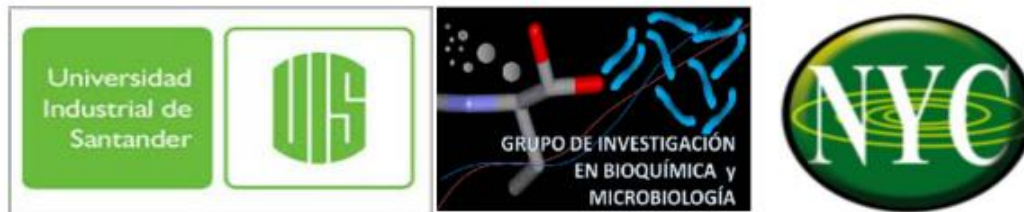


**DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS GENERADOS POR LA CICLOHEXIMIDA
SOBRE LA MEMORIA A LARGO PLAZO Y EL PERFIL PROTEÓMICO DEL
HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS WISTAR EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ
ELEVADO BAJO CRITERIO DE APRENDIZAJE**

KRISTTY STEPHANIE ORTIZ BELTRAN



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

**DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS GENERADOS POR LA CICLOHEXIMIDA
SOBRE LA MEMORIA A LARGO PLAZO Y EL PERFIL PROTEÓMICO DEL
HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS WISTAR EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ
ELEVADO BAJO CRITERIO DE APRENDIZAJE**

KRISTTY STEPHANIE ORTIZ BELTRAN

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de Química

Director

Rodrigo Torres Sáez^a, PhD
Escuela de Química

Co-Director

Carlos Conde Cotes^b, PhD
Escuela de Medicina

^a Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología

^b Grupo de investigación en Neurociencias y Comportamiento

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

“...Es mejor cojear por el camino que avanzar a grandes pasos fuera de él. Pues quién cojea en el camino, aunque avance poco, se acerca a la meta, mientras que quién va fuera de él, cuanto más corre, más se aleja...”

San Agustín

A mi mami Leyla,
mi hermanita Andrea,
mi cugis Anny,
mis abuelitos Bernabé y Celsa.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar presente en cada momento de mi vida, por ser mi guía en cada paso que doy e iluminarme en cada aspecto de mi vida.

A mi mamá, por ser una súper mamá que hace de mamá y papá. Porque valoro todo lo que ha hecho y sigue haciendo por mí y mi hermana. Por sus consejos y regaños que me han hecho una mejor persona. Por trabajar arduamente para darme el estudio, la vivienda y la comida y ser uno de mis modelos a seguir. Por el cariño que me da a diario.

A mis maravillosos abuelitos, por ser la mayor bendición de Dios en mi vida. Gracias por todo el amor que me han dado, por apoyar a mi mami para sacarnos adelante a mí y a mi hermana. Por ser un modelo a seguir y por todos los momentos que hemos compartido y que me han hecho crecer como persona.

A mi hermanita, por ser mi gran amiga, mi consejera y mi apoyo. Gracias por el cariño que me das. Y gracias también por compartir conmigo el camino de la vida. Te quiero mucho.

A mi cugis, por ser mi hermana mayor, mi amiga y un modelo a seguir. Gracias por tu cariño, tus consejos y tus detalles. Por estar presente en mi vida a pesar de la distancia que nos separa.

A mis tíos y primos, por apoyarnos a mí, a mi mami y mi hermana. Gracias por todo el cariño, los consejos y los momentos que hemos compartido como familia, recuerdo con nostalgia y mucho amor los momentos familiares. Estoy muy orgullosa de mi familia.

A mi Carlitos, por ser una bendición inesperada en mi vida. Gracias por todo lo que hemos compartido, por iluminar mi vida y ponerle color a mi sonrisa. Por caminar por la vida junto a mí. Te adoro.

A todos los integrantes de la familia Grimaldos Trillos, por abrirme las puertas de sus casas y brindarme cariño.

Al profesor Rodrigo Torres y al Dr. Conde, por darme la oportunidad de realizar el trabajo de grado bajo su dirección, sus enseñanzas y sus consejos. Gracias a Uds. he crecido a nivel profesional y personal.

A los integrantes del grupo de investigación en Bioquímica y microbiología, y neurociencias y comportamiento UIS-UPB, por su colaboración, sus enseñanzas y sus consejos en esta etapa de aprendizaje, especialmente a Marilyn, Víctor, Diana, Jesús Rodríguez y Eliana.

A los profesores de la Escuela de Química que hicieron parte de mi formación profesional.

A mis amigas de toda una vida Liz y Sandrita, por su apoyo incondicional a lo largo de los años. Las quiero muchísimo.

A COLCIENCIAS, por apoyar e incentivar la investigación científica.

A mis amigos de la UIS, Walter, Camila, Tatiana, Albita, Aleja, Stefy, Zayda, Cindy, los bonitos, Javier, Eliana. Hemos compartido el sueño de estudiar en una maravillosa universidad, y también nuestras alegrías y tristezas.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
TABLA DE CONTENIDO	8
INTRODUCCIÓN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
3.1.1 Objetivos específicos.....	21
4. MARCO TEÓRICO.....	22
4.1 APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	22
4.1.1 Formación de la memoria	22
4.1.2 Mecanismos celulares y moleculares de la memoria a largo plazo	25
4.1.3 Memoria emocional, hipocampo y amígdala.	26
4.1.4 Laberinto en cruz elevado (LCE).....	27
4.1.5 Memoria y síntesis de proteínas.....	30
4.2 NEUROCIENCIA Y PROTEÓMICA.....	32
4.2.1 La proteómica y la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (2D SDS-PAGE)	33
4.2.1.1 Preparación de la muestra.	35
4.2.1.2 Cuantificación de la muestra.....	37
4.2.1.3 La primera dimensión: Isoelectroenfoco IEF.....	38
4.2.1.4 Equilibración	39
4.2.1.5 La segunda dimensión: SDS-PAGE	39
4.2.1.6 Tinción del gel de 2D-SDS PAGE.....	40
4.2.1.7 Adquisición, y análisis de imágenes y bioinformático de las manchas en el gel de 2D-SDS PAGE.....	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
5.1 ANÁLISIS COMPORTAMENTAL.....	42
5.1.1 Animales	42

5.1.2 Laberinto en cruz elevado LCE	42
5.1.3 Exposición de los animales al LCE	43
5.1.4 Análisis de los datos obtenidos en el LCE.	45
5.2 ANÁLISIS PROTEÓMICO.....	46
5.2.1 Preparación de las muestras.....	46
5.2.1.1 Precipitación y solubilización de las proteínas.	46
5.2.1.2 Cuantificación de las proteínas.....	46
5.2.2 2D SDS-PAGE.....	46
5.2.2.1 Isoelectroenfoque IEF	46
5.2.5 Análisis bioinformático de las proteínas expresadas diferencialmente.	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
6.1 RESULTADOS ANÁLISIS COMPORTAMENTAL	51
6.2 RESULTADOS ANÁLISIS PROTEÓMICO.	57
6.1.1 Análisis de proteínas en el hipocampo dorsal derecho (HD)	58
6.1.1.1 Comparaciones entre SS-3h y CHX-3h.	58
6.1.1.2 Comparaciones entre SS-24h y CHX-24h.....	62
6.1.1.3 Comparaciones entre SS-3h y SS-24h	66
6.1.1.4 Comparaciones entre CHX-3h y CHX-24h.	72
6.2.1 Análisis de proteínas en el hipocampo dorsal izquierdo (HI).	77
6.2.1.1 Comparaciones entre SS-3h y CHX-3h	77
6.2.1.2 Comparaciones entre SS-24h y CHX-24h.....	81
6.2.1.3 Comparaciones entre SS-3h y SS-24h.	85
6.2.1.4 Comparaciones entre CHX-3h y CHX-24h	90
7. CONCLUSIONES.....	98
8. RECOMENDACIONES	99
9. BIBLIOGRAFIA.....	100
ANEXOS.....	107
Anexo A.	108
Anexo B.	112
Anexo C.	116

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema del corte coronal del hipocampo.	27
Figura 2. Imagen del laberinto en cruz elevado.	28
Figura 3. Estructura de la molécula de cicloheximida.	31
Figura 4. Modelo del mecanismo de acción de la CHX en la inhibición de la elongación de la traducción de la cadena polipeptídica.	32
Figura 5. Esquema de una estrategia para llevar a cabo la proteómica.	35
Figura 6. Esquema del procedimiento experimental en el LCE.	44
Figura 7. Esquema de la distribución de las posiciones en los brazos para el registro de datos con PROSTCOM por parte del grupo de investigación NyC UIS-UPB.	45
Figura 8. Equipo de Isoelectroenfoque.	47
Figura 9. Cámara empleada para la segunda dimensión de la electroforesis.	48
Figura 10. Imagen del gel de 2D SDS-PAGE teñido con comassie coloidal G-250.	49
Figura 11. Gráfica del tiempo en el brazo cerrado del laberinto.	52
Figura 12. Gráfica del tiempo en el brazo abierto del laberinto.	53
Figura 13. Gráfica de los cruzamientos en el laberinto.	54
Figura 14. Gráfica de las entradas al brazo abierto del laberinto.	54
Figura 15. Gráfica de las entradas al brazo cerrado del laberinto.	55
Figura 16. Gráfica del porcentaje de entradas al brazo abierto del laberinto.	56
Figura 17. Cantidad de proteínas presentes en SS-3h y CHX-3h.	59
Figura 18. Estructura tridimensional de la proteína Synaptotagmin-1.	62
Figura 19. Cantidad de proteínas presentes en SS-24h y CHX-24h.	63
Figura 20. Cantidad de proteínas presentes en SS-3h y SS-24h.	67
Figura 21. Estructura tridimensional de la proteína Glutamate decarboxylase 2.	71
Figura 22. Cantidad de proteínas presentes en CHX-3h y CHX-24h.	73
Figura 23. Cantidad de proteínas presentes en SS-3h y CHX-3h.	78
Figura 24. Estructura tridimensional de la proteína Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta.	81
Figura 25. Cantidad de proteínas presentes en SS-24h y CHX-24h.	82
Figura 26. Estructura tridimensional de la proteína Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1.	84

Figura 27. Cantidad de proteínas presentes en SS-3h y SS-24h..... 86
Figura 28. Cantidad de proteínas presentes en CHX-3h y CHX-24h..... 91

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cronograma de actividades de la parte experimental del análisis comportamental.	43
Tabla 2. Grupos experimentales.	44
Tabla 3. Protocolo de corrida del IEF.....	47
Tabla 4. Experimentos creados en el programa PDQUEST.....	57
Tabla 5. Proteínas presentes los grupos SS-3h y CHX-3h.....	59
Tabla 6. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y CHX-3h.	62
Tabla 7. Proteínas presentes los grupos SS-24h y CHX-24h.....	63
Tabla 8. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-24h y CHX- 24h.	66
Tabla 9. Proteínas aumentaron su expresión en el grupo SS-24h con respecto al grupo SS-3h.	67
Tabla 10. . Proteínas aumentaron su expresión en el grupo SS-3h con respecto a SS-24h.	69
Tabla 11. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y SS-24h.	72
Tabla 12. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo CHX-24h con a CHX-3h.	73
Tabla 13. Proteínas aumentaron su expresión en el grupo CHX-3h con a CHX-24h.	75
Tabla 14. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos CHX-3h y CHX- 24h.	76
Tabla 15. Proteínas presentes en SS-3h y CHX-3h.	78
Tabla 16. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y CHX- 3h.	81
Tabla 17. Proteínas presentes en SS-24h y CHX-24h.	82
Tabla 18. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-24h y CHX- 24h.	85
Tabla 19. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo SS-24h con respecto a SS- 3h.	86
Tabla 20. Proteínas aumentaron su expresión en el grupo SS-3h con respecto a SS-24h	87
Tabla 21. Proteínas expresadas diferencialmente entre SS-3h y SS-24h.	89
Tabla 22. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo CHX-24h con respecto a CHX-3h.....	91
Tabla 23. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo CHX-3h con respecto a CHX-24h.....	92
Tabla 24. Proteínas que expresaron diferencialmente entre CHX-3h y CHX-24h.	94

RESUMEN

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS GENERADOS POR LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA MEMORIA A LARGO PLAZO Y EL PERFIL PROTEÓMICO DEL HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS WISTAR EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO BAJO CRITERIO DE APRENDIZAJE

AUTORA: Kristty Stephanie Ortiz Beltran**

Palabras clave: aprendizaje, memoria, consolidación de la memoria síntesis de proteínas, cicloheximida.

La capacidad del sistema nervioso de aprender y retener nueva información es esencial para llevar a cabo funciones cognitivas como la memoria. La base fundamental del almacenamiento de información en el cerebro consiste en la habilidad para alterar la conectividad sináptica en estructuras, como el hipocampo. Las bases moleculares del aprendizaje y la memoria asocian la síntesis de proteínas en el proceso de consolidación de la memoria. Se han utilizado inhibidores de síntesis de proteínas como la cicloheximida (CHX) para estudiar la memoria.

Utilizando el laberinto en cruz elevado LCE como modelo experimental, se evaluó el comportamiento de ratas Wistar, estas fueron inyectadas v.i.p con CHX 3mg/mL o solución salina SS (control), cada animal exploró en dos sesiones el laberinto, la sesión 2 S2 ocurrió en 2 tiempos de 3 y 24h. Se encontró que las ratas animales disminuyeron significativamente la exploración en la S2, debido a un aprendizaje en la primera experiencia en el LCE. La disminución en la exploración en el LCE fue mayor para los grupos CHX-3h y CHX-24h, este resultado se debe a una disminución de la actividad locomotora causada por la CHX. Los resultados sugieren que la CHX no afectó la memoria a largo plazo, pero si afectó la actividad locomotora del animal.

Seguido del análisis comportamental se analizó la expresión de proteínas de cada hipocampo. Los resultados mostraron la inhibición, el aumento y la disminución de la expresión de proteínas en el hipocampo dorsal de ratas, en respuesta a la experiencia en el LCE y/o tiempo entre las sesiones y/o un efecto del tratamiento. Se logró presuntivamente la identificación de proteínas por punto isoeléctrico y peso molecular. Las proteínas identificadas intervienen en el ciclo celular, la sinapsis, el metabolismo, el transporte, entre otras funciones, y estas proteínas podrían estar estrechamente relacionadas con la memoria.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez, Ph.D. Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Codirector: Carlos Arturo Conde, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION OF CHANGES FROM THE CYCLOHEXIMIDE ON LONG-TERM MEMORY AND PROFILE OF HIPOCAMPO PROTEOMIC WISTAR RIDGE RATS EXPOSED TO CROSS HIGH ON MAZE LEARNING APPROACH^{*}

AUTHOR: Kristty Stephanie Ortiz Beltran ^{}**

Keywords: learning, memory, memory consolidation of protein synthesis, Cycloheximide.

The ability of the nervous system to learn and retain new information turns out to be essential to carry out important cognitive functions such as long-term memory. The fundamental basis of information storage in the brain consists of the ability to alter synaptic connectivity within structures, such as the hippocampus. Previous works on the molecular basis of learning and memory have demonstrated that protein synthesis plays a key role in the processes of consolidation of memory. Inhibitors of protein synthesis as Cycloheximide (CYX) have been used for studying memory.

Using the elevated plus maze EPM as an experimental model, we examined the behavior of Wistar rats whose were injected with CHX 3mg/mL or saline SS (control). Each animal explored the maze twice. The second session S2 occurred in 2 different times from 3 and 24 hours, S2-3h and S2-24h. We found that the rats treated decreased significantly its exploration in the S2 due to early learning experience in the LCE. The decrease in exploration in EPM was higher for CHX-3h and CHX -24h groups; this result is due to a decrease in locomotion activity caused by CYX. The results suggest that the effect of CYX did not affect the long-term memory, but did affect the locomotion activity of the animal.

Followed by behavioral analysis, the proteins expressions were analyzed for each hippocampus. The results were inhibition, increased and decreased of the protein expression in the dorsal hippocampus of Wistar rats, in response to the experience in EPM and/or time between the session and/or an indirect effect of the treatment. Identifying proteins by isoelectric point and molecular weight are presumably achieved. The identified proteins involved in the cell cycle, synapses, metabolism, transport, among other functions, and these proteins may be closely related to memory.

^{*} Degree work

^{**} Science Faculty. School of Chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez, Ph.D. Health Faculty. School of Medicine. Director: Carlos Arturo Conde, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

La capacidad del sistema nervioso central (SNC) de aprender y retener nueva información, resulta esencial para llevar a cabo funciones cognitivas superiores, como por ejemplo, la memoria a largo plazo, la memoria de trabajo, el lenguaje y el control del comportamiento. La base fundamental del almacenamiento de información en el cerebro es la habilidad para alterar la conectividad sináptica dentro de circuitos claves, como el hipocampo (Monopoli et al., 2011).

En las Neurociencias, cuando se habla de estudios sobre memoria, se hace referencia al estudio de un conjunto de procesos que se pueden evidenciar por las manifestaciones observadas en el comportamiento de un sistema o un ser vivo. En 1976, Kandel afirmó que el comportamiento es toda respuesta observable, secretora y/o muscular, a cambios en el medio ambiente interno o externo de un animal (Conde, Becerra & Botelho, 2001). La observación del comportamiento en modelos animales es uno de los métodos para estudiar la memoria. Para el caso de la memoria emocional, se evalúan fenómenos psicológicos, que comprenden aspectos conductuales, fisiológicos y cognitivos (Aguado, 2002). El laberinto en cruz elevado (LCE) es uno de los modelos animales en el que se experimenta con roedores, que está asociado a las emociones y la memoria espacial, y permite observar y evaluar el efecto de sustancias farmacológicas (Lamprea *et al*, 2000).

El aprendizaje y la memoria son característicos de todos los organismos vivos, por lo que se cree que debió aparecer en una etapa temprana de la evolución. Hace más de un siglo las nociones de James, Tanzi y Cajal asumieron que el aprendizaje y la memoria se deben a la plasticidad neuronal del sistema nervioso. En la actualidad, las investigaciones están enfocadas en la plasticidad sináptica y en la búsqueda del mecanismo de aprendizaje y memoria a nivel comportamental y molecular, centrándose en aquellos mecanismos que pueden elucidar las modificaciones dependientes de la actividad de la fuerza sináptica (Baudry & Bi, 2013).

Las investigaciones llevadas a cabo sobre las bases moleculares del aprendizaje y la memoria han permitido concluir que la síntesis de proteínas es necesaria para los

procesos de consolidación y re consolidación de la memoria. Una de las estrategias para inhibir selectivamente la síntesis de proteínas en modelos animales, consiste en suministrarle moléculas que afectan la regulación de la transcripción y/o la traducción, como es el caso de los inhibidores de síntesis de proteínas como la cicloheximida (CHX). De tal manera que, a través del bloqueo de la síntesis de proteínas, se puedan elucidar los procesos moleculares que podrían estar involucrados en la formación de la memoria (Alberini, 2008). Para ello es necesario aplicar técnicas proteómicas, que permitan obtener y analizar los perfiles de las proteínas que se expresan y/o se inhiben en el tejido del SNC que sea de interés (Tannu & Hemby, 2006).

Así, la comprensión de cómo la maquinaria de traducción altera la plasticidad sináptica y la función neuronal, posiblemente tendrá implicaciones en el entendimiento y el tratamiento de enfermedades que conllevan a la disfunción cognitiva, tal como ocurre en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Gal-Ben-Ari et al., 2012).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), y el Grupo de Investigación en Neurociencias y Comportamiento de la Universidad Industrial de Santander – Universidad Pontificia Bolivariana (NYC UIS-UPB), decidieron realizar un estudio que contribuya al conocimiento de los procesos comportamentales y moleculares implicados en el aprendizaje y la memoria a largo plazo de ratas Wistar expuestas al LCE, mediante la identificación de proteínas en el hipocampo dorsal, cuya expresión es modificada al bloquear la síntesis de proteínas con CHX. El experimento consta de dos etapas: un análisis comportamental y un análisis proteómico. En el análisis comportamental, las ratas Wistar son inyectadas i.p. con el inhibidor de síntesis de proteínas (CHX) o con solución salina (SS CONTROL), y son expuestas al LCE durante dos sesiones (S1 y S2). Para la S2 se consideran dos intervalos de tiempo diferentes respecto a la S1, 3 horas o 24 horas después. Posterior a la S2, los animales se decapitan para aislar los hipocampos dorsales, derechos e izquierdos.

Estos tejidos son homogenizados en un medio que permite la lisis y extracción de las proteínas, las cuales son separadas por electroforesis bidimensional (2D SDS-PAGE). A partir del análisis de imágenes de los geles, se determinan los proteomas de los hipocampos dorsales y se establecen las diferencias en la expresión de proteínas entre

las ratas tratadas con CHX y SS, con los dos intervalos de tiempo de exposición entre la S1 y la S2 en el LCE. Finalmente, se establece la relación entre los resultados obtenidos a nivel proteómico y los comportamientos registrados durante las exposiciones al LCE.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inhibición de síntesis de proteínas afecta la memoria y el aprendizaje en roedores. Muchos investigadores han sugerido que al inhibir la síntesis de proteínas se genera una acción amnésica que puede deberse a alteraciones en la neurotransmisión catecolaminérgica, colinérgica, opiácea y GABAérgica (Weniger, Lange, & Irle, 2006). Por otra parte, se ha determinado que el hipocampo y la amígdala son estructuras claves para el aprendizaje y la memoria, considerándose que el registro inicial y la consolidación de la memoria declarativa dependen del hipocampo, mientras que la amígdala tiene un papel fundamental en la adquisición del miedo asociado con situaciones de peligro (Aguado, 2002). No obstante, el hipocampo y la amígdala se encuentran estrechamente relacionados, ya que la información codificada en el hipocampo se ve afectada por los mecanismos cognitivos que ocurren como respuesta emocional en un individuo que ha alterado su actividad neural en la amígdala (Weniger et al., 2006).

Teniendo en cuenta lo poco que se ha indagado sobre la memoria emocional y su regulación por parte del hipocampo, surge el interés por estudiar la relación entre la síntesis de proteínas en dicha área del SNC con los procesos neurobioquímicos de la memoria emocional. Es por esto que, a través de las Neurociencias y la Proteómica, se plantea evaluar el comportamiento de ratas Wistar en el modelo del LCE y, describir los proteomas del hipocampo dorsal cuando se bloquea la síntesis de proteínas con CHX (Escarabajal, Torres, & Flaherty, 2003).

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la investigación en el área del aprendizaje y la memoria es importante, debido a que estos procesos están presentes en la conducta normal humana, y también son componentes esenciales del comportamiento anormal en trastornos como: la adicción, la ansiedad, la depresión, la esquizofrenia y las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Alzheimer (EA) y la enfermedad del Parkinson (EP) (King, Marsden, & Fone, 2008). Las enfermedades neurodegenerativas (EN) implican un impacto socio-económico en las familias con algún miembro que la padezca, puesto que se requiere un apoyo físico y emocional en el transcurso del tratamiento; algunas de las consecuencias negativas de estas enfermedades son la estigmatización y la discriminación (Mundo, 2001).

Desde una perspectiva clínica, el deterioro de la memoria episódica representa uno de los mayores problemas funcionales en los pacientes que se encuentran en las fases leves y moderadas de la EA. Al disminuir la habilidad de la memoria episódica, los pacientes con la EA recuerdan relativamente mejor los acontecimientos del pasado lejano que los eventos ocurridos al inicio de la enfermedad. Inevitablemente, al perder progresivamente la habilidad de recordar acontecimientos recientes o aprender nueva información conlleva a déficits funcionales que resultan devastadores para el paciente y familiares. Para entender los déficits de memoria específica que experimentan las personas con EA se deben diseñar y evaluar la eficacia de nuevos tratamientos farmacéuticos para las alteraciones de la memoria (C. A. Gold & Budson, 2009).

Una gran cantidad de estrategias proteómicas han sido aplicadas al estudio de enfermedades neurológicas. Se han estudiado algunas de las enfermedades con gran impacto clínico tales como la esclerosis múltiple (EM), la enfermedad del Alzheimer (EA) y el Parkinson. Numerosas investigaciones y estudios clínicos se han enfocado en delinear diagnósticos seguros, pronósticos y marcadores terapéuticos. A su vez, las mediciones del cambio de expresión de múltiples proteínas proporciona una gran estrategia en la

investigación de procesos fisiopatológicos complejos como los observados en las EN (Sánchez, Corthals & Hochstrasser; 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios en el comportamiento, la memoria a largo plazo y los patrones de expresión de las proteínas del hipocampo dorsal de ratas Wistar tratadas con cicloheximida (CHX) y expuestas al laberinto en cruz elevado (LCE).

3.1.1 Objetivos específicos

- Comparar el comportamiento de las ratas Wistar tratadas con CHX y solución salina (SS) para establecer las diferencias conductuales que se presentan como consecuencia del aprendizaje en el LCE.
- Determinar diferencias en la expresión de las proteínas del hipocampo de ratas Wistar tratadas con CHX y SS.
- Evaluar los efectos en el comportamiento y la expresión de proteínas debido a diferentes intervalos de tiempo entre las sesiones de exposición al LCE de las ratas Wistar tratadas con CHX y SS.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 APRENDIZAJE Y MEMORIA

El aprendizaje es considerado como un proceso adaptativo, ya que los organismos modifican su conducta para ajustarse a aquellas condiciones del medio que los rodea, las cuales pueden ser cambiantes e impredecibles. Cuanto más cambiante resulte el entorno, la conducta también lo es, y bajo estos cambios, el cerebro debe ser más plástico, lo que sugiere que los organismos que viven en medios diferentes tengan también diferentes conductas y grados de plasticidad. La plasticidad es un reflejo y una característica del sistema nervioso y de las neuronas. A medida que aumenta la plasticidad del sistema nervioso, mayores posibilidades de aprender tiene un animal. Es decir, el aprendizaje se puede considerar como un cambio que ocurre en el sistema nervioso como resultado de una experiencia, lo cual origina cambios duraderos en el comportamiento del organismo. (Morgado, 2009).

Por otra parte, la memoria hace referencia a la información que es almacenada en el cerebro como consecuencia de un aprendizaje, y se puede inferir del comportamiento. El aprendizaje y la memoria son dos procesos que se encuentran estrechamente unidos y están asociados con la percepción sensorial, las emociones y el lenguaje, por lo que no se puede hacer referencia a algunos de ellos con independencia del otro (Morgado, 2009).

4.1.1 Formación de la memoria. El aprendizaje y la memoria son procesos dinámicos que dependen del tiempo, razón por la que se han establecido varias fases sucesivas e independientes en el aprendizaje como la adquisición, consolidación, recuperación, reactivación y extinción de la información (Gallo, 2007).

La memoria involucra tres procesos básicos que forman las representaciones mentales y operan en ellas: la *codificación*, el *almacenamiento* y la *recuperación* de la información. La *codificación* consiste en la percepción, el reconocimiento y el procesamiento de un objeto o evento que pueda ser recordado posteriormente. La manera como la información es codificada en una representación mental hace una diferencia substancial sobre qué tan

bien se puede recordar. Resulta posible que un evento, por ejemplo, se olvide debido a que en un principio no fue bien codificado. La *codificación* debe ir seguida por el *almacenamiento* a corto o largo plazo de la representación mental de un evento. Por último, la *recuperación* de la información consiste en la búsqueda de la información en la memoria a largo plazo y encontrar el evento que se ha *codificado* y *almacenado*. Un evento se puede recordar y está disponible en el cerebro si la información ha sido codificada y almacenada correctamente (Harris, 2007).

El proceso por el que las memorias se convierten en duraderas se denomina consolidación (Gal-Ben-Ari et al., 2012). Se piensa que los recuerdos son almacenados debido al mantenimiento de las conexiones entre las neuronas o sinapsis. Cada vez que se adquiere nueva información, la fuerza sináptica se modifica alterando las memorias ya existentes, jugando así un rol importante a lo largo de la vida. Una de las hipótesis que explica este proceso está basada en el hecho que las memorias se pueden almacenar en diferentes partes del cerebro, y las memorias importantes son transferidas desde un área del cerebro a otra. Existe evidencia biológica que afirma que la memoria es almacenada en el lóbulo temporal medial. Durante la consolidación, las memorias que en principio son almacenadas en el hipocampo se transfirieren a otras áreas del córtex, durante los eventos de repetición mientras se descansa y se duerme (Clopath, 2012).

De acuerdo con el aprendizaje, la memoria se puede dividir en dos tipos: la *memoria explícita* (recuerdo consciente de una experiencia previa), y la *memoria implícita* (recuerdos de experiencias pasadas que influyen en el comportamiento actual, que no son recordadas conscientemente). Cuando se habla de *memoria explícita* se hace referencia al almacenamiento de hechos o memoria semántica (por ejemplo, la información básica sobre un curso de ciencias), y a eventos autobiográficos o memoria episódica (por ejemplo, lo que había en el desayuno). De tal forma que la memoria explícita permite tener un aprendizaje asociativo a cerca de personas, lugares, cosas y situaciones complejas, y puede declararse de forma verbal o escrita, implicando para tal fin a diferentes zonas cerebrales que procesan la información como la neocorteza (Morgado, 2009).

