, existe una evidencia creciente de que el transporte dirigido de RNA mensajeros, seguido por la traducción local, proporciona un mecanismo de compartimentalización. Lo cual hace que las

neuronas tengan funciones específicas y facilita el procesamiento local de señales extrínsecas, tales como diferentes entradas sinápticas (Glock et al., 2017).

Mediante hibridación *in situ* Lein y colaboradores propusieron genes que muestran una expresión restringida en las diferentes subregiones del hipocampo de ratón. Para el gen MCM6 (Hamilton et al., 2017) mediante la misma técnica, encontraron que este presenta una expresión diferencial en giro dentado. Para el gen PKC δ también se confirma expresión diferencial de CA3 (Thompson et al., 2008). No obstante, en el hipocampo de rata esta expresión es característica de células piramidales (CA3 y CA1) (McNamara et al., 1999; Tang et al., 2004). En nuestros resultados, estos genes no poseen una expresión diferencial entre las subregiones, el análisis de estas variaciones será discutido a continuación. Por último, la expresión de CCN3 en el hipocampo de roedor se confirma en diversos estudios (Dong et al., 2009; Natarajan et al., 2000; Su et al., 2001), incluyendo este.

Se plantean diversos factores que pudieron influir en los resultados para que MCM6 y PKC δ no pudieran ser catalogados como marcadores moleculares. El primero, es la posible contaminación en las muestras, ya que la disección se realizó a pulso. Cabe aclarar que no se buscaba una alta pureza, en cambio, se buscaba un enriquecimiento celular de cada una de las subregiones del hipocampo. Segundo, las células pueden tener respuestas únicas a las condiciones de cultivo en las que están expuestas, así como a las diversas estimulaciones que se presentan en el procedimiento del cultivo. Estas condiciones pueden afectar al transcriptoma neuronal (Francis et al., 2014).

El tercer factor, como se mencionó anteriormente, es no tener una población neuronal totalmente sincronizada, es decir que todas las neuronas no pueden estar simultáneamente en la misma etapa de desarrollo (Beaudoin et al., 2012). Diferentes estudios proponen que la expresión génica varía sustancialmente entre las distintas etapas de desarrollo (Hackett et al., 2015; Pramparo et al., 2011). Por ejemplo, en la etapa embrionaria (E14) los genes implicados en el ciclo celular y procesos de expresión génica son predominantes, sin embargo, en el nacimiento (P0) aunque no tenga procesos de expresión génica característica, se comienzan a realizar procesos de migración celular. El día 14 después del nacimiento (P14) se caracteriza por la represión de síntesis de proteínas, en este punto la expresión génica sigue siendo aproximadamente constante (Pramparo et al., 2011).

Este cambio en la expresión génica a través de las etapas de desarrollo, también se puede visualizar en Allen Mouse Atlas (<http://www.brain-map.org>). Es una plataforma de acceso libre, donde se almacena la información de la expresión génica en todo el cerebro de ratón, utilizando datos de hibridación *in situ* (ISH), es útil para comprender la estructura génica y celular del cerebro (Lein et al., 2007). Aunque la diferencia en las etapas de desarrollo entre las neuronas no sea muy significativa, el utilizar una técnica sensible como lo es la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR) puede en parte, constatar esta diferencia entre la expresión o entre los procesos de migración celular.

Por ejemplo, utilizando la herramienta online de Allen Mouse Atlas (<http://www.brain-map.org>), el gen $PKC\delta$ no se expresa en etapas embrionarias, ni en la etapa P4, pero solo hasta el estadio P14 se observa una expresión diferencial en la subregión CA3 del hipocampo en un plano sagital. No obstante, en un plano coronal se observa una leve expresión de $PKC\delta$ en la subregión CA1. Por ende, se podría inferir que, en estadios embrionarios, existe una baja expresión de $PKC\delta$ en la subregión CA1 y luego, por procesos de migración celular o cambios en la expresión génica, este gen se expresa diferencialmente en la subregión CA3 del ratón adulto. Esta hipótesis podría explicar los resultados obtenidos en este estudio, donde se observa una expresión diferencial de $PKC\delta$ en la subregión CA1 y no en la subregión CA3 como se esperaba en un comienzo.

