

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA MEMORIA EMOCIONAL Y LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN EL HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS WISTAR EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

MARILYN ROCÍO ÁLVAREZ SANTOS



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA MEMORIA
EMOCIONAL Y LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN EL HIPOCAMPO DORSAL
DE RATAS WISTAR EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO**

MARILYN ROCÍO ÁLVAREZ SANTOS

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

DIRECTOR

RODRIGO TORRES SÁEZ, Ph. D.

Escuela de Química

CODIRECTOR

CARLOS CONDE COTES, Ph. D.

Escuela de Medicina

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

“...Disfruta de tus éxitos lo mismo que de tus planes. Mantén el interés en tu propia carrera por humilde que sea, ella es un verdadero tesoro en el fortuito cambiar de los tiempos...”

Max Ehrmann

A mis papitos Ramiro y Sonia

AGRADECIMIENTOS

A Dios, ese Ser superior que se evidencia en cada momento, que me ha brindado la fortaleza y la buena energía para continuar caminando hacia las metas trazadas en mi proyecto de vida.

A mis padres por su amor, su apoyo incondicional y su esfuerzo constante por formarnos a mis hermanos y a mí en los valores, la calidad humana, y el respeto al otro y a nosotros mismos. Gracias por ser la voz de aliento y el “empujoncito” para continuar luchando a pesar de las dificultades y los “terrenos agrestes” que nos presenta la vida.

A mis hermanos María Mercedes, Luis Javier y Sonia Alexandra por todos los momentos que hemos compartido juntos, por tolerar mis “chocheras” y estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mi Mao, porque desde que nuestras vidas se encontraron me siento una mujer plena. Gracias por acompañarme en este proceso, por apoyarme, por escucharme y dibujarme una sonrisa cuando más la necesito.

Al profe Rodrigo Torres Sáez y al Doc. Carlos Conde, por brindarme la oportunidad de crecer a nivel profesional y personal al permitirme desarrollar mi trabajo de grado bajo su dirección, sus enseñanzas y por qué no decirlo, sus llamados de atención. A los dos, gracias por confiar en mis capacidades.

A mis compañeros de los grupos de Investigación en Bioquímica y Microbiología, y Neurociencias y Comportamiento por sus enseñanzas y colaboración en este proceso de aprendizaje, especialmente a Diana Martínez, Jesús Rodríguez, Nasser Guerrero, Víctor Hernández y Yenny Bueno.

A los profesores de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander quienes son partícipes de mi formación profesional. Gracias por compartir su conocimiento y sus experiencias.

A COLCIENCIAS por apoyar la investigación y con ello permitir que los grupos de investigación continúen creciendo en conocimiento y acogiendo a más estudiantes interesados en “hacer ciencia”.

A mis queridos compañeros y amigos Químicos UIS: Daissy, Lina, Daniela, Mayra, Karla, Julio, Elkin, Camilo, Diego y Sebastián. Juntos hemos compartido no sólo una formación académica, sino también ideales, alegrías y tristezas. Siempre serán mis mejores recuerdos UIS.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 17 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 19 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| OBJETIVOS..... | 22 |
| Objetivo general | 22 |
| Objetivos específicos..... | 22 |
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 23 |
| 1.1. Aprendizaje y memoria | 23 |
| 1.1.1. Formación de la memoria..... | 24 |
| 1.1.2. Mecanismos moleculares implicados en la formación de la memoria a largo plazo..... | 27 |
| 1.1.3. Memoria emocional..... | 30 |
| 1.1.4. Estructuras cerebrales asociadas con la memoria emocional..... | 32 |
| 1.1.5. El estudio proteómico del hipocampo revela su asimetría lateral..... | 34 |
| 1.1.6. La síntesis de proteínas en la formación de la memoria | 36 |
| 1.2. Modelos animales en el estudio de la memoria y las emociones | 41 |
| 1.2.1. Laberinto en cruz elevado (LCE)..... | 42 |
| 1.2.2. Fenómeno <i>One Trial Tolerance</i> (OTT)..... | 43 |
| 1.3. Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE)..... | 45 |
| 1.3.1. Preparación de la muestra | 47 |
| 1.3.2. Cuantificación de las proteínas presentes en la muestra | 49 |
| 1.3.3. Isoelectroenfoque..... | 51 |
| 1.3.4. Equilibración..... | 53 |
| 1.3.5. Gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)..... | 53 |
| 1.3.6. Tinción de las proteínas con azul de <i>Coomassie</i> G-250 | 56 |
| 1.3.7. Análisis de imágenes | 57 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 59 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 2.1. | Análisis comportamental..... | 59 |
| 2.1.1. | Animales | 59 |
| 2.1.2. | Grupos experimentales | 60 |
| 2.1.3. | Laberinto en cruz elevado (LCE)..... | 60 |
| 2.1.4. | Procedimiento experimental en el LCE | 61 |
| 2.1.5. | Análisis de los datos obtenidos en el LCE | 62 |
| 2.2. | Análisis proteómico..... | 64 |
| 2.2.1. | Preparación de las muestras..... | 64 |
| 2.2.1.1. | Extracción y solubilización de proteínas | 64 |
| 2.2.1.2. | Cuantificación de proteínas | 64 |
| 2.2.2. | Electroforesis bidimensional SDS-PAGE | 66 |
| 2.2.2.1. | Isoelectroenfoque (IEF) | 66 |
| 2.2.2.2. | SDS-PAGE | 68 |
| 2.2.2.3. | Tinción | 69 |
| 2.2.2.4. | Análisis de imágenes..... | 69 |
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 72 |
| 3.1. | Análisis del comportamiento en el LCE | 72 |
| 3.2. | Análisis proteómico..... | 79 |
| 3.2.1. | Análisis de proteínas en el hipocampo dorsal derecho (HD)..... | 79 |
| 3.2.2. | Análisis de proteínas en el hipocampo dorsal izquierdo (HI)..... | 84 |
| 3.2.3. | Comparación de los proteomas de los hipocampos dorsales derecho e izquierdo..... | 91 |
| 3.3. | Relación entre el comportamiento en el LCE y la expresión de proteínas en el hipocampo dorsal..... | 92 |
| 4. | CONCLUSIONES..... | 94 |
| 5. | RECOMENDACIONES | 95 |
| | BIBLIOGRAFÍA..... | 97 |
| | ANEXOS..... | 104 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de las principales células, conexiones y flujo de impulsos a través del hipocampo..... | 33 |
| Figura 2. Estructura química de la cicloheximida..... | 37 |
| Figura 3. Modelo del mecanismo por el cual la cicloheximida inhibe la elongación de la traducción en la síntesis de proteínas..... | 39 |
| Figura 4. Laberinto en cruz elevado (LCE). | 42 |
| Figura 5. Rompimiento de los enlaces disulfuro de las proteínas por el ditioneitol (DTT).. | 48 |
| Figura 6. Azul de <i>Coomassie</i> G-250 | 50 |
| Figura 7. Polimerización de la acrilamida..... | 54 |
| Figura 8. Desnaturalización de las proteínas con dodecil sulfato de sodio (<i>SDS</i>)..... | 55 |
| Figura 9. Ratas Wistar dispuestas en su caja vivero..... | 59 |
| Figura 10. Diseño del laberinto en cruz elevado del Grupo de Investigación en Neurociencias y Comportamiento | 61 |
| Figura 11. Distribución de los brazos en el LCE para el registro de datos con PROSTCOM en el grupo de investigación NYC UIS-UPB..... | 63 |
| Figura 12. Obtención de las combinaciones de proteínas extraídas del hipocampo dorsal, derecho e izquierdo..... | 65 |
| Figura 13. Separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico | 68 |
| Figura 15. Porcentaje del número de entradas en los brazos abiertos (%EBA) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 16. Tiempo en los brazos abiertos (TBA) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE | 74 |
| Figura 17. Tiempo en la plataforma central (TC) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE | 75 |
| Figura 18. Tiempo en los brazos cerrados (TBC) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE | 75 |
| Figura 19. Porcentaje de entradas en los brazos cerrados (%EBC) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE | 76 |
| Figura 20. Número de cruzamientos (CRUZ) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE..... | 77 |
| Figura 21. Cantidad de manchas comunes en los tratamientos CONTROL, SS y CHX de los hipocampos derechos (HD) | 81 |
| Figura 22. Intensidad de las proteínas expresadas diferencialmente en SS HD y CONTROL HD, que están ausentes en CHX HD | 82 |
| Figura 23. Intensidad de las proteínas expresadas diferencialmente en SS HD y CHX HD, que están ausentes en CONTROL HD | 83 |
| Figura 24. Cantidad de manchas comunes en los tratamientos CONTROL, SS y CHX de los hipocampos izquierdos (HI). | 85 |
| Figura 25. Intensidad de las proteínas expresadas diferencialmente en CONTROL HI y SS HI, que están ausentes en CHX HI | 86 |
| Figura 26. Intensidad de las proteínas expresadas diferencialmente en SS HI y CHX HI, que están ausentes en CONTROL HI..... | 87 |
| Figura 27. Estructura 3D de IL-1-RAPL-1 (rata)..... | 89 |
| Figura 28. Estructura 3D de Hba1 (rata) | 90 |
| Figura 29. Estructura 3D de Cox-2 (rata) | 91 |

Figura 30. Expresión de la proteína SSP 1544 presente en el proteoma del HD y ausente en el HI.....92

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Cronograma de actividades para el análisis comportamental en el LCE. | 62 |
| Tabla 2. Muestras mezcladas para la formación de combinaciones de proteínas del hipocampo derecho (HD) y el hipocampo izquierdo (HI)..... | 66 |
| Tabla 3. Protocolo de la corrida para el isoelectroenfoco..... | 67 |
| Tabla 4. Corridas de la segunda dimensión en la cámara de electroforesis Protean xi Cell. | 69 |
| Tabla 5. Experimentos creados en el <i>PDQuest</i> para el análisis proteómico. | 79 |
| Tabla 6. Cantidad de manchas detectadas para los tratamientos CONTROL, SS y CHX en los hipocampos dorsales derechos (HD)..... | 80 |
| Tabla 7. Proteínas destacadas en el hipocampo dorsal derecho (HD)..... | 84 |
| Tabla 8. Cantidad de manchas detectadas para los tratamientos CONTROL, SS y CHX en los hipocampos dorsales izquierdos (HI)..... | 85 |
| Tabla 9. Proteínas destacadas en el hipocampo dorsal izquierdo (HI)..... | 87 |
| Tabla 10. Proteínas encontradas en las bases de datos de proteínas para el hipocampo en la especie <i>R. norvegicus</i> | 88 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| ANEXO A. Composición de las soluciones utilizadas para el análisis proteómico | 104 |
| ANEXO B. Curva de calibración de los patrones de albúmina de suero bovino usada para cuantificar proteínas por el método de Bradford | 108 |
| ANEXO C. Proteoma de las doce muestras de hipocampo dorsal que resultaron de la combinación de proteínas | 111 |

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA MEMORIA EMOCIONAL Y LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN EL HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS WISTAR EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO*

AUTORA: Marilyn Rocío Alvarez Santos**

PALABRAS CLAVE: deterioro de memoria, cicloheximida, hipocampo dorsal, síntesis de proteínas, LCE, 2D SDS-PAGE.

DESCRIPCIÓN

La información es almacenada a largo plazo cuando se somete a un proceso de consolidación que se fortalece con el tiempo en una huella de memoria estable. La inhibición de síntesis de proteínas con cicloheximida (CHX) sobre el hipocampo dorsal podría prevenir la reducción en la exploración de ratas re-expuestas al laberinto en cruz elevado (LCE), sugiriendo que la información adquirida en la primera exposición no fue consolidada.

Para determinar si la memoria emocional asociada al LCE es deteriorada como consecuencia de la inhibición de síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal derecho (HD) e izquierdo (HI); se trataron ratas Wistar machos vía intraperitoneal con 1mg/kg de CHX 15 min antes de la primera sesión en el LCE. Las ratas control expuestas al laberinto (SS) recibieron inyecciones del vehículo (1mL/kg de solución salina 0,9% p/v), mientras que los controles sin exposición al LCE (CONTROL) no se sometieron a tratamiento. 48 horas después de la primera sesión, las ratas en los grupos SS y CHX fueron re-expuestas al LCE para evaluar el efecto de cada tratamiento sobre el proceso de exploración. Luego de sacrificar los animales, los hipocampos dorsales se disecaron y procesaron para la extracción de las proteínas, que posteriormente fueron separadas mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D SDS-PAGE).

Los resultados obtenidos a nivel comportamental, sugieren que el tratamiento con CHX no interrumpió la consolidación de la memoria asociada a la experiencia en el LCE. Por otro lado, los análisis proteómicos comprobaron asimetría entre HD y HI, detectándose un número de proteínas mayor en HD. Además, se determinó que el conteo de proteínas en los hipocampos dorsales de las ratas sometidas al LCE fue mayor que en las ratas no expuestas.

* Trabajo de grado.

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

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE CYCLOHEXIMIDE EFFECT ON THE EMOTIONAL MEMORY AND PROTEINS EXPRESSION IN THE DORSAL HIPPOCAMPUS OF WISTAR RATS EXPOSED TO THE ELEVATED PLUS MAZE*

AUTHOR: Marilyn Rocío Alvarez Santos**

KEYWORDS: memory impairment, cycloheximide, dorsal hippocampus, proteins synthesis, EPM, 2D SDS-PAGE.