Por otra parte, la memoria implícita consiste en aquellos aspectos del comportamiento que incluyen las habilidades motoras y las asociaciones emocionales con eventos o estímulos particulares, los cuales forman nuestros disgustos y gustos. La memoria implícita incluye la facilitación, que es la habilidad para identificar un objeto debido a una exposición previa, incluso si la exposición no fue consciente (Robertson, 2001). Esta memoria se forma a partir de tipos de aprendizaje filogenéticamente antiguos, los cuales están ligados a condiciones de adaptación y supervivencia de cada especie. La expresión de este tipo de memoria se realiza en su mayoría de manera automática y es difícil de verbalizar. En general, se considera una memoria fiel, rígida y duradera la cual es adquirida gradualmente y perfeccionada con la práctica. Una característica de las memorias implícitas son las inclinaciones biológicas de cada especie animal y de cada persona para adquirirlas. La mayoría de las formas de aprendizaje atribuidas a la memoria implícita se encuentran condicionadas por los grados de plasticidad cerebral. Algunos ejemplos son: la abejas y su capacidad de asociar colores y olores, los pájaros que anidan tienen una gran memoria espacial, la ratas se adaptan al aprendizaje en laberintos, los humanos tienen la habilidad de reconocer voces y rostros (Morgado, 2009).

Las memorias implícita y explícita no siempre son independientes. Los recuerdos o conductas inconscientes (implícita) se pueden modular y modificar por la memoria consciente (explícita), además los recuerdos explícitos pueden tener componentes de la memoria implícita. La mayoría de los tipos de aprendizaje y memoria en un principio son conscientes y explícitos, sin embargo pueden convertirse, mediante la evocación o la práctica de su contenido, en una memoria implícita (Morgado, 2009).

Adicionalmente, el proceso de formación de la memoria consta de al menos dos etapas sucesivas: la memoria a corto plazo (STM) y la memoria a largo plazo (LTM) (Morgado, 2009). La memoria a corto plazo, registra y retiene información de forma muy accesible por un corto periodo de tiempo después de que la información ha sido obtenida (Tulving, 1995), mientras que la memoria a largo plazo conserva de forma duradera la información obtenida. En la actualidad, la memoria a corto plazo se considera un sistema de memoria que funciona como memoria operativa o de trabajo, y su finalidad es la de asistir a una serie de tareas de razonamiento, de planificación de acciones futuras o la comprensión de

los mensajes lingüísticos; mientras que la memoria a largo plazo diferencia entre sistemas de memoria semántica y memoria episódica (Aguado-Aguilar, 2001).

La memoria y sus correlaciones (como la, potenciación a largo plazo [LTP] o la depresión a largo plazo [LTD]) no son procesos unitarios, se componen de fases, y se encuentran definidas a nivel molecular y temporal. Se ha determinado que, tanto la memoria a corto plazo como la LTP/LTD dependen de modificaciones post-traduccionales de las proteínas preexistentes, mientras que la memoria a largo plazo y la LTP/LTD de larga duración dependen de la transcripción del ARN o la traducción de proteínas (Gal-Ben-Ari et al., 2012).

4.1.2 Mecanismos celulares y moleculares de la memoria a largo plazo. La fuerza con la que las neuronas se conectan mejora con la repetición de la experiencia vivida. Estudios en los que se evalúa la plasticidad sináptica en el hipocampo, revelan que la LTP promueve un mecanismo bioquímico para mejorar la eficacia de la sinapsis, donde el neurotransmisor glutamato y su receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) en la membrana de la célula post sináptica, juegan un rol importante. El receptor de NMDA está encargado de controlar la entrada de iones de calcio en la neurona. Cuando una neurona envía señales a otra neurona a través del neurotransmisor glutamato, desencadena una cascada de reacciones químicas dentro de la neurona post-sináptica. Sin embargo, el receptor de NMDA también debe recibir una descarga eléctrica a partir de la despolarización de la membrana post-sináptica provocando la eliminación de un Mg^{2+} desde el poro del receptor de NMDA, antes que el canal de NMDA permita el flujo de los iones de calcio en la célula post-sináptica. De este modo, dos señales separadas, la unión del glutamato y la despolarización de la membrana, funcionan como "detectores de coincidencia" y ayudan al cerebro a asociar los eventos. Aunque una sola fuente no sea suficiente para la activación de la sinapsis, las neuronas del hipocampo reciben múltiples entradas, de forma simultánea y repetidamente, lo cual es suficiente para que la neurona se pueda activar. No obstante, la plasticidad sináptica no sólo se produce en el hipocampo, también en la amígdala y en la corteza cerebral, donde los receptores de NMDA ayudan a establecer conexiones entre las diversas entradas corticales (Robertson & Ph, 2001).

4.1.3 Memoria emocional, hipocampo y amígdala. La memoria emocional se forma a partir del abanico de estímulos sensoriales o sentimentales que experimentamos en la vida cotidiana, y que a menudo son infundidos con relevancia emocional. Regularmente, la información de importancia emocional se recuerda con mayor intensidad que la información neutral (Kensinger *et al*, 2004). En la memoria emocional, el mecanismo de potenciación hormonal consiste en una mayor retención y manifestación conductual de la experiencia aversiva, debido a la presencia de hormonas (exógenas o endógenas) que producen una respuesta fisiológica a un estímulo aversivo y facilita la consolidación de la información en la memoria. Este mecanismo se ha podido observar en la investigación animal y podría generalizarse para nuestra especie. Algunas investigaciones sugieren la participación de dos estructuras cerebrales la amígdala y el hipocampo (Aguado, 2002).

La amígdala es una estructura cerebral que juega un papel fundamental en la adquisición y manifestación de respuestas a señales asociadas con situaciones de peligro, considerado como un componente importante en la emoción del miedo. En ella, también tienen lugar la convergencia de vías sensoriales de señales de peligro y el estímulo incondicionado (estímulo al que se reacciona con una respuesta innata), donde al parecer se codifica neuronalmente la asociación entre ambos (Aguado, 2002). Es por esto, que la amígdala es el principal organizador de los procesos de la memoria emocional y actúa específicamente en los procesos de consolidación de la memoria en regiones como el hipocampo (Hamann, 2001).

Por otro lado, el hipocampo se ha constituido en una estructura clave para el estudio del aprendizaje y la consolidación de la memoria explícita (Aguado, 2002). En 1992, Squire propuso que el hipocampo se une a diversos lugares en la neocorteza cerebral que procesan diferentes características de un nuevo evento, tales como la forma, el color, y la ubicación visual de un objeto (Harris, 2007). La estructura del hipocampo se puede observar por medio de un corte coronal (**Figura 1**). El hipocampo consta de 2 láminas corticales enrolladas una dentro de la otra: el Cornu Ammonis y el giro dentado (Destrieux, Bourry, & Velut, 2013).

El Cornu Ammonis continúa lateralmente el subículo, que es la cara superior plana del parahipocampo o giro T5. El Corno de Ammonis se puede subdividir en 4 campos

diferentes con respecto a la citoarquitectura de su capa piramidal, es decir, de CA1 (cerca de la subículo) a CA4 (dentro de la concavidad del giro dentado). Una fina capa blanca, el alveus, recubre el cornu Ammonis y termina medialmente como la fimbria. El giro dentado es un surco dorso-medial cóncavo que contiene el campo CA4. El hipocampo forma en su mayoría la parte inferior (o temporal) del ventrículo lateral. Es una protuberancia donde se encuentran principalmente los campos CA1, CA2 y CA3 y está cubierto por el alveus. La parte inferior continúa lateralmente por la eminencia colateral, en esta zona la protuberancia se encuentra menos marcada hacia parte inferior de los surcos T4-T5. Medialmente la parte inferior está limitada por la fimbria (Destrieux et al., 2013).

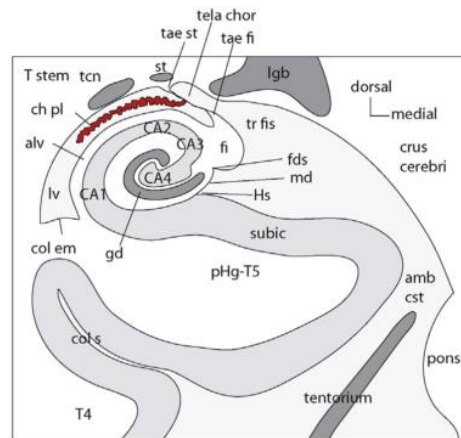


Figura 1. Esquema del corte coronal del hipocampo.

4.1.4 Laberinto en cruz elevado (LCE). El laberinto en cruz elevado LCE es uno de los modelos animales más utilizados en la investigación sobre la ansiedad. Hoy en día, su utilidad se ha extendido al entendimiento de las bases moleculares de la emoción relacionadas con el aprendizaje y la memoria (Gianlorenço, Canto-de-Souza, & Mattioli, 2011). El laberinto consiste en un aparato en cruz hecho de madera, está elevado a 50 cm del suelo y comprende 4 brazos, dos brazos opuestos que tienen dimensiones de 28,5 x 7 cm (largo x ancho) y se encuentran opuestos (brazos abiertos), estos brazos se cruzan en ángulo recto por dos brazos de las mismas dimensiones cerrados por 14 cm altos muros, que tiene un techo abierto **Figura 2**. En la prueba de comportamiento en el LCE, cada ratón se coloca en la plataforma central del aparato. Durante un período de 5

minutos, donde se registran las entradas a los brazos abiertos y cerrados (Calzavara et al., 2005) (Walf & Frye, 2007).

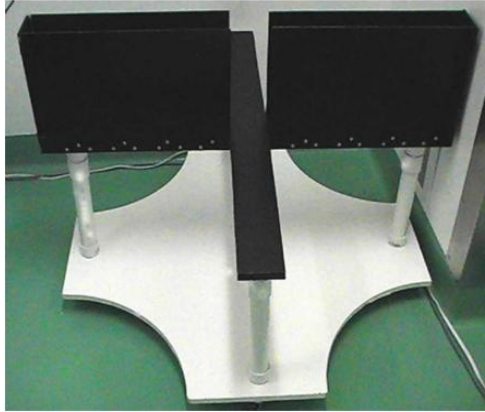


Figura 2. Imagen del laberinto en cruz elevado.

Los principales indicadores de ansiedad en este modelo son medidas espacio-temporales relacionadas con la frecuencia de las visitas a los brazos abiertos en relación al total de entradas al brazo, y la cantidad de tiempo invertido en estas áreas aversivas del aparato, con respecto a la duración de la sesión. Este modelo está basado en el miedo natural a espacios abiertos y elevados. Como consecuencia de ello, las ratas que están ansiosas evitarán los brazos abiertos y permanecerán en los brazos cerrados, mientras que ratas menos ansiosas estarán dispuestas a explorar los brazos abiertos (Sandusky, Flint, & McNay, 2012). Hay dos grandes grupos de variables que interfieren en el comportamiento y/o en la respuesta a drogas en el LCE: (1) variables del organismo tales como, la especie, cepa genética, género y edad. (2) variables de procedimiento tales como, el alojamiento, manipulación previa, estrés previo, niveles de luz, en los cuales se ha reportado que tienen efectos significantes en la ansiedad basal (Bertoglio & Carobrez, 2000) y también el fenómeno one trial tolerance (OTT).

Aunque el LCE se ha utilizado para evaluar la memoria y para inducir ansiedad, este modelo animal se ha utilizado ampliamente para evaluar los ansiolíticos y los efectos ansiogénicos de los medicamentos. Este modelo es el más utilizado para evaluar la ansiedad ya que dependen de la utilización de la conducta espontánea. No obstante, el LCE tiene un fenómeno conocido como la tolerancia a un ensayo, o más conocido como

One-trial tolerance (OTT). Este fenómeno consiste en una marcada atenuación o a veces de la supresión del efecto ansiolítico de las benzodiazepinas en ratas y ratones que solo tuvieron una experiencia previa en el LCE. El fenómeno de la OTT no depende del tratamiento farmacológico en la primera experiencia en el laberinto, ni del material utilizado para construir el laberinto. Se ha reportado que este fenómeno ocurre en intervalos de 24 horas a 2 semanas entre experiencia 1 y 2 (Calzavara et al., 2005), mientras que si se aumenta la duración de las dos experiencias de 5 a 10 minutos se restablece la acción del fármaco como el clordiazepóxido durante la segunda experiencia. Estudios neuroanatómicos relacionados con este fenómeno han sugerido que el hipotálamo dorsomedial, el núcleo basolateral de la amígdala y el rafe dorsal se encuentran implicados en el fenómeno de la OTT pero el hipocampo no está implicado (Escarabajal, Torres, & Flaherty, 2003).

A pesar de la consistencia del efecto de la OTT, en la actualidad no se ha encontrado ninguna explicación concluyente para este fenómeno. Existen varias hipótesis que se han propuesto para entender este fenómeno, basándose en procesos como la habituación locomotora al laberinto, el desarrollo de una respuesta fóbica a la información aprendida, o la falta de conflicto motivacional. Una posible razón para esta variedad de hipótesis está conectada con el hecho de que la importancia relativa de algunas variables para la inducción de este fenómeno no está clara. Por ejemplo, contrariamente a los primeros resultados de los perfiles de primera y segunda experiencia estables en los grupos inyectados con el vehículo, un conjunto creciente de los experimentos indican que una sola experiencia previa del LCE sin fármaco puede reducir entradas en los brazos abiertos y las entradas totales en la segunda experiencia (Escarabajal et al., 2003). También, se ha demostrado en repetidas ocasiones que manipulación de los animales puede modular la acción ansiolítica de los fármacos probados en el LCE (Andrews and File, 1993), sólo File et al. 1992 observaron que la ausencia de manipulación abolió la falta de efecto ansiolítico de clordiazepóxido en la segunda experiencia. Por último, aunque el fenómeno de OTT depende críticamente de la experiencia en el laberinto, parece ser independiente del medicamento en la exposición inicial (File, 1990). Estos resultados sugieren que la influencia de la experiencia del laberinto en la acción ansiolítica de las benzodiazepinas no está modulada por las drogas en la experiencia inicial (Escarabajal et al., 2003).

Los efectos a largo plazo en el comportamiento del animal y la plasticidad neuronal se ven afectados por la exposición a un estrés ambiental, esto ha sido implicado en varios trastornos humanos tales como, la depresión, ansiedad o enfermedades cardiovasculares. Experiencias previas de estrés pueden modificar respuestas en el animal debido a nuevos estímulos. Un ejemplo son las ratas que se exponen a una prueba de resistencia (inmovilización) de 2h previas a la exposición en el LCE, mostrando una reducción en la exploración del brazo abierto del LCE. Estas pruebas de resistencia causan un gran incremento en la síntesis de proteínas cerebrales, debido a cambios psicológicos relacionados con el estrés. Debido a estas pruebas se sugirió que el aumento en la síntesis de proteínas puede jugar un papel importante en los eventos moleculares que lideran cambios en la plasticidad neuronal después de un estrés agudo (Mendonça & Guimarães, 1998).

4.1.5 Memoria y síntesis de proteínas. La memoria es, en gran parte, un proceso molecular a través del cual la información aprendida, es almacenada y estabilizada a largo plazo a través del proceso de consolidación de la memoria que es dependiente del hipocampo y la síntesis de nuevas proteínas que participan el fortalecimiento de la sinapsis (Klann & Sweatt, 2008)(McGauran et al., 2008). Diferentes investigaciones en el área de la biología molecular y las neurociencias, han coincidido en la necesidad de la síntesis de nuevas proteínas para la memoria. Al parecer, este proceso es un proceso clave en las modificaciones de la conectividad neurona-neurona, y es requerido para sostener los recursos celulares que garantizan la conectividad del sistema nervioso en respuesta a la memoria (Gold, 2008).

En un estudio que pretendía examinar los efectos de la administración sistémica de CHX sobre la reconsolidación de la memoria espacial en ratas macho y hembra utilizando el laberinto acuático de Morris. Los resultados obtenidos reportaron que la síntesis de proteínas es importante en la reconsolidación a largo plazo de la memoria espacial, que es reactivada por una prueba latente de aprendizaje contextual. La cicloheximida afecta el rendimiento de las ratas en la prueba cuando es administrada junto con la reactivación. En este estudio y en otros realizados por Flint y Marino (2007), la cicloheximida tuvo un impacto sobre la reconsolidación de la memoria. Los resultados también reafirman lo que asegura la literatura sobre las diferencias que existen entre los sexos, ya que los machos

tuvieron latencias más cortas a la plataforma que las hembras (Flint, Valentine, & Papandrea, 2007).

El dogma central de la biología molecular consiste en que el ADN se transcribe a ARN, el cual se traduce para sintetizar proteínas. Sin embargo, se ha encontrado que la traducción puede verse interrumpida por compuestos que tienen la capacidad de interactuar con la maquinaria molecular que participa en la síntesis de proteínas, inhibiendo dicho proceso y afectando la consolidación de la memoria (Hernández & Abel, 2008). La CHX es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces griseus* que se utiliza, a nivel experimental, para interrumpir la síntesis de proteínas en células eucariotas (Hettinger, Formaker, & Frank, 2007). Se ha demostrado que CHX bloquea la etapa de elongación en el proceso de traducción, al unirse al ribosoma, e impedir la translocación del polipéptido que es mediada por el efector eEF2 (Schneider-Poetsch et al., 2010).

La CHX es un antibiótico producido por *Streptomyces griseus*. La CHX se ha utilizado para interrumpir experimentalmente la síntesis de proteínas **Figura 3** (Hettinger, Formaker, & Frank, 2007). La CHX inhibe la traducción en ribosomas citoplasmáticos eucariotas. El sitio primario de la inhibición ha sido reportado como iniciación, elongación y terminación. Olenick demostró que todas las etapas de la traducción dependientes de la energía son sensibles a la droga; el efecto relativo de la droga en las diferentes etapas de traducción parece variar dependiendo de la concentración de CHX (Sutton, Ares, & Hallberg, 1978).

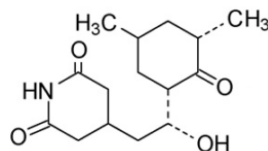


Figura 3. Estructura de la molécula de cicloheximida.

Se ha demostrado que la CHX bloquea la elongación de la traducción eucariótica. Se une al ribosoma e inhibe la translocación del polipéptido la cual es mediada por eEF2. La CHX permite un ciclo completo de translocación antes de detener completamente cualquier elongación adicional de la cadena del polipéptido. Se ha especulado que la CHX requiere

un sitio-E unido al t-RNA desacilado por la actividad **Figura 4** (Schneider-poetsch et al., 2010).

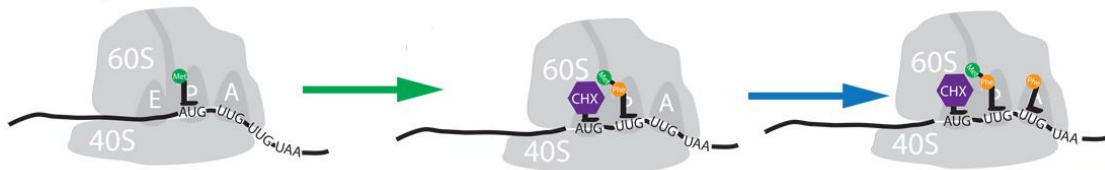


Figura 4. Modelo del mecanismo de acción de la CHX en la inhibición de la elongación de la traducción de la cadena polipeptídica. La CHX se une a un sitio-E ribosomal y pero detiene la translocación al distorsionar la unión del t-ARN desacilado con el sitio-E y por lo que permitiendo una ronda completa de translocación más antes de proceder a inhibir la siguiente elongación.

4.2 NEUROCIENCIA Y PROTEÓMICA.

La neurociencia comprende y estudia una amplia gama de interrogantes acerca de cómo se organizan los sistemas nerviosos y cómo funcionan para generar la conducta. Una de las estructuras más importantes del sistema nervioso es el encéfalo, ya que tiene la capacidad de almacenar información provista por la experiencia y recuperar gran parte de ella a voluntad. Al hablar de aprendizaje nos referimos al proceso en el que el sistema nervioso adquiere nueva información y se pueden observar cambios en el comportamiento (Purves *et al*, 2006).

La neurociencia y la proteómica se han relacionado, permitiendo llevar a cabo estudios sobre los procesos neurobiológicos asociados, con el deterioro cognitivo, el déficit de aprendizaje, el deterioro de la memoria emocional, la relación de estos procesos con formación sináptica, la plasticidad neuronal, y la transmisión sináptica en la que participan las proteínas. Estos procesos se encuentran relacionados con los trastornos neurobiológicos en pacientes, por ejemplo, con la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson, y esclerosis múltiple, entre otros (Sánchez, Corthals, Hochstrasser; 2003).

La proteómica, va un paso más allá de los enfoques de la genómica, y junto con el estudio de los niveles de expresión del ARN está asociado con el análisis de la expresión global de las proteínas en células, organismos, tejidos, etc. En un estudio cuantitativo de la expresión de proteínas se debe tener en cuenta la influencia de la variación de condiciones, así como el acontecimiento de modificaciones post-traduccionales, interacciones con otras moléculas, etc.; para obtener una visión en conjunto de las proteínas expresadas, que es denominada proteoma (Sánchez, Corthals & Hochstrasser; 2003).

La electroforesis bidimensional constituye una herramienta ideal para el estudio de mezclas complejas de proteínas, ya que permite que éstas puedan separarse mediante su carga y su peso molecular, permitiendo diferenciar las diferentes isoformas de la misma proteína. Además, se pueden obtener las imágenes de los geles para determinar, mediante análisis bioinformático, los proteomas y sus cambios de expresión (Sánchez, Corthals & Hochstrasser; 2003).

Un estudio proteómico del giro dentado hipocampal de ratas Wistar expuestas al laberinto acuático, que aprendieron a encontrar una plataforma que se encontraba en el laberinto y fueron sacrificadas en tiempos de 3, 6, 12, y 24 horas después del aprendizaje, reveló que a lo largo de estos tiempos, la expresión de 42 proteínas variaban considerablemente, es decir, las concentraciones de las proteínas aumentaban y disminuían, indicando una regulación a través del tiempo. Esta regulación se hace más significativa alrededor de las 3 y 12 horas posteriores al aprendizaje. Como la mayoría de las proteínas identificadas contribuyen con la estructura o el metabolismo celular, sugieren un rol importante en la memoria asociada con la reorganización sináptica; entre ellas se hallan actinas, tubulinas y proteínas de filamentos intermedios que son los principales componentes del citoesqueleto (Monopoli et al., 2011).

4.2.1 La proteómica y la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (2D SDS-PAGE). La secuenciación del genoma humano ha sido uno de los más importantes logros científicos de las últimas décadas. Uno de los elementos más sorprendentes de toda la investigación fue que los seres humanos tienen apenas más genes que las moscas y los gusanos. La complejidad de los seres humanos

no puede explicarse únicamente por su genómica, sino más bien en la forma en que estos productos genéticos, las proteínas, interactúan. Un solo gen puede codificar más de un tipo de proteína. La reciente compilación de la base de datos del genoma humano ha dado lugar a un número de proteínas predichas, que requieren identidades estructurales y funcionales primarias. Por lo tanto, la secuencia del gen de la información y el patrón de actividad de los genes dentro de la célula no proporcionan una imagen completa. Se debe mirar más allá del actual nivel genómico para establecer un vínculo entre el gen y la proteína (Dhingra, Gupta, Andacht, & Fu, 2005).

La proteómica surgió a mediados de la década de 1990 y ha continuado creciendo rápidamente desde su inicio. Este es nuevo enfoque de la biología y la investigación biomédica fue posible gracias a la disponibilidad de nuevas secuencias completas de genomas y el desarrollo de técnicas de alta sensibilidad como la espectrometría de masas y de instrumentos para el análisis de proteínas y péptidos. El término "PROTEOMA" se introdujo por primera vez a mediados de la década de 1990 por Wilkins y Williams para indicar todo el complemento «proteínas» expresado por un "genoma" de una célula, tejido u organismo entero. El genoma de una célula u organismo es finito y estático durante su vida útil, pero al contrario de los genomas, los proteomas son muy dinámicos y cambian constantemente como respuesta a los estímulos externos y durante el desarrollo celular. Especialmente para los organismos complejos como los eucariotas superiores, el número potencial de proteomas únicos es esencialmente infinito (Ali-Khan, Zuo, & Speicher, 2003).

Los estudios proteómicos se centran en la caracterización detallada de uno, o como mucho, unos pocos genes o proteínas, teniendo un enfoque más amplio y sistemático para entender la biología. La proteómica está basada principalmente en el descubrimiento en lugar de una hipótesis. Por esto, el resultado no se ve limitado por el conocimiento previo y la proteómica puede ofrecer nuevas oportunidades para avanzar en el conocimiento de gran manera mediante la identificación de nuevas dianas farmacológicas, conducir al desarrollo de diagnósticos y terapéuticas superiores, correlacionar las vías biológicas y mecanismos moleculares con la enfermedad (Ali-Khan et al., 2003). Muchas herramientas han sido diseñadas para estudiar las proteínas. Las más importantes son, la separación de alta calidad de proteínas en dos dimensiones, la caracterización de las

proteínas separadas por espectrometría de masas, y la elucidación de nueva información utilizando herramientas bioinformáticas **Figura 5** (Dhingra et al., 2005).

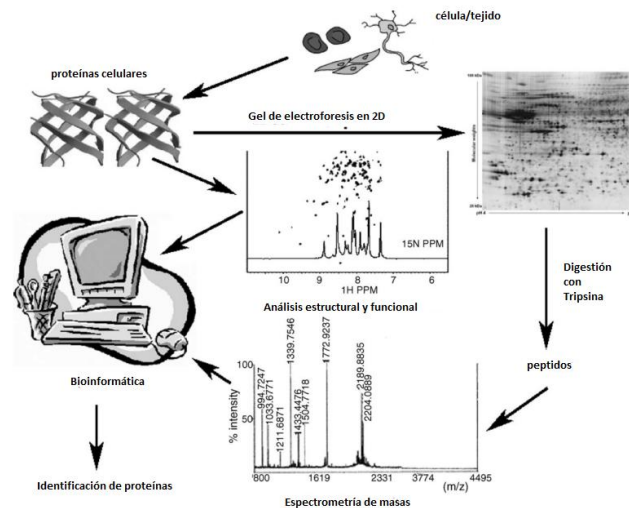


Figura 5. Esquema de una estrategia para llevar a cabo la proteómica (una visión general).

La 2D-SDS es una técnica de bioanalítica con alta resolución en la separación de proteínas mediante la integración de dos métodos de separación electroforéticos independientes. En la primera dimensión, se separan las proteínas de acuerdo con su carga, empleando la técnica de enfoque isoeléctrico (IEF), mientras que la segunda dimensión consiste en la separación basada de acuerdo con el tamaño de la proteína usando la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (2D SDS-PAGE) (Arbor, 2005).

4.2.1.1 Preparación de la muestra. La preparación de la muestra es uno de los pasos más importantes en todo análisis del proteoma. El tratamiento previo de las muestras para electroforesis 2D implica la solubilización, desnaturalización, la reducción para romper completamente las interacciones entre las proteínas y, la eliminación de todos los compuestos de interferencia para asegurar la separación eficiente (Dhingra et al., 2005). La preparación de la muestra consiste en solubilizar cuantitativamente todas las proteínas, sin que ocurra ninguna modificación añadida durante todo el proceso, de una manera totalmente compatible con la primera separación, y que al mismo tiempo, pueda

eliminar todos los demás compuestos biológicos que podrían interferir con esta primera separación (Rabilloud, Chevallet, Luche, & Lelong, 2010).

En los procesos de lisis celular, solubilización y homogenización, es importante que la carga de las proteínas no se altere de ninguna manera. Se utiliza una solución de lisis que contenga productos químicos no cargados para la solubilización, extracción de las proteínas celulares, desnaturalización de estas y para mantenerlas en solución. Para lograr esto, regularmente se utiliza una combinación de agentes caotrópicos y detergentes. Los agentes caotrópicos son desnaturalizantes de proteínas y agentes solubilizantes, los agentes caotrópicos neutros, tales como la urea y de la tiourea son los más comunes. Sin embargo, los caotrópicos por sí solos no son suficientes, ya que no disuelven los lípidos celulares de manera eficiente y no son capaces de mantener las proteínas lo suficientemente solubles en las condiciones que deben permanecer en el Isoelectroenfoque IEF. Para lograr ambos fines, los detergentes eléctricamente neutros se añaden siempre durante la preparación de la solución de lisis. Para ello se puede utilizar cualquier tipo de detergente completamente neutral en todo el rango de pH de enfoque isoeléctrico y compatible con los agentes caotrópicos. El detergente que se utiliza con mayor frecuencia y de manera eficiente es CHAPS (Rabilloud et al., 2010).

Después de la lisis celular, es necesario para eliminar las sustancias de interferencia (compuestos fenólicos, ácidos nucleicos), y los componentes insolubles (por centrifugación a alta velocidad). El procedimiento de lisis para cada tipo de tejido o célula debe ser optimizado para minimizar la proteólisis y la modificación de las proteínas, ya que el objetivo es preservar las proteínas en la misma estructura principal que se encuentra en la célula. Las proteasas presentes en la solución de lisis tienden a producir interferencias en el perfil en dos dimensiones. Estas interferencias se pueden silenciar por la adición de inhibidores de proteasas. Aunque, los inhibidores de proteasas en algún momento pueden también ayudar en la generación de otros artefactos en el perfil de dos dimensiones. Las proteasas también se pueden inactivar al calentar la muestra en una solución de sodio dodecil sulfato SDS al 1%(p/v). Sin embargo, el SDS tiene una carga negativa y, por lo tanto, no es compatible con el enfoque isoeléctrico. El SDS también tiene un efecto negativo sustancial en la eficiencia de alquilación de la proteína (*Dhingra et al., 2005*). Es por ello que se pueden añadir el inhibidor de proteasas PMSF o cócteles

de inhibidores. Sin embargo, se deben agregar antes de la adición del agente reductor ya que a veces pueden ocurrir modificaciones de algunas proteínas (Dunn, 1993). Además, las proteínas se pueden limpiar por la precipitación en acetona enfriada. Después de la lisis celular y la eliminación de componentes de interferencia, las muestras se deben resolubilizar en una solución que contenga agentes caotrópicos y detergentes eficientes que permitan la solubilización de las proteínas (por ejemplo, NP-40, Triton X-100, CHAPS o SDS) (Dhingra et al., 2005).

