



EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL Y PROTEÓMICA CEREBRAL (AMIGDALA
E HIPOCAMPO) EN RATAS EXPUESTAS A DIFERENTES NIVELES DE
ESTRÉS INDUCIDO POR EL NADO FORZADO

NASSER GUERRERO BERMÚDEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA

2012

EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL Y PROTEÓMICA CEREBRAL (AMIGDALA
E HIPOCAMPO) EN RATAS EXPUESTAS A DIFERENTES NIVELES DE
ESTRÉS INDUCIDO POR EL NADO FORZADO

NASSER GUERRERO BERMÚDEZ

TRABAJO DE GRADO:
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR

DR. RODRIGO TORRES SÁEZ Ph.D

CODIRECTOR

DR. CARLOS CONDE COTES MD, Ph.D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA

2012

DEDICATORIA

Primero que todo doy gracias a Dios por haberme iluminado para así culminar con este proyecto de vida.

A mi madre MARIA BERMUDEZ y hermano JADER GUERRERO por el apoyo incondicional recibido durante este proceso de formación superior.

A mí querida esposa ALBA MARIA AMAYA y mis pequeños VALENTINA Y SANTIAGO les entrego el fruto de mis esfuerzos para que junto conmigo lo compartamos hasta que Dios nos lo permita

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	17
1. Marco teórico	21
1.1 Estrés.....	21
1.1.1 Etapas en la respuesta al estrés	23
1.1.2 Características de los estímulos estresantes.....	25
1.1.3 Respuesta fisiológica del estrés.....	27
1.1.4 Importancia de la glucosa en situaciones de estrés.....	30
1.1.5 Uso del consumo de oxígeno como indicador de estrés en animales de experimentación.....	31
1.1.6 Estructuras cerebrales de estudio	33
1.1.6.1 El Hipocampo	33
1.1.6.2 La Amígdala	36
1.1.7 Modelos animales en el estudio del estrés	37
1.1.8 Nado Forzado (PNF).....	41
1.1.9 Categorías comportamentales	42
1.2 Proteómica	44
1.2.1 Preparación de muestras	45
1.2.2 Solubilización de Proteínas	45
1.2.3 Electroforesis bidimensional	46
1.2.4 Isoelectroenfoque	47
1.2.5 Rehidratación y aplicación de la muestra.....	48
1.2.6 Equilibración	49
1.2.7 SDS-PAGE	50
1.2.8 Métodos de Tinción.....	51
1.2.9 Adquisición y Análisis de Imágenes.....	53
1.3 Estudio Proteómico del Sistema Nervioso Central (SNC).....	54
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
2.1 Consideraciones éticas.....	57

2.2	Animales	57
2.3	Nado Forzado (PNF).....	58
2.4	Parámetro Fisiológico	60
2.4.1	Consumo de oxígeno.....	60
2.4.2	Medición de los niveles de glucosa.....	61
2.5	Parámetro comportamental	62
2.6	Parámetro Proteómico	63
2.6.1	Obtención y preparación de las muestras	63
2.6.2	Solubilización y Extracción.....	64
2.6.3	Eliminación de lípidos e impureza de la muestra	65
2.6.4	Cuantificación	65
2.6.5	Electroforesis 2D.....	66
2.6.5.1	Isoelectroenfoque (IEF).....	67
2.6.5.2	SDS-PAGE	67
2.6.6	Tinción	68
2.6.7	Registro y análisis de imágenes	68
3.	Análisis estadístico: Fase comportamental	71
3.1	Resultados y Discusión: Fase comportamental	71
3.2	Análisis estadístico: Fase fisiológica	74
3.2.1	Consumo de oxígeno	74
3.2.2	Resultados y Discusión: Consumo de oxígeno	75
3.2.3	Análisis estadístico: Glicemia	76
3.2.4	Resultados y Discusión: Glicemia	76
3.3	Análisis proteómico	79
3.3.1	Análisis de imágenes e identificación de las proteínas expresadas diferencialmente por análisis bioinformático.	79
3.3.2	Cantidad de manchas detectadas en el hipocampo derecho e izquierdo	81
3.3.3	Análisis de resultados y discusión en el hipocampo dorsal	91
3.3.4	Cantidad de manchas detectadas en amígdala derecha e izquierda.....	96
3.3.5	Análisis de resultados en amígdala	102

3.4 Correlación entre la fase comportamental, fisiológica y la expresión de proteínas en ratas sometidas a diferentes niveles de estrés	105
3.4.1 Análisis estadístico	105
3.4.2 Resultados y Discusión.....	105
Conclusiones	107
Recomendaciones	109
Bibliografía.....	110

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ETAPAS DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS DE UNA RATA EXPUESTA AL NADO FORZADO. A) FASE DE ALERTA O ALARMA, B) FASE DE RESISTENCIA Y C) FASE DE AGOTAMIENTO COMPORTAMENTAL	24
FIGURA 2. UBICACIÓN DEL HIPOCAMPO Y AMÍGDALA EN EL CEREBRO	33
FIGURA 3. REACCIONES DE EQUILIBRACIÓN. A) REDUCCIÓN B) ALQUILACIÓN. TOMADO DE LA TESIS: DETERMINACIÓN DE CAMBIOS EN EL PÉRFIL PROTEÓMICO DEL HIPOCAMPO DE RATAS EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO BAJO CRITERIO DE APRENDIZAJE.....	49
FIGURA 4 DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE.....	51
FIGURA 5 ESTRUCTURAS MOLECULARES DE LOS COLORANTES COOMASSIE R-250 Y G-250. TOMADO DE LA TESIS: DETERMINACIÓN DE CAMBIOS EN EL PÉRFIL PROTEÓMICO DEL HIPOCAMPO DE RATAS EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO BAJO CRITERIO DE APRENDIZAJE.	52
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL. TOMADA DE LA TESIS: ANÁLISIS PROTEÓMICO EN PLASMA DE PACIENTES CON EVENTOS CORONARIOS AGUDOS	53
FIGURA 7 DIGITALIZACIÓN DE LA IMAGEN. TOMADO DE LA TESIS: DETERMINACIÓN DE CAMBIOS EN EL PÉRFIL PROTEÓMICO DEL HIPOCAMPO DE RATAS EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO BAJO CRITERIO DE APRENDIZAJE.....	54
FIGURA 8. CAJAS VIVEROS DONDE SE MANTENÍAN LAS RATAS.....	58
FIGURA 9 TANQUE DEL NADO FORZADO. A) VISTA FRONTAL DEL TANQUE CON LAS CONDICIONES DE LABORATORIO, B) VISTA SUPERIOR.....	59
FIGURA 10. COMPLEMENTOS INFORMATIVOS SOBRE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL ESTRÉS: CONSUMO DE OXÍGENO	61

FIGURA 11 COMPLEMENTOS INFORMATIVOS SOBRE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL ESTRÉS: TOMA DE SANGRE DE LA VENA CAUDAL PARA MEDIR GLICEMIA.	62
FIGURA 12 VISTA SUPERIOR DEL TANQUE DEL NADO FORZADO DIVIDIDO VIRTUALMENTE PARA EL REGISTRO COMPORTAMENTAL	63
FIGURA 13 OBTENCIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA. A) CEREBRO DE LA RATA, B) Y C) EXTRACCIÓN DEL HIPOCAMPO DORSAL	64
FIGURA 14. MÉTODO DE SOLUBILIZACIÓN Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS. A) SUSPENSIÓN DE LAS MUESTRAS EN BUFFER DE LISIS. B) HOMOGENIZACIÓN DE LAS MUESTRAS EN VORTEX. C) CENTRIFUGACIÓN	65
FIGURA 15. PROCESO DE CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.A) PLACA CON LAS MUESTRAS A CUANTIFICAR. B) EQUIPO DE ELISA MICROPLATE READER, BIO-RAD.	66
FIGURA 16 PROCESO DE REHIDRATACIÓN Y CORRIDA EN EL EQUIPO IEF. A) COLOCACIÓN DE LAS TIRAS EN LA BANDEJA DE IEF. B) EQUIPO IEF PROTEAN IEF CELL, BIO-RAD	67
FIGURA 17 EQUIPO DE ELECTROFORESIS: MINI PROTEAN SYSTEM, BIO-RAD. A) Y B) MONTAJE PARA LA CORRIDA ELECTROFORÉTICA	68
FIGURA 18. ESCÁNER: EQUIPO UMAX POWERLOOK 2100XL PARA ADQUIRIR LAS IMÁGENES DE LOS GELES TEÑIDOS.....	69
FIGURA 19. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL 2D-PAGE. TOMADA DE LA TESIS: ANÁLISIS PROTEÓMICO EN PLASMA DE PACIENTES CON EVENTOS CORONARIOS AGUDOS.....	70
FIGURA 20. LA GRÁFICA MUESTRA EL PROMEDIO \pm 1 EE DE LA MEDIA DE LOS TIEMPOS RELATIVOS DE PERMANENCIA EN LOS LUGARES DEL TANQUE. * DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P<0.05), DONDE EL MARCADO ES MAYOR QUE EL % DE TIEMPO DE PERMANENCIA DEL OTRO GRUPO EN EL LUGAR SEÑALADO.....	73

FIGURA 21. LA GRÁFICA MUESTRA EL PROMEDIO \pm 1 EE DEL NÚMERO TOTAL DE ENTRADAS Y CRUZAMIENTOS ENTRE DIFERENTES LUGARES DEL TANQUE. *VALORES OBTENIDOS A LOS 5 MINUTOS MENORES QUE LOS OBTENIDOS EN 15 MINUTOS (P<0.05).....	73
FIGURA 20. PROMEDIO DE DIFERENCIA DEL CONSUMO DE OXÍGENO DE RATAS SOMETIDAS A LA PRUEBA DE NADO FORZADO EN DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN. LOS VALORES ESTÁN DADOS EN PROMEDIO \pm ERROR ESTÁNDAR.	75
FIGURA 21. PROMEDIO DE LA DIFERENCIA DE GLICEMIA DE RATAS SOMETIDAS A LA PRUEBA DE NADO FORZADO A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN. LOS VALORES ESTÁN DADOS EN PROMEDIO \pm ERROR ESTÁNDAR	77
FIGURA 22. IMAGEN DEL GEL MÁSTER Y DE UN GEL REPRESENTATIVO A MODO DE EJEMPLO CORRESPONDIENTE AL HIPOCAMPO DERECHO.....	80
FIGURA 23. GELES MASTERS (A) HIPOCAMPO DERECHO (HD), (B) HIPOCAMPO IZQUIERDO (HI).NÓTESE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MANCHAS MUCHO MAYOR EN EL HD CON RESPECTO AL HI. CADA UNA DE LAS IMÁGENES SE OBTUVO AL ANALIZAR 10 GELES DE CADA TRATAMIENTO	83
FIGURA 24. PROTEÍNAS DETECTADAS SEGÚN LA BASE DE DATOS EXPASY	84
FIGURA 25. GRÁFICO DE BARRA QUE RELACIONA LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS EXPRESADAS CON SU FUNCIÓN CELULAR SEGÚN EL ANÁLISIS PROTEÓMICO EN EL HIPOCAMPO DERECHO E IZQUIERDO. EL PORCENTAJE CITADO FUE CALCULADO A PARTIR DEL TOTAL DE PROTEÍNAS SELECCIONADAS DE ACUERDO AL CRITERIO ENUNCIADO ANTERIORMENTE (CITADO EN EL ÍTEM 3.3.1)	85
FIGURA 26. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN LA PLASTICIDAD NEURONAL CON LA INTENSIDAD DEL ESTÍMULO ESTRESOR. CÓDIGOS: P84076: <i>PROTEINA HIPOCALCINA</i>	

NEURONAL ESPECIFICA DE UNIÓN A CALCIO; Q0PGW2: *PROTEÍNA LCHN*; P35370: *RECEPTOR DE NOCICEPTINA*; Q9Z214: *PROTEÍNA HOMOLOGA 1 HOMER*; Q04940: *NEUROGRANINA*; O35264: *FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS ACETILHIDROLASA IB...*; Q920M2: *PROTEÍNA 39 DE SEÑALIZACIÓN RING*; Q63544: *GAMMA-SINUCLEINA*; Q9QWR2: *PROTEÍNA DE UNIÓN A CALCIO BETA P23K*; P97829: *ANTÍGENO DE SUPERFICIE DE LOS LEUCOCITOS CD47*; Q62845: *CONTACTINA-4*.....90

FIGURA 27. IMAGEN 3D E INTENSIDAD DE LA MANCHA EN EL GEL DE LA PROTEÍNA P35370: *RECEPTOR DE NONICEPTINA*.....90

FIGURA 28. IMAGEN 3D E INTENSIDAD DE LA MANCHA EN EL GEL DE LA PROTEÍNA P84076: *LA PROTEÍNA HIPOCALCINA NEURONAL ESPECIFICA DE UNIÓN A CALCIO*.....91

FIGURA 29. GRÁFICO DE BARRA QUE RELACIONA LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS EXPRESADAS CON SU FUNCIÓN CELULAR, SEGÚN EL ANÁLISIS PROTEÓMICO EN EL HIPOCAMPO DERECHO. EL PORCENTAJE CITADO FUE CALCULADO A PARTIR DEL TOTAL DE PROTEÍNAS SELECCIONADAS DE ACUERDO AL CRITERIO ENUNCIADO ANTERIORMENTE (CITADO EN EL ÍTEM 3.3.1).....93

FIGURA 30. GRÁFICO DE BARRA QUE RELACIONA LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS EXPRESADAS CON SU FUNCIÓN CELULAR, SEGÚN EL ANÁLISIS PROTEÓMICO EN EL HIPOCAMPO IZQUIERDO. EL PORCENTAJE CITADO FUE CALCULADO A PARTIR DEL TOTAL DE PROTEÍNAS SELECCIONADAS DE ACUERDO AL CRITERIO ENUNCIADO ANTERIORMENTE (CITADO EN EL ÍTEM 3.3.1).....93

FIGURA 31. PROTEÍNAS DETECTADAS EN LA AMÍGDALA SEGÚN LA BASE DE DATOS EXPASY98

FIGURA 32. GRÁFICO DE BARRA QUE RELACIONA LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS EXPRESADAS CON SU FUNCIÓN CELULAR, SEGÚN EL ANÁLISIS PROTEÓMICO EN LA AMÍGDALA DERECHA E IZQUIERDA. EL PORCENTAJE CITADO FUE CALCULADO A PARTIR DEL TOTAL DE

PROTEÍNAS SELECCIONADAS DE ACUERDO AL CRITERIO ENUNCIADO ANTERIORMENTE (CITADO EN EL ÍTEM 3.3.1)99

FIGURA 33. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN LA AMÍGDALA DERECHA SEGÚN EL ANÁLISIS PROTEÓMICO. CÓDIGOS: P97557: *SUBFAMILIA DE PROTEÍNAS CANALES DE POTASIO REGULADOS POR VOLTAJE.*; P23457: *3-ALFA-HIDROXIESTEROIDES DESHIDROGENASA*; Q63689: *FACTOR 2 DE DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA*; Q62813: *PROTEÍNA DE MEMBRANA ASOCIADA AL SISTEMA LÍMBICO*; B0YIR8: *RCG20955*; Q63053: *PROTEÍNA ASOCIADA AL CITOESQUELETO CON ACTIVIDAD REGULADORA*; Q6PST4: *ATLASTINA-1*; Q07917: *RECEPTOR NUCLEAR DE LA SUBFAMILIA 4 MIEMBRO 2 DEL GRUPO A* 100

FIGURA 34. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN LA AMÍGDALA IZQUIERDA SEGÚN EL ANÁLISIS PROTEÓMICO. CÓDIGOS: P97557: *SUBFAMILIA DE PROTEÍNAS CANALES DE POTASIO REGULADOS POR VOLTAJE*; P23457: *3-ALFA-HIDROXIESTEROIDES DESHIDROGENASA*; Q63689: *FACTOR 2 DE DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA*; Q62813: *PROTEÍNA DE MEMBRANA ASOCIADA AL SISTEMA LÍMBICO*; B0YIR8: *RCG20955*; Q63053: *PROTEÍNA ASOCIADA AL CITOESQUELETO CON ACTIVIDAD REGULADORA*..... 101

FIGURA 35. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN LA PLASTICIDAD NEURONAL CON LA INTENSIDAD DEL ESTÍMULO ESTRESOR. CÓDIGOS: Q63689: *FACTOR 2 DE DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA*; Q62813: *PROTEÍNA DE MEMBRANA ASOCIADA AL SISTEMA LÍMBICO*; Q63053: *PROTEÍNA ASOCIADA AL CITOESQUELETO CON ACTIVIDAD REGULADORA*; Q6PST4: *ATLASTINA-1*; Q07917: *RECEPTOR NUCLEAR DE LA SUBFAMILIA 4 MIEMBRO 2 DEL GRUPO A*..... 102

FIGURA 36. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN ENTRE LA AD Y LA AI CON RELACIÓN A LAS PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA NEUROPLASTICIDAD 104

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos establecidos para el análisis experimental	60
Tabla 2. Resultados obtenidos del análisis comportamental.	72
Tabla 3. Cantidad de manchas detectadas inicialmente en el software PDQuests a partir de las muestras del hipocampo derecho e izquierdo.....	82
Tabla 4 Proteínas expresadas en el hipocampo derecho e izquierdo.....	86
Tabla 5 Proteínas expresadas en el hipocampo derecho	88
Tabla 6 Proteínas expresadas en el hipocampo izquierdo	89
Tabla 7 Cantidad de manchas detectadas inicialmente en la amígdala derecha e izquierda	97
Tabla 8 Proteínas expresadas en la amígdala derecha e izquierda, y sólo aquellas expresadas en la amígdala derecha.	98

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A Composición de las soluciones utilizadas en Electroforesis	123
ANEXO B Curva de Calibración	130
ANEXO C Perfiles de los proteomas de muestras hipocampales y amígdalas ..	134
ANEXO D Ejemplos de proteínas comparando su expresión en 3D, su expresión del spots en el gel y las intensidades con los promedios \pm error estándar	153
ANEXO E Peso de las muestras cerebrales (Hipocampo y Amígdala)	154
ANEXO F Resultados fisiológicos: glicemia y consumo de oxígeno.....	159
ANEXO G Resultados obtenidos del análisis de correlación de Spearman Rank Order.....	164

RESUMEN

TITULO:

EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL Y PROTEÓMICA CEREBRAL (AMIGDALA E HIPOCAMPO) EN RATAS EXPUESTAS A DIFERENTES NIVELES DE ESTRÉS INDUCIDO POR EL NADO FORZADO*

AUTOR: GUERRERO Bermúdez Nasser **

PALABRAS CLAVES:

Estrés, hipocampo, proteómica, nado forzado

DESCRIPCION:

En general, los estímulos estresores pueden inducir respuestas adaptativas o mal adaptativas dependiendo, entre otras cosas, de la intensidad y la duración. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios que relacionen cuantitativamente y cualitativamente la intensidad de estrés al que es expuesto un animal y la expresión de proteínas del hipocampo. Objetivo: Evaluar la expresión diferencial de proteínas hipocampales en ratas wistar-UIS, expuestas a diferentes niveles de estrés inducido por el nado forzado. Materiales y métodos: Se utilizaron 30 ratas Wistar-UIS machos distribuidas aleatoriamente en 3 grupos según el tiempo de exposición al nado forzado como estímulo estresor (0, 5 y 15 minutos). Después de 24 horas se extrajeron hipocampos dorsales y se realizó electroforesis bidimensional de las proteínas extraídas. A continuación, se llevó a cabo el procesamiento de las imágenes de los geles obtenidos utilizando el software PDQUEST 2D. Aquellas proteínas en las se detectaron intensidades asociadas a los tiempos de exposición al estímulo, se identificaron de manera presuntiva utilizando la base de datos bioinformática EXPASY (www.expasy.org). Resultados: De acuerdo con el análisis proteómico y bioinformático se identificaron 60 proteínas, de las cuales, 38 eran comunes al hipocampo derecho e izquierdo; 13 del hipocampo derecho y 9 del izquierdo. Conclusión: Se encontraron diferencias en la expresión de proteínas entre el hipocampo derecho e izquierdo del tipo dosis dependientes decrecientes después de haber sido sometido al animal a diferentes niveles de estrés inducido por la prueba de nado forzado.

*Proyecto de Grado

** Facultad de Salud Departamento de Ciencias Básicas Director Dr. Rodrigo Torres Sáez Ph.D.
Codirector Dr. Carlos Conde Cotes MD, Ph.D

ABSTRACT

TITLE

EVALUATION BEHAVIORAL AND BRAIN PROTEOMICS (AMYGDALA AND HIPPOCAMPUS) IN RAT EXPOSED TO DIFFERENT LEVELS OF STRESS INDUCED BY THE FORCED SWIM

KEYWORDS:

Stress, hippocampus, proteomic, forced swimming

AUTOR:

GUERRERO Bermúdez Nasser **

DESCRIPTION

In general, the stressful stimuli can induce adaptive responses or maladaptive depending, among other things, the intensity and duration. However, not found studies in the literature that relates quantitatively and qualitatively the intensity of stress that an animal is exposed and hippocampal proteins expression, structure important in the processing of stress. Objective: Evaluate the differential proteins expression hippocampal in Wistar-UIS rats, exposed to different levels of stress induced by forced swimming. Materials and methods: We used 30 rats male Wistar-UIS randomized into 3 groups according to duration of exposure to forced swimming as a stressor stimulus (0, 5 and 15 minutes). After 24 hours dorsal hippocampus were removed and two-dimensional electrophoresis was performed extracted proteins. Then, was performed the processing of the images of the gels obtained using software PDQuest 2D. Those proteins were detected in the intensities associated with the stimulus exposure times were identified presumptively using bioinformatics database EXPASY (www.expasy.org). Results: According to the bioinformatics and proteomic analysis we identified 60 proteins of which 38 are common to both left and right hippocampus, 13 were found only in the right hippocampus and 9 in the left hippocampus. Conclusion: differences in protein expression between the left and right hippocampus dose-dependent decreasing rate after the animal was subjected to different levels of stress induced by forced swimming test.

*Proyecto de Grado

** Facultad de Salud Departamento de Ciencias Básicas Director Dr. Rodrigo Torres Sáez Ph.D.
Codirector Dr. Carlos Conde Cotes MD, Ph.D

INTRODUCCIÓN

El término estrés se define como cualquier condición que perturba la homeostasis fisiológica/psicológica de un organismo. En ese sentido la vida cotidiana de todo ser vivo está expuesto a diferentes niveles de estrés. Sin embargo, existen niveles de estrés que inducen respuestas adaptativas, biológicas y comportamentales que son favorables para el individuo y la especie, mientras que niveles altos y/o sostenidos de estrés inducen respuestas mal adaptativas. Muy poco se ha escrito de manera sistemática tendiente a esclarecer las relaciones entre magnitudes (o duraciones) de estímulos estresores versus los mecanismos fisiopatológicos asociados a las respuestas maladaptativas.

Actualmente se ha despertado un gran interés por el estudio de los procesos neurobiológicos que pueden estar asociados con la intensidad y la duración de los estímulos estresores. Muchas de las patologías humanas se asocian a altos niveles de estrés, dentro de las cuales se pueden mencionar depresión, ataques de pánico, fobias, trastornos obsesivos compulsivos, estrés postraumático, trastornos de memoria, atención, etc.

La Neurociencia ha asociado al estrés con muchas estructuras del sistema nervioso central entre ellas el hipocampo y la amígdala, estructuras particularmente susceptibles a los efectos del estrés incontrolable, provocando cambios en la plasticidad neuronal. Además estas estructuras cerebrales juegan un papel crucial en la memoria y las emociones (Badowska-Szalewska E, Spodnik E, Klejbor I and Morys J. 2010).

La neurociencia ha asociado al estrés con muchas estructuras del sistema nervioso central entre ellas el hipocampo y la amígdala, estructuras particularmente susceptibles a los efectos del estrés incontrolable, provocando

cambios en la plasticidad neuronal principalmente en el hipocampo, estructura que juega un papel crucial en el aprendizaje, la memoria y las emociones (Badowska-Szalewska E, Spodnik E, Klejbor I and Moryś J. 2010). Por otro lado, la proteómica aplicada a la identificación y cuantificación de proteínas cerebrales, está siendo utilizada ampliamente en las neurociencias con el fin de buscar marcadores diagnósticos y nuevos blancos de medicamentos (Colantonio, 2005; LaBaer, 2005; Morrison, 2002). En este sentido, se recurre con frecuencia al uso de modelos animales que ilustren aspectos psicopatológicos para estudiar el comportamiento de los seres humanos, siendo las ratas los modelos más empleados para estos estudios (Gómez y Saldivar, 2002; Botelho de Oliveira, 2003; E. Mustaca, 2006; Shuhama, 2007).

Dentro de los modelos para el estudio de depresión y objeto del presente trabajo, se destaca la prueba de Nado Forzado, descrita por primera por Porsolt (1977), que es actualmente una de las pruebas más utilizadas para evaluar distintos tipos de tratamiento antidepresivos. Algunos de los argumentos a su favor como modelo de depresión se fundamentan en el hecho de que incluye la exposición a un estímulo estresor “inescapable” que induce comportamientos homologables con algunas manifestaciones depresivas en el humano (comportamientos del tipo “desesperanza aprendida” (Seligman 1973) y por una razonable sensibilidad a los efectos de algunos fármacos antidepresivos.).

No se encontró en la literatura, ningún estudio que relacione cuantitativamente ni cualitativamente, la intensidad de estrés al que es expuesto un animal y la expresión de proteínas en las áreas cerebrales de estudio (amígdala, hipocampo), estructuras importantes en el procesamiento de las situaciones de estrés. Por tal motivo el presente proyecto se orientó a aportar a la comprensión de los mecanismos neurobiológicos asociados a diferentes niveles de estrés en ratas Wistar-UIS mediante el análisis comportamental y proteómico.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ESTRÉS

El uso del término estrés se ha popularizado sin que la mayoría de las personas tengan claro en qué consiste el mismo. Al revisar la amplia literatura sobre el tema, se encuentran multitud de definiciones, algunas de las cuales lo abordan indistintamente desde la perspectiva del estrés como estímulo, como respuesta o como consecuencia.

El diccionario de la Real Academia Española define estrés como: “situación de un individuo, o de alguno de sus órganos o aparatos, que, por exigir de ellos un rendimiento superior al normal, los pone en riesgo próximo de enfermar”.

Estrés es una palabra que deriva del latín y se comenzó a utilizar ya en el siglo VII para definir “adversidad o aflicción”. A finales del siglo XVIII, su utilización evolucionó para expresar: “fuerza, presión o esfuerzo”, puestos en práctica por la propia persona, su cuerpo y su mente (Griffin y Thomson., 1998. apud. J.C. Illera et al., 2004).

Posteriormente y, desde el punto de vista de la biología y la psicología el estrés se define como “cualquier tensión o interferencia que altera el funcionamiento de un organismo” (Botelho S, Conde C. 2003). Ya Claude Bernard, en 1867, sugirió que los cambios externos en el ambiente, pueden perturbar el organismo. (Botelho S, Conde C. 2003)

Los seres humanos responden al estrés físico y psicológico con una serie de respuestas que, generalmente, recuerdan a una activación del sistema nervioso autónomo. Si el estrés es muy fuerte, o las defensas orgánicas inadecuadas, se puede producir una alteración psicosomática o mental. Por tanto, podríamos decir

que estrés es una respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda que se le imponga.

La Organización Mundial de la Salud define estrés como “el conjunto de reacciones fisiológicas que preparan al organismo para la acción”. Otros autores (Lazarus, 1966) lo definen como: “el resultado de la relación entre el individuo y el entorno, evaluado por aquel como amenazante que desborda sus recursos y pone en peligro su bienestar”. En la Literatura Científica, comprobamos que estrés implica cualquier factor que actúe interna o externamente, al cual se hace difícil adaptar y que induce un aumento en el esfuerzo por parte del animal para mantener un estado de equilibrio dentro de él mismo y con su ambiente externo.

Sin entrar a polemizar teóricamente sobre su definición, por no constituir objeto de este trabajo de investigación, el presente proyecto asumió la definición de Hans Selye, (considerado padre del concepto de estrés) quien introdujo el concepto como síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas no específicas del organismo a diferentes agentes nocivos del ambiente de naturaleza física o química, provocando un aumento de la tasa metabólica. (Selye H., 1936, apud Botelho S, Conde C. 2003).

Alternativamente para precisar conceptos, se utiliza el término "respuesta de estrés" al referirse a la respuesta inespecífica del organismo a cualquier demanda, y el término de "estresor" o "situación estresante" referida al estímulo o situación que provoca una respuesta de estrés. (Botelho S, Conde C. 2003)

La respuesta de estrés es una respuesta automática del organismo a cualquier cambio ambiental, externo o interno, mediante la cual se prepara para hacer frente a las posibles demandas que se generan como consecuencia de la nueva situación, (Labrador, 1992). Por tanto, ello no es algo "malo" en sí mismo, al contrario; facilita el disponer de recursos para enfrentarse a situaciones que se

detectan como novedosas o excepcionales. Estas respuestas favorecen la percepción de la situación y sus demandas, procesamiento más rápido y adecuado de la información disponible, posibilitan mejor búsqueda de soluciones y la selección de conductas adecuadas para hacer frente a las demandas de la situación, preparan al organismo para actuar de forma más rápida y vigorosa.

Dado que se activan gran cantidad de recursos (incluye aumento en el nivel de activación fisiológica, cognitiva y conductual); supone un desgaste importante para el organismo. Si éste es un estrés suave no se esperan problemas, pues el organismo tiene capacidad para recuperarse, si se repiten con excesiva frecuencia, intensidad o duración, pueden producir la aparición de trastornos psicofisiológicos. Los animales, en general, responden de diferente forma al mismo suceso, lo que es estresante para unas especies, razas o incluso individuos, para otros puede no serlo.

Además, en igualdad de condiciones, en la medida como se trate la evaluación y la adaptación, los estímulos estresantes pueden provocar respuestas neuroquímicas heterogéneas en los individuos, que conducen a diferentes resultados psicológicos (Anisman y Merali, 2000 apud. Hymie Anismana, Kim Mathesonb 2005).

1.1.1 Etapas en la Respuesta al Estrés

Según Selye, (Selye, 1998, apud Botelho S, Conde C. 2003) en la respuesta al estrés parecen existir tres etapas. La fase A o etapa de alerta o alarma, el organismo reconoce el estrés y responde al sentirse amenazado por la circunstancias del medio ambiente. Se prepara para la acción, ya sea de evitación, agresión o de fuga. Todas las facultades del organismo se encuentran en su estado de movilización general, pero sin que algún sistema orgánico en particular quede implicado. En la segunda etapa o fase B, también llamada estado de resistencia, el organismo se adapta a la presencia del estrés durante un periodo de tiempo indeterminado. Durante esta fase suele ocurrir un equilibrio dinámico entre el medio interno y externo del individuo. La disminución progresiva de la

respuesta de un organismo frente a una situación de estrés prolongado conduce a un estado de gran deterioro, que conlleva a una pérdida importante de sus capacidades fisiológicas. Con ello sobreviene la fase de agotamiento o fase C en la que el sujeto suele sucumbir ante las demandas ya que se reducen al mínimo sus capacidades de adaptación e interrelación con el medio, pudiéndole causar muchas de las patologías enunciadas anteriormente y la muerte. **Ver figura 1**

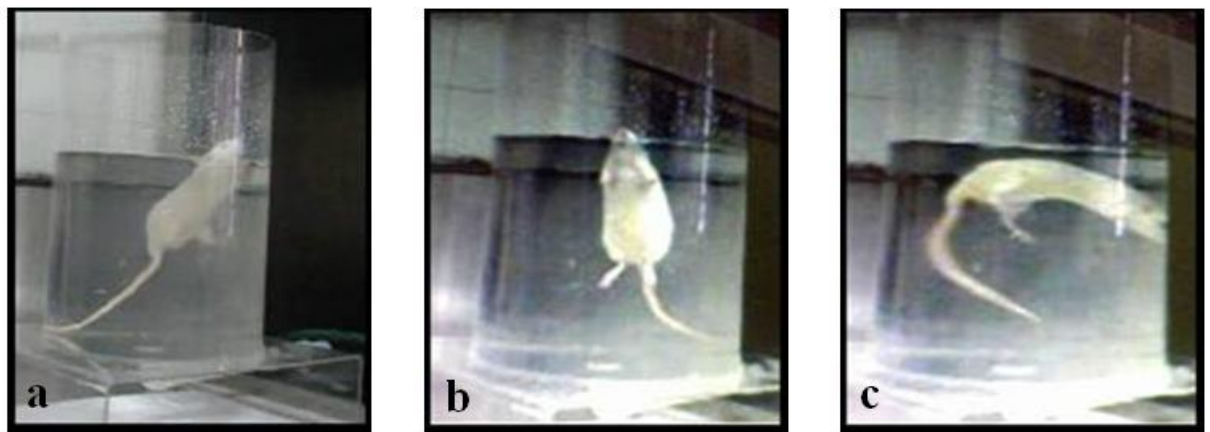


FIGURA 1 Etapas de la respuesta al estrés de una rata expuesta al nado forzado. a) Fase de alerta o alarma, b) Fase de resistencia y c) Fase de agotamiento comportamental

Selye (Selye, 1998., apud. Illera, J.C. et al., 2004) consideró entonces que varias enfermedades como las cardíacas, la hipertensión arterial y los trastornos emocionales o mentales no eran sino la resultante de cambios fisiológicos consecuentes a un prolongado estrés en los órganos de choque mencionados y que estas alteraciones podrían estar predeterminadas genética o constitucionalmente. Sin embargo, al continuar con sus investigaciones, integró a sus ideas, que no solamente los agentes físicos nocivos actuando directamente sobre el organismo animal son productores de estrés, sino que además, en el caso del hombre, las demandas de carácter social y las amenazas del entorno del individuo que requieren de capacidad de adaptación provocan el trastorno del estrés.

No obstante las respuestas de estrés son obligatorias en seres vivos, la persistencia del estímulo estresor o la magnitud del mismo, pueden inducir efectos lesivos al propio organismo, manifestándose en comportamientos mal adaptativos (por ejemplo la respuesta de tipo “desesperanza aprendida”) y manifestándose en respuestas fisiológicas como hiperacidez gástrica con úlceras, trastornos neuroendocrinos como los asociados a periodicidad de los ciclos estrales, trastornos de la fertilidad, trastornos cardiovasculares etc (Seligman 1973).

En los últimos años, y dentro del contexto de los efectos del estrés, se le está dedicando mucha atención a sus repercusiones sobre el sistema inmunitario.

Existen pruebas evidentes de que el estrés suprime la actividad del sistema inmunitario, haciendo al organismo más susceptible a las infecciones. Un organismo con un sistema inmune deficitario es, también, menos capaz de controlar, de forma natural, las mutaciones celulares que conducen a la aparición del cáncer (Illera J., Silván G, Gil-Cabrera F, Illera M. 2009).

Existen varios ejemplos que definen la relación entre el estrés y el estado inmunitario: cuando los animales de laboratorio están físicamente retenidos y sujetos, a la vez que se les aplica un choque eléctrico, o están en un ambiente ruidoso, o viven materialmente hacinados; tales animales presentan una actividad disminuida de su sistema inmunitario. Esto mismo se ha podido confirmar en otras especies, como por ejemplo, la especie bovina (Illera J., Silván G, Gil-Cabrera F, Illera M. 2009).

1.1.2 Características de los Estímulos Estresores

La exposición a un estímulo estresor puede durar desde pocos segundos hasta días o semanas y los efectos del estrés sobre el sistema endocrino son dependientes del tiempo de exposición.

Según sus características los estímulos estresantes pueden ser: (Illera J., Silván G, Gil-Cabrera F, Illera M. 2009)

- Estímulos físicos, estímulos térmicos, químicos, eléctricos, etc., distintos tipos de lesiones, como por ejemplo lesión tisular, hemorragia, otro tipo de alteraciones orgánicas como hipoglucemia, infecciones, etc.

- Estímulos psicológicos o emocionales, entre los que se incluyen: Miedo, ansiedad, sorpresa, transporte, confinamiento, etc.

- Estímulos mixtos o físico-emocionales, que serían una mezcla de los dos grupos anteriores y, por tanto, los más frecuentes.

Según la duración del estímulo estos pueden ser:

- Agudos: Es la forma de estrés más común. Es el producto de una agresión intensa ya sea física o emocional, limitada en el tiempo pero que supere el umbral del sujeto, da lugar a una respuesta también intensa, rápida y muchas veces violenta. Por ejemplo un transporte de corta duración.

- Crónico: Se presenta de forma prolongada en el tiempo, continuo, no necesariamente intenso, pero exigiendo adaptación permanente, se llega a sobrepasar el umbral de resistencia del sujeto para provocar las llamadas enfermedades de adaptación. Por ejemplo, un confinamiento prolongado en condiciones incompatibles con el bienestar animal.

Según la modalidad de presentación del estrés crónico se pueden distinguir dos tipos: crónico continuo y crónico intermitente. En el estrés crónico continuo el animal puede ser sometido de manera ininterrumpida a estrés durante días o semanas, mientras que en el crónico intermitente los animales son diariamente

expuestos durante semanas a una situación estresante con un tiempo de exposición diario que va desde minutos hasta horas. Como ejemplo de un modelo de estrés continuo se puede mencionar el estrés social, observado tanto en monos como en roedores. El estrés social es particularmente notable cuando se potencia el comportamiento agresivo de los machos por la presencia de las hembras.

Anisman y Matheson (2005) de acuerdo con Herman y Cullinan, (1997), consideran los estímulos estresores desde una perspectiva amplia, los clasifican en estresores “de procesamiento” o “*processive*” y estresores sistémicos. El primero, pudiendo ser de naturaleza física o psicológica, involucra la evaluación de una situación o estímulo, requiriendo procesamiento cortical de alto orden, estos incluyen los modelos de miedo condicionado, estrés psicológico y en general, los de condicionamiento aversivo (Figueiredo et al. 2003; Hayley et al., 2001, Morrow et al., 2000. apud. Hymie Anismana, Kim Mathesonb 2005). El segundo, de tipo sistémico, se relaciona con procesos metabólicos, respiratorios, inmunológicos etc.

Los dos tipos de estresores llevan a muchos efectos similares, incluyendo aumento de la liberación de CRH (Hormona liberadora de corticotropina), ACTH, corticosterona, así como monoaminas en el hipotálamo (Anisman et al., 1998; Shintani et al., 1995. apud. Hymie Anisman, Kim Matheson 2005). Sin embargo, el estresor “*processive*” puede inducir la activación del sistema Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA) a través de la vía límbica, mientras que el estrés sistémico pueden hacerlo a través de mecanismos no límbicos (Herman y Cullinan, 1997). Así, de estos retos diferentes no se deben esperar que induzcan efectos neuroquímicos idénticos, ni necesariamente obtener resultados idénticos de comportamiento.

1.1.3 Respuesta Fisiológica del Estrés

La Respuesta fisiológica del Estrés se puede calificar como una respuesta neuroendocrina que afecta a diferentes sistemas orgánicos dando lugar a

adaptaciones frente al estímulo estresor. Selye, además de introducir el término estrés, acuñó el término Síndrome General de Adaptación (GAS), que explica esta respuesta neuroendocrina.