SUMMARY

The information is stored to long term when it is subjected to a consolidation process that is strengthened over time into a stable memory trace. The proteins synthesis inhibition with cycloheximide (CHX) on the dorsal hippocampus could prevent the reduction in the exploration of rats re-exposed to the elevated plus maze (EPM), suggesting that the acquired information in the first exhibition this was not consolidated.

To determine if the emotional memory associated with the EPM is impaired as a consequence of the protein synthesis inhibition in the right (RH) and left (LH) dorsal hippocampus; male Wistar rats were treated intraperitoneally with 1mg/kg of CHX 15 minutes before the first session in the EPM. Control rats exposed to the maze (SS) received injections of vehicle (1mL/kg saline 0.9% w/v), whereas controls without exposure to EPM (CONTROL) didn't undergo treatment. 48 hours after the first session, the rats in the SS and CHX groups were re-exposed to the EPM to evaluate the effect of each treatment on the scanning process. After sacrificing the animals, the dorsal hippocampus were dissected and processed for the extraction of proteins, which were subsequently separated by two-dimensional electrophoresis in polycalcrilamide gel (2D SDS-PAGE).

The results to behavioral level, suggest that treatment with CHX didn't disrupt the memory consolidation associated with the experience in the EPM. Furthermore, the proteomic analysis found asymmetry between RH and LH, detecting a larger number of proteins in RH. In addition, it was determined that the protein count in the dorsal hippocampus of rats subjected to the EPM was higher than in unexposed rats.

* Degree work.

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

INTRODUCCIÓN

El deterioro cognitivo, los déficits en el aprendizaje y la memoria emocional, y su estrecha relación con diferentes trastornos neurodegenerativos que afectan al hombre, han despertado en la actualidad un gran interés por el estudio de sus procesos bioquímicos. Hasta el momento, se han encontrado dos estructuras cerebrales que parecen jugar un papel importante en la formación de la memoria emocional: la amígdala y el hipocampo. Para avanzar en su conocimiento, se han creado modelos animales cuyos mecanismos fisiológicos asociados a emociones como el miedo y la ansiedad, se pueden homologar con la conducta humana. El laberinto en cruz elevado (LCE) constituye uno de los modelos de ansiedad más validados desde el punto de vista comportamental, fisiológico y farmacológico, en el cual los roedores se enfrentan a un conflicto entre su inclinación por explorar un ambiente novedoso y su tendencia natural a evitar las propiedades aversivas de los espacios abiertos (Conde, Bécerra & Botelho, 2001; Carobrez & Bertoglio, 2005).

Por su parte, la Proteómica ha proporcionado herramientas útiles para indagar acerca de los mecanismos moleculares que participan en la formación de la memoria y la plasticidad sináptica, entre ellas se encuentra la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (*2D-PAGE*), una técnica de separación que ha hecho posible el análisis de proteomas complejos. Diversos estudios al respecto, han planteado que existe cierta asimetría en la expresión de las proteínas entre los hipocampos derecho e izquierdo de ratas saludables y ratas sometidas a situación de estrés, lo que implicaría una lateralidad de las funciones y los mecanismos moleculares mediados por dicha estructura del sistema nervioso central (Hernández, 2010; Samara *et al.*, 2011; Guerrero, 2012). También se ha establecido que la síntesis de nuevas proteínas en el hipocampo podría requerirse para la consolidación de la memoria a largo plazo. Esta idea está sustentada por una serie de datos experimentales en los que la administración sistémica de

inhibidores de síntesis de proteínas (*PSIs*) en diversas especies animales, deterioran la memoria evaluada en diferentes tareas de aprendizaje (Díaz *et al.*, 2009). Entre estos antibióticos se destaca la cicloheximida (*CHX*), un compuesto producido por la bacteria *Streptomyces griseus*, que es uno de los *PSIs* más utilizados para inhibir *in vivo* e *in vitro* la síntesis de proteínas en células eucariotas, y prevenir la formación de hongos en cultivos bacterianos (Franklin & Snow, 2005).

Por esta razón, los grupos de investigación en Bioquímica y Microbiología, y en Neurociencias y Comportamiento de la Universidad Industrial de Santander, buscan contribuir a los estudios que asocian la formación de la memoria a largo plazo con la síntesis de nuevas proteínas, evaluando el efecto de la *CHX* sobre el comportamiento de ratas Wistar expuestas al LCE a través del análisis de los proteomas de sus hipocampos dorsales, derecho e izquierdo. Para ello se realizó la etapa inicial referente al comportamiento en la que se consideraron tres grupos experimentales: un control sin exposición al LCE (CONTROL), un control expuesto al LCE (SS), y el grupo expuesto al LCE bajo el efecto del inhibidor de síntesis de proteínas (*CHX*). Las ratas en SS y *CHX* se sometieron a dos sesiones en el laberinto que fueron registradas en video para su posterior análisis. Inmediatamente después de la segunda sesión las ratas se sacrificaron y se disecaron los hipocampos dorsales derecho e izquierdo. Estos tejidos se trataron con soluciones que permitieron extraer las proteínas y separarlas mediante electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida. Finalmente, se determinaron los proteomas de los hipocampos dorsales y se establecieron las diferencias de expresión entre los grupos experimentales, las cuales se relacionaron con los resultados obtenidos a través del análisis comportamental.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existe un gran interés por el conocimiento de los procesos bioquímicos que tienen lugar en el hipocampo y podrían estar relacionados con la formación de la memoria. Se ha planteado que, en diferentes especies animales, la inhibición de síntesis de proteínas en el hipocampo estaría afectando la consolidación de información deteriorando la memoria a largo plazo. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han concentrado en el uso de modelos que estudian la memoria espacial y el análisis de proteínas específicas que estarían involucradas en los procesos de memoria. Por otra parte, los aportes al entendimiento de la memoria emocional se han enfocado principalmente en el estudio de la emoción del miedo, asociada a la amígdala. Esto motivó a que el presente trabajo vinculara dos líneas de investigación, las Neurociencias y la Proteómica, con el propósito de evaluar el comportamiento de ratas Wistar en el modelo de laberinto en cruz elevado (LCE), y establecer la relación entre la memoria emocional y la expresión general de proteínas en los hipocampos dorsales derecho e izquierdo.

JUSTIFICACIÓN

Los trastornos neurológicos conllevan a un deterioro en la calidad de vida de las personas que los padecen, ya que estos ocasionan impedimentos cognitivos, problemas de memoria y aprendizaje que limitan el desempeño en las actividades diarias y afectan la estabilidad emocional no sólo de los pacientes, sino también de sus familiares. Algunos de estos trastornos neurológicos (neuropsiquiátricos) comprenden enfermedades como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis múltiple (EM).

El estudio de la Carga Global de Enfermedad (CGE), encabezado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), demostró que en el transcurso de los años el impacto de los trastornos neurológicos en la salud global había sido subestimado, debido a que se tomaban en consideración las tasas de mortalidad, pero no las de discapacidad. De acuerdo con el estudio realizado en 1990, las lesiones ocasionadas por los trastornos neuropsiquiátricos fueron las principales causas de años perdidos de vida saludable. Posteriormente, la OMS realizó proyecciones entre los años 2005 y 2030, estimándose que los trastornos neurológicos serán una causa importante de mortalidad, representando el 12% de las muertes a escala global, además de constituir un 12% de la pérdida de vida saludable (OMS, 2006). Adicionalmente, en Colombia los trastornos de ansiedad son de mayor prevalencia que otros trastornos mentales. El 19.3% de la población entre 18-65 años de edad reporta haber tenido alguna vez en la vida un trastorno de ansiedad. Estos son más frecuentes entre las mujeres (21.8%). Dentro de los trastornos de ansiedad, la fobia específica es la de mayor prevalencia de vida con 13.9% en mujeres y 10.9% en hombres, seguido por la fobia social que es similar en ambos géneros con un 5% de prevalencia de vida. Por otra parte, la edad de inicio de estos trastornos fluctúa entre los 7 años en el trastorno de fobia específica y los 28 años para el trastorno de estrés post traumático (Posada *et al.*, 2006).

Por lo tanto, esta investigación pretende contribuir a los estudios en Neurociencias y Proteómica que asocian el aprendizaje y la memoria con la síntesis de proteínas, mediante la evaluación del efecto de inhibidores de síntesis de proteínas como la cicloheximida (CHX) sobre ratas Wistar sometidas a evaluación comportamental en el modelo de laberinto en cruz elevado (LCE). Dicho estudio constituye un importante aporte a los experimentos realizados en modelos animales, teniendo en cuenta que la mayoría se han interesado principalmente en el rol del hipocampo y la síntesis de proteínas en la consolidación de la memoria espacial, mientras que se ha indagado poco acerca del papel que esta área del sistema límbico cumple sobre la memoria emocional. Además, dicho estudio puede constituirse en una fuente de información novedosa acerca del modelo de LCE.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer la relación entre los comportamientos observados en el laberinto en cruz elevado (LCE) y las proteínas expresadas en el hipocampo dorsal derecho e izquierdo de ratas Wistar bajo el efecto de la cicloheximida (CHX).

Objetivos específicos

- Analizar el comportamiento de las ratas Wistar en los grupos experimentales con tratamientos cicloheximida (CHX) y solución salina (SS), sometidas a la tarea de aprendizaje en el laberinto en cruz elevado (LCE).
- Determinar los perfiles de proteínas en el hipocampo dorsal derecho e izquierdo, de las ratas Wistar en los grupos experimentales: control sin exposición en el LCE (CONTROL), SS y CHX.
- Identificar los cambios de expresión en los proteomas del hipocampo dorsal derecho e izquierdo, de las ratas expuestas al LCE bajo el efecto de la CHX, respecto a los grupos CONTROL y SS.
- Definir si los cambios en los proteomas del hipocampo dorsal derecho e izquierdo de las ratas Wistar en los grupos experimentales, están vinculados al comportamiento observado en el LCE.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Aprendizaje y memoria

La variedad de mecanismos que están involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria han sido estudiados a través de las Neurociencias, ciencias multidisciplinares que analizan el sistema nervioso para entender las bases biológicas del comportamiento (Squire *et al.*, 2008).

El cerebro crea representaciones del mundo basado en la información que recibe a través de los sistemas sensoriales. Una característica común de todos los animales en el reino animal, es su capacidad para adaptarse a los cambios ambientales. Si estas adaptaciones se basan en modificaciones del sistema nervioso y se hacen evidentes a nivel comportamental, se dice que los animales han aprendido. El aprendizaje depende de la plasticidad de los circuitos cerebrales¹ que son capaces de reorganizarse funcionalmente para ajustar la representación del entorno en respuesta a nueva información relevante. De esta forma, el aprendizaje describe el proceso de adaptación, mientras que la memoria se refiere al estado y la permanencia de los cambios adaptativos del comportamiento (Gallo, 2007; Holsboer & Ströhle, 2005); por lo tanto, la memoria se puede definir como la capacidad de los animales de retener y utilizar la información adquirida (Conde, Bécerra & Botelho, 2001).

Los sistemas de aprendizaje son capaces de detectar y modificar, no sólo los cambios en diversas características de un estímulo específico, sino también aquellos que implican la relación entre los estímulos, y las respuestas y sus consecuencias. Adicionalmente, debe considerarse que el aprendizaje también se

¹ Los circuitos cerebrales hacen referencia a los conjuntos de estructuras nerviosas situadas en el cerebro.

afecta por los procesos sensoriales, el rendimiento, la motivación, la excitación, la atención y los procesos emocionales (Gallo, 2007).

1.1.1. Formación de la memoria

El aprendizaje y la memoria consisten de procesos dinámicos dependientes del tiempo. Se pueden considerar varios estados sucesivos del aprendizaje tales como la adquisición, la consolidación, la retención, la recuperación, la reactivación y la extinción de la información, los cuales incluyen procesos independientes que ocurren sucesivamente (Gallo, 2007).

En general, la formación de la memoria consta de tres etapas principales: la adquisición, la consolidación y la evocación. La adquisición de la memoria es la fase de interacción de un organismo con los cambios en su ambiente, que se caracteriza por la admisión de información sensorial. La consolidación de la memoria es la etapa en que la información adquirida es procesada en el cerebro conduciendo a cambios duraderos en la comunicación inter neuronal, mientras que la evocación constituye el uso de los recuerdos o la información consolidada (Holsboer & Ströhle, 2005; Tulving, 1995).

La mayoría de los recuerdos se disipan con el tiempo, debido a la reversión de los cambios en la comunicación inter neuronal original o a su modificación por procesos de aprendizaje nuevos que perturban la recuperación de la memoria inicial. Los recuerdos también pueden extinguirse por entrenamiento, lo que genera un estado de disminución en el rendimiento de la memoria que se denomina “retención de la memoria de extinción”, y se cree está basada en la formación de nuevos recuerdos que contrarrestan la recuperación de la información original (Holsboer & Ströhle, 2005).