La adición de un detergente co-precipitante en la solución de lisis permite que las proteínas se precipiten a partir de una solución. Otros componentes importantes son el tampón de lavado, que contiene algunos aditivos orgánicos que permiten la resuspensión rápida y completa de las proteínas con un solubilizante o tampón de lisis. En el proceso de preparación de la muestra un tampón de lisis típico podría ser una mezcla de urea 9M, 1% de DTT, 2% de CHAPS y 0,8% de anfolitos portadores. La urea cumple la función de desnaturalizar las proteínas de la muestra, que inactiva rápidamente cualquier actividad enzimática, lo que podría generar la modificación de proteínas. El CHAPS aumenta la solubilidad de las proteínas hidrófobas. La tiourea aumenta la solubilidad de las proteínas en presencia de urea. El DTT mantiene las proteínas en un estado reducido, rompe los enlaces disulfuro y potencia de la solubilidad (Dhingra et al., 2005). Los anfolitos son compuestos anfóteros que presentan bajo peso molecular, son pequeñas poliaminas (alrededor de 750 kDa) con abundantes grupos ácidos y básicos, con un pI que abarca desde 2.5 hasta 11.0, tienen una gran capacidad de tamponación cerca de su pI, con una gran solubilidad y conductividad (Cultek, 2006).

4.2.1.2 Cuantificación de la muestra. En la purificación de proteínas, los laboratorios requieren un método rápido y sensible para la cuantificación de la proteína. Uno de los métodos de cuantificación se basa en la observación del cambio de coloración del azul brillante de Coomassie G-250, ya existe en dos formas diferentes de color, rojo y azul. La forma roja se convierte en la forma azul tras unirse el colorante a la proteína. El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción molar, lo que conduce a una gran sensibilidad en la medición de la proteína. El proceso de la unión del colorante a la proteína es rápido (aproximadamente 2min), y el complejo proteína-colorante se mantiene

disperso y estable en una solución por aproximadamente 1 hora, lo que hace el procedimiento muy rápido y reproducible (Bradford, 1976).

4.2.1.3 La primera dimensión: Isoelectroenfoque IEF. Las proteínas son moléculas anfóteras; pueden tener una carga neta positiva, negativa o cero. Esta carga depende de la composición de aminoácidos. Se conoce como la carga neta de una proteína a la suma de todas las cargas negativas y positivas. El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es el pH específico en el que la carga neta de la proteína es cero. Las proteínas se encuentran cargadas positivamente a valores de pH por debajo de su pI y están cargadas negativamente a valores de pH por encima de su pI. El IEF es una separación electroforética basada en esta característica bioquímica de las proteínas (Chevalier, 2010).

Fundamentalmente, la primera dimensión se realiza en una "tira". Esta tira contiene un gel seco que se forma por medio de la polimerización de monómeros de acrilamida, unidos por bis-acrilamida con moléculas de inmovilina unidas covalentemente. Las inmovilinas son compuestos químicos derivados de la acrilamida y tienen funciones no ionizables anfóteras adicionales, teniendo inmovilinas de varios pKa se puede crear un gradiente de pH inmovilizado en el interior de la tira gel de acrilamida. Aunque la inmovilina se desarrolló por los profesores Righetti y Görg a principios de la década de 1990, aún es muy utilizado en la 2D-SDS PAGE ya que el gradiente del IEF es muy estable en el tiempo y en un alto campo eléctrico, lo que permite tener una buena reproducibilidad y una gran capacidad de separación. Las tiras que contienen geles de acrilamida se encuentran secas y se guardadas en un soporte de plástico. Antes de su uso, la tiras se rehidratan en una solución que contiene un cóctel de compuestos de diferentes pI que corresponde a anfolitos soporte y una cantidad adecuada de proteínas en el tampón de solubilización. Los anfolitos portadores son moléculas anfóteras con una alta capacidad amortiguadora cerca de su pI. Los anfolitos portadores contienen especies con pI que abarcan un rango específico de pH, lo cual facilita la movilidad electroforética de las proteínas (Chevalier, 2010).

Al aplicar un campo eléctrico a la tira rehidratada, las moléculas cargadas negativamente (proteínas y anfolitos) se mueven hacia el ánodo (electrodo positivo) y las moléculas cargadas positivamente se mueven hacia el cátodo (electrodo negativo). Cuando las proteínas se encuentran alineadas de acuerdo con su pI, la carga neta global es cero y las proteínas quedan inmobilizadas, para posteriormente enfocarla. El enfoque de la proteínas se logra con un aparato que tiene la capacidad de generar un voltaje entre 8.000 o 10.000 V, pero con una corriente de intensidad (50 μ A máx. por tira) para reducir el calor. Las tiras se rehidratan sin corriente durante al menos 5h (rehidratación pasiva), después se rehidratan con 50 V aprox. 5h (rehidratación activa) y luego se enfocan con 30 a 80 kV/h (Chevalier, 2010).

4.2.1.4 Equilibración. La equilibración de la tiras es un paso fundamental en la 2D-SDS PAGE. En este paso, las tiras están saturadas con SDS, un detergente aniónico que puede desnaturalizar las proteínas y formar un complejo proteína/SDS cargado negativamente. La cantidad de SDS unida a una proteína es directamente proporcional a la masa de la proteína. Por lo tanto, las proteínas que están completamente cubiertas por las cargas negativas se separan sobre la base de la masa molecular. Esta equilibración se lleva a cabo al poner las tiras en una solución que contiene un tampón, con urea y glicerol y se lleva a cabo en dos partes: (1) con una solución de equilibrado que contiene DTT, para mantener un ambiente reductor, y (2) con una solución de equilibrio que contenía yodoacetamida, para alquilar grupos tiol reducidos, evitando la re-oxidación durante la electroforesis (Chevalier, 2010).

4.2.1.5 La segunda dimensión: SDS-PAGE. SDS-PAGE es un método que permite identificar, separar y monitorear las proteínas, también se emplea para determinar el peso molecular de estas. En SDS-PAGE, la migración de la proteínas está determinada por su peso molecular (Chevalier, 2010). El SDS desnaturaliza completamente las proteínas y rompe los enlaces no covalentes de estas, estos enlaces son los que determinan la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas. El gel de poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en la electroforesis, es químicamente inerte y tiene propiedades uniformes. Los geles son transparentes, lo que posibilita una buena visualización de las bandas de las proteínas, también presentan estabilidad mecánica, son insolubles en agua, y son relativamente no iónicos. Los geles de poliacrilamida se

forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y el monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, producidos por radicales libres de oxígeno, causados por la acción de iones persulfato. El N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED) es el catalizador de esta reacción, que causa la formación de radicales libres por parte del persulfato, esta polimerización se lleva a cabo dentro de dos vidrios que se encuentran separados por milímetros. La migración de la proteína hacia el ánodo a través del gel es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (PM). El PM de las proteínas puede determinarse al compararse las movilidades electroforéticas de marcadores de pesos molecular conocidos. La representación gráfica del Log PM de la proteína como función del valor de Rf (distancia desde el inicio del gel separador al centro de cada banda dividido por la distancia a la cual ha migrado el ión líder) (Hilda & García, 2000).

Las tiras equilibradas se encajan con 1% (p/v) de agarosa de caliente en una solución tampón de Tris/glicina/SDS con 0,01% (p/v) de azul de bromofenol en la parte superior del gel de poliacrilamida. Los geles se corren generalmente con 1 o 2 W de corriente en la primera hora, seguido de 15 mA/gel durante la noche con una regulación de la temperatura (10°C a 18°C). Cuando el azul de bromofenol, que se le conoce como el frente de migración o de corrido alcanza la parte inferior del gel, la segunda dimensión ha terminado y el gel de acrilamida puede ser removido de las placas de vidrio (Chevalier, 2010).

4.2.1.6 Tinción del gel de 2D-SDS PAGE. El gel después de la 2D-SDS PAGE se debe sumergir en una solución de fijación que contenga ácido (ácido fosfórico o ácido acético) y alcohol (etanol o metanol). Posteriormente, se debe seleccionar un protocolo de tinción de los geles (Chevalier, 2010). El azul brillante de Coomassie (CBB), el nitrato de plata, y la tinción negativa son métodos muy comunes de tinción de geles de 2D-SDS PAGE. La sensibilidad de las manchas en el gel varía de 100 ng (Coomassie) a 1 ng (plata) para la detección individual de las proteínas. Existen dos tipos de CBB: Coomassie R-250 y de Coomassie G-250. En medio ácido, el CBB se une a los aminoácidos por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. La tinción con CCB coloidal es reproducible y tiene una alta sensibilidad (Tannu & Hemby, 2006).

4.2.1.7 Adquisición, y análisis de imágenes y bioinformático de las manchas en el gel de 2D-SDS PAGE. Los geles teñidos se escanean en un escáner de tipo "visible" o "fluorescente" de acuerdo con el protocolo de tinción seleccionado. La imagen se puede importar al software específico para analizarla y compararla. Para el análisis de imágenes se utilizan softwares, como progénesis, PDQuest y Samespots, que detectan las manchas y permiten comparar la intensidad de una mancha específica entre las muestras. El mapa proteómico es específico para una determinada célula, tejido u organismo que se encuentra en un estado fisiológico específico, permitiendo comparar no sólo una mancha con otra en el gel, sino que un conjunto de manchas con otro conjunto de manchas, por ejemplo, entre dos organismos cercanos (Chevalier, 2010).

La identificación de estas manchas se puede hacer utilizando la base de datos bioinformática ExPASy (www.expasy.org), que es un Portal de recursos SIB Bioinformática que proporciona acceso a bases de datos científicos y herramientas de software en diferentes áreas de las ciencias biológicas, incluyendo la proteómica, la genómica, la filogenia, la biología de sistemas, la evolución, la genética de poblaciones, transcriptómica etc. El portal ofrece información detallada sobre los recursos de más de 20 grupos diferentes SIB toda Suiza. En cuanto a la proteómica, tiene herramientas como búsqueda de proteínas de tejidos específicos y la búsqueda de la masa y el punto isoeléctrico de proteínas que se encuentran en esta base de datos (Artimo *et al.*, 2012).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ANÁLISIS COMPORTAMENTAL.

5.1.1 Animales. La manipulación de los animales se hizo de acuerdo con las normas éticas establecidas por la ley 84 de 1989, resolución 8430 de 1993 del ministerio de salud, que rigen el uso animales vivos para experimentación e investigación, y la aprobación del comité de bioética de la Universidad Industrial de Santander.

Se utilizaron 48 ratas Wistar machos de 7-9 semanas de edad y pesos entre 256-355 gramos provenientes del bioterio de la facultad de salud-UIS. Las 48 ratas se distribuyeron en 8 cajas vivero (50x30x15 cm) en grupos de 6 animales, en cada caja los animales recibieron el mismo tratamiento (CHX o SS) y el mismo tiempo entre sesión 1 y sesión 2 (3 o 24 horas). Los animales se mantuvieron en las siguientes condiciones ambientales: Temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $65\pm 5\%$, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, agua y alimento de acceso libre.

5.1.2 Laberinto en cruz elevado LCE. El LCE es un dispositivo de madera, y consiste en 4 brazos dispuestos en forma de cruz: 2 brazos abiertos (BA) con un borde pequeño de acrílico de 2 cm de altura y 2 brazos cerrados (BC) con paredes laterales de 40cm de altura (50 x 12 cm cada uno), se encuentra elevado a 50 cm del suelo (Bertoglio & Carobrez, 2000). El laberinto se ubicó en el centro de un cuarto de experimentación iluminado por 300 lux en cuyo techo, que se encontraba encima del LCE y donde también se hallaba una cámara de video, se realizó el registro de la actividad exploratoria y grabó en un computador que se encontraba en una habitación contigua. La limpieza del laberinto se llevó a cabo antes y después de la exposición de cada animal, usando una solución de etanol (10% v/v) y papel absorbente. Cada sesión en el LCE se grabó para realizar el registro y tratamiento de los datos utilizando el programa computacional PROSTCOM, considerando como variables comportamentales los tiempos y las entradas (absolutas y relativas) a los diferentes brazos del laberinto.

5.1.3 Exposición de los animales al LCE. Los animales se colocaron en la sala de habituación, bajo las mismas condiciones ambientales que tenían en el bioterio, cuatro días antes de la primera sesión en el laberinto. Todos los animales (48 ratas Wistar) fueron manipulados durante 1 minuto cada día durante 3 días previos a la primera exposición al laberinto y sus colas fueron marcadas de diferentes colores para la misma caja, teniendo un total de 8 cajas. La exposición de los animales al LCE previamente se realizó un cronograma de actividades **Tabla 1**.

Tabla 1. Cronograma de actividades de la parte experimental del análisis comportamental.

Día	Actividad
1	Manipulación de las ratas en las cajas 1 y 2.
2	Manipulación de las ratas en las cajas 1 ,2 ,3 y 4.
3	Manipulación de las ratas en las cajas 1 ,2 ,3 y 4.
4	Manipulación de las ratas en las cajas 3 y 4. Inyección de SS a las ratas de la caja 1. Inyección de CHX a las ratas de la caja 2. Primera sesión de las ratas en las cajas 1 y 2. Segunda sesión de las ratas en las cajas 1 y 2 (3 horas después de la primera sesión).
5	Inyección de CHX a las ratas de la caja 3. Inyección de SS a las ratas de la caja 4. Primera sesión de las ratas en las cajas 3 y 4.
6	Segunda sesión de las ratas en las cajas 3 y 4.
7	Manipulación de las ratas en las cajas 5 y 6.
8	Manipulación de las ratas en las cajas 5 y 6.
9	Manipulación de las ratas en las cajas 5, 6, 7 y 8.
10	Manipulación de las ratas en las cajas 7 y 8. Inyección de CHX a las ratas de la caja 5.
10	Inyección de SS a las ratas de la caja 6. Primera sesión de las ratas en las cajas 5 y 6.
11	Manipulación de las ratas en las cajas 7 y 8. Segunda sesión de las ratas en las cajas 5 y 6.
12	Inyección de SS a las ratas de la caja 7. Inyección de CHX a las ratas de la caja 8. Primera sesión de las ratas en las cajas 7 y 8. Segunda sesión de las ratas en las cajas 7 y 8 (3 horas después de la primera sesión).

Las exposiciones al LCE se llevaron a cabo entre las 13:00 y 18:00 horas de la siguiente manera (**Figura 6**): los animales se inyectaron vía intraperitoneal i.p con SS o CHX (3mg/kg en un volumen 1mL/kg), media hora después fueron expuestas por primera vez al LCE durante 5 minutos; 3 horas después se realizó la segunda exposición (5 minutos) al LCE para a los animales que pertenecían a los grupos experimentales SS-3h y CHX-3h; 24 horas después se realizó la segunda exposición (5 minutos) al LCE utilizando los demás animales (12 ratas inyectadas con CHX y 12 con SS) que de los grupos experimentales SS-24h y CHX-24h (**Tabla 2**). Después de la segunda exposición al laberinto, al pasar 5 minutos los animales fueron decapitados y se aislaron los hipocampos derecho e izquierdo.

Tabla 2. Grupos experimentales.

GRUPO	DESCRIPCIÓN	n
SS-3h	TTO con SS – Tiempo entre 1 y 2 sesión en el LCE: 3 horas.	12
CHX-3h	TTO con CHX – Tiempo entre 1 y 2 sesión en el LCE: 3 horas.	12
SS-24h	TTO con SS – Tiempo entre 1 y 2 sesión en el LCE: 24 horas.	12
CHX-24h	TTO con CHX – Tiempo entre 1 y 2 sesión en el LCE: 24 horas.	12

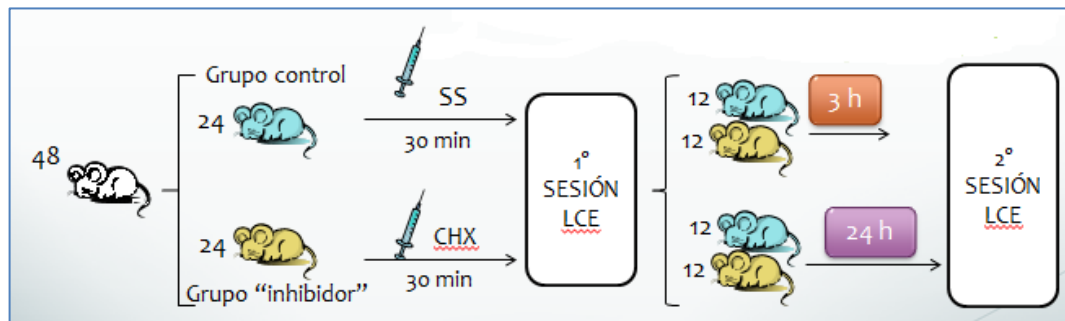


Figura 6. Esquema del procedimiento experimental en el LCE.

5.1.4 Análisis de los datos obtenidos en el LCE. En el LCE se asume que en los brazos abiertos BA del laberinto se produce una combinación de miedo: a) a un ambiente no familiar; b) a un espacio abierto intensamente brillante, y c) a una situación de equilibrio en una superficie relativamente angosta y situada a una considerable altura. Por el contrario, los brazos cerrados BC que presentan altas paredes ofrecen protección ante posibles depredadores (Cárdenas & Navarro, 2002). El comportamiento de las ratas en el laberinto se describe por los movimientos en las zonas de los BA y BC, se encuentran separados por una plataforma central, como se puede observar en la **Figura 7**. El grupo de investigación en Neurociencias y comportamiento UIS-UPB, estableció este modelo para registrar la actividad exploratoria con base en variables espacio-temporales.

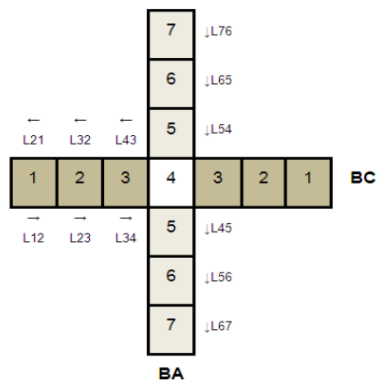


Figura 7. Esquema de la distribución de las posiciones en los brazos para el registro de datos con REG 1.0 por parte del grupo de investigación NyC UIS-UPB. En los brazos cerrados se encuentran las zonas 1, 2 y 3, en los brazos abiertos las zonas 5,6 y 7, y la plataforma central del laberinto en la zona 4.

Teniendo en cuenta el esquema de la **Figura 7**, se analizaron las sesiones grabadas en el LCE con el programa computacional PROSTCOM (Conde, Costa & Tomaz, 2000), permitiendo registrar los tiempos de permanencia en cada una de las posiciones del laberinto, considerándose como parámetro de movimiento de una zona a otra el cruce con las cuatro patas del animal. Posteriormente, se analizaron los datos obtenidos mediante el paquete estadístico SIGMASTAT 3.5.

5.2 ANÁLISIS PROTEÓMICO

5.2.1 Preparación de las muestras.

5.2.1.1 Precipitación y solubilización de las proteínas. Cada uno de los tejidos del hipocampo dorsal (derecho HD e izquierdo HI) fue puesto en un tubo eppendorf de 1,5mL y homogenizado en 500µL de una solución buffer de lisis mediante agitación en vortex a 1200rpm durante 2h (ver **Anexo A**). A continuación, la muestra se centrifugó durante 20min a 13000rpm y 4°C, utilizando una centrifuga THERMO IEC CL31R Multispeed. El sobrenadante se separó, se distribuyó en cantidades iguales en 2 tubos eppendorf de 1,5mL, y almacenó con acetona a -20°C en una proporción 1:4 volumen a volumen, muestra/acetona, durante 12h mínimo. Posteriormente al enfriamiento de la muestra, esta mezcla fue centrifugada por 15min a 15000xg y 4°C. El sobrenadante se descartó, mientras que el precipitado o pellet se lavó 3 veces con 200µL de acetona a -20°C. En cada lavado, el centrifugado se centrifugó durante 5min a 10000xg y 4°C. Para finalizar la preparación de las muestras, cada pellet se resuspendió en 200µL de solución buffer de lisis usando agitación en vortex a 1200rpm durante 2h. Las muestras se almacenaron a -20 °C para utilizarlas en los experimentos de cuantificación de proteínas y 2D-SDS.

5.2.1.2 Cuantificación de las proteínas. La concentración de proteínas en cada muestra de hipocampo dorsal (HD y HI) se determinó por medio del método de Bradford (*Bradford, 1976*). Para esta determinación, se preparó una curva de calibración utilizando patrones de albúmina de suero bovino (fracción V, MERCK) disueltos en solución de buffer de lisis. Las absorbancias de los patrones y las muestras se midieron en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800 utilizando el programa UV-Probe 2.33 (**Anexo B**).

5.2.2 2D SDS-PAGE

5.2.2.1 Isoelectroenfoque IEF. En la primera dimensión se utilizaron tiras de gel inmovilizado (IPG *strips*) de 17cm de longitud, de rango entre pH 3-10 (Bio-Rad). Las tiras se rehidrataron durante 17h por rehidratación pasiva, usando un volumen de muestra de 300µL compuesto por 0,9 mg de proteína y solución buffer de rehidratación. A

continuación, se realizó el Isoelectroenfoque usando el equipo Protean IEF cell de Bio-Rad (**Figura 8**) teniendo cuenta las condiciones descritas en la **Tabla 3**.



Figura 8. Equipo de Isoelectroenfoque. Las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico. En la separación se utilizan tiras rehidratadas con la muestra de proteínas, que se encuentran ubicadas en la bandeja.

Tabla 3. Protocolo de corrida del IEF, tomado y modificado de Witzmann et al., 2006.

Etapa	Voltaje (V)	Tiempo (min)	Rampa de voltaje
1	300	30	Lineal
2	700	30	
3	1000	30	
4	1500	60	
5	2000	60	
6	3000	60	
7	7000	120	
Final	Voltaje constante: 10000V para alcanzar 80000 voltios por hora (VHR)		Lenta
Tiempo total: ≈17 h			

Después de finalizar el Isoelectroenfoque las tiras de gel inmovilizado se pasaron a las etapas de equilibración, primero las tiras estuvieron en contacto por 30 min con 6mL de una solución reductora denominada buffer de equilibración I. Luego de retirar la solución I, se agregó igual volumen de una solución alquilante llamada buffer de equilibración II por el mismo tiempo. Finalmente, las tiras se lavaron en 100mL de solución de corrido.

Se aclara que la cámara de electroforesis que permite correr la segunda dimensión tiene capacidad únicamente para dos geles, por lo que sólo se realizó de forma simultánea la rehidratación de y el IEF de 4 muestras por día.

5.2.2.2 SDS-PAGE. A continuación de la separación de las proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico y la equilibración de las tiras IPG, se llevó a cabo la separación de las proteínas en función de su peso molecular (PM), por medio de la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). Se usaron geles al 12%(p/v) de acrilamida, y se corrieron durante 6h aproximadamente a 150V en una cámara Protean xi Cell (Bio-Rad) (**Figura 9**) con 1.5L de buffer de corrido, teniendo una fuente de poder Power Pac HC (Bio-Rad).

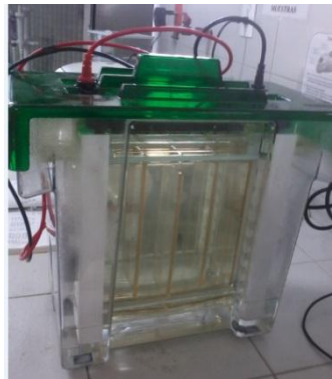


Figura 9. Cámara empleada para la segunda dimensión de la electroforesis.

5.2.3 Tinción del gel de electroforesis. Al finalizar la electroforesis bidimensional, se utilizó el protocolo de tinción de los geles con la solución de Coomassie coloidal G-250, usando un *shaker* MAXQ 4450 (THERMO) con agitación a 40rpm durante todo el proceso. Cada gel se colocó en 200mL de solución de fijación durante un tiempo mínimo de 3h. Luego, se lavó 3 veces con agua desionizada y se incubó por 1h en solución de sensibilización. A continuación, se adicionaron 10mL de solución de Coomassie G-250 permitiendo que el colorante interactuara con el gel por 20min. Para finalizar el proceso de tinción, el gel se lavó con agua desionizada hasta que se pudieran observar las manchas de las proteínas y el fondo se decolorara como en la **Figura 10**.

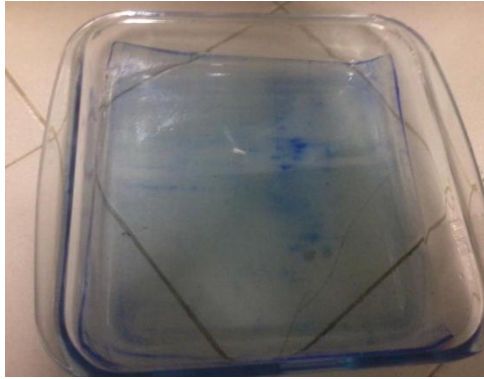


Figura 10. Imagen del gel de 2D SDS-PAGE teñido con comassie coloidal G-250.

5.2.4 Análisis de las imágenes de los geles 2D SDS-PAGE. Las imágenes de los geles revelados se obtuvieron a través de un scanner Gel Doc™ XR (Bio-Rad). Los análisis de las imágenes de los proteomas del hipocampo derecho y el hipocampo izquierdo se realizaron de manera separada usando el software PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad). Se determinaron también los valores de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) de las proteínas detectadas en los análisis de imágenes, utilizando como referencia el marcador de peso molecular 2-D SDS-PAGE *Standards* (Bio-Rad). La información obtenida de aquellas proteínas que resultaron interesantes debido a una expresión diferencial, se compararon con las proteínas publicadas en las bases de datos ExPASy.org para el hipocampo de la especie *Rattus norvegicus*, para identificar de forma cualitativa las probables proteínas asociadas con los procesos evaluados en este trabajo.

Para cada match set se creó un gel patrón, o master, constituido por las proteínas detectadas en las imágenes del experimento. Las manchas fueron etiquetadas con un número estándar SSP (*standard spot number*). Por medio de las herramientas del Analysis set manager, se determinaron las proteínas comunes en las imágenes de cada tratamiento o grupo experimental (SS-3h, CHX-3h, SS-24h y CHX-24h), con el fin de establecer el proteoma para cada uno de ellos. Se determinaron también las proteínas que se expresaron diferencialmente de acuerdo con las intensidades de los spots entre los grupos experimentales, teniendo como objetivo seleccionar, o filtrar los resultados para presentar un análisis cualitativo con los cambios más destacados.

5.2.5 Análisis bioinformático de las proteínas expresadas diferencialmente.

Para finalizar el análisis, se realizó la búsqueda de las proteínas de interés, es decir, aquellas que mostraron diferencias significativas en su expresión, utilizando las bases de datos del servidor ExPASy.org. Para ello se usaron los valores de peso molecular (PM) y punto isoelectrico (pI) calculados por el PDQuest.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 RESULTADOS ANÁLISIS COMPORTAMENTAL

Por medio del programa computacional PROSTCOM, se obtuvieron para cada una de las ratas expuestas al LCE los siguientes datos: Tiempos de permanencia en la plataforma central, tiempos en las diferentes posiciones de los brazos (abiertos y cerrados), y el número de entradas a cada brazo.

En el estudio del comportamiento de las ratas en el LCE, se tuvieron en cuenta variables como:

- Tiempo en el brazo cerrado TBC.
- Tiempo en el brazo abierto TBA.
- Cruzamientos CRUZ.
- Entradas al brazo abierto EBA.
- Porcentaje de entradas al brazo abierto %EBA.
- Entradas el brazo cerrado EBC.

Para realizar el análisis comportamental, se utilizaron los valores de las medianas de los datos para interpretar y representar gráficamente las variables estudiadas para cada grupo experimental: SS-3h, CHX-3h, SS-24h y CHX-24h; los cuales tuvieron dos experiencias en el LCE: S1 y S2. Las medianas de los datos se analizaron por medio de un paquete estadístico SIGMASTAT 3.5, utilizando el método de Holm-Sidak, para comparar los cuatro diferentes tratamientos y evaluar estadísticamente el comportamiento de la S2. Para el análisis se estableció un valor de $p < 0,05$ como indicador de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos cotejados.

En la **Figura 11** se observa que el tiempo en el brazo cerrado del laberinto (TBC) aumentó significativamente para la S2 de todos los grupos experimentales. Este incremento en el TBC puede deberse a la preferencia del animal por estar en superficies verticales, como rincones y lugares poco iluminados, ya que las ratas tienen aversión a

lugares con campos abiertos y a las alturas (Miranda, Conde, Celis, & Corzo, 2009). En la S2, se observa que los grupos experimentales donde el lapso entre S1 y S2 fue de 24h (SS-24h y CHX-24h), tuvieron un menor TBC que los grupos con lapso de 3h entre sesiones (SS-3h y CHX-3h). Al comparar la S2 de los grupos con la misma diferencia entre sesiones, se observa que el TBC para el grupo con CHX-24h es significativamente diferente al grupo SS-24h, pero para el grupo CHX-3h no es significativamente diferente al grupo SS-3h.