Es sabido que la respuesta de estrés prepara al organismo para la lucha o la huida. La glucosa, fuente principal de energía del organismo, se pone en movimiento desde sus zonas de almacenamiento. La sangre, que transporta la glucosa y el oxígeno, se desvía de los órganos no esenciales para el ejercicio físico, tales como la piel y el sistema gastrointestinal, y se dirige, rápidamente, hacia los órganos cruciales: corazón, músculo y cerebro. Estas modificaciones del flujo se consiguen mediante la constricción de determinados vasos sanguíneos, la dilatación de otros y el aumento del ritmo cardiaco. Simultáneamente, se pueden potenciar los procesos de cognición y disminuye la percepción del dolor. Las actividades fisiológicas que no aportan un beneficio inmediato se retardan, con lo que procesos tan importantes como el crecimiento, la reproducción, la digestión, etc. pueden llegar a inhibirse. Toda esta sintomatología obedece a una activación repentina del sistema nervioso simpático y, con ello, la liberación de varias hormonas y la inhibición de otras (Illera, JC, 2000).

De acuerdo con McEwen (1993) (apud Mucio J. 2007), existen sistemas que participan de manera importante durante el estrés, tales como el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) y el sistema nervioso autónomo. El HPA es el sistema neuroendocrino involucrado en la mediación de la respuesta al estrés. La hormona liberadora de corticotropina (CRH) regula y controla de manera muy importante este eje. Otras hormonas hipotalámicas involucradas en la respuesta al estrés son la vasopresina y el péptido de la pituitaria activador de la adenilato ciclasa (PACAP) (Squire L, et al. 2003 apud Mucio J. 2007)

Existen tres rutas principales, mediante las cuales el organismo inicia la respuesta al estrés (Illera, JC, 2000).

a) La llamada ruta neutra (A) responde casi de inmediato, La sangre se desvía desde órganos no esenciales para el ejercicio físico hacia órganos importantes como el corazón, el músculo y el cerebro. Estas modificaciones se consiguen mediante constricciones y dilataciones de determinados vasos sanguíneos. La vasoconstricción produce aumento de la presión sanguínea, disminuye la temperatura superficial del cuerpo y aumenta el ritmo cardiaco y respiratorio.

b) La ruta endocrina (ruta B) puede presentar un retraso de varios segundos. Las concentraciones de catecolaminas en sangre, se consideran como la medida más precisa de la activación, inducida por estrés, del sistema medular simpático.

Además, cuando actúa el estresante hay una liberación de corticoides adrenales que puede, incluso, llegar a vaciar los depósitos de estas hormonas en la corteza adrenal, con lo que si persiste el estímulo la hiperplasia e hipertrofia de la glándula serán síntomas sobresalientes. Si la acción estimulante perdura durante mucho tiempo, y dependiendo de la capacidad de resistencia del individuo, se puede llegar a producir la muerte.

c) La ruta C está relacionada con el estrés a más largo plazo ya que, para que aparezcan los síntomas característicos, se requiere un período mínimo de 48 horas, después de haberse producido el estímulo. Al verse alteradas las concentraciones de gonadotropinas es muy posible que tengan lugar diversas alteraciones reproductoras.

Lo anterior indica que para que se pueda reaccionar adecuadamente ante una situación de estrés es imprescindible que exista una normalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales.

Por consiguiente se puede decir, que la respuesta corporal, a un aumento de demanda física o psicológica, es la liberación de hormona adrenocorticotropa

desde la adenohipófisis, glucocorticoides desde la corteza adrenal, epinefrina desde la médula adrenal y norepinefrina desde el sistema nervioso simpático (Illera, JC, 2000).

Estas hormonas sirven, como se ha indicado, para adaptar al organismo a los estímulos estresores, que varían desde un tipo medio de cambio psicológico a un grave cambio físico. La respuesta integradora del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, que se ha considerado anteriormente, ocurre a través de interacciones entre circuitos cerebrales sensibles al estrés y neuronas neuroendocrinas del núcleo paraventricular del hipotálamo (Illera, JC, 2000).

1.1.4 Importancia de la Glucosa en Situaciones de Estrés

La liberación de adrenalina en respuesta al estrés estimula la liberación de glucosa, a partir de glucógeno hepático a la circulación sistémica (Nelson D y Cox M. 2004). Tal incremento en los niveles de glicemia, permite tener recursos energéticos disponibles para ser utilizados durante una situación de emergencia, especialmente para el incremento de la actividad locomotora.

Al inyectar tanto adrenalina como glucosa en ratas, se regulan varias funciones cerebrales, incluyendo la potenciación del aprendizaje y la memoria. Parsons y Gold en 1992, encontraron que la glucosa tenía un efecto dosis-tiempo-dependiente similar al de la adrenalina (en forma de U invertida), siendo más efectivo cuando la glucosa se administraba después del entrenamiento (Hall y Gold 1986, Hall y Gold 1992, Gold 1995). Así mismo, se ha observado que, en respuesta a una demanda cognitiva, los niveles de glucosa disminuyen en el líquido extracelular del hipocampo, actuando como un marcador de procesos mnemónicos (Manning et al 1993, Gold 2005).

En humanos se han obtenido resultados similares, con la administración de glucosa en pruebas donde se evalúa la memoria declarativa, en participantes tanto

jóvenes como ancianos, de ambos sexos, y con patologías como esquizofrenia (Hall et al 1989, Parsons y Gold 1992, Benton y Owen 1993, Foster et al 1998, Newcomer et al 1999).

De igual modo, se ha demostrado que en personas con disregulación de la glucosa y con diabetes tipo 2 que presentan deterioro en el desempeño neuropsicológico, relacionado principalmente con la memoria declarativa, la administración sistémica de glucosa, mejora el desempeño cognitivo (Messier y Gagnon 1996, Awad et al 2002). No solo la administración de glucosa se relaciona con buen desempeño cognitivo, sino que, en pruebas con contenido emocional, los niveles de glicemia post prueba aumentan, correlacionándose de manera positiva con el desempeño mnemónico (Blake et al 2001).

1.1.5 Uso del Consumo de Oxígeno como Indicador de Estrés en Animales de Experimentación

El consumo de oxígeno (VO_2) es un parámetro que expresa el volumen de oxígeno que consume o utiliza un organismo en una unidad de tiempo. Es considerado como equivalente de la capacidad funcional del organismo (Bramante 1961), la cual se puede medir de forma absoluta, (L/min) o de forma relativa, (mL/Kg/min). Las metodologías utilizadas para su evaluación van desde cálculos matemáticos (Cerezo y García 2004, Medrano 2008, Torres et al 2008), hasta sistemas sofisticados con altos costos y con niveles tecnológicos exigentes (Messner-Pellenc et al 1994).

La determinación del consumo de oxígeno ha sido ampliamente utilizada en diferentes organismos, con el fin de determinar el estado funcional general del individuo y su relación con procesos metabólicos (Cerezo y García 2004), con el nivel de actividad física (Medrano 2008), y con la función cardio-respiratoria, entre otras. A su vez, tal estado funcional es dependiente de aspectos que pueden considerarse como constitutivos (densidad de receptores, sistemas enzimáticos

expresados genéticamente (Ball y Jungas 1961), sexo (Medrano 2008), edad (Medrano 2008) etc.); y también de aspectos ambientales, que influyen en las necesidades adaptativas (nivel de estrés, consumo de alimentos y agua (Cerezo y García 2004, Yamaoka et al 2009), deficiencia de nutrientes (Adelman y Holliday 1977, Ohira et al 1981) condiciones del medio ambiente, (Cameron 1958, Cerezo et al 2004), fase del ciclo estral, ciclo circadiano (Yamaoka et al 2008, Yamaoka et al 2009), etc.

Se ha encontrado que las catecolaminas responden a un incremento en la actividad física aumentando sus concentraciones plasmáticas hasta 4 veces más de lo que se presenta en reposo (Hulks et al 1991). La mayoría de estudios relacionados con consumo de oxígeno y catecolaminas, están orientados hacia la relación entre el estrés generado por la intensidad del ejercicio físico o por el estrés mental, con la activación del sistema nervioso simpático, así como con la respuesta simpato-adrenal, que lleva a un incremento endógeno en la secreción de adrenalina y noradrenalina, asumiendo que tal incremento es responsable de la mayoría de los efectos simpato-adrenérgicos presentados (Stallknecht et al 2001, Reims et al 2004).

Estudios llevados a cabo con el fin de evaluar la adaptación metabólica a diferentes situaciones, como el ejercicio (West et al 2006) o la exposición al frío, mostraron que el efecto de la adrenalina sobre el consumo de oxígeno es dosis dependiente, es decir, dosis bajas tienen poco efecto, moderadas lo aumentan, dosis altas lo disminuye (Himsworth 1968, Alexander et al 1972). En el caso de la disminución encontrada en dosis altas, se piensa que, es debido a una posible supresión voluntaria de la actividad muscular (Alexander et al 1972).

1.1.6 Estructuras Cerebrales de Estudio

1.1.6.1 El Hipocampo. Una de las estructuras de estudio, el hipocampo, situado en la parte medial del lóbulo temporal, constituye una estructura cerebral que juega un papel crucial tanto en la memoria (declarativa- explícita en los seres humanos y la memoria espacial-relacional en los roedores) (Scoville y Milner, 1957; Squire y Zola-Morgan, 1996; Eichenbaum et al., 1992), como en la regulación neuroendocrina de las hormonas del estrés. (Kim J.J y Diamond D.M. 2002).

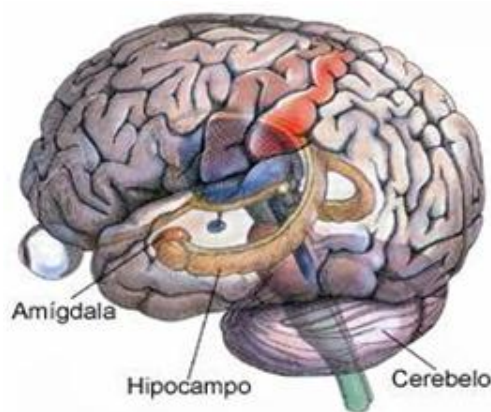


FIGURA 2. Ubicación del hipocampo y amígdala en el cerebro

Es considerado particularmente susceptible a los efectos del estrés incontrolable y es catalogado como una de las dianas de las hormonas del estrés, con una de las mayores concentraciones de receptores para corticosteroides del cerebro de los mamíferos. Una función neuroendocrina del hipocampo es participar en la terminación de la respuesta de estrés por medio de una retroalimentación negativa mediada por glucocorticoides del sistema hipotálamo-hipofisario-adrenal. (Reul y de Kloet, 1985; McEwen y Sapolsky, 1995. apud. Kim J.J., et al 2005).

En el hipocampo existen dos tipos de receptores para corticosteroides, los mineralocorticoides (MRs) y los glucocorticoides (GRs). Estos últimos, de menor afinidad y ocupados de manera masiva por corticosteroides en la respuesta al estrés, son los principales mediadores de los efectos adversos del estrés en el hipocampo (afectan negativamente al metabolismo neuronal, la supervivencia celular, las funciones fisiológicas y la morfología neuronal del hipocampo en las ratas) (Kim J.J y Diamond D.M. 2002)

A parte de jugar un papel crucial en la memoria, juega un papel fundamental en el aprendizaje y las emociones (Bremner 1999, Lisman 1999, McEwen y Magariños de 2001, Bartolomucci et al. 2002, Richter-Levin 2004, Aggletony Brown 2005, McEwen y Gianaros 2010. Apud. Ewa Badowska-Szalewska, et al. 2010), participa también en la regulación y el control de la ansiedad respuesta condicionada y el miedo (Yee et al. 2007. Apud. Ewa Badowska-Szalewska, et al. 2010).

Además, este componente de alta sensibilidad del cerebro posee un alto grado de plasticidad (McEwen y Gianaros 2010. Apud. Ewa Badowska-Szalewska, et al. 2010) y es un elemento clave en la respuesta neuroendocrina (Yan et al. 1997. Apud. Ewa Badowska-Szalewska, et al. 2010).

Numerosos estudios en las dos últimas décadas apoyan la idea de que el estrés y las hormonas del estrés deterioran las formas de memoria dependientes del hipocampo, tanto en humanos como en animales. Así por ejemplo, los pacientes con trastorno por estrés postraumático (TEP) presentan atrofia del hipocampo y déficit marcados en las tareas de recuerdo dependientes del hipocampo. Más aún, la administración de cortisol a niveles similares a los del estrés en sujetos normales, deteriora de forma selectiva la memoria verbal declarativa, sin afectar a la no-verbal (procedimental). Hay datos concordantes en pacientes con depresión e hipercortisolemia, o en pacientes con enfermedad de Cushing (secreción excesiva de corticosteroides). (Kim J.J y Diamond D.M. 2002)

Existe evidencia que demuestra que el hipocampo se encuentra dividido en hipocampo dorsal y ventral, estando el primero vinculado preferiblemente a la función del aprendizaje espacial y el segundo a regular comportamientos defensivos relacionados a ansiedad (Bertoglio, 2006; Rogers, 2006; Nascimento, 2007).

El papel de éste último en el procesamiento emocional es distinto al de la amígdala, que está vinculada específicamente con el miedo (Bannerman, et al., 2004).

Se ha formulado la hipótesis de que el estrés inducido provoca cambios en la plasticidad del hipocampo, lo cual podría ser la base neural de trastornos de estrés en la memoria hipocampal (Kim y Yoon, 1998; Kim y Diamond, 2002).

Además de jugar un papel importante en la memoria, el aprendizaje y las emociones, el hipocampo está implicado en la regulación del ánimo y guarda relación con síntomas vegetativos y déficits cognitivos observados en pacientes depresivos. Se ha encontrado que la hipercortisolemia y, en general, el aumento de glucocorticoides asociado a estrés tienen importantes efectos neurotóxicos sobre el hipocampo, con pérdida neuronal y menor neurogénesis (la que se ha comprobado que persiste a lo largo de la vida en diversas especies de mamíferos). Los consecuentes déficits cognitivos, particularmente de ciertas formas de memoria, son frecuentes en pacientes depresivos, contribuyendo, de hecho, a mantener la depresión (Herbert J. 1997, Reid IC, Stewart CA, Lupien SJ, Lepage M. Apud Trucco M. 2002)

Lesiones severas del hipocampo producen profundas dificultades en la formación de nuevos recuerdos (amnesia anterógrada), y a menudo también afecta los recuerdos formados antes de la lesión (amnesia retrógrada). Aunque el efecto retrógrado normalmente se extiende a algunos años antes del daño cerebral, en algunos casos los recuerdos más antiguos permanecen. Esta preservación de los

recuerdos antiguos ha llevado a la idea de que la consolidación a lo largo del tiempo implica la transferencia de recuerdos desde el hipocampo a otras partes del cerebro. (Squire, LR; Schacter DL 2002).

1.1.6.2 La Amígdala Anatómicamente, la amígdala está conectada tanto directamente como indirectamente (a través de la corteza entorrinal) con diversas regiones del hipocampo.

La amígdala desempeña un papel primordial para el aprendizaje emocional y para la manifestación de los efectos relacionados con el estrés tanto a nivel conductual como en el funcionamiento hipocámpico. La lesión o la supresión farmacológica de la amígdala previene la erosión gástrica, la analgesia, o la conducta ansiosa inducidos por el estrés, bloquea el efecto modulador de drogas sobre la memoria dependiente del hipocampo, y deteriora la potenciación de sinapsis a largo plazo (LTP) *in vivo*. (Henke, 1981; Grijalva et al., 1986), la analgesia (Helmstetter, 1992), y en modelos de ansiedad (Adamec et al. 1999).

Los receptores NMDA de la amígdala parecen implicados en la regulación de la potenciación de sinapsis a largo plazo (LTP) hipocámpica. Así la infusión de antagonistas NMDA en el núcleo basolateral de la amígdala, deteriora la potenciación sináptica en el giro dentado (hipocampo). Más específicamente, la estimulación de la amígdala tiene un efecto bifásico dependiente del tiempo (inmediatamente excitatorio y uno inhibitorio más duradero) sobre la potenciación de sinapsis a largo plazo (LTP) del hipocampo. (Kim J.J y Diamond D.M. 2002)

Es interesante reseñar que las lesiones en la amígdala también previenen el incremento en la eliminación de catecolaminas inducido por el estrés, que se postula como mecanismo subyacente al deterioro de la memoria de trabajo en la corteza prefrontal. (Kim J.J y Diamond D.M. 2002)

El núcleo basolateral de la amígdala parece jugar un papel clave en la modulación de la adquisición y la consolidación de la memoria, especialmente en relación al papel de los glucocorticoides.

Hallazgos sugieren que la amígdala, a través de su proyección hacia el hipocampo (Krettek y la Price, 1977; Pikkarainen et al., 1999. apud. Kim Jeansok J., et al 2005), podría estar implicada en la mediación de los efectos del estrés en el funcionamiento del hipocampo.

Muy poco se ha escrito de manera sistemática tendiente a esclarecer las relaciones entre magnitudes (o duraciones) de estímulos estresores versus los mecanismos fisiopatológicos asociados a las respuestas maladaptativas.

1.1.7 Modelos Animales en el Estudio del Estrés.

Existen varios modelos animales diseñados para estudiar el estrés; tales modelos se pueden dividir en dos grandes grupos: los modelos basados en respuestas incondicionadas y los que se fundamentan en respuestas condicionadas (Gómez y Saldivar, 2002; Botelho y Conde, 2002).

En los modelos basados en respuestas condicionadas, como el modelo de Geller-Seifter y el modelo de Vogel (modelos centrados en estresores biológicos y físicos), el individuo se encuentra perturbado por la confluencia de dos impulsos antagónicos; uno es la realización de una conducta que satisfaga una necesidad dominante (beber o comer), y otro, la posibilidad de recibir, durante la consumación de dicha conducta, un estímulo adverso reconocido como tal mediante el aprendizaje (Gómez y Saldivar, 2002).

Los modelos basados en respuestas incondicionadas emplean la curiosidad natural de exploración de los animales de laboratorio. En estos modelos se observa el instinto animal de protegerse frente a potenciales predadores, aunque estos no sean identificables.

En modelos animales el estrés produce atrofia del hipocampo y la corteza prefrontal, e hipertrofia de la amígdala lateral. Estas alteraciones morfológicas deterioran la memoria, el aprendizaje y el procesamiento emocional de los estímulos sensoriales.

En humanos, estudios de neuroimágenes han demostrado que en patologías relacionadas con el estrés, como son los trastornos depresivos, los pacientes presentan disminución del volumen hipocampal y de la corteza prefrontal, estas alteraciones contribuyen al déficit cognitivo de la depresión mayor (McEwen B.S., Chattarji S. 2004).

La validez de los modelos animales

El establecimiento de categorías de validez de los modelos animales posee un valor en principio práctico, y a la postre también teórico, por cuanto permite la identificación de áreas en las que la información sobre un modelo en particular no existe o es escasa, al tiempo que posibilita la comparación de diferentes modelos sobre la base de resultados con ellos obtenidos. A continuación se exponen los principales criterios de validez considerados habitualmente. (Escorihuela R, Fernández-Teruel A. 1998)

a) Validez aparente

Se refiere a la existencia de similitud fenomenológica entre aquello que se observa en el modelo y el proceso o trastorno (psicopatológico) que se intenta simular.

En general la validez aparente de los modelos animales dependerá de la unanimidad y precisión en los criterios vigentes para el diagnóstico de la psicopatología que se pretende simular. Por ejemplo, el desacuerdo en la categorización del trastorno obsesivo-compulsivo dificulta la existencia de modelos apropiados. Por otro lado, el hecho de que en muchos casos la sintomatología humana se base en la verbalización de experiencias subjetivas, imposibles de simular en animales de laboratorio, también dificulta el progreso en la validez

aparente de los modelos. La validez aparente es, en muchos casos, prescindible para que un modelo sea útil en la investigación, si al menos cumple con el siguiente criterio.

b) Validez predictiva

Se refiere a si un modelo discrimina o refleja eficientemente los efectos que determinadas sustancias (y tratamientos no farmacológicos) presentan en la condición (normal o anormal) humana que se pretende simular. Un modelo con excelente validez predictiva permitirá incluso el ensayo de nuevas sustancias experimentales (potenciales psicofármacos) y, en función de los efectos observados, predecir el tipo de efecto que tendrá sobre la condición humana que se simula. El concepto de validez predictiva alcanza también a la similitud, entre el modelo y aquello que modela en el tipo de régimen de tratamiento (ej. crónico o agudo) que resulta eficaz.

Por otra parte, no menos importante es el hecho de que el modelo debe presentar el mínimo posible de «*falsos positivos*» (sustancias o tratamientos que tienen efecto «terapéutico» en el modelo pero no en la condición humana simulada) y de «*falsos negativos*» (sustancias o tratamientos que no presentan efecto en el modelo y sí en la condición humana que se simula).

c) Validez de constructo

Se refiere a que el modelo presente consistencia teórica, y mida aquello que pretende medir (o que pretende simular). El juicio sobre este tipo de validez implica asumir la posibilidad de que ciertas explicaciones o teorías/hipótesis sobre la psicopatología humana (o de aspectos específicos o síntomas) puedan ser aplicables a otras especies, dado que enjuiciar la validez teórica implica determinar el grado de similitud o analogía entre los antecedentes, variables (o procesos) intervinientes, y consecuentes que aparecen en el modelo y en la condición que se pretende modelar. Puede entenderse, por tanto, que la

"validación de constructo" de un determinado modelo sea un proceso dinámico, en evolución continua, puesto que las mismas teorías o hipótesis sobre los mecanismos (psicológicos o neurobiológicos) antecedentes e intervinientes en cualquier neuro- o psicopatología están a su vez sometidas permanentes cambios.

d) Validez convergente o concurrente

Se refiere al grado con que un determinado modelo se correlaciona con otros que intentan medir o simular el mismo constructo. En Neurociencias de la conducta parece generalizarse la razonable convicción, cada vez más intensa, de que definir constructos a partir de múltiples métodos de medida (ej. usar varios modelos de ansiedad, en lugar de uno sólo) es más útil y heurístico (aunque también más laborioso) que trabajar con medidas o modelos únicos (Geyer y Markou, 1995 apud Escorihuela R, Fernández-Teruel A. 1998).

A primera vista, estos criterios fundamentales parecen ser relativamente sencillos. Sin embargo, cumplir estos criterios puede, de hecho, cumplir con múltiples obstáculos. Algunos de estos son relacionados con la definición del síndrome que se simula, mientras que otros están alineados con la diferencia individual de factores que influyen en la evolución de los síntomas clínicos.

De acuerdo a la definición de estrés anteriormente descrita, cualquier modelo experimental animal incluye una situación de estrés para el animal, no obstante, algunos apuntan más directamente a este proceso y son utilizados como herramientas para el estudio específico de las manifestaciones del estrés. Se pueden mencionar algunos como el de inmovilidad prolongada, el de estimulaciones múltiples variadas y prolongadas o inclusive el de estrés farmacológico inducido por sustancias, que en general, aumentan las tasas metabólicas del animal. En el caso del presente proyecto, por razones de "conveniencia operativa" y por las características del estímulo, se ha escogido el

modelo de nado forzado como una herramienta que podría ser útil para abordar los objetivos propuestos.

1.1.8 Nado Forzado

La prueba de nado forzado, descrita por primera por Porsolt (1977) en búsqueda de un modelo animal de depresión, es actualmente el test más utilizado para evaluar distintos tipos de tratamiento antidepresivos.

Algunos de los argumentos a su favor como modelo de depresión se fundamentan en el hecho de que incluye la exposición a un estímulo estresor “inescapable” que induce comportamientos homologables con algunas manifestaciones depresivas en el humano (comportamientos del tipo “desesperanza aprendida”) y por una razonable sensibilidad a los efectos de algunos fármacos antidepresivos. (Seligman 1973).

Cabe resaltar, que el presente proyecto no pretendió abordar preguntas relacionadas con la validez de este modelo como modelo de depresión, sino utilizarlo como herramienta para la correlación entre “magnitudes” asociadas al estímulo estresor y las respuestas tanto comportamentales como proteómicas en estructuras cerebrales específicas.

En este sentido, este modelo permitirá manipular magnitudes asociadas al estímulo (tiempo y/o frecuencia de exposición), y correlacionarlas con las respuestas tanto comportamentales como las asociadas a la expresión proteica en estructuras límbicas (amígdala e hipocampo), estas últimas, ampliamente relacionadas con repuestas autonómicas y emocionales.

1.1.9 Categorías Comportamentales

El comportamiento puede ser descrito en un número de formas diferentes. La distinción más simple, está entre describir el comportamiento en términos de estructura, consecuencias o ubicación espacial. La estructura es la apariencia, forma física o modelo temporal del comportamiento. El comportamiento es descrito en términos de la postura y el movimiento del sujeto. Las consecuencias son los efectos del comportamiento del sujeto en el ambiente, sobre otros individuos o sobre sí mismo, en este caso el comportamiento puede ser descrito sin referenciar como los efectos que son realizados. Las categorías tales como “obtener alimento” o “escapar de un depredador” son descritos en términos de sus consecuencias, y podrían ser calificadas irrespectivas del patrón actual de los acostumbrados movimientos del cuerpo. Las categorías comportamentales descritas en función de la ubicación espacial hacen referencia a la ubicación del animal con respecto al ambiente y/o con respecto a otros congéneres. (Martin Paul y Bateson Patrick., 1993).

Las categorías comportamentales seleccionadas deberían cumplir las siguientes normas generales:

1. Las categorías deberían ser usadas para describir las conductas con suficientes detalles para responder las preguntas y, preferiblemente proporcionar alguna información adicional personal.
2. Cada categoría debería estar precisamente definida y debería resumir tanta información relevante como sea posible acerca del comportamiento.
3. Las categorías deberían ser generalmente independientes de alguna manera u otra, esto es, dos o más categorías no deberían estar en diferentes formas, midiendo la misma cosa. (Cane 1961).

4. Las categorías deberían ser generalmente homogéneas; esto es, todos los actos incluidos dentro de la misma categoría deberían compartir las mismas propiedades.

Cuando se están escogiendo categorías puede que algunas veces sea útil tener descripciones de los principales tipos de modelo de comportamiento que tipifica las especies. En algunos casos esta información es disponible en la forma de un etograma, el cual es un catalogo de descripciones separadas, especies típicas de modelos de conductas que forman los básicos repertorios comportables de las especies. Infortunadamente, los etogramas publicados varían enormemente en el número de categorías comportamentales incluidas en detalle con las cuales éstas están descritas, o no están disponibles para algunas materias de estudio en el laboratorio. (Sceleit et al., 1984. apud. Martin Paul y Bateson Patrick., 1993).

Para el análisis de los registros y categorías comportamentales es necesario tener en cuenta los siguientes parámetros medibles:

1. Latencia: (medida en unidades de tiempo. Ejemplo segundos, minutos u horas). Es el tiempo entre eventos. Por ejemplo, el tiempo transcurrido desde el comienzo de una sesión de observación hasta la aparición de un comportamiento.

2. Frecuencia: (ejemplo evento/ segundos, minutos, horas) es el numero de eventos del patrón de comportamiento por unidad de tiempo.

3. Duración: es la medida del tiempo de duración de un evento en segundos, minutos u horas, en particular de los patrones de comportamiento.

4. Intensidad: La intensidad, a diferencia de la latencia, la frecuencia y la duración, no tiene una definición general. No obstante, puede ser útil o incluso esencial realizar juicios sobre la intensidad y la amplitud de un patrón de comportamiento. La intensidad en ocasiones puede ser medida de acuerdo a la presencia o ausencia de ciertos componentes del acto, los cuales pueden presentarse en altas intensidades pero ausentes a bajas intensidades. (Martin Paul y Bateson Patrick., 1993).

1.2 PROTEÓMICA

Los análisis proteómicos presentan gran interés dado la relación entre la variabilidad del proteoma y el funcionamiento del organismo, ya sea en estado normal o dentro de sus patologías.

La proteómica constituye un área de las ciencias biológicas dedicada al estudio de la expresión global de las proteínas y de sus cambios con respecto al contexto biológico. Está dirigida a proveer una visión comprensible de las características y actividad de las proteínas (proteoma) que son complementarias a un genoma y que se expresan en una célula, tejido u organismo, en un estado y momento particular (Morrison, 2002; Colantonio, 2005). La proteómica incluye diversos enfoques de investigación: (a) Proteómica descriptiva o estructural, (b) Proteómica comparativa o diferencial, (c) Proteómica funcional, y (d) el establecimiento de mapas moleculares subproteómicos (Plebani, 2005; Sarka, 2002).

Mientras que el genoma de un organismo es esencialmente constante a lo largo de la vida, el proteoma tiene un carácter dinámico; la expresión de proteínas cambia en diferentes etapas del ciclo celular y en respuesta a estímulos externos.

Es precisamente esta variabilidad del proteoma que lo hace tan atractivo para la investigación biomédica, en donde los análisis proteómicos, principalmente en su enfoque diferencial, conducen a identificar cambios en los patrones de expresión de proteínas entre un estado normal y uno patológico (cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades y trastornos del sistema nervioso central, búsqueda de blancos de fármacos, entre muchos otros) (Colantonio, 2005).

Consecuentemente se han considerado las proteínas como biomarcadores en el estudio de las enfermedades (LaBAer, 2005; Westman-Brinkmalm y col., 2009).

Los análisis proteómicos se realizan en tres etapas: (1) Preparación de la muestra; (2) Separación de las proteínas, e (3) Identificación de las proteínas (Gygi, 2000; Sarka, 2003).

1.2.1 Preparación de Muestras

Las muestras biológicas sometidas a electroforesis bidimensional requieren de un tratamiento previo cuyo objetivo es obtener proteínas libres de otras macromoléculas y contaminantes. Este tratamiento implica métodos de limpieza de propósito general y métodos de fraccionamiento; en los primeros se eliminan selectivamente componentes mayoritarios (lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, sales) y en los segundos se subdivide la muestra teniendo en cuenta algún parámetro como: ubicación subcelular, solubilidad diferencial, tamaño/peso molecular o punto isoeléctrico, lo cual facilita su manipulación y separación.

Las técnicas utilizadas para eliminar estos componentes tienen que cumplir ciertas condiciones: a) no pueden alterar el perfil de proteínas; no pueden introducir modificaciones sobre las proteínas; c) el número de pasos debe ser mínimo; d) incrementar la resolución de los spots; e) prevenir la agregación y pérdida de las proteínas durante la focalización y f) llevar a niveles detectables las proteínas de interés (Posch, 2006; Castellanos cap 20)

1.2.2 Solubilización de Proteínas

Dado que las proteínas no son entidades homogéneas y presentan propiedades bioquímicas y biofísicas diferentes, es importante que el proceso de solubilización sea estandarizado para cada tipo de muestra. Un procedimiento ideal de solubilización debe cumplir los siguientes requisitos: a) extraer totalmente las proteínas que desean estudiar, de modo que su abundancia en la solución de extracción refleje su abundancia relativa en la célula o el organelo; b) no modificar químicamente ningún grupo funcional presente en las proteínas; e c) impedir las reacciones de degradación provocadas por la liberación de proteasas al medio.

Para la utilización de proteínas se utilizan mezclas de agentes caotrópicos, detergentes, agentes reductores, inhibidores de proteasas y anfolitos del rango de pH adecuado. Los agentes caotrópicos como la úrea y tiourea provocan la desnaturalización de las proteínas por ruptura de puentes de hidrógeno e interacciones iónicas entre residuos aminoacídicos con cargas opuestas y algunos iones metálicos. Los detergentes rompen las interacciones hidrofóbicas intramoleculares y entre proteínas que están formando complejos proteínicos, además coadyuvan en la solubilización al romper las membranas celulares y evitar las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas que están siendo liberadas a la solución.

Los agentes reductores como el ditrioteitol (DDT) y el 2-mercaptoetanol completan la desnaturalización proteica por ruptura de puentes disulfuros (Cys-S-S-Cys).

Algunas proteínas son susceptibles a modificaciones post-extracción ya sea por hidrólisis química por efecto del pH o por degradación enzimática por la acción de proteasas. Por lo tanto, es necesario utilizar sustancias como el Tris-base o anfolitos carrier que mantienen el pH amortiguado y el fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) como inhibidor de proteasas, en algunos casos es necesaria la utilización de mezclas de inhibidores de proteasas (Sarka, 2003; Posch, 2006).

1.2.3 Electroforesis Bidimensional

Uno de los mayores desafíos de los análisis de proteomas es el fraccionamiento reproducible de esas mezclas complejas de proteínas conservando al mismo tiempo la relación cuantitativa y cualitativa. Actualmente, la electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida (2-D PAGE) es el método más utilizado en esta tarea. Mediante esta técnica es posible resolver más de 2000 proteínas en un único gel, lo cual la convierte en una herramienta importante en investigaciones proteómicas, donde múltiples proteínas deben ser separadas en análisis paralelos (Issaq 2008).

La electroforesis bidimensional 2D, separa las proteínas de una mezcla según sus dos propiedades moleculares de masa y carga bajo la acción de un campo eléctrico. En la primera dimensión la separación ocurre de acuerdo con el punto isoeléctrico (pI) y se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF). En la segunda dimensión la separación ocurre según el peso molecular y se realiza mediante SDS-PAGE. Esta segunda fase se lleva a cabo en geles de poliacrilamida (Langen 1997).

Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida. Las condiciones óptimas de una buena separación se determinan experimentalmente. La naturaleza de la muestra sirve de guía para alcanzar las condiciones en la que se deben obtener los mejores resultados (Plebani,2005; Castellanos, cap 20).

1.2.4 Isoelectroenfoque

La separación por isoelectroenfoque se basa en la diferencia en el punto isoeléctrico de las proteínas. Cuando una proteína se pone en un medio con un gradiente de pH y se somete a un campo eléctrico, ésta se desplaza a través del electrodo con carga opuesta hasta su individual y característico punto isoeléctrico.

El enfoque es un mecanismo (estado-equilibrio) con respecto al pH, donde las proteínas migran a su posición de (estado-equilibrio) desde cualquier parte del sistema y la mantienen por largos periodos de tiempo. En contraste, las proteínas en electroforesis convencional, continúan moviéndose a través del medio hasta que el campo eléctrico sea removido.

A principio de los años 80 se introdujo una modificación en la realización del IEF, la cual consistió en la co-polimerización de los anfolitos con la matriz de acrilamida creando en el gel un gradiente estable de carga. Estos geles están disponibles en

el mercado y se conocen como IPGs, geles en gradiente de pH inmovilizados. Hay variadas opciones en cuanto al rango de pI de separación y la longitud del gel de separación (están disponible comercialmente IPG desde 7cm hasta 24 cm).

Las mejores condiciones del IEF deben ser halladas experimentalmente. En una primera etapa se prefiere realizar un gel bidimensional exploratorio de rango amplio, entre pI 3-10, seguido de separación por tamaño en el rango de 14-150 KDa utilizando geles de 12%T en la segunda dimensión. Esta primera etapa permite ajustar la preparación de la muestra y la cantidad de muestra a aplicar en el gel. A continuación se selecciona un rango de pI más estrecho, con rangos de pH de 4-7 y 6-10. Cuando se desea incrementar la información sobre una región específica, se utilizan separaciones en geles llamados de rango estrecho o zoom. (Sarka, 2003; Posch, 2006; Castellanos, cap 20).

1.2.5 Rehidratación y Aplicación de la Muestra

Previo a la corrida en el IEF es necesario rehidratar los IPGs y efectuar la carga de la muestra sobre el gel. Para ello existen tres métodos: 1) rehidratación pasiva, en la cual la muestra es incluida en el buffer de rehidratación y es extendido sobre una bandeja, posteriormente se coloca el gel sobre la muestra y se mantiene en reposo durante 12 a 16 horas; 2) rehidratación activa, se diferencia de la anterior en que el proceso se realiza bajo la acción de un campo eléctrico lo cual favorece la absorción de proteínas de alto peso molecular dentro de la matriz polimérica; 3) uso de tasa de carga, es un método en el cual la muestra es aplicada después de la rehidratación del gel, es poco conveniente, pero puede resultar favorable cuando el rango de pH del IPG es alcalino. El volumen final de carga depende de la longitud del IPG: 7cm (125 μ L), 11cm (200 μ L), 17cm (300 μ L), 18cm (315 μ L), 24cm (450 μ L) (García, 2000; Colantino,2005).

1.2.6 Equilibración

Una vez finalizado el proceso de IEF es necesario completar la desnaturalización de las proteínas reduciendo los puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares. Para ello la tira del gel se sumerge en un buffer que contenga un agente reductor, principalmente Ditionitrotol (DTT). Con el fin de evitar la formación aleatoria de puentes disulfuro en las proteínas reducidas es necesario efectuar un proceso de alquilación de los grupos tioles de los residuos de cisteína, por lo cual, seguido al paso de reducción los geles se colocan en un buffer alquilante con yodoacetamida como agente de alquilación. **Figura 3.** Es importante que el buffer mantenga las propiedades solubilizadas en el interior del gel y evite las pérdidas de las proteínas por difusión, por lo cual, se emplean agentes como urea, SDS, tris y glicerol (Posch,2006; Castellanos, cap 20).

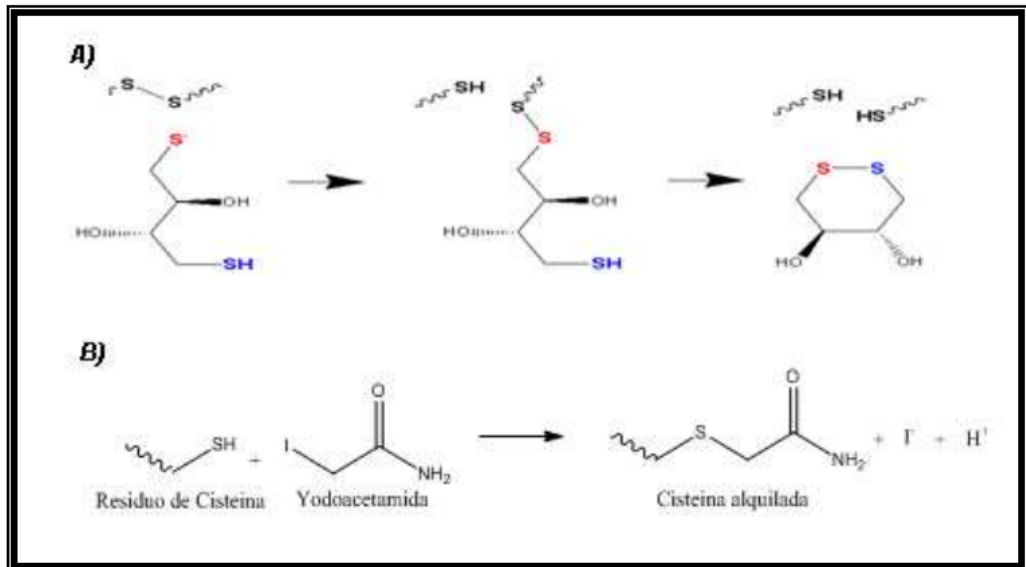


FIGURA 3. Reacciones de equilibración. A) reducción B) alquilación. Tomado de la tesis: Determinación de cambios en el perfil proteómico del hipocampo de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado bajo criterio de aprendizaje.