Un cuarto factor, es la expresión diferencial que existe entre el eje longitudinal y transversal del hipocampo de roedores (Figura 7). Las observaciones de Thompson y colaboradores sugieren que la región del cuerno de Amón (CA1 y CA3) del hipocampo, se divide en tres dominios moleculares principales: un dominio dorsal, intermedio y ventral, entre estos se presentan diferencias en la expresión génica. Es decir, que existe diferencia en la expresión génica a lo largo del eje septo-temporal, así como también en el eje próximo-distal del hipocampo (Dong et al., 2009). Por ejemplo, el gen $Nov/CCN3$ tiene expresión consistente en el dominio dorsal de la subregión CA1 del hipocampo y el gen $PKC\delta$ tiene una expresión diferencial en la región septal de CA3 (Thompson et al., 2008). Esta expresión diferencial afecta de manera significativa en cómo se realiza la disección del tejido, ya que al poseer diferencias entre los ejes puede que una mala disección lleve a resultados erróneos. Por lo tanto, se recomiendan genes que tengan una expresión tejido-específica, que además adquieran una expresión homogénea en el eje longitudinal y transversal de las distintas subregiones del hipocampo.

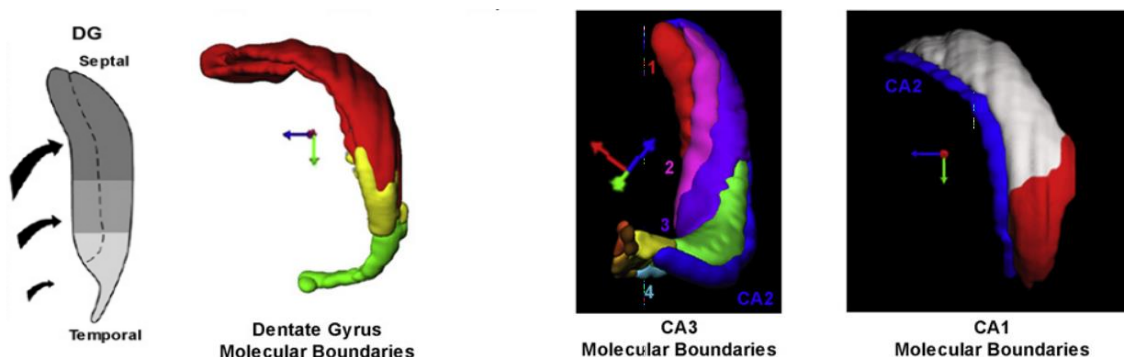


Figura 7. Dominios moleculares subregiones del hipocampo (DG, CA3 y CA1). Tomado de: (Thompson et al., 2008).

Por último, pero no menos importante se encuentra el hecho de que nos basamos en la expresión génica del cerebro de ratón, sin embargo, se trabajó con cerebro de rata. Al ser especies distintas también la expresión génica es distinta, la expresión molecular en el cerebro de rata no está tan bien descrita como en el de ratón ya que este último, se utiliza como modelo en diversas metodologías transgénicas. Con estos resultados, también se resalta que la elección del modelo animal podría afectar a los resultados esperados tales como la fisiología molecular subcelular (Francis et al., 2014). Cabe resaltar que el cultivo propuesto, también se puede realizar con neuronas postnatales de ratón, pero hay que tener en cuenta que estos cultivos, son de mayor cuidado a comparación con los de rata (Kaar et al., 2017).

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 CONCLUSIONES

El cultivo primario y el aislamiento de diferentes poblaciones de neuronas hipocámpales de rata descrito; aunque posee un nivel de dificultad alto debido al mantenimiento que requiere, puede usarse para una variedad de estudios moleculares, fisiológicos y bioquímicos celulares.

Con el protocolo de disección propuesto para el aislamiento de las subregiones del hipocampo de rata (DG, CA3, CA1) no se puede asegurar una pureza en los cultivos, no obstante, si permite un enriquecimiento celular representativo de cada subregión del hipocampo.

La expresión molecular en el cerebro de roedores varía a través de las distintas etapas de desarrollo y también entre los diferentes ejes del tejido. Se comprueba que el gen *CCN3* (nephroblastoma overexpressed) es un marcador tejido-específico de la subregión CA1 del hipocampo de rata.