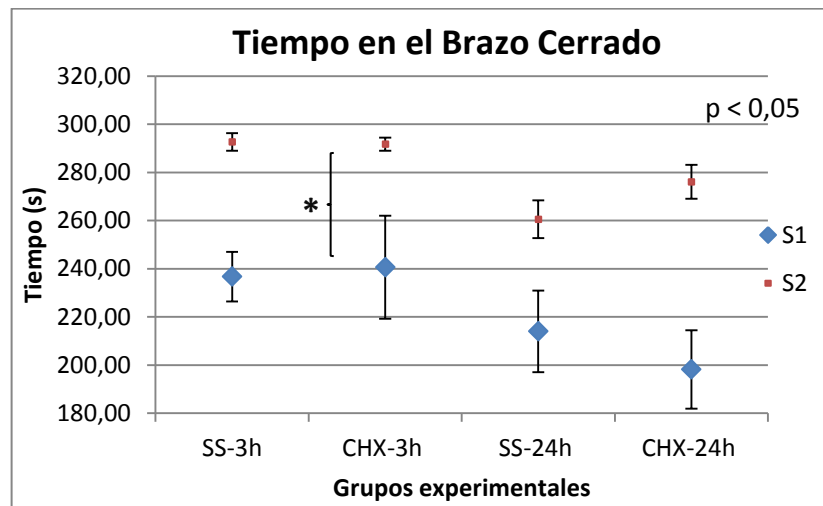


Figura 11. Tiempo de permanencia de las ratas en el brazo cerrado del laberinto.

Debido al incremento del TBC en la S2 del LCE hay una disminución del TBA, que se puede observar en la **Figura 12**. En la S2, los grupos experimentales donde el lapso entre S1 y S2 fue de 3h (SS-3h y CHX-3h), no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero si presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos experimentales con lapso de 24 horas entre sesiones (SS-24h y CHX-24h), estos dos grupos experimentales tampoco presentaron diferencias significativas entre ellos.

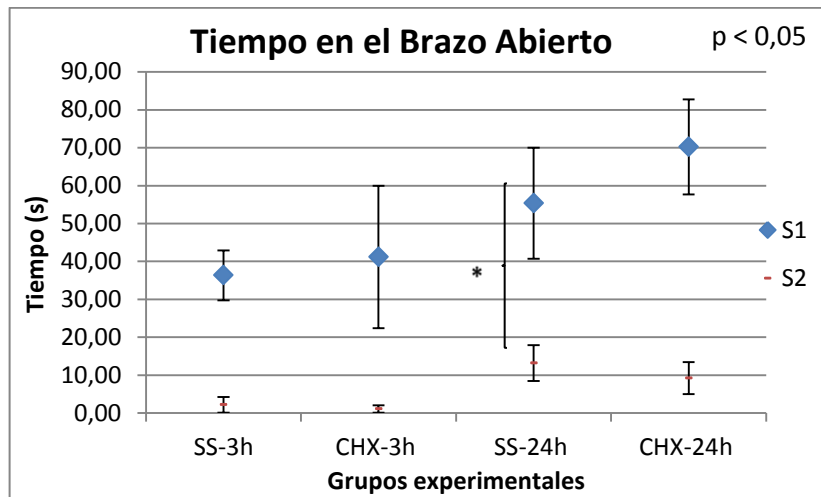


Figura 12. Tiempo de permanencia de las ratas en el brazo abierto del laberinto.

Los cruzamientos (CRUZ), disminuyeron para la S2 para todos los grupos experimentales como se puede observar en la **Figura 13**. Estos resultados pudieron ocurrir debido a una disminución de la exploración, y esta disminución a su vez fue consecuencia de una menor actividad locomotora (*Igaz, Vianna, Medina, & Izquierdo, 2002*). Al comparar los grupos que tuvieron la misma diferencia de tiempo entre S1 y S2, se observó que los grupos con SS (SS-3h y SS-24h) presentaron mayor cantidad de CRUZ que los grupos con CHX (CHX-3h y CHX-24h). Los grupos experimentales cuya diferencia entre S1 y S2 fue de 24h, presentaron una mayor cantidad de CRUZ que aquellos grupos donde la diferencia entre S1 y S2 fue de 3h.

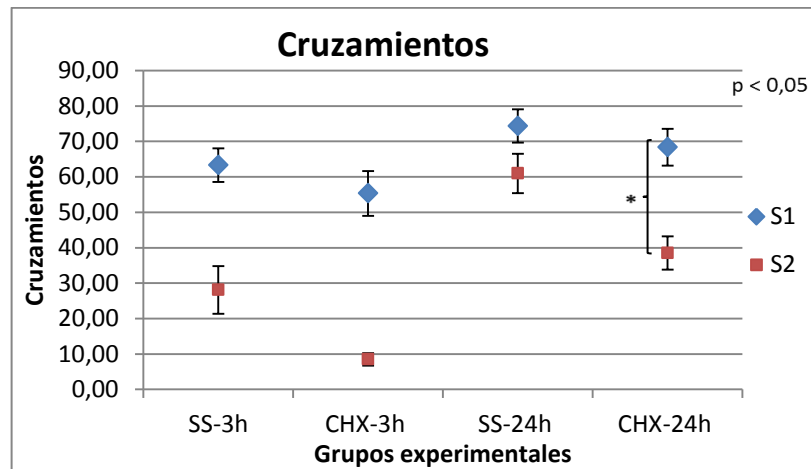


Figura 13. Número de cruzamientos de las ratas en el laberinto.

Las entradas al brazo abierto del laberinto (EBA) disminuyeron significativamente para la S2 de todos los grupos experimentales (**Figura 14**). Esta disminución puede ser consecuencia de la S1 en el laberinto, lo que indica una habituación por parte del animal al LCE (*Calzavara et al., 2005*). Al comparar la S2, los grupos experimentales cuya S2 ocurrió 24 h después de la S1: SS-24h y CHX-24h, tuvieron mayor cantidad de EBA que los grupos cuya S2 ocurrió 3h después de la S1. Los grupos experimentales que tuvieron la S2 en el mismo lapso no presentaron diferencias significativas entre ellos.

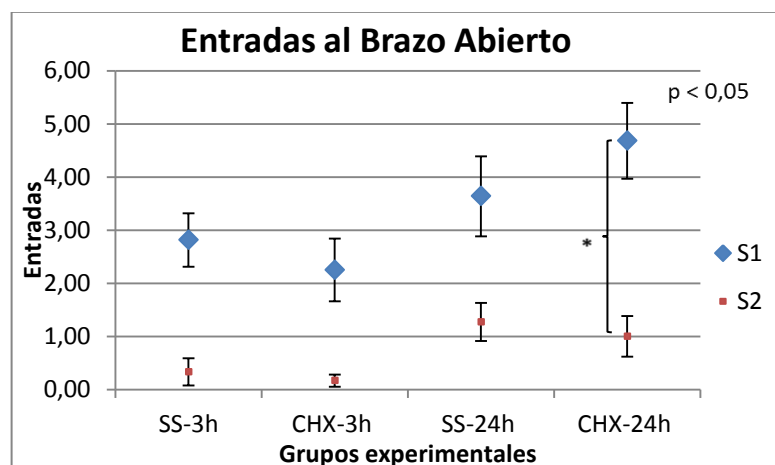


Figura 14. Número de las entradas de las ratas al brazo abierto del laberinto.

Las entradas al brazo cerrado del laberinto (EBC) disminuyeron significativamente para 3 tres grupos experimentales: SS-3h, CHX-3h y CHX-24h en la S2; mientras que para el grupo SS-24h no se observó diferencia significativa entre sesiones S1 y S2 (**Figura 15**). Estos resultados nos indican que la actividad locomotora de los animales se vio comprometida y como consecuencia disminuyó las EBC (*Hogg, 1996*). Al comparar la S2 de los grupos que tuvieron la misma diferencia de tiempo entre S1 y S2, se observó que los grupos con tratamiento de SS (SS-3h y SS-24h) presentan mayor cantidad de CRUZ que los grupos tratados con CHX (CHX-3h y CHX-24h). En la S2, los grupos cuya diferencia de tiempo entre S1 y S2 fue de 24h (SS-24h y CHX-24h) presentaron mayor CRUZ que los grupos con diferencia de tiempo entre sesiones de 3h (SS-3h y CHX-3h).

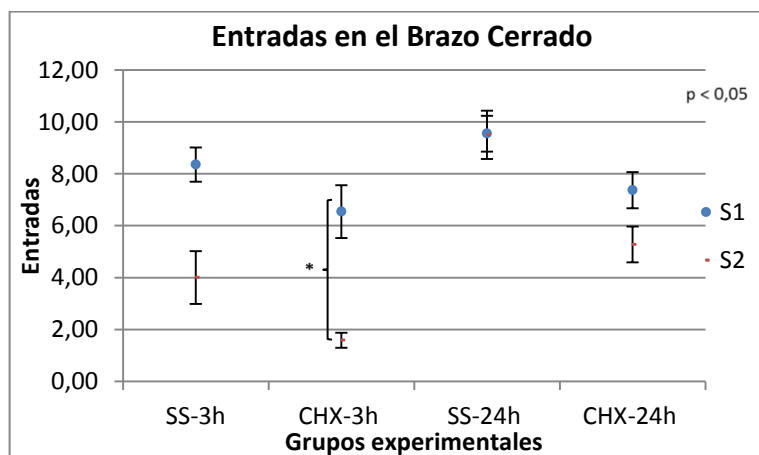


Figura 15. Número de las entradas de las ratas al brazo cerrado del laberinto.

El porcentaje de entradas al brazo abierto (%EBA) permite medir la actividad locomotora del animal (*Escarabajal et al., 2003*), en la **Figura 16** se puede observar que el %EBA disminuyó significativamente para todos los grupos experimentales en la S2. Al comparar la S2 de todos los grupos, se observa que entre CHX3-h, SS-24h y CHX-24h no hay diferencias significativas, y SS-3h es significativamente diferente a los grupos cuya diferencia entre S1 y S2 es 24h (SS-24h y CHX-24h).

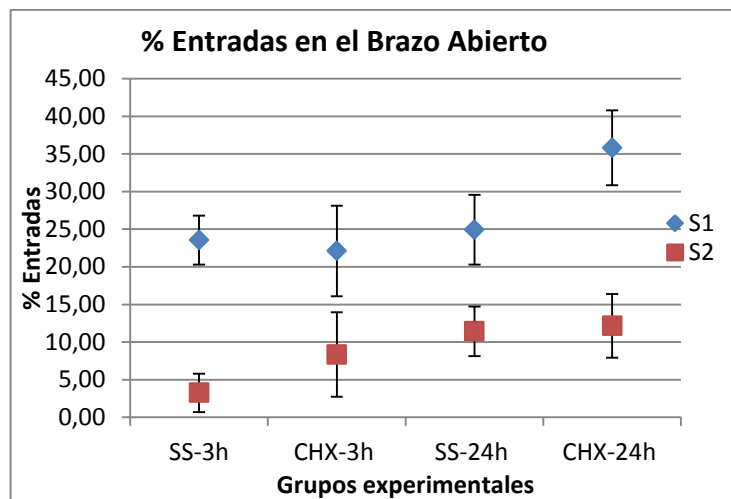


Figura 16. Porcentaje de entradas de las ratas al brazo abierto del laberinto.

Las diferencias en las **Figura 11, Figura 12, Figura 13, Figura 14, Figura 15 y Figura 16** para la S2 entre los grupos de 24h y 3h se podrían deber al deterioro de la memoria largo plazo en los grupos 24h, debido a que para que ocurra un aprendizaje se desarrolla una cascada de eventos moleculares, esta se produce durante su período de consolidación de la fase inicial de almacenamiento de la memoria que es lábil y se puede alterar fácilmente (Bailey, Bartsch, & Kandel, 1996).

La exploración de un nuevo lugar, como ocurre en la S1 se entiende como un proceso de toma de decisiones porque el animal debe tomar una decisión sobre qué dirección tomar en cada movimiento que hace, lo que genera un patrón de exploración (Tejada, Bosco, Morato, & Roque, 2010). Al exponer los animales por segunda vez al LCE, la actividad locomotora disminuye y a su vez la exploración del laberinto por lo que la disminución del número de cruzamientos en el laberinto sugiere una habituación por aprendizaje de los animales (Conde, Costa, & Tomaz, 1999). La habituación en el comportamiento exploratorio suele ocurrir al exponer al animal al mismo entorno repetidas veces (Calzavara et al., 2005).

Por otra parte, la habituación de la actividad exploratoria en el LCE indica que en el comportamiento de los animales expuestos al LCE estuvo presente un fenómeno conocido como la OTT (Calzavara et al., 2005). El fenómeno de la OTT depende del

aprendizaje aversivo en la primera experiencia en el laberinto y también encuentra asociado a un cambio cualitativo en el estado emocional de los animales (*Albrechet-Souza, Borelli, & Brandão, 2008*). La OTT puede deberse a la adquisición de una respuesta fóbica a los brazos abiertos durante la primera experiencia, en ausencia de benzodiazepinas ansiolíticas en la segunda experiencia, que puede estar de acuerdo con la falta de efecto de estas drogas en la fobia (*Calzavara et al., 2005*).

Los resultados del comportamiento no muestran cambios significativamente diferentes entre los grupos tratados con CHX y SS. Por esta razón, se deduce que la administración vía intraperitoneal de 3mg/kg de cicloheximida a ratas machos Wistar, no muestra un efecto amnésico o un deterioro significativo de la memoria emocional debido a la exposición en el laberinto.

6.2 RESULTADOS ANÁLISIS PROTEÓMICO.

Las imágenes digitales de los geles (**Anexo C**), se analizaron por medio en el programa PDQuest 8.0.1 de Bio-Rad. Para el análisis se crearon dos experimentos o match sets: uno para las imágenes de los hipocampos derechos (HD) y otro para los hipocampos izquierdos (HI). Esto con el objetivo de evaluar no sólo el efecto de los tratamientos, sino también si existía una lateralidad o asimetría de la expresión de proteínas del hipocampo dorsal (**Tabla 4**).

Tabla 4. Grupos experimentales utilizados en el programa PDQuest para realizar el análisis proteómico de cada hipocampo.

Match set	HD				HI			
SS-3h	R7-0	R7-1	R7-2	R7-3	R7-1	R7-2	R7-3	R7-5
CHX-3h	R8-0	R8-1	R8-2	R8-3	R8-1	R8-2	R8-3	
SS-24h	R6-2	R6-3	R6-4	R6-5	R6-1	R6-2	R6-3	R6-4
CHX-24h	R5-1	R5-2	R5-4	R5-5	R5-2	R5-3	R5-4	

6.1.1 Análisis de proteínas en el hipocampo dorsal derecho (HD). Por medio del match set creado para el análisis de los HD, se determinó la cantidad de manchas comunes en cada tratamiento, y se obtuvo un gel master compuesto por 968 proteínas que constituyen el proteoma general del HD (**Tabla 5**) (**Anexo C**). Se realizaron las comparaciones entre los grupos experimentales para observar diferencias en la expresión y regulación de las proteínas, teniendo en cuenta el tratamiento y el intervalo de tiempo entre sesiones en el LCE.

Tabla 5. Experimentos creados en el programa PDQuest para realizar el análisis proteómico.

TTO Tiempo (h)	SS	CHX
3	X	X
24	X	X

La identificación de las proteínas encontradas de acuerdo a su masa y punto isoeléctrico se realizó comparando esta información con la base de datos de ExPASy.

6.1.1.1 Comparaciones entre SS-3h y CHX-3h. El grupo SS-3h expresó 758 proteínas mientras que el grupo CHX-3h expresó 626 proteínas. Esta diferencia en el conteo de proteínas, pudo darse como una respuesta del organismo frente a la presencia de cicloheximida.

Así que, teniendo en cuenta los resultados de comportamiento donde se observó que la CHX no generó un efecto amnésico en los animales, es decir, que ambos grupos aprendieron y recordaron la experiencia en el laberinto. Se realizó la intercepción de las proteínas presentes en ambos grupo experimentales obteniendo como resultado que 547 proteínas (**Figura 17**).

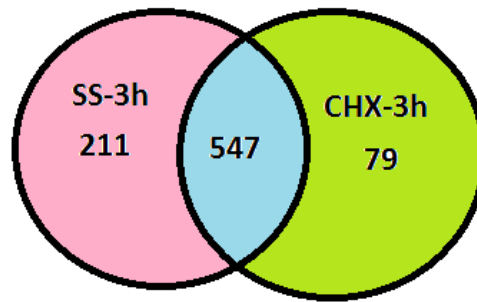


Figura 17. Cantidad de proteínas presentes en SS-3h y CHX-3h.

A partir de las 547 proteínas presentes en los dos grupos, se identificaron proteínas que intervienen en la sinapsis, el metabolismo celular, la señalización, el crecimiento neuronal, el transporte, la transcripción, la mitosis, el procesamiento del ARNm, entre otros, como se observa en la **Tabla 6 (Anexo C, Tabla 1)**.

Tabla 6. Proteínas presentes los grupos SS-3h y CHX-3h.

Nombre	FUNCION
Bicaudal D homolog 2	Transcripción.
F-actin-capping protein subunit alpha-2	Sinapsis.
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Degradación y metabolismo de lípidos.
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	Procesamiento de ARNm
AH receptor-interacting protein (AIP)	Señalización celular.
Protein Red	Expresión de antígenos.
Limbic system-associated membrane protein precursor	Adhesión celular.
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Biosíntesis de aminoácidos.
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	Ciclo celular, división celular, mitosis.
Triosephosphate isomerase	Gluconeogénesis, glicolisis, ruta de las

	pentosas.
Vesicular glutamate transporter 1	Transporte de iones, neurotransmisores, sodio y simporte.
Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1	Sinapsis y regulación de la traducción.
Oligophrenin-1	Endocitosis y exocitosis.
Dual specificity protein phosphatase 4	Transducción de la señal mitogénica
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	Ciclo celular, diferenciación, reparación del ADN.
Interleukin-1 receptor accessory protein precursor	Señalización celular.
Mitogen-activated protein kinase 4.	Ciclo celular.
Leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 1 precursor	Sinapsis.
Peroxiredoxin-1	Señalización celular y mitosis.
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase R	Señalización, crecimiento celular, diferenciación, ciclo mitótico, y la transformación oncogénica
Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1	Señalización celular y transmisión sináptica inhibitoria.
Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2	Transcripción.
SHC-transforming protein 3	Señalización celular.
Synaptotagmin-1	Sinapsis.
Kelch-like protein 24	Señalización, transcripción y tráfico vesicular.
T-complex protein 1 subunit beta	Tráfico vesicular.
Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma	Adhesión celular, quimiotaxis, endocitosis, exocitosis, fagocitosis.
Purkinje cell protein 4	Señalización.
Leucine zipper putative tumor suppressor 3	Ciclo celular.

SAP domain-containing ribonucleoprotein	Transcripción, regulación de la transcripción, transporte.
Dihydropyrimidinase-related protein 4	Orientación del axón, crecimiento neuronal y migración celular.
WD repeat-containing protein 6	Ciclo celular.
Glutamate decarboxylase	Biosíntesis de neurotransmisores.
Neurogranin	Sinapsis y aprendizaje espacial.
E3 ubiquitin-protein ligase	Exocitosis.
LIM and SH3 domain protein 1	Transporte de iones.
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	Transporte de aminoácidos, iones y simporte.
Glutamate receptor 2	Transporte de iones.
Pannexin-2	Transporte de iones.
cGMP-gated cation channel alpha-1	Transporte de iones.
Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	Transporte de iones.
Potassium channel subfamily K member 9	Transporte de iones.
25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase	Metabolismo del Colesterol, lípidos, esteroides, esterol.

De las proteínas encontradas en el análisis, F-actin-capping protein subunit alpha-2, Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1, Leucine-rich repeat y fibronectin type III domain-containing protein 1 precursor y Synaptotagmin-1 intervienen en la sinapsis.

Synaptotagmin-1 (**Figura 18**) es una proteína que se encuentra en la membrana de la vesícula sináptica. Al unirse esta proteína con Ca^{2+} permite la liberación de neurotransmisores (Xu, Pang, Shin, & Südhof, 2009).

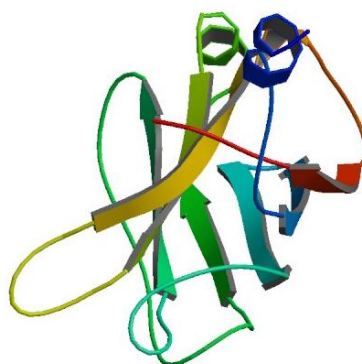


Figura 18. Estructura tridimensional de la proteína Synaptotagmin-1 basado de DOI:[10.2210/pdb1rsy/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1rsy/pdb). Tomado de RSCB PROTEIN DATA BANK.

También se realizó un análisis para averiguar cuales proteínas se expresaban diferencialmente utilizando en el programa PDQuest 8.0.1 (Bio Rad), una herramienta que utiliza la prueba t para encontrar diferencias significativas entre los grupos SS-3h y CHX-3h. Se identificaron 3 proteínas que intervienen en la señalización, transporte, transcripción, diferenciación celular y sinapsis (**Tabla 7**) (**Anexo C, Tabla 2**).

Tabla 7. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y CHX-3h.

Nombre	Función
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2	Señalización, diferenciación y sinapsis.
Nucleoside diphosphate kinase A	Diferenciación, endocitosis, neurogénesis y el metabolismo de nucleótidos.
SAP domain-containing ribonucleoprotein	Transcripción, regulación de la transcripción, transporte.

6.1.1.2 Comparaciones entre SS-24h y CHX-24h. El grupo SS-24h expresó 763 proteínas mientras que el grupo CHX-24h expresó 657 proteínas. Esta diferencia en el conteo de proteínas, pudo darse debido al aprendizaje y/o como una respuesta del organismo frente a la presencia de cicloheximida.

Teniendo en cuenta los resultados de comportamiento, se realizó la intercepción de las proteínas presentes en ambos grupo experimentales obteniendo como resultado que 563 proteínas (**Figura 19**).

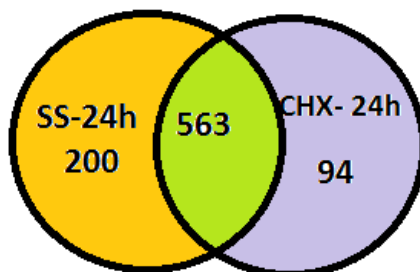


Figura 19. Cantidad de proteínas presentes en SS-24h y CHX-24h.

A partir de las 563 proteínas presentes, se identificaron proteínas que intervienen en el metabolismo celular, la señalización, la sinapsis, el transporte, la neurogénesis, la transcripción, entre otros (**Tabla 8**) (**Anexo C, Tabla 3**). El cambio en el conteo de proteínas con respecto a los grupos SS-3h y CHX-3h puede deberse al dinamismo que presentan las células.

Tabla 8. Proteínas presentes los grupos SS-24h y CHX-24h.

Nombre	Función
F-actin-capping protein subunit alpha-2	Sinapsis.
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Degradación y metabolismo de los lípidos.
Disks large homolog 2	Señalización y sinapsis.
Kelch-like protein 24	Señalización, transcripción y tráfico vesicular.
Caspase-2 precursor	Apoptosis.
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like	Transporte, movimiento centrípeto de lisosomas y endosomas, formación del huso, movimiento del

protein	cromosoma, posicionamiento nuclear.
E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP	Degradación de lípidos.
Calcium-responsive transcription coactivator	Transcripción, regulación de la transcripción.
LIM and SH3 domain protein 1	Transporte de iones.
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	Transporte de aminoácidos, lones, sodio y simporte.
Regulator of G-protein signaling 14	Ciclo celular, división celular y sinapsis.
Rho GTPase-activating protein 17	Exocitosis
Cyclin-dependent kinase 5	Apoptosis, ciclo celular, división celular, neurogénesis.
Interleukin-1 receptor accessory protein precursor	Señalización
Progressive ankylosis protein homolog	Transporte.
Potassium channel subfamily K member 9	Transporte.
Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2	Transporte.
SHC-transforming protein 3	Señalización.
N-acetylaspartate synthetase	Regulación de la lipogénesis.
Kv channel-interacting protein 1	Transporte.
Guanine deaminase	Biosíntesis de nucleótidos.
Phosphatidylinositol 4- phosphate 5-kinase type-1 gamma	Adhesión celular, quimiotaxis, Endocitosis, Exocitosis, fagocitosis.

Proteasome subunit alpha type-1	Inmunidad.
Uroporphyrinogen decarboxylase	Hemobiosíntesis y biosíntesis porfirina.
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta	Diferenciación y neurogénesis.
Glutathione S-transferase Yb-3	Transporte.
Glutamate carboxypeptidase 2	Neurotransmisión.
Transducing-like enhancer protein 4	Transcripción , regulación de la transcripción , señalización
Hemoglobin subunit alpha-1/2	Transporte.
Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	transcripción , regulación de la transcripción , señalización
MYCBP-associated protein	Diferenciación.
25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase	Metabolismo del Colesterol, lípidos, esteroides, esterol.
Leucine zipper protein 1	Transcripción.

De las proteínas encontradas en el análisis, F-actin-capping protein subunit alpha-2, Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1, Disks large homolog 2, Kelch-like protein 24 intervienen en la sinapsis.

Kelch-like protein 24 es una proteína que se encuentra en el hipocampo entre las células piramidales CA1-CA3 y en los gránulos del giro dentado. Su función es reducir las corrientes mediadas por los receptores de cainato en las neuronas del hipocampo, muy probablemente por la modulación de las propiedades del canal (Laezza et al., 2007).

También se realizó un análisis para averiguar cuales proteínas se expresaban diferencialmente utilizando en el programa PDQuest, una herramienta que utiliza la prueba t para encontrar diferencias significativas entre los grupos SS-3h y CHX-3h. Se identificaron 6 proteínas que intervienen en el transporte, transcripción y diferenciación celular (**Tabla 9**) (**Anexo C, Tabla 4**).

Tabla 9. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-24h y CHX-24h.

Nombre	Función
Kv channel-interacting protein 1	Transporte.
Period circadian protein homolog 2	Ritmos biológicos, Transcripción y regulación de la transcripción.
Stress-induced-phosphoprotein 1	Transporte.
Cytoplasmic Aconitate hydratase	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Hemoglobin subunit alpha-1/2	Transporte.
MYCBP-associated protein	Diferenciación.

6.1.1.3 Comparaciones entre SS-3h y SS-24h. El grupo SS-3h expresó 758 proteínas mientras que el grupo SS-24h expresó 763 proteínas. Esta mínima diferencia en el conteo de proteínas entre los grupos puede deberse a la regulación de la expresión de las proteínas debido al aprendizaje, por esta razón se realizó un análisis de la intercepción de las proteínas presentes en ambos grupo experimentales obteniendo como resultado que 607 proteínas (**Figura 20**).

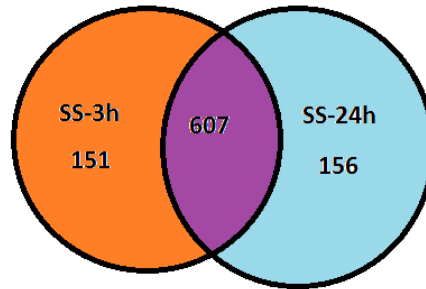


Figura 20. Cantidad de proteínas presentes en SS-3h y SS-24h.

Teniendo en cuenta lo anterior, se encontró que 107 proteínas aumentaron su expresión en el grupo SS-24h con respecto al grupo SS-3h. Se pudieron identificar 39 proteínas que cumplen funciones de transcripción, transporte, crecimiento celular, metabolismo, sinapsis, neurotransmisión, ciclo celular, entre otras (**Tabla 10**) (**Anexo C, Tabla 4**).

Tabla 10. Proteínas aumentaron su expresión en el grupo SS-24h con respecto al grupo SS-3h.

Nombre	Función
Thioredoxin	Transcripción, Regulación de la transcripción y transporte.
Kv channel-interacting protein 2	Transporte.
Kv channel-interacting protein 1	Transporte.
Lactoyl glutathione lyase	Regulación del crecimiento celular y ensamblaje de microtúbulos.
Proteasome subunit alpha type-3	Inmunidad.
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	Endocitosis.
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Degradación y metabolismo de los lípidos.
Protein NDRG4	Degradación y metabolismo de los lípidos.
Protein Red	Expresión de antígenos.
Neuronal pentraxin-1 precursor	Sinapsis.

E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP	Degradación de lípidos.
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	Biosíntesis de péptidos.
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Biosíntesis de aminoácidos.
LIM and SH3 domain protein 1	Transporte de iones.
Phosphatase and actin regulator 1	Formación de túbulos.
Cytoplasmic Aconitate hydratase	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
Mothers against decapentaplegic homolog 3	Transcripción, Regulación de la transcripción
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta	Diferenciación y neurogénesis.
Glutathione S-transferase Yb-3	Transporte.
Transgelin-3	Regulación de la transcripción
Contactin-4	Adhesión celular.
Triosephosphate isomerase	La gluconeogénesis, glucólisis y ruta de las pentosas.
Vesicular glutamate transporter 1	Transporte de iones, neurotransmisores, sodio y simporte.
Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	Esteroidogénesis
Glutamate carboxypeptidase 2	Neurotransmisión.
Rho GTPase-activating protein 17	Exocitosis
Transketolase	Ruta de las pentosas.
Dynamin-like 120 kDa protein	Apoptosis.
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Neurotransmisión.
Cyclin-dependent kinase 5	Apoptosis, ciclo celular, división celular, neurogénesis.
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	Ciclo celular, diferenciación celular, reparación del ADN.
LIM/homeobox protein Lhx5	Transcripción, Regulación de la transcripción
Nuclear receptor subfamily 4 group A	Transcripción, Regulación de la

member 3	transcripción
Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1	Señalización celular y transmisión sináptica inhibitoria.
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Inmunidad.
V-type proton ATPase subunit E 1	Transporte.
Profilin-1	Señalización.
Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3	Locomoción celular y cambios en la forma celular
Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	Biosíntesis de piridoxina.