1.2.7 SDS-Page

La poliacrilamida es químicamente, inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparada de forma rápida y reproducible. Origina geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y permiten buena visualización de los spots durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de poder controlarse el tamaño del poro variando la concentración de polímeros. La bis-acrilamida es el agente entrecruzador más comúnmente empleado en este tipo de electroforesis, la cual puede actuar como terminador de la cadena en el proceso de polimerización y concentraciones altas pueden disminuir el tamaño del poro máximo del gel (García,2000).

Las propiedades en que se hallan la acrilamida y el entrecruzador determinan las propiedades físicas del gel como son: densidad, elasticidad, resistencia mecánica y el tamaño del poro.

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, que se producen por causa de la acción de radicales de persulfato. Las aminas terciarias como la N,N,N',N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizador de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato, mediante una reacción redox, llevando a la formación de largas cadenas de poliacrilamida.

La separación de acuerdo con el peso molecular se basa en la propiedad que poseen las proteínas, de migrar a través de un gel o una matriz de naturaleza porosa, en presencia de un campo eléctrico. La electroforesis con SDS-PAGE es un excelente método para identificar, monitorear y determinar el peso molecular de las subunidades de proteínas durante un proceso de purificación. El detergente aniónico dodecil sulfato de sodio se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de

aminoácidos, con una relación SDS/proteína máximo de 1,4 g/g). El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Independientemente de la composición aminoácida y la secuencia de la proteína, el SDS les confiere una carga negativa proporcional a su masa, permitiendo que todas las proteínas viajen al ánodo (Laemmli 1970). **Figura 4**

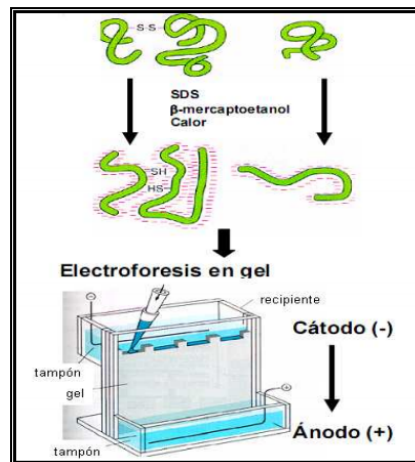


Figura 4 Desnaturalización de proteínas en SDS-PAGE

1.2.8 Métodos de Tinción

Finalmente, las proteínas deben ser identificadas mediante un método de tinción adecuado de acuerdo a la concentración de éstas en la muestra de interés. La tinción con azul de Coomassie es útil en muestras con alta concentración de proteínas. Proteínas menos abundantes, desde 1ng de proteína, pueden ser visualizadas mediante tinción con plata y tinción fluorescente. (Görg et. al. 2004).

Esta tinción requiere un medio ácido para la generación de la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van Der Waals, que

une a las proteínas y al colorante formando un complejo; esta unión es totalmente reversible en condiciones adecuadas; el límite detectable se halla entre 0.1-0.3 microgramos de proteína (Xuchu, 2007).

El colorante azul de coomassie G-250 (**Figura 5**) tiene la capacidad de acomplejarse con ciertos aminoácidos básicos como arginina, tirosina, lisina e histidina proporcionando una sensibilidad de detección proteica de 8-50 ng, a la vez de no producir un fondo (background) demasiado intenso. El gel es fácilmente desteñido utilizando agua grado HPLC.

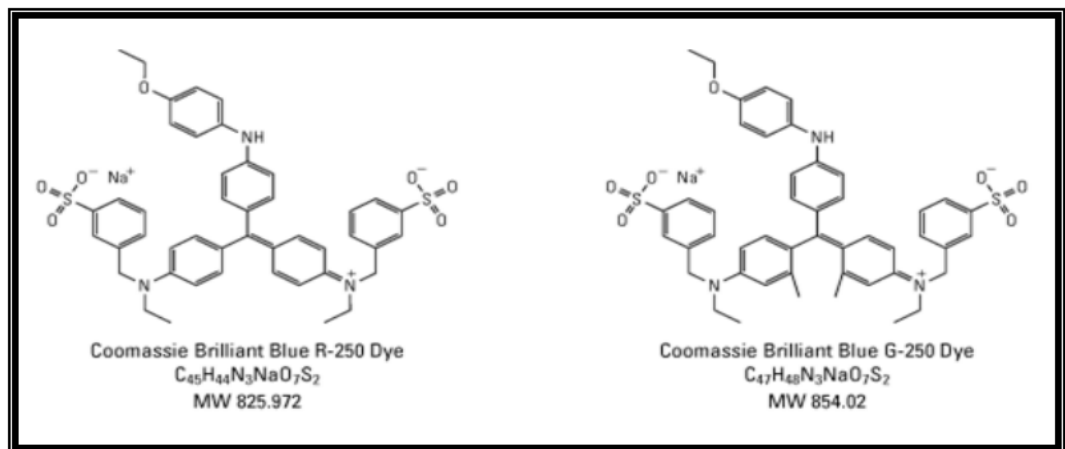


FIGURA 5 Estructuras moleculares de los colorantes Coomassie R-250 y G-250. Tomado de la tesis: Determinación de cambios en el perfil proteómico del hipocampo de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado bajo criterio de aprendizaje.

En la **figura 6**, se muestra el esquema de un análisis de proteómico diferencial.

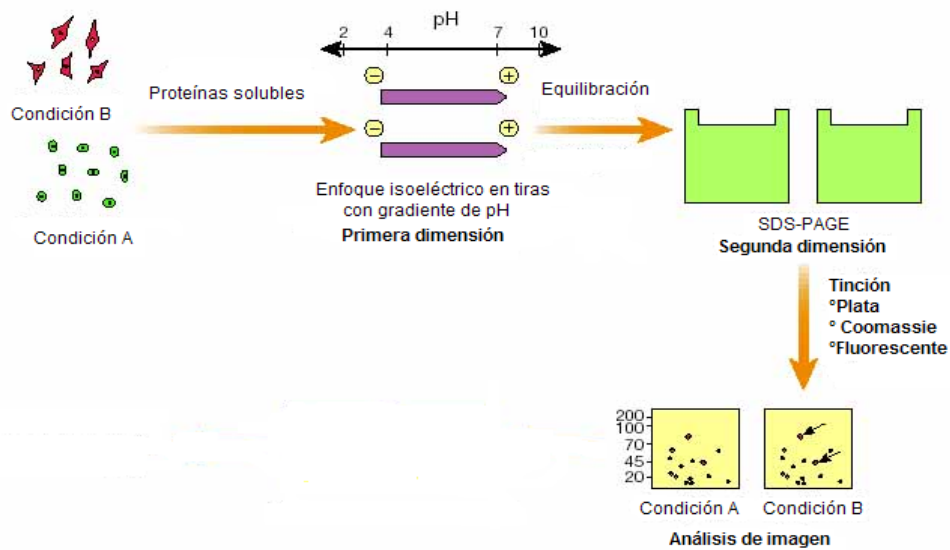


FIGURA 6. Representación esquemática de la electroforesis bidimensional. Tomada de la tesis: Análisis proteómico en plasma de pacientes con eventos coronarios agudos

1.2.9 Adquisición y Análisis de Imágenes

Antes de que los geles donde se han separado las proteínas puedan ser analizados con un sistema de evaluación de imágenes, éstos deben ser digitalizados. **Figura 7.** Los instrumentos de adquisición de imágenes más comúnmente usados son los densitómetros (GS-800, Power Look 2100XL) y los escáneres de fluorescencia (FX ProPlus). Todos ellos funcionan con software de análisis diseñados para detectar y cuantificar “spots” en las imágenes digitales, así como para comparar y analizar estadísticamente los geles de interés. Los software de análisis son PDQuest de Bio-Rad y Decyder de GE.

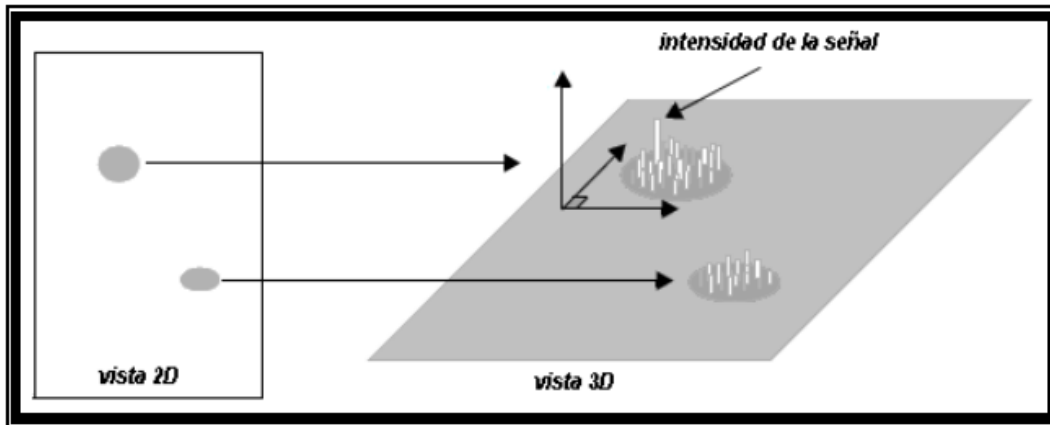


FIGURA 7 Digitalización de la imagen. Tomado de la tesis: Determinación de cambios en el perfil proteómico del hipocampo de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado bajo criterio de aprendizaje.

El análisis de los geles con el software PDQuest se realiza teniendo en cuenta los siguientes parámetros: 1) Obtención de la imagen por digitalización; 2) adecuación del tamaño y orientación de la imagen; 3) identificación de los spots de proteínas; 4) comparación y determinación de spots coincidentes; y 5) análisis cualitativos, cuantitativos y estadísticos de los datos.

1.3 ESTUDIO PROTEÓMICO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

Actualmente los avances en los análisis proteómicos tienen implicaciones en el entendimiento de las múltiples vías que gobiernan el comportamiento, la cognición y la respuesta del sistema nervioso a las enfermedades. Diversos estudios en el SNC emplean 2D-PAGE para elucidar cambios de expresión diferencial de las proteínas que participan en los mecanismos neurobioquímicos que describen dichas respuestas (Morrison, 2002; Nothwang, 2003; Nielsen, 2005; Supawadee, 2007).

La construcción de mapas proteómicos cerebrales constituyen la base de datos de referencia para estudiar cambios en los niveles de proteínas asociadas con el

desarrollo, la edad, anormalidades comportamentales o diversos desordenes que dañan el sistema nervioso, tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington, entre otras (Sarka, 2002; Wen, 2003; Nothwang, 2003; Li-Rong, 2004; Vercauteren, 2004; Nielsen, 2005; Jae-Won, 2005; Sorolla, 2008).

Se han obtenido perfiles de proteínas del cerebelo de ratas en desarrollo y ratas adultas por 2D- PAGE, identificándose cerca de 3000 manchas en los geles de cerebelo de ratas adulta. De éstas, se usaron 67 como marcadores de comparación de proteomas obtenidos de cerebelo de ratas en desarrollo (0, 3, 7, 14, 21 días post-natal), mostrando muchas de estas proteínas un incremento en su abundancia a medida que el cerebelo maduraba. Finalmente, se identificaron 29 proteínas de las 67 empleadas como marcadores, como proteínas involucradas en el proceso de desarrollo del sistema nervioso central (Morrison, 2002).

La investigación de los mecanismos moleculares relacionados con la edad del cerebro humano se ha desarrollado a través de estudios proteómicos 2D- PAGE de muestras post-mortem de tejido cerebral tomadas de cerebros jóvenes y viejos, hallándose diferencias en la expresión de proteínas con función antioxidante en el cerebro (Wen, 2003).

Los análisis proteómicos han sido aplicados a muestras cerebrales de pacientes con enfermedades neurodegenerativas o con ratones transgénicos como modelos animales de esta enfermedad. El enfoque comparativo aplicado a los análisis proteómicos realizados post-mortem a tejidos cerebrales de pacientes con enfermedad de Alzheimer y proteomas de tejido cerebral control (de la misma edad y sanos) revelaron que 37 proteínas son expresadas significativamente de forma diferente. Estas proteínas están implicadas en funciones como, metabolismo de carbohidratos, transporte de lípidos, respuesta al estrés y neurotransmisión, muchas de ellas involucradas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Morrison, 2002).

Además, se ha estudiado la respuesta del proteoma hipocampal a la expresión de proteínas mutantes presentes en formas familiares de la enfermedad de Alzheimer. Para ello, se han utilizado ratas transgénicas como modelo animal de la enfermedad, siendo el hipocampo una de las primeras regiones cerebrales en ser afectada en esta enfermedad, lo cual produce daños de memoria (Vercauteren, 2004).

Estudios post-mortem efectuados en el estriado y la corteza de cerebro de pacientes con enfermedad de Huntington y comparados contra proteomas de muestras controles (misma edad, sexo y sanos), mostraron un incremento en los niveles de expresión de proteínas relacionadas con procesos de antioxidación celular (defensa antioxidante) (Sorolla, 2008).

Otros tipos de células nerviosas, denominadas astrocitos, las cuales desempeñan funciones en el metabolismo energético, la homeóstasis neural y están relacionados a factores de crecimiento neural han sido igualmente estudiadas mediante análisis proteómico empleando 2D- PAGE (Jae-Won, 2005).

Estudios de análisis proteómico dirigido al hipocampo demostraron, la asimetría lateral empleando un enfoque combinado de 2D PAGE y MS, para examinar la expresión diferencial de proteínas en el hipocampo derecho y el izquierdo de ratas machos adultos y jóvenes. El análisis proteómico demostró diferencias cuantitativas de 41 proteínas entre el hipocampo derecho y el izquierdo. Esas proteínas participan principalmente en el metabolismo celular, transporte y tráfico vesicular, proteínas del citoesqueleto, chaperonas. (A. Samara, et, al, 2011).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto de investigación se rigió de acuerdo con todas las disposiciones y normas éticas, científicas y técnicas previstas (artículos 87 a 93) de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud. Los animales de experimentación usados, fueron aportados por el bioterio de la facultad de Salud y cumplen con la normatividad vigente del ministerio de Salud y las disposiciones de la ley 84 de 1989 referente a la investigación biomédica con animales. Adicionalmente, el presente proyecto cuenta con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

2.2 ANIMALES

Se emplearon 30 ratas Wistar-UIS machos con un peso entre 180 y 200 gramos al comienzo de las observaciones (2 meses de edad aproximadamente), provenientes del bioterio de la facultad de salud de la Universidad Industrial de Santander; mantenidas bajo temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humedad de 65% \pm 5, ciclos de luz / oscuridad de 12 horas siendo encendida la luz a las 7 de la mañana con libre acceso de comida y agua. Las ratas fueron distribuidas al azar de acuerdo al tratamiento (tiempo de exposición a la prueba de nado forzado) y colocadas en cajas viveros (50cm x 30cm x 15cm) **Figura 8**. Se conformaron 3 grupos experimentales con 10 animales cada uno (Grupo 1: 5 minutos de exposición; Grupo 2: 15 minutos de exposición y Grupo 3: Sin exposición al nado forzado) donde cada animal fue expuesto durante un tiempo diferente según la asignación aleatoria que le correspondió. (**Tabla 1**).



FIGURA 8. Cajas viveros donde se mantenían las ratas

2.3 NADO FORZADO

El tanque utilizado para la prueba de nado forzado, consistió en un cilindro de acrílico de 45 cm de altura; con un diámetro de 30 cm conteniendo agua a una temperatura de 21°C hasta un nivel de 32 cm para que el animal no alcance a tocar con la cola el fondo del tanque. En la base del cilindro se encuentra una válvula por donde se realiza la evacuación del agua una vez haya concluido la exposición de cada animal. **Ver figura 9.**

A una distancia de 1.5 metros por encima de la piscina, se ubicó una cámara ligada a un circuito cerrado de televisión y grabación digital cuyos instrumentos y manejador se ubicaron en un cuarto contiguo. La iluminación en el centro de la piscina fue de 296 lux y el cuarto experimental está construido con material cuyas paredes amortiguan el sonido externo.

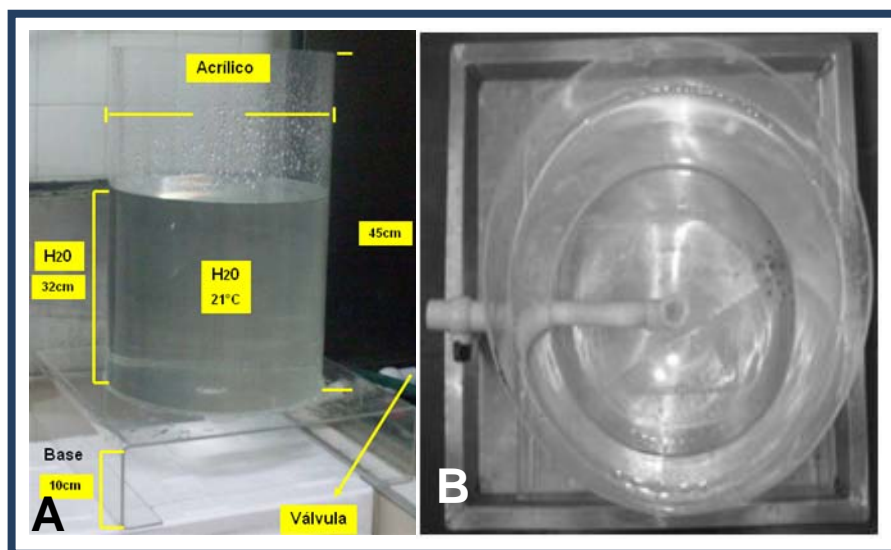


FIGURA 9 Tanque del nado forzado. a) Vista frontal del tanque con las condiciones de laboratorio, b) Vista superior

Los animales fueron colocados en la sala de habituación, bajo las mismas condiciones ambientales utilizadas en el bioterio, 72 horas antes de la sesión experimental. Todos los animales fueron manipulados por el experimentador 1 minuto cada día durante los días previos a la exposición a la prueba de nado forzado. Para la obtención del peso de los animales se utilizó una báscula mecánica (Ohaus, NJ USA) introduciendo cuidadosamente el animal dentro de una cesta metálica, con previa calibración de la báscula; el pesaje se llevó a cabo antes y después de la exposición al nado. Los experimentos fueron realizados en horas de la tarde entre la 13:00 y las 17:00 horas.

TABLA 1. Grupos establecidos para el análisis experimental. T= Tiempo

GRUPO	CONSIDERACIONES	MUESTRA
1	5 min de exposición al nado forzado (T5)	10
2	15 min de exposición al nado forzado (T15)	10
3	Control: sin exposición (T0)	10

2.4 PARÁMETRO FISIOLÓGICO

2.4.1 Consumo de Oxígeno

El equipo utilizado para evaluar el consumo de oxígeno consistió en una cámara que contenía un paquete de aproximadamente 50 gramos de cal sodada envuelto en una malla de gasa que permitía la absorción de CO₂ espirado por el animal. Una vez la rata era introducida en el dispositivo, el extremo abierto se sellaba con un tapón de caucho que contaba con un orificio central al cual se le conectaba una pipeta de 10 ml lubricada con agua jabonosa (jabón líquido a una dilución de 1:10), y con una burbuja en el extremo distal de la misma. Durante una sesión de registro se cronometró en 3 oportunidades el tiempo requerido para el consumo de oxígeno a los 5 y 10 ml a partir del desplazamiento de la burbuja de jabón. Entre cada toma de datos se permitió la renovación del aire de la cámara con el animal adentro. Esta sesión realizada a las 13 horas antes de la exposición del animal a la piscina, se repitió inmediatamente después del nado forzado obteniendo valores pre y post exposición al estresor. (Benedict & MacLeod 1929, Himsworth 1968). La evaluación del consumo de oxígeno se llevó a cabo en una sala adyacente a la prueba de nado forzado bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad. **Ver figura 10**

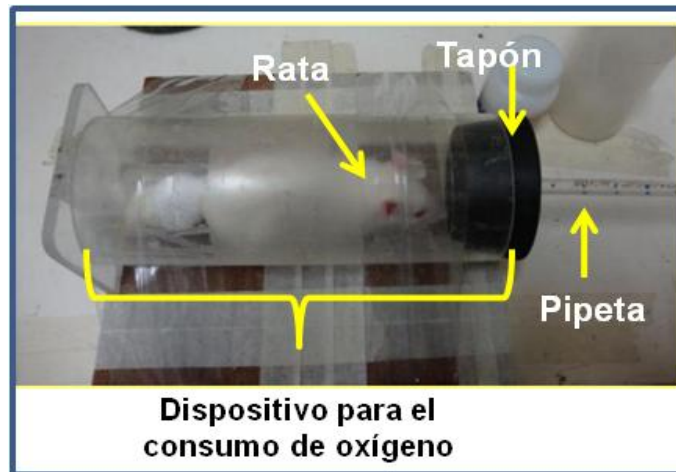


FIGURA 10. Complementos informativos sobre la respuesta fisiológica del estrés: consumo de oxígeno

Los datos de consumo de oxígeno se expresaron en función del peso de los animales (mililitros/minutos x 100 g de peso del animal).

2.4.2 Medición de los Niveles de Glucosa

El orden de exposición al protocolo experimental, también fue aleatorizado y una vez seleccionado al animal se introdujo con mucho cuidado dentro del mismo dispositivo que se utilizó para medición del consumo de oxígeno con el fin de lograr su inmovilización, se le tomó por punción, una muestra sanguínea de aproximadamente 0,5 ml, proveniente de la vena dorso-lateral de la cola. Con esto y utilizando un glucómetro Contourt TS Bayer se obtuvo la primera medida de glicemia pre-exposición al estrés del nado forzado. A las 14 horas, el animal era expuesto a la piscina del nado forzado durante el tiempo correspondiente a la asignación aleatoria del grupo experimental. Inmediatamente después, se obtuvo nuevamente por punción venosa, una segunda muestra de sangre para una segunda medida de glicemia. Todas las sesiones experimentales se realizaron

entre las 13:00 y las 17:00 horas. (Solnica et al 2003, Esquivel et al, 2006). **Ver figura 11**



FIGURA 11 Complementos informativos sobre la respuesta fisiológica del estrés: Toma de sangre de la vena caudal para medir glicemia.

2.5 PARÁMETRO COMPORTAMENTAL

Para determinar el parámetro comportamental, sobre la pantalla en que se reprodujo la película de cada experimento, se realizó una división virtual de la superficie de la piscina de manera que quedó una zona central circular de 7cm de diámetro (indicada con el número 2) y una región periférica en contacto con las paredes de la piscina (indicada con el número 1). **Ver figura 12.**

Esto con el fin de determinar la frecuencia y el tiempo de permanencia del animal en ese lugar y determinar el gasto metabólico.

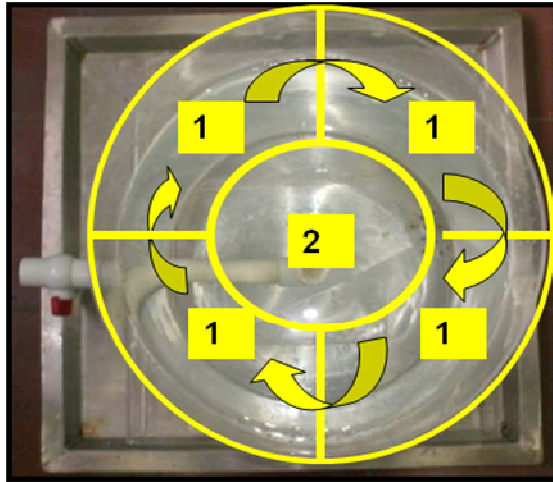


FIGURA 12 Vista superior del tanque del nado forzado dividido virtualmente para el registro comportamental

Para efectos de registro comportamental, se utilizó el programa “PROSTCOM” (Conde C, Costa V, Tomaz C, 2000), que se ejecutó durante la observación de las películas de los experimentos.

2.6 PARÁMETRO PROTEÓMICO

2.6.1 Obtención y Preparación de las Muestras

Los animales fueron sacrificados por decapitación 24 horas después de finalizada la exposición a la prueba de nado forzado. A cada animal se le extrajo el cerebro, el cual fue colocado en una caja de petri cubierta de papel humedecido con solución salina (NaCl 0.9%). Se extrajeron las estructuras cerebrales de interés (amígdala e hipocampo) teniendo en cuenta la subdivisión de los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo. **Figura 13.** El tejido húmedo fue pesado, rotulado y se mantuvo en nitrógeno líquido. En el **ANEXO 5** se presentan los resultados del peso de las muestras cerebrales

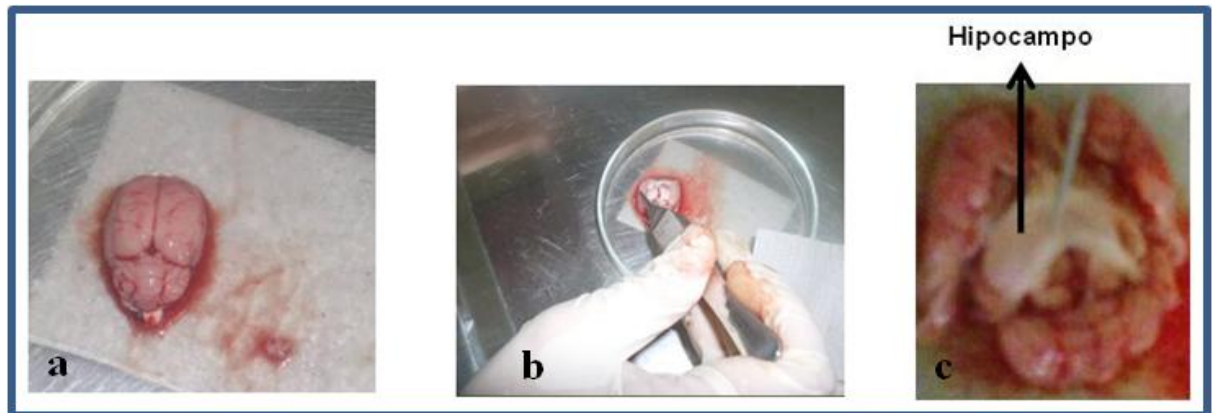


FIGURA 13 Obtención y extracción de la muestra. a) Cerebro de la rata, b) y c) extracción del hipocampo dorsal

Cada muestra hipocampal y amígdala fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5mL que contenía 500 μ L de buffer de lisis previamente pesado y marcado.

Inmediatamente las muestras fueron nuevamente pesadas para determinar la cantidad de tejido cerebral extraído.

2.6.2 Solubilización y Extracción

La solubilización de las proteínas se realizó suspendiendo el tejido cerebral en buffer de lisis (**Anexo 1**). La acción de sus componentes lleva a la completa ruptura celular (lisis por detergentes) y la liberación de proteínas. Las muestras fueron homogenizadas mediante agitación en vortex (1200 rpm) durante aproximadamente 4 horas.

Posteriormente a su homogenización, se centrifugaron las muestras en una centrifuga IEC CL31R Multispeed: a 13000 rpm, 4°C, durante 20 min. **Ver figura 14**



FIGURA 14. Método de solubilización y extracción de proteínas. a) Suspensión de las muestras en buffer de lisis. b) Homogenización de las muestras en vortex. c) Centrifugación

2.6.3 Eliminación de Lípidos e Impureza de la Muestra

Se realizó la precipitación de proteínas con solvente orgánico, para lo cual se empleó acetona fría (-20°C) en relación 1:4 muestra-solvente. Después de la adición del solvente, las muestras fueron sometidas a agitación en vortex, 500 rpm, durante 5 min y se mantuvieron a -20°C durante toda la noche. Luego se centrifugaron a 10.000 g, 4°C, durante 10 min.

Se separó cada pellet sedimentado y fueron lavados en 100 µL de acetona fría en tres ocasiones y luego fueron centrifugados a 10.000 g, a 4°C, durante 10 minutos. Posteriormente los pellet se resolubilizaron en buffer de lisis con agitación en vórtex a 1200 rpm

2.6.4 Cuantificación

La cuantificación de las proteínas solubles se determinó por la metodología de Bradford (Bradford, 1976). En el ambiente ácido del reactivo, la proteína se une al colorante, coomassie - G250.

Esto resulta en un cambio espectral del tinte de rojizo/marrón (máximo de absorbancia 465 nm) a la forma azul del tinte (máximo de absorbancia 610 nm).

La diferencia entre las dos formas de la tintura es mayor a 595 nm, por lo que es la óptima longitud de onda para medir el color del complejo proteína colorante.

Para determinar la concentración de las muestras se preparó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino como patrón (albumin fraction V from bovine serum, MERCK) y buffer de lisis como blanco y medio de dilución. Se realizaron lecturas de absorbancia triplicadas en el equipo de elisa microplate reader, bio-rad, para los patrones y las muestras. (**Anexo 2**). **Ver figura 15**

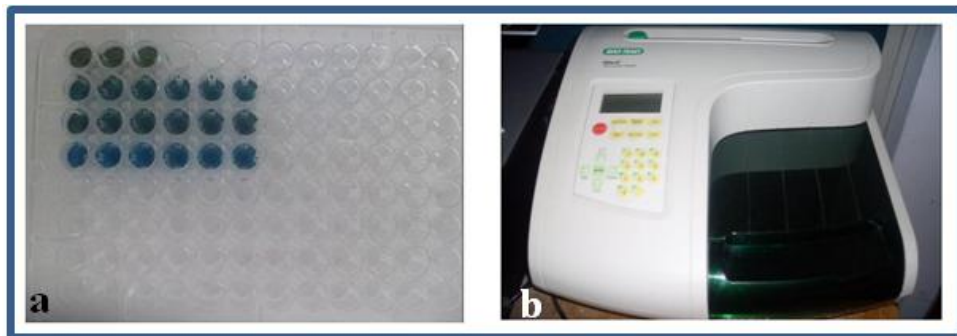


FIGURA 15. Proceso de cuantificación de las proteínas.a) Placa con las muestras a cuantificar. b) Equipo de elisa microplate reader, bio-rad.

2.6.5 Electroforesis 2D

Una vez obtenidos los extractos solubles de proteínas totales fueron separadas mediante electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE), con el objetivo de facilitar la detección de cambios, expresión diferencial o diferencias en la cantidad de proteínas detectadas en los geles bidimensionales.

2.6.5.1 Isoelectroenfoco (IEF). En el proceso se utilizaron tiras de rehidratación (ReadyStrip IPG strips, bio-rad) de 7 cm de longitud con rango de pH 3-10 y se rehidrataron mediante el método de rehidratación pasiva (sin voltaje) durante 12 a 16 horas. Las muestras fueron colocadas en la bandeja IEF y corridas en el equipo de IEF, protean IEF cell, bio-rad. Ver figura 16

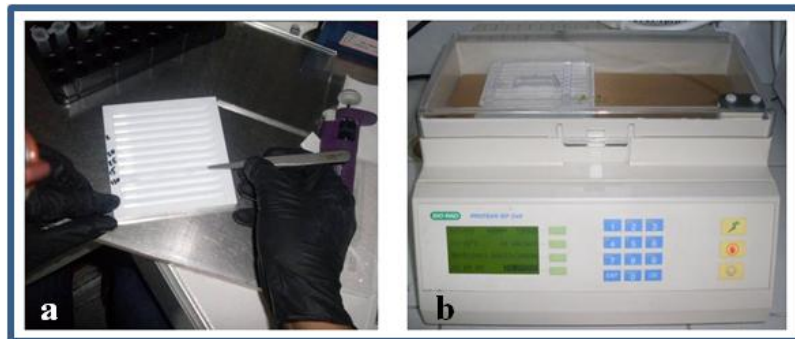


FIGURA 16 Proceso de Rehidratación y corrida en el equipo IEF. A) Colocación de las tiras en la bandeja de IEF. B) Equipo IEF protean IEF cell, bio-rad

2.6.5.2 SDS-Page Una vez que las proteínas fueron separadas en función de sus propiedades de carga (pI), se separaron en función de su tamaño o peso molecular mediante electroforesi SDS-PAGE en geles de poliacrilamida. Previo a la separación las tiras de IEF fueron equilibradas mediante un proceso de reducción-alquilación, para lo cual fueron colocadas en las bandejas de equilibración I y II (Anexo 1).

Después de la equilibración cada tira fue sumergida en buffer de corrido (anexo A) y colocadas sobre los geles de poliacrilamida al 12%T (**Anexo 1**) y corridas a 150 V en el equipo de electroforesis mini protean system, bio-rad, durante aproximadamente 1 hora. **Ver figura 17.**

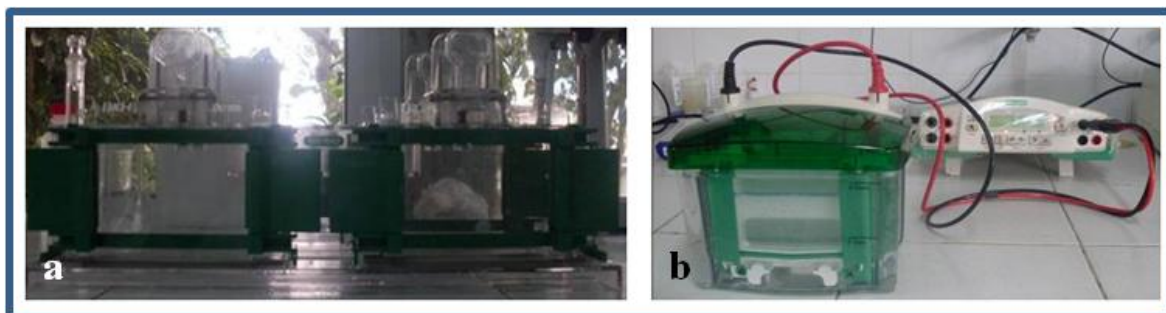


FIGURA 17 Equipo de electroforesis: mini protean system, bio-rad. a) y b) Montaje para la corrida electroforética

2.6.6 Tinción

Para visualizar las proteínas en el gel éstos fueron coloreados, para lo cual se utilizó el método de tinción azul de coomassie coloidal (**Anexo 1**). Finalizada la corrida SDS-PAGE el gel se sumergió en 50 mL de solución de fijación durante toda la noche, posteriormente se lavó el gel con agua desionizada en tres ocasiones. Se adicionaron 50 mL de solución de equilibración y se mantuvo el gel en esta solución durante 1 hora, transcurrido el tiempo se agregaron 5 mL de solución de coloración gota a gota y con agitación durante 20 min. Posteriormente fue descartada la solución colorante y se adicionó 100mL agua grado HPLC para revelar los spots de proteínas.

2.6.7 Registro y Análisis de Imágenes

Una vez separadas las proteínas en los geles de SDS-PAGE, éstas fueron escaneadas con un densitómetro (UMAX PowerLook 2100XL) para adquirir las imágenes de los geles teñidos. Este dispositivo digitaliza las imágenes con 800 x 1600 puntos por pulgada (dpi), lo cual ofrece alta resolución y permite capturar finos detalles cuando se escanean transparencias. Además, este equipo minimiza el ruido de la señal favoreciendo la calidad de la imagen, reduciendo el tiempo de digitalización de ésta y el consumo de energía. **Ver figura 18**



FIGURA 18. Escáner: Equipo UMAX PowerLook 2100XL para adquirir las imágenes de los geles teñidos

Las diferencias de intensidad y cantidad de manchas (spots) se analizaron con ayuda del software PDQUEST 2D, Bio-rad versión 8.0.1. Este programa filtra y suaviza la imagen del gel e identifica las manchas proteicas, mediante la creación de una representación gaussiana en tres dimensiones de las manchas clarificadas. La intensidad de las manchas es la suma de las intensidades de todos los pixeles que forman la imagen, lo que permite tener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas. Las imágenes importadas fueron filtradas empleando la opción “sal y pimienta” gaussiana de 9 x 9. A continuación fueron analizadas, utilizando los mismos parámetros de detección para identificar manchas en todos los geles que forman los grupos a analizar; el programa incluye todos los geles que se van a comparar y nivela diferencias producto del tipo de tinción, intensidad de las manchas y ruido de fondo. **Figura 19**

Por último aquellas proteínas en las que se detectaron intensidades asociadas a los tiempos de exposición al estímulo, fueron identificadas con la ayuda de la base de datos bioinformática expasy.(www.expasy.org), utilizando la herramienta

bioinformática de caracterización *compute pI/M* correspondiente a la misma base de datos de expasy.

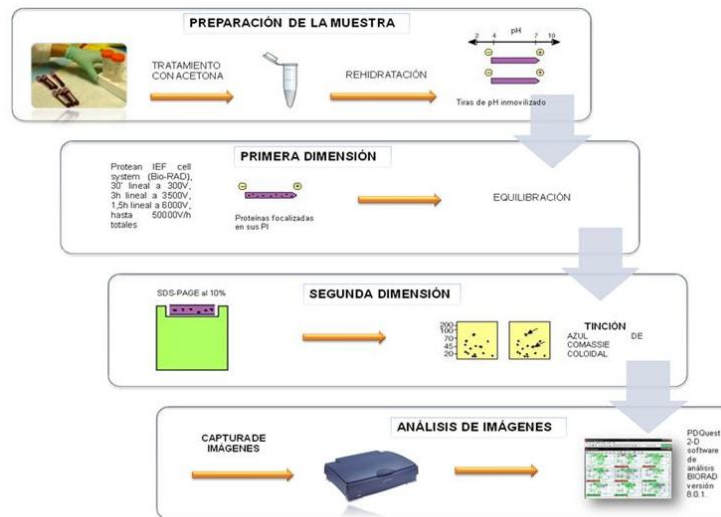


FIGURA 19. Representación gráfica del análisis de proteínas mediante electroforesis bidimensional 2D-PAGE. Tomada de la tesis: Análisis proteómico en plasma de pacientes con eventos coronarios agudos

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: FASE COMPORTAMENTAL

Para determinar el parámetro comportamental, sobre la pantalla en que se reprodujo la película de cada experimento, se realizó una división virtual de la superficie de la piscina de manera que quedó una zona central circular de 7 centímetros de diámetro (indicada con el número 2) y una región periférica en contacto con las paredes de la piscina (indicada con el número 1). **Ver figura 12.**

Para el análisis comportamental se obtuvieron registros de las frecuencias y tiempos tanto absolutos como relativos de las entradas y permanencias de las ratas en los lugares del tanque, así como se contabilizó el número de cruzamientos entre los lugares virtuales pre-definidos. Se realizaron comparaciones entre los dos grupos expuestos al tanque mediante pruebas t para muestras independientes.