Basándose en la variedad de aprendizaje, se han establecido dos categorías de memoria diferentes para los seres humanos, la memoria implícita que se expresa cuando las experiencias previas facilitan el desarrollo de una tarea que no requiere de un recuerdo consciente o intencional de esas experiencias; y la memoria explícita o declarativa, la cual se revela en el desarrollo de tareas que requieren recuerdos conscientes de las experiencias previas (Holsboer & Ströhle, 2005). La memoria declarativa, generalmente se concibe como la combinación de las memorias episódica y semántica. La memoria episódica enfatiza en la capacidad de recordar experiencias personales específicas, que contienen una secuencia detallada de los eventos que las constituyen, y el contexto espacio- temporal en el cuál ocurren. Por otro lado, la memoria semántica implica la adquisición de conocimiento sobre el mundo y sus características físicas, sobre el contenido y el significado del lenguaje, la estructura social, la geografía, entre otras ciencias (Eichenbaum, 2003).

Es preciso tener en cuenta que los anteriores son conceptos descriptivos que se refieren principalmente a la experiencia psicológica de una persona. En consecuencia, los conceptos de memoria implícita y explícita, no hacen referencia ni implican la existencia de dos procesos separados (Holsboer & Ströhle, 2005). Estas dos categorías de memoria no se pueden aplicar fácilmente a la situación de los animales, ya que estos a pesar de ser conscientes de su mundo y basarse en el aprendizaje y la memoria para adquirir las habilidades necesarias para sobrevivir, no pueden proveer un reporte explícito² de sus experiencias. No obstante, varios investigadores se han basado en características de la memoria episódica que pueden ser evaluadas en animales, incluyendo el contexto temporal y espacial de los recuerdos (Eichenbaum, 2003; Tulving, 2002).

² Un reporte explícito se refiere al conocimiento que ha sido codificado y almacenado, y puede ser transmitido inmediatamente a otros individuos.

Además de los sistemas de memoria clasificados por su contenido (explícita e implícita), se encuentran aquellos relacionados con su duración como la memoria a corto plazo (*Short Term Memory, STM*) y la memoria a largo plazo (*Long Term Memory, LTM*). La *STM* hace referencia a la memoria que se desarrolla en unos pocos segundos o minutos y dura varias horas, mientras que la consolidación de la *LTM* procede lentamente, generando recuerdos que van desde las 24 horas hasta toda una vida (Izquierdo *et al.*, 1999). Esta clasificación de la memoria fue propuesta inicialmente por Hermann Ebbinghaus y posteriormente formalizada por William James. Aunque la *STM* y la *LTM*, no se separan en un periodo de tiempo fijo, es claro que la información almacenada a largo plazo se somete a un proceso de consolidación que se fortalece con el tiempo en una huella de memoria estable; proceso que no tiene lugar para la memoria a corto plazo, que decae mucho antes (Rodríguez & Bermúdez, 2007).

La *LTM* asociada a la evitación inhibitoria³ no se establece inmediatamente después de la adquisición, sino que se somete a un proceso prolongado de consolidación que lleva de 3 a 9 horas, y consiste de una secuencia de eventos moleculares específicos en la región CA1 del hipocampo (sección 1.1.4, figura 1) conectada a estructuras corticales y subcorticales. La *STM* puede deprimirse a través de tratamientos farmacológicos que actúan sobre diferentes receptores y vías de señalización en diferentes regiones del cerebro, sin que ello afecte la formación de la memoria a largo plazo. Diversas investigaciones, han establecido que la consolidación de la *LTM*, a diferencia de la *STM*, requiere de la síntesis de proteínas (Holsboer & Ströhle, 2005). Esto hace evidente que los mecanismos asociados a la formación y el mantenimiento de la *STM*, están separados de los que participan en la consolidación de la *LTM* (Cammarota *et al.*, 2007). Sin embargo, existen relaciones entre los procesos involucrados con la *STM* y la *LTM*

³ La evitación inhibitoria, describe una tarea de aprendizaje en la que las ratas aprenden a asociar suaves descargas eléctricas en sus patas, como un comportamiento particular del aparato en que se disponen.

a nivel del receptor y el post-receptor dependiendo del área cerebral que se estudie (Cammarota *et al.*, 2007; Escobar & Derrick, 2007).

Se ha formulado que la formación de la *LTM* está directamente relacionada con la potenciación a largo plazo (*LTP*, sigla en inglés), a partir de la cual se desencadenan una serie de eventos moleculares que podrían determinar la permanencia de los cambios plásticos a través de largos períodos (Cammarota *et al.*, 2007).

1.1.2. Mecanismos moleculares implicados en la formación de la memoria a largo plazo

El aprendizaje de una nueva conducta y la adquisición de información del medio ambiente requieren que los patrones específicos de la actividad neuronal inducida por la experiencia se mantengan a través de la plasticidad en determinadas redes neuronales. La actividad neuronal conduce a una serie de eventos moleculares tales como la activación de ciertos sistemas de quinasas y neurotransmisores, la afluencia de iones calcio (Ca^{2+}), la inducción de la expresión génica, la traducción y regulación de proteínas, y muchos otros que son esenciales para establecer cambios en la plasticidad subyacente a la memoria a largo plazo (Ramirez, 2007).

La potenciación a largo plazo (*LTP*) es un modelo de los eventos sinápticos y celulares que se ocultan tras la formación de la memoria a largo plazo, que fue observado inicialmente en el hipocampo del conejo por Terjer Lømo (Escobar & Derrick, 2007). La *LTP* se caracteriza porque se genera rápidamente (en el orden de minutos), lo cual implica una despolarización post-sináptica inducida por la estimulación de alta frecuencia de un número suficiente de vías aferentes. Además, es un mecanismo asociativo, es decir, que se requiere de la cooperatividad de un número mínimo de vías aferentes activas para inducir la *LTP* en una neurona post-sináptica (Escobar & Derrick, 2007).

La transmisión glutamatérgica⁴ podría ser un paso importante en los mecanismos de la plasticidad sináptica y la duración de la memoria, debido a la regulación de la densidad de los receptores del glutamato, *AMPA* (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y *NMDA* (N-metil-D-aspartato), en la membrana post sináptica (Ramirez, 2007), (Escobar & Derrick, 2007). El progreso en la formación de la memoria, además de los receptores ionotrópicos del glutamato, requiere de la participación de los receptores metabotrópicos de este neurotransmisor excitatorio, que pueden ser regulados por la transmisión colinérgica y GABAérgica (Ramirez, 2007). Es posible que las diferentes cascadas de transducción de señales, de velocidad (glutamatérgica) y moduladoras (colinérgica) sean necesarias para la plasticidad sináptica a largo plazo y puedan converger en una neurona dada (Ramirez, 2007).

En algunos casos, la *LTP* se ve opacada por la potenciación a corto plazo (*STP*, sigla en inglés), que consiste de un aumento exponencial en la descomposición de la fuerza sináptica que parece involucrar también los receptores *NMDA*, pero se descompone en 5-20 minutos. Este mecanismo podría relacionarse directamente con la memoria a corto plazo e indicaría la importancia de los receptores ionotrópicos del glutamato en la etapa temprana de la memoria (Escobar & Derrick, 2007).

Para que se induzca la *LTP* se requiere de una neurona post sináptica con una membrana levemente despolarizada, de tal manera que se pueda disociar el Mg^{2+} que bloquea el canal del *NMDA* (Escobar & Derrick, 2007). Después de activar los receptores *NMDA* del glutamato, se generan una serie de eventos celulares, tales como la entrada de calcio y la activación del sistema quinasa-fosfatasa, entre otros. Probablemente, la señal más prominente de la plasticidad sináptica es el calcio, que tiene la capacidad de interactuar con las dendritas, regulando la

⁴ La transmisión glutamatérgica hace referencia a la información transmitida de una neurona a otra por el neurotransmisor excitatorio glutamato.

plasticidad sináptica. Allí juega un importante rol la Ca^{2+} /calmodulina proteína quinasa II (CaMKII) que es una proteína quinasa serina/treonina altamente enriquecida en la densidad post sináptica, regulada por el calcio y el complejo calmodulina. Cuando este complejo activa a la CaMKII mediante autofosforilación, ésta puede fosforilar a otras proteínas, interactuar con los receptores NMDA del glutamato y mejorar la conductancia en el receptor AMPA por hiperfosforilación (Ramirez, 2007).

Además de los sistemas de neurotransmisores, es bien aceptado que la formación de la memoria a largo plazo requiere de la síntesis rápida de ácidos ribonucleicos mensajeros (*mRNAs*) y su traducción en proteínas. A estos procesos se han asociado varios genes inmediatamente tempranos (*IEGs* en inglés), efectores o reguladores de la transcripción de otros genes. Entre ellos se encuentra el *Arc* que es un *IEG* efector rápidamente inducido por la actividad celular, que posee sitios para la fosforilación de la CaMKII y la proteína quinasa C (PKC), y depende de la activación del receptor NMDA del glutamato. Por otro lado, se mencionan *IEGs* reguladores de la transcripción como *c-fos* y *c-jun* que son considerados buenos candidatos en los primeros pasos para la formación de la plasticidad sináptica de la LTM (Ramirez, 2007; Escobar & Derrick, 2007). El *c-fos* es capaz de activar la expresión de otros genes relacionados con la plasticidad, como lo es el factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF* por su sigla en inglés). El *BDNF* es una neurotrofina, es decir, un factor de regulación implicado en el desarrollo, supervivencia y reparación celular que activa receptores de tirosina quinasa (*TrkB*) localizados en la membrana celular. Durante el desarrollo, esta neurotrofina regula la proliferación neuronal, la migración neuronal, las vías del axón, el crecimiento dendrítico, la formación de la sinapsis y la permanencia del contacto sináptico. La vinculación del *BDNF* a la plasticidad sináptica se ha sugerido por mucho tiempo y se sabe que regula la actividad glutamatérgica mediante el aumento de la fosforilación del receptor *NMDA* en la corteza cerebral. Adicionalmente, se ha sugerido que el *BDNF* puede jugar un rol importante en los mecanismos

moleculares involucrados en la plasticidad estructural inducida por el aprendizaje espacial (Ramirez, 2007).

Finalmente, considerando los diferentes sistemas moleculares mencionados, se podría resumir que después de una situación de comportamiento que conduce a la formación de la memoria a largo plazo (*LTM*), la transmisión glutamatérgica puede estimular la activación de los receptores *NMDA* y desencadenar el flujo de Ca^{2+} al interior de la célula, generando una señal compleja que puede ser traducida a través de la *CaMKII*. Adicionalmente, los iones calcio junto con otras moléculas como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*MAPK*) pueden regular la expresión del gen *Arc* que es traducido en las dendritas. Por último, puede ocurrir la activación de los receptores *TrkB* por el *BDNF*, que converge en la activación de los receptores *NMDA* y el aumento de la actividad de *CaMKII* (Ramirez, 2007).

1.1.3. Memoria emocional

Las emociones pueden interpretarse como disposiciones de acción que le permiten al cuerpo responder adecuadamente cuando se enfrenta a estímulos ambientales relevantes (como situaciones de peligro), generando complejos estados psicológicos y fisiológicos según las circunstancias (Labar & Ledoux, 2006; Dolan, 2002). De allí que, la memoria emocional pueda considerarse como el conjunto de procesos de adquisición, consolidación y evocación de los estados emocionales asociados a la experiencia que pueden inferirse en un modelo de miedo y ansiedad (Conde, Becerra & Botelho, 2001).

El valor adaptativo del miedo como una emoción, es posible entenderlo dentro de un contexto evolutivo a través del cual la detección de la presencia de amenazas en el medio ambiente es fundamental para la supervivencia. Ante una situación de peligro, los sistemas de vigilancia del cuerpo deben actuar con rapidez, ejerciendo influencia sobre los dominios sensoriales, cognitivos y motores, para preparar al

cuerpo para la ejecución de mecanismos de defensa frente a posibles daños inminentes, y recordar las características y lugares de los estímulos amenazantes para evitarlos en el futuro. Cuando el organismo se encuentra en un estado prolongado de preparación para enfrentar las posibles situaciones de peligro, se produce la ansiedad como una señal de alerta (Labar & Ledoux, 2006). Mientras que la ansiedad normal es beneficiosa para la coordinación de los patrones de respuesta ante una situación de amenaza, la ansiedad patológica tiene muchas facetas que pueden agobiar considerablemente a un individuo, requiriendo intervención terapéutica (Holsboer & Ströhle, 2005).

La importancia del miedo en la regulación del comportamiento se refleja en la prevalencia de los trastornos de ansiedad en los seres humanos. El estudio de la Carga Global de Enfermedad (CGE), encabezado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), demostró que en el transcurso de los años el impacto de los trastornos neurológicos en la salud global había sido subestimado, debido a que se tomaban en consideración las tasas de mortalidad, pero no las de discapacidad. De acuerdo con el estudio realizado en 1990, las lesiones ocasionadas por los trastornos neuropsiquiátricos fueron las principales causas de años perdidos de vida saludable. Posteriormente, la OMS realizó proyecciones entre los años 2005 y 2030, estimándose que los trastornos neurológicos serán una causa importante de mortalidad, representando el 12% de las muertes a escala global, además de constituir un 12% de la pérdida de vida saludable (OMS, 2006). Adicionalmente, en Colombia los trastornos de ansiedad son de mayor prevalencia que otros trastornos mentales. El 19.3% de la población entre 18-65 años de edad reporta haber tenido alguna vez en la vida un trastorno de ansiedad. Estos son más frecuentes entre las mujeres (21.8%). Dentro de los trastornos de ansiedad, la fobia específica⁵ es la de mayor prevalencia de vida con 13.9% en mujeres y 10.9% en hombres, seguido por la fobia social que es similar en ambos

⁵ La fobia específica se refiere al miedo persistente e irracional a un tipo específico de objeto, animal, actividad o situación que ofrece poco o ningún peligro real.

géneros con un 5% de prevalencia de vida. Por otra parte, la edad de inicio de estos trastornos fluctúa entre los 7 años en el trastorno de fobia específica y los 28 años para el trastorno de estrés post traumático (Posada *et al.*, 2006).