De las proteínas encontradas en el análisis, F-actin-capping protein subunit alpha-2, Cytoplasmic polyadenylation Neuronal pentraxin-1 precursor, Vesicular glutamate transporter 1, Glutamate carboxypeptidase 2 y Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 intervienen en la sinapsis y neurotransmisión.

Vesicular glutamate transporter 1 es una proteína que se encuentra en membrana de la vesícula sináptica. Esta proteína regula la captación de glutamato en vesículas sinápticas en las terminales nerviosas presinápticas de células neuronales excitables (Herzog et al., 2001).

Por otra parte, se encontró que 56 proteínas que disminuyeron su expresión en el grupo SS-24h con respecto al grupo SS-3h. Se pudieron identificar 17 proteínas que cumplen funciones de neurogénesis, sinapsis, transporte, señalización, metabolismo, neurotransmisión, entre otros como se observa en la **Tabla 11 (Anexo C, Tabla 5)**.

Tabla 11. Proteínas disminuyeron su expresión en el grupo SS-24h con respecto al grupo SS-3h.

Nombre	Función
Neuronal membrane glycoprotein M6-a	Neurogénesis.

F-actin-capping protein subunit alpha-2	Sinapsis.
H(+)/Cl(-) exchange transporter 3	Antiporte, transporte.
Adaptin ear-binding coat-associated protein 1	Endocitosis, transporte.
Kelch-like protein 24	Señalización, transcripción, sinapsis y tráfico vesicular.
T-complex protein 1 subunit beta	Tráfico vesicular.
Caspase-2 precursor	Apoptosis.
Dihydropyrimidinase-related protein 4	Orientación del axón, crecimiento neuronal y migración celular.
Glutamate decarboxylase 2	Biosíntesis de neurotransmisores.
Polyubiquitin-B precursor	Degradación de las proteínas, la reparación del ADN, la regulación del ciclo celular, modificación quinasa, la endocitosis y la señalización.
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial precursor	Metabolismo de aminoácidos.
cGMP-gated cation channel alpha-1	Transporte de iones.
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Neurotransmisión.
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	Diferenciación.
Proto-oncogene Mas	Señalización.
Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	Transcripción y metabolismo de ácidos grasos.
N-acetylaspartate synthetase	Regulación de la lipogénesis.

De las proteínas encontradas en el análisis, F-actin-capping protein subunit alpha-2, Kelch-like protein 24, Glutamate decarboxylase 2 y Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 intervienen en la sinapsis y neurotransmisión.

Glutamate decarboxylase 2 (**Figura 20**) es una proteína que se encuentra la membrana celular pre-sináptica, y cataliza la producción de GABA. El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un inhibidor de la neurotransmisión muy ampliamente conocido y se encuentra en el cerebro de los vertebrados. GABA también cumple en otros órganos, incluyendo el páncreas (Erlander, Tillakaratne, Feldblum, Patel, & Tobin, 1991).

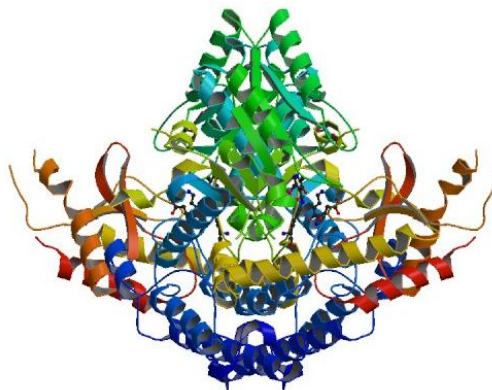


Figura 21. Estructura tridimensional de la proteína Glutamate decarboxylase 2 basada en:

DOI:[10.2210/pdb2okk/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb2okk/pdb). Tomado de RCSB PROTEIN DATA BANK.

Los resultados obtenidos sobre la regulación de las proteínas concuerdan con la idea anteriormente expuesta sobre que el mínimo cambio en el conteo de proteínas entre los grupos SS-3h y SS-24h, se puede deber a la dinámica celular el cambio ya que el conteo proteínas no varía, pero al identificar las proteínas se observan cambios en la presencia y/o ausencia de las proteínas y en la intensidad con que se expresa.

También se realizó un análisis para averiguar cuales proteínas se expresaban diferencialmente utilizando la prueba t del programa PDQuest 8.0.1 para encontrar diferencias significativas entre los grupos SS-3h y CHX-3h. Se identificaron 6 proteínas que intervienen en el transporte, transcripción y diferenciación celular (**Tabla 12**) (**Anexo C, Tabla 6**).

Tabla 12. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y SS-24h.

Nombre	Función.
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	Limpieza
Kv channel-interacting protein 1	Transporte.
Proteasome subunit alpha type-3	Inmunidad.
ADP-ribosylation factor-like protein 2	Ciclo celular.
L-lactate dehydrogenase B chain	Glicolisis.
Nucleoside diphosphate kinase A	Diferenciación, endocitosis, neurogénesis y el metabolismo de nucleótidos
KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2	Transcripción, regulación de la transcripción.
Slit homolog 1 protein	Diferenciación, neurogénesis.
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	Apoptosis, transporte.
Glutathione S-transferase Yb-3	Transporte.
GTP-binding nuclear protein Ran	Ciclo celular, la división celular, la mitosis y Transporte
MYCBP-associated protein	Diferenciación.
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase R	Señalización celular, crecimiento celular, la diferenciación, ciclo mitótico, y la transformación oncogénica
25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase	Metabolismo del Colesterol, lípidos, esteroides, esterol.

6.1.1.4 Comparaciones entre CHX-3h y CHX-24h. El grupo CHX-3h expresó 626 proteínas mientras que el grupo CHX-24h expresó 657 proteínas. Esta diferencia en el

conteo de proteínas entre los grupos puede deberse a la regulación de la expresión de las proteínas debido al aprendizaje y/o como una respuesta del organismo frente a la presencia por más tiempo de cicloheximida. Debido a este resultado se realizó un análisis de la intersección de las proteínas presentes en ambos grupo experimentales obteniendo como resultado que 483 proteínas eran expresadas y fueron comunes a ambos tratamientos (**Figura 21**).

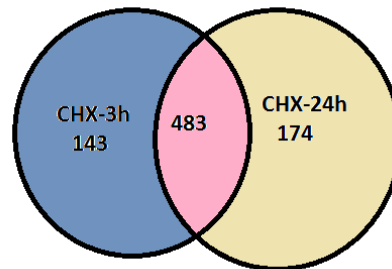


Figura 22. Cantidad de proteínas presentes en CHX-3h y CHX-24h.

El análisis mostró que 89 proteínas aumentaron su expresión en el grupo CHX-24h con respecto al grupo CHX-3h. Se identificaron 30 proteínas que cumplen funciones de inmunidad, transporte, señalización, sinapsis, transcripción, endocitosis, metabolismo, biosíntesis de proteínas, entre otros como se observa en la **Tabla 13 (Anexo C, Tabla 7)**.

Tabla 13. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo CHX-24h con a CHX-3h.

NOMBRE	FUNCIÓN
Syntaxin-1B	Transporte.
Proteasome subunit alpha type-3	Inmunidad.
Synaptic vesicle 2-related protein	Transporte.
Disks large homolog 2	Señalización y sinapsis.
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1	Viabilidad celular.
SAP domain-containing ribonucleoprotein	Transcripción, regulación de la transcripción, transporte.
Histidine triad nucleotide-binding	Apoptosis, transcripción, regulación

protein 1	de la transcripción.
E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP	Degradación de lípidos.
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	Biosíntesis de péptidos.
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Biosíntesis de aminoácidos.
Neurogranin	Sinapsis y aprendizaje espacial.
Dihydropyrimidinase-related protein 5	Diferenciación.
Calcium-responsive transcription coactivator	Transcripción, regulación de la transcripción.
LIM and SH3 domain protein 1	transporte
Eukaryotic translation initiation factor 4H	Biosíntesis de proteínas.
Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	Endocitosis.
Cytoplasmic aconitate hydratase	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
Mothers against decapentaplegic homolog 3	Transcripción, Regulación de la transcripción.
Acyl-protein thioesterase 2	Metabolismo de los ácidos grasos y de lípidos.
Glutathione S-transferase Yb-3	Transporte.
Triosephosphate isomerase	Gluconeogénesis, glicolisis, ruta de las pentosas.
Vesicular glutamate transporter 1	Transporte de iones, neurotransmisores, sodio y simporte.
Glutathione S-transferase P	Metabolismo.
Glutamate receptor 2	Transporte.
Rho GTPase-activating protein 17	Exocitosis
Pannexin-2	Transporte de iones.
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	transporte
cGMP-gated cation channel alpha-1	Transporte de iones.

25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase	Metabolismo del Colesterol, lípidos, esteroides, esterol.
---	---

De las proteínas encontradas en el análisis, Disks large homolog 2 y Neurogranin intervienen en la sinapsis y el aprendizaje espacial.

Neurogranin es una proteína que se encuentra en el citoplasma y en las espinas dendríticas. Regula la afinidad de la calmodulina con el calcio y también tiene un papel importante en la plasticidad sináptica y el aprendizaje espacial (Gaertner, Putkey, & Waxham, 2004).

Por otra parte, se encontró que 48 proteínas disminuyeron su expresión en el grupo CHX-24h con respecto al grupo CHX-3h. Se pudieron identificar 16 proteínas que cumplen funciones de transporte, biosíntesis de nucleótidos, metabolismo de lípidos, señalización, regulación de la traducción, procesamiento del ARNm, entre otros (**Tabla 14**) (**Anexo C, Tabla 8**).

Tabla 14. Proteínas aumentaron su expresión en el grupo CHX-3h con a CHX-24h.

Nombre	Función
Syntaxin-1A	Exocitosis, transporte de neurotransmisores y transporte.
Syntaxin-1B	Transporte.
Guanine deaminase	Biosíntesis de nucleótidos.
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Degradación y metabolismo de los lípidos.
Growth factor receptor-bound protein 2	Señalización celular.
AH receptor-interacting protein (AIP)	Degradación y metabolismo de los lípidos.
Serum albumin	Señalización celular.
WD repeat-containing protein 1	Ciclo celular, transducción de señales, apoptosis, y regulación de genes.

Septin-11	Sinapsis y regulación de la traducción.
Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1	Regulación de la traducción y procesamiento del m-RNA.
Guanine deaminase	Regulación de la traducción y procesamiento del m-RNA.
25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase	Metabolismo del Colesterol, lípidos, esteroides, esterol.
Hypoxia-inducible factor 3-alpha	Transcripción, Regulación de la transcripción.
Megakaryocyte-associated tyrosine-protein kinase	Señalización celular.
N-acetylaspartate synthetase	Regulación de la lipogénesis.
Leukocyte surface antigen CD47 precursor	Adhesión celular.

De las proteínas encontradas en el análisis, el septin-11 desempeña un papel en potencial citocinesis. También interviene en la citoarquitectura de las neuronas, incluyendo la arborización dendrítica y espinas dendríticas, y en la conectividad sináptica GABAérgica (Li, Serwanski, Miralles, Nagata, & De Blas, 2009).

También se realizó un análisis para averiguar cuales proteínas se expresaban diferencialmente utilizando en el programa PDQuest una herramienta que utiliza la prueba t para encontrar diferencias significativas entre los grupos CHX-3h y CHX-24h. Se identificaron 10 proteínas que intervienen en el transporte, transcripción, diferenciación celular, inmunidad, adhesión celular, entre otros (**Tabla 15**) (**Anexo C, Tabla 9**).

Tabla 15. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos CHX-3h y CHX-24h.

Nombre	Función
Thioredoxin	Transcripción, Regulación de la transcripción y transporte.
Proteasome subunit	Inmunidad.

alpha type-3	
Disks large homolog 1	Adhesión celular, la transducción de señales, la proliferación celular, la sinaptogénesis y activación de linfocitos.
Cytoplasmic aconitate hydratase	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Mothers against decapentaplegic homolog 3	Transcripción, Regulación de la transcripción
Transducin-like enhancer protein 3	Transcripción, Regulación de la transcripción y la vía de señalización.
Glutamate receptor ionotropic	Transporte.
Vesicular glutamate transporter 1	Transporte de iones, neurotransmisores, sodio y simporte.
Protein-L-isoaspartate	Reparación y degradación de proteínas.
Leucine zipper putative tumor suppressor 1	Regulación del crecimiento celular.

6.2.1 Análisis de proteínas en el hipocampo dorsal izquierdo (HI). Por medio del match set creado para el análisis de los HI, se determinó la cantidad de manchas de proteínas comunes en cada tratamiento y se obtuvo un gel master compuesto por 1202 proteínas que constituyen el proteoma general del HI (**Anexo C**). Se realizaron las mismas comparaciones entre los grupos experimentales utilizadas en el análisis del hipocampo derecho.

6.2.1.1 Comparaciones entre SS-3h y CHX-3h. El grupo SS-3h expresó 824 proteínas mientras que el grupo CHX-3h expresó 748 proteínas. Esta diferencia en la cantidad de proteínas, pudo ser debido a una respuesta por parte del organismo en la presencia de cicloheximida.

Se realizó un análisis de la intercepción de las proteínas presentes en ambos grupo experimentales obteniendo como resultado que 565 proteínas (**Figura 23**).

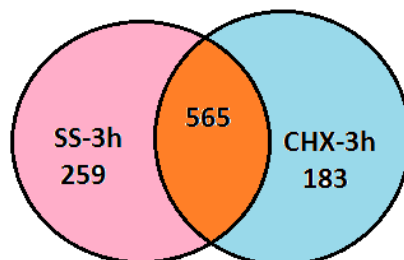


Figura 23. Cantidad de proteínas presentes en SS-3h y CHX-3h.

De las 565 proteínas presentes en ambos grupos se identificaron 40 proteínas que intervienen en la degradación, metabolismo, ritmos biológicos, transcripción, regulación de la transcripción, ciclo celular, homeostasis energética, sinapsis (**Tabla 16**) (**Anexo 3, Tabla 10**).

Tabla 16. Proteínas presentes en SS-3h y CHX-3h.

Nombre	Función
Thioredoxin	Transcripción, Regulación de la transcripción y transporte.
Creatine kinase B-type	Homeóstasis energética.
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit	Señalización.
Peroxiredoxin-6	Degradación y metabolismo de lípidos.
Rho-associated protein kinase	Citocinesis, contracción del músculo liso, la formación de fibras de estrés de actina y adhesiones focales, y la activación del elemento de respuesta sérica c-fos
Protein unc-13 homolog B	Exocitosis y sinapsis.
Disrupted in schizophrenia 1 homolog	Neurogénesis, sinapsis y señalización

Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2	Transporte de iones.
Disks large homolog 2	Señalización y sinapsis.
Growth factor receptor-bound protein 2	Señalización celular.
Nucleoside diphosphate kinase A	Diferenciación, endocitosis, neurogénesis y el metabolismo de nucleótidos
Golgi phosphoprotein 3	transporte de proteínas, señalización, migración celular y biosíntesis de lípidos
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	Biosíntesis de lípidos.
DNA repair protein XRCC1	Reparación del ADN.
Leucine zipper putative tumor suppressor 3	Ciclo celular.
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Biosíntesis de aminoácidos.
Transaldolase	Ruta de las pentosas
ADP-ribosylation factor-like protein 2	Ciclo celular.
McKusick-Kaufman syndrome	Biosíntesis de lípidos.
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta	Diferenciación y neurogénesis.
Cytosol aminopeptidase	Síntesis de proteínas.
Vesicular glutamate transporter 1	Transporte de iones, neurotransmisores, sodio y simporte.
GTP-binding nuclear protein Ran	Ciclo celular, la división celular, la mitosis, el transporte de proteínas y Transporte
Proto-oncogene tyrosine-	La adhesión celular, el ciclo celular e inmunidad

protein kinase	
SNF-related serine/threonine-protein kinase	Proliferación celular, diferenciación y apoptosis.
Reticulon-4 receptor-like 2 precursor	Regeneración axonal y plasticidad.
Adenylate kinase isoenzyme 1	Homeostasis energética y metabolismo de nucleótidos.
Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3	locomoción celular y cambios en la forma celular

De las proteínas encontradas en el análisis, Protein unc-13 homolog B, Disrupted in schizophrenia 1 homolog, Disks large homolog 2 y Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta intervienen en la sinapsis y neurogénesis.

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta (**Figura 24**) es una proteína que se encuentra en el citoplasma y funciona de forma autónoma después de la unión Ca^{2+} /calmodulina y la autofosforilación, y se encuentra involucrada en la columna vertebral y la formación de sinapsis dendríticas, la plasticidad neuronal. En las neuronas, tiene un papel estructural esencial en la reorganización del citoesqueleto de actina durante la plasticidad por la unión y la agrupación de los filamentos de actina independiente de quinasa. Esta función estructural es necesaria para la correcta orientación de CaMK2A, que actúa sobre el receptor de NMDA para promover la espina dendrítica, la formación de sinapsis y mantener la plasticidad sináptica que permite la potenciación a largo plazo (LTP) y el aprendizaje dependiente del hipocampo. En el desarrollo de las neuronas del hipocampo, promueve la arborización del árbol dendrítico y en neuronas maduras, promueve la remodelación dendrítica (Fink et al., 2003).

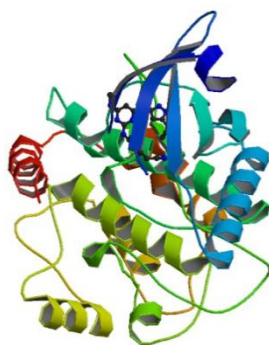


Figura 24. Estructura tridimensional de la proteína Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta basada en: DOI:[10.2210/pdb3bhh/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3bhh/pdb). Tomado de RSCB PROTEIN BANK.

También se realizó un análisis para averiguar cuales proteínas se expresaban diferencialmente utilizando en el programa PDQuest una herramienta que utiliza la prueba t para encontrar diferencias significativas entre los grupos CHX-3h y CHX-24h. Se identificaron 10 proteínas que intervienen en el transporte, transcripción, diferenciación celular, inmunidad, adhesión celular, entre otros (**Tabla 17**) (**Anexo C, Tabla 11**).

Tabla 17. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y CHX-3h.

Nombre	FUNCIÓN
Synaptosomal-associated protein 29	La autofagia, el transporte de proteínas y transporte
Protein unc-13 homolog B	Exocitosis y sinapsis.
cGMP-gated cation channel alpha-1	Transporte de iones.
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	Ciclo celular, diferenciación y reparación del ADN.

6.2.1.2 Comparaciones entre SS-24h y CHX-24h. El grupo SS-24h expresó 845 proteínas mientras que el grupo CHX-24h expresó 894 proteínas. La diferencia en el conteo de proteínas, pudo ocurrir debido al aprendizaje y/o como una respuesta del organismo frente a la presencia de cicloheximida.

Teniendo en cuenta los resultados de comportamiento se realizó la intercepción de las proteínas presentes en ambos grupo experimentales obteniendo como resultado que 700 proteínas (**Figura 25**).

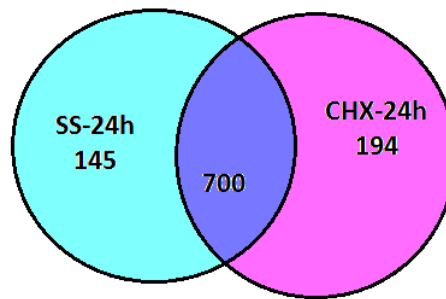


Figura 25. Cantidad de proteínas presentes en SS-24h y CHX-24h.

A partir de las 700 proteínas presentes se identificaron proteínas que intervienen en el transporte, sinapsis, metabolismo, neurogénesis, neurotransmisión, ciclo celular, entre otros (**Tabla 18**) (**Anexo C, Tabla 12**). El cambio en el conteo de proteínas con respecto a los grupos SS-3h y CHX-3h puede deberse a la dinámica de las células.

Tabla 18. Proteínas presentes en SS-24h y CHX-24h.

Nombre	Función
ATP synthase subunit delta, mitochondrial precursor	Transporte de iones y síntesis de ATP.
Lactoylglutathione lyase	Regulación del crecimiento celular y ensamblaje de microtúbulos.
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	Sinapsis.
Syntaxin-1B	Transporte.
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Degradación y metabolismo de los lípidos.
Disks large homolog 1	Adhesión celular, la transducción de señales, la

	proliferación celular, la sinaptogénesis y activación de linfocitos.
UMP-CMP kinase	Biosíntesis de bipyrimidas.
Cell surface glycoprotein MUC18 precursor	adhesión celular, y en la cohesión de la monocapa endotelial
Golgi phosphoprotein 3	Transporte de proteínas, señalización, migración celular y biosíntesis de lípidos.
Acetoacetyl-CoA synthetase	Metabolismo de los ácidos grasos, el metabolismo de lípidos
Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase	Apoptosis, transcripción, regulación de la transcripción.
Limbic system-associated membrane protein precursor	Adhesión celular.
Neuronal pentraxin-1 precursor	Sinapsis.
Stress-induced-phosphoprotein 1	Transporte.
Proteasome subunit beta type-4 precursor	Síntesis de péptidos.
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
Transaldolase	ruta de las pentosas
Neuritin precursor	Crecimiento de neuritas.
Zinc finger protein neuro-d4	Neurogénesis, transcripción, regulación de la transcripción.
Fragile X mental retardation protein 1 homolog	Transporte y el transporte del ARNm
Glutathione S-transferase Yb-3	Transporte.
Acetyl-CoA acetyltransferase	Metabolismo de lípidos y transcripción.
Apoptosis regulator Bcl-2	Apoptosis.
Transketolase	Ruta de las pentosas.

Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Neurotransmisión.
Interleukin-1 receptor accessory protein precursor	Señalización celular.
Proteasome subunit beta type-7 precursor	Transcripción.
V-type proton ATPase subunit E 1	Transporte.
Periaxin	Mantenimiento de mielina.

De las proteínas encontradas en el análisis, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1, Neuronal pentraxin-1 precursor y Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 intervienen en la sinapsis y neurotransmisión.

La proteína Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (**Figura 26**) se encuentra en la membrana celular postsináptica y actúa como inhibidor específico de la CaM quinasa II (CAMK2) (Chang, Mukherji, & Soderling, 2001).

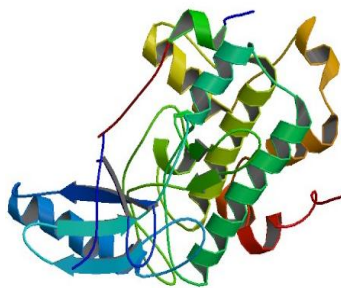


Figura 26. Estructura tridimensional de la proteína Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 basada en: DOI:10.2210/pdb3kl8/pdb. Tomado de RSCB PROTEIN DATA BANK.

También se realizó un análisis para averiguar cuáles proteínas se expresaban diferencialmente utilizando la prueba t en el programa PDQuest para encontrar diferencias significativas entre los grupos SS-24h y CHX-24h. Se identificaron 13 proteínas que intervienen en el transporte, transcripción, diferenciación celular, sinapsis, aprendizaje espacial entre otros (**Tabla 19**) (**Anexo C, Tabla 13**).

Tabla 19. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-24h y CHX-24h.

Nombre	Función
Thioredoxin	Transcripción, Regulación de la transcripción y transporte.
Astrocytic phosphoprotein	Apoptosis, transporte.
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	Sinapsis.
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2	Señalización, diferenciación y sinapsis.
Nuclear receptor coactivator 1	Transcripción, Regulación de la transcripción
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	Transporte, movimiento centrípeto de lisosomas y endosomas, formación del huso, movimiento del cromosoma, posicionamiento nuclear.
Neurogranin	Sinapsis y aprendizaje espacial.
Calcium-responsive transcription coactivator	Transcripción, regulación de la transcripción.
Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-4 precursor	Transporte.
Mothers against decapentaplegic homolog 3	Transcripción, Regulación de la transcripción
Contactin-4	Adhesión celular.
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	Transporte de aminoácidos, Iones, sodio y simporte.
10 kDa heat shock protein	Transcripción.

6.2.1.3 Comparaciones entre SS-3h y SS-24h. El grupo SS-3h expresó 824 proteínas mientras que el grupo SS-24h expresó 845 proteínas. Esta diferencia la cantidad de proteínas entre los grupos puede deberse a la regulación de la expresión de las proteínas debido al aprendizaje, por esta razón se realizó un análisis de la intercepción de las proteínas presentes en ambos grupo experimentales obteniendo como resultado que 615 proteínas (**Figura 27**).

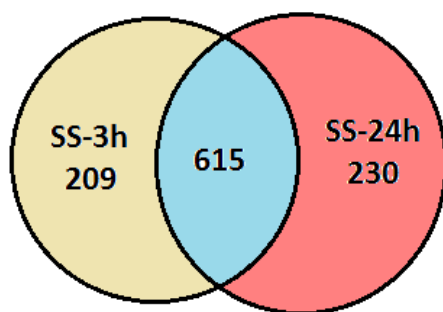


Figura 27. Cantidad de proteínas presentes en SS-3h y SS-24h.

Se encontraron 43 proteínas que aumentaron su expresión en el grupo SS-24h con respecto al grupo SS-3h. Se identificaron 12 proteínas que cumplen funciones de metabolismo, adhesión celular, transporte, transcripción, sinapsis, entre otros (**Tabla 20**) (**Anexo C, Tabla 14**).

Tabla 20. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo SS-24h con respecto a SS-3h.

Nombre	Función
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Degradación y metabolismo de los lípidos
Protein Red	Expresión de antígenos.
Limbic system-associated membrane protein precursor	Adhesión celular.
Neuronal pentraxin-1 precursor	Sinapsis.
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	El transporte de proteínas, translocación y Transporte
Fragile X mental retardation protein 1 homolog	Transporte y el transporte del ARNm
Macrophage migration inhibitory factor	Inmunidad, respuesta inflamatoria.
Apoptosis regulator Bcl-2	Apoptosis.
cGMP-gated cation channel alpha-1	Transporte de iones.
Mineralocorticoid receptor MCR_RAT	Transcripción y regulación de la

	transcripción.
Hydroxyacylglutathione hydrolase	Metabolismo.
Proteasome subunit beta type-7 precursor	Transcripción.

De las proteínas encontradas en el análisis, Neuronal pentraxin-1 se encuentra en las vesículas citoplasmáticas y participa en la mediación de absorción de material sináptico durante la remodelación de sinapsis o en la mediación de la agrupación sináptica de receptores de glutamato AMPA en un subconjunto de las sinapsis excitables (Kirkpatrick, Matzuk, Dodds, & Perin, 2000).

Por otra parte, se encontró que 85 proteínas disminuyeron su expresión en el grupo SS-24h con respecto a SS-3h. Se pudieron identificar 20 proteínas que cumplen funciones de transcripción, regulación de la transcripción, homeostasis energética, transporte, procesamiento del ARNm, señalización, metabolismo, entre otros (**Tabla 21**) (**Anexo C, Tabla 15**).

Tabla 21. Proteínas disminuyeron su expresión en el grupo SS-24h con respecto a SS-3h.

Nombre	Función
Thioredoxin	Transcripción, Regulación de la transcripción y transporte.
Creatine kinase B-type	Homeostasis energética y metabolismo de nucleótidos.
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Degradación y metabolismo de los lípidos.
Protein mago nashi homolog	Regulación de la traducción, transporte, procesamiento del RNAm y transporte del ARNm.
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	Crecimiento celular.
Superoxide dismutase	Protección.

Golgi phosphoprotein 3	Transporte de proteínas, señalización, migración celular y biosíntesis de lípidos.
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	Daños en el ADN, la reparación del ADN.
Lipid phosphate phosphatase-related protein type 1	Transcripción.
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	Transporte, movimiento centrípeto de lisosomas y endosomas, formación del huso, movimiento del cromosoma, posicionamiento nuclear.
Uroporphyrinogen decarboxylase	Hemobiosíntesis y biosíntesis porfirina.
Transaldolase	ruta de las pentosas
Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial precursor	Metabolismo de ácidos carboxílicos.
Phosphatase and actin regulator 1	Formación de túbulos.
Cytoplasmic aconitate hydratase	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
Vesicular glutamate transporter 1	Transporte de iones, neurotransmisores, sodio y simporte.
GTP-binding nuclear protein Ran	Ciclo celular, la división celular, la mitosis y Transporte
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	Transporte de aminoácidos, lones, sodio y simporte.
SNF-related serine/threonine-protein kinase	Proliferación celular, diferenciación y apoptosis.
cGMP-gated cation channel alpha-1	Transporte de iones.
Hemoglobin subunit alpha-1/2	Transporte.

Carbonyl reductase [NADPH] 1	Metabolismo del ácido araquidónico.
Creatine kinase U-type	Homeostasis energética.

De las proteínas encontradas en el análisis Protein mago nashi homolog es una estructura dinámica que consiste de proteínas del núcleo y varios factores nucleares y citoplasmáticos. Esta proteína marca la posición de la unión exón-exón en el ARNm maduro para la maquinaria de expresión de genes y los componentes del núcleo permanecen unidos a los ARNm empalmados a lo largo de todas las etapas del metabolismo del ARNm influyendo así en los procesos de exportación nuclear ARNm, localización subcelular del ARNm, eficiencia en la traducción (Glanzer et al., 2005).