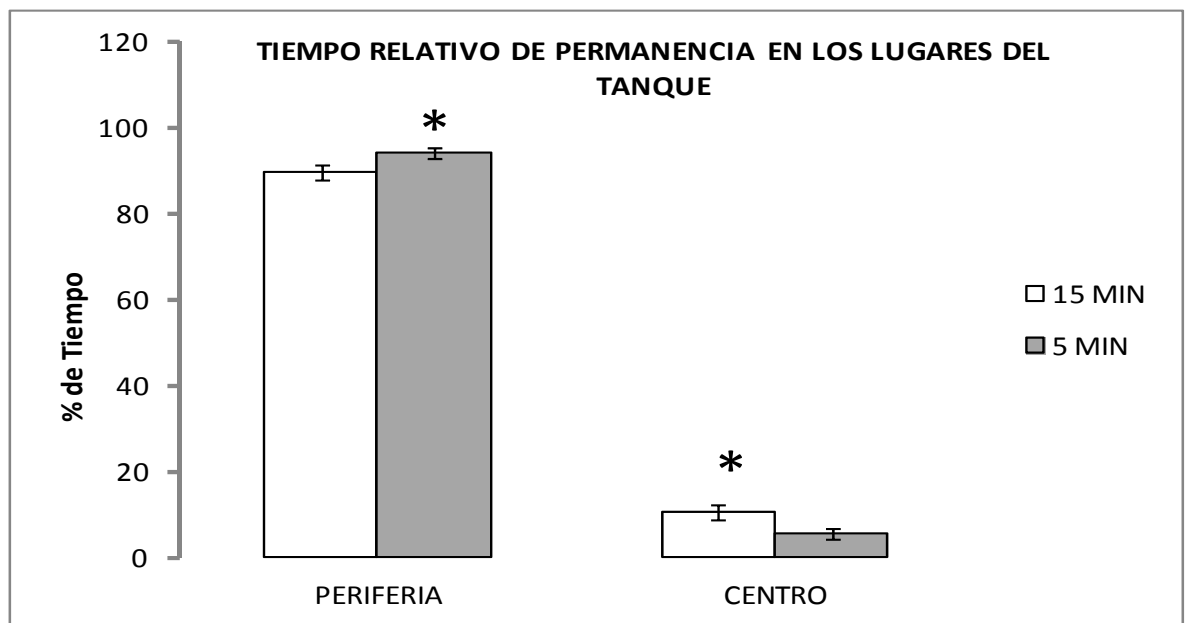
3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN: FASE COMPORTAMENTAL

La tabla 2, muestra los resultados del análisis comportamental, indicando las variables y los valores de la t de Student y su probabilidad (p) de acuerdo al análisis estadístico aplicado (t de Student para muestras independientes)

TABLA 2. Resultados obtenidos del análisis comportamental. Se muestran las variables en estudio, con sus respectivos valores de la t de student y la probabilidad (p)

VARIABLE	t	p
Frecuencia absoluta -Centro	t = -4,444	P = <0,001
Frecuencia relativa -Centro	t = -1,875	P = 0,077
Tiempo absoluto -Centro	T = 57,000	P = <0,001
Tiempo relativo -Centro	t = -2,270	P = 0,036
Frecuencia absoluta -Periferia	t = -9,409	P = <0,001
Frecuencia relativa -Periferia	t = 1,803	P = 0,088
Tiempo absoluto -periferia	T = 55,000	P = <0,001
Tiempo relativo -Periferia	t = 2,199	P = 0,041
Cruzamientos	t = -8,468	P = <0,001

De acuerdo a los resultados arrojados por el análisis estadístico, se determinó que hay diferencias estadísticamente significativas con relación a la frecuencia absoluta de entradas en el centro entre los dos tiempos de exposición al nado (5 y 15 minutos), lo cual coincide con el tiempo absoluto en el mismo lugar (centro).



Ver figura 20

Figura 20. La gráfica muestra el promedio \pm 1 EE de la media de los tiempos relativos de permanencia en los lugares del tanque. * Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), donde el marcado es mayor que el % de tiempo de permanencia del otro grupo en el lugar señalado

El porcentaje de tiempo nos permitió hacer una analogía con el campo abierto, donde el animal permanece más tiempo en la periferia con respecto al centro, ya que al estar en la periferia se siente más seguro, porque la pared es el sitio de posible escape y encuentra apoyo.

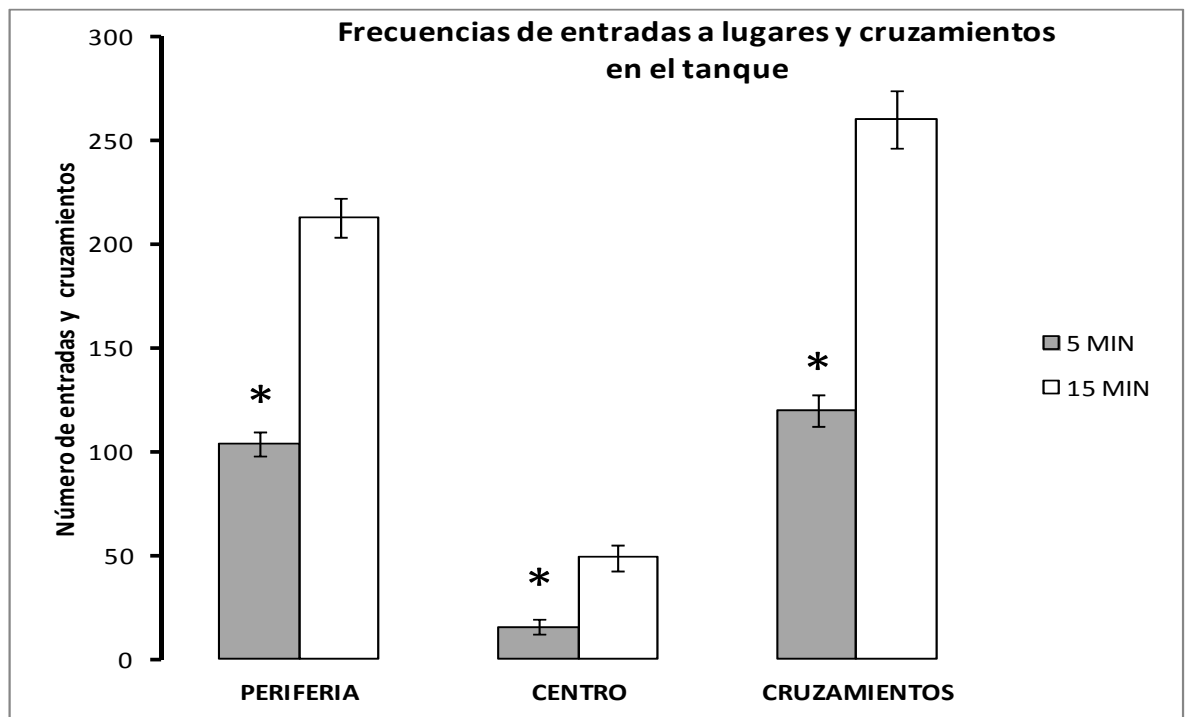


Figura 21. La gráfica muestra el promedio \pm 1 EE del número total de entradas y cruzamientos entre diferentes lugares del tanque. *valores obtenidos a los 5 minutos menores que los obtenidos en 15 minutos ($p < 0.05$).

De acuerdo a la definición de estrés asumida en este proyecto según Hans Selye (síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas no específicas del organismo a diferentes agentes nocivos del ambiente de naturaleza física o química, provocando un aumento de la tasa metabólica (Selye H., 1936, apud Botelho S, Conde C. 2003), se observó y corroborándolo con los resultados comportamentales que las frecuencias de entradas y cruzamientos como se muestra en la tabla 2 y en la figura 21, fue mayor en la periferia con respecto al centro del tanque a los 5 y 15 minutos de exposición, lo que posiblemente provocaría un mayor gasto metabólico en comparación cuando el animal permanecía en el centro.

3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO: FASE FISIOLÓGICA

3.2.1 Consumo de Oxígeno

La utilización de este método (consumo de oxígeno) se hizo con base en que son numerosos los trabajos que ponen de manifiesto que el consumo de oxígeno es exponente fundamental de la actividad metabólica. (Moguilevsky. J. A. 1965; Schiaffiigi, O.; Menendez-Patterson, A., y Marín, B.1974). Es decir, que los cambios metabólicos ofrecen evidencias bioquímicas de la actividad nerviosa. (Lowry, O. H, 1966).

Considerando que las condiciones de humedad y de temperatura ambiental fueron homogéneas en todos los experimentos (65% +/- 5 de humedad y $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), los volúmenes de consumo de oxígeno aquí se expresan en condiciones ATPS (Temperatura y presión ambiente y saturado con vapor de agua). Los resultados de los ensayos, fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA de dos vías de medidas repetidas). Luego de esto, se realizó un análisis de comparaciones múltiples (prueba post hoc) utilizando el test de Holm-Sidak

3.2.2 Resultados y Discusión: Consumo de Oxígeno

Los resultados del consumo de oxígeno se encuentran consignados en el **ANEXO 6**

Los resultados del análisis de varianza de ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló, que no hay diferencias estadísticamente significativas cuando el animal fue expuesto a 5 y 15 minutos al nado forzado (Grados de libertad= 2, F= 1,25; P = 0,301), sin embargo se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Grados de libertad= 2, F= 12,895; P = 0,001). El análisis post hoc de Holm-Sidak mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre el control (T0) con el grupo de 5 minutos (P= 0,0014) y el control (T0) con el grupo de 15 minutos de exposición al nado (P= 0,0003). **Ver figura 22**

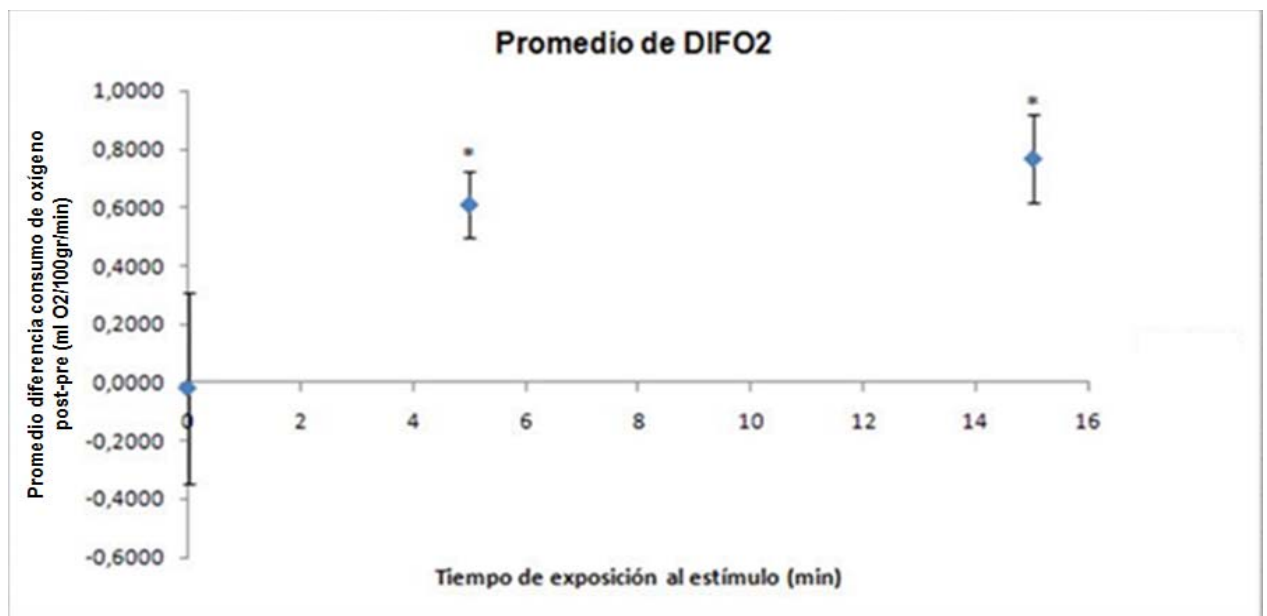


Figura 20. Promedio de diferencia del consumo de oxígeno de ratas sometidas a la prueba de nado forzado en diferentes tiempos de exposición. Los valores están dados en promedio \pm error estándar.

Lo anterior indica, que cuando el animal se encuentra bajo condiciones de estrés, el consumo de oxígeno se incrementa, debido a que aumenta la tasa metabólica. Esta elevación posiblemente se deba principalmente a los siguientes factores; resíntesis de fosfocreatina (PC) en el músculo, aclaramiento de lactato, reestablecimiento de los almacenes de oxígeno sanguíneo y muscular, aumento de la temperatura, elevación de la frecuencia cardíaca y respiratoria y aumento de actividad hormonal (Gore CJ, Withers RT, 1990; Gerardo J, Córdova A, González J. 2000).

Otros estudios relacionan las catecolaminas con el consumo de oxígeno. Se ha encontrado que las catecolaminas responden a un incremento en la actividad física aumentando sus concentraciones plasmáticas hasta 4 veces más de lo que se presenta en reposo (Hulks et al 1991). La mayoría de estudios relacionados con consumo de oxígeno y catecolaminas, están orientados hacia la relación entre el estrés generado por la intensidad del ejercicio físico o por el estrés mental, con la activación del sistema nervioso simpático, así como con la respuesta simpatoadrenal, que lleva a un incremento endógeno en la secreción de adrenalina y noradrenalina, asumiendo que tal incremento es responsable de la mayoría de los efectos simpatoadrenérgicos presentados (Stallknecht et al 2001, Reims et al 2004).

3.2.3 Análisis Estadístico: Glicemia

Al igual que en el consumo de oxígeno, los resultados de los ensayos de glicemia expresada en mg/dl., fueron sometidos del análisis de varianza de ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

3.2.4 Resultados y Discusión: Glicemia

Los resultados de la toma de glicemia se encuentran consignados en el **ANEXO 6**. Los resultados del análisis de varianza de ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló, que no hay diferencias estadísticamente significativas cuando el

animal fue expuesto a 5 y 15 minutos al nado forzado (Grados de libertad= 2, F= 0,477; P= 0,626), de igual forma no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los grupos de exposición al nado forzado (F= 0,315; P = 0,579). **Ver figura 23**

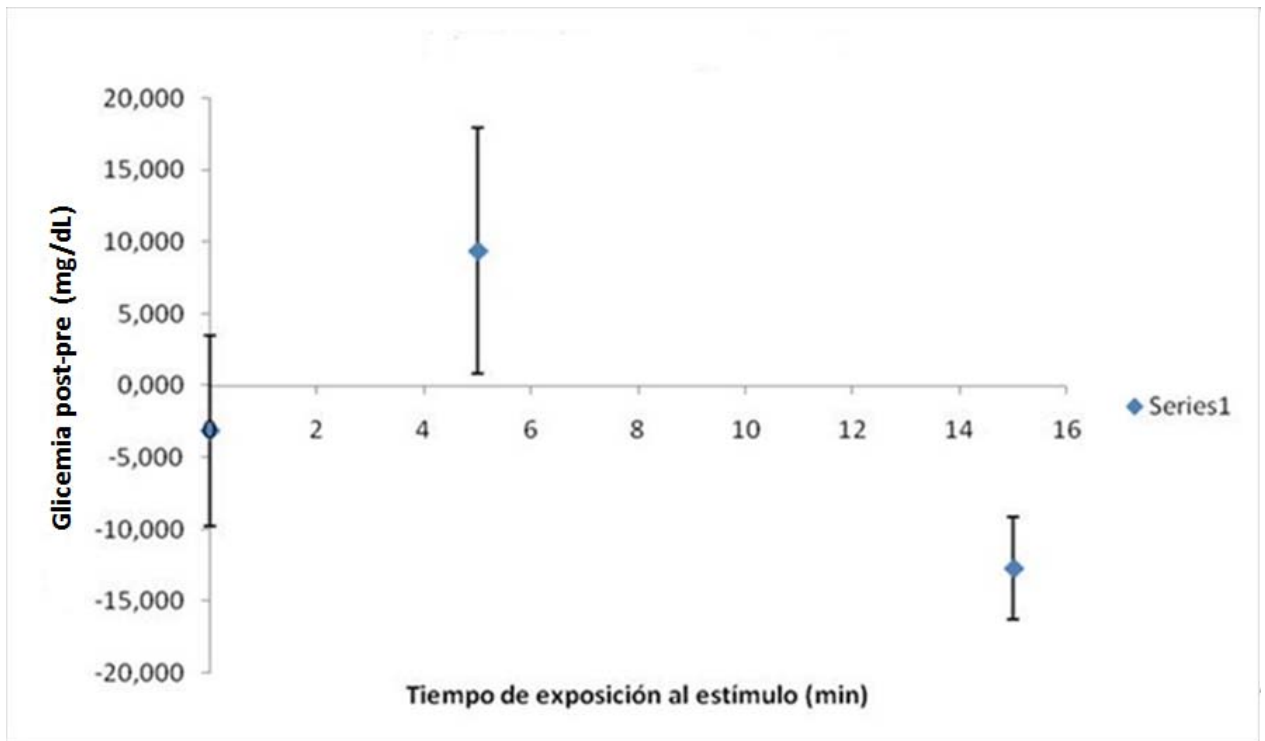


FIGURA 21. Promedio de la diferencia de glicemia de ratas sometidas a la prueba de nado forzado a diferentes tiempos de exposición. Los valores están dados en promedio \pm error estándar

Los resultados obtenidos indican, que cuando el animal es sometido a una situación de estrés, como la generada por la exposición al nado forzado, el incremento de la glicemia en los primeros 5 minutos fue notorio, esto puede estar asociado a la disponibilidad energética para la actividad locomotora. Al aumentar la intensidad del estímulo estresor (15 min) la glicemia desciende. Lo anterior es debido, a que la glucosa, fuente principal de energía del organismo, se pone en

movimiento desde sus zonas de almacenamiento. La sangre, que transporta la glucosa, se desvía de los órganos no esenciales para el ejercicio físico, tales como la piel y el sistema gastrointestinal, y se dirige, rápidamente, hacia los órganos cruciales: corazón, músculo y cerebro. (Illera, JC, 2000); de tal forma que los niveles de glucosa en sangre descienden, como se muestra en la **figura 23**

Durante ejercicios en “steady state” en ratas, la tasa de glucosa reconvertida, y por lo tanto la excreción hepática de glucosa, está directamente relacionada a la intensidad de trabajo, tanto en animales entrenados (Brook, G.A; Donovan, C.M, 1983; apud Michael Kjaer. 1993) como en los no entrenados (Sonne B; Galbo H. 1985-1986. apud Michael Kjaer. 1993).

Cuando el animal se encuentra en una transición entre el estado de reposo al ejercicio, aumenta la producción de glucosa hepática debido al incremento tanto de la glucogenólisis como de la gluconeogénesis. Durante ejercicios moderados e intensos de corta duración, el aumento en la excreción esplácnica de glucosa es causado casi enteramente por una glucogenólisis hepática acelerada (Vranic M et al 1976-1984; Wasserman, D.H. 1984, apud Michael Kjaer. 1993). La contribución de la glucogenólisis está demostrada por una reducción del contenido hepático de glucógeno inducida por el ejercicio, tanto en ratas (Sonne B; Galbo H. 1986, apud Michael Kjaer. 1993) como en humanos (Hultman, E.; Nilsson . L.H. 1971, apud Michael Kjaer. 1993).

Por otro lado, debido a la importancia de la glucosa en la memoria, se han llevado a cabo estudios orientados a dilucidar los mecanismos neurobiológicos responsables de este efecto, y una hipótesis planteada es que los efectos de la glucosa sobre la memoria pueden ser debidos a la simple producción de energía, o a la producción de uno o más de los neurotransmisores sintetizados a partir de la glucosa, por regulación de la función colinérgica central (Gold 1995, Kopf & Baratti 1996).

En esta secuencia de ideas, resulta interesante pensar que en una situación de estrés, como la generada por la exposición al nado forzado, el incremento de la glicemia en los primeros 5 minutos, no sólo se asocia a la disponibilidad energética para la actividad locomotora, sino también a los mecanismos mnemónicos que le permitirían al animal aprender de aquella experiencia “estresante”.

3.3 ANÁLISIS PROTEÓMICO

3.3.1 Análisis de Imágenes e Identificación de las Proteínas Expresadas Diferencialmente por Análisis Bioinformático.

Para la identificación y posterior análisis de las proteínas fueron realizados 90 geles, de los cuales 30 correspondieron al hipocampo derecho, 30 hipocampo izquierdo y 30 de amígdalas (15 amígdala derecha y 15 amígdala izquierda).
(Anexo 3)

Una vez escaneados los geles fueron analizados en el software PDQUEST 2D, Bio-rad versión 8.0.1. En el programa se incluyeron todos los geles que se compararon. Con el objetivo de compensar las posibles variaciones entre los geles debidas a diferencias en la eficacia de la tinción, se aplicó el método de normalización, mediante el modelo de regresión local “Local Regression Model”. Este calcula una curva en el diagrama de dispersión que minimiza la distancia a todos los puntos de la grafica y asigna el factor de normalización para cada mancha. En seguida el programa cuantifica la densidad de las manchas proteicas, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas. No obstante, se realizó una revisión manual pormenorizada, la edición y corrección de algunas de las manchas o de los emparejamientos detectados automáticamente.

Finalmente el programa nos arrojó una imagen maestra “master” que reúne todas las manchas, con una distribución gaussiana, identificadas en los geles que conforman cada grupo. En figura 24 se presenta a manera de ejemplo la imagen del gel máster de y uno de los geles obtenidos del hipocampo derecho.

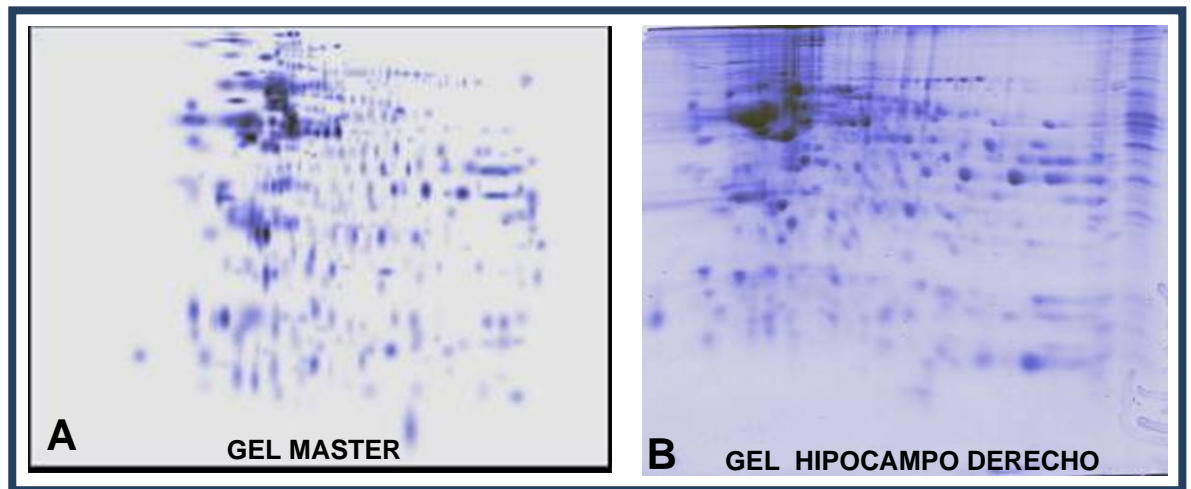


FIGURA 22. Imagen del gel máster y de un gel representativo a modo de ejemplo correspondiente al hipocampo derecho.

Después de realizar un examen cuidadoso y haciendo una depuración de las manchas solamente fueron seleccionados aquellos cuyas intervalos de confianza de las intensidades no se superpusieran asumiéndolas como probablemente diferentes. Con respecto al grupo control, se verificó cuando hubo un aumento de cada proteína en los tratamientos de 5 y 15 minutos y cuando hubo una disminución en los mismos tratamientos. Después se verificó si hubo aumento en ambos tratamientos o hubo disminución en ambos tratamientos o se presentó incremento en uno y disminución en otro.

De manera presuntiva, y como una manera de encontrar la posible identidad de aquellas manchas que presentaron diferencias en sus niveles de expresión; se

realizó una comparación entre los valores de masa molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) de las proteínas identificadas en el estudio (muestras experimentales) con respecto a los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de aquellas proteínas encontradas en la base de datos bioinformática expasy, correspondiente a los valores teóricos, utilizando la herramienta bioinformática de caracterización *compute pI/M* correspondiente a la misma base de datos de Expasy. Como criterio de búsqueda para hipocampo, fueron utilizados los términos: cerebro de rata, hipocampo, wistar (rat brain, hippocampus, wistar), reportando un total de 109 proteínas asociadas con esos criterios. Para amígdalas se utilizaron los criterios de búsqueda: cerebro de rata, amígdala, wistar (rat brain, amygdala, wistar), reportando un total de 25 proteínas asociadas con esos criterios.

Se asignaron las identidades a aquellas proteínas que presentaron diferencias en sus valores de PM iguales o menores a ± 2.0 KDa, y diferencias en los valores de pI iguales o menores de ± 0.2 unidades con respecto a los valores de PM y pI tomados de las bases de datos. El criterio de identificación se determinó teniendo en cuenta las variaciones que se han reportado en las proteínas identificadas, separadas por 2D-PAGE, que se encuentran reportadas en la base de datos (SWISS 2D-PAGE). Estas aplicaciones están disponibles en el sistema experto de análisis de proteínas (expasy) (www.expasy.org)

3.3.2 Cantidad de Manchas Detectadas en el Hipocampo Derecho e Izquierdo

De acuerdo con el análisis de todos los geles que conformaron el experimento se obtuvieron inicialmente los datos de la cantidad de manchas detectados en el hipocampo derecho y el izquierdo. En el hipocampo de las ratas estudiadas se obtuvo lo siguiente: En el hemisferio derecho se detectaron 331 spots en el grupo control (sin exposición al nado T0), 268 en el tratamiento de 5 minutos de exposición a la prueba de nado forzado (T5) y 145 en el tratamiento de 15 min de exposición (T15).

De igual forma, en el hemisferio izquierdo del hipocampo se detectaron 149 manchas en el grupo control (sin exposición al nado T0), 178 en el tratamiento de 5 minutos de exposición a la prueba (T5) y 99 en el tratamiento de 15 min (T15). **Ver Tabla 3 y la Figura 25.**

TABLA 3. Cantidad de manchas detectadas inicialmente en el software PDQuests a partir de las muestras del hipocampo derecho e izquierdo en ratas wistar UIS sometidas al nado forzado.

TRATAMIENTO	HIPOCAMPO DERECHO	HIPOCAMPO IZQUIERDO
Control: T0	331	189
5 min: T5	268	178
15 min: T15	145	99

Se comparó la cantidad de manchas detectadas en los geles de la región hipocampal derecha e izquierda y se encontró que estas disminuyen cuando los animales son expuestos al estímulo estresor y a medida que la intensidad del mismo es mayor. Con respecto al hipocampo derecho se notó una disminución del cuando la rata fue sometida a 5 min de exposición en la prueba de nado forzado con relación al control; y un aumento cuando fue sometida a 15 minutos de exposición respecto al control. En el hipocampo izquierdo se notó un comportamiento muy similar, con una disminución cuando el animal fue sometido a 5 min de exposición y un aumento a los 15 min en la prueba. Lo anterior indica una marcada lateralidad en la cantidad de manchas detectadas inicialmente por el software PDQUEST 2D, Bio-rad versión 8.0.1 en el hipocampo derecho.

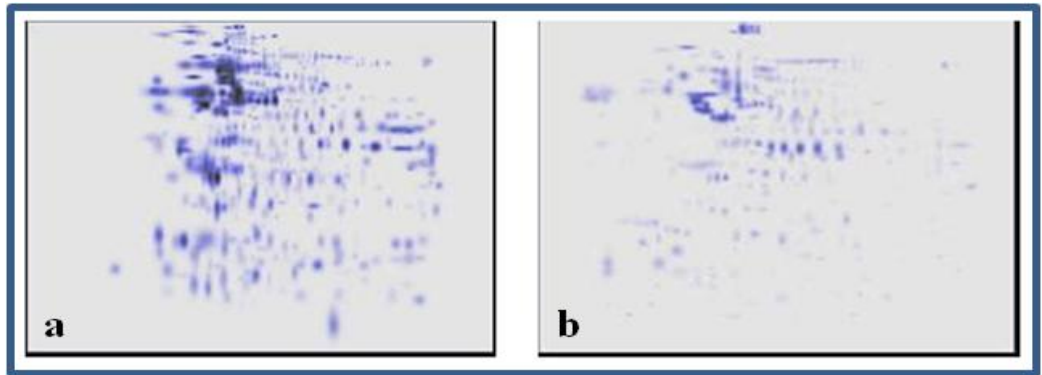


FIGURA 23. Geles masters (a) Hipocampo derecho (HD), (b) Hipocampo izquierdo (HI). Nótese la expresión diferencial de manchas mucho mayor en el HD con respecto al HI. Cada una de las imágenes se obtuvo al analizar 10 geles de cada tratamiento

Teniendo en cuenta los criterios enunciados anteriormente y de acuerdo al análisis proteómico y comparándolo con la base de datos expasy, se encontraron 60 proteínas en total, que presentaron diferencias en sus niveles de expresión en los grupos analizados (4.65% del proteoma detectable), de las cuales 38 (63.3% de las encontradas en la base de datos expasy) son comunes al hipocampo derecho e izquierdo (HD/HI); 13 (21.6%) se encontraron solo en el hipocampo derecho (HD) y 9 (15%) en el hipocampo izquierdo (HI). **Figura 26.**

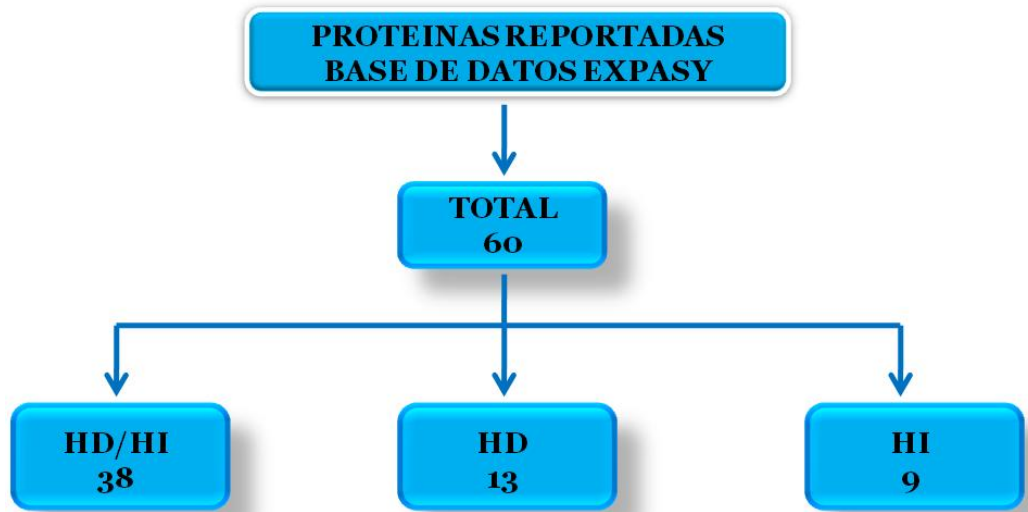


FIGURA 24. Proteínas detectadas según la base de datos expasy

De las proteínas expresadas, varias de ellas participan en los procesos de plasticidad neuronal, en la estructura del citoesqueleto, en las vías de señalización celular, enzimas relacionadas con el metabolismo, transporte y el tráfico endocítico, procesamiento, plegamiento y degradación de proteínas, proceso de transcripción y proteínas receptoras. **La figura 27** muestra las funciones y el porcentaje de expresión de cada una de ellas.

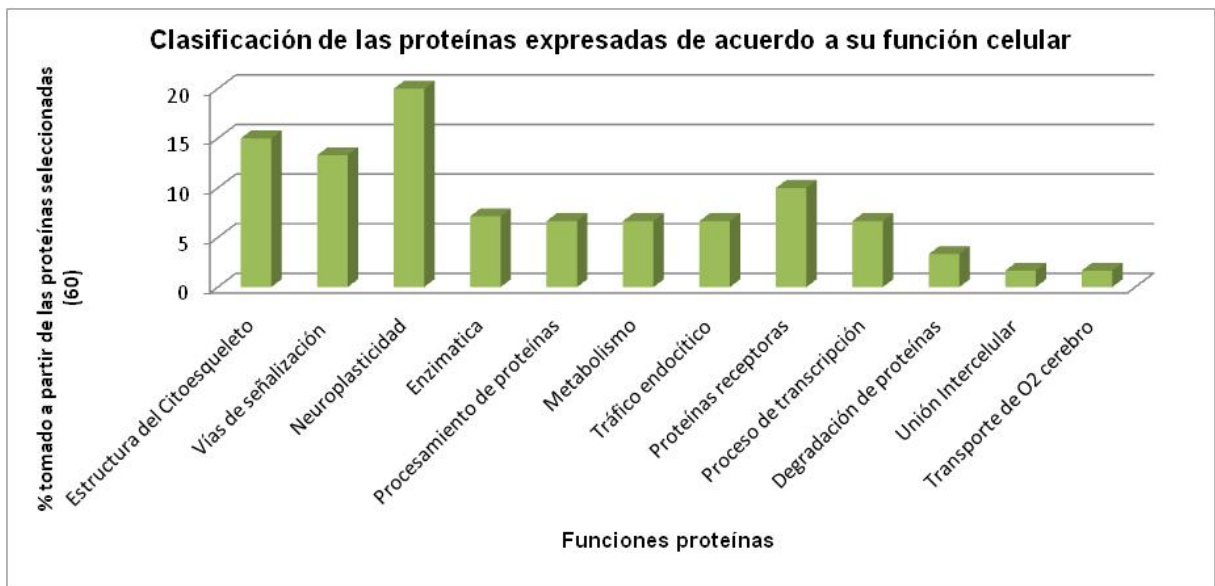


FIGURA 25. Gráfico de barra que relaciona la cantidad de proteínas expresadas con su función celular según el análisis proteómico en el hipocampo derecho e izquierdo. El porcentaje citado fue calculado a partir del total de proteínas seleccionadas de acuerdo al criterio enunciado anteriormente (citado en el ítem 3.3.1)

Las 60 proteínas expresadas en el hipocampo dorsal, con sus masas moleculares (PM) y puntos isoeléctricos (pI) experimentales y teóricos se encuentran en la **tabla 4, 5 y 6.**

TABLA 4. Proteínas expresadas en el hipocampo derecho e izquierdo, con sus códigos y comparando las masas y puntos isoeléctricos experimentales con los teóricos

origen	Código Interno	Protein ID from Swiss Prot	Nombre de la proteína	Masa Exp	PI Exp	Masa Teórica	PI Teórico
HD/HI	O08557	DDAH1_RAT	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydro...	32,01	5,94	31,42	5,75
HD/HI	O08697	ARL2_RAT	ADP-ribosylation factor-like protein 2	20,88	5,58	20,83	5,65
HD/HI	O35244	PRDX6_RAT	Peroxiredoxin-6	24,1	5,6	24,81	5,64
HD/HI	O35264	PA1B2_RAT	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB...	26,75	5,65	25,58	5,57
HD/HI	O35353	GBB4_RAT	Guanine nucleotide-binding protein subunit be...	38,8	5,6	37,36	5,74
HD/HI	P04182	OAT_RAT	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	49,3	6,4	48,33	6,53
HD/HI	P04639	APOA1_RAT	Apolipoprotein A-I	29,48	5,66	30,06	5,52
HD/HI	P51907	EAA3_RAT	Excitatory amino acid transporter 3	55,99	5,99	56,77	5,95
HD/HI	P52555	ERP29_RAT	Endoplasmic reticulum resident protein 29	28,89	6,13	28,57	6,23
HD/HI	P54311	GBB1_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/...	36	5,6	37,37	5,6
HD/HI	P63039	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	59,7	5,9	60,95	5,91
HD/HI	P84076	HPCA_RAT	Neuron-specific calcium-binding protein hippo...	20,84	4,81	22,42	4,87
HD/HI	Q04940	NEUG_RAT	Neurogranin	76,5	6,73	74,96	6,53
HD/HI	Q0PGW2	LCHN_RAT	Protein LCHN	5,02	5,4	51,36	5,18
HD/HI	Q566Q8	CK068_RAT	UPF0696 protein C11orf68 homolog	27,7	5,2	27,49	5,28
HD/HI	Q63279	K1C19_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 19	44,8	5,1	44,63	5,21
HD/HI	Q68VK5	TSN5_RAT	Tetraspanin-5	29,1	4,67	30,33	4,59
HD/HI	Q6Q0N1	CNDP2_RAT	Cytosolic non-specific dipeptidase	52,3	5,3	52,69	5,43
HD/HI	Q8K4V4	SNX27_RAT	Sorting nexin-27	59,7	5,8	61,01	5,95
HD/HI	Q8VD52	PLPP_RAT	Pyridoxal phosphate phosphatase	31,2	5,4	33,11	5,45
HD/HI	Q9JJM9	SEPT5_RAT	Septin-5	42,78	6,32	42,85	6,34
HD/HI	Q9Z214	HOME1_RAT	Homer protein homolog 1	41,3	5,2	41,3	5,39
HD/HI	P35370	OPRX_RAT	Nociceptin receptor	41,12	8,44	40,52	8,5
HD/HI	O08661	O08661_RAT	Ryanodine receptor type II	62,4	5,1	62,52	5,17

HD/HI	P59824	IRPL1_RAT	Interleukin-1 receptor accessory protein-like...	77,9	5,8	79,77	5,94
HD/HI	P62994	GRB2_RAT	Growth factor receptor-bound protein 2	24,19	5,76	25,2	5,89
HD/HI	P97531	CIP4_RAT	Cdc42-interacting protein 4	61,5	5,4	62,79	5,31
HD/HI	Q8VHK7	HDGF_RAT	Hepatoma-derived growth factor	25,88	4,83	26,48	4,78
HD/HI	Q91Y78	UCHL3_RAT	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme...	25,5	5,04	26,12	5,01
HD/HI	Q9ESQ7	PSD1_RAT	PH and SEC7 domain-containing protein 1	70,87	7,38	70,81	7,31
HD/HI	O35077	GPDA_RAT	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], cy...	36,37	6,31	37,45	6,16
HD/HI	P0CG51	UBB_RAT	Polyubiquitin-B	34,32	6,78	34,36	6,94
HD/HI	P35355	PGH2_RAT	Prostaglandin G/H synthase 2	70,7	6,92	69,16	7,07
HD/HI	Q920M2	RNF39_RAT	RING finger protein 39	36,55	6,08	38,34	6,19
HD/HI	Q63544	SYUG_RAT	Gamma-synuclein	14,96	4,99	12,97	4,78
HD/HI	O35264	PA1B2_RAT	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB...	24,21	5,76	25,58	5,57
HD/HI	P63102	1433Z_RAT	14-3-3 protein zeta/delta	29,08	4,67	27,77	4,73
HD/HI	O35987	NSF1C_RAT	NSFL1 cofactor p47	39,09	5,24	40,67	5,04
HD/HI	P62959	HINT1_RAT	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	15,59	6,39	13,77	6,36

TABLA 5 Proteínas expresadas en el hipocampo derecho con sus códigos y comparando las masas y puntos isoeléctricos experimentales con los teóricos.