1.1.4. Estructuras cerebrales asociadas con la memoria emocional

Dentro de las estructuras del cerebro que parecen jugar un papel importante en el aprendizaje aversivo y la memoria emocional se encuentran la amígdala y el hipocampo. La primera es fundamental para la consolidación y, posiblemente, para el almacenamiento de los recuerdos de tipo aversivo; mientras que el hipocampo es crítico para el aprendizaje y la memoria asociados con tareas espacio-temporales (Holsboer & Ströhle, 2005).

La amígdala es la estructura cerebral más destacada en relación a la generación de emociones negativas, incluyendo el miedo y la ansiedad. Su función consiste en asignar significado emocional a los estímulos ambientales, de tal manera que cuando se presenta un impulso sensorial, la amígdala lo evalúa rápidamente y le informa al cerebro si éste representa un peligro o por el contrario, promete alguna ganancia para el organismo (Simón, 1997). Esta estructura se forma por la colección heterogénea de núcleos interconectados en lo profundo del lóbulo temporal, y está diferenciada funcional y morfológicamente. La amígdala contiene componentes corticales y estriatales. Los componentes corticales, como el complejo basolateral de la amígdala, parecen ser esenciales en la asociación de estímulos en el miedo condicionado. Además, las vías eferentes del complejo basolateral hacia las estructuras adicionales de la amígdala, podrían regular las respuestas activas a estímulos o situaciones de peligro potencial, como ocurre con los componentes estriatales que comprometen el núcleo medio y central amigdaloides, los cuales reciben las señales del complejo basolateral y organizan las reacciones defensivas frente a los estímulos de eventos aversivos (Holsboer & Ströhle, 2005).

Por otro lado, el hipocampo es una estructura simétrica ubicada al interior del lóbulo temporal medio, sobre ambos hemisferios del cerebro humano. Al realizar secciones transversales del cerebro de roedores se diferencian tres regiones en la formación hipocampal: el giro dentado, el propio hipocampo (*Cornu ammonis*, CA, por su semejanza con el cuerno de un carnero o del dios Amón) y el subículo. En el hipocampo como tal, se definen las regiones CA1 a CA3, y CA4 generalmente llamado el *hilus* y considerado parte del giro dentado (Xiong, 2008; Holsboer & Ströhle, 2005). El flujo de información a través del hipocampo procede del giro dentado y de allí fluye hacia las regiones CA3 a CA1 hasta llegar al subículo, formando así el principal circuito trisináptico intrínseco. La anatomía del hipocampo en roedores fue extensamente estudiada por Cajal (1911), para lo cual publicó la ilustración de las principales células, conexiones y el flujo de los impulsos que se transportan en la formación hipocampal (figura 1) (Xiong, 2008).

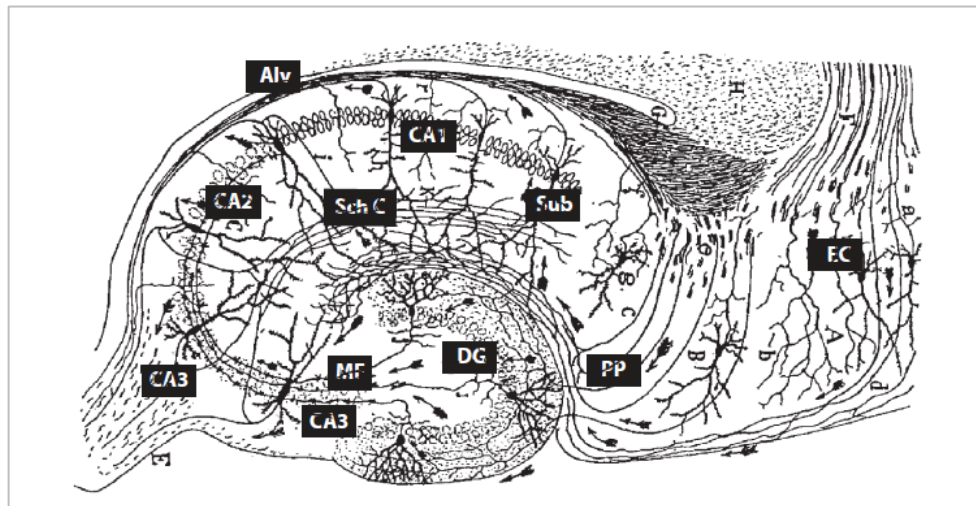


Figura 1. Esquema de las principales células, conexiones y flujo de impulsos a través del hipocampo, realizado por Cajal en 1911. Se destacan allí las regiones CA, el giro dentado (DG), el subículo (*Sub*), entre otros. Tomado de Xiong, 2008.

Con el paso del tiempo se han ido reuniendo evidencias que sugieren, que el hipocampo tiene un papel esencial en la formación de nuevas memorias asociadas a los eventos experimentados por un individuo. El daño en el

hipocampo suele evidenciarse en la dificultad para la formación de nuevos recuerdos (amnesia anterógrada) y también puede afectar el acceso a los recuerdos previos (amnesia retrograda). Sin embargo, algunas de estas memorias adquiridas con anterioridad se conservan a pesar de la lesión, lo cual sugiere que la consolidación en el tiempo implica la transferencia de recuerdos del hipocampo a otras partes del cerebro (Xiong, 2008).

Por otro lado, diversas investigaciones con modelos roedores indican que el hipocampo juega un rol en el almacenamiento y procesamiento de la información espacial. De hecho, los estudios de neuroimagen del hipocampo humano revelan que éste se activa durante la navegación espacial, lo que sugiere que es una estructura que contribuye a la codificación y recuperación de la información relacionada con el espacio (Xiong, 2008). No obstante, de los resultados obtenidos experimentalmente, se ha propuesto que esta función del hipocampo depende preferencialmente de la subregión dorsal, constituida por el 50% del volumen del hipocampo ubicado en la zona septal (Bannerman *et al.*, 2004). Mientras que la subregión ventral, definida como el 50% del volumen hipocámpico dispuesto en el polo temporal, puede desempeñar un papel preferencial en comportamientos asociados con el miedo y la ansiedad que podría estar relacionado con la conectividad del hipocampo ventral al hipotálamo y la amígdala. Es preciso tomar en cuenta que estas distinciones entre las regiones del hipocampo no son absolutas, ya que el hipocampo ventral puede contribuir al aprendizaje espacial, al menos bajo ciertas condiciones (Bannerman *et al.*, 2004).

1.1.5. El estudio proteómico del hipocampo revela su asimetría lateral

El hipocampo está implicado en diferentes desórdenes neuronales. Estudios realizados en humanos con daños unilaterales en el hipocampo han propuesto diferencias funcionales, donde las lesiones al hipocampo izquierdo (HI) afectan la memoria verbal, mientras que las lesiones sobre el hipocampo derecho (HD)

conlleven al déficit en la memoria de tareas no verbales. Incluso, al comparar el volumen del HD con el HI de un individuo saludable, el primero resulta ser mayor que el segundo (Samara *et al.*, 2011).

Por otro lado, utilizando técnicas bioquímicas como la electroforesis bidimensional y empleando software para el análisis proteómico, se ha determinado que los hipocampos dorsales, derecho e izquierdo, de ratas machos Wistar bajo criterio de aprendizaje en el laberinto en cruz elevado (LCE) o sometidas a situación de estrés en el modelo de nado forzado, presentan diferencias en el conteo de proteínas, siendo mayor el número de proteínas detectadas en la región hipocampal derecha (Hernández, 2010; Guerrero, 2012).

Adicionalmente, aplicando electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, se demostró que hay diferencias cuantitativas en la expresión de 41 proteínas entre el HD y el HI de ratas machos adultas Sprague Dawley, las cuales son más abundantes en el HD (~68%). Estas proteínas participan principalmente en las vías de energía y metabolismo celular, el transporte de vesículas, la estructura y cambios del citoesqueleto, y el procesamiento de las proteínas, como la traducción, el plegado y la degradación. El análisis revela que el HD en contraste con el HI, contiene una alta abundancia de enzimas relacionadas con el metabolismo de la energía celular. Mientras que el HI tiene una mayor concentración de proteínas localizadas principalmente en los astrocitos (Samara *et al.*, 2011). Por medio de inmunotransferencia, también se confirmó que algunas proteínas específicas del cerebro como dinamina-1, DRP2, sinapsina-1 entre otras, se expresan en mayor proporción en el HD (Samara *et al.*, 2011). Finalmente, con base en la abundancia de proteínas específicas se propone que, bajo condiciones normales, el hipocampo derecho juega un papel principal en la sinapsis y el hipocampo izquierdo cumple con un rol neuro protector (Samara *et al.*, 2011). Dicha asimetría encontrada a nivel de las ratas, a pesar de que no se

puede extrapolar a los humanos, permite un mayor entendimiento del desarrollo saludable del cerebro y las enfermedades que lo afectan.

1.1.6. La síntesis de proteínas en la formación de la memoria

Los procesos de consolidación de la memoria a corto y a largo plazo se distinguen por su dependencia de la síntesis de nuevas proteínas. El bloqueo de la transcripción y la traducción en la amígdala lateral o el hipocampo revela que la consolidación de la memoria a largo plazo, pero no a corto plazo, requiere de la síntesis de proteínas (Holsboer & Ströhle, 2005). La idea de que la consolidación de la memoria está mediada por la generación de nuevas proteínas se fundamenta en una serie de datos experimentales en los que la administración de inhibidores de síntesis de proteínas (*PS/s*, sigla en inglés) en roedores, peces, insectos entre otros, deterioran la memoria a largo plazo evaluada en diferentes tareas de aprendizaje (Díaz *et al.*, 2009). No obstante, La amnesia producida por los *PS/s* depende de la dosis suministrada y parece estar relacionada con el porcentaje de inhibición de la síntesis de proteínas (Díaz *et al.*, 2009).

La puromicina, la cicloheximida, la acetocicloheximida y la anisomicina son compuestos antibióticos que pueden ser usados para determinar la importancia de la síntesis de proteínas en las respuestas biológicas asociadas con la memoria. Estos *PS/s* también tienen la capacidad de interferir con los sistemas de neurotransmisión colinérgica, ya que al parecer pueden inhibir la acetil colinesterasa (*AChE*). No obstante, para que esto ocurra se requiere de concentraciones de cicloheximida, acetocicloheximida y anisomicina mayores a las usadas en los experimentos relacionados con la memoria, lo que podría indicar que los efectos amnésicos de estos *PS/s* no se deben directamente a la inhibición de la *AChE* (Moss & Fahrney, 1976).

Se ha reportado que los *PSIs* interrumpen la memoria si son administrados antes o inmediatamente después del entrenamiento, y que las ratas hembras podrían ser más sensibles a los efectos cognitivos relacionados con la inhibición de la síntesis de proteínas, debido a un posible bloqueo de las acciones esteroideas implicadas en su ciclo estral. Por otro lado, se ha sugerido que para experimentos *in vivo* con este tipo de compuestos, podría ser más conveniente utilizar vías de administración sistémicas que, a pesar de su falta de especificidad, no inducen apoptosis en el cerebro como suele ocurrir en tratamientos a nivel local (Flint, Valentine, & Papandrea, 2007).

Entre los *PSIs* más utilizados en estudios *in vivo* e *in vitro* se encuentra la cicloheximida (*CHX*), un compuesto antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces griseus*, utilizado principalmente como una herramienta experimental que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas y previene la formación de hongos en cultivos bacterianos (Franklin & Snow, 2005). La *CHX* tiene la estructura química 3-[2-(3,5-dimetil-2-oxociclohexil)-2-hidroxietil] glutarimida, donde el componente glutarimida se refiere al anillo de piperidina con dos grupos cetona vecinos al nitrógeno (figura 2), el cual podría jugar un papel clave en la actividad biológica de la *CHX* (Schneider Poetsch *et al.*, 2010).

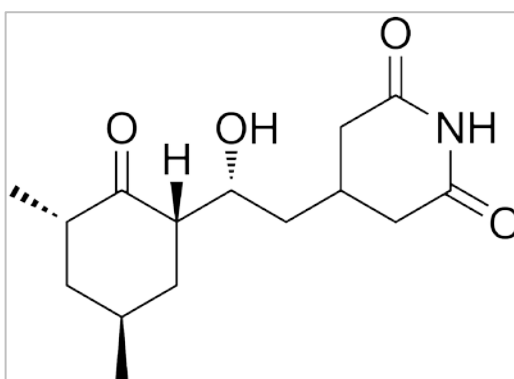


Figura 2. Estructura química de la cicloheximida. Tomado de Schneider Poetsch *et al.*, 2010.