8.2 RECOMENDACIONES

Este protocolo demanda un entrenamiento constante, aunque las disecciones se realizaron a pulso, se obtuvo un aislamiento bastante significativo de las tres subregiones del hipocampo. Por otra parte, si se tiene un presupuesto elevado, se puede optar por utilizar un microscopio de microdisección láser para realizar este tipo de disecciones y asegurar un mayor grado de pureza en cada subregión.

En cuanto al desarrollo de los cultivos, se recomienda lo siguiente:

- El cuarto de cultivo debe ser un sitio aislado, donde la limpieza sea exhaustiva cada dos semanas o menos, si el trabajo es constante.
- Todos los materiales a utilizar en el desarrollo del cultivo deben estar estériles.
- Trabajar adecuadamente en la cabina de flujo laminar, utilizar luz UV antes del desarrollo de cada cultivo.
- Cualquier implemento que ingrese a la cabina debe limpiarse con etanol al 70%.
- El kit de disección debe limpiarse con etanol al 70% antes y después del protocolo de disección.
- Los diferentes medios de cultivo deben ser preparados al menos con un día de anticipación.
- Todo el procedimiento del cultivo celular se debe llevar a cabo en un lapso de dos horas.
- Recubrir los platos en donde se van a cultivar las células con poli-L-lisina, el día anterior al procedimiento. El día del cultivo, realizar tres lavados a la poli-L-lisina con agua mili-Q estéril.

Son necesarios estudios adicionales sobre las propiedades moleculares de las tres subregiones del hipocampo. Así mismo, como estas propiedades pueden cambiar durante procesos de desarrollo. Lo anterior, para conocer y entender como estas propiedades se pueden ver alteradas o modificadas por enfermedades que afectan el funcionamiento normal del hipocampo.

Empleando la herramienta Allen Mouse Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>), se encontraron diversos genes categorizados como tejido-específicos de las diferentes subregiones del hipocampo. Sin embargo, teniendo en cuenta una expresión constante en las distintas etapas de desarrollo, así como de los planos coronal y sagital en adultos (P56); se propone para estudios posteriores la evaluación de los siguientes genes como marcadores moleculares:

- Subregión CA1: ***Mpped1*** (Metallophosphoesterase domain containing 1) implicado en neurogénesis del neocórtex y el hipocampo (Chen et al., 2010) y ***Lmo1*** (LIM domain only 1) papel activo en embriogénesis (Matis et al., 2007). **Figura 8 y 9.**



Figura 8. Plano sagital de expresión gen *Mpped1* en cerebro de ratón P4 utilizando hibridación in situ. Crédito de imagen: Allen Institute, experimento 100054986.

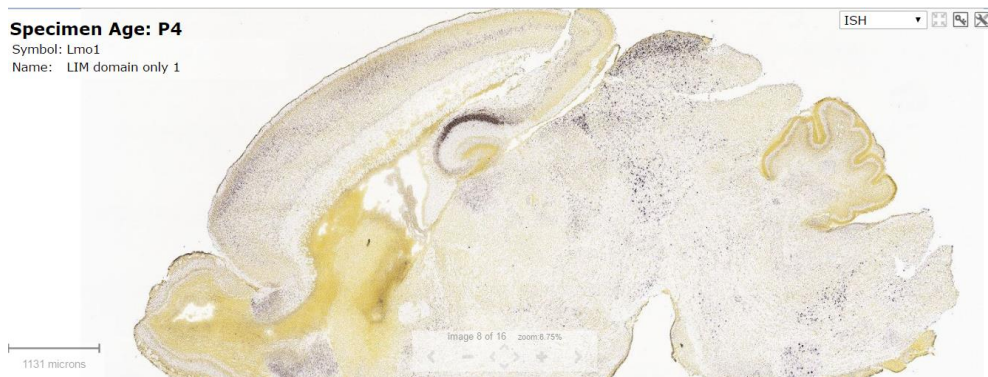


Figura 9. Plano sagital de expresión gen *Lmo1* en cerebro de ratón P4 utilizando hibridación in situ. Crédito de imagen: Allen Institute, experimento 100078475.

- Subregión CA3: ***Trps1*** (Trichorhinophalangeal syndrome I) participa en procesos de desarrollo de la región facial, folículos pilosos, formación de extremidades y sistema nervioso central (Kunath et al., 2002). **Figura 10.**



Figura 10. Plano sagital de expresión gen *Trps1* en cerebro de ratón P4 utilizando hibridación in situ. Crédito de imagen: Allen Institute, experimento 100091871.