origen	Código Interno	Protein ID from Swiss Prot	Nombre de la proteína	Masa Exp	PI Exp	Masa Teórica	PI Teórico
HD	A8WCF8	TPRGL_RAT	Tumor protein p63-regulated gene 1-like prote...	29,97	6,73	29,84	6,91
HD	P11884	ALDH2_RAT	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	54,48	6,63	56,48	6,63
HD	P22199	MCR_RAT	Mineralocorticoid receptor	10,69	5,5	10,67	5,49
HD	P31044	PEBP1_RAT	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	19,98	5,31	20,8	5,47
HD	P45592	COF1_RAT	Cofilin-1	19,1	8,34	18,53	8,22
HD	P61983	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma	29	5	28,3	4,8
HD	Q99JA8	NGB_RAT	Neuroglobin	15,26	5,35	16,98	5,39
HD	Q9QWR2	Q9QWR2_RAT	Calcium-binding protein P23K beta	17,2	4,8	16,85	4,7
HD	P97829	CD47_RAT	Leukocyte surface antigen CD47	34,5	9,17	32,99	8,91
HD	P07483	FABPH_RAT	Fatty acid-binding protein, heart	15.78	5.97	14.53	5.90
HD	P26772	CH10_RAT	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	10.82	8.80	10.90	8.89
HD	Q7TSC7	Q7TSC7_RAT	Jacob	24.97	8.94	25.87	8.99
HD	P62775	MTPN_RAT	Myotrophin	14.85	5.31	12.86	5.27
HD	P21707	SYT1_RAT	Synaptotagmin-1	46.36	8.47	47.39	8.57

TABLA 6 Proteínas expresadas en el hipocampo izquierdo con sus códigos y comparando las masas y puntos isoeléctricos experimentales con los teóricos.

origen	Código Interno	Protein ID from Swiss Prot	Nombre de la proteína	Masa Exp	PI Exp	Masa Teórica	PI Teórico
HI	O88209	O88209_RAT	PKH alpha	57,53	7,08	56,28	7,02
HI	P31977	EZRI_RAT	Ezrin	68,35	5,99	69,39	5,83
HI	P55094	NR2C2_RAT	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	63,46	5,88	65,34	6,06
HI	P60571	PANX2_RAT	Pannexin-2	75,13	7,3	74,43	7,27
HI	P70615	LMNB1_RAT	Lamin-B1	66,44	5,36	66,6	5,16
HI	O08697	ARL2_RAT	ADP-ribosylation factor-like protein 2	21,62	5,68	20,83	5,67
HI	O35244	PRDX6_RAT	Peroxiredoxin-6	24,15	5,63	24,81	5,64
HI	Q80WE1	FMR1_RAT	Fragile X mental retardation protein 1 homolo...	64,89	6,69	66,78	6,77
HI	P68255	1433T_RAT	14-3-3 protein theta	25,86	4,83	27,77	4,69
HI	Q62845	CNTN4_RAT	Contactin-4	76,31	6,19	77,05	6,05

Del total de las proteínas expresadas en el análisis proteómico, se destacan las asociadas con la plasticidad neuronal. **La figura 28** representa algunos ejemplos de esas proteínas ilustrando la relación entre la intensidad del estímulo estresor y su nivel de expresión y las **figuras 29 y 30** comparan a modo de ejemplo la expresión de dos de las proteínas representadas en 3D y la intensidad de la mancha en el gel. **ANEXO 4**

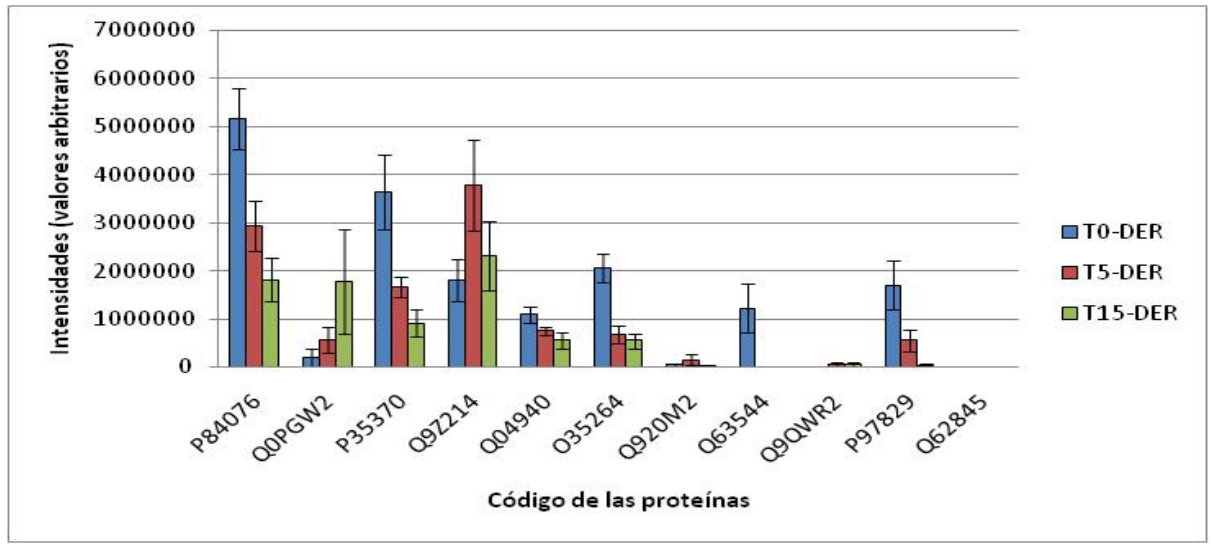


FIGURA 26. Relación de la expresión de proteínas que intervienen en la plasticidad neuronal con la intensidad del estímulo estresor. Códigos: P84076: *Proteína hipocalcina neuronal específica de unión a calcio*; Q0PGW2: *Proteína LCHN*; P35370: *Receptor de nociceptina*; Q9Z214: *Proteína homóloga 1 Homer*; Q04940: *Neurogranina*; O35264: *Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa IB...*; Q920M2: *Proteína 39 de señalización RING*; Q63544: *Gamma-sinucleína*; Q9QWR2: *Proteína de unión a calcio beta P23K*; P97829: *Antígeno de superficie de los leucocitos CD47*; Q62845: *Contactina-4*

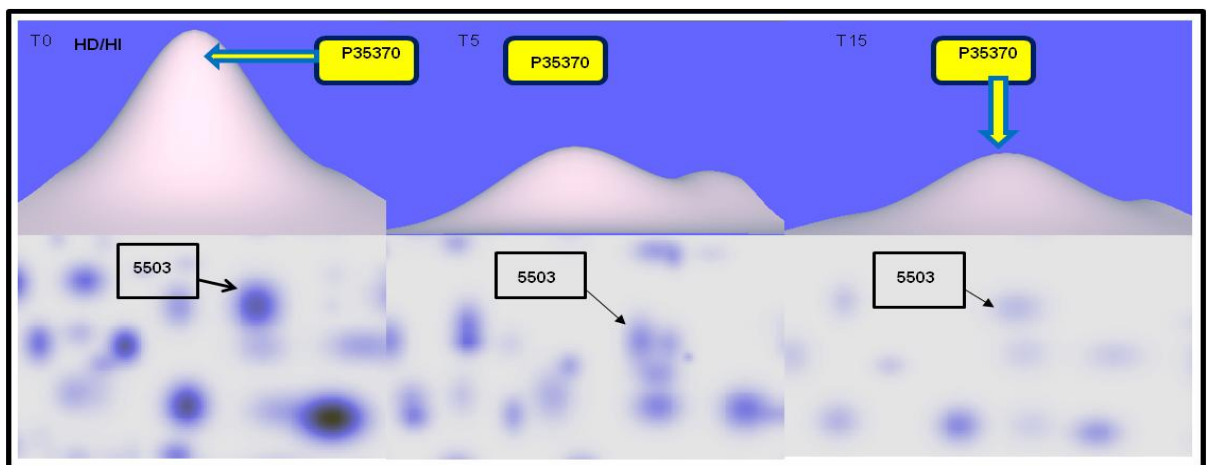


FIGURA 27. Imagen 3D e intensidad de la mancha en el gel de la proteína P35370: *Receptor de noniceptina*

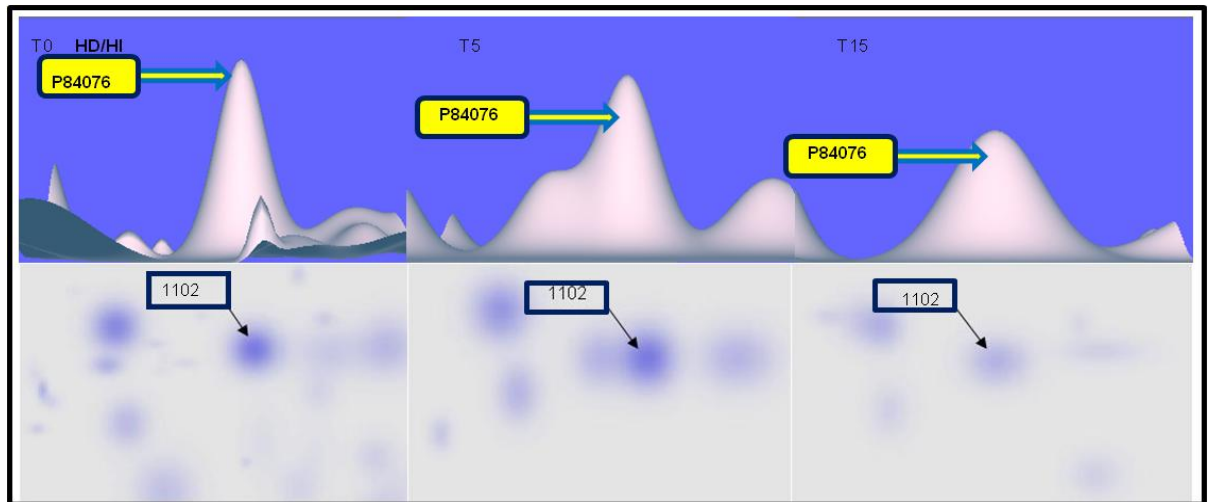


FIGURA 28. Imagen 3D e intensidad de la mancha en el gel de la proteína P84076: *la proteína hipocalcina neuronal específica de unión a calcio*

3.3.3 Análisis de Resultados Y Discusión en el Hipocampo Dorsal

El análisis proteómico demostró diferencias cuantitativas en la expresión de proteínas entre los dos hipocampos, notándose una lateralidad cerebral hacia el hipocampo derecho de acuerdo a la intensidad del estímulo.

Del total de las proteínas obtenidas del análisis proteómico, aproximadamente el 20% intervienen en la neuroplasticidad cerebral entre las cuales podemos mencionar a manera de ejemplo: la proteína *hipocalcina neuronal específica de unión a calcio*, la cual juega un papel fundamental en la depresión a largo plazo; *la proteína LCHN*, interviene en la neuritogénesis, así como en la recuperación neuronal y/o reestructuración de la isquemia transitoria cerebral en el hipocampo; *receptor de nociceptina*, es un ligando natural acoplado a la proteína G, anteriormente llamado receptor de opioide (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995, apud Alexander Kuzmin et al 2009), juega un papel fundamental en la neuroplasticidad del hipocampo, en el aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo; *Antígeno de superficie de los leucocitos CD47*, interviene en la

formación de la memoria y la plasticidad sináptica; *Contactina-4*, interviene en la sinaptogénesis, la *Proteína homóloga 1*, participa en los cambios estructurales que se producen en las sinapsis durante el desarrollo y plasticidad neuronal de larga duración; la *Neurogranina*, juega papel en la plasticidad sináptica y aprendizaje espacial; la *Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa IB...*, juega un papel importante durante el desarrollo del cerebro y las neuronas del hipocampo; la Proteína 39 de señalización *RING*, participa en la potenciación a largo plazo: transmisión de señales entre dos neuronas en forma duradera; *Gamma-sinucleína*, a pesar de que originalmente caracterizaron a esta proteína en el núcleo y citoplasma, micrografías electrónicas evidenciaron que en la región CA3 del hipocampo de la rata esta proteína se encuentra restringida al citoplasma de las terminaciones presinápticas (Iwai et al., 1995, apud Bennett, M. Catherine, 2005) desempeña un papel en la integridad de la red de neurofilamentos e intervienen en la modulación de la arquitectura axonal durante el desarrollo y en el adulto y la *Proteína de unión a calcio beta P23K*, interviene en la proliferación axonal y plasticidad sináptica.

De acuerdo a los resultados obtenidos, además de la lateralización del hipocampo con respecto al número de manchas detectadas inicialmente por el software, se observó una asimetría hacia el hipocampo derecho con relación a la neuroplasticidad, presentándose un 23% de expresión de proteínas en el hipocampo derecho con relación a un 11,11% en el hipocampo izquierdo como se muestra en la comparación de la **figura 31 y 32**.

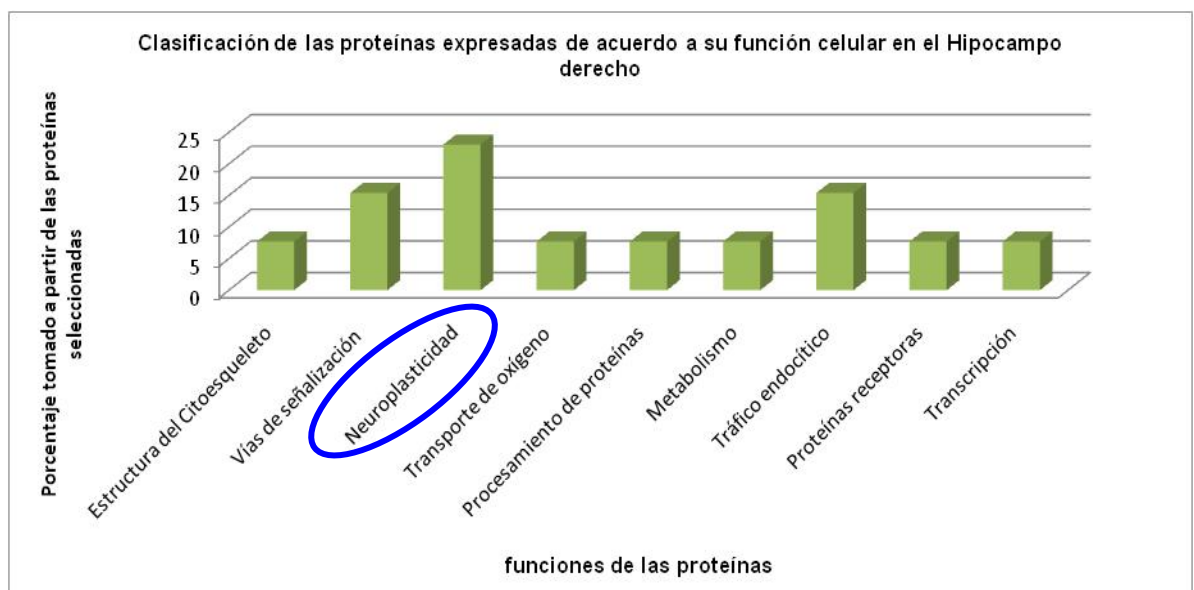


FIGURA 29. Gráfico de barra que relaciona la cantidad de proteínas expresadas con su función celular, según el análisis proteómico en el hipocampo derecho. El porcentaje citado fue calculado a partir del total de proteínas seleccionadas de acuerdo al criterio enunciado anteriormente (citado en el ítem 3.3.1)

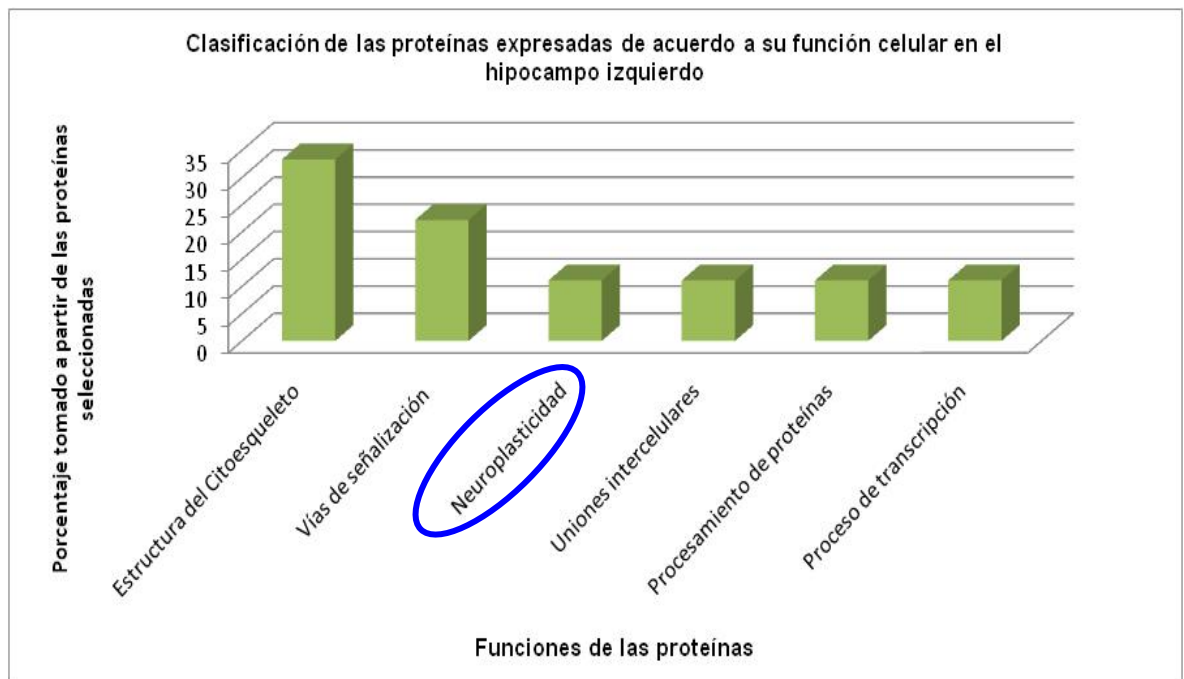


FIGURA 30. Gráfico de barra que relaciona la cantidad de proteínas expresadas con su función celular, según el análisis proteómico en el hipocampo izquierdo. El porcentaje citado fue calculado a partir del total de proteínas seleccionadas de acuerdo al criterio enunciado anteriormente (citado en el ítem 3.3.1)

Con respecto a la relación expresión proteica vs intensidad del estímulo de las proteínas involucradas en la neuroplasticidad, se observó que la proteína hipocalcina neuronal específica de unión a calcio; *receptor de nociceptina*, *Gamma-sinucleína* y la *Antígeno de superficie de los leucocitos CD47*, disminuyen

a medida que aumenta la intensidad del estímulo (dosis-efecto decreciente), siendo esta la tendencia de la mayor parte de las proteínas expresadas según el análisis proteómico general. El caso específico de la proteína *receptor de nociceptina*, estudios indican que esta proteína juega un papel fundamental en la neuroplasticidad del hipocampo, en el aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo. Además ha sido demostrado que inhibe la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) (Yu et al ., 1997; Yu a nd Xie, 1998, apud Alexander Kuzmin et al 2009), modula una serie de funciones cerebrales, incluyendo las emociones y los comportamientos instintivos. Lo que indicaría según su expresión de acuerdo al análisis proteómico que hay una tendencia a que disminuya la capacidad de aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo.

Lo anterior demuestra que la exposición a la prueba del nado forzado origina cambios neurobiológicos asociados al estímulo estresor, y que dichos cambios son marcados a medida que se aumenta la intensidad del estresor

Estudios llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* indican que al aumentar la magnitud del estrés (en duración e intensidad) deteriora la memoria dependiente del hipocampo, lo cual interferiría con la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo (o procesos relacionados) (Kim J.J, Diamond D.M. 2002).

En el equivalente experimental de la indefensión aprendida (donde las ratas no pueden realizar ninguna respuesta adaptativa para escapar del estímulo aversivo), se produce un deterioro de la memoria y el aprendizaje. (Kim, J.J.; Diamond D.M. 2002).

Así pues, el efecto del estrés parecería afectar el rango fisiológico de la plasticidad sináptica de manera que se favorecería el desarrollo de la depresión sobre la potenciación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio se pudo notar que la expresión de las proteínas asociadas con la neuroplasticidad presentaron un efecto dosis-dependiente decreciente, indicando que la intensidad del estímulo a que fue sometido el animal en la prueba de nado forzado, probablemente podría afectar a la memoria y a la plasticidad sináptica.

Es interesante señalar que los cambios en la actividad neuronal dependen de los cambios en el empalme de ciertas proteínas que conforman el citoesqueleto, también se ha observado, que pueden contribuir a la plasticidad neuronal (A. Samara, et, al. 2011)

La liberación de neurotransmisores y algunas otras funciones cerebrales, modulan a corto y largo plazo la eficacia sináptica y estos son regulados por los iones de calcio y estos a su vez son mediados por las proteínas de unión a calcio. (Fountoulakis, M. 2005). En el presente estudio se expresaron dos proteínas que están relacionadas con la unión a calcio y que juegan un papel fundamental en la plasticidad neuronal, entre las cuales tenemos la proteína *hipocalcina neuronal específica de unión a calcio* y la *Proteína de unión a calcio beta P23K*. En la primera se notó una expresión de dosis efecto decreciente mientras que en la segunda, no se detectó en el grupo control pero si una baja expresión en los otros tratamientos (T5 y T15). **Figura 28**

Estudio previos indican que el calcio juega un papel principal en la mediación de distintos eventos intracelulares, que incluyen la plasticidad neuronal, la supervivencia celular y la muerte celular (Rasmussen H.1986; Bechuck JN, et al 2000). La falta de movilización de calcio citosólico sería responsable de los cambios en la excitabilidad sináptica, cambios que probablemente conforman la "memoria de aprendizaje" (Rasmussen H.1986). De acuerdo a lo anterior la decreciente expresión de estas proteínas debido a la intensidad del estímulo

estresor, provocan cambios neurobiológicos que podrían influir sobre la memoria y el aprendizaje.

Otro grupo de proteínas que se encontraron en el análisis proteómico con un alto nivel de expresión (15%) son aquellas que forman parte del citoesqueleto y la envoltura nuclear; dentro de las cuales destacamos la *Ezrina*, proteína que actúa como un intermediario entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina. Se expresa en el hipocampo y desempeña un papel clave en la adhesión de la superficie celular, la migración, la organización y la morfogénesis de células epiteliales. Otra proteína es la ADP- proteína factor 2 de ribosilación, son proteínas que funcionan como reguladores del tráfico vesicular y la organización del citoesqueleto de actina.

El aumento del tráfico de las vesículas puede reflejar un aumento de la actividad sináptica y la plasticidad (A. Samara, et, al. 2011).

3.3.4 Cantidad de Manchas Detectadas en Amígdala Derecha e Izquierda

De acuerdo con el análisis de todos los geles que conformaron el experimento se obtuvieron inicialmente los datos de la cantidad de manchas detectadas en la amígdala derecha e izquierda. En la amígdala de las ratas estudiadas se obtuvieron los siguientes resultados: En la amígdala derecha se detectaron 150 spots en el grupo control (sin exposición al nado T0), 108 en el tratamiento de 5 minutos de exposición a la prueba de nado forzado (T5) y 100 en el tratamiento de 15 min de exposición (T15). De igual forma en la amígdala izquierda se detectaron 142 spots en el grupo control (sin exposición al nado T0) 102 en el tratamiento de 5 minutos de exposición a la prueba (T5) y 100 en el tratamiento de 15 min (T15).

Tabla 7.

TABLA 7 Cantidad de manchas detectadas inicialmente en la amígdala derecha e izquierda

TRATAMIENTO	AMÍGDALA DERECHA	AMÍGDALA IZQUIERDA
Control: T0	150	142
5 min: T5	108	102
15 min: T15	100	100

Se comparó la cantidad de manchas detectadas en los geles de la amígdala derecha e izquierda y se encontró que estas disminuyen cuando los animales son expuestos al estímulo estresor y a medida que la intensidad del mismo es mayor. Con respecto a la amígdala derecha se notó una disminución de las proteínas cuando la rata fue sometida a 5 y 15 minutos de exposición a la prueba de nado forzado con relación al control. En la amígdala izquierda se notó un comportamiento muy similar.

Teniendo en cuenta los criterios enunciados anteriormente y de acuerdo al análisis proteómico y comparándolo con la base de datos expasy, se encontraron 8 proteínas que presentaron diferencias en sus niveles de expresión en los grupos analizados (1.13% del proteoma detectable), de las cuales 6 (75% de las encontradas en la base de datos expasy) son comunes en la amígdala derecha e izquierda (AD/AI); 2 (25%) se encontraron solo en la amígdala derecha (AD).

Figura 33



FIGURA 31. Proteínas detectadas en la amígdala según la base de datos expasy

Las 8 proteínas expresadas con sus masas moleculares (PM) y puntos isoeléctricos (pI) experimentales y teóricos se encuentran en la **tabla 8**.

TABLA 8 Proteínas expresadas en la amígdala derecha e izquierda, y sólo aquellas expresadas en la amígdala derecha, con sus códigos y comparando las masas y puntos isoeléctricos experimentales con los teóricos.

ORIGEN	CÓDIGO INTERNO	PROTEIN ID FROM SWISS PROT	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	MASA EXP	PI EXP	MASA TEÓRICA	PI TEÓRICO
AD/AI	P97557	KCNV1_RAT	Potassium voltage-gated channel subfamily V m... 3-alpha-hydroxysteroid	59,52	5,95	56,66	5,78
AD/AI	P23457	DIDH_RAT	dehydrogenase Neurogenic differentiation	36,82	6,58	37,02	6,67
AD/AI	Q63689	NDF2_RAT	factor 2 Limbic system-associated	41,14	6,24	41,46	6,18
AD/AI	Q62813	LSAMP_RAT	membrane protein	37,84	6,41	37,32	6,26
AD/AI	B0YIR8	B0YIR8_RAT	RCG20955 Activity-regulated cytoskeleton-	38,56	8,74	39,34	8,65
AD/AI	Q63053	ARC_RAT	associated pr...	45,54	5,3	45,35	5,34
AD	Q6PST4	ATLA1_RAT	Atlastin-1	61,69	5,66	67,37	5,76
AD	Q07917	NR4A2_RAT	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2	65,53	8,37	66,62	8,32

Estas son proteínas que intervienen en la plasticidad neuronal, en las vía de señalización celular, proteína de transporte de la membrana y enzimas relacionadas con el metabolismo. La **figura 34** muestra las funciones y el porcentaje de expresión de cada una de ellas.

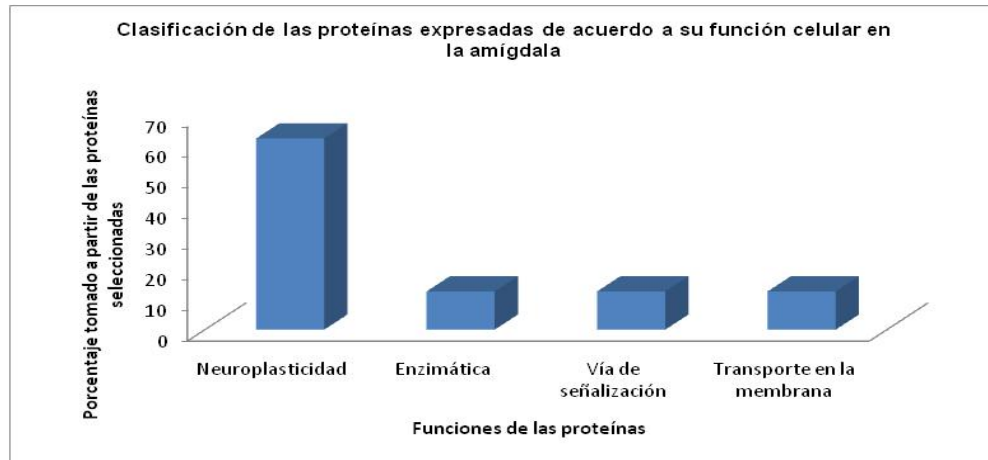


FIGURA 32. Gráfico de barra que relaciona la cantidad de proteínas expresadas con su función celular, según el análisis proteómico en la amígdala derecha e izquierda. El porcentaje citado fue calculado a partir del total de proteínas seleccionadas de acuerdo al criterio enunciado anteriormente (citado en el ítem 3.3.1)

La **figura 35 y 36**, muestra las proteínas expresadas según la base de datos expasy en la amígdala derecha e izquierda con relación a la intensidad del estímulo estresor.

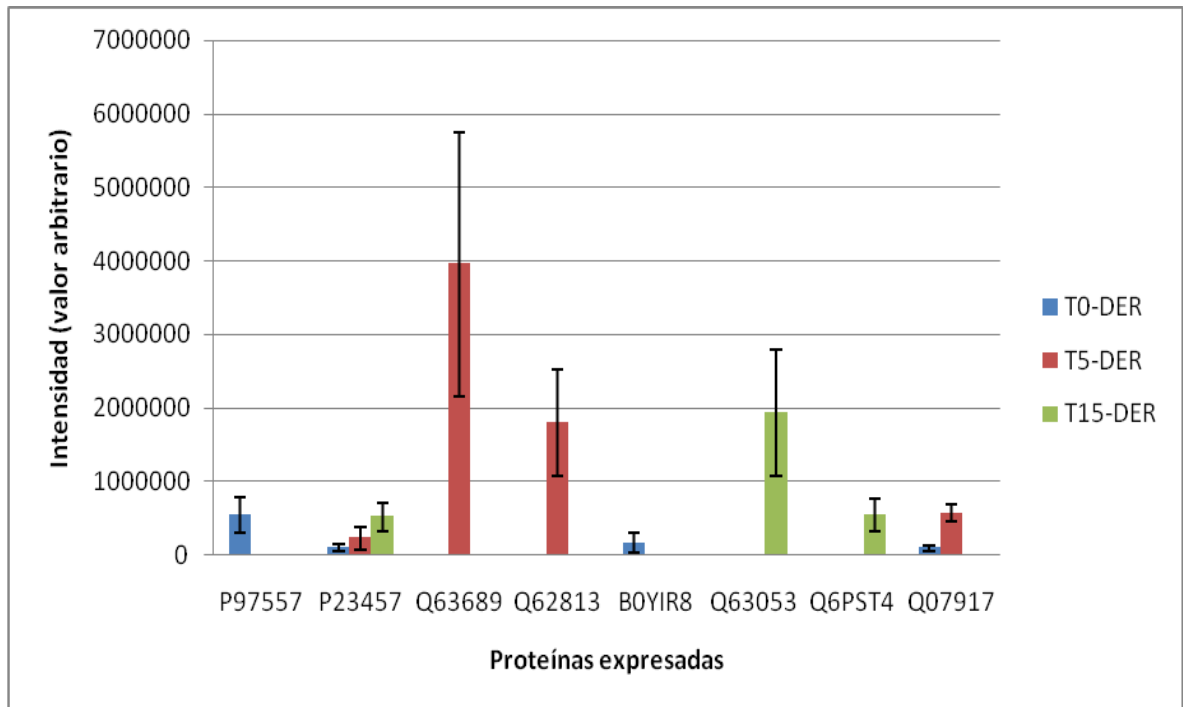


FIGURA 33. Expresión de las proteínas en la amígdala derecha según el análisis proteómico. Códigos: P97557: *Subfamilia de proteínas canales de potasio regulados por voltaje*.; P23457: *3-alfa-hidroxiesteroides deshidrogenasa*; Q63689: *Factor 2 de diferenciación neurogénica*; Q62813: *Proteína de membrana asociada al sistema límbico*; B0YIR8: *RCG20955*; Q63053: *Proteína asociada al citoesqueleto con actividad reguladora*; Q6PST4: *Atlastina-1*; Q07917: *Receptor Nuclear de la subfamilia 4 miembro 2 del grupo A*

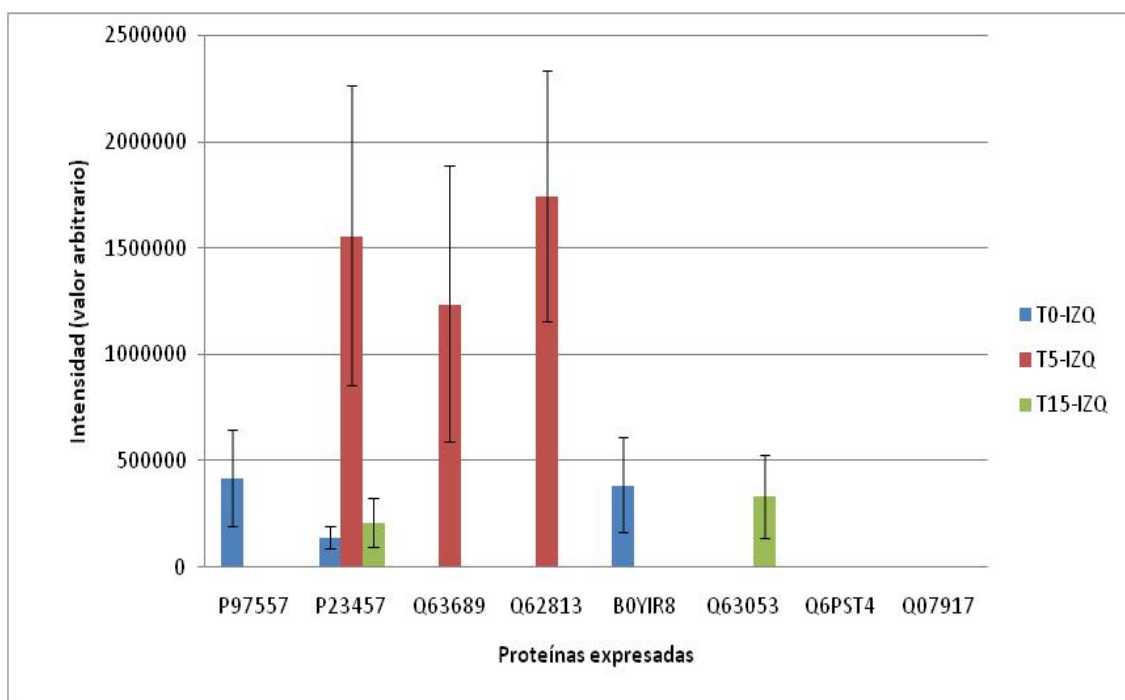


FIGURA 34. Expresión de las proteínas en la amígdala izquierda según el análisis proteómico. Códigos: P97557: *Subfamilia de proteínas canales de potasio regulados por voltaje*; P23457: *3-alfa-hidroxiesteroides deshidrogenasa*; Q63689: *Factor 2 de diferenciación neurogénica*; Q62813: *Proteína de membrana asociada al sistema límbico*; B0YIR8: *RCG20955*; Q63053: *Proteína asociada al citoesqueleto con actividad reguladora*.

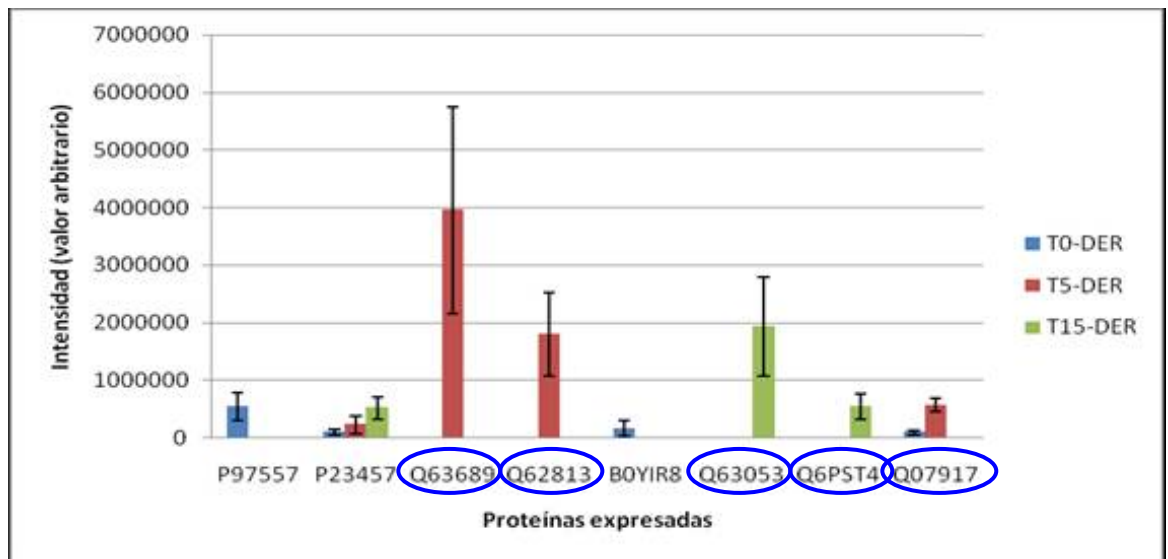


FIGURA 35. Relación de la expresión de proteínas que intervienen en la plasticidad neuronal con la intensidad del estímulo estresor. Códigos: Q63689: *Factor 2 de diferenciación neurogénica*; Q62813: *Proteína de membrana asociada al sistema límbico*; Q63053: *Proteína asociada al citoesqueleto con actividad reguladora*; Q6PST4: *Atlastina-1*; Q07917: *Receptor Nuclear de la subfamilia 4 miembro 2 del grupo A*

Del total de las proteínas expresadas en el análisis proteómico, se destacan las asociadas con la plasticidad neuronal. **La figura 37** representa algunos ejemplos de esas proteínas ilustrando la relación entre la intensidad del estímulo estresor y su nivel de expresión. Aquellas proteínas resaltadas con el ovalo representan las relacionadas con la neuroplasticidad.

3.3.5 Análisis de Resultados en Amígdala

El análisis proteómico demostró que el 75% de las proteínas expresadas se encuentran en ambas amígdalas (derecha e izquierda) y un 25% de las proteínas

expresadas sólo en la amígdala derecha, demostrando lateralidad hacia esa región cerebral.

Del total de las proteínas obtenidas del análisis proteómico, aproximadamente el 62,5% intervienen en la neuroplasticidad cerebral entre las cuales podemos mencionar a manera de ejemplo: *El Factor 2 de diferenciación neurogénica*, esta proteína contribuye a la regulación de varias vías de diferenciación de las células, como las que promueven las células granulares o el cerebelo o la capa de células del giro dentado del hipocampo; además juegan un papel importante en la morfogénesis de dendritas y el mantenimiento de la corteza cerebelosa. Participan en el aprendizaje asociativo, la respuesta del comportamiento al miedo. *La Proteína de membrana asociada al sistema límbico*, (LAMP) es una glicoproteína de la superficie de la membrana neuronal de 68 kD en regiones corticales y subcorticales del sistema límbico, funcionan en la cognición, la emoción, la memoria y el aprendizaje.

Durante el desarrollo del sistema límbico, LAMP se encuentra en la superficie de las membranas de los axones y conos de crecimiento, donde actúa como una molécula de adhesión homofílica selectiva, y guía el desarrollo de patrones específicos de las conexiones neuronales. *La Proteína asociada al citoesqueleto con actividad reguladora*, (Arc/ Arg3.1) es un gen inmediato-temprano que ha sido ampliamente implicado en la plasticidad sináptica y en la consolidación de una variedad de tareas de memoria del hipocampo y la amígdala. *La Atlastina-1*, regula el desarrollo axonal durante la prolongación neuronal y la *Receptor Nuclear de la subfamilia 4 miembro 2 del grupo A*, es un regulador de la transcripción que es importante para la diferenciación y el mantenimiento de las neuronas del meso-diencefalo durante el desarrollo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, además de la lateralización de la amígdala teniendo en cuenta el total del análisis proteómico (8), se observó una asimetría hacia la amígdala derecha con relación a la neuroplasticidad, presentándose un

62,5% de expresión de proteínas en la amígdala derecha con relación a un 37,5% en la amígdala izquierda como se muestra en la **figura 38**.