La biosíntesis de proteínas en células eucariotas posee una etapa de elongación donde la traducción del *mRNA* en los ribosomas va del extremo 5' hacia el extremo 3', y un ciclo de translocación se conforma de tres pasos: 1) la unión de un aminoacil-*tRNA*⁶ al sitio aceptor ribosomal (sitio A); 2) la formación de un enlace peptídico y 3) la translocación del *tRNA* desacilado del sitio peptídico (sitio P) a la posición de salida (sitio E), y el desplazamiento del péptidil-*tRNA* del sitio A al sitio P. Estos pasos pueden repetirse múltiples veces, están catalizados por factores de elongación (*EF*) y requieren de guanósín trifosfato (*GTP*) (Schneider Poetsch *et al.*, 2010).

Diversos estudios han indagado que la *CHX* actúa específicamente sobre la subunidad 60S de los ribosomas eucariontes, interfiriendo con la actividad de la peptidil transferasa y bloqueando la translocación del peptidil *tRNA* del sitio A al sitio P, al parecer, por su unión a los dos residuos de guanina (G) situados en una región del bucle 28S de la subunidad mayor 60S, asociados con la hidrólisis de *GTP* y la interacción de los ribosomas con el factor de elongación *EF-2* (Franklin & Snow, 2005). Adicionalmente, se ha determinado que la *CHX* permite un ciclo completo de translocación antes de proceder a interrumpir la elongación y se ha especulado que este antibiótico se une a un aminoacil-*tRNA* desacilado confinado en el sitio E, para bloquear la traducción (figura 3). Sin embargo, el sitio de unión exacto de la *CHX* sigue siendo desconocido, además no es claro si ésta interactúa directamente con el *EF-2* o si la inhibición de la translocación resulta de un efecto indirecto (Schneider Poetsch *et al.*, 2010).

A través de los estudios realizados con los *PS/Is*, se ha encontrado que la administración intraperitoneal (i.p.) de 2,8 mg/kg de *CHX* no produce amnesia en roedores que han sido sometidos a estímulos estresores fuertes, como choques eléctricos; es posible que cuando se aumenta el estímulo aversivo al que es

⁶ El aminoacil-*tRNA* es un ácido ribonucleico de transferencia (*tRNA*) que se encarga de transportar aminoácidos al ribosoma para incorporarlos en la síntesis de nuevas proteínas.

sometido el animal, la inhibición de la síntesis de proteínas no afecte la consolidación de la memoria, o que este proceso se complete antes de que el *PSI* ejerza su efecto perturbador (Díaz Trujillo *et al.*, 2009).

Sin embargo, una serie de investigaciones han demostrado que la administración sistémica de *CHX* afecta la consolidación de la memoria a largo plazo en otras tareas de aprendizaje. En 1998, Mendonça & Guimarães propusieron que la administración intraventricular (i.c.v.) de *CHX* en el hipocampo dorsal de ratas machos Wistar, podría prevenir la reducción en la exploración del laberinto en cruz elevado (LCE), después de haberles inducido estrés; sugiriendo que la inhibición de la síntesis de nuevas proteínas estaría atenuando el comportamiento derivado de dicha emoción.

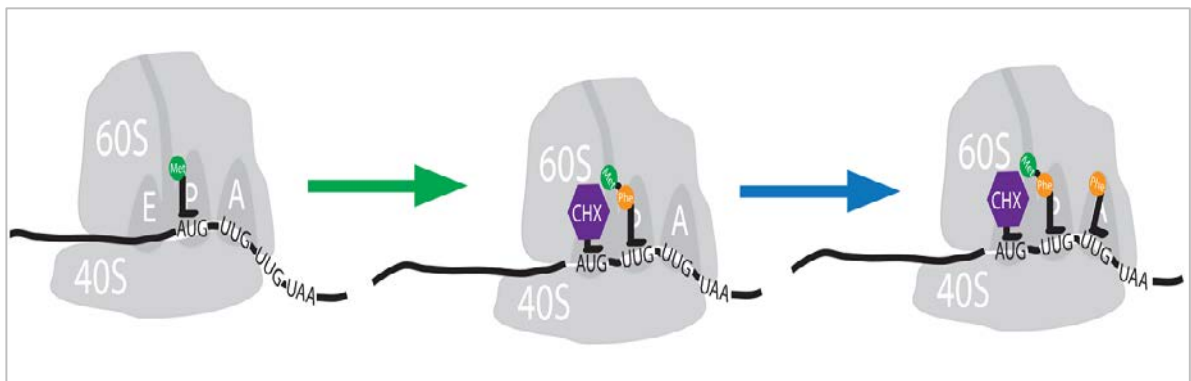


Figura 3. Modelo del mecanismo por el cual la cicloheximida inhibe la elongación de la traducción en la síntesis de proteínas. La CHX se ubica en el sitio E interfiriendo la translocación mediante la distorsión de la unión del tRNA desacilado al sitio E. Tomado de Schneider Poetsch *et al.*, 2010

También se han evaluado los efectos de los *PSIs* sobre modelos que implican el aprendizaje locomotor y se ha encontrado que dosis i.p. de 0,5 mg/kg de *CHX* (en 0,5 mL de solución salina) suministradas 1 hora antes a las ratas entrenadas en un rotarod⁷, afectan la consolidación de la memoria a largo plazo asociada con

⁷ El rotarod es un modelo de resistencia motora que consta de un cilindro ubicado de forma horizontal, al que se aplica una determinada fuerza giratoria. La prueba consiste en que los

dicha tarea, más no interfiere con la adquisición de la información y la memoria a corto plazo. Esto es consistente con los resultados publicados en tareas de memoria espacial, memoria de trabajo, entre otras; y contrasta con la idea que los cambios a corto plazo son mediados por la maquinaria sináptica pre existente, mientras que las modificaciones a largo plazo requieren adaptaciones estructurales a través de la síntesis de nuevas proteínas (Luft *et al.*, 2004). Además se reitera que dosis i.p. de 0,5 a 0,6 mg/kg de *CHX* no son tóxicas y reducen la síntesis de proteínas en el cerebro alrededor de un 75% entre los 20 minutos de su administración; aunque a las 12 horas ya se ha restaurado en su mayor parte la capacidad de síntesis, su normalización es completa luego de las 48 horas (Luft *et al.*, 2004). Por otra parte, el uso de dosis más altas de *CHX* vía i.p. como 1 mg/kg, en ratas sometidas a tareas espaciales en el laberinto de agua⁸, demuestran un profundo deterioro en la retención de la información respecto al control salina y a las ratas que recibieron dosis de 0,5 mg/kg del inhibidor de síntesis de proteínas (McGauran *et al.*, 2008). La dosis más alta (1mg/kg) de *CHX* no se considera tóxica ya que no se reporta un deterioro significativo a nivel locomotor o motivacional. Adicionalmente, al bloquear la síntesis de proteínas con *CHX* vía i.p., la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*) y la quinasa reguladora de la señal extracelular (*ERK*) en el hipocampo se vería reducida a través de la inhibición de la vía de proteínas quinasas activadas por mitógenos (*MAP-K*), lo que podría afectar la potenciación a largo plazo (*LTP*) y por ende, la retención de la tarea espacial (McGauran *et al.*, 2008).

roedores dispuestos sobre el cilindro en movimiento, deben coordinar sus movimientos para evitar caerse de él.

⁸ El laberinto de agua es uno de los modelos más empleados en el estudio de la memoria espacial en roedores, donde los animales tienen que nadar para localizar una plataforma oculta.

1.2. Modelos animales en el estudio de la memoria y las emociones

Cambios similares en los indicadores fisiológicos y en las respuestas comportamentales al estímulo del miedo en humanos y otros animales, sugiere la posibilidad de homologar dichas respuestas defensivas motivadas etológicamente⁹ (Bailey & Crawley, 2009).

Los roedores como *Rattus norvegicus*, además de tener una correspondencia más o menos del 90% con el genoma humano (*Nature*, 2004), son animales que ofrecen una gran variedad de comportamientos, que dentro de su repertorio natural, son homologables con los síntomas de ansiedad generalizada en los humanos. Sin embargo, es necesario aclarar que si bien, existe paralelismo entre los síntomas de ansiedad de humanos y ratas, no se sabe si dichos roedores experimentan esta emoción de la misma forma que el hombre (Finn, Purdy, & Koob, 2004).

Basándose en la premisa de que los mecanismos fisiológicos asociados al miedo en los roedores, se pueden equiparar a mecanismos similares en los seres humanos, se proporciona un aparente grado de validez para utilizar modelos animales de comportamiento que conduzcan a un mayor conocimiento de los trastornos de la salud mental. Estos modelos fundamentados en el miedo y la ansiedad, permiten el análisis de las relaciones cualitativas, cuantitativas y temporales de los estímulos aversivos con los cambios en los comportamientos emitidos que están relacionados con la evitación, la fuga o los estados de protección y/o defensa del individuo y/o de la especie (Conde, Becerra & Botelho, 2001; Bailey & Crawley, 2009).

⁹ Entiéndase “etología” como la rama de la ciencia que estudia la conducta y el comportamiento de los animales en su entorno.

1.2.1. Laberinto en cruz elevado (LCE)

Uno de los modelos animales de ansiedad más validado desde el punto de vista comportamental, fisiológico y farmacológico es el laberinto en cruz elevado (LCE), que está basado en la evitación natural de los roedores por los espacios abiertos y elevados. Por lo tanto la prueba establece un conflicto para el roedor entre su inclinación a explorar un ambiente novedoso y su tendencia a evitar las propiedades aversivas de un entorno abierto (Conde, Becerra & Botelho, 2001; Carobrez & Bertoglio, 2005).

El LCE es un aparato que consiste de dos brazos abiertos (BA) y dos brazos cerrados (BC) horizontales, del mismo tamaño, ubicados perpendicularmente. Los cuatro brazos se extienden desde una plataforma central (5x5 cm aproximadamente), formando una cruz que está elevada alrededor de 50 cm sobre el suelo (figura 4). Cada uno de los BA posee un pequeño borde de acrílico que puede ser percibido por el roedor sin que éste se caiga del brazo; mientras que los BC poseen paredes altas que pueden ser opacas (Finn, Purdy & Koob, 2004)

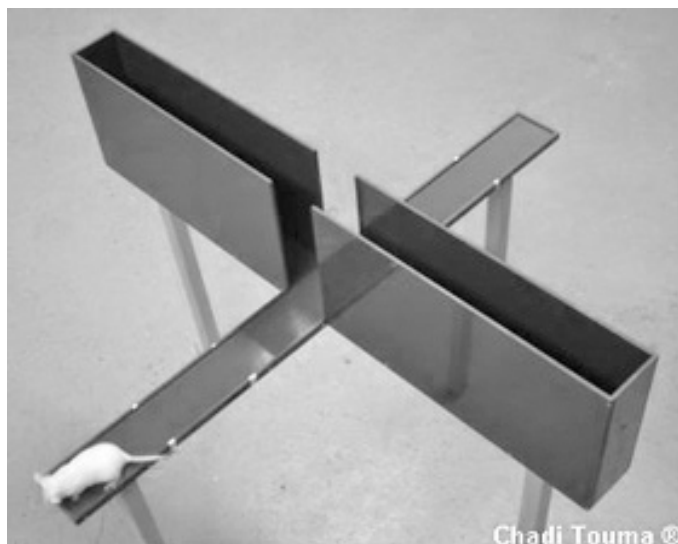


Figura 4. Laberinto en cruz elevado (LCE). Tomado de *Max Plank Institute of Psychiatry*

Por lo general, el animal se coloca en la plataforma central y se le permite explorar libremente durante cinco minutos. El análisis al inicio y al final de la prueba puede mostrar un comportamiento completamente diferente, lo que implicaría que se está generando un proceso de aprendizaje durante la sesión (Carobrez & Bertoglio, 2005). De esta prueba, se miden el número de entradas a los BA y BC, y la cantidad de tiempo que el roedor permanece en cada uno de ellos, considerando la entrada en el brazo cuando las cuatro patas del animal están dentro de él. Si la sesión en el laberinto es registrada en video se pueden evaluar otros comportamientos específicos de la exploración como: el *rearing*, que consiste en el levantamiento del cuerpo del roedor apoyado en sus patas traseras; el *head-dipping*, que ocurre cuando la rata agacha la cabeza y la extiende hacia afuera de los BA con el fin de explorar la altura a la que se encuentra; y el *risk assesment* o valoración de riesgo, en el cual la rata ubicada en un BC, estira su cuerpo y dispone su cabeza en la plataforma central o en la entrada de un BA para explorar las zonas aversivas. Sin embargo, el indicador de ansiedad más reportado para las pruebas en el LCE, es el porcentaje de las entradas y del tiempo de permanencia en los BA y BC (Finn, Purdy & Koob, 2004; Célis, 2008).

Normalmente los roedores prefieren permanecer en los BC del LCE, ya que estos en su estado natural eligen estar cerca de superficies verticales, rincones y lugares con poca iluminación que les confieren mayor protección. No obstante, diversos estudios han indagado que fármacos ansiolíticos como las benzodiazepinas suelen aumentar la proporción de entradas y tiempo de permanencia de los roedores en los BA del LCE, mientras que los compuestos ansiogénicos disminuyen dicho porcentaje (Finn, Purdy & Koob, 2004).