- Giro dentado: ***Prox1*** (Prospero homeobox 1) en hipocampo induce diferenciación celular y en la zona subventricular induce diferenciación en oligodendrocitos (Bunk et al., 2016). **Figura 11.**

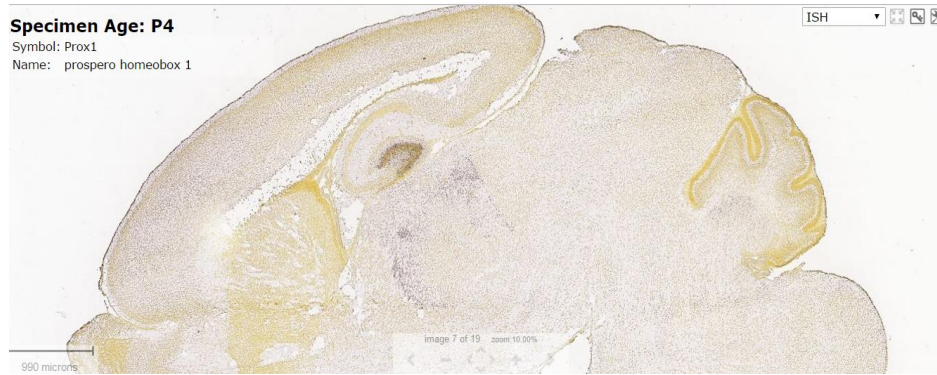


Figura 11. Plano sagital de expresión gen *Prox1* en cerebro de ratón P4 utilizando hibridación in situ. Crédito de imagen: Allen Institute, experimento 100040958.

Además del atlas, cabe resaltar que existe poca información bibliográfica con respecto a los genes anteriormente recomendados. Muchos de estos no poseen información exacta sobre sus funciones en el hipocampo, por lo tanto, se sugiere que en estudios posteriores se realice silenciamiento génico para predecir sus funciones y como modificaciones en su expresión, pueden alterar el funcionamiento del hipocampo.

9. REFERENCIAS CITADAS

- Ahlemeyer, B., & Baumgart-Vogt, E. (2005). Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 149(2), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.05.022>.
- Bannerman, D., Deacon, R., Offen, S., Friswell, J., Grubb, M., & Rawlins, J. (2002). Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav. Neurosci.*, 479, 884-901. doi:. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.116.5.884>.
- Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, 309(August), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>.
- Beaudoin, G. M. J., 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. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.099>.
- Bettio, L. E. B., Rajendran, L., & Gil-Mohapel, J. (2017). the Effects of Aging in the Hippocampus and Cognitive Decline. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 79(November 2016), 66–86. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.030>.
- Brewer, G. (1998). Age-related toxicity to lactate, glutamate, and beta-amyloid in cultured adult neurons. *Neurobiol. Aging*, 19, 561-568. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(98\)00091-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(98)00091-8).
- Brewer, G. J. (1997). Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 71(2), 143–155. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00136-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00136-7).
- Brewer, G., & Torricelli, J. (2007). Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat. Protoc.*, 2, 1490-1498. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nprot2007.207>.
- Brewer, G., Lim, A., Capps, N., & Torricelli, J. (2005). Age-related calcium changes, oxyradical damage, caspase activation and nuclear condensation in hippocampal neurons in response to glutamate and beta-amyloid. *Exp. Gerontol*, 40, 426-437. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2005.03.007>.
- Bu, L., & Lephart, E. D. (2005). Soy isoflavones modulate the expression of BAD and neuron-specific beta III tubulin in male rat brain. *Neuroscience Letters*, 385(2), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.05.040>.
- Bunk, E. C., Ertaylan, G., Ortega, F., Pavlou, M. A., Gonzalez Cano, L., Stergiopoulos, A., ... Schwamborn, J. (2016). Prox1 Is Required for Oligodendrocyte Cell Identity in Adult Neural Stem Cells of the Subventricular Zone. *Stem Cells*, 2053–2064. <https://doi.org/10.1002/2>.