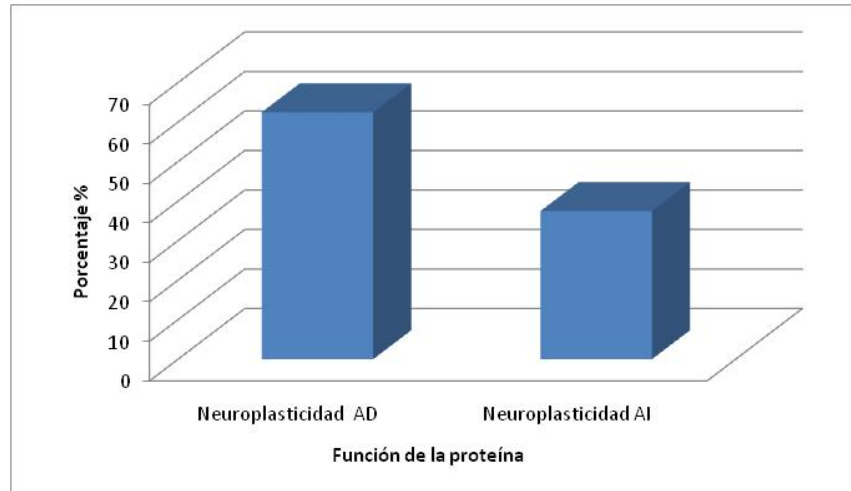


FIGURA 36. Diferencias en la expresión entre la AD y la AI con relación a las proteínas que participan en la neuroplasticidad

Con respecto a la relación expresión proteica vs intensidad del estímulo de las proteínas involucradas en la neuroplasticidad, se observó que el *Factor 2 de diferenciación neurogénica*, y la *Proteína de membrana asociada al sistema límbico*, (LAMP) se encuentran muy expresadas cuando el animal fue sometido a 5 minutos en la prueba de nado forzado, no encontrándose expresión alguna en el control y en el tratamiento de 15 minutos. Esta expresión posiblemente podría indicar que el animal en ese tiempo (5 min) está relacionando el aprendizaje asociativo, la emoción, la memoria al estímulo estresor.

La *Proteína asociada al citoesqueleto con actividad reguladora*.,(Arc/ Arg3.1) y la *Atlastina-1*, se expresan cuando el animal fue sometido a 15 min de exposición al nado, no encontrándose expresión proteica en el control (sin exposición al nado) ni cuando fue expuesto a 5 min de la prueba. Lo anterior probablemente se deba a que el animal en ese tiempo haya aprendido a asimilar al estímulo estresor.

Es interesante señalar que los cambios en la actividad neuronal dependen de los cambios en el empalme de ciertas proteínas que conforman el citoesqueleto, también se ha observado, que pueden contribuir a la plasticidad neuronal (A. Samara, et, al. 2011)

3.4 CORRELACIÓN ENTRE LA FASE COMPORTAMENTAL, FISIOLÓGICA Y LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN RATAS SOMETIDAS A DIFERENTES NIVELES DE ESTRÉS

3.4.1 Análisis Estadístico

Con el fin de correlacionar el tiempo de exposición al que es expuesto el animal en el nado forzado, con la expresión de proteínas, se realizó un análisis no paramétrico con una correlación de Spearman Rank Order. Para ello se tomó como criterio aquellas proteínas implicadas en la neuroplasticidad ya que estas presentaron un alto porcentaje de expresión con respecto al proteoma general.

3.4.2 Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos del análisis de correlación de Spearman Rank Order pueden observarse en el **ANEXO 7**

Al correlacionar el tiempo de exposición al que fue sometido el animal a la prueba de nado forzado con la expresión de proteínas, se notó que a medida que aumenta el tiempo de exposición se presentó una correlación negativa con la expresión de proteínas, afirmándose de esta manera que existe una inhibición estadísticamente significativa en las proteínas P84076: *Proteína hipocalcina neuronal específica de unión a calcio*, P35370: *Receptor de nociceptina*, P97829: *Antígeno de superficie de los leucocitos CD47*, O08697: *ADP-ribosylation factor-like protein 2*, Q63689: *Factor 2 de diferenciación neurogénica*, Q62813: *Proteína*

de membrana asociada al sistema límbico. La tendencia a la inhibición de la expresión de las proteínas enunciadas anteriormente, además de afectar a la memoria y a la plasticidad sináptica, podría alterar la morfología de las dendritas e inhibir la neurogénesis en el cerebro adulto, lo que potencialmente puede tener un impacto en la memoria y aprendizaje.

Cabe anotar que dos de las proteínas resaltadas sufrieron una correlación positiva al aumentar el tiempo de exposición del estímulo estresor, tal es el caso de las proteínas Q63053: *Proteína asociada al citoesqueleto con actividad reguladora* y Q6PST4: *Atlastina-1*. Estas proteínas están ampliamente implicadas en la plasticidad sináptica, en la memoria del hipocampo y la amígdala, además juegan un papel en el desarrollo axonal durante la prolongación neuronal.

El parámetro comportamental como como criterio de estrés se determinó a través de los cruzamientos. A mayores cruzamientos se notó una correlación negativa en la expresión de las proteínas.

Con respecto a la glicemia y a la tasa metabólica basal de oxígeno, a medida que aumentó el tiempo de exposición al estímulo, se notó una correlación positiva con la expresión de proteínas.

Además al correlacionar la glicemia post con la expresión de proteínas, se observó que en los animales que consumieron menos glucosa, la expresión de las proteínas Q9Z214: *Proteína homóloga 1 Homer* y O08697: *ADP- proteína factor 2 de ribosilación* presentaron una correlación positiva, la primera de ellas interviene en los cambios estructurales que se producen en las sinapsis durante el desarrollo y plasticidad neuronal de larga duración y la otra proteína en la organización del citoesqueleto de actina.

CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias en la expresión de proteínas entre el hipocampo derecho e izquierdo del tipo dosis dependientes decrecientes después de haber sido sometido al animal a diferentes niveles de estrés inducido por la prueba de nado forzado.

Aproximadamente un 20% del total de las proteínas expresadas estarían asociadas con la plasticidad neuronal, demostrando que el hipocampo es una estructura dinámica y muy sensible a los efectos de un estrés agudo o crónico.

Se encontró una lateralidad funcional importante en la expresión de proteínas en el hipocampo dorsal. El análisis proteómico demostró una mayor expresión de las proteínas en el hipocampo derecho con relación al hipocampo izquierdo.

El análisis proteómico mostró que la expresión de proteínas en la amígdala no fue del tipo dosis dependiente decreciente con respecto a la intensidad del estímulo estresor, presentándose una mayor expresión proteica cuando el animal fue expuesto a la prueba de nado forzado a los 5 y 15 minutos.

Con respecto al parámetro comportamental, se encontró que el animal pasaba mayor tiempo realizando cruzamientos en la periferia en comparación con el centro.

A nivel fisiológico, cuando el animal se encontró bajo condiciones de estrés por la exposición al nado, el consumo de oxígeno se incrementó; de igual forma se presentó un aumento en los niveles de glicemia en los primeros minutos de exposición y luego al aumentar la intensidad del estímulo estresor los niveles de glicemia descendieron.

Se encontró una relación dosis dependientes decrecientes en las proteínas asociadas a la plasticidad, predominando una correlación negativa

RECOMENDACIONES

Determinar cambios a nivel proteómico dentro de las regiones de proteínas que mostraron baja resolución, aumentando la longitud de los strips (geles de la primera dimensión) empleados en la corrida del isoelectroenfoco. Además, esto permitiría esclarecer cambios asociados en la expresión del hipocampo y la amígdala de ratas expuestas a la prueba de nado forzado de una manera más específica a proteínas que presentan isoformas con pequeñas diferencias en sus puntos isoeléctricos. De igual forma se sugiere utilizar un método de tinción mucho más sensible (por ej. fluorescente), para poder observar de mejor la expresión de las proteínas.

Efectuar un mapeo proteómico identificando las proteínas que presentaron variaciones en su expresión por técnicas de espectrometría de Masas MALDI-TOF y/o ESI-MS, ya sea por el nivel de intensidad o por la expresión diferencial entre los grupos analizados, con el fin de monitorear dichas variaciones en asociación a modelos de depresión y memoria como lo es la prueba de nado forzado, y de esta manera correlacionar el nivel comportamental con las variaciones neuroproteómicas que se puedan presentar.

Finalmente, se espera que estos resultados proporcionen una nueva perspectiva utilizando herramientas proteómicas para favorecer la investigación en el campo de las Neurociencias a nivel Nacional.

BIBLIOGRAFÍA

Adamec R, Burton P, Shallow T, Budgell J. Unilateral block of NMDA receptors in the amygdale prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle-effective hemisphere depends on the behavior. *Physiol Behav* 1999; 65:739 –751.

Adelman R, Holliday M. Oxygen consumption in the azotemic rat. *Am J Clin Nutr.* 1977; 30: 565-567

Alexander G, Bell A, Setchell B. Regional distribution of cardiac output in young lambs: effect of cold exposure and treatment with catecholamines. *J Physiol* 1972; 220: 511-528.

Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. *Behavioral Neuroscience. 2005 Reviews* 29: 525–546

Awad N, Gagnon M, Desrochers A, Tsiakas M, Messier C. Impact of peripheral glucoregulation on memory. *Behavioral Neuroscience* 2002; 116: 691-702

Badowska-Szalewska E, Spodnik E, Klejbor I y Moryś J, Effects of chronic forced swim stress on hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor (TrkB) immunoreactive cells in juvenile and aged rats. *Acta Neurobiol Exp* 2010; 70: 370–381

Ball E, Jungas R. On the action of hormones which accelerate the rate of oxygen consumption and fatty acid release in rat adipose tissue in vitro. *PNAS USA* 1961; 15: 932-941,

Bannerman D, Rawlins J, McHugh S, Deacon R, Yee BK, Bast T, Zhang W, Pothuizen H y Feldon J. Regional dissociations within the hippocampus? memory and anxiety. *Neuroscience and Behavior* 2004; Reviews 28

Bebchuck J, Arfken C, Dolan-Manji S, Murphy J, Hasanat K, Manji HK. A preliminary investigation of a proteinkinase C inhibitor in the treatment of acute mania. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57: 95-97.

Benedict F, MacLeod G. The Heat Production of the Albino Rat I. Technique, Activity Control, and the Influence of Fasting. *Nutr*, 1929; 1: 343-366.

Benton D, Owens D. Blood glucose and human memory. *Psychopharmacology (Berl)*, 1993; 113: 83-88,

Beranova-Giorgianni S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: Strengths and limitations. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003; 22 (5), 273-281.

Beranova-Giorgianni S, Pabst M J, Russell T, Giorgianni F, Goldowitz D, Desiderio D. Preliminary analysis of the mouse cerebellum proteome. *Molecular Brain Research* 2002; 98: 135-140

Bertoglio L, Regiane L, Samia J; Silveira G. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behavioural Brain Research* 2006; 175:183-188.

Blake T, Varnhagen C, Parent MB. Emotionally arousing pictures increase blood glucose levels and enhance recall. *Neurobiol Learn Mem* 2001; 75: 262-273.

Bramante P. Quantitation of oxygen consumption and spontaneous muscular activity of the rat. *J Appl Physiol* 1961; 16: 982-990,

Botelho de Oliveira S, Conde C. Modelos Animales de Estrés Post-traumático. Salud UIS. 2003; 35: 97-107

Cameron M. The action of nitrophenols on the metabolic rate of rats. Br J Pharmacol Chemother 1958; 13: 25-29

Castellanos L, González L ,Padron G. PROTÉOMICA. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Capítulo 20; 367-403

Cerezo J, García B. Influencia del peso y la temperatura sobre el consumo de oxígeno de rutina del Dentón común (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). Revista Aquatic 2004; 21: 16-23

Colantonio D. Chan D.. The Clinical application of proteomics. Clinica chimica Acta. 2005; 357: 151-158

Conde C, Costa V, Tomaz C. Un conjunto de programas para el registro y procesamiento de datos comportamentales en investigación de fisiología y farmacología. Biotemas 2000; 13: 145-159

De Pablo J, Guillamón A. Validez de la prueba de natación forzada como modelo animal de depresión. Revista de fisiología general y aplicada. 1992; 45(2): 151-160.

Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ. "The hippocampus—what does it do?" Behav Neural Biol. 1992; 57: 2–36.

Escorihuela R, Fernández-Teruel A. Modelos animales en psicopatología y psicofarmacología: del análisis experimental de la conducta a la neurogenética. *Psicología Conductual*, Vol. 6, Nº 1, 1998, pp. 165-191

Esquivel C, Velasco V, Martínez E, Barbachano E, González G, Castillo C. Coeficiente de correlación intraclase vs correlación de Pearson de la glucemia capilar por reflectometría y glucemia plasmática. *Med Int Mex* 2006; 22: 165-71

Foster J, Lidder P, Süram S. Glucose and memory: fractionation of enhancement effects? *Psychopharmacology (Berlin)* 1998; 137: 259-70,

Fountoulakis M, Tsangaris G, Maris A, Lubec G. The rat brain hippocampus proteome. *Journal of Chromatography B*. 2005 ; 819 : 115-129.

García H. M. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG* 2000; 1 (2): 31-41

Gold P. Role of glucose in regulating the brain and cognition. *Am J Clin Nutr. Review* 1995; 61: 987S-995S

Gold P. Glucose and age-related changes in memory. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 60-64

Gómez, C. y Saldivar, A. Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*. 2002; 25: 14-24

Gore CJ, Withers RT. Effect of exercise intensity and duration on postexercise metabolism. *J Appl Physiol* 1990; 68(6): 2362-2368.

Görg A, Weiss W, Dunn M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4(12): 3665-85.

Gygi S, Corthals G, Zhang Y, Rochon Yvan, y Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis based proteome analysis technology. PNAS. 2000; 97: (17), 9390-9395.

Hall J, Gold P. The effects of training, epinephrine, and glucose injections on plasma glucose levels in rats. Behav Neural Biol 1986; 46: 156-167

Hall J, Goder-Frederick L, Chewning W, Silveira J, Gold P. Glucose enhancement of performance on memory tests in young and aged humans. Neuropsychologia 1989; 27: 1129-38

Hall J, Gold P. Plasma glucose levels predict the disrupting effects of adrenoceptor antagonists on enhancement of memory storage. Eur J Pharmacol 1992; 20: 365-70

Helmstetter F. "The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia". Behavioral Neurosciencie 1992; 106: 518 –528.

Henke P. "Attenuation of shock-induced ulcers after lesion in the medial amygdala". Physiol Behav 1981; 27:143–146.

Himsworth R. Compensatory reactions to a lack of metabolizable glucose. J Physiol 1968; 198: 451-465

Hulks G, Mohammed A, Jardine A, Connell J, Thomson N. Circulating plasma concentrations of atrial natriuretic peptide and catecholamines in response to maximal exercise in normal and asthmatic subjects. Thorax 1991; 46: 824-828,

Illera J., Silván G, Gil-Cabrera F, Illera M. Neurofisiología del estrés y síndrome de adaptación en el bovino de lidia. Symposium del toro de lidia 2009

Issaq H, Veenstra T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): Advances and perspectives. *BioTechniques* 2008; 44(5): 697-700.

Kim J.J, Koo J W, Lee H, Han J-S « Amygdalar Inactivation Blocks Stress-Induced Impairments in Hippocampal Long-Term Potentiation and Spatial Memory”. *The Journal of Neuroscience*. 2005 ; 25(6):1532–1539

Kim J y Yoon KS. Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trens Neuroscience* 1998,;21: 505-509.

Kim J y Diamond D. “The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories”. *Neuroscience* 2002; 3: 453-462.

Kjaer M. Metabolismo del combustible hepático durante el ejercicio. *Am. J. Physiol.* 1993; 265:E275-E283.

Kuzmin A, Madjid N, Johansson B, Terenius L, Ogren S.O . The nociceptin system and hippocampal cognition in mice A pharmacological and genetic analysis. *Brain Research*. 2009. 1305 suppl:S7-19

LaBaer, J. So, you want to look for biomarkers. *Journal of Proteome Research* 2005; 4: 1053-1059.

Labrador F. El estrés: nuevas técnicas para su control. Madrid: Temas de Hoy. 1992; Isbn 84-7880-170-177

Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.

Langen H, Röder D, Juranville J, Fountoulakis M. Effect of protein application mode and acrylamide concentration on the resolution of protein spots separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1997; 18 (11): 2085-2090.

Lazarus R y Folkman S. "Estrés y procesos cognitivos". Ed. Martínez Roca. Barcelona 1986

Lowry O. Energy metabolism of the nerve cell. *Nerve as a tissue*. Ed. Haipa. New York 1974; 4: 361-366

Manning C, Ragozzino M, Gold E. Glucose enhancement of memory in patients with senile dementia of the alzheimer's type. *Neurobiology of Aging* 1993; 14: 523-528

Martin P y Bateson P. *Measuring behaviour: Preliminaries to measuring behaviour*. 1993; 4-5: 56-65

Medrano R. Diagnóstico del nivel de Máximo Consumo de Oxígeno (MVO₂) en los adultos mayores del municipio de Camagüey. Facultad de Cultura Física de Camagüey.

(Consultado 04/04/2010) Disponible en: <http://afide.inder.cu/PDF/AREA%201/AFC/AF016.pdf>

Messier C, Gagnon M. Glucose regulation and cognitive functions: relation to Alzheimer's disease and diabetes. *Behav Brain Res* 1996; 75: 1-11

Messner-Pellenc P, Ximenes C, Brasileiro CF, Mercier J, Grilleau R, P'refaut CG. Cardiopulmonary exercise testing. Determinants of dyspnea due to cardiac or pulmonary limitation. *Chest* 1994; 106: 354-360

Moguilevsky J. Oxidative Activity of different hypothalamic area during sexual cycle in rats. *Acta Physiol. Latinoam.* 1965; 15: 423 .

Morrison R, Kinoshita Y, Johnson M, McBee J, Conrads T y Veenstra T. Proteomic Analysis in the Neurociencie. *Molecular & cellular proteomic.* 2002; 1: 553-560

Mucio J. La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opiodes. *Revista de educación bioquímica.* 2007; vol 26: 121-128

Mustaca E, Kamenetzky G. Alcoholismo y ansiedad: modelos animales. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy.* 2006; 6: 343-364

Nascimento L, Pádua A. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytice effects revealed in the elevate plus-maze task in rats. *Neurobiology of learning and memory.* 2007; 88: 177-185

Nelson D y Cox M. *Principles of Biochemistry*, Hardcover Apr 23, 4ta edition, 2004

Newcomer J, Craft S, Fucetola R, Moldin S, Selke G, Paras L, Miller R. Glucose-induced increase in memory performance in patients with schizophrenia. *Schizophr Bull* 1999; 25: 321-35,

Nielsen P, Olsen J, Podtelejnikov A, Jens A, Mann M y Wisniewski J. Proteomic Mapping of Brain Plasma Membrane Proteins. *Molecular & cellular proteomic.* 2005; 4: 402-408

Nothwang H, Becker M, Ociepka K. Protein analysis in the rat auditory brainstem by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular Brain Research.* 2003; 116: 59-69

Ohira Y, Koziol B, Edgerton V, Brooks G. Oxygen consumption and work capacity in iron-deficient anemic rats. *J Nutr*, 1981; 111: 17-25,

Parsons M, Gold P. Glucose enhancement of memory in elderly humans: an inverted-U dose-response curve. *Neurobiol Aging*, v. 13, p. 401-4, 1992

Plebani M. Proteomic: The next revolution in laboratory medicine?. *Clinica chimica Acta*. 2005; 357: 113-122.

Porsolt R, Bertin A, Jalfre M. "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants". *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 1977. 229 (2): 327–336

Posch A, Paulus A, y Brubacher M. Tool for Sample Preparation and Prefractionation in Two-Dimensional Gel (2D) Electrophoresis. Taylor & Francis Group, LLC. 2006

Rasmussen H. The calcium messenger system. *N Engl J Med* 1986; 314: 1094-1101

Reims H, Sevre K, Fossum E, Høiegggen A, Eide I, Kjeldsen S. Plasma catecholamines, blood pressure responses and perceived stress during mental arithmetic stress in young men. *Blood Press* 2004; 13:287-94

Rogers J, Hunsaker M, Kesner R. Effects of ventral and dorsal CA1 subregional lesions on trace fear conditioning. *Neurobiology of learning and memory*. 2006; 86: 72-81

Samara A, Vougas K, Papadopoulou A, Anastasiadou E, Baloyanni N, Paronis E, Chrousos G., and Tsangaris T. Proteomics Reveal Rat Hippocampal Lateral Asymmetry. *Hippocampus* 2011; 21:108-119

Sapolsky R. "Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death". Cambridge, MA: MIT. 1992

Schiaffigi O, Menendez-Patterson A y Marín B. Sexual Cycle and metabolism of the hypophysiotropic and septal areas, caudal nucleus, adenohipophysis and cerebral cortex. *Reproduction* 1974; 1 No 4: 361-366 .

Scoville W, Milner B. "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions". *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957; 20:11–21.

Seligman M. Hipótesis de la Desesperanza Aprendida: Fall in Helplessness. *Psychology Today* 1973; 7, N° 1

Selye H. "A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents". Article classic by from *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 1998; 10: 230a-231

Shuhama R, Del-ben C, Loureiro S y Graeff F. Animal defense strategies and anxiety disorder. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 2007; 79 (1): 97-109.

Solnica B, Naskalski J, Sieradzki J. Analytical performance of glucometers used for routine glucose self-monitoring of diabetic patients. *Clínica Chimica Acta* 2003; 331: 29-35

Sorolla A, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabisco E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radical Biology & Medicine* N. 2008; 45: 667-678

Squire L, Zola M. "Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems". *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:13515–13522.

Stallknecht B, Lorentsen J, Enevoldsen L, Bulow J, Biering-Sorensen F, Galbo H, Kjaer M. Role of the sympathoadrenergic system in adipose tissue metabolism during exercise in humans. *J Physiol* 2001; 536: 283-294

Supawadee S, Supachok S, Payungsak T, Ching T, Suree P, Shui-Tein C. Enhanced detectability in proteome studies. *Journal of Chromatography B* 2007; 849: 91-104.

Trucco M. Stress and mental disorders: neurobiological and psychosocial aspects. *Rev. chil. neuro-psiquiatr.* v.40 supl.2. 2002

Van de Kar L, Blair M. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Frontiers in neuroendocrinology* 1999; 20(1):1-48.

Vercauteren F, Clerens S, Roy L, Hamel N, Arckens L. Early dysregulation of hippocampal proteins in transgenic rat with Alzheimer's disease-linked mutations in amyloid precursor protein and presenilin. *Molecular Brain Research* 2004; 132: 241-259

Villa JG, Córdova A. *Nutrición del deportista*. Ed Gymnos. 2001 Madrid.

Wen C, Jianguo J, Xiaoman X, Sizhi H. Proteomic comparison between human young and old brain by two-dimensional gel electrophoresis and identification of proteins. *Int. J. Devl Neurosciencie*. 2003; 21: 209-216

West S, Goedecke JH, Van NL, Collins M, St Clair GA, Macdonald I, Noakes T, Lambert E. Effects of elevated plasma adrenaline levels on substrate metabolism, effort perception and muscle activation during low-to-moderate intensity exercise. *Pflugers Arch* 2006; 451: 727-37

Westman-Brinkmalm, A., Ruetschi, U., Portelius, E., Andreasson, U., Brinkmalm, G., Karlsson, G, Hansson, S., Zetterberg, H, Blennow, K. Proteomics/peptidomics tools to find CSF biomarkers for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Bioscience*. 2009; 14: 1793-1806.

Xuchu W, Xiafang L, Yinxin L. A modified Coomassie Brilliant Blue Staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol Setter*. 2007; 29: 1599-1603

Yamaoka I, Nakayama M, Miki T, Yokayama T, Takeuchi Y. Dietary protein modulates circadian changes in core body temperature and metabolic rate in rats. *J Physiol Sci*, 2008; 58: 75-81

Yamaoka I, Hagi M, Doi M. Circadian changes in core body temperature, metabolic rate and locomotor activity in rats on a high-protein, carbohydrate-free diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009; 55: 511-517

Yang J-W, Suder P, Silberring J, Lubec G. Proteome analysis of mouse primary astrocyte. *Neurochemistry International*. 2005; 47: 159-172

Yu L-R, Conrads T P, Uo T, Kinoshita Yoshito, Morrisons R. Global Analysis of the Cortical Neuron Proteome. *Molecular & cellular proteomic*. 2004; 3: 896-907

ANEXOS

ANEXO A Composición de las soluciones utilizadas en Electroforesis

1. Buffer de lisis

BUFFER DE LISIS 5ML		
Componente	Concentración	Cantidad
Tris base	40 mM	0.024 g
Urea	7 M	2.145 g
Tiourea	2 M	0.760 g
CHAPS	4% (p/v)	0.200 g
PMSF	1 mM	200.0 μ L
		(Stock 25 mM)

2. SOLUCIONES PARA ISOELECTROENFOQUE

2.1 Buffer de Rehidratación

Buffer de Rehidratación	
Componente	Concentración
Urea	8 M
DTT	50 mM
Anfolitos	0.2%
CHAPS	2% (p/v)
Azul de bromofenol	0.001%

2.2 BUFFER DE EQUILIBRACIÓN I

Buffer de Equilibración I	
Componente	Concentración
Urea	6 M
Tris-HCl pH 8.8	0.375 M
SDS	2%
Glicerol	20%
DTT	13 mM

2.3 BUFFER DE EQUILIBRACIÓN II

Buffer de Equilibración II	
Componente	Concentración
Urea	6 M
Tris-HCl pH 8.8	0.375 M
SDS	2%
Glicerol	20%
Iodoacetamida	13.5 mM

3. SOLUCIONES PARA SDS-PAGE

3.1 Acrilamida/bisacrilamida 30% (29.2% acrilamida, 0.8% bisacrilamida)

Solución de acrilamida	
	100 mililitros
Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g
Disolver en 80 ml de agua HPLC	
Agua HPLC	Añadir hasta 100 ml
Filtrar, almacenar en frasco oscuro a 4°C	

3.2 TAMPON PARA EL GEL SEPARADOR TRIS- HCL 1,5 M, PH 8,8

Solución tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	
100 mililitros	
Tris-base	18.17 g
Disolver en 80 ml de agua HPLC	
Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado	
Agua HPLC	Añadir hasta 100 ml

3.3 TAMPON PARA EL GEL SEPARADOR TRIS- HCL 0,5 M, PH 6,8

Solución tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	
100 mililitros	
Tris-base	6.05 g
Disolver en 80 ml de agua HPLC	
Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado	
Agua HPLC	Añadir hasta 100 ml

3.4 SDS al 10% (peso/volumen)

Solución SDS 10%	
	100 mililitros
SDS	10.0 g
Disolver en 80 ml de agua HPLC	
Agua HPLC	Añadir hasta 100 ml

3.5 Persulfato amónico (APS) al 10%

Solución APS 10%	
	10 mililitros
SDS	1.0 g
Disolver en 8 ml de agua HPLC	
Agua HPLC	Añadir hasta 10 ml

3.6 COMPONENTES PARA LA PREPARACIÓN DE LOS GELES

Composición de los geles (1 gel)		
Componente	Separador (12%)	Staking (5%)
	Cantidad	Cantidad
Agua (desionizada)	1.6 mL	930.0 µL
Acrilamida-bisacrilamida 30%	2.0 mL	230.0 µL
Tris base, pH 8.8 -6.8	1.3 mL	375.0 µL
SDS (10%)	50.0 µL	15.0 µL
Persulfato de amonio (10%)	25.0 µL	30.0 µL
TEMED	10.0 µL	3.0 µL

3.7 Buffer de corrido

Composición del Buffer de corrido (2000 ml)		
Componente	Concentración	Cantidad
Glicina	1.44 %	28.8 g
Tris-base	0.20%	4.0 g
SDS	0.10%	2.0 g
Disolver en 1L y aforar a 2L		

4. SOLUCIONES DE TINCION AZUL DE COOMASSIE COLOIDAL

4.1 Solución de Fijación

Solución de fijación (500 ml)		
Componente	Concentración	Cantidad
Metanol	50.0 %	250.0 ml
Acido fosfórico	2.0 %	10.0 ml
Aforar a 500 ml con agua HPLC		

4.2 Solución de Equilibración

Solución de equilibración (200 ml)		
Componente	Concentración	Cantidad
Metanol	33.0 %	66.0 ml
Sulfato de amonio	17.0 %	34.0 g
Acido fosfórico	3.0 %	6.0 ml
Aforar a 200 ml con agua HPLC		

4.3 Solución Colorante

Solución colorante (5 ml)	
Componente	Cantidad
Azul de Coomassie G-250	60.0 mg
Metanol	5.0 ml

ANEXO B Curva de Calibración

Se prepararon 500 μL de solución de albúmina de concentración 1 mg/mL y se obtuvieron los patrones que se describen en la tabla 1

Tabla 1. Patrones de la curva de calibración

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (MG/ML)	μL	
		SOLUCIÓN	μL BUFFER
1	BLANCO	0	100
2	0.1	10	90
3	0.2	20	80
4	0.3	30	70
5	0.4	40	60
6	0.5	50	50
7	0.6	60	40
8	0.7	70	30
9	0.8	80	20
10	0.9	90	10
11	1.0	100	0

1. De cada patrón se tomaron 20 μL y se adicionó 1.0 mL del reactivo de Bradford
2. Se realizaron diluciones de 1:20, para que el valor de absorbancia estuviera dentro del rango de la curva.

De cada patrón se realizaron lecturas de absorbancia por triplicado, se obtuvo el valor promedio y se graficó la absorbancia promedio vs concentración (**figura 1**). La tabla 2 a,b,c muestra a manera de ejemplo los resultados de la cuantificación en el hipocampo derecho.

CURVA DE CALIBRACIÓN

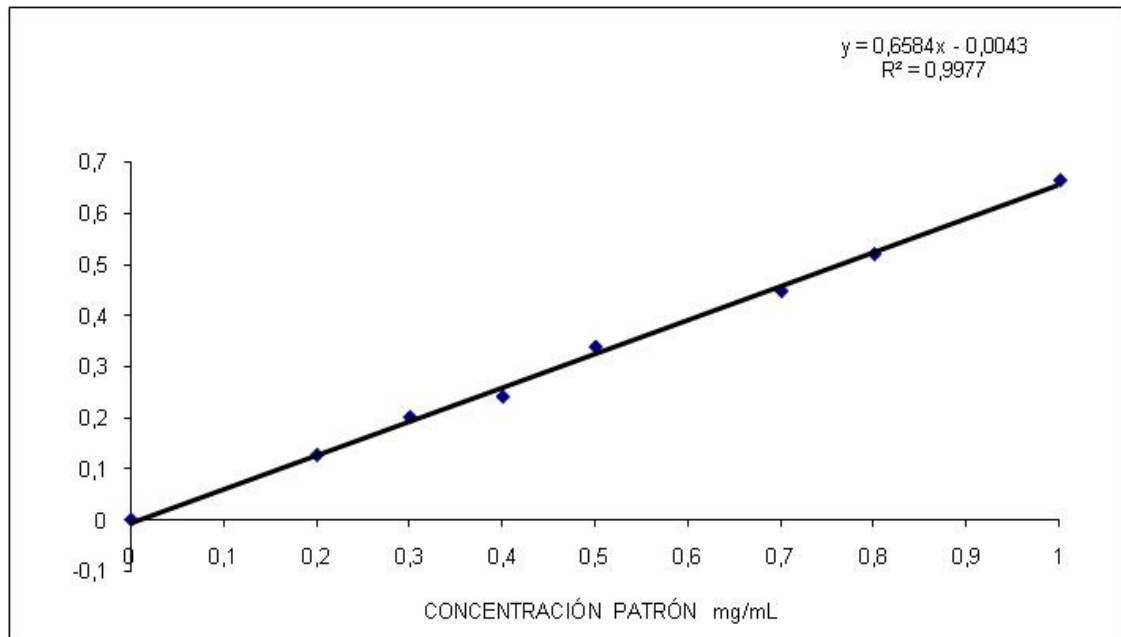


Figura 1. Curva de calibración

Tabla 2a. Resultados de la cuantificación en el hipocampo derecho tratamiento 0

Muestra	Concentración	Vol muestra μl	Vol buffer de Rehidratación
			μL
C1R5T0	5.63	32.4	94.6
C1R1T0	3.63	50.2	76.8
C2R0T0	12.80	14.3	112.7
C2R5T0	9.19	19.9	107.1
C4R3T0	9.076	20.1	106.9
C4R0T0	9.107	20.1	106.9
C5R4T0	6.058	30.2	96.8
C5R2T0	2.518	72.6	54.4
C6R1T0	6.048	30.2	96.8
C6R3T0	2.797	65.4	61.6

C= Caja R= Rata T= Tratamiento

Ejemplo: C1R5T0 Caja 1, Rata 5, Tratamiento 0 (control)

Tabla 2b. Resultados de la cuantificación en el hipocampo derecho tratamiento 5 min

Muestra	Concentración	Vol muestra μl	Vol buffer de Rehidratación μL
C1R0T5	3.766	48.6	78.4
C1R4T5	7.026	26.0	101
C2R1T5	7.158	25.5	101.5
C2R4T5	6.064	30.2	96.8
C4R2T5	10.661	17.2	109.8
C4R5T5	12.069	15.2	111.8
C5R0T5	5.183	35.3	91.7
C5R2T5	9.385	19.5	107.5
C6R0T5	12.646	14.5	112.5
C6R4T5	14.023	13.0	114

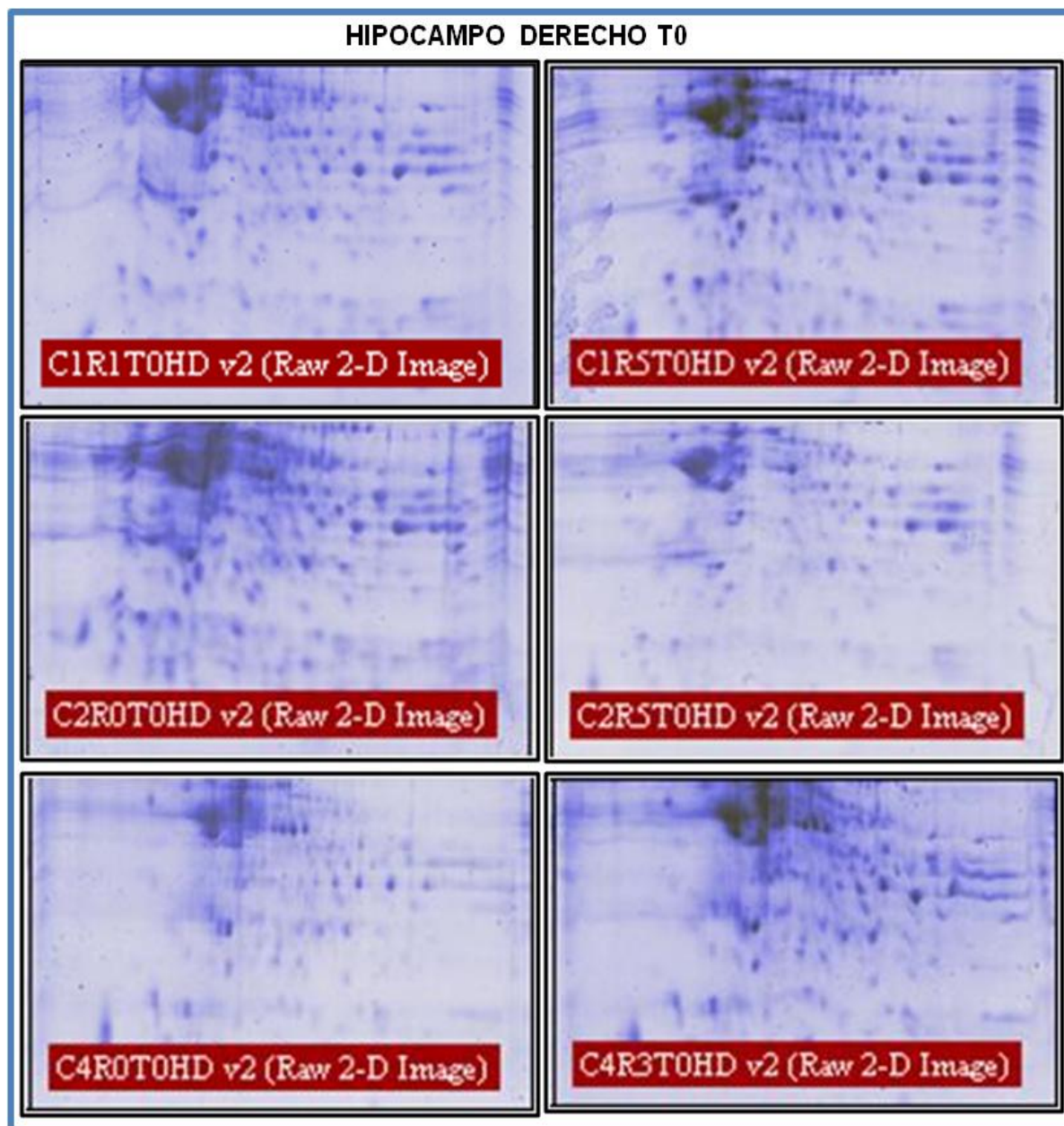
Muestra	Concentración	Vol muestra μl	Vol buffer de Rehidratación μL
C1R2T15	4.343	42.1	84.9
C1R3T15	5.285	34.6	92.4
C2R3T15	12.595	14.5	112.5
C2R2T15	7.492	24.4	102.6
C4R1T15	9.750	18.8	108.2
C4R4T15	9.446	19.4	107.6
C5R1T15	6.92	26.4	100.6
C5R5T15	7.107	25.7	101.3
C6R2T15	12.646	14.5	112.5
C6R4T15	10.762	17.0	110

Tabla 2c. Resultados de la cuantificación en el hipocampo derecho tratamiento 15 min