1.2.2. Fenómeno *One Trial Tolerance* (OTT)

Los roedores que se han evaluado en una primera sesión de 5 minutos en el LCE luego de administrarles fármacos ansiolíticos, aumentan la exploración de los BA.

Sin embargo, si estos animales se exponen nuevamente a la prueba (sesión 2), ya no responden al efecto ansiolítico. Este fenómeno se observó por primera vez con la benzodiazepina clordiazepóxido y se denominó *one trial tolerance (OTT)* o tolerancia al primer ensayo (Carobrez & Bertoglio, 2005). Posteriormente, se demostró que los fármacos como las benzodiazepinas, el etanol y los barbituratos que se unen al complejo de receptores ionotrópicos del ácido gamma aminobutírico (GABA_A), fallan en la producción del efecto ansiolítico sobre los roedores sometidos a tales experimentos (Bertoglio *et al.*, 2005). También se ha establecido que el *OTT* no depende del tratamiento farmacológico durante la primera sesión en el LCE, como tampoco del material que se construye el laberinto (File *et al.*, 1993; Calzavara *et al.*, 2005). Además, se ha reportado que el fenómeno ocurre entre sesiones con un rango de intervalos que va desde 24 horas hasta 2 semanas, y que el aumento a 10 minutos en la duración de la primera exposición en el laberinto no modifica la falta de eficacia de las benzodiazepinas durante los 5 minutos de re-exposición (Calzavara *et al.*, 2005).

Para poder explicar el fenómeno *OTT* se han propuesto diversas hipótesis, incluyendo la habituación locomotora, un estado alterado de los sitios de unión y/o los complejos del receptor implicado, una sensibilización al miedo y/o un cambio cualitativo en la naturaleza de la respuesta aversiva provocada entre las pruebas, contra lo cual los fármacos ansiolíticos no son eficientes (Bertoglio *et al.*, 2005). Alternativamente, se ha sugerido que el conocimiento previo del laberinto podría reducir la exploración de las zonas naturalmente aversivas, disminuyendo el conflicto de aproximación-evitación en la segunda sesión, lo que podría indicar que hay algún tipo de aprendizaje asociado con la evitación de los BA, por lo cual el comportamiento en la re-exposición es diferente, independiente del tratamiento farmacológico (Calzavara *et al.*, 2005).

Con relación a la prevención del fenómeno *OTT*, se ha demostrado que el efecto ansiolítico de los fármacos sobre las ratas en la segunda sesión, continúa cuando:

1) una nueva situación de conflicto motivacional se introduce en la prueba; 2) el tiempo de la sesión se limita a 1 minuto; y 3) antes de la primera sesión, se administran dosis de escopolamina (bloqueadora de receptores muscarínicos) que deterioran el aprendizaje (Carobrez & Bertoglio, 2005). No obstante, los dos últimos puntos difieren de los resultados obtenidos en otros experimentos con ratones, donde el *OTT* no es abolido por una exposición previa de 1 minuto y la administración de escopolamina no interrumpe el aprendizaje asociado a la evitación de los BA en el LCE, ni revierte el fenómeno *OTT* en la segunda sesión (Calzavara *et al.*, 2005).

Los controvertidos resultados que se presentan en las diversas investigaciones resultan ser muy intrigantes, tomando en cuenta que las hipótesis actualmente planteadas para explicar el fenómeno *OTT*, se basan en que la re-exposición al laberinto podría conducir a recuperar la información que se obtuvo en la primera sesión. El desarrollo de un estado fóbico, la ausencia de una situación de conflicto y la habituación en el comportamiento exploratorio son factores que sugieren la importancia del aprendizaje que se genera en el primer ensayo para la producción del fenómeno *OTT*. Sin embargo, no se puede descartar que la modulación de otros procesos de memoria, puedan estar involucrados (Calzavara *et al.*, 2005).

1.3. Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE)

Las proteínas constituyen parte importante de la supervivencia de un organismo, ya que se encargan de proporcionar un marco funcional para las células, participan en su estructura, en la producción de energía y permiten su comunicación y reproducción. A diferencia del genoma, el proteoma es susceptible a cambios debido a las condiciones ambientales y juega un papel clave en las vías de señales del sistema inmune y el metabolismo intracelular (Sahin, 2006).

Los términos “proteómica” y “proteoma” fueron acuñados por Wilkins y Williams en 1994, para describir la colección completa de proteínas codificadas por el genoma en el organismo humano (Sahin, 2006). De allí, la Proteómica surge como una nueva disciplina apropiada para elucidar las modificaciones post traduccionales, los niveles de expresión y las interacciones de cientos de proteínas simultáneamente (Vercauteren *et al.*, 2004); conduciendo a avanzar en el conocimiento de nuevas dianas farmacológicas, el desarrollo de mejores diagnósticos y la correlación de las vías biológicas y los mecanismos moleculares de una enfermedad (Speicher, 2004).

El estudio de un proteoma comienza con la separación, la visualización y el análisis de mezclas complejas que contienen varios cientos de proteínas aisladas de células o tejidos. La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (*2D-PAGE*) sigue siendo la técnica más favorable para la separación de mezclas de proteínas, debido a su alta resolución y reproducibilidad (Sahin, 2006).

En la electroforesis bidimensional, las proteínas son separadas con base en su carga eléctrica y su peso molecular (Sahin, 2006). Para ello, es necesario aplicar un campo eléctrico que promueva el desplazamiento de las macromoléculas a través de una matriz porosa que suele ser de poliacrilamida (Ahmed, 2005). Este movimiento de las proteínas depende del voltaje aplicado, conforme a la Ley de Ohm¹⁰, y requiere del control de la temperatura debida a la diferencia de potencial en el sistema¹¹.

Para el desarrollo de la electroforesis, el voltaje y la corriente son suministrados por una fuente de poder de corriente directa, que se encarga de mantener un parámetro eléctrico constante (corriente, voltaje o potencia), mientras que los

¹⁰ $V=IR$, donde V es el voltaje, I la corriente y R la resistencia.

¹¹ La potencia en el circuito se representa como $P=VI=I^2R=\frac{V^2}{R}$

electrodos, la *buffer*¹² de corrida y el gel actúan como resistencias variables. Al realizar la corrida en un sistema continuo, la resistencia disminuye resultando en una ganancia de calor debida a un voltaje constante (Ahmed, 2005).

Cuando se desean separar y detectar las proteínas mediante electroforesis bidimensional, la muestra debe pasar por una serie de etapas:

- Preparación de la muestra
- Cuantificación de las proteínas
- Isoelectroenfoque (*IEF*)
- Equilibración
- Separación en gel de poliacrilamida
- Tinción
- Análisis de imágenes

1.3.1. Preparación de la muestra

Inicialmente, la muestra debe ser homogenizada en una solución tampón y luego se somete a diferentes etapas de fraccionamiento celular con el fin de eliminar las sales, los lípidos, los polisacáridos y los ácidos nucleicos que puedan interferir en la separación de las proteínas de membrana, que se obtienen principalmente por este método (Sahin, 2006; Witzmann, 2005).

La lisis celular y la solubilización de las proteínas se logran mediante el uso de agentes caotrópicos, detergentes, agentes reductores, *buffers* y anfolitos. Los compuestos elegidos no deben modificar las proteínas ni aumentar la fuerza iónica de la solución (Posch, 2008; Witzmann, 2005). La urea es el agente caotrópico más utilizado en la preparación de muestras para *2D-PAGE*, acompañado por la

¹² Una *buffer* o tampón, es una solución reguladora de pH formada por la mezcla de concentraciones relativamente elevadas de un ácido débil y su base conjugada.

tiourea que puede ayudar a solubilizar proteínas hidrofóbicas. Estos dos compuestos interrumpen los puentes de hidrógeno que pueden causar agregación o formación de estructuras secundarias que afecten la movilidad de las proteínas. Se pueden utilizar mezclas de tiourea 2 M y urea 5-8 M cuando se requieren fuertes condiciones caótropicas (Molloy *et al.*, 2000; Görg & Weiss, 2004; Leimgruber, 2005). Asimismo, agentes reductores como el ditioneitol (DTT) son utilizados en concentraciones hasta de 100 mM, para romper los puentes disulfuro en las proteínas (figura 5) (Posch, 2008; Leimgruber, 2005).

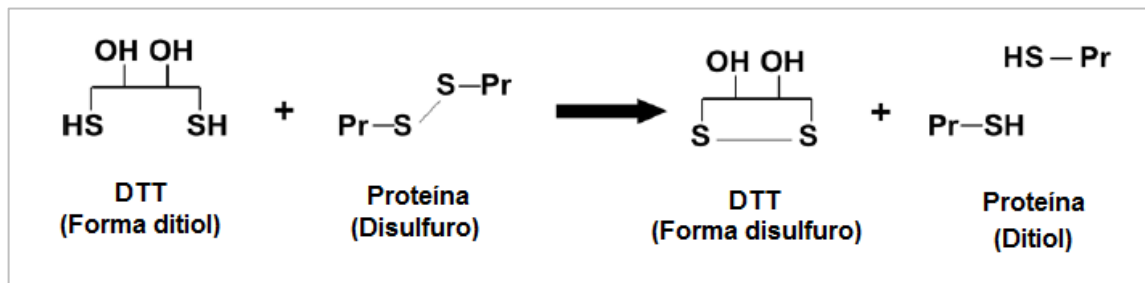


Figura 5. Rompimiento de los enlaces disulfuro de las proteínas por el ditioneitol (DTT). Tomado de Posch, 2008.

También se agregan detergentes no iónicos o zwitteriónicos que rompen las interacciones hidrofóbicas en el complejo proteico y aumentan la solubilidad de las proteínas en su punto isoeléctrico. Entre los más utilizados, porque no interfiere con el proceso posterior de isoelectroenfoque, se halla el compuesto zwitteriónico 3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato más conocido como *CHAPS*, que en concentraciones de 2-4% (p/v), junto con los agentes caotrópicos, facilita la solubilidad de proteínas de membrana (Sahin, 2006; Görg & Weiss, 2004; Leimgruber, 2005).

Ya que en la etapa inicial del isoelectroenfoque se eliminan sales presentes en la muestra, se requiere de anfólitos en una concentración menor a 40 mM que eviten la precipitación de algunas proteínas que le deben su solubilidad a las sales (Görg & Weiss, 2004). Por otro lado, dichos anfólitos y el compuesto Tris base se

encargan de mantener el pH amortiguado para prevenir las modificaciones post traduccionales de las proteínas que se han extraído del tejido. Igualmente, se adicionan inhibidores de proteasas como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*PMSF*, sigla en inglés) y el ácido etilendiaminotetraacético (*EDTA*) en concentraciones de 1mM (Henningesen *et al.*, 2002), que impiden la degradación de las proteínas por la acción de dichas enzimas (Sahin, 2006), (Posch, 2008).

Finalmente, las proteínas solubles se separan de otros orgánulos teniendo en cuenta parámetros como la densidad, siendo la centrifugación una de las herramientas más empleadas para este propósito. Además, se pueden utilizar solventes orgánicos como la acetona para disolver los lípidos que aún estén presentes en la muestra y que pueden generar interferencias en los análisis posteriores (Carboni *et al.*, 2002).

1.3.2. Cuantificación de las proteínas presentes en la muestra

El ensayo de Bradford es un método ampliamente utilizado para la cuantificación de proteínas, debido a que es simple y rápido. Para ello se requiere el uso del derivado dimetilado G-250 (figura 6) del azul de *Coomassie* R-250 (*Coomassie Brilliant Blue*), que reacciona principalmente con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos.

Se considera que el colorante interacciona electrostáticamente con la proteína mediante sus grupos de ácido sulfónico. Este mecanismo de unión del azul de *Coomassie*, puede explicarse por la existencia de tres especies absorbentes que se generan por la pérdida sucesiva de protones: una catiónica de color rojo ($A_{\text{máx}}$ 470 nm), una neutra de color verde ($A_{\text{máx}}$ 650 nm) y una aniónica de color azul ($A_{\text{máx}}$ 595 nm) (figura 6). De tal manera que, cuando el azul de *Coomassie* se une a la proteína, cambia a su forma desprotonada y produce la coloración azul. La

denominación “G” para el azul de *Coomassie* implica que se trata de la especie absorbente de color verde (*green*) (Mielke & Krishnan, 2005).

El reactivo de Bradford que forma complejos con las proteínas, se compone por concentraciones finales de 0,01% (p/v) de azul de *Coomassie* G-250, 4,7% (v/v) de etanol y 8,5% (v/v) de ácido o-fosfórico. El desarrollo del ensayo se realiza a través de una curva estándar utilizando patrones de albúmina de suero bovino (BSA) de 0,1 a 1 mg/mL, donde a cada 100 μ L de muestra se adicionan 5 mL del reactivo de Bradford, y su absorbancia es medida entre los 5 minutos y 1 hora (como máximo) después de realizar la mezcla (Bradford, 1976; Mielke & Krishnan, 2005).

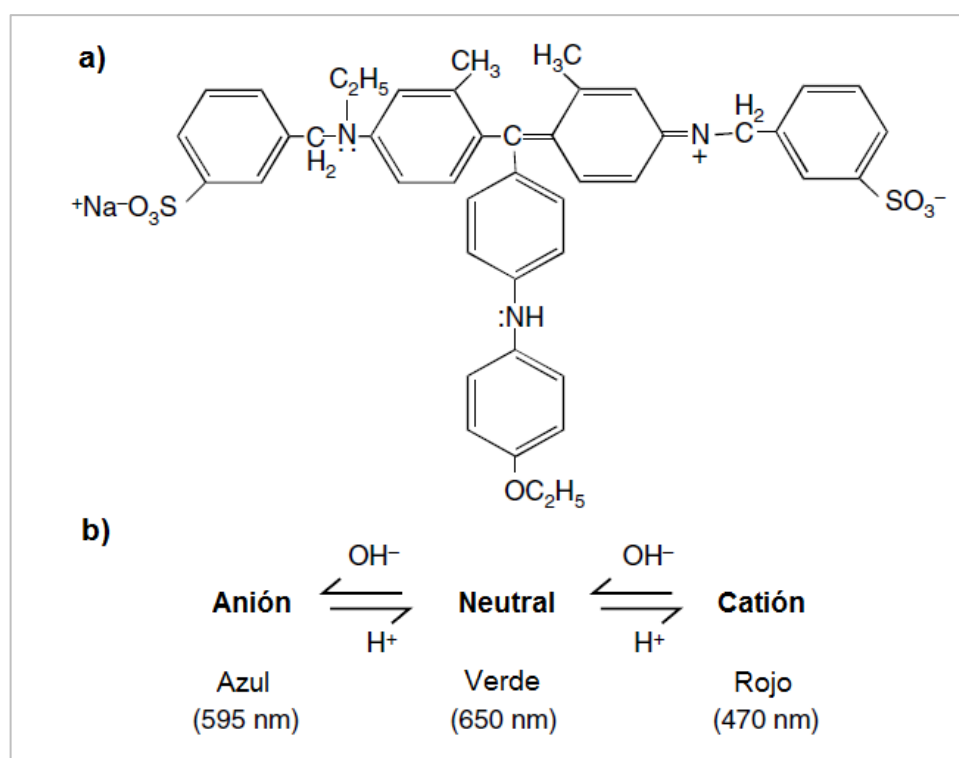


Figura 6. Azul de *Coomassie* G-250 a) estructura química; b) especies absorbentes del colorante. Tomado y modificado de Mielke & Krishnan, 2005.

Es importante tener en cuenta que el ensayo de Bradford puede presentar interferencias con concentraciones altas de detergentes como el dodecil sulfato de sodio (*SDS*) o el tritón X-100 (Bradford, 1976), (Mielke & Krishnan, 2005).

1.3.3. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) es un método electroforético en el cual las moléculas anfóteras son separadas por su migración a través de un gradiente de pH. La carga neta de una proteína es la suma algebraica de todas sus cargas positivas y negativas, a pH fisiológico los residuos de lisina, arginina e histidina están cargados positivamente, mientras que los de ácido aspártico y glutámico tienen cargas negativas. El pH en el cual la proteína posee una carga neta igual a cero (total de cargas positivas igual al total de cargas negativas) corresponde a su punto isoeléctrico (pI) (Ahmed, 2005).

La proteína tiene carga positiva si está por debajo de su pI, y carga negativa si está por encima de él. Cuando la proteína se coloca en un medio con pH variable y se expone a un campo eléctrico comienza a migrar hacia el electrodo de carga contraria. Durante el movimiento a través del gradiente de pH, la proteína puede ganar o perder protones, de tal manera que su carga neta y su movilidad disminuyen, hasta detenerse en su pI. Las proteínas presentan variados puntos isoeléctricos, usualmente en un rango de pH de 3-12, comprendidos la mayoría entre el intervalo de pH 4-7 (Ahmed, 2005).

Se han creado tiras de gel de poliacrilamida inmovilizado (*IPG strips*, en inglés) con gradientes de pH. Su estructura general es $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$, donde R es un grupo carboxilo (-COOH) o un grupo amino terciario, por ejemplo $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$. Las tiras de 17 cm y los geles en formato grande ofrecen un área mayor que permite resolver las manchas de proteína, pero requieren de más tiempo en su corrida. Por esta razón, se prefiere el uso de sistemas pequeños para optimizar

rápidamente los métodos antes de pasar al formato grande, en el que se pueden evaluar e identificar las proteínas de muestras complejas con mayor facilidad (Sahin, 2006).

Antes del IEF la tira debe rehidratarse, preferiblemente con la muestra, de tal forma que ésta se absorba y se distribuya a lo largo del gel. Para tal fin, la tira es incubada con la muestra al menos durante 11 horas previas a la corrida de la primera dimensión, aplicando un bajo voltaje (rehidratación activa) o simplemente permitiendo que las proteínas sean absorbidas por el gel de la tira sin una fuerza adicional (rehidratación pasiva) (Sanchez, Hochstrasser, & Rabilloud, 1999).

Ya que el IEF usualmente se corre en un sistema desnaturalizante, la incubación se realiza en una mezcla de muestra y solución *buffer* de rehidratación compuesta por agentes caotrópicos (urea, tiourea), agentes reductores (DTT) y detergentes (*CHAPS*). La cantidad de proteína y de *buffer* de rehidratación que se adicionan a la tira, dependen de su tamaño y del método de tinción que se use en la etapa final. En formatos grandes se utilizan cantidades de proteína relativamente altas entre ~0,3-1,5 mg, en un volumen total de mezcla alrededor de los 300 μ L (Garbis, Lubec, & Fountoulakis, 2005; Sahin, 2006).

Cuando se aplica un campo eléctrico sobre las tiras *IPG* al inicio del IEF, la corriente será relativamente alta debido al número de cargas presentes. A medida que las proteínas y los anfólitos avanzan hacia su pI, la corriente disminuye gradualmente debido a la reducción de las cargas netas (Garfin, 1995). El equipo de isoelectroenfoque PROTEAN IEF Cell de Bio-Rad se ha diseñado para proporcionar una adecuada refrigeración, de tal manera que se puedan aplicar altos voltajes. La corriente en cada tira se limita a 50 μ A con la intención de reducir las reacciones de carbamitación de las proteínas en muestras tamponadas con urea. Adicionalmente, para que el enfoque sea consistente y reproducible se requiere que el tiempo integral de voltaje (voltios-hora) se mantenga constante en

las diferentes etapas de la corrida. Para el caso de tiras de 17 cm las corridas pueden ser de 50000 volt-hora o 85600 volt-hora, ya que este voltaje aumenta según la complejidad de la muestra (Bio-Rad *online*, Protean IEF Cell, 2012).

1.3.4. Equilibración

Después de la etapa de IEF, las tiras de gel son equilibradas antes de la segunda dimensión. El proceso de equilibración es necesario para asegurar que las proteínas sean cubiertas por el dodecil sulfato de sodio (*SDS*) y que las cisteínas sean reducidas y alquiladas. Con este fin, las tiras se colocan en una solución *buffer* con Tris pH 8,8 en presencia de *SDS*, DTT, yodoacetamida, urea y glicerol. Inicialmente, El DTT cumple con su papel reductor y luego la yodoacetamida se encarga de alquilar los grupos tioles presentes en el medio, para evitar su migración a la segunda dimensión. Asimismo la urea, el Tris, el *SDS* y el glicerol permiten que las proteínas continúen solubilizadas en el interior del gel y no hayan pérdidas por difusión (Sahin, 2006).

1.3.5. Gel de poliacrilamida desnaturalizante (*SDS-PAGE*)

Luego de la separación por su *pI*, las proteínas son separadas perpendicularmente en un gel de poliacrilamida de acuerdo a su peso molecular (PM). Este gel se forma por la copolimerización del monómero de acrilamida, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$, y un comonómero entrecruzado, *N,N'*-metilenbisacrilamida, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ (bisacrilamida) (figura 7) (Ahmed, 2005).

El mecanismo de formación del gel de poliacrilamida, es la polimerización por adición de vinilos que está catalizada por un sistema de generación de radicales libres, compuesto de persulfato de amonio y *N,N,N',N'*-tetrametilendiamina (TEMED). El TEMED cataliza la descomposición del persulfato de amonio para

producir un radical libre $\text{SO}_4^{\cdot-}$, que activa el monómero de acrilamida. Este monómero activado reacciona con uno desactivado, para iniciar la elongación de la cadena del polímero, y así sucesivamente. Durante la elongación de la cadena, la bisacrilamida se entrecruza al azar (figura 7) generando circuitos cerrados que resultan en un complejo polímero reticulado con una porosidad característica que depende de las condiciones de polimerización y las concentraciones del monómero (Ahmed, 2005).

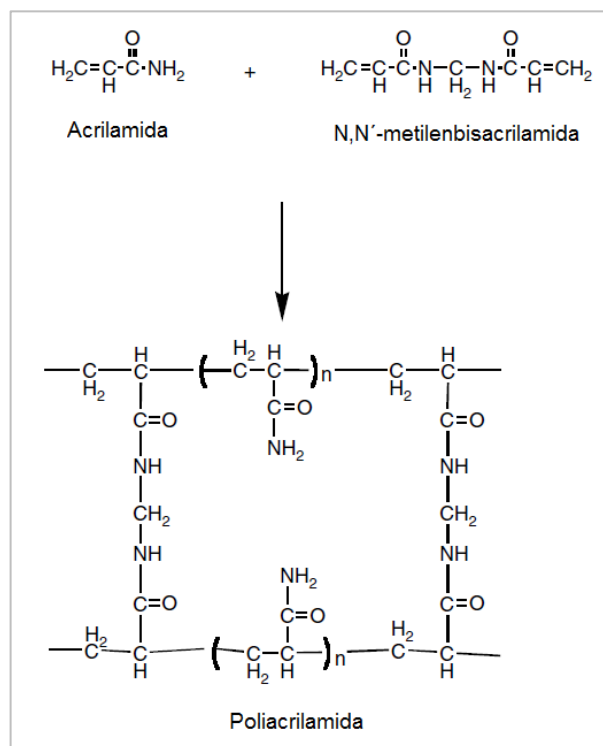


Figura 7. Polimerización de la acrilamida. Tomada y modificada de Ahmed, 2005.

El tamaño efectivo del poro depende de la concentración de acrilamida en el gel, ya que entre más grande sea ésta, menor será su tamaño. Generalmente, los geles se caracterizan por dos parámetros: el total de monómeros, %T (1), y la relación de entrecruzamiento del monómero de acrilamida, %C (2) (Ahmed, 2005). Experimentalmente, suelen prepararse soluciones *stock* con 30%T y 2,7%C, y

geles con un porcentaje final 12%T que tienen una resolución de separación aproximadamente de 10 a 79 KDa (Ahmed, 2005).

$$\%T = \frac{\text{Acrilamida (g)} + \text{Bisacrilamida (g)}}{\text{Volumen (mL)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%C = \frac{\text{Bisacrilamida (g)}}{\text{Acrilamida (g)} + \text{Bisacrilamida (g)}} \times 100 \quad (2)$$

En la electroforesis con gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (*SDS-PAGE*), la muestra ha sido tratada previamente con dodecil sulfato de sodio (*SDS*). Este detergente aniónico desnaturiza las proteínas y se une fuertemente a sus estructuras abiertas; de tal forma que una molécula de *SDS* se une aproximadamente a dos residuos de amino ácidos, enmascarando la carga superficial de la proteína nativa y creando una carga neta negativa debida a sus grupos sulfato (figura 8) (Ahmed, 2005).

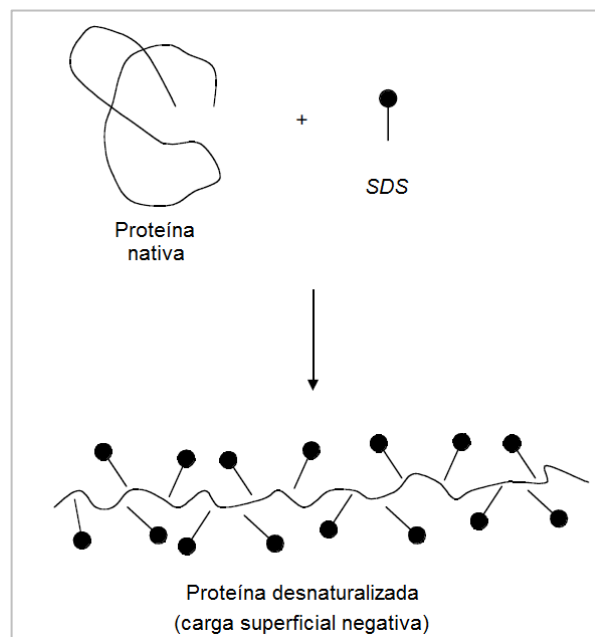


Figura 8. Desnaturización de las proteínas con dodecil sulfato de sodio (*SDS*). Tomada y modificada de Ahmed, 2005.

Esto conduce a que las proteínas se separen únicamente con base en su tamaño molecular, ya que tienen una relación carga/masa uniforme. La velocidad de migración de una proteína en la *SDS-PAGE* es inversamente proporcional al logaritmo de su PM; es así como las proteínas de bajo PM viajan más rápido a través del gel, mientras que las de PM alto se desplazan lentamente (Ahmed, 2005).

1.3.6. Tinción de las proteínas con azul de *Coomassie* G-250

Existe una variedad de colorantes que pueden ser utilizados para detectar las proteínas que fueron separadas por su pl y PM, en la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida, *SDS-PAGE*. Dentro de ellos se encuentra el colorante orgánico azul de *Coomassie* G-250, que a pesar de ser menos sensible que la tinción con plata y algunos compuestos fluorescentes, es ventajoso por su reproducibilidad, su compatibilidad con espectrometría de masas y la simplicidad de su protocolo de tinción (Dyballa & Metzger, 2009).

El azul de *Coomassie* G-250 es un compuesto trifenilmetano disulfonado que se une principalmente, mediante interacciones electrostáticas, a los residuos de amino ácidos básicos en su forma protonada, pero también puede establecer interacciones hidrofóbicas con los residuos hidrófobos y las micelas de sodio del *SDS* (Smejkal, 2006). El estudio de las propiedades coloidales de este colorante, permitió determinar que sus moléculas forman suspensiones constituidas de grandes micelas, que penetran fácilmente la matriz del gel de poliacrilamida y que pueden ser estabilizadas por iones H^+ y grupos SO_3^- alineados en su superficie (Smejkal, 2006; Dyballa & Metzger, 2009). El azul de *Coomassie* coloidal en medio ácido, tiene una sensibilidad entre 8 y 10 ng para detectar las bandas de proteínas en los geles obtenidos por la electroforesis bidimensional *SDS-PAGE* (Sahin, 2006; Dyballa & Metzger, 2009).

1.3.7. Análisis de imágenes

Luego de teñir el gel, se observan manchas con diferentes posiciones dadas por coordenadas x,y , que corresponden a las proteínas detectadas en la muestra o tejido que es objeto de estudio.

La imagen del proteoma representada en el gel puede ser analizada mediante el desarrollo de los siguientes pasos (Sahin, 2006):

- Los datos son adquiridos a través de un proceso de digitalización, donde la imagen analógica del gel se convierte en una imagen digital con la ayuda de técnicas informáticas.
- La imagen digital es procesada de tal forma que se detecte la ubicación exacta de cada mancha y se puedan determinar su forma e intensidad (con base en el nivel de pixeles), ya que estos parámetros están relacionados con la abundancia de las proteínas.
- Cuando se tienen diferentes condiciones experimentales, se realiza un análisis comparativo en un juego de geles, que conduce a la identificación de cambios y semejanzas en las proteínas expresadas según la intensidad y el área de las manchas. Por lo tanto se puede obtener información sobre los cambios cualitativos y cuantitativos de un proteoma a otro, a través de herramientas estadísticas multivariadas.
- La interpretación y posterior presentación de los datos requiere que a cada mancha se le asignen su pI y PM . Para tal fin, se utilizan marcadores de proteínas con valores de pI y PM conocidos, que son corridos bajo las mismas condiciones que las muestras y luego son cotejados con los proteomas de interés. A través de software diseñados para este tipo de análisis se asignan los valores aproximados de pI y PM a las manchas, con base en las coordenadas x,y de las proteínas usadas como marcadores.

- Finalmente, los datos obtenidos por el análisis de imágenes pueden ser comparados con la información disponible en bases de datos de proteínas como ExPASy.org.

Posterior al análisis de imágenes, se pueden aplicar otras herramientas de proteómica como la cromatografía y la espectrometría de masas que permiten la identificación y caracterización de las proteínas separadas por electroforesis bidimensional.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Análisis comportamental

2.1.1. Animales

Se emplearon 24 ratas Wistar machos de 8-10 semanas de edad con pesos comprendidos entre 250-300g, provenientes del bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Éstas se distribuyeron aleatoriamente y se colocaron en cuatro cajas vivero (50x30x15cm) en grupos de 6 animales (figura 9), luego fueron llevadas a una sala de habituación bajo las mismas condiciones ambientales del bioterio: acceso libre a agua y alimento, temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $65\pm 2\%$ y ciclos de 12h de luz/oscuridad.

Las ratas se manipularon durante 2min por tres días consecutivos previos a los experimentos en el LCE, con el objetivo de crear un ambiente familiar con el investigador y los procedimientos posteriores.

Este trabajo de investigación se realizó de acuerdo con lo establecido por las leyes colombianas que rigen el uso de animales vivos en experimentos e investigación, Ley 84 de 1989 (Cap. IV, Art. 23-26) y la resolución 8430 de 1993 (Tit. IV, Art. 83-93).



Figura 9. Ratas Wistar dispuestas en su caja vivero

2.1.2. Grupos experimentales

Las ratas se dispusieron al azar en tres grupos: control sin exposición ($n=8$), control con exposición ($n=8$) y tratamiento con cicloheximida ($n=8$). En cada caja vivero se asignaron 2 animales por grupo experimental, que se identificaron con marcas distintivas en sus colas.

El control sin exposición (CONTROL) comprende aquellos animales que no se sometieron al LCE ni recibieron tratamiento farmacológico; el control con exposición (SS) corresponde a las ratas que se les administró solución salina 0.9% (p/v) por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 1ml/kg, 15min antes de la primera sesión en el LCE; mientras que en el tratamiento CHX las ratas fueron inyectadas vía i.p. con 1ml/kg de cicloheximida disuelta en solución salina 0.9% (p/v), siguiendo el mismo protocolo de exposición en el LCE del grupo SS.

Cabe resaltar que la manipulación de las ratas y los experimentos en el LCE se realizaron dentro de la fase de luz entre las 13:00 y 17:00 horas.

2.1.3. Laberinto en cruz elevado (LCE)

El LCE utilizado, es un dispositivo de madera elevado 50cm sobre el suelo, que posee cuatro brazos (50x12cm cada uno) dispuestos en forma de cruz: dos brazos cerrados (BC) con paredes laterales de 40cm de altura y dos brazos abiertos (BA) con un pequeño borde acrílico de 2cm de altura (figura 10). Éste se ubicó en el centro de un cuarto de experimentación iluminado por 300 lux en cuyo techo, justo encima del LCE, se hallaba una cámara de video a través de la cual se registró la actividad exploratoria que fue monitoreada y grabada en un computador dispuesto en una habitación contigua.

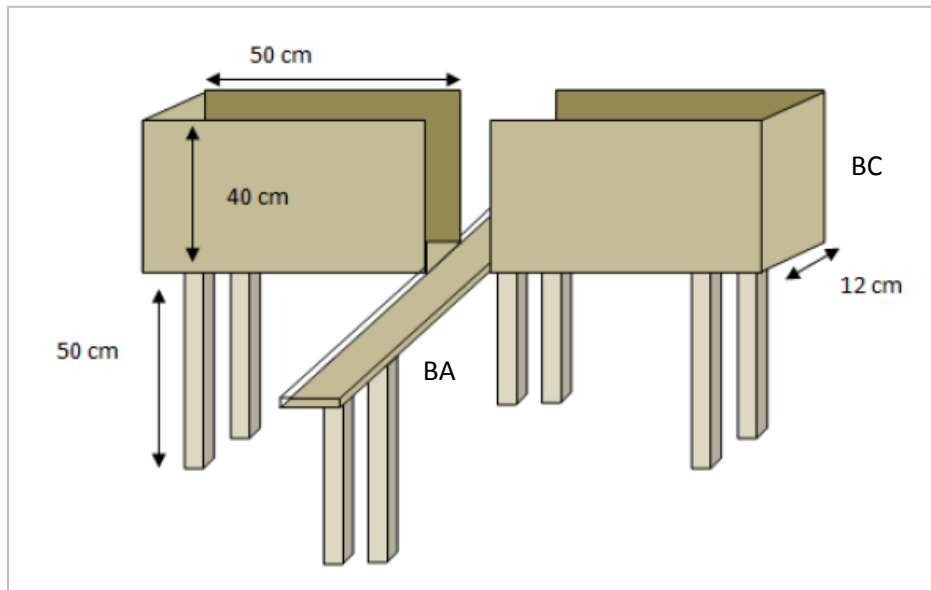


Figura 10. Diseño del laberinto en cruz elevado del Grupo de Investigación en Neurociencias y Comportamiento. Tomado de (Célis, 2008).

La limpieza del laberinto se realizó antes de la exposición de cada animal, usando una solución de etanol (10% v/v) y toallas de papel absorbente.

2.1.4. Procedimiento experimental en el LCE

Los individuos de los grupos SS y CHX fueron pesados antes de la primera sesión en el LCE, con el fin de determinar las dosis que debían inyectarse de los respectivos tratamientos. 15min después de administrar la dosis i.p., cada rata se dispuso en la plataforma central del LCE de cara a un BC, permitiéndole una exploración libre durante 5 minutos. Al cumplir este criterio el animal fue devuelto a su caja vivero. Pasadas 48h las ratas se expusieron nuevamente al laberinto, esta vez sin tratamiento farmacológico. Inmediatamente después de la segunda sesión, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se disecaron los hipocampos dorsales, derecho (HD) e izquierdo (HI), para su tratamiento y posterior análisis proteómico.

Las actividades que se realizaron para evaluar el comportamiento en el LCE se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Cronograma de actividades para el análisis comportamental en el LCE.

| DÍA | ACTIVIDAD |
|-----|---|
| 1 | Manipulación de las ratas en las cajas 1 y 2 |
| 2 | Manipulación de las ratas en las cajas 1 y 2 Manipulación de las ratas en las cajas 3 y 4 |
| 3 | Manipulación de las ratas en las cajas 1 y 2 Manipulación de las ratas en las cajas 3 y 4 |
| 4 | Manipulación de las ratas en las cajas 3 y 4 Primera sesión LCE de las ratas SS y CHX en las cajas 1 y 2 |
| 5 | Primera sesión LCE de las ratas SS y CHX en las cajas 3 y 4 |
| 6 | Segunda sesión LCE de las ratas SS y CHX en las cajas 1 y 2 |
| 7 | Segunda sesión LCE de las ratas SS y CHX en las cajas 3 y 4 |

2.1.5. Análisis de los datos obtenidos en el LCE

El comportamiento de las ratas en el LCE está descrito por sus movimientos en las zonas de los BA y BC, los cuales están separados por una plataforma central, y distribuidos espacialmente como se muestra en la figura 11. El grupo de investigación en Neurociencias y comportamiento UIS-UPB, estableció este modelo para registrar la actividad exploratoria con base en variables espacio-temporales donde no se considera el principio de lateralidad espacial¹³, ya que la rata no tiene preferencia en la exploración de un brazo del mismo tipo respecto al otro ubicado al frente.

¹³ En el contexto espacial del LCE la lateralidad implicaría la preferencia por uno de los dos BC o uno de los dos BA. Por lo tanto, la ausencia de lateralidad no diferencia un BC del otro, ni entre los dos BA.

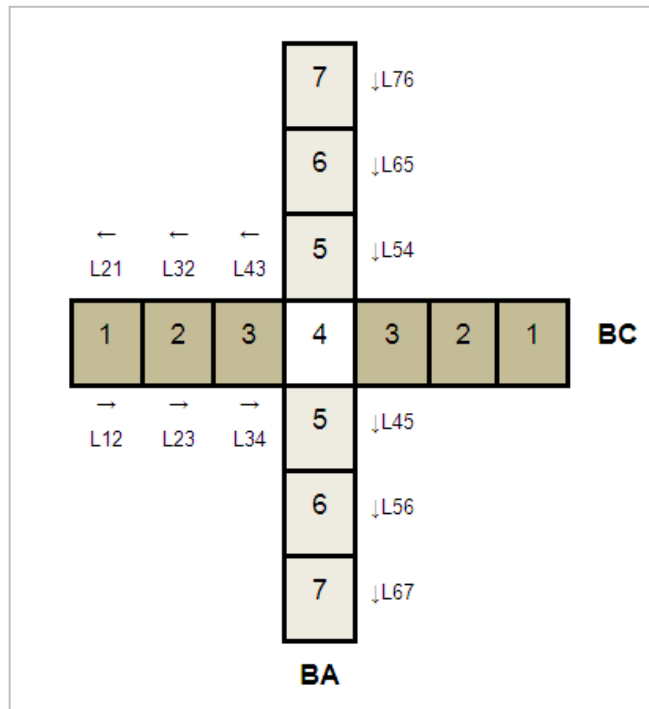


Figura 11. Distribución de los brazos en el LCE para el registro de datos con PROSTCOM en el grupo de investigación NYC UIS-UPB. Las zonas 1, 2 y 3 corresponden a los brazos cerrados (BC), las zonas 5, 6 y 7 a los brazos abiertos (BA), mientras que la zona 4 es la plataforma central del laberinto.

Teniendo en cuenta el modelo de la figura 11, las sesiones grabadas en el LCE para cada una de las ratas fueron analizadas con el programa computacional PROSTCOM (Conde, Costa & Tomaz, 2000), mediante el cual se registraron los tiempos de permanencia en cada una de las posiciones del laberinto, considerando como parámetro de movimiento de una zona a otra el cruce con las cuatro patas. Posteriormente, los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva y el paquete estadístico SIGMASTAT 3.5.

2.2. Análisis proteómico

2.2.1. Preparación de las muestras

2.2.1.1. Extracción y solubilización de proteínas