Los resultados en la regulación de las proteínas concuerdan con la idea anteriormente expuesta sobre la variación en la cantidad de proteínas entre los grupos SS-3h y SS-24h, y también con los resultados del hipocampo derecho.

También se realizó un análisis para averiguar cuáles proteínas se expresaban diferencialmente utilizando la prueba t del programa PDQuest para encontrar diferencias significativas entre los grupos SS-3h y SS-24h. Se identificaron 13 proteínas que intervienen en el transporte, transcripción, señalización, sinapsis, entre otros (**Tabla 22**) (**Anexo C, Tabla 16**).

Tabla 22. Proteínas expresadas diferencialmente entre SS-3h y SS-24h.

Nombre	FUNCIÓN
Protein unc-13 homolog B	Exocitosis y Sinapsis.
Protein-tyrosine kinase 2-beta	Inmunidad adaptativa, angiogénesis.
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	Crecimiento celular, adhesión, supervivencia, diferenciación, regulación de la transcripción, metabolismo y reordenamientos del citoesqueleto.

Lipid phosphate phosphatase-related protein type 1	Transcripción.
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	Biosíntesis de péptidos.
Profilin-2	REGULACIÓN DE LA ACTINA.
Adenylyl cyclase-associated protein 1	Localización del ARNm y el establecimiento de la polaridad celular.
Transducin-like enhancer protein 4	Transcripción, regulación de la transcripción, señalización.
cGMP-gated cation channel alpha-1	Transporte de iones.
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	Metabolismo de ácidos grasos.
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	Ciclo celular, diferenciación celular, reparación del ADN.
Creatine kinase U-type, mitochondrial precursor	Homeostasis energética.

6.2.1.4 Comparaciones entre CHX-3h y CHX-24h. El grupo CHX-3h expresó 748 proteínas mientras que el grupo CHX-24h expresó 894 proteínas. Esta diferencia en el conteo de proteínas entre los grupos puede deberse a la regulación de la expresión de las proteínas debido al aprendizaje y/o como una respuesta del organismo frente a la presencia por más tiempo de cicloheximida. Debido a este resultado se realizó un análisis de la intercepción de las proteínas presentes en ambos grupo experimentales obteniendo como resultado que 560 proteínas (**Figura 28**).

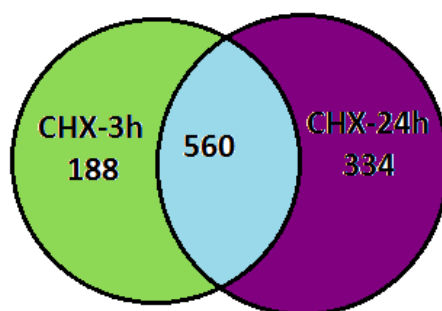


Figura 28. Cantidad de proteínas presentes en CHX-3h y CHX-24h.

Se encontró que 77 proteínas aumentaron su expresión en el grupo CHX-24h con respecto al grupo CHX-3h. Se identificaron 23 proteínas que cumplen funciones de transcripción, homeostasis energética, metabolismo, transporte, señalización, entre otros (**Tabla 23**) (**Anexo C, Tabla 17**).

Tabla 23. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo CHX-24h con respecto a CHX-3h.

Nombre	Función
Thioredoxin	Transcripción, Regulación de la transcripción y transporte.
Lactoylglutathione lyase	Regulación del crecimiento celular y ensamblaje de microtúbulos.
Creatine kinase B-type	Homeostasis energética y metabolismo de nucleótidos.
Disks large homolog 1	Adhesión celular, la transducción de señales, la proliferación celular, la sinaptogénesis y activación de linfocitos.
Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2	Transporte de iones.
Fatty acid-binding protein	Transporte de iones, transporte.
Golgi phosphoprotein 3	Transporte de proteínas, señalización, migración celular y biosíntesis de lípidos.
Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase	Apoptosis, transcripción, regulación de la transcripción.
Vesicular inhibitory amino	Transporte de neurotransmisores, Transporte

acid transporter	
DNA repair protein XRCC1	Reparación del ADN.
Protein Red	Expresión de antígenos.
Ornithine aminotransferase	Biosíntesis de aminoácidos.
Aldehyde dehydrogenase X	Metabolismo de ácidos carboxílicos.
Pyruvate kinase PKM	Glicolisis.
Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 3 precursor	Adhesión celular y neurogénesis.
Acyl-protein thioesterase 2	Metabolismo de los ácidos grasos y de lípidos.
Zinc finger protein neuro-d4	Neurogénesis, transcripción , regulación de la transcripción
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	La adhesión celular, el ciclo celular e inmunidad
Solute carrier family 22 member 5	Transporte de iones y simporte.
Adenylate kinase isoenzyme 1	Homeostasis energética y metabolismo de nucleótidos.
Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	Metabolismo.
Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3	Locomoción celular y cambios en la forma celular.

Por otra parte, se encontró que 49 proteínas disminuyeron su expresión en el grupo SS-24h con respecto al grupo SS-3h. Se identificaron 20 proteínas que cumplen intervienen el ciclo celular, metabolismo, transporte de iones, diferenciación, sinapsis, biosíntesis de neurotransmisores (**Tabla 24**) (**Anexo C, Tabla 18**).

Tabla 24. Proteínas que disminuyeron su expresión en el grupo SS-24h con respecto a SS-3h.

Nombre	Función
Lactoylglutathione lyase	Regulación del crecimiento celular y ensamblaje de microtúbulos.
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Degradación y metabolismo de los lípidos.

Chloride intracellular channel protein	Transporte de iones.
Dihydropyrimidinase-related protein 3	Señalización, neurogénesis y migración celular.
Contactin-5 precursor	Adhesión celular y neurogénesis.
Proteasome subunit beta type-3	Inmunidad.
NT-3 growth factor receptor	Diferenciación y neurogénesis.
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	Proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y el desarrollo celular.
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	Biosíntesis de lípidos.
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2	El transporte de electrones, la cadena respiratoria y Transporte
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1	Viabilidad celular.
Stress-induced-phosphoprotein 1	Transporte.
Dynamin-1	Endocitosis.
Glutamate decarboxylase 2	Biosíntesis de neurotransmisores.
Syntaxin-binding protein 1	Transporte.
Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	Endocitosis.
Acyl-protein thioesterase 2	Metabolismo de los ácidos grasos y de lípidos.
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Transporte.
Dual specificity protein phosphatase 4	Transducción de la señal mitogénica.
CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	Sinapsis.

De las proteínas encontradas en el análisis, CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1 y Glutamate decarboxylase 2 intervienen en la sinapsis y la síntesis de neurotransmisores.

El CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1 es una proteína que suprime los receptores canabinoides CNR1 por medio de una inhibición tónica mediada de los canales de calcio dependientes de voltaje. Esta proteína tiene importantes papeles fisiológicos en la plasticidad sináptica, la analgesia, el apetito, y la neuroprotección (Niehaus et al., 2009)

También se realizó un análisis para averiguar cuales proteínas se expresaban diferencialmente utilizando en el programa PDQest una herramienta que utiliza la prueba t para encontrar diferencias significativas entre los grupos CHX-3h y CHX-24h. Se identificaron 12 proteínas que intervienen en el transporte, transcripción, señalización, sinapsis, entre otros (**Tabla 25**) (**Anexo C, Tabla 18**).

Tabla 25. Proteínas que expresaron diferencialmente entre CHX-3h y CHX-24h.

Nombre	Función
Thioredoxin	Transcripción, Regulación de la transcripción y transporte.
Astrocytic phosphoprotein	Apoptosis, transporte.
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	Sinapsis.
CREB-regulated transcription coactivator 1	Transcripción, Regulación de la transcripción
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	Transporte, movimiento centrípeto de lisosomas y endosomas, formación del huso, movimiento del cromosoma, posicionamiento nuclear, y axonogenesis.
Neurogranin	Sinapsis y aprendizaje espacial.
Calcium-responsive transcription coactivator	Transcripción, regulación de la transcripción.
Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-4 precursor	Transporte.
Mothers against decapentaplegic homolog 3	Transcripción, regulación de la transcripción.
Contactin-4	Adhesión celular.
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	Transporte de aminoácidos, lones, sodio y simporte.
Neuroplastin	Adhesión celular y neurogénesis.

Como se observó en los resultados la regulación de proteínas que intervienen en la transcripción, homeostasis energética, metabolismo, transporte, señalización, apoptosis, ciclo celular, biosíntesis de proteínas, péptidas, neurotransmisoras y nucleótidos es importante para la consolidación de la memoria. Ya que la clasificación funcional de las proteínas reveló que la regulación de estas proteínas es necesaria para mantener la estructura celular y/o metabolismo celular y así tener los componentes necesarios para nuevas sinapsis, lo que podría permitir la retención de nueva información.

Fueron pocas las proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos experimentales. De acuerdo con la identificación utilizando la base de datos de ExPASy, estas proteínas en su mayoría cumplen funciones metabólicas, de transporte y de transcripción en la célula.

La cantidad promedio de proteínas en los hipocampos derecho e izquierdo varía de los grupos experimentales del a ratas Wistar varía, este resultado puede ser atribuido a varios factores: la inyección, la inhibición de síntesis de proteínas, la exposición al laberinto, la adquisición y la consolidación de la información (**Figura 29**).

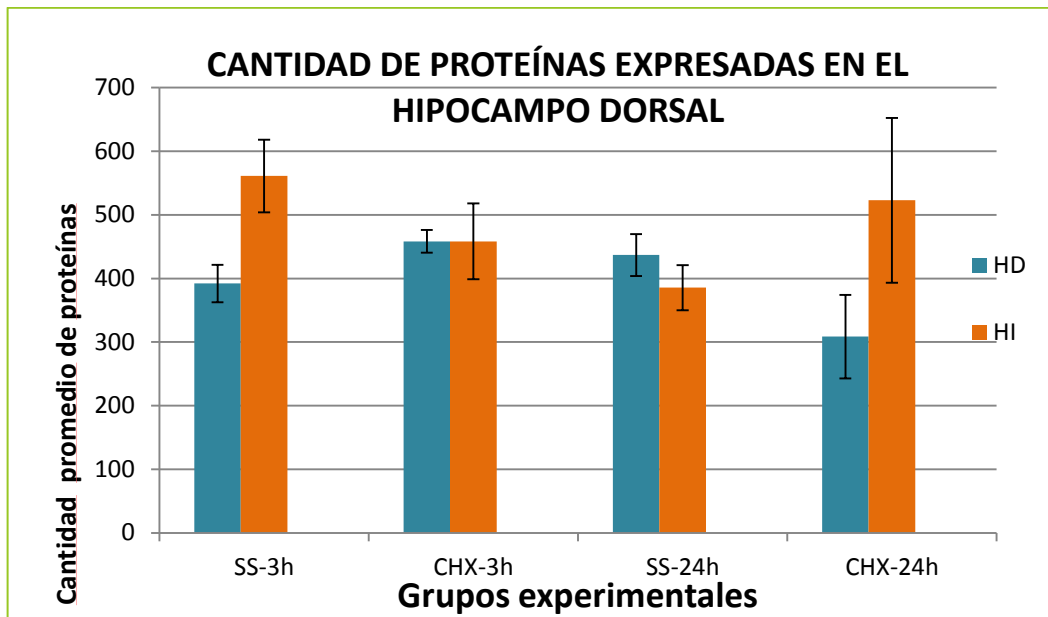


Figura 29. Cantidad promedio de proteínas expresadas en hipocampo derecho e izquierdo.

La mayoría de proteínas expresadas en el hipocampo derecho como en el izquierdo que presuntivamente se identificaron por medio de la base de datos están asociadas a funciones como: transporte, transcripción, metabolismo, sinapsis, neurotransmisión y señalización (**Figura 30**).

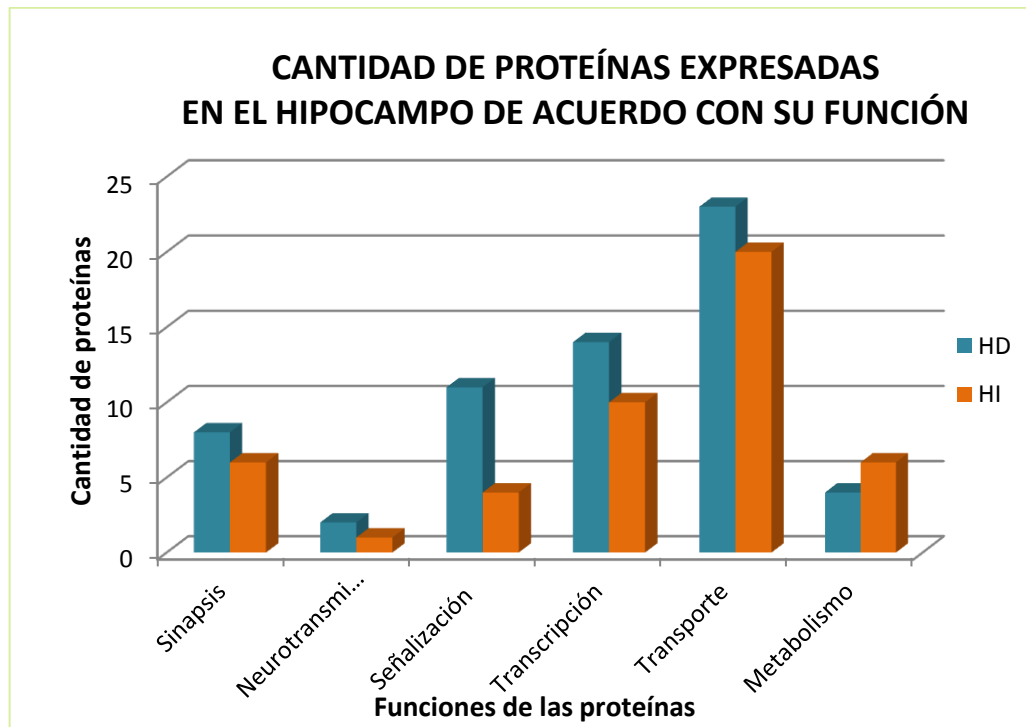


Figura 30. Cantidad de proteínas expresadas en el hipocampo derecho y el hipocampo izquierdo de acuerdo con su función.

Por último, se logró identificar presuntivamente por las bases de datos bioinformáticas una variedad de proteínas que intervienen directamente con la sinapsis, con lo que se podría entender mejor los procesos moleculares que se llevan a cabo durante el aprendizaje y la consolidación de la memoria.

7. CONCLUSIONES

- El comportamiento de las ratas Wistar en el LCE entre los tratamientos SS y CHX no fue estadísticamente diferente.
- La dosis de 3mg/kg de cicloheximida aplicada vía intraperitoneal a las ratas Wistar no generó un efecto amnésico o un deterioro en la memoria emocional con la que se encuentra asociado el LCE.
- El conteo de proteínas en el hipocampo dorsal derecho (HD) y el hipocampo dorsal izquierdo (HI) fue mayor para los grupos CHX-24h y SS-24h que para los grupos SS-3h y CHX-3h.
- Se observó la inhibición, el aumento y la disminución de la expresión de proteínas en el hipocampo dorsal de ratas Wistar, en respuesta a la experiencia en el LCE y/o tiempo entre las sesiones y/o un efecto indirecto del tratamiento.
- De acuerdo con la base de datos obtenida en EXPasy.org y los datos de los análisis realizados por el programa PDQuest, se podría decir que se logró presuntivamente la identificación por punto isoeléctrico y masa de proteínas que intervienen en el ciclo celular, la sinapsis, el metabolismo, entre otras funciones, y que estas proteínas podrían estar estrechamente relacionadas con la memoria.

8. RECOMENDACIONES

- Determinar una dosis de CHX vía intrahipocampal que cause amnesia en las ratas Wistar que se expongan al LCE, y que se evidencie con cambios en el comportamiento y en la expresión de proteínas en el hipocampo dorsal, sin causar intoxicación de los roedores.
- Utilizar como inhibidor de síntesis de proteínas la anisomicina para realizar análisis comportamental y proteómico de ratas Wistar expuestas al LCE.
- Aumentar la resolución de la expresión de proteínas en los geles bidimensionales obtenidos para muestras de hipocampo utilizando tiras de gel inmovilizado con gradientes de pH en el rango 4-7, ya que en este rango se detecta un gran cantidad de manchas que al mejorar la resolución del gel podrían estar presentando cambios interesantes pasados por alto al emplear tiras de pH 3-10 porque ofrecen ventanas de separación pequeñas debido a al amplio rango de pH.

9. BIBLIOGRAFIA

Aguado, L. (2002) Procesos cognitivos y sistemas cerebrales de la emoción. *Rev Neurol*, 34:1161-1170.

Albrechet-Souza, L., Borelli, K. G., & Brandão, M. L. (2008). Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *Journal of Neuroscience Methods*, 169(1), 109–18. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.025

Ali-Khan, N., Zuo, X., & Speicher, D. W. (2003). Overview of proteome analysis. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.], Chapter 22, Unit 22.1.* doi:10.1002/0471140864.ps2201s30

Arbor, A. (2005). Two-dimensional gel electrophoresis. *Pfizer Global Research and Development, Molecular Technologies.*

Bailey, C. H., Bartsch, D., & Kandel, E. R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13445–52. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=33629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Bertoglio, L. J., & Carobrez, a P. (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 108(2), 197–203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10701663>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>

Calzavara, M. B., Patti, C. L., Lopez, G. B., Abílio, V. C., Silva, R. H., & Frussa-Filho, R. (2005). Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice. *Life Sciences*, *76*(19), 2235–46. doi:10.1016/j.lfs.2004.10.040

Cárdenas, J., & Navarro, J. . F. (2002). Modelos animales de ansiedad incondicionada. *Psiquiatría Biológica*, *Vol. 09. Núm. 01. Enero 2002*, *9*(1), 18–31.

Chang, B. H., Mukherji, S., & Soderling, T. R. (2001). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor protein: localization of isoforms in rat brain. *Neuroscience*, *102*(4), 767–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182241>

Chevalier, F. (2010). Highlights on the capacities of “ Gel-based ” proteomics Review. *Proteome Science 2010*, *8*:23, 1–10.

Conde, C. a, Costa, V., & Tomaz, C. (1999). Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *63*(1), 63–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340525>

Cultek. (2006). Electroforesis de Proteínas. *Protocolo Y Tecnicas. Soluciones Electroforesis*, 1–17.

Destrieux, C., Bourry, D., & Velut, S. (2013). Surgical anatomy of the hippocampus. *Neuro-Chirurgie*, *59*(4-5), 149–58. doi:10.1016/j.neuchi.2013.08.003

Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T., & Fu, Z. F. (2005). New frontiers in proteomics research: a perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, *299*(1-2), 1–18. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.04.010

Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J., Feldblum, S., Patel, N., & Tobin, a J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, *7*(1), 91–100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2069816>

Escarabajal, M. ., Torres, C., & Flaherty, C. . (2003). The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is

abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. *Life Sciences*, 73(8), 1063–1074. doi:10.1016/S0024-3205(03)00416-8

Fink, C. C., Bayer, K.-U., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Schulman, H., & Meyer, T. (2003). Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron*, 39(2), 283–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873385>

Flint, R. W., Valentine, S., & Papandrea, D. (2007). Reconsolidation of a long-term spatial memory is impaired by cycloheximide when reactivated with a contextual latent learning trial in male and female rats. *Neuroscience*, 148(4), 833–44. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.07.022

Gaertner, T. R., Putkey, J. a, & Waxham, M. N. (2004). RC3/Neurogranin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II produce opposing effects on the affinity of calmodulin for calcium. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39374–82. doi:10.1074/jbc.M405352200

Gianlorenço, A. C., Canto-de-Souza, A., & Mattioli, R. (2011, January 15). I-histidine induces state-dependent memory deficit in mice mediated by H(1) receptor. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.09.006

Glanzer, J., Miyashiro, K. Y., Sul, J.-Y., Barrett, L., Belt, B., Haydon, P., & Eberwine, J. (2005). RNA splicing capability of live neuronal dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16859–64. doi:10.1073/pnas.0503783102

Gold, C. A., & Budson, A. E. (2009). Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics., 8(12), 1879–1891. doi:10.1586/14737175.8.12.1879.Memory

Gold, P. E. (2008). Protein synthesis inhibition and memory : Formation vs amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89, 201–211. doi:10.1016/j.nlm.2007.10.006

Hamann, S. (2001). Cognitive and neural mechanisms of emotional memory. *Trends in Cognitive Sciences*, 5(9), 394–400. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520704>

Harris, D. M. (2007). Memory systems. *FUNDAMENTALS OF COGNITIVE PSYCHOLOGY*, 463–512. doi:10.1016/B978-012370497-9/50009-3

Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., ... El Mestikawy, S. (2001). The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(22), RC181. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698619>

Hettinger, T. P., Formaker, B. K., & Frank, M. E. (2007). Cycloheximide: no ordinary bitter stimulus. *Behavioural Brain Research*, 180(1), 4–17. doi:10.1016/j.bbr.2007.02.027

Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 54(1), 21–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728535>

Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6781–9. doi:20026642

Kensinger, E. a, Anderson, A., Growdon, J. H., & Corkin, S. (2004). Effects of Alzheimer disease on memory for verbal emotional information. *Neuropsychologia*, 42(6), 791–800. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2003.11.011

King, M., Marsden, C., & Fone, K. (2008). A role for the 5-HT1A, 5-HT4 and 5-HT6 receptors in learning and memory. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(9), 482–492. doi:10.1016/j.tips.2008.07.001

Kirkpatrick, L. L., Matzuk, M. M., Dodds, D. C., & Perin, M. S. (2000). Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. Neuronal pentraxin (NP) receptor binds to taipoxin

and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 via NP1 and NP2. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17786–92. doi:10.1074/jbc.M002254200

Klann, E., & Sweatt, J. D. (2008). Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 247–59. doi:10.1016/j.nlm.2007.08.009

Laezza, F., Wilding, T. J., Sequeira, S., Coussen, F., Zhang, X. Z., Hill-Robinson, R., ... Craig, A. M. (2007). KRIP6: a novel BTB/kelch protein regulating function of kainate receptors. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 34(4), 539–50. doi:10.1016/j.mcn.2006.12.003

Li, X., Serwanski, D. R., Miralles, C. P., Nagata, K., & De Blas, A. L. (2009). Septin 11 is present in GABAergic synapses and plays a functional role in the cytoarchitecture of neurons and GABAergic synaptic connectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 17253–65. doi:10.1074/jbc.M109.008870

McGauran, A.-M. T., Moore, J. B., Madsen, D., Barry, D., O’Dea, S., Mahon, B. P., & Commins, S. (2008). A possible role for protein synthesis, extracellular signal-regulated kinase, and brain-derived neurotrophic factor in long-term spatial memory retention in the water maze. *Behavioral Neuroscience*, 122(4), 805–15. doi:10.1037/0735-7044.122.4.805

Mendonça, F. H., & Guimarães, F. S. (1998). Intra-hippocampal administration of cycloheximide attenuates the restraint-induced exploratory deficit of an elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 91(1-2), 207–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9580415>

Miranda, D. A., Conde, C. A., Celis, C. C., & Corzo, S. P. (2009). Modelado Del Comportamiento De Ratas En Laberinto En Cruz Eleva- do Basado En Redes Neuronales Artificiales. *Revista Colombiana de Física*, 41(2), 406–408.

Monopoli, M. P., Raghnaill, M. N., Loscher, J. S., O’Sullivan, N. C., Pangalos, M. N., Ring, R. H., ... Murphy, K. J. (2011). Temporal proteomic profile of memory consolidation in the

rat hippocampal dentate gyrus. *Proteomics*, 11(21), 4189–201.
doi:10.1002/pmic.201100072

Morgado, I. (2009). Psicobiología del aprendizaje y la memoria. *Cuadernos de Información Y Comunicación*, 221–233.

Mundo, E. L. (2001). 2001 Salud mental: nuevos conocimientos, nuevas esperanzas.

Niehaus, J. L., Liu, Y., Wallis, K. T., Egertová, M., Sheela, G., Mukhopadhyay, S., ... Georgia, J. L. N. (2009). CB1 Cannabinoid Receptor Activity Is Modulated by the Cannabinoid. *Mol Pharmacol.*, 72(6), 1557–1566. doi:10.1124/mol.107.039263.CB

Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., & Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*, 73(11), 2064–77. doi:10.1016/j.jprot.2010.05.016

RCSB PROTEIN DATA BANK [online]. P21707: model 3D structure [cited: 30 ene 2014].
<URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1RSY>>

RCSB PROTEIN DATA BANK [online]. Q05329: model 3D structure [cited: 30 ene 2014].
<URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2OKK>>

RCSB PROTEIN DATA BANK [online]. Q13554: model 3D structure [cited: 30 ene 2014].
<URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3BHHK>>

RCSB PROTEIN DATA BANK [online]. O62305: model 3D structure [cited: 30 ene 2014].
<URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3KL8>>

Robertson, L. T., & Ph, D. (2001). Memory and the Brain. *Journal of Dental Education*, 66(1), 30–42.

Sanchez, J. Corthals, G. Hochstrasser, D. *Biomedical Applications of Proteomics* Ed. WILEY-VCH. 2003. cap. 17 pág.317

Sandusky, L. a, Flint, R. W., & McNay, E. C. (2012). Effects of the protein synthesis inhibitor cycloheximide on anxiety-like extinction behavior in an animal model of post-traumatic stress. *Behavioural Brain Research*, 231(1), 208–12. doi:10.1016/j.bbr.2012.03.019

Schneider-poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., ... Liu, J. O. (2010). Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nat Chem Biol*, 6(3), 209–217. doi:10.1038/nchembio.304.Inhibition

Sutton, C. A., Ares, M., & Hallberg, R. L. (1978). Cycloheximide resistance can be mediated through either ribosomal subunit Biochemistry : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(7), 3158–3162.

Tannu, N. S., & Hemby, S. E. (2006). Methods for proteomics in neuroscience. *Progress in Brain Research*, 158, 41–82. doi:10.1016/S0079-6123(06)58003-3

Tejada, J., Bosco, G. G., Morato, S., & Roque, A. C. (2010). Characterization of the rat exploratory behavior in the elevated plus-maze with Markov chains. *Journal of Neuroscience Methods*, 193(2), 288–95. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.09.008

Walf, A. a, & Frye, C. a. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–8. doi:10.1038/nprot.2007.44

Xu, J., Pang, Z. P., Shin, O.-H., & Südhof, T. C. (2009). Synaptotagmin-1 functions as a Ca²⁺ sensor for spontaneous release. *Nature Neuroscience*, 12(6), 759–66. doi:10.1038/nn.2320

Witzmann, F.A., Arnold, R.J., Bai, F., Hrnčirova, P., Kimpel, M.W., Mechref, Y.S., McBride, W.J. (2006). A proteomic survey of rat cerebral synaptosomes. *Proteomics*, 5(8), p. 2177-2201.

ANEXOS

Anexo A.

Composición de las soluciones con las que se realizó el análisis proteómico.

Todas las soluciones que se nombraran a continuación se prepararon con agua desionizada.

1. Homogenización de tejidos.

Solución de buffer de lisis.

Componente	Concentración
Urea	7M
Tiourea	2M
Anfolitos pH 3-10	1% (v/v)
DTT	0,1 M
Tris	0,04 M
CHAPS	4% (p/v)
EDTA	1 mM
PMSF-Ortovanadato de sodio	1 mM
Leupeptina-Pepstatina	10 M

2. Isoelectroenfoque.

Solución de buffer de rehidratación.

Componente	Concentración
Urea	8M
DTT	50 mM
Anfolitos pH 3-10	0.2% (v/v)
CHAPS	2% (p/v)
Azul de bromofenol	0.001%

Solución de equilibración I.

Componente	Concentración
Urea	6 M
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M
SDS	2% (p/v)
Glicerol	20% (v/v)
DTT	13 mM

Solución de equilibración II.

Componente	Concentración
Urea	6 M
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M
SDS	2% (p/v)
Glicerol	20% (v/v)
Iodoacetamida	13,5 mM

3. SDS-PAGE.

Solución acrilamida/bis-acrilamida.

Componente	Concentración
Acrilamida	29,2% (p/v)
Bis-acrilamida	0,8% (p/v)

Solución Tris-HCl pH 8,8.

Componente	Concentración
Tris Base	1,5 M
El pH se ajusta a 8,8 con HCl concentrado	

Solución SDS.

Componente	Concentración
SDS	10% (p/v)

Solución de persulfato de amonio.

Componente	Concentración
Persulfato de amonio	10% (p/v)

Preparación del gel al 12% (20x20 cm)

Componente	Volumen
Agua desionizada	17,6 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida	22 mL
Tris-HCl pH 8,8	14,3 mL
SDS 10%	550 μ L
Persulfato de amonio	275 μ L
TEMED	110 μ L

Solución de buffer de corrido.

Componente	Concentración
Glicina	1,44 % (p/v)
Tris Base	0,2 % (p/v)
SDS	0,10% (p/v)

A partir de ésta solución, se prepara el buffer de corrido diluido con agua destilada al 10% (v/v) la cual se agrega a la cámara de electroforesis para correr la segunda dimensión.

4. Tinción con azul comassie coloidal G-250.

Solución de fijación.

Componente	Concentración
Metanol	50% (v/v)
Ácido o-fosfórico	2 % (v/v)

Solución de incubación.

Componente	Concentración
Metanol	33% (v/v)
Ácido o-fosfórico	3 % (v/v)
Sulfato de amonio	17% (p/v)

Solución colorante azul de comassie (0,06 %).

Componente	Cantidad
Azul de comassie G-250	120 mg
Metanol	20 mL

La concentración final de azul de Coomassie G-250 para la tinción fue de 0.06%, ya que el colorante estaba disuelto en metanol y se le adicionó a los 200 mL de solución de incubación que se hallaban en cada gel.

Anexo B.

Curva de calibración de los patrones de albúmina de suero bovino (BSA) usada para cuantificar proteínas por el método de Bradford.

El patrón utilizado en la curva de calibración fue una solución de BSA de 1 mg/mL, partiendo de esta se realizaron diluciones para obtener las diferentes concentraciones de BSA con las que se realizó la curva de calibración (**Tabla 1**).

Tabla 1. Patrones de la curva de calibración.

Concentración (mg/mL)	Patrón concentrado (µL)	Solución <i>buffer</i> de lisis (µL)
Blanco	0	100
0,1	10	90
0,2	20	80
0,3	30	70
0,4	40	60
0,5	50	50
0,6	60	40
0,7	70	30
0,8	80	20
0,9	90	10
1	0	100

Para cada patrón se tomaron 20 µL y se diluyeron en 1 mL de reactivo de Bradford. A continuación, se midieron las absorbancias y se obtuvo la ecuación para la curva de calibración (**Figura 1**).

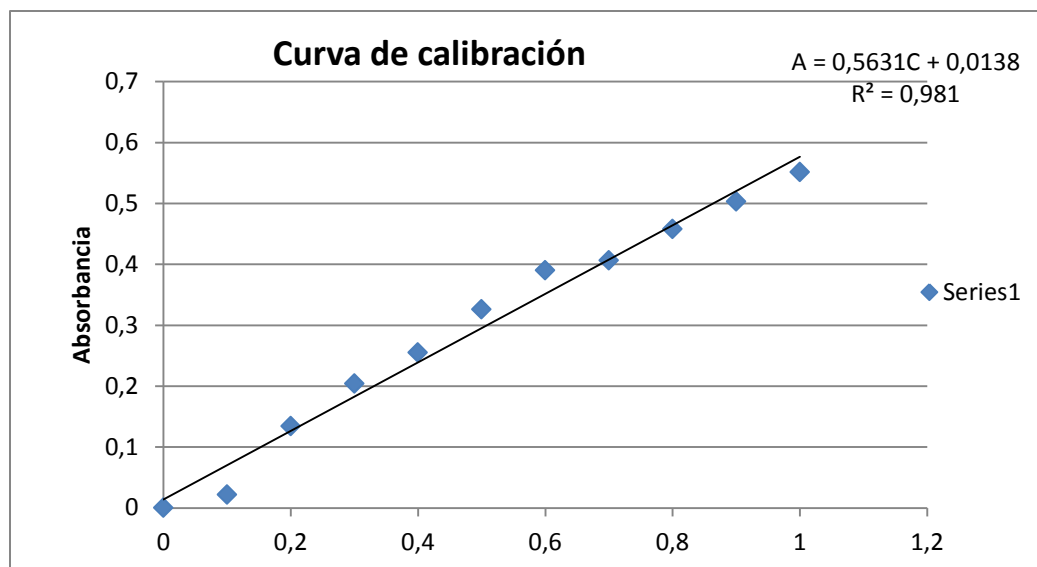


Figura 1. Grafica de la curva de calibración.

La gráfica de la curva de calibración fue: $A = 0,5631C + 0,0138$

$$C = \frac{A - 0,0138}{0,5631}$$

Donde A es la absorbancia es la absorbancia de la muestra y C la concentración de la muestra (mg/mL).

Las muestras de hipocampo dorsal se diluyeron en una relación 1:20 muestra: buffer de lisis, con la finalidad de que sus absorbancias estuvieran dentro del intervalo de la curva de calibración y se pudiera realizar la interpolación y así, calcular su concentración. En la medición de la absorbancia de las muestras también se tomaron 20 μL de cada muestra diluida en 1 mL de reactivo de Bradford.

En la **Tabla 2** y en la **Figura 2** se pueden observar las concentraciones de proteínas obtenidas para cada una de las muestras y las concentraciones promedio de cada grupo experimental.

Tabla 2. Concentración de proteínas en todas las muestras de hipocampo dorsal derecho (HD) e hipocampo dorsal izquierdo (HI).

Grupo	Muestra	[mg prot /mg hipoc]	
		HD	HI
SS-3h	R7-0 HD	0,0423	0,0430
SS-3h	R7-1 HD	0,0391	0,0285
SS-3h	R7-2 HD	0,1199	0,0414
SS-3h	R7-3 HD	0,0382	0,0364
SS-3h	R7-4 HD	0,0412	0,0394
SS-3h	R7-5 HD	0,0506	0,0206
CHX-3h	R8-0 HD	0,0321	0,0306
CHX-3h	R8-1 HD	0,0629	0,0621
CHX-3h	R8-2 HD	0,0528	0,0211
CHX-3h	R8-3 HD	0,0186	0,0399
CHX-3h	R8-4 HD	0,0356	0,0358
CHX-3h	R8-5 HD	0,0446	0,0328
SS-24h	R6-0 HD	0,0357	0,0304
SS-24h	R6-1 HD	0,0396	0,0300
SS-24h	R6-2 HD	0,0241	0,0322
SS-24h	R6-3 HD	0,0242	0,0266
SS-24h	R6-4 HD	0,0352	0,0349
SS-24h	R6-5 HD	0,0365	0,0209
CHX-24h	R5-0 HD	0,0288	0,0311
CHX-24h	R5-1 HD	0,0283	0,0296
CHX-24h	R5-2 HD	0,0374	0,0289
CHX-24h	R5-3 HD	0,0388	0,0315
CHX-24h	R5-4 HD	0,0361	0,0251
CHX-24h	R5-5 HD	0,0392	0,0173

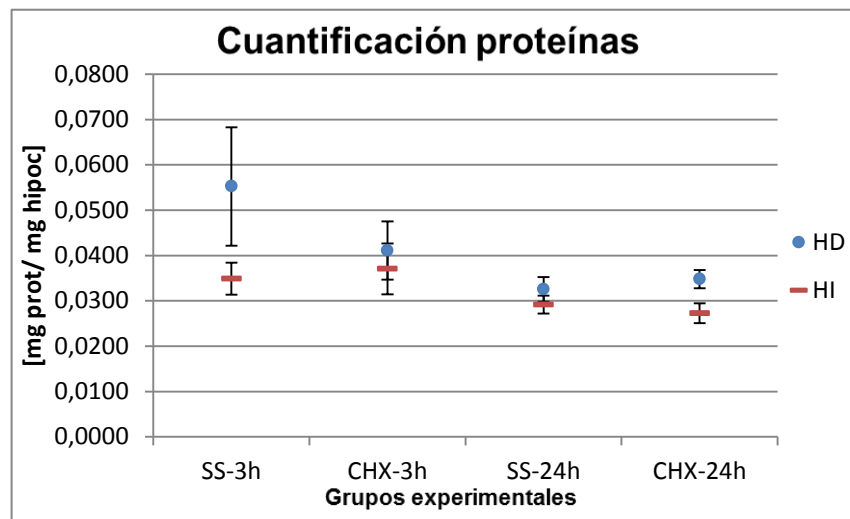


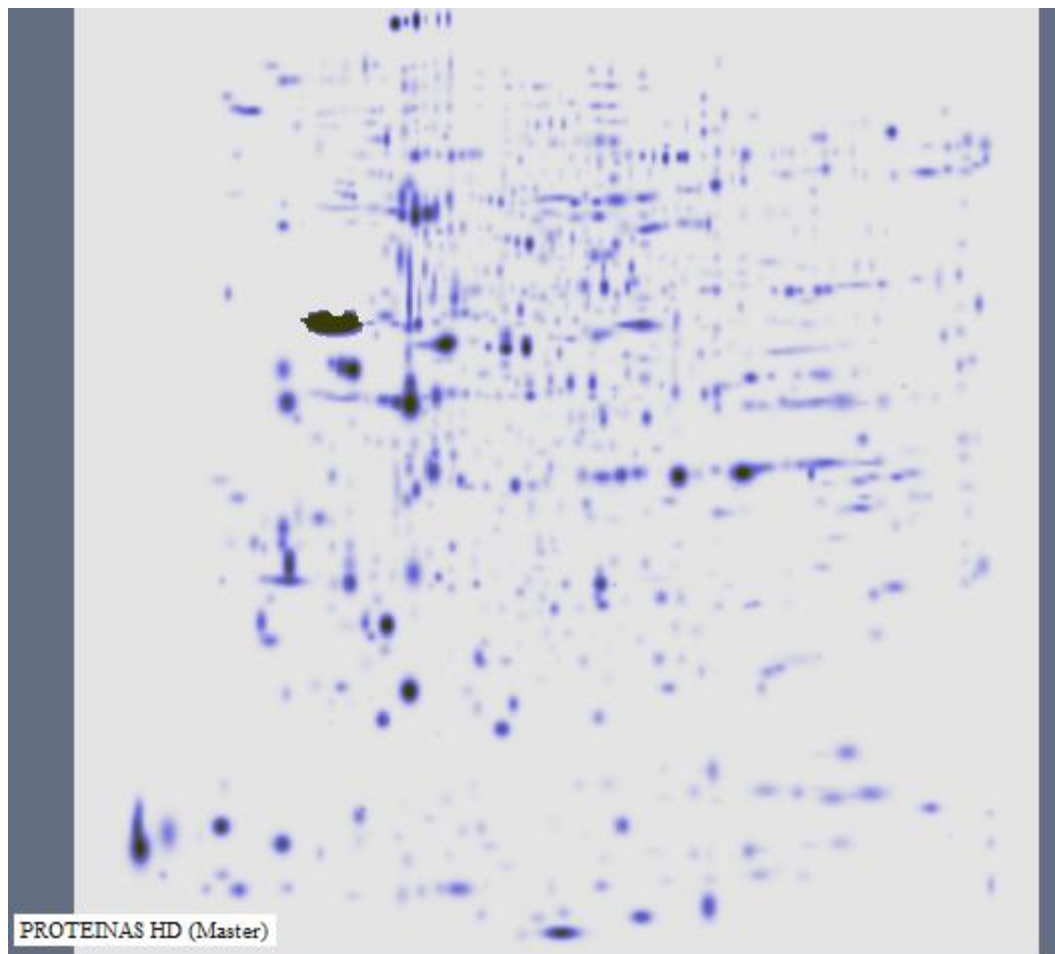
Figura 2. Concentración promedio de proteínas en los grupos experimentales.

Anexo C.

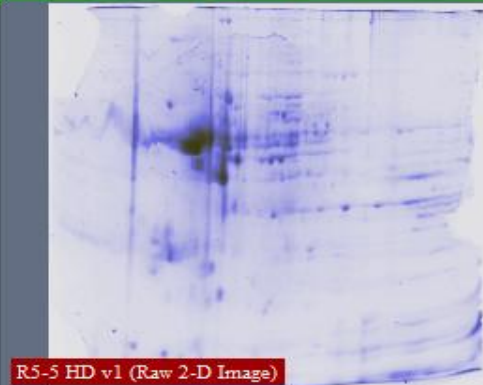
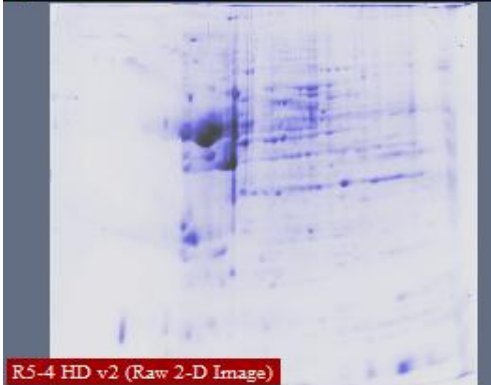
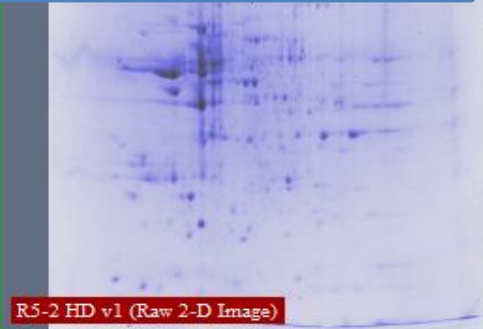
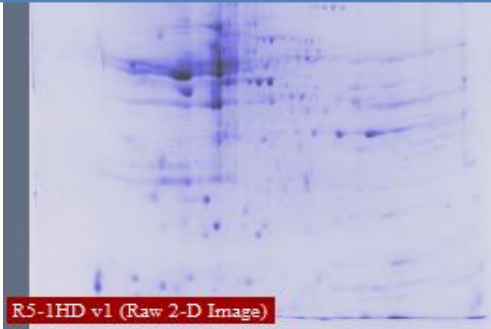
Proteoma de las 30 muestras de hipocampo dorsal y resultados del análisis proteómico.

Se utilizaron tiras de Isoelectroenfoque de 17 cm; pH 3-10; Peso molecular 200-10 KDa.

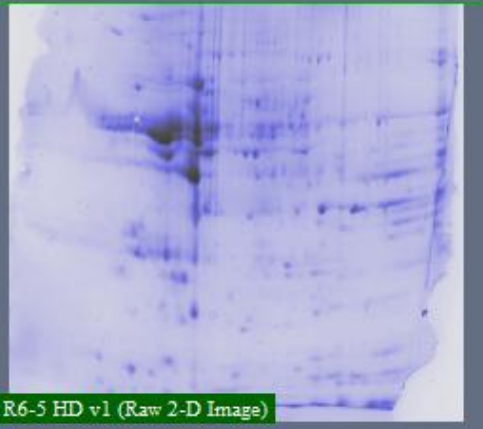
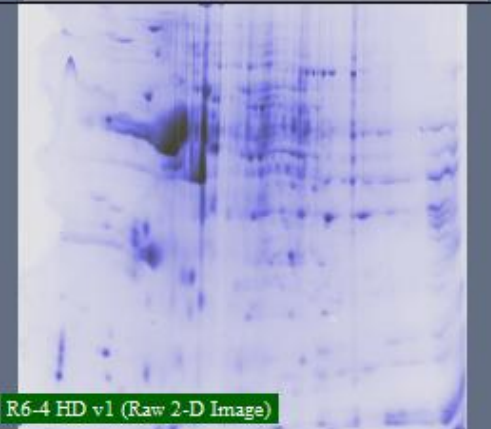
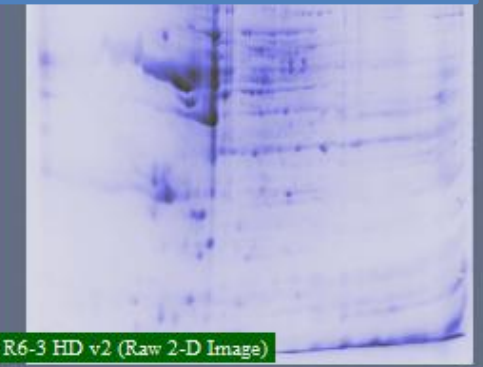
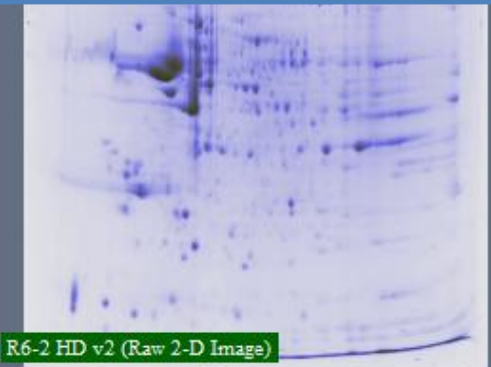
Master HD



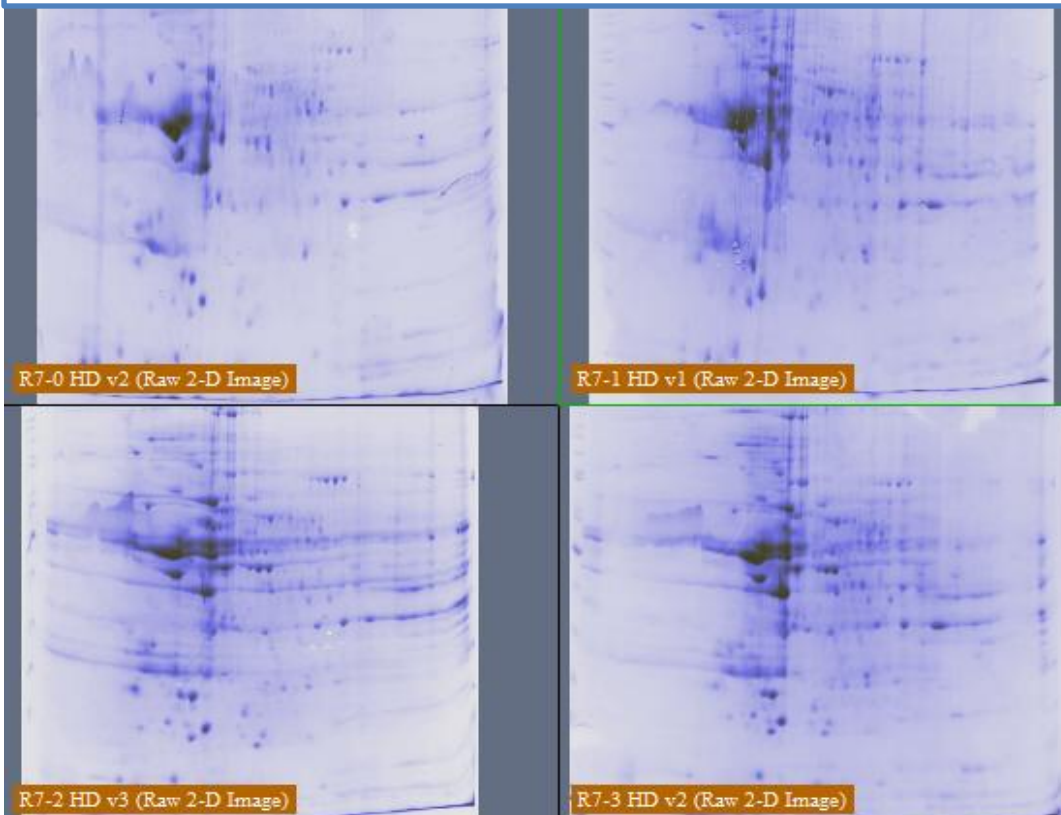
CHX-24h HD



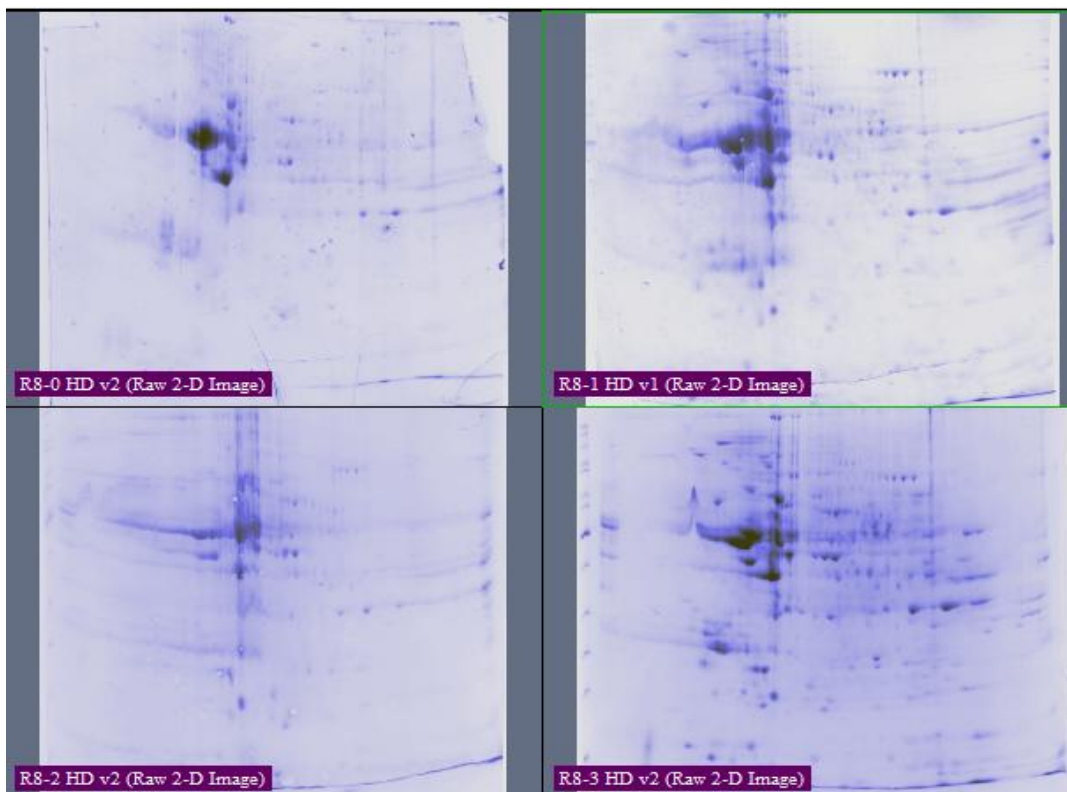
SS-24h HD



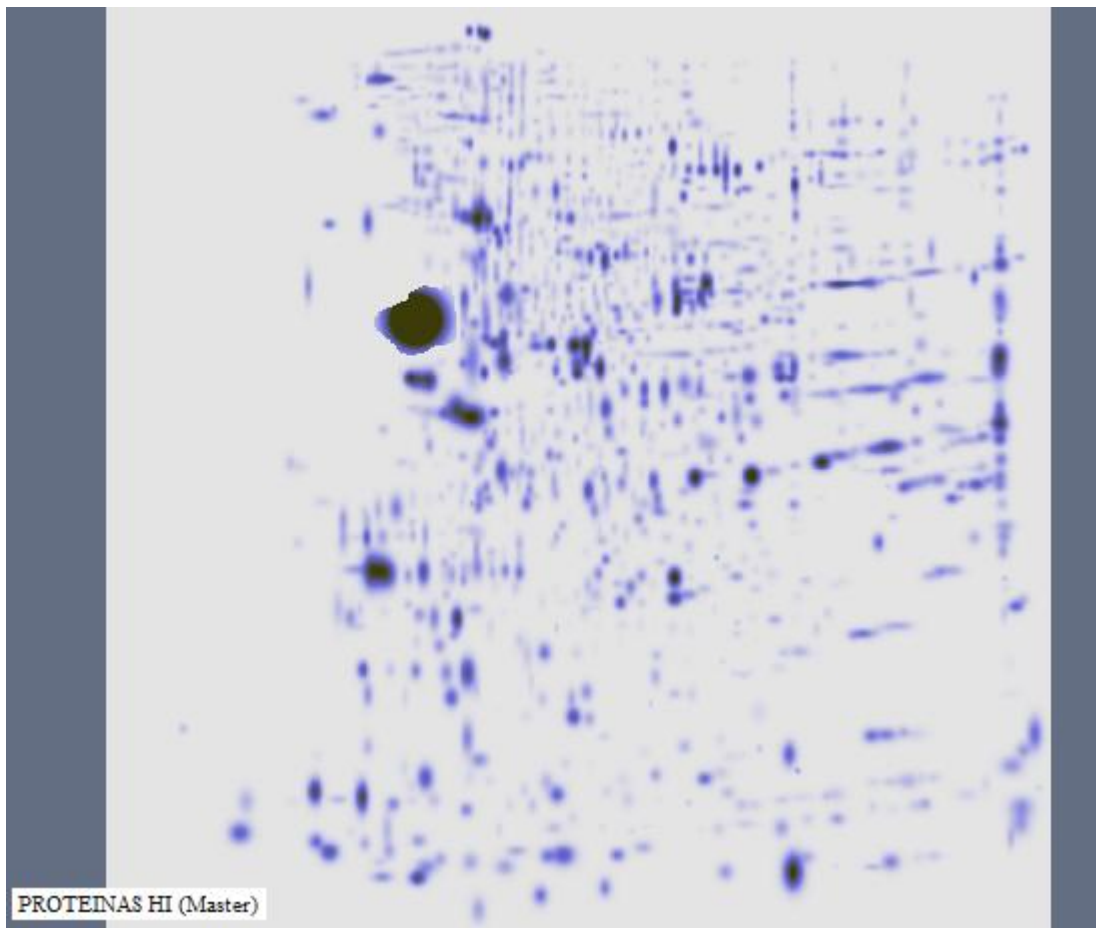
SS-3h HD



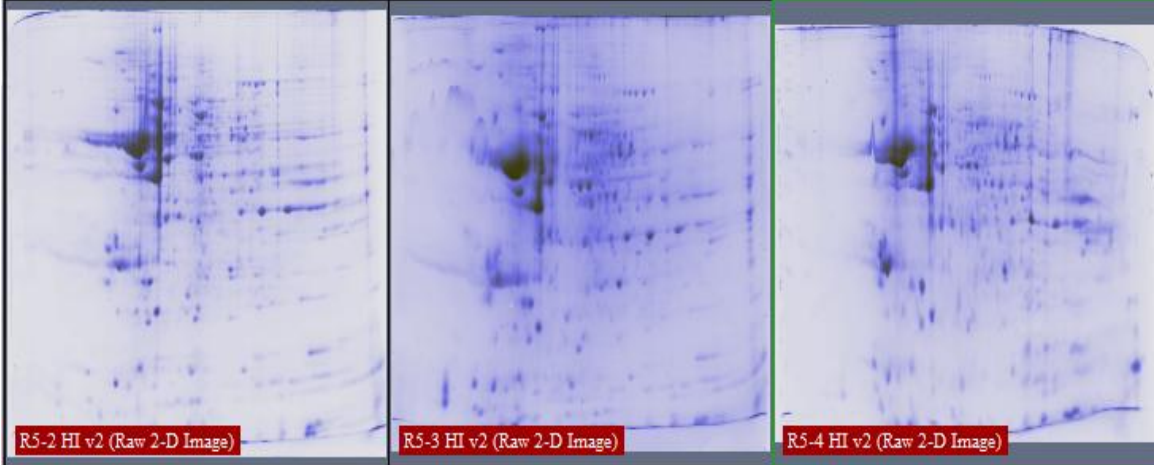
CHX-3h HD



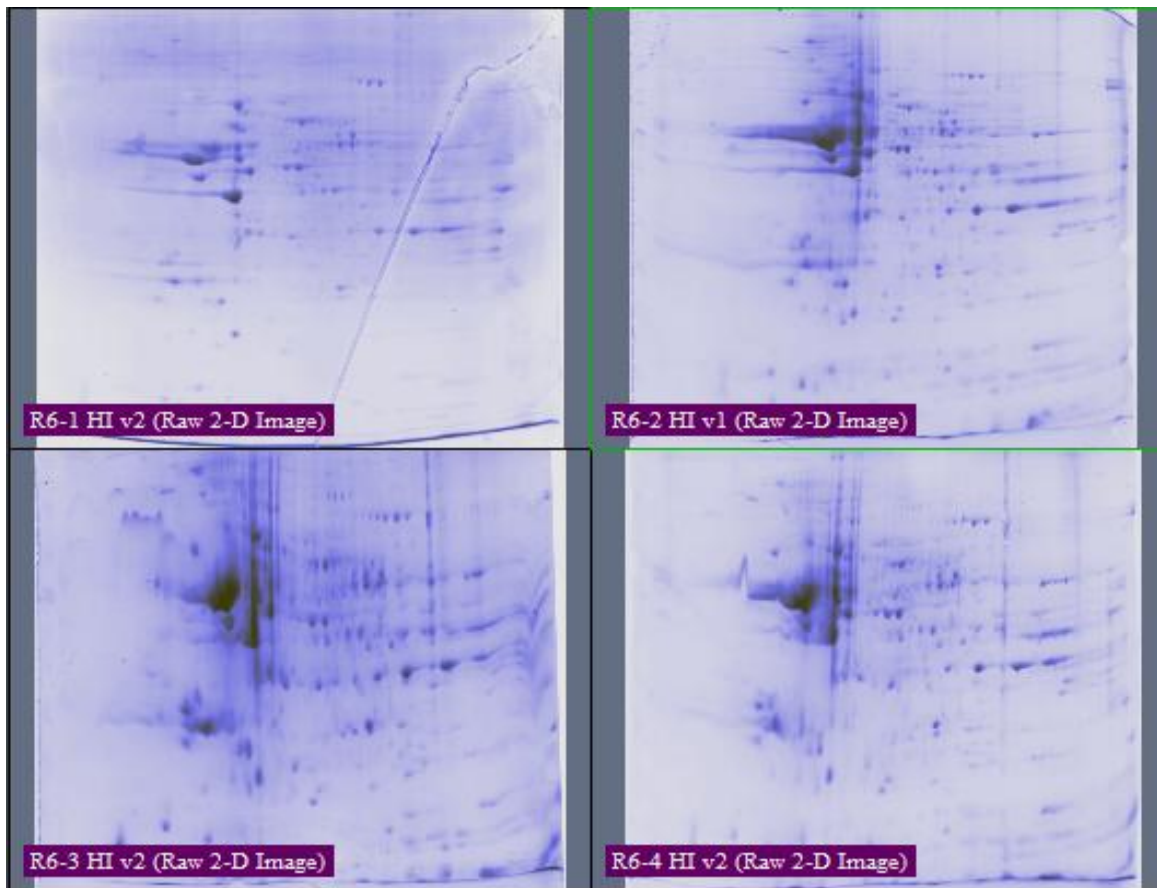
Master HI



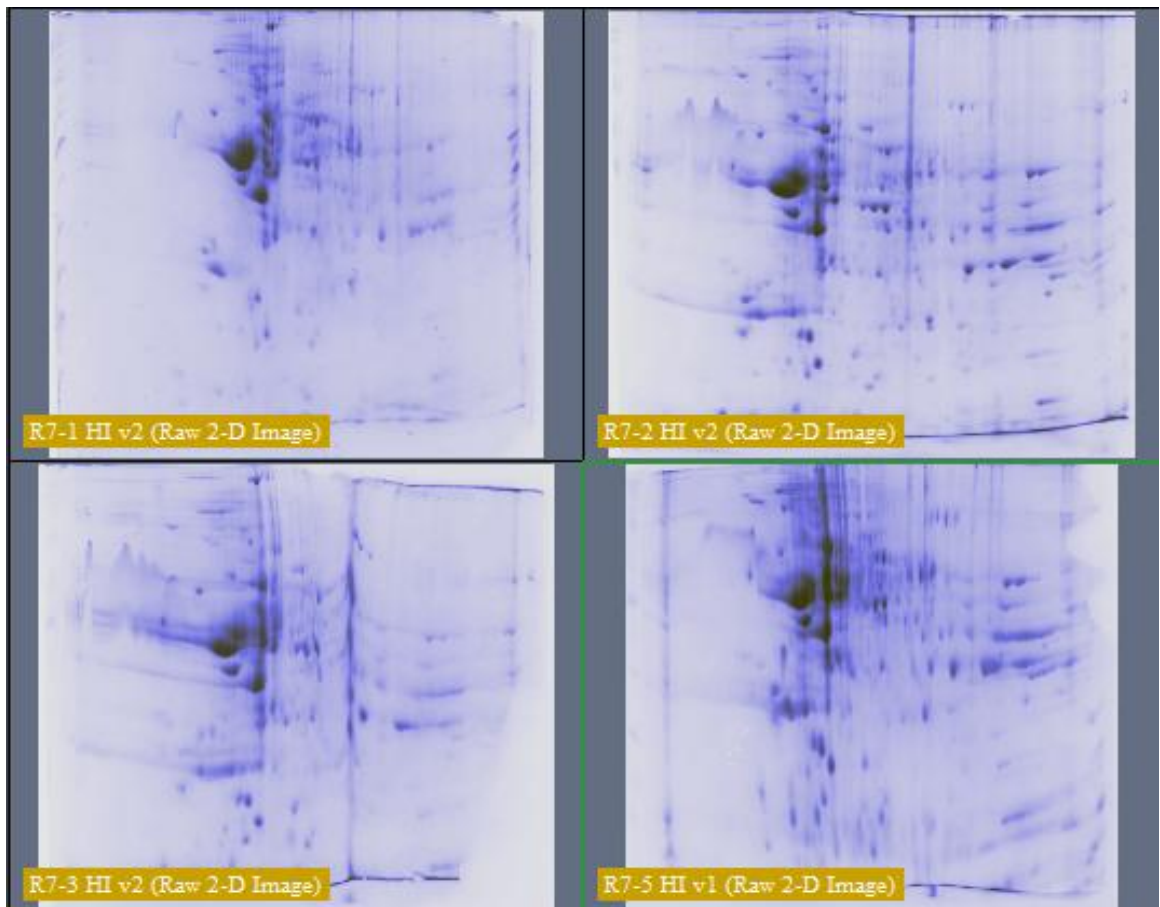
CHX-24h HI



SS-24h HI



SS-3h HI



CHX-3h HI

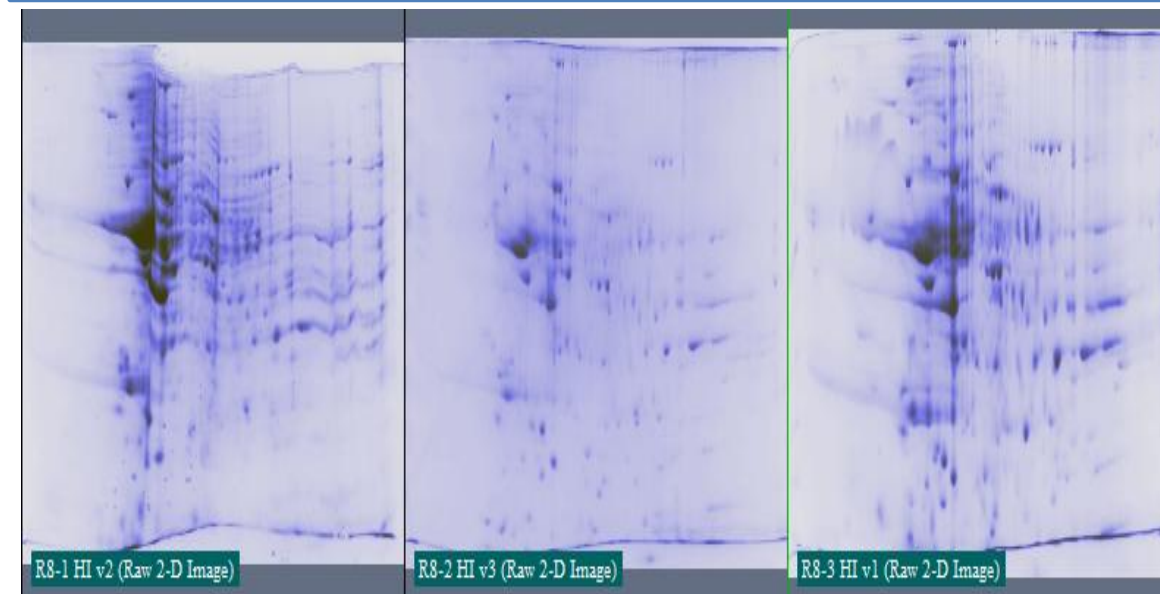


Tabla 1. Proteínas presentes los grupos SS-3h y CHX-3h HD.

SSP	Mr	pI	Nombre
703	93.38	5.24	Bicaudal D homolog 2
2304	29.75	5.57	F-actin-capping protein subunit alpha-2
2201	26.58	5.58	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
2402	47.95	5.72	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
2512	66.74	5.99	Kelch-like protein 24
2513	61.65	6.00	T-complex protein 1 subunit beta
2308	34.23	6.09	AH receptor-interacting protein (AIP)
3706	76.20	6.10	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma
3108	11.17	6.18	Purkinje cell protein 4
4601	67.51	6.25	Protein Red
3306	41.32	6.27	Limbic system-associated membrane protein precursor
2603	71.23	6.27	Leucine zipper putative tumor suppressor 3
4201	27.19	6.29	SAP domain-containing ribonucleoprotein
3505	63.72	6.32	Dihydropyrimidinase-related protein 4
3817	126.67	6.33	WD repeat-containing protein 6
3506	66.98	6.43	Glutamate decarboxylase 2
4101	18.35	6.50	Ornithine aminotransferase, mitochondrial
4107	10.58	6.53	Neurogranin
3612	81.81	6.53	E3 ubiquitin-protein ligase
4310	33.18	6.63	LIM and SH3 domain protein 1
4313	43.01	6.68	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2
5209	26.60	6.87	Triosephosphate isomerase
5410	48.77	6.90	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1
4513	66.02	6.99	Vesicular glutamate transporter 1
5721	96.08	7.09	Glutamate receptor 2
6707	75.99	7.26	Pannexin-2
7707	78.08	7.43	cGMP-gated cation channel alpha-1
7609	64.75	7.53	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1

7611	87.00	7.53	Oligophrenin-1 OPHN1_RAT
6314	45.87	7.54	Dual specificity protein phosphatase 4
7211	20.46	7.79	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
7603	69.37	7.80	Interleukin-1 receptor accessory protein precursor
7218	30.24	7.86	Mitogen-activated protein kinase 4
7706	77.73	7.87	Leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 1 precursor
7624	83.57	7.87	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor
7415	47.21	8.19	Potassium channel subfamily K member 9
8101	14.24	8.26	Peroxiredoxin-1
8605	69.27	8.27	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase R
8707	108.33	8.30	Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1
8602	69.27	8.35	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2
8403	47.13	8.37	25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase
8603	69.64	8.40	SHC-transforming protein 3
8410	46.90	8.56	Synaptotagmin-1

Tabla 2. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y CHX-3h HD.

SSP	Mr	pl	NOMBRE
2101	19.58	5.63	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2
2104	17.71	5.92	Nucleoside diphosphate kinase A
4201	27.19	6.29	SAP domain-containing ribonucleoprotein

Tabla 3. Proteínas presentes los grupos SS-24h y CHX-24h HD.

SSP	Mr	pl	Nombre
2304	29.75	5.57	F-actin-capping protein subunit alpha-2
2201	26.58	5.58	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
2701	92.22	5.86	Disks large homolog 2

2512	66.74	5.99	Kelch-like protein 24
3402	47.01	6.01	Caspase-2 precursor
3109	13.97	6.33	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein
4402	48.58	6.36	E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP
5407	48.11	6.62	Calcium-responsive transcription coactivator
4310	33.18	6.63	LIM and SH3 domain protein 1
5506	58.70	7.01	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1
6511	64.62	7.16	Regulator of G-protein signaling 14
6612	89.45	7.17	Rho GTPase-activating protein 17
7309	29.91	7.60	Cyclin-dependent kinase 5
7603	69.37	7.80	Interleukin-1 receptor accessory protein precursor
7411	51.27	8.04	Progressive ankylosis protein homolog
8402	46.68	8.23	Potassium channel subfamily K member 9
8702	74.78	8.34	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2
8603	69.64	8.40	SHC-transforming protein 3
8316	37.07	8.80	N-acetylaspartate synthetase
1304	29.68	5.11	Kv channel-interacting protein 1
2401	48.05	5.56	Guanine deaminase
3604	72.01	6.10	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma
3304	29.63	6.13	Proteasome subunit alpha type-1
4308	36.35	6.36	Uroporphyrinogen decarboxylase
4510	61.61	6.73	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta
5210	27.94	6.84	Glutathione S-transferase Yb-3
5619	82.02	7.06	Glutamate carboxypeptidase 2
6618	86.08	7.35	Transducin-like enhancer protein 4
7110	12.17	7.83	Hemoglobin subunit alpha-1/2
7704	89.95	7.87	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor
7806	118.9	7.88	MYCBP-associated protein

	0		
8404	47.12	8.41	25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase
8324	38.29	8.59	Leucine zipper protein 1

Tabla 3. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-24h y CHX-24h HD.

SSP	Mr	pI	Nombre
1304	29.68	5.11	Kv channel-interacting protein 1
			Period circadian protein homolog
1816	140.61	5.80	2
4604	64.09	6.38	Stress-induced-phosphoprotein 1
5801	97.62	6.70	Cytoplasmic aconitate hydratase
7109	11.52	7.83	Hemoglobin subunit alpha-1/2
7809	108.52	7.87	MYCBP-associated protein

Tabla 4. Proteínas aumentaron su expresión en el grupo SS-24h con respecto al grupo SS-3h HD.

SSP	Mr	pI	Nombre
117	14.55	4.83	Thioredoxin
1302	34.46	4.92	Kv channel-interacting protein 2
1304	29.68	5.11	Kv channel-interacting protein 1
1205	25.47	5.15	Lactoylglutathione lyase
1204	26.82	5.29	Proteasome subunit alpha type-3
1315	44.40	5.34	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
2201	26.58	5.58	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
2509	61.85	5.83	Protein NDRG4
4601	67.51	6.25	Protein Red
2306	43.74	6.27	Neuronal pentraxin-1 precursor

4402	48.58	6.36	E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP
4204	27.78	6.36	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9
4404	52.03	6.54	Ornithine aminotransferase, mitochondrial
4311	31.31	6.61	LIM and SH3 domain protein 1
4609	70.74	6.64	Phosphatase and actin regulator 1
4719	93.63	6.69	Cytoplasmic aconitate hydratase
5405	50.33	6.72	Mothers against decapentaplegic homolog 3
4510	61.61	6.73	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta
5210	27.94	6.84	Glutathione S-transferase Yb-3
4209	25.54	6.86	Transgelin-3
4822	117.41	6.86	Contactin-4
5204	21.96	6.91	Triosephosphate isomerase
5606	62.27	6.94	Vesicular glutamate transporter 1
5505	58.78	6.94	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase
5613	89.34	7.04	Glutamate carboxypeptidase 2
6714	94.12	7.15	Rho GTPase-activating protein 17
6604	66.88	7.19	Transketolase
5003	12.04	7.19	Dynamin-like 120 kDa protein
7708	77.59	7.51	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
7301	34.11	7.55	Cyclin-dependent kinase 5
7211	20.46	7.79	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
7406	46.20	7.87	LIM/homeobox protein Lhx5
8610	69.25	8.15	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3
8707	108.33	8.30	Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1
8106	12.45	8.31	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
8305	30.60	8.44	V-type proton ATPase subunit E 1
8009	12.53	8.46	Profilin-1
8614	70.46	8.53	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3
8309	33.89	8.65	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase

Tabla 5. Proteínas aumentaron su expresión en el grupo SS-24h con respecto al grupo SS-3h HD.

SSP	Mr	pI	Nombre
205	26.97	5.19	Neuronal membrane glycoprotein M6-a
2304	29.75	5.57	F-actin-capping protein subunit alpha-2
2701	92.22	5.86	H(+)/Cl(-) exchange transporter 3
3204	27.35	5.99	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1
2512	66.74	5.99	Kelch-like protein 24
2513	61.65	6.00	T-complex protein 1 subunit beta
3402	47.01	6.01	Caspase-2 precursor
4501	62.10	6.28	Dihydropyrimidinase-related protein 4
3506	66.98	6.43	Glutamate decarboxylase 2
5506	58.70	7.01	Polyubiquitin-B precursor
6511	64.62	7.16	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial precursor
7707	78.08	7.43	cGMP-gated cation channel alpha-1
6412	57.08	7.46	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
6114	15.19	7.79	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
8317	36.65	8.72	Proto-oncogene Mas
8325	39.70	8.79	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase
8316	37.07	8.80	N-acetylaspartate synthetase

Tabla 6. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y SS-24h HD.

SSP	Mr	pI	Nombre
1303	30.07	5.04	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha
1304	29.68	5.11	Kv channel-interacting protein 1
1204	26.82	5.29	Proteasome subunit alpha type-3
2101	19.58	5.63	ADP-ribosylation factor-like protein 2
2402	47.95	5.72	L-lactate dehydrogenase B chain

2104	17.71	5.92	Nucleoside diphosphate kinase A
3402	47.01	6.01	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2
3902	168.71	6.35	Slit homolog 1 protein
5301	35.73	6.71	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D
5307	29.27	6.85	Glutathione S-transferase Yb-3
6201	26.61	6.99	GTP-binding nuclear protein Ran
7809	108.52	7.87	MYCBP-associated protein
8605	69.27	8.27	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase R
8411	51.78	8.38	25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase

Tabla 7. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo CHX-24h con respecto a CHX-3h HD.

SSP	Mr	pI	NOMBRE
1305	29.97	5.23	Syntaxin-1B
1204	26.82	5.29	Proteasome subunit alpha type-3
2509	61.85	5.83	Synaptic vesicle 2-related protein
2701	92.22	5.86	Disks large homolog 2
4704	80.89	6.23	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1
4201	27.19	6.29	SAP domain-containing ribonucleoprotein
4109	12.16	6.35	Histidine triad nucleotide-binding protein 1
4402	48.58	6.36	E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP
4304	29.74	6.37	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9
4403	48.40	6.51	Ornithine aminotransferase, mitochondrial
4107	10.58	6.53	Neurogranin
5601	62.55	6.59	Dihydropyrimidinase-related protein 5
5407	48.11	6.62	Calcium-responsive transcription coactivator
4310	33.18	6.63	LIM and SH3 domain protein 1
4208	24.80	6.64	Eukaryotic translation initiation factor 4H
4714	78.20	6.65	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1
5801	97.62	6.70	Cytoplasmic aconitate hydratase

5405	50.33	6.72	Mothers against decapentaplegic homolog 3
5201	25.95	6.74	Acyl-protein thioesterase 2
5304	30.26	6.84	Glutathione S-transferase Yb-3
5715	94.69	6.85	Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1
5209	26.60	6.87	Triosephosphate isomerase
5305	30.28	6.91	Tumor protein p63-regulated gene 1-like protein
5606	62.27	6.94	Vesicular glutamate transporter 1
6201	26.61	6.99	Glutathione S-transferase P
5721	96.08	7.09	Glutamate receptor 2
6714	94.12	7.15	Rho GTPase-activating protein 17
6707	75.99	7.26	Pannexin-2
7201	28.32	7.42	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
7707	78.08	7.43	cGMP-gated cation channel alpha-1
8403	47.13	8.37	25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase

Tabla 8. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo CHX-3h con respecto a CHX-24h HD.

SSP	Mr	pI	Nombre
301	32.13	5.12	Syntaxin-1A
1306	31.51	5.23	Syntaxin-1B
2502	53.91	5.56	Guanine deaminase
2304	29.75	5.57	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
1211	28.63	5.88	Growth factor receptor-bound protein 2
3301	37.67	6.10	AH receptor-interacting protein (AIP)
3604	72.01	6.10	Serum albumin
3605	66.64	6.17	WD repeat-containing protein 1
3408	47.87	6.21	Septin-11
6512	61.05	7.49	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1
7611	87.00	7.53	Guanine deaminase

8404	47.12	8.41	25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase
8607	70.72	8.65	Hypoxia-inducible factor 3-alpha
8406	49.78	8.76	Megakaryocyte-associated tyrosine-protein kinase
8311	34.65	8.80	N-acetylaspartate synthetase
8313	34.62	8.88	Leukocyte surface antigen CD47 precursor

Tabla 9. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos CHX-3h y CHX-24h HD.

SSP	Mr	pI	Nombre
1103	11.64	4.82	Thioredoxin
1204	26.82	5.29	Proteasome subunit alpha type-3
2801	96.61	5.67	Disks large homolog 1
5801	97.62	6.70	Cytoplasmic aconitate hydratase
5405	50.33	6.72	Mothers against decapentaplegic homolog 3
5706	78.51	6.73	Transducin-like enhancer protein 3
5803	132.01	6.83	Glutamate receptor ionotropic
5606	62.27	6.94	Vesicular glutamate transporter 1
6202	26.63	7.17	Protein-L-isoaspartate
6606	64.74	7.25	Leucine zipper putative tumor suppressor 1

Tabla 10. Proteínas presentes en SS-3h y CHX-3h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
1103	12.47	4.82	Thioredoxin
1601	95.46	4.94	Rab GTPase-binding effector protein 1
1207	31.18	5.05	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha
1212	24.10	5.12	Lactoylglutathione lyase
1306	45.82	5.39	Creatine kinase B-type

1220	32.31	5.50	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3
2214	25.93	5.59	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
2213	29.60	5.63	Peroxiredoxin-6 (EC 1.11.1.15) (1-Cys peroxiredoxin)
1712	138.7 3	5.68	Period circadian protein homolog 1
2216	22.86	5.69	UMP-CMP kinase
2814	168.5 3	5.70	Rho-associated protein kinase
1816	189.4 9	5.77	Protein unc-13 homolog B
2611	97.73	5.77	Disrupted in schizophrenia 1 homolog
2605	101.9 9	5.77	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2
2613	93.61	5.84	Disks large homolog 2
2222	20.65	5.86	Growth factor receptor-bound protein 2
2112	18.90	5.92	Nucleoside diphosphate kinase A
3303	34.70	6.07	Golgi phosphoprotein 3
2508	67.04	6.13	WD repeat-containing protein 1
3306	39.75	6.15	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]
3309	41.67	6.17	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
3505	67.11	6.19	DNA repair protein XRCC1
3407	62.34	6.23	Protein Red
3511	73.90	6.26	Leucine zipper putative tumor suppressor 3
3312	34.51	6.30	Pyridoxal kinase
4413	49.16	6.52	Ornithine aminotransferase, mitochondrial
4316	35.22	6.54	Transaldolase
4110	16.51	6.63	ADP-ribosylation factor-like protein 2
4408	61.90	6.64	McKusick-Kaufman syndrome
5411	62.01	6.70	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta
4414	52.19	6.79	Cytosol aminopeptidase
5416	60.24	6.98	Vesicular glutamate transporter 1
5210	22.03	7.00	GTP-binding nuclear protein Ran

6402	60.01	7.09	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
5527	69.66	7.10	Prostaglandin G/H synthase 2
5526	80.89	7.24	SNF-related serine/threonine-protein kinase
6321	48.37	7.60	Reticulon-4 receptor-like 2 precursor
7102	18.71	7.65	Adenylate kinase isoenzyme 1
6114	15.38	7.80	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
7511	76.69	8.56	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3

Tabla 11. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y CHX-3h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
1211	26.37	5.30	Synaptosomal-associated protein 29
1816	189.49	5.77	Protein unc-13 homolog B
6514	74.26	7.45	cGMP-gated cation channel alpha-1
7213	20.99	7.77	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2

Tabla 12. Proteínas presentes en SS-24h y CHX-24h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
1108	12.58	5.12	ATP synthase subunit delta, mitochondrial precursor
1212	24.10	5.12	Lactoylglutathione lyase
1106	12.46	5.23	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
1210	31.08	5.25	Syntaxin-1B
2214	25.93	5.59	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
2602	102.76	5.67	Disks large homolog 1
2216	22.86	5.69	UMP-CMP kinase
2010	12.22	5.75	Cell surface glycoprotein MUC18 precursor
3303	34.70	6.07	Golgi phosphoprotein 3
3513	73.06	6.07	Acetoacetyl-CoA synthetase
3113	13.33	6.16	Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase
3311	39.50	6.27	Limbic system-associated membrane protein precursor

3318	42.25	6.29	Neuronal pentraxin-1 precursor
4504	65.68	6.37	Stress-induced-phosphoprotein 1
4304	33.67	6.45	Proteasome subunit beta type-4 precursor
4305	39.96	6.48	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha
4316	35.22	6.54	Transaldolase
4009	12.33	6.59	Neuritin precursor
5313	43.08	6.72	Zinc finger protein neuro-d4
5503	67.59	6.78	Fragile X mental retardation protein 1 homolog
5203	30.24	6.85	Glutathione S-transferase Yb-3
5314	42.39	6.88	Acetyl-CoA acetyltransferase
6205	25.32	7.08	Apoptosis regulator Bcl-2
6506	65.85	7.22	Transketolase
6414	54.38	7.46	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
6413	56.56	7.47	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
7528	67.89	7.85	Interleukin-1 receptor accessory protein precursor
7210	29.88	8.15	Proteasome subunit beta type-7 precursor
7116	22.95	8.45	V-type proton ATPase subunit E 1
7707	140.55	8.62	Periaxin

Tabla 13. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-24h y CHX-24h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
1103	12.47	4.82	Thioredoxin
1002	12.37	4.94	Astrocytic phosphoprotein
1105	12.93	5.21	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
2507	67.64	5.66	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2
3703	148.43	6.08	Nuclear receptor coactivator 1
3110	12.85	6.31	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein
4006	12.33	6.50	Neurogranin
4307	49.13	6.61	Calcium-responsive transcription coactivator

5501	70.97	6.68	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-4 precursor
5303	49.67	6.72	Mothers against decapentaplegic homolog 3
5716	115.02	6.87	Contactin-4
5410	52.84	7.02	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1
8101	13.60	8.88	10 kDa heat shock protein

Tabla 14. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo SS-24h con respecto a SS-3h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
2215	23.66	5.60	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
3407	62.34	6.23	Protein Red
3318	42.25	6.29	Limbic system-associated membrane protein precursor
3316	45.69	6.31	Neuronal pentraxin-1 precursor
5108	13.27	6.72	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9
5503	67.59	6.78	Fragile X mental retardation protein 1 homolog
5004	12.02	6.80	Macrophage migration inhibitory factor
6205	25.32	7.08	Apoptosis regulator Bcl-2
6514	74.26	7.45	cGMP-gated cation channel alpha-1
6624	101.29	7.47	Mineralocorticoid receptor MCR_RAT
7316	32.82	7.66	Hydroxyacylglutathione hydrolase
7306	32.74	8.13	Proteasome subunit beta type-7 precursor

Tabla 15. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo SS-3h con respecto a SS-24h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
1109	13.39	4.83	Thioredoxin
1306	45.82	5.39	Creatine kinase B-type

2214	25.93	5.59	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
1111	17.52	5.72	Protein mago nashi homolog
2304	48.83	5.77	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1
2222	20.65	5.86	Superoxide dismutase
3303	34.70	6.07	Golgi phosphoprotein 3
3113	13.33	6.16	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
3311	39.50	6.27	Lipid phosphate phosphatase-related protein type 1
3110	12.85	6.31	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein
3324	36.17	6.36	Uroporphyrinogen decarboxylase
4316	35.22	6.54	Transaldolase
4404	54.11	6.59	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial precursor
4510	68.69	6.63	Phosphatase and actin regulator 1
5601	93.47	6.68	Cytoplasmic aconitate hydratase
5523	65.42	6.99	Vesicular glutamate transporter 1
5210	22.03	7.00	GTP-binding nuclear protein Ran
6411	57.66	7.05	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1
5526	80.89	7.24	SNF-related serine/threonine-protein kinase
6614	84.83	7.41	cGMP-gated cation channel alpha-1
6111	13.46	7.80	Hemoglobin subunit alpha-1/2
7209	27.56	8.18	Carbonyl reductase [NADPH] 1
7432	52.73	8.70	Creatine kinase U-type

Tabla 16. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y SS-24h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
1816	189.49	5.77	Protein unc-13 homolog B
2606	111.94	5.98	Protein-tyrosine kinase 2-beta
3309	41.67	6.17	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
3311	39.50	6.27	Lipid phosphate phosphatase-related protein type 1

4202	28.94	6.37	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9
4106	12.96	6.55	Profilin-2
6403	52.71	7.15	Adenylyl cyclase-associated protein 1
6612	83.99	7.31	Transducin-like enhancer protein 4
6514	74.26	7.45	cGMP-gated cation channel alpha-1
7502	80.50	7.61	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain
7213	20.99	7.77	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
7432	52.73	8.70	Creatine kinase U-type, mitochondrial precursor

Tabla 17. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo CHX-24h con respecto a CHX-3h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
1103	12.47	4.82	Thioredoxin
1208	22.62	5.11	Lactoylglutathione lyase
1306	45.82	5.39	Creatine kinase B-type
2602	102.76	5.67	Disks large homolog 1
2605	101.99	5.77	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2
2112	18.90	5.92	Fatty acid-binding protein
3303	34.70	6.07	Golgi phosphoprotein 3
3113	13.33	6.16	Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase
3409	56.01	6.18	Vesicular inhibitory amino acid transporter
3505	67.11	6.19	DNA repair protein XRCC1
2510	63.28	6.28	Protein Red
3312	34.51	6.30	Pyridoxal kinase
4413	49.16	6.52	Ornithine aminotransferase
4404	54.11	6.59	Aldehyde dehydrogenase X
4408	61.90	6.64	Pyruvate kinase PKM
5501	70.97	6.68	Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 3 precursor
5214	25.22	6.71	Acyl-protein thioesterase 2

5313	43.08	6.72	Zinc finger protein neuro-d4
6402	60.01	7.09	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
7402	61.05	7.58	Solute carrier family 22 member 5
7102	18.71	7.65	Adenylate kinase isoenzyme 1
7316	32.82	7.66	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial
7511	76.69	8.56	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3

Tabla 18. Proteínas que aumentaron su expresión en el grupo CHX-3h con respecto a CHX-24h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
1212	24.10	5.12	Lactoylglutathione lyase
2214	25.93	5.59	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
2217	24.41	5.91	Chloride intracellular channel protein
3401	64.18	6.06	Dihydropyrimidinase-related protein 3
3701	119.42	6.07	Contactin-5 precursor
3307	32.57	6.15	Proteasome subunit beta type-3
3604	96.47	6.16	NT-3 growth factor receptor
3309	41.67	6.17	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
3310	34.74	6.19	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]
3206	25.04	6.24	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2
3507	81.93	6.24	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1
4519	67.48	6.41	Stress-induced-phosphoprotein 1
4619	92.60	6.47	Dynamin-1
4518	69.82	6.48	Glutamate decarboxylase 2
4514	69.25	6.53	Syntaxin-binding protein 1
4607	86.14	6.61	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1
5105	20.63	6.74	Acyl-protein thioesterase 2
6312	36.83	7.43	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
7201	28.57	7.51	Dual specificity protein phosphatase 4
7103	18.96	7.71	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1

Tabla 19. Proteínas que se expresaron diferencialmente entre los grupos SS-3h y SS-24h HI.

SSP	Mr	pI	Nombre
1103	12.47	4.82	Thioredoxin
1002	12.37	4.94	Astrocytic phosphoprotein
1105	12.93	5.21	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
2507	67.64	5.66	CREB-regulated transcription coactivator 1
3110	12.85	6.31	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein
4006	12.33	6.50	Neurogranin
4307	49.13	6.61	Calcium-responsive transcription coactivator
5501	70.97	6.68	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-4 precursor
5303	49.67	6.72	Mothers against decapentaplegic homolog 3
5716	115.02	6.87	Contactin-4
5410	52.84	7.02	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1
7314	41.73	8.58	Neuroplastin