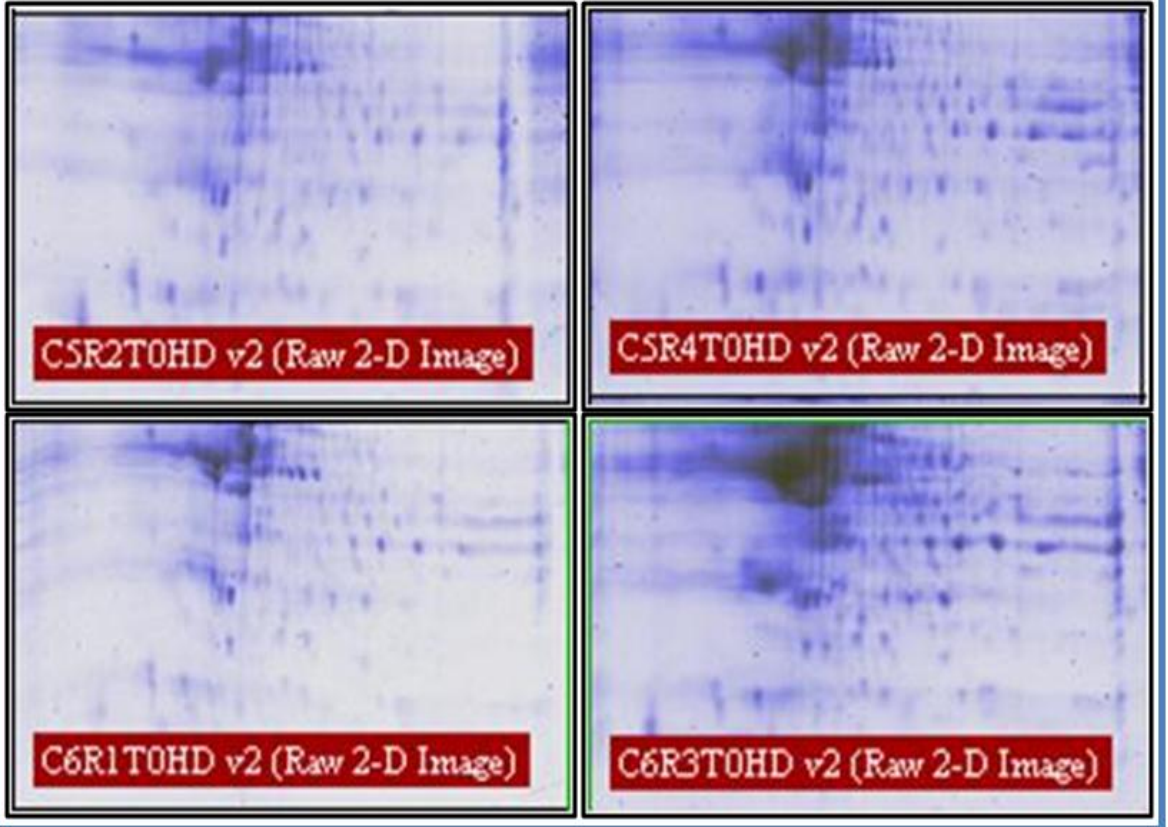
ANEXO C

Perfiles de proteínas de muestras del hipocampo derecho, izquierdo, amígdala derecha e izquierda con sus respectivos tratamientos

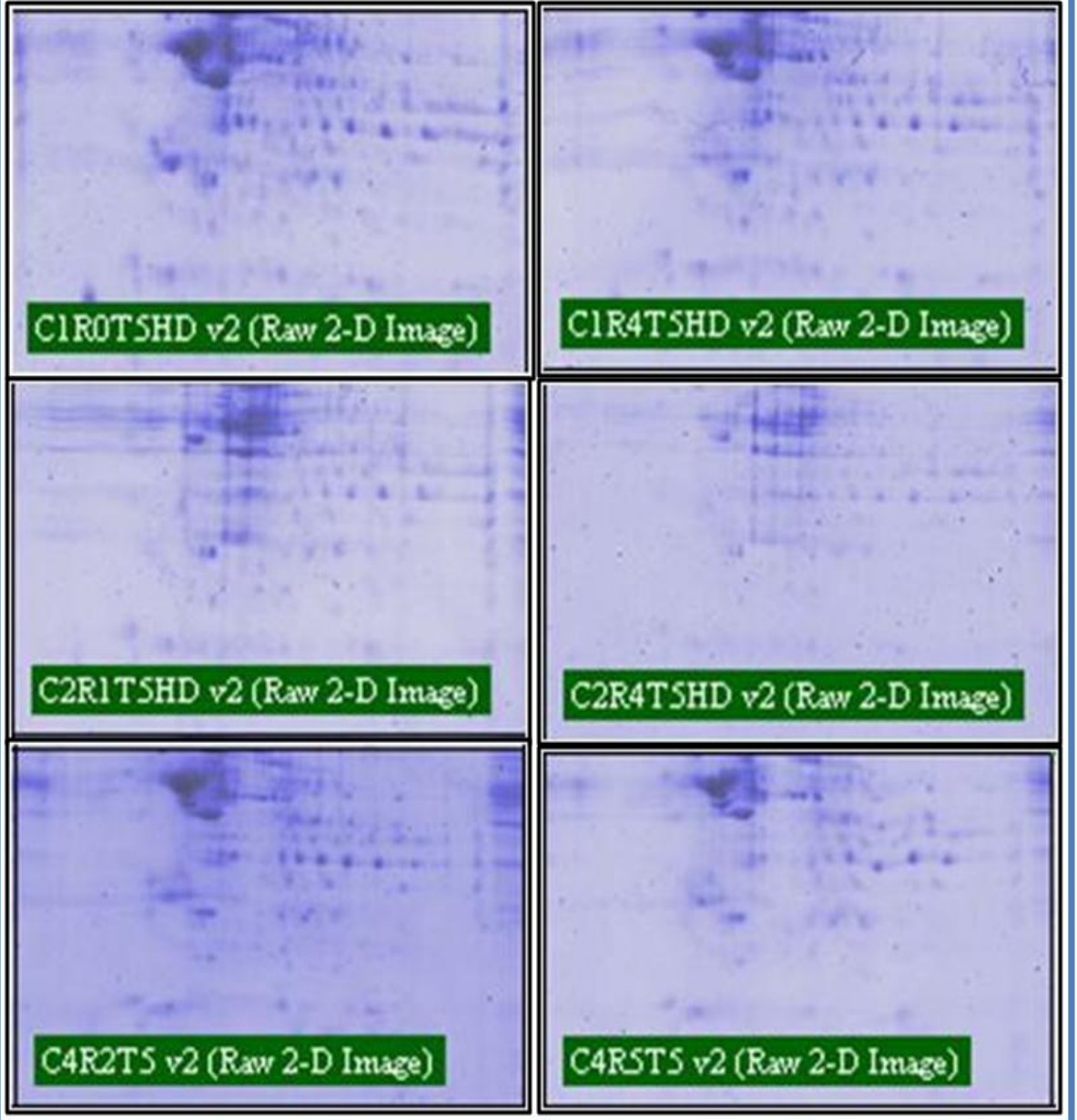
Strips 7cm; pl 3-10



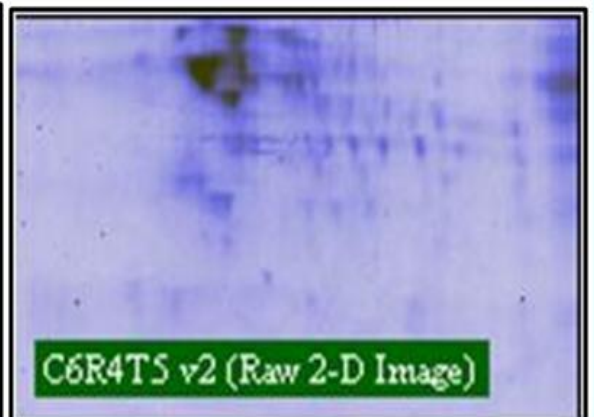
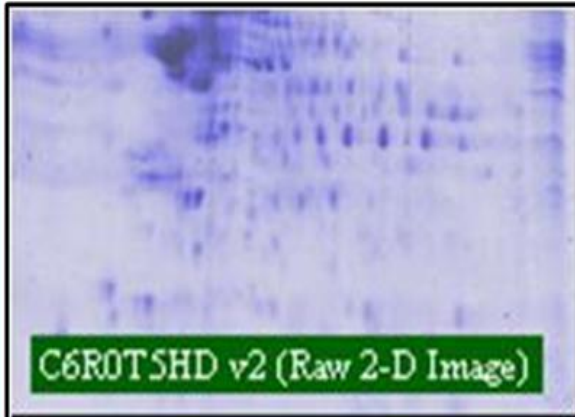
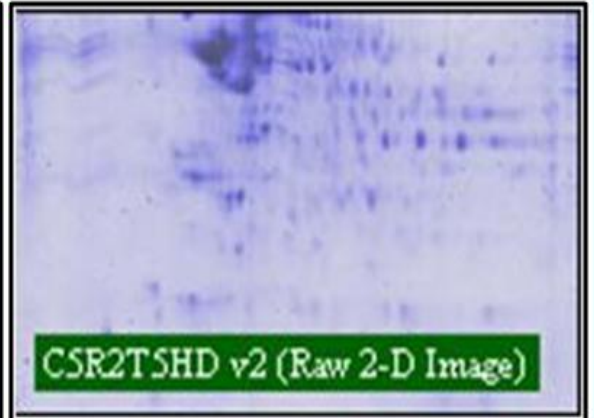
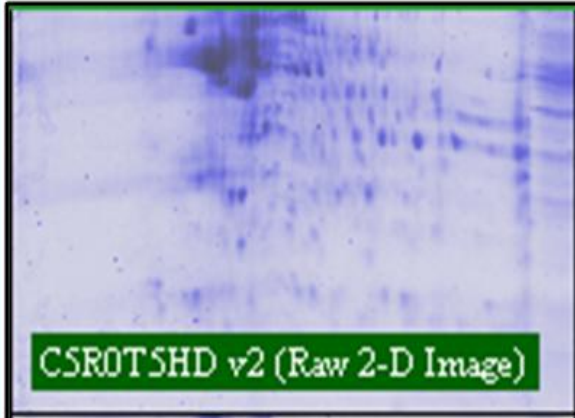
HIPOCAMPO DERECHO T0



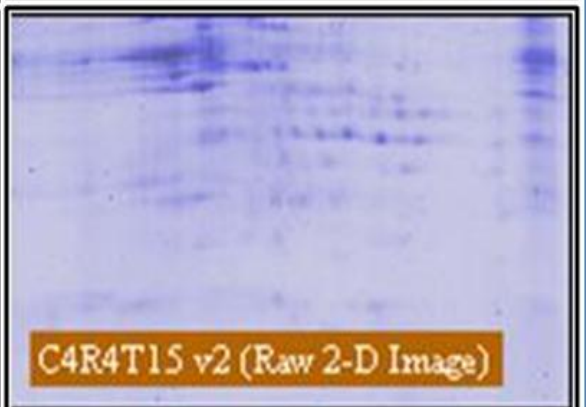
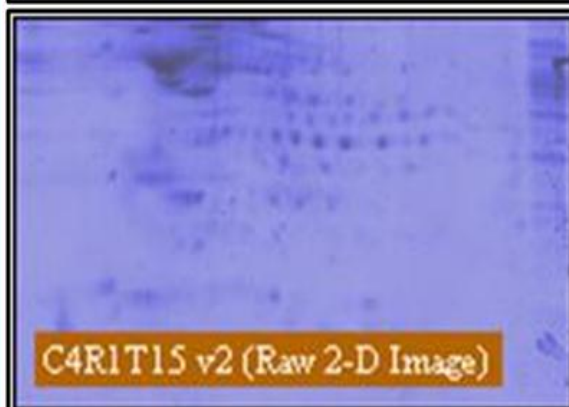
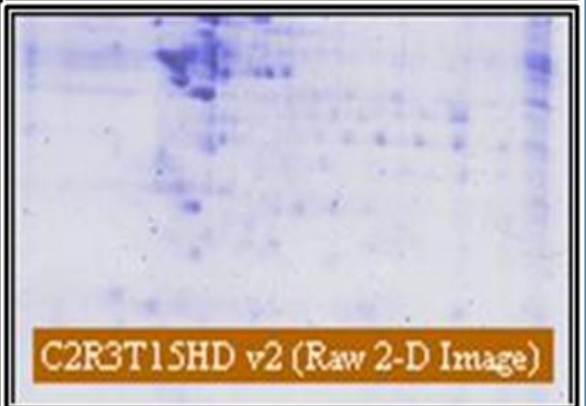
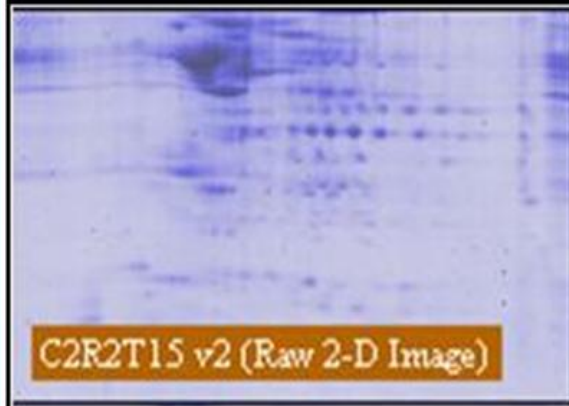
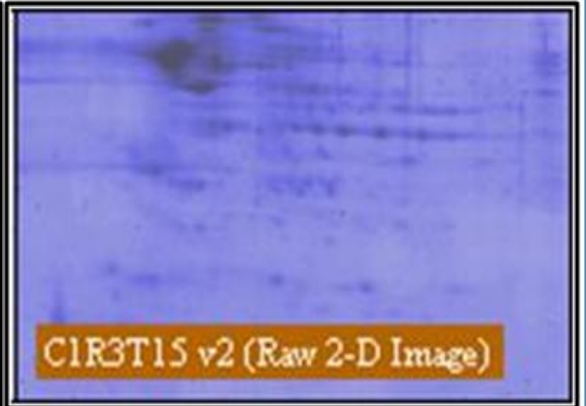
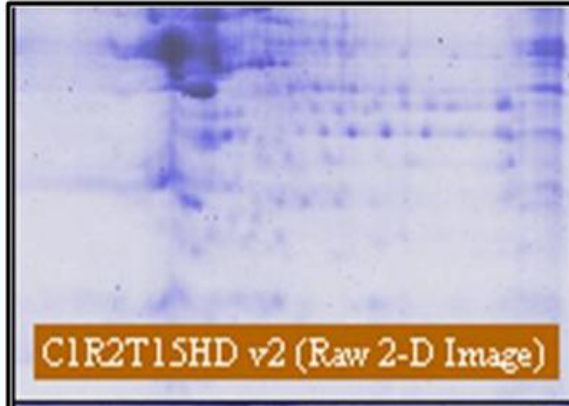
HIPOCAMPO DERECHO T5



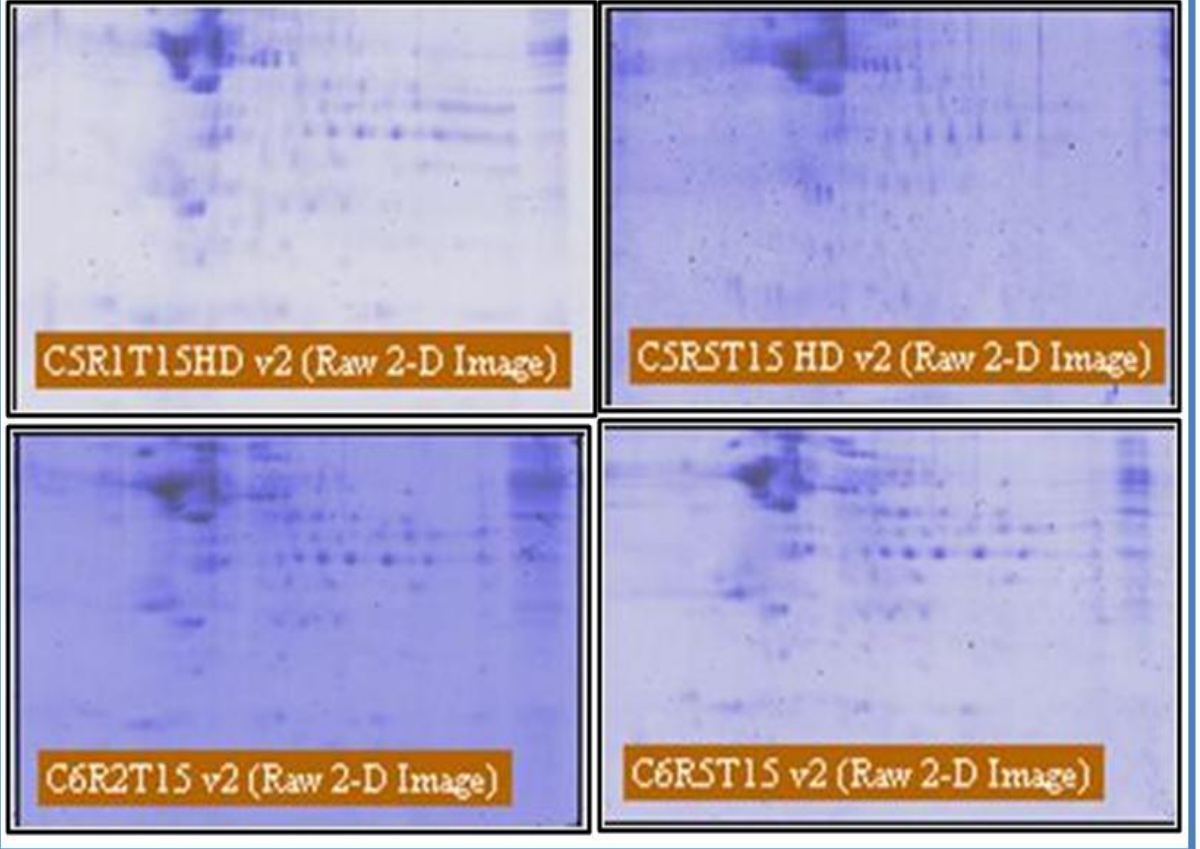
HIPOCAMPO DERECHO T5

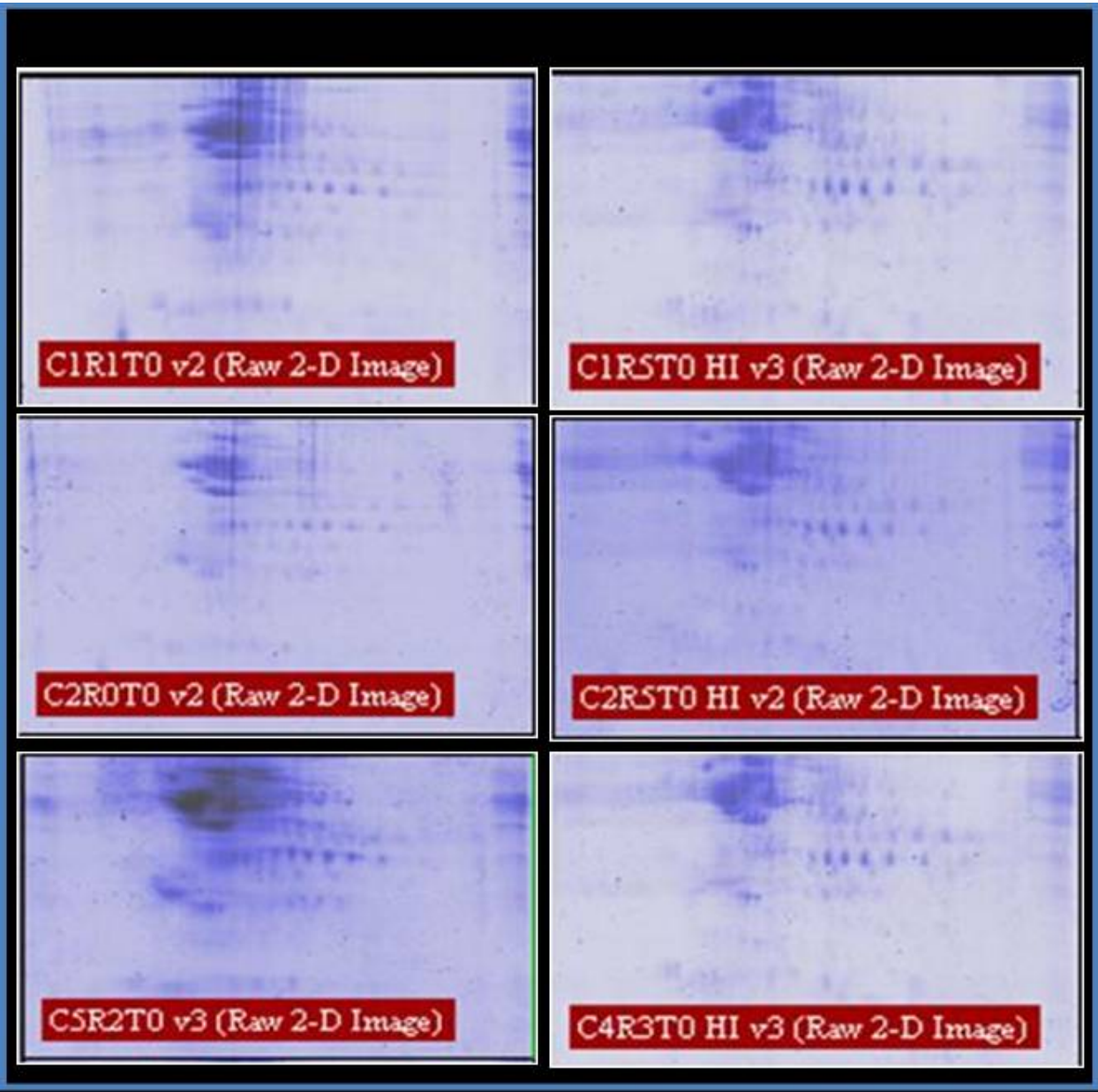


HIPOCAMPO DERECHO T15

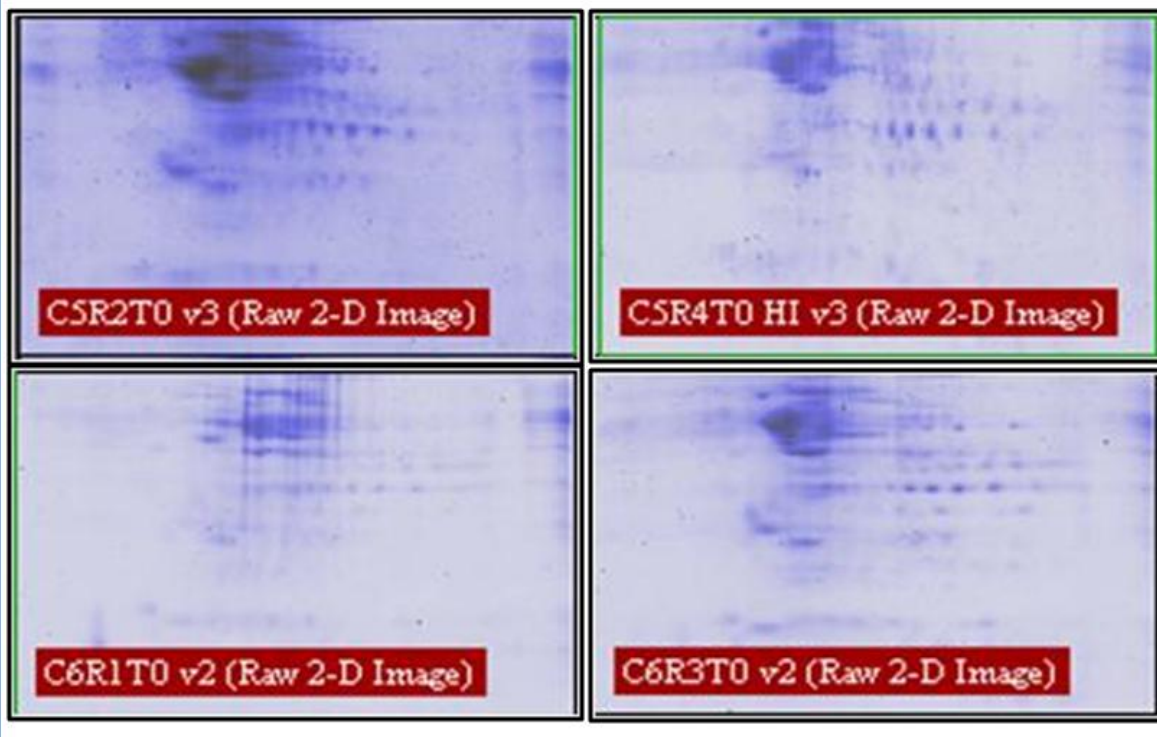


HIPOCAMPO DERECHO T15





HIPOCAMPO IZQUIERDO T0



HIPOCAMPO IZQUIERDO T5

C1R0T5HI v3 (Raw 2-D Image)

C1R4T5HI v2 (Raw 2-D Image)

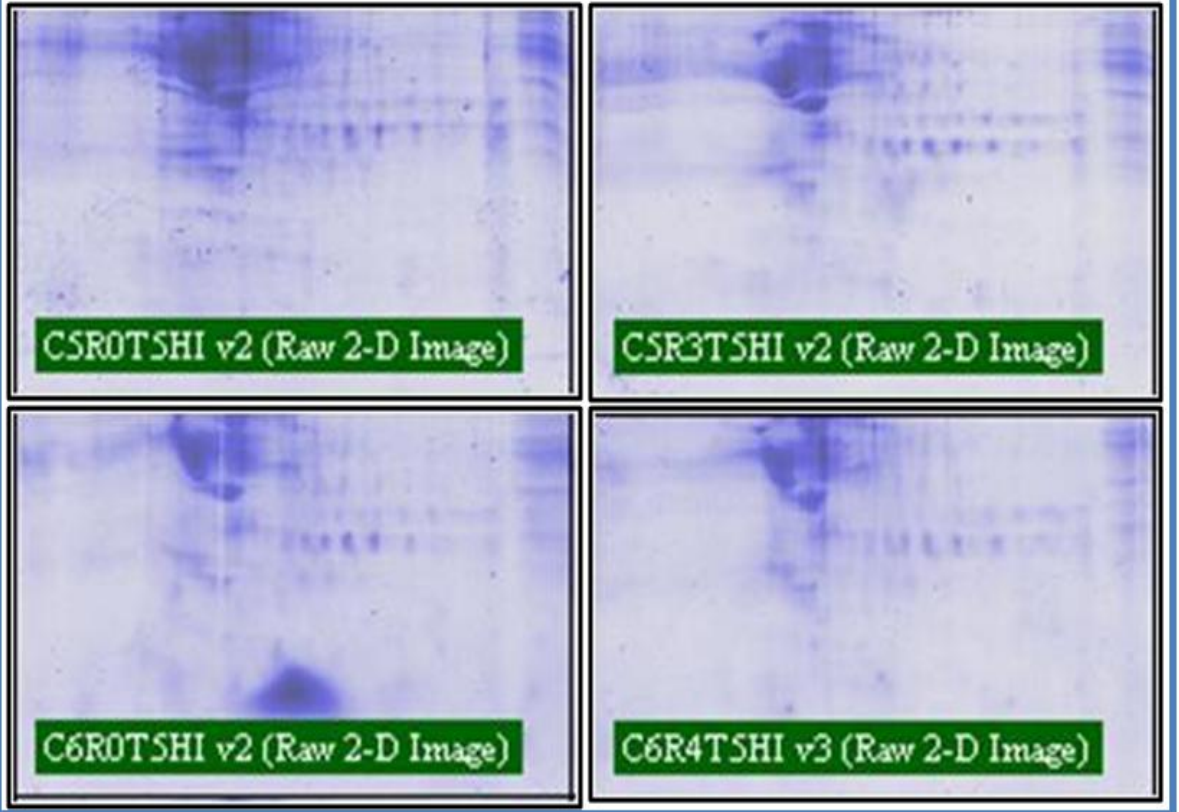
C2R1T5HI v2 (Raw 2-D Image)

C2R4T5HI v2 (Raw 2-D Image)

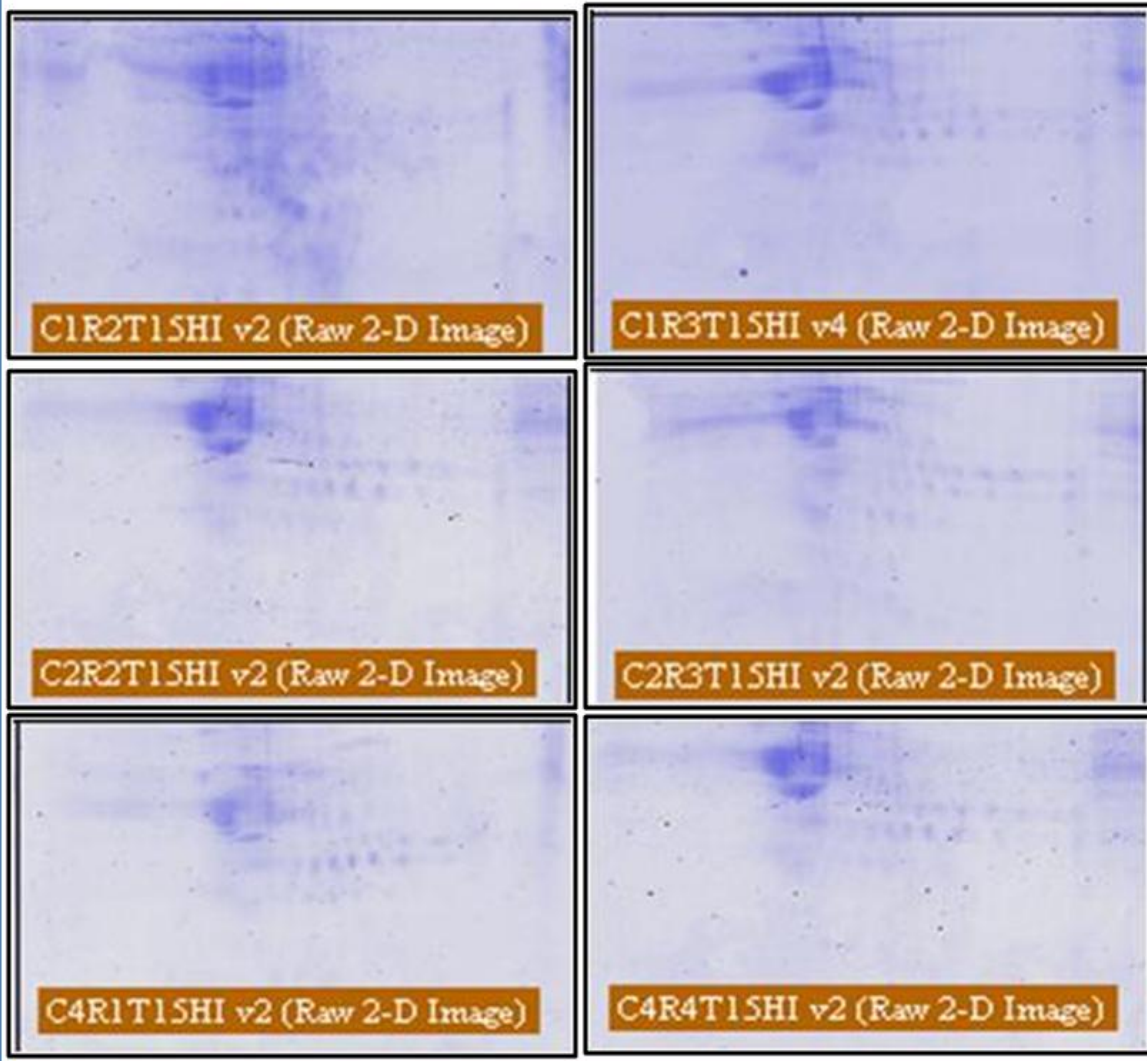
C4R2T5HI v2 (Raw 2-D Image)

C4R5T5HI v3 (Raw 2-D Image)

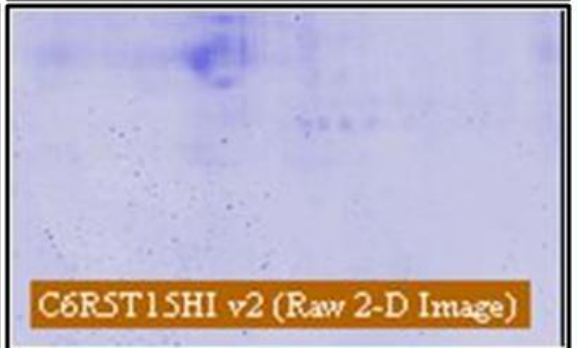
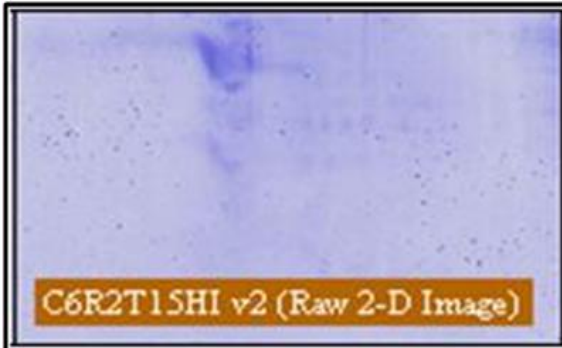
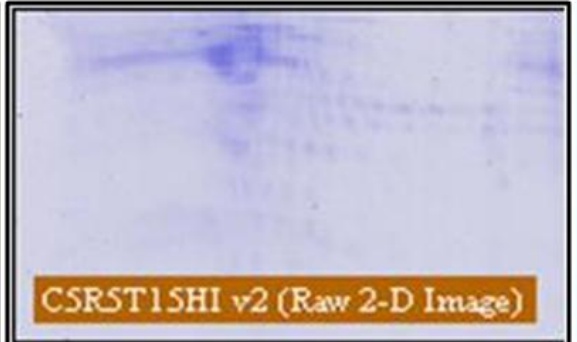
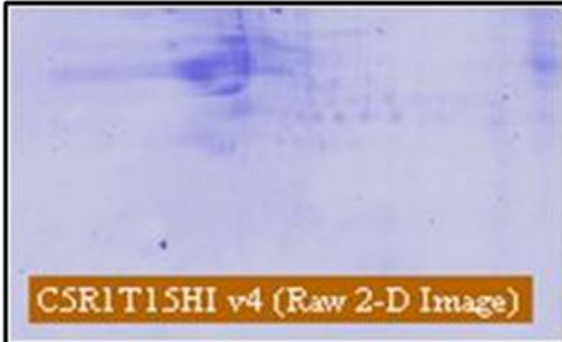
HIPOCAMPO IZQUIERDO T5



HIPOCAMPO IZQUIERDO T15



HIPOCAMPO IZQUIERDO T15



GELES MASTER

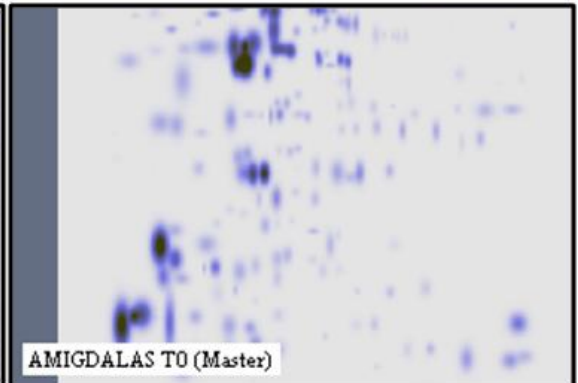
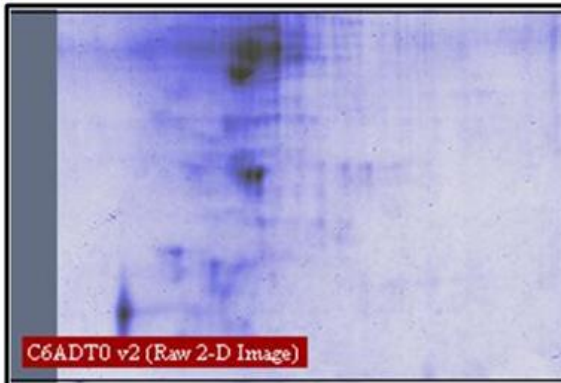
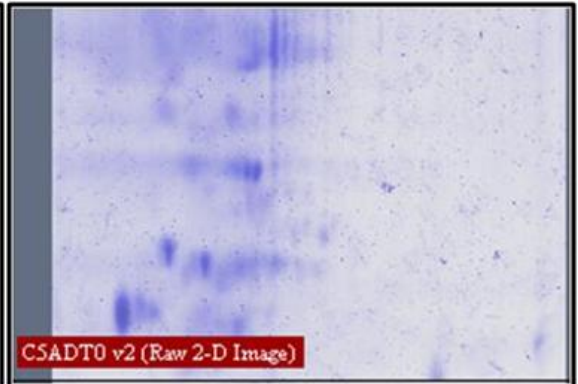
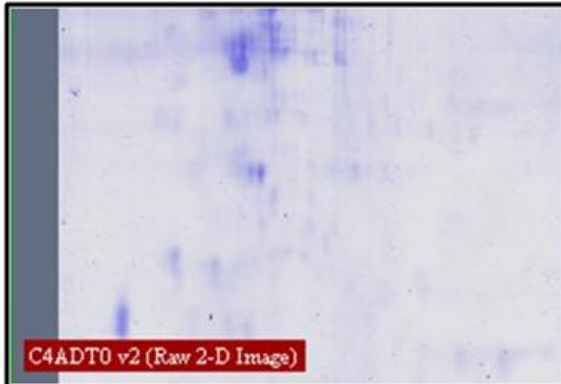
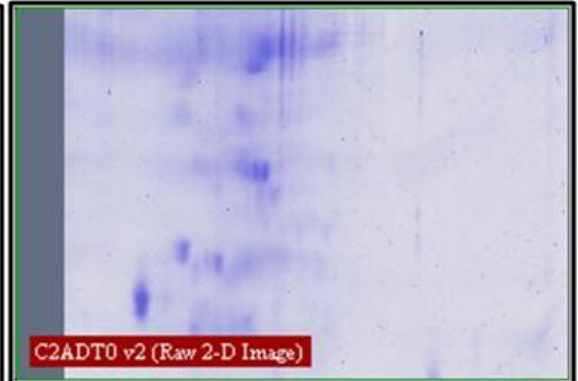
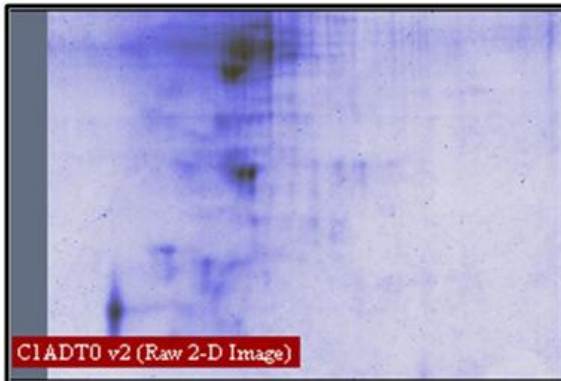


Hipocampos Derechos (Master)