- Cao, S., Du, J., Lv, Y., Lin, H., Mao, Z., Xu, M., ... Liu, Y. (2017). PAX3 inhibits β -Tubulin-III expression and neuronal differentiation of neural stem cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *485*(2), 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.086>.
- Chen, C. M., Wang, H. Y., You, L. R., Shang, R. L., & Liu, F. C. (2010). Expression analysis of an evolutionary conserved metallophosphodiesterase gene, *Mpped1*, in the normal and β -catenin-deficient malformed dorsal telencephalon. *Developmental Dynamics*, *239*(6), 1797–1806. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22293>.
- Chen, C.-C., & Lau, L. (2009). Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, *41*(4), 771-783.
- Chen, W. S., Yueh, C. Y., Huang, Y. A., & Hwang, E. (2011). An inverted method for culturing dissociated mouse hippocampal neurons. *Neuroscience Research*, *70*(1), 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.01.002>.
- Chen, Y., Stevens, B., Chang, J., Milbrandt, J., Barres, B., & Hell, J. (2008). NS21: re-defined and modified supplement B27 for neuronal cultures. *J. Neurosci. Methods*, 239-247. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.03.013>.
- Chevalier, G., Yeger, H., Martinerie, C., Laurent, M., Alami, J., Shofield, P., & Perbal, B. (1998). novH: differential expression in developing kidney and Wilm's tumors. *Am. J. Pathol.*, *152*, 1563-1575.
- Deters, K. D., Nho, K., Risacher, S. L., Kim, S., Ramanan, V. K., Crane, P. K., ... Saykin, A. J. (2017). Genome-wide association study of language performance in Alzheimer's disease. *Brain and Language*. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2017.04.008>.
- Dong, H., Swanson, L. W., Chen, L., Fanselow, M. S., & Toga, A. W. (2009). Genomic – anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *PNAS*, *106*(28), 11794–11799.
- El-Falougy, H., & Benuska, J. (2006). History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratislava Medical Journal*, *107*(4), 103-106.
- Enciu, A., Gherghiceanu, M., & Popescu, B. (2013). Triggers and effectors of oxidative stress at blood-brain barrier level: relevance for brain ageing and neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 297512. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2013/297512>.
- Francis, C., Natarajan, S., Lee, M. T., Khaladkar, M., Buckley, P. T., Sul, J., ... Kim, J. (2014). Divergence of RNA localization between rat and mouse neurons reveals the potential for rapid brain evolution. *BMC Genomics*, *15*(883), 1471–2164.
- Giau, V. Van, & An, S. (2016). Journal of the Neurological Sciences Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, *360*, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.12.005>.
- Glock, C., Heumüller, M., & Schuman, E. M. (2017). mRNA transport & local translation in neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, *45*, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.005>.

- Guo, J., Qiang, M., & Ludueña, R. F. (2011). The distribution of β -tubulin isotypes in cultured neurons from embryonic, newborn, and adult mouse brains. *Brain Research*, 1420, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.08.066>.
- Hackett, T. A., Guo, Y., Clause, A., Hackett, N. J., Garbett, K., Zhang, P., ... Mirnics, K. (2015). Transcriptional maturation of the mouse auditory forebrain. *BMC Genomics*, 16(606), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1709-8>.
- Hamilton, D. J., White, C. M., Rees, C. L., Wheeler, D. W., & Ascoli, G. A. (2017). Molecular fingerprinting of principal neurons in the rodent hippocampus: A neuroinformatics approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.062>.
- Hansen, S. N., Schjoldager, J. G., Paidi, M. D., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2016). Maternal vitamin C deficiency does not reduce hippocampal volume and β -tubulin III intensity in prenatal Guinea pigs. *Nutrition Research*, 36(7), 696–702. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.03.004>.
- Harvey, C. B., Wang, Y., Darmoul, D., Phillips, A., Mantei, N., & Swallow, D. M. (1996). Characterisation of a human homologue of a yeast cell division cycle gene, MCM6, located adjacent to the 5' end of the lactase gene on chromosome 2q21. *FEBS Letters*, 398(2–3), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01189-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01189-1).
- Heath, E., Tahri, D., Andermarcher, E., Schofield, P., Fleming, S., & Boulter, C. (2008). Abnormal skeletal and cardiac development, cardiomyopathy, muscle atrophy and cataracts in mice with a targeted disruption of the *Nov* (*Ccn3*) gene. *BMC Dev. Biol*, 8(18).
- Holthoff, H. P., Baack, M., Richter, A., Ritzi, M., & Knippers, R. (1998). Human protein MCM6 on hela cell chromatin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7320–7325. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7320>.
- Iadecola, C. (2015). Dangerous leaks: blood-brain barrier woes in the aging hippocampus. *Neuron*, 85, 231–233. [doi:http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2015.00132](http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2015.00132).
- Jun, J., & Lau, L. (2011). Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov*, 10, 945–963.
- Kaar, A., Morley, S. J., & Rae, M. G. (2017). An Efficient and Cost-effective Method of Generating Postnatal (P2 - 5) Mouse Primary Hippocampal Neuronal Cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 286, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.020>.
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, 1(5), 2406–2415. <https://doi.org/10.1254/fpj.119.163>.
- Kivell, B., McDonald, F., & Miller, J. (2000). Serum-free culture of rat post-natal and fetal brainstem neurons. *Dev. Brain Res*, 120, 199–210. [doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0165-3806\(00\)00010-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-3806(00)00010-9).
- Koch, K., Jonas, T., Georgiana, O., & Zimmer, C. (2016). Neurolmage Extensive learning is associated with gray matter changes in the right hippocampus. *NeuroImage*, 125, 627–632. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.10.056>.

- Kunath, M., Lüdecke, H. J., & Vortkamo, A. (2002). Expression of Trps1 during mouse embryonic development. *Gene Expression Patterns*, 2(1–2), 119–122. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00300-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00300-3).
- Le Dréau, G., Nicot, A., Bénard, M., Thibout, H., Vaudry, D., Martinerie, C., & Laurent, M. (2010). NOV/CCN3 promotes maturation of cerebellar granule neuron precursors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 43(1), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.02.011>.
- Lein, E. S., Zhao, X., & Gage, F. H. (2004). Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput in situ hybridization. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(15), 3879–89. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4710-03.2004>.
- Lie, D., Song, H., Colamarino, S., Ming, G., & Gage, F. (2004). Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 399–421. doi:<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44>.
- Matis, C., Oury, F., Remacle, S., Lampe, X., Gofflot, F., Picard, J. J., ... Rezsohazy, R. (2007). Identification of Lmo1 as part of a Hox-dependent regulatory network for hindbrain patterning. *Developmental Dynamics*, 236(9), 2675–2684. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21266>.
- Mayati, A., Moreau, A., Le Vée, M., Stieger, B., Denizot, C., Parmentier, Y., & Fardel, O. (2017). Protein kinases C-mediated regulations of drug transporter activity, localization and expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040764>.
- McNamara, R. K., Wees, E. A., & Lenox, R. H. (1999). Differential Subcellular Redistribution of Protein Kinase C Isozymes in the Rat Hippocampus Induced by Kainic Acid. *Journal of Neurochemistry*, 72, 1735–1743.
- Mizutani, T., Nakashima, S., & Nozawa, Y. (1998). Changes in the expression of protein kinase C (PKC), phospholipases C (PLC) and D (PLD) isoforms in spleen, brain and kidney of the aged rat: RT-PCR and Western blot analysis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 105(1–2), 151–172. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(98\)00094-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00094-3).
- Montagne, A., Barnes, S., Sweeney, M., Halliday, M., Sagare, A., Zhao, Z., . . . Zlokovic, B. (2015). Blood-Brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, 85, 296–302. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>.
- Natarajan, D., Andermarcher, E., Schofield, P. N., & Boulter, C. A. (2000). Mouse Nov Gene Is Expressed in Hypaxial Musculature and Cranial Structures Derived From Neural Crest Cells and Placodes. *Developmental Dynamics*, 219(April), 417–423.
- Nunez, J. (2008). Primary culture of hippocampal neurons from P0 newborn rats. *J. Vis. Exp.* 3–4. doi:<http://dx.doi.org/10.3791/895>.
- Ohno, K., Hirose, F., Inoue, Y. H., Takisawa, H., Mimura, S., Hashimoto, Y., ... Matsukage, A. (1998). cDNA cloning and expression during development of *Drosophila*, 217, 177–186.

- Park, E., & Patel, A. N. (2010). PKC-delta induces cardiomyogenic gene expression in human adipose-derived stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 582–586. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.018>.
- Park, M., Baek, I. J., Kim, H., Woo, D. K., Park, Y. J., & Shim, S. (2015). CCN3 overexpression inhibits growth of callosal projections via upregulation of RAB25. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(3), 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.016>.
- Pramparo, T., Libiger, O., Jain, S., Li, H., Youn, Y. H., Hirotsune, S., ... Wynshaw-Boris, A. (2011). Global Developmental Gene Expression and Pathway Analysis of Normal Brain Development and Mouse Models of Human Neuronal Migration Defects. *PLoS Genetic*, 7(3), e1001331. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001331>.
- Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., & Karaglanidou, M. (2016). *World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia, Coverage, quality and costs now and in the future*. London: Alzheimer's Disease International.
- Querfurth, H. W., & Laferla, F. M. (2010). Mechanisms of Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 329–344.
- Raz, M., Sharon, Y., Yerushalmi, B., & Birk, R. (2013). Frequency of LCT-13910C/T and LCT-22018G/A single nucleotide polymorphisms associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Israelis of different ethnic groups. *Gene*, 519(1), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.049>.
- Reddy, P. H., Tonk, S., Kumar, S., Vijayan, M., Kandimalla, R., Sekhar, C., & Reddy, A. P. (2016). Biochemical and Biophysical Research Communications A critical evaluation of neuroprotective and neurodegenerative MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.067>.
- Roddy, K. A., & Boulter, C. A. (2015). Targeted mutation of NOV / CCN3 in mice disrupts joint homeostasis and causes osteoarthritis-like disease. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(4), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.12.012>.
- Rodriguez, T (2017). Caracterización de neuronas hipocámpales de rata a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Universidad Icesi.
- Romaniello, R., Arrigoni, F., Bassi, M. T., & Borgatti, R. (2015). Mutations in α - and β -tubulin encoding genes: Implications in brain malformations. *Brain and Development*, 37(3), 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2014.06.002>.
- Schrötter, A., Oberhaus, A., Kolbe, K., Seger, S., Mastalski, T., El Magraoui, F., ... Müller, T. (2017). LMD proteomics provides evidence for hippocampus field-specific motor protein abundance changes with relevance to Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1865(6), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.03.013>.

- Su, B.-Y., Cai, W.-Q., Zhang, C.-G., Martinez, V., Lombet, A., & Perbal, B. (2001). The expression of *ccn3* (nov)* RNA and protein in the rat central nervous system is developmentally regulated. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, *54*, 184–191.
- Suh, K. S., Tatunchak, T. T., Crutchley, J. M., Edwards, L. E., Marin, K. G., & Yuspa, S. H. (2003). Genomic structure and promoter analysis of PKC- δ . *Genomics*, *82*(1), 57–67. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00072-7).
- Tang, F. R., Lee, W. L., Gao, H., Chen, Y., Loh, Y. T., & 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*, *98*(February 2003), 87–98. <https://doi.org/10.1002/hipo.10156>.
- 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*, *60*(6), 1010–1021. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.008>.
- Toledo, J. B., Arnold, M., Kastenmuller, G., Chang, R., Baillie, R. A., Han, X., ... Kaddurah-Daouk, R. (2017). Metabolic network failures in Alzheimer's disease-A biochemical road map. *Alzheimer's and Dementia*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.01.020>.
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(4), 272–82. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>.
- Wei, L., & Zhao, X. (2016). A new MCM modification cycle regulates DNA replication initiation. *Nat Struct Mol Biol*, *23*(3), 209–216. <https://doi.org/10.1002/nbm.3369>.Three.
- Yang, Q., Ke, Y., Luo, J., & Tang, Y. (2017). Protocol for culturing low density pure rat hippocampal neurons supported by mature mixed neuron cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, *277*, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.12.002>.
- You, Z., & Masai, H. (2005). DNA binding and helicase actions of mouse MCM4/6/7 helicase. *Nucleic Acids Research*, *33*(9), 3033–3047. <https://doi.org/10.1093/nar/gki607>.
- Zaid, Y., Senhaji, N., Darif, Y., Kojok, K., Oudghiri, M., & Naya, A. (2016). Distinctive roles of PKC delta isozyme in platelet function. *Current Research in Translational Medicine*, *64*(3), 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.05.001>.
- Zhang, R., Kadar, T., Sirimanne, E., MacGibbon, A., & Guan, J. (2012). Age-related memory decline is associated with vascular and microglial degeneration in aged rats. *Behav. Brain Res.*, *235*, 210-217. [doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.002).
- Zhang, W., Hu, Y., Newman, E., & Mulholland, M. (2006). Serum-free culture of rat postnatal neurons derived from the dorsal motor nucleus of the vagus. *J. Neurosci. Methods*, *150*, 1-7. [doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.03.015](http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.03.015).

10. ANEXOS

10.1 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS EMPLEADOS PARA EL CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS HIPOCAMPALES

Solución de disección			
Reactivo	Concent. 1	Concent. 2	Vol
Hanks BBS		1 X	48,9 mL
Sodium pyruvate	100 mM	1 mM	500 uL
D-Glucose	50%	0,1%	100 uL
HEPES	1 M	10 mM	500 uL

Solución enzimática			
Reactivo	Concent. 1	Concent. 2	Vol (2 mL)
Solución de disección			1,7 mL
EDTA pH 7	50 mM	0,5 mM	20 uL
DNase I	0,01 mg/mL	2x10 ⁻⁴ mg/mL	40 uL
Trypsine	2,5% (10 X)	0,30%	240 uL

Planting medium			
Reactivo	Concent. 1	Concent. 2	Vol (50 mL)
MEM (Earle's + L-Glu)		1 X	43,5 mL
D-Glucose	50%	0,5%	500 uL
Sodium pyruvate	100 mM	1 mM	500 uL
FBS	100%	10%	5 mL
Pen/Strep/Amph B	100 X	1 X	500 uL

Medio neuronal			
Reactivo	Concent. 1	Concent. 2	Vol (50 mL)
Neurobasal		1 X	47,5 mL
Glutamax-I	100 X	1 X	500 uL
D-Glucose	50%	0,5%	500 uL
Pen/Strep/Amph B	100 X	1 X	500 uL
B27	50 X	1 X	1 mL
AraC	1000 uM	0,4 uM	20 uL

10.2 MEZCLA REACTIVOS RT- PCR

RT-PCR	1 Sample (uL)
GS Buffer 5X	4,0
10 mM dNTPs	1,6
25 mM MgCl₂	1,0
GS Rev Trans	1,0
H₂O	7,4
Total	15,0
Sample	5,0

10.3 SECUENCIAS Y TEMPERATURAS DE FUSIÓN DE PRIMERS UTILIZADOS EN RT-PCR

Región	Primer	Secuencia (5'...3')	Longitud	Tm (°C)	pb
CA1	CCN3 1 F	ACCTGTGGCTCAGAGGAGAA	20	65	375
CA1	CCN3 1 R	ACTGCAGATCCCACAGAACC	20	65	
CA3	PKCd 1 F	GGAAGCCAGAGACACCAGAG	20	68	457
CA3	PKCd 1 R	GCATAAAACGTAGCCCGGTA	20	68	
DG	MCM6 2 F	TGAGGAGCAGACAGCTGAGA	20	58	241
DG	MCM6 2 R	ATCCCCAACAATGCAAACAT	20	58	
Control	TUBB3 1 F	TGAGGCCTCCTCTCACAAGT	20	57	237
Control	TUBB3 1 R	TGCAGGCAGTCACAATTCTC	20	57	

10.4 CONDICIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA PCR ESTÁNDAR

PCR	1 Sample (uL)
Buffer 5X	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
Sample	1,0

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 min	35 X
94°C	1 min	
55-65°C	50 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

10.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Test Friedman	CCN3/BIII-Tub
P value	0,0278
Exact or approximate P value?	Exact
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Friedman statistic	6

Data Summary	CCN3/BIII-Tub
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

Test Friedman	PKCd/BIII-Tub
P value	0,1944
Exact or approximate P value?	Exact
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Friedman statistic	4,667

Data Summary	PKCd/BIII-Tub
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

Test Friedman	MCM6/BIII_Tub
P value	0,9444
Exact or approximate P value?	Exact
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Friedman statistic	0,6667

Data Summary	MCM6/BIII_Tub
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	1	No	ns	>0,9999	A-C
CA3 vs. CA1	2	No	ns	>0,9999	B-C
Test details	Rank sum 1	Rank sum 2	Rank sum diff,	N1	N2
DG vs. CA3	6	7	-1	3	3
DG vs. CA1	6	5	1	3	3
CA3 vs. CA1	7	5	2	3	3

10.6 APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA UNIVERSIDAD ICESI

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

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

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

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

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

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

Cordialmente,



Juliana Rengifo
Presidente –CIECUAE- Universidad Icesi