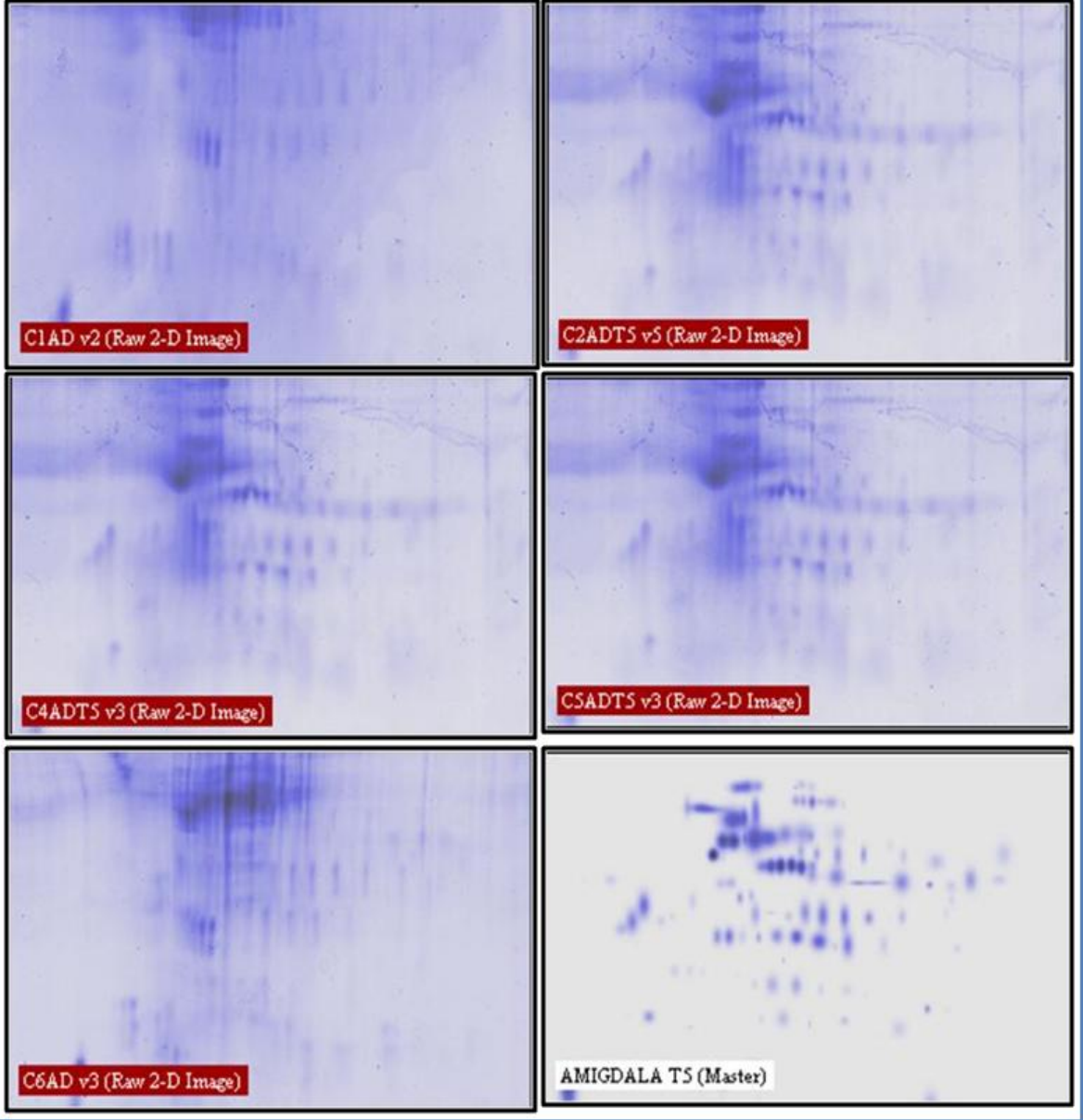


Hipocampos Izquierdos (Master)

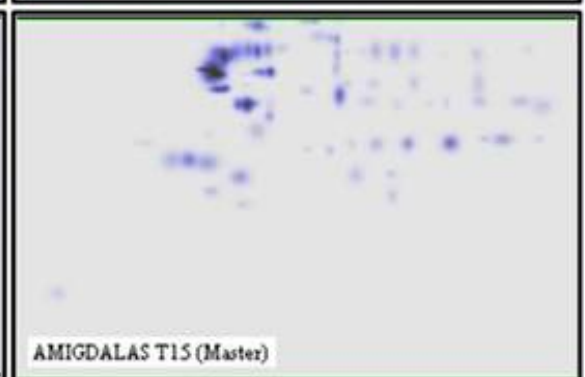
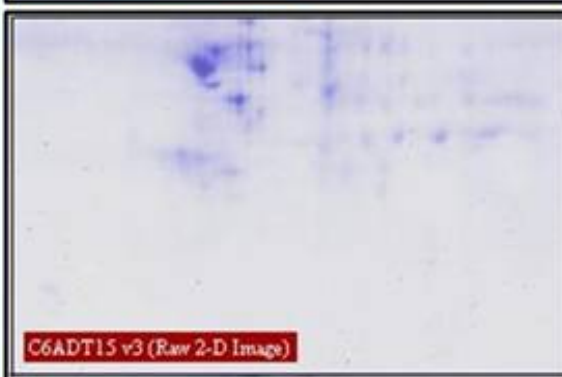
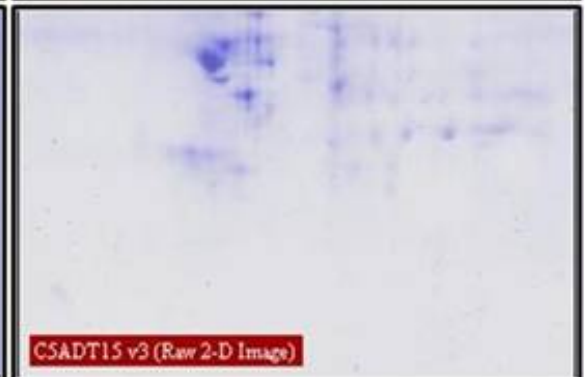
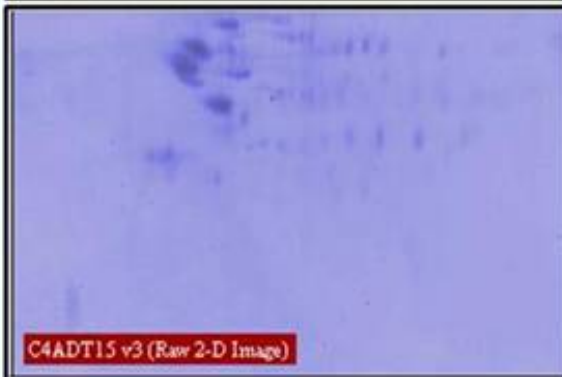
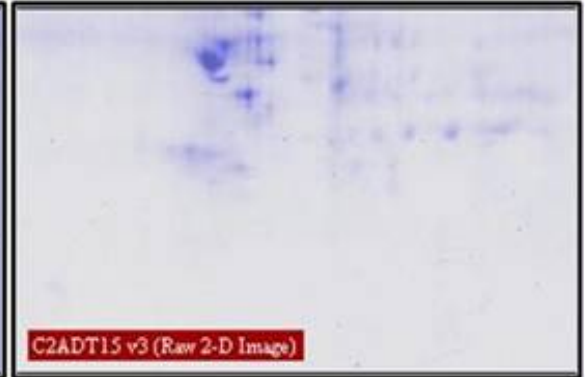
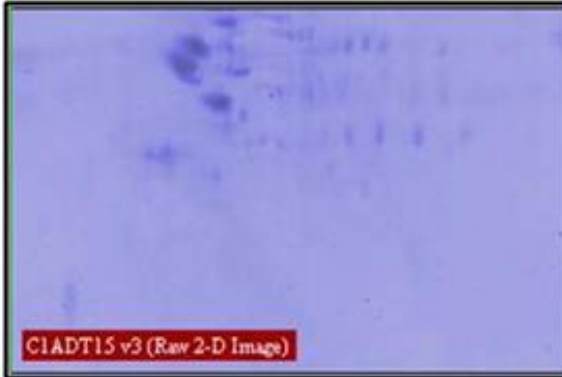
AMIGDALA DERECHA T0



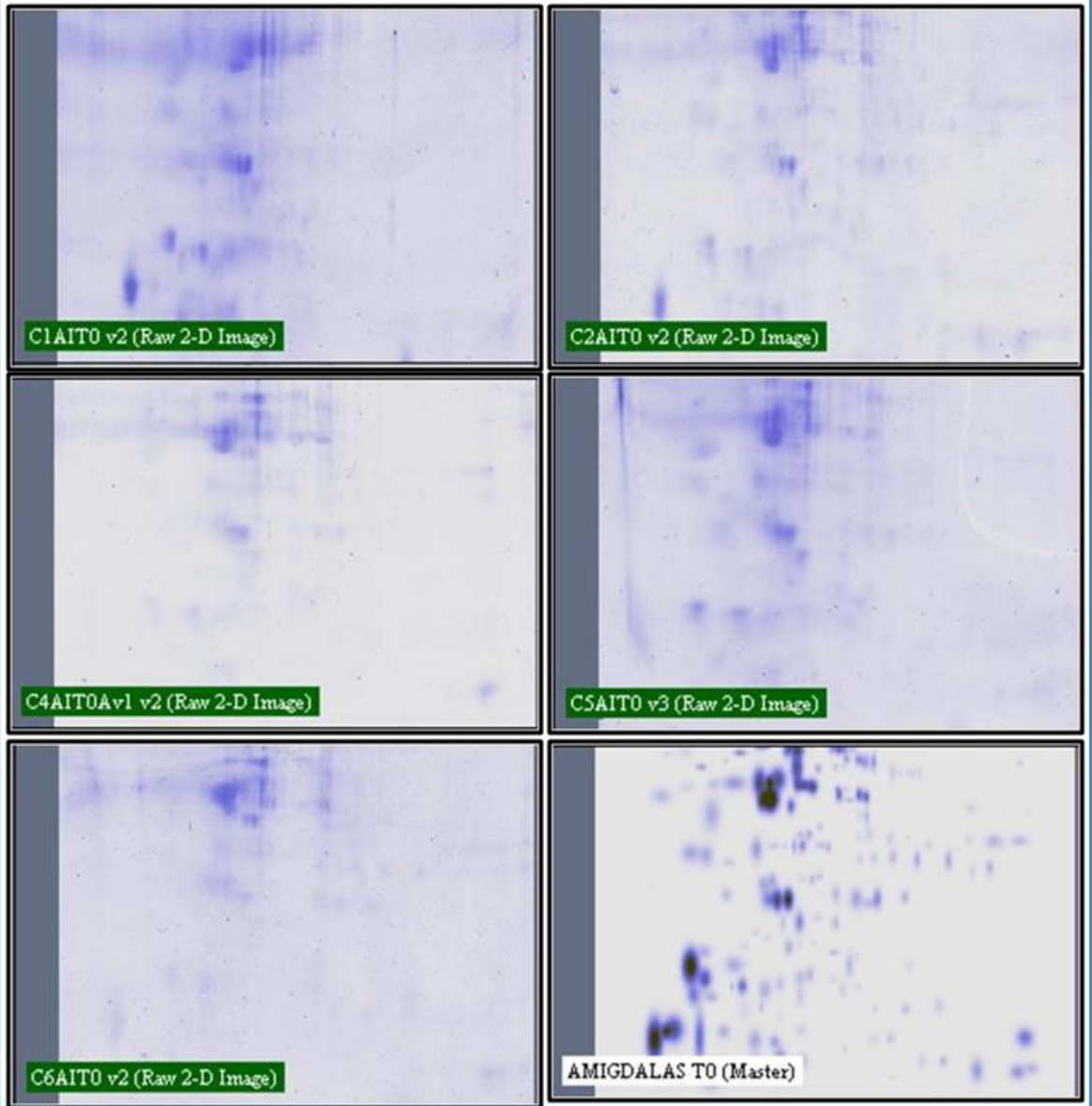
AMIGDALA DERECHA T5



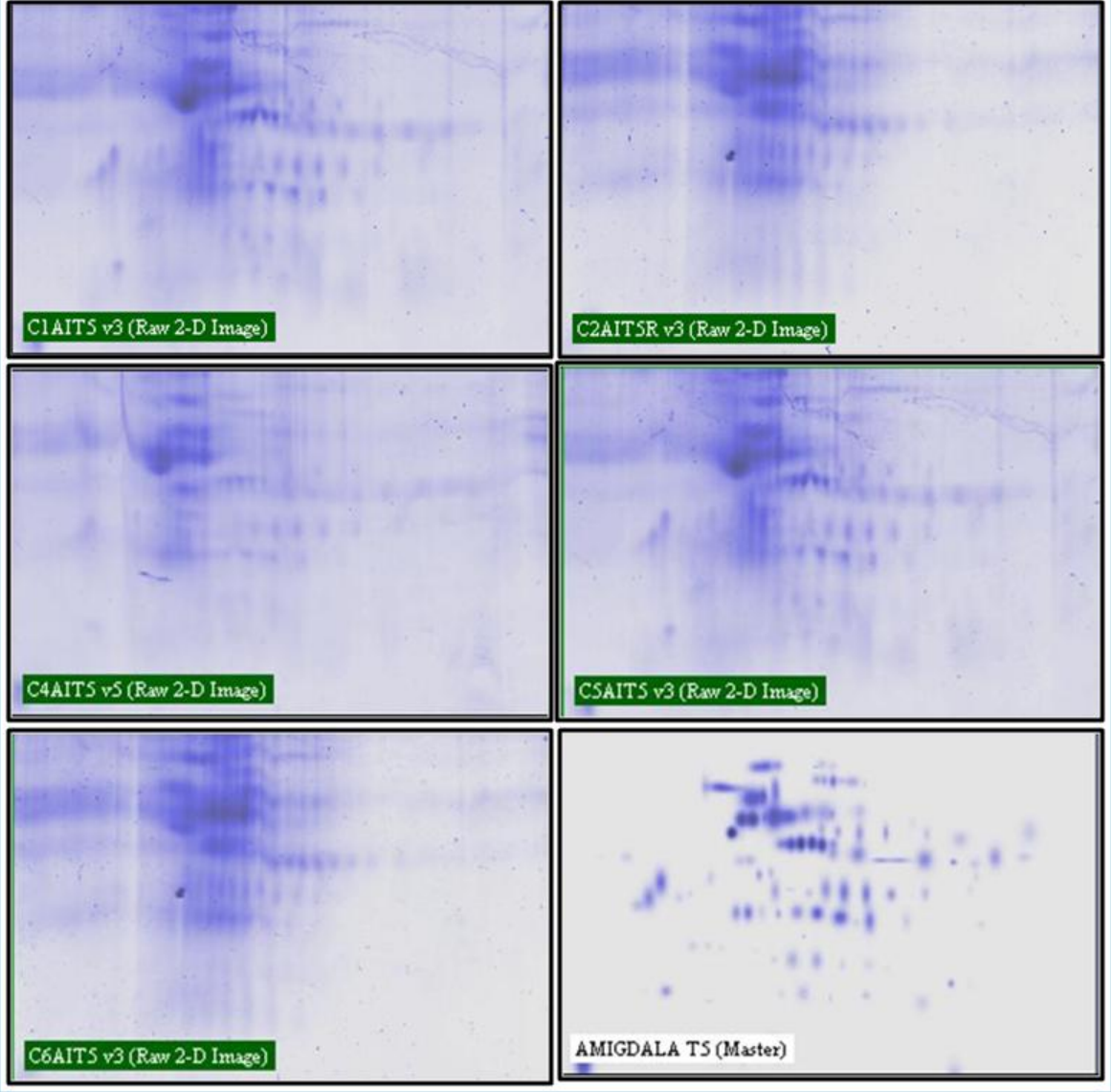
AMIGDALA DERECHA T15



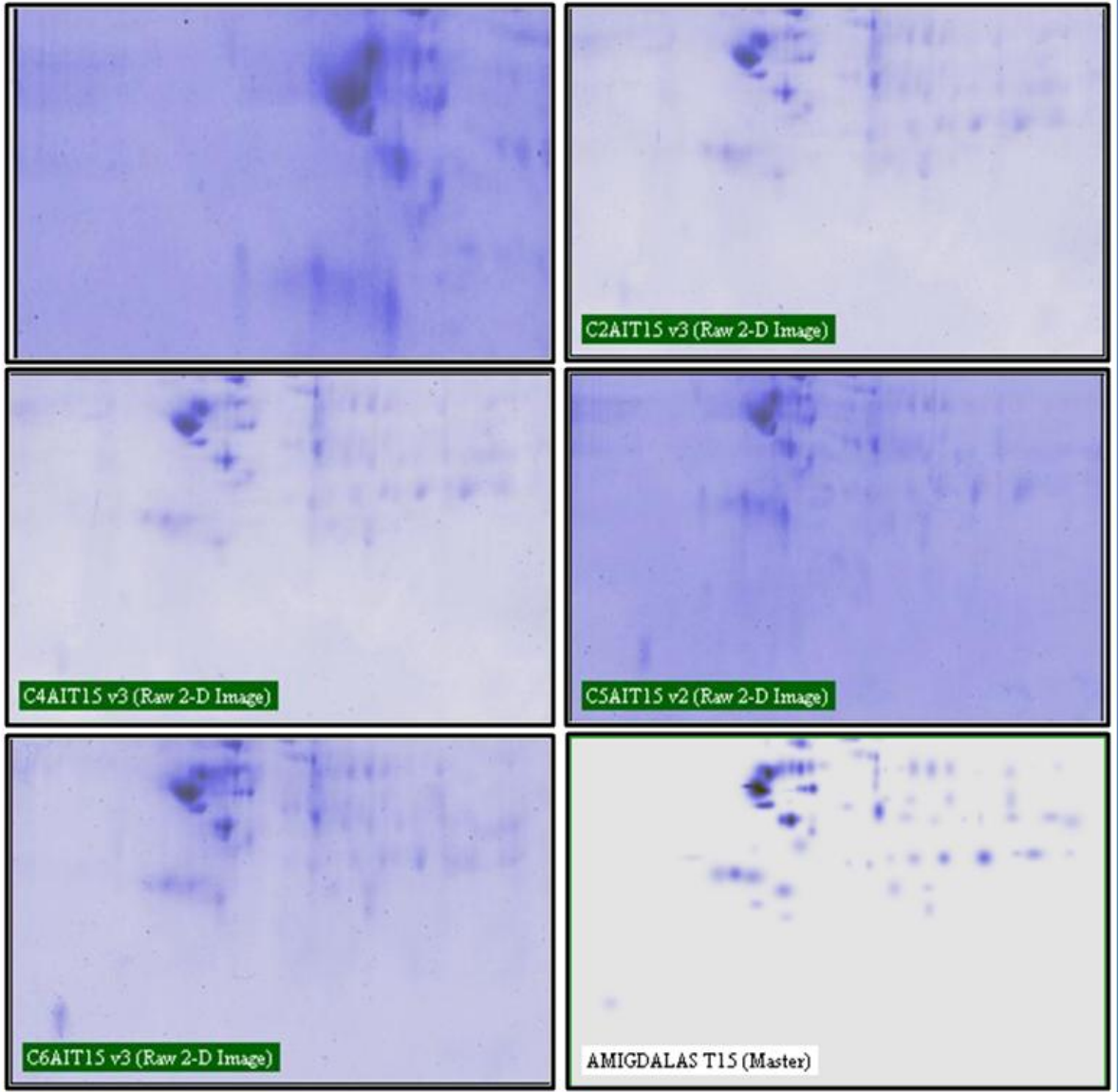
AMIGDALA IZQUIERDA T0



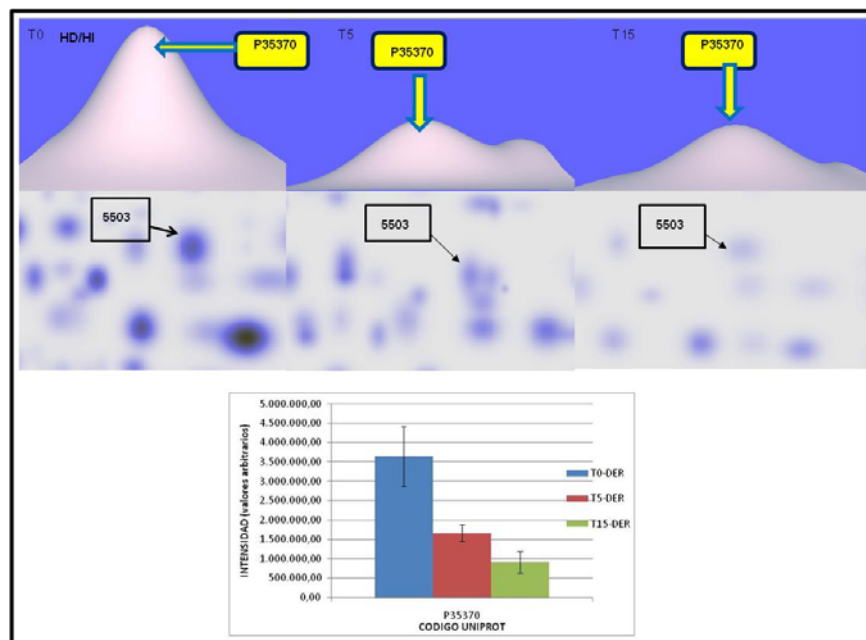
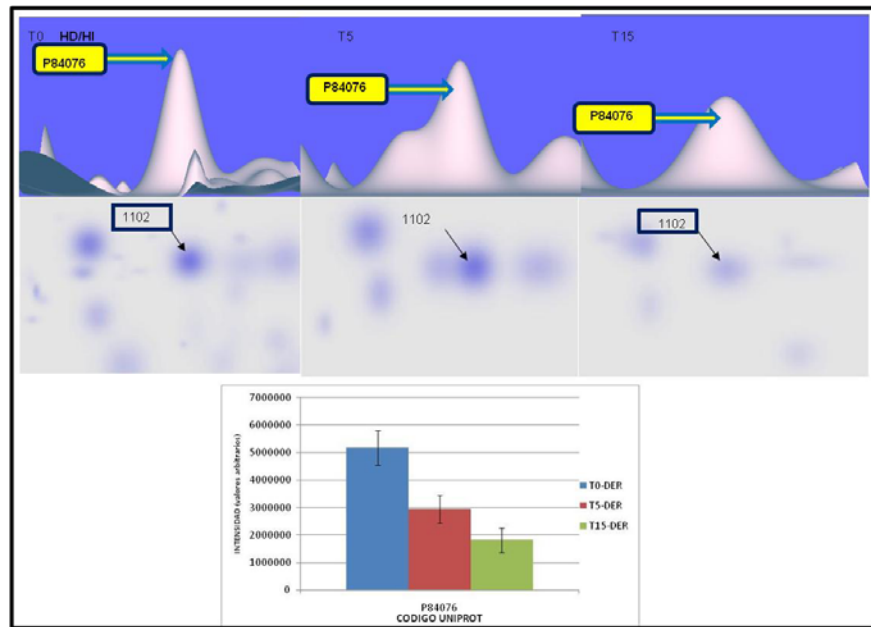
AMIGDALA IZQUIERDA T5



AMIGDALA IZQUIERDA T15



ANEXO D Ejemplos de proteínas comparando su expresión en 3D, su intensidad de expresión de la mancha en el gel y las intensidades con los promedios \pm error estándar. Notándose un efecto dosis-dependiente decreciente cuando el animal es sometido a diferentes tiempos de exposición al nado forzado (T0-T5-T15).



ANEXO E Peso de las muestras cerebrales (Hipocampo y Amígdala) de cada una de las cajas viveros con sus respectivos tratamientos

CAJA 1

Rata	TTO	Localización	w tubo + buffer	w tubo + buffer + muestra	w muestra
0	5	HD	1,8314	1,8503	0,0189
0	5	HI	1,7838	1,8077	0,0239
0	5	AD	1,5459	1,5858	0,0399
0	5	AI	1,5542	1,6093	0,0551
1	0	HD	1,8049	1,8439	0,039
1	0	HI	1,7881	1,8306	0,0425
1	0	AD	1,5604	1,6169	0,0565
1	0	AI	1,529	1,5574	0,0284
2	15	HD	1,8346	1,8612	0,0266
2	15	HI	1,7737	1,7889	0,0152
2	15	AD	1,5642	1,6065	0,0423
2	15	AI	1,5636	1,5994	0,0358
3	15	HD	1,8226	1,8683	0,0457
3	15	HI	1,7647	1,8262	0,0615
3	15	AD	1,5696	1,604	0,0344
3	15	AI	1,5146	1,5555	0,0409
4	5	HD	1,7878	1,8319	0,0441
4	5	HI	1,7819	1,8267	0,0448
4	5	AD	1,5846	1,62	0,0354
4	5	AI	1,5245	1,549	0,0245
5	0	HD	1,7743	1,8076	0,0333
5	0	HI	1,7816	1,8292	0,0476
5	0	AD	1,5781	1,6122	0,0341
5	0	AI	1,5255	1,5597	0,0342

CAJA 2

Rata	TTO	Localización	w tubo + buffer	w tubo + buffer + muestra	w muestra
0	0	HD	1,8138	1,8663	0,0525
0	0	HI	1,815	1,868	0,053
0	0	AD	1,5624	1,601	0,0386
0	0	AI	1,5724	1,6107	0,0383
1	5	HD	1,6517	1,718	0,0663
1	5	HI	1,6816	1,7346	0,053
1	5	AD	1,5375	1,5597	0,0222
1	5	AI	1,6027	1,6191	0,0164
2	15	HD	1,6132	1,6633	0,0501
2	15	HI	1,6966	1,748	0,0514
2	15	AD	1,4736	1,5044	0,0308
2	15	AI	1,3784	1,4076	0,0292
3	15	HD	1,8099	1,8595	0,0496
3	15	HI	1,737	1,7936	0,0566
3	15	AD	1,5533	1,5997	0,0464
3	15	AI	1,5771	1,6126	0,0355
4	5	HD	1,659	1,7158	0,0568
4	5	HI	1,6078	1,6538	0,046
4	5	AD	1,5754	1,6178	0,0424
4	5	AI	1,563	1,6018	0,0388
5	0	HD	1,7223	1,7959	0,0736
5	0	HI	1,6504	1,7052	0,0548
5	0	AD	1,5744	1,6306	0,0562
5	0	AI	1,4951	1,5389	0,0438

CAJA 3

Rata	TTO	Localización	w tubo + buffer	w tubo + buffer + muestra	w muestra
0	5	HD	1,8638	1,9318	0,068
0	5	HI	1,7747	1,8367	0,062
0	5	AD	1,5876	1,606	0,0184
0	5	AI	1,6481	1,6608	0,0127
1	0	HD	1,7994	1,8529	0,0535
1	0	HI	1,7794	1,8281	0,0487
1	0	AD	1,5699	1,5954	0,0255
1	0	AI	1,5687	1,6058	0,0371
2	15	HD	1,7832	1,8307	0,0475
2	15	HI	1,7617	1,8062	0,0445
2	15	AD	1,571	1,5944	0,0234
2	15	AI	1,5635	1,5949	0,0314
3	0	HD	1,8117	1,8533	0,0416
3	0	HI	1,7558	1,8116	0,0558
3	0	AD	1,526	1,5472	0,0212
3	0	AI	1,5741	1,5962	0,0221
4	5	HD	1,8058	1,8735	0,0677
4	5	HI	1,7766	1,8113	0,0347
4	5	AD	1,5685	1,6005	0,032
4	5	AI	1,5608	1,5976	0,0368
5	15	HD	1,7742	1,8636	0,0894
5	15	HI	1,7652	1,8207	0,0555
5	15	AD	1,5946	1,6281	0,0335
5	15	AI	1,6141	1,6393	0,0252

CAJA 4

Rata	TTO	Localización	w tubo + buffer	w tubo + buffer + muestra	w muestra
0	0	HD	1,7674	1,8154	0,048
0	0	HI	1,7721	1,8249	0,0528
0	0	AD	1,528	1,5663	0,0383
0	0	AI	1,5178	1,554	0,0362
1	15	HD	1,7858	1,8457	0,0599
1	15	HI	1,7892	1,8381	0,0489
1	15	AD	1,5307	1,561	0,0303
1	15	AI	1,5544	1,5881	0,0337
2	5	HD	1,7776	1,8242	0,0466
2	5	HI	1,7826	1,8374	0,0548
2	5	AD	1,5299	1,5733	0,0434
2	5	AI	1,5646	1,616	0,0514
3	0	HD	1,7611	1,8049	0,0438
3	0	HI	1,7792	1,8325	0,0533
3	0	AD	1,5524	1,5927	0,0403
3	0	AI	1,564	1,5873	0,0233
4	15	HD	1,7958	1,8426	0,0468
4	15	HI	1,7975	1,8435	0,046
4	15	AD	1,5493	1,5947	0,0454
4	15	AI	1,5285	1,5747	0,0462
5	5	HD	1,792	1,8477	0,0557
5	5	HI	1,7682	1,8229	0,0547
5	5	AD	1,4955	1,5389	0,0434
5	5	AI	1,4738	1,4997	0,0259

CAJA 5

Rata	TTO	Localización	w tubo + buffer	w tubo + buffer + muestra	w muestra
0	5	HD	1,7715	1,8022	0,0307
0	5	HI	1,7833	1,849	0,0657
0	5	AD	1,632	1,6632	0,0312
0	5	AI	1,6492	1,6836	0,0344
1	15	HD	1,7756	1,8199	0,0443
1	15	HI	1,8204	1,8798	0,0594
1	15	AD	1,5958	1,6267	0,0309
1	15	AI	1,5544	1,5816	0,0272
2	0	HD	1,7703	1,8115	0,0412
2	0	HI	1,7552	1,7898	0,0346
2	0	AD	1,5632	1,5968	0,0336
2	0	AI	1,4779	1,5114	0,0335
3	5	HD	1,7702	1,8015	0,0313
3	5	HI	1,7679	1,8088	0,0409
3	5	AD	1,5624	1,5935	0,0311
3	5	AI	1,5626	1,599	0,0364
4	0	HD	1,789	1,8359	0,0469
4	0	HI	1,8041	1,8495	0,0454
4	0	AD	1,5547	1,585	0,0303
4	0	AI	1,5632	1,59	0,0268
5	15	HD	1,7592	1,809	0,0498
5	15	HI	1,753	1,7891	0,0361
5	15	AD	1,5528	1,5923	0,0395
5	15	AI	1,5564	1,5903	0,0339

ANEXO F Tabla que muestra los resultados fisiológicos: glicemia y consumo de oxígeno de cada caja vivero con los diferentes tratamientos, con las condiciones de laboratorio como la temperatura y humedad relativa

CONSUMO DE OXÍGENO EN MILILITROS / MIN X 100 GRAMOS DEL PESO

DEL ANIMAL

CAJ A 1																					
RAT A	TT O	HUMEDA D		TEMPERATURA °C		PESO (G)		GLICEMIA MG/DL		CONSUMO DE OXÍGENO (ML)											
(N)		PR E	POS T	PRE	POST	PR E	POS T	PR E	POS T	5M L	10M L	5M L	10M L	5M L	10M L	5M L	10M L	5M L	10M L	5M L	10M L
0	5	0,7	0,71	21,5	23,2	23 6	240	5	198	3,3	3,0	1,7	2,4	2,1	2,2	2,5	2,7	2,6	2,7	2,7	2,8
1	0	0,7	0,71	21,5	23,2	25 0	248	6	92	3,8	3,2	2,9	3,3	4,8	4,4	2,4	2,4	2,3	1,9	1,5	1,7
2	15	0,7	0,71	21,5	23,2	23 6	236	8	107	2,1	2,3	1,6	2,1	2,0	2,0	2,8	2,8	2,4	2,8	3,0	3,0
3	15	0,7	0,71	21,5	23,2	23 5	241	0	87	1,2	1,5	2,3	2,1	0,9	1,5	2,8	2,7	2,8	2,3	2,8	2,3
4	5	0,7	0,79	21,5	23,5	22 6	230	73	111	1,7	1,7	2,0	2,4	2,3	2,2	2,6	2,5	1,9	2,4	2,2	2,6
5	0	0,7	0,79	21,5	23,5	23 4	237	1	111	1,6	2,0	1,9	2,2	2,0	2,2	2,4	2,3	2,2	2,2	2,3	2,2

CONSUMO DE OXÍGENO EN MILILITROS / MIN X 100 GRAMOS DEL PESO DEL ANIMAL

CAJA 2

RATA	TTO	TEMPERATURA				GLICEMIA				CONSUMO DE OXÍGENO (ML)													
		HUMEDAD		°C		PESO (G)		MG/DL		5ML		10ML		5ML		10ML		5ML		10ML		5M	10M
(N)		PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	5ML	10ML	5ML	10ML	5ML	10ML	5ML	10ML	5ML	10ML	5ML	10ML	L	L
0	0	0,76	0,74	22,8	22,8	222	216	79	97	2,0	2,3	1,1	1,5	1,4	1,4	2,2	2,3	2,0	2,3	2,0	2,3	2,0	1,9
1	5	0,71	0,74	23,2	22,8	225	231	126	104	2,3	2,5	1,9	1,9	1,7	1,5	2,6	1,3	3,2	3,0	2,5	2,5	2,5	2,5
2	15	0,73	0,7	23,2	23,1	234	237	98	102	1,5	2,0	2,2	1,9	0,9	1,2	2,9	3,4	2,4	2,5	2,2	2,6	2,2	2,6
3	15	0,71	0,71	23,2	23,2	251	250	113	87	2,4	2,2	1,3	1,4	1,0	1,1	2,7	2,8	2,9	2,5	2,9	2,8	2,9	2,8
4	5	0,71	0,72	23,2	23,2	222	224	93	103	1,4	1,8	1,1	1,3	0,8	0,9	2,4	2,4	2,3	2,1	1,9	2,4	1,9	2,4
5	0	0,71	0,75	23,2	23,4	234	228	103	98	2,2	2,1	1,5	1,5	0,9	1,0	2,4	2,2	1,1	1,3	0,9	1,0	0,9	1,0

CONSUMO DE OXÍGENO EN MILILITROS / MIN X 100 GRAMOS DEL PESO DEL ANIMAL

CAJ A 3																					
RAT	TT	HUMEDA		TEMPERATU		PESO (G)		GLICEMIA		CONSUMO DE OXÍGENO (ML)											
A	O	D		RA °C				MG/DL			5M	10M	5M	10M	5M	10M	5M	10M	5M	10M	
(N)		PR	POS	PRE	POST	PR	POS	PR	POS	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	
0	5	0,7 8	0,72	21,7	23	277	282	83	85	2,0	2,3	1,4	1,5	1,2	1,1	2,7	2,7	2,3	2,5	1,5	1,8
1	0	0,7 2	0,7	23,3	22,1	292	298	80	104	1,4	1,7	1,7	1,7	1,6	1,9	1,6	1,7	1,3	1,7	1,1	1,7
2	15	0,6 8	0,7	23,4	22,1	295	297	98	81	1,2	1,4	1,6	1,6	2,2	2,7	2,0	2,1	1,6	1,5	1,5	1,7
3	0	0,6 7	0,71	23,4	22	250	243	92	89	1,5	1,9	1,8	1,6	1,6	1,5	2,3	2,3	1,3	1,5	1,5	1,5
4	5	0,7 0,7	0,71	23,5	22	259	262	98	91	1,6	1,9	1,6	1,8	2,4	2,1	2,2	2,5	2,3	1,4	2,5	2,5
5	15	0,7 1	0,74	23,5	21,8	265	266	99	78	1,4	1,8	1,7	1,9	1,4	1,8	2,2	2,4	2,3	1,4	2,3	2,3

CONSUMO DE OXÍGENO EN MILILITROS / MIN X 100 GRAMOS DEL PESO DEL ANIMAL

CAJA 4

RAT A	TT O	HUMEDA		TEMPERATU		GLICEMIA				CONSUMO DE OXÍGENO (ML)											
		D		RA °C		PESO (G)	MG/DL														
(N)		PR	POS	PRE	POST	PR	POS	PR	POS	5M	10M	5M	10M	5M	10M	5M	10M	5M	10M	5M	10M
0	0	0,7	0,77	22,4	22,5	249	244	91	96	1,9	2,5	1,8	1,8	1,4	1,6	1,8	1,9	2,0	2,0	1,8	1,9
1	15	0,7	0,77	22,6	22,5	280	286	96	84	1,2	1,6	1,8	2,1	1,0	1,2	2,9	3,0	2,8	2,8	2,4	2,6
2	5	0,7	0,76	22,7	22,6	252	256	102	95	1,6	1,8	1,5	1,8	1,8	2,0	2,8	2,9	2,9	2,9	3,2	3,0
3	0	0,7	0,77	22,7	22,7	281	282	93	94	1,5	1,5	1,8	2,0	2,5	2,3	1,1	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
4	15	0,7	0,77	22,8	22,7	242	244	92	93	1,3	1,5	1,7	1,6	1,5	2,0	3,2	3,1	2,6	2,7	2,5	3,2
5	5	0,7	0,77	22,8	22,7	259	262	88	87	1,8	2,1	2,2	2,1	2,3	1,9	2,9	2,8	2,3	2,2	1,6	1,8

CONSUMO DE OXÍGENO EN MILILITROS / MIN X 100 GRAMOS DEL PESO DEL ANIMAL

**CAJA
5**

RATA	TT O	HUMEDA D		TEMPERATU RA °C		PESO (G)		GLICEMI A MG/DL		CONSUMO DE OXÍGENO (ML)											
		PR E	POS T	PRE	POST	PR E	POS T	PR E	POS T	5M L	10M L	5M L	10M L	5M L	10M L	5M L	10M L	5M L	10M L	5M L	10M L
0	5	0,7 2	0,7	22,7	22,5	270	276	89	93	1,5	1,8	1,8	2,1	1,9	3,7	2,3	2,3	2,4	2,6	2,7	2,7
1	15	0,7 1	0,67	22,7	22,6	246	248	114	91	2,3	2,3	1,7	2,0	1,3	2,6	2,0	2,0	2,2	1,9	2,2	1,7
2	0	0,7 1	0,74	22,6	22,7	266	264	101	91	2,2	2,9	1,7	1,7	1,4	2,9	1,7	1,9	1,6	1,4	1,2	1,4
3	5	0,7 1	0,74	22,7	22,8	254	256	109	113	2,1	2,2	1,8	1,8	1,2	2,5	2,3	2,5	2,6	2,7	3,0	2,8
4	0	0,7 5	0,71	22,8	23,2	255	257	74	87	2,8	2,2	1,6	1,6	0,8	1,6	1,4	1,5	0,8	1,0	0,9	1,1
5	15	0,7 2	0,77	23	23,2	260	263	98	99	2,2	2,3	1,9	2,0	1,4	2,8	2,6	2,6	2,5	2,6	2,2	2,3

ANEXO G Tabla que muestra los resultados obtenidos del análisis de correlación de Spearman Rank Order. Se correlacionó el tiempo de exposición que fue sometido el animal, el consumo de oxígeno, glicemia y la frecuencia y el tiempo de permanencia de acuerdo a la zona ubicada virtualmente en la piscina con la expresión de proteínas. Se tomó como criterio aquellas proteínas implicadas en la neuroplasticidad.. Abreviaturas: TTO= Tratamiento; PBT= consumo de oxígeno pre; PPOST= consumo de oxígeno post; FA= Frecuencia absoluta; TA= Tiempo absoluto; CRUZ=Cruzamientos; Gli-post= Glicemia post; HD= Hipocampo derecho; HI= Hipocampo izquierdo; A= Amígdala

	TTO	PBT	PPOST	FA-CENTRO	TA-CENTRO	FA-PERIF	TA-PERIF	%T-PERIF	CRUZ	GLI-POST
P84076 HD/HI	-0,444						-0,461			
Q0PGW2 HD/HI										
P35370 HD/HI	-0,445						-0,445			
Q9Z214 HD/HI		0,574								0,663
Q04940 HD/HI										
O35264 HD/HI										
Q9QWR2 HD										
P97829 HD	-0,476						-0,489			
Q62845 HI										
P31977 HI										
O08697 HI	-0,556				-0,465	-0,525	-0,542		-0,518	0,451
Q63689 AD/AI	-0,519			-0,446		-0,525	-0,509		-0,525	
Q62813 AD/AI	-0,689				-0,473	-0,647	-0,694		-0,608	
Q63053 AD/AI	0,474		-0,495				0,487			
Q6PST4 AD	0,688			0,696	0,692	0,712	0,649	-0,509	0,741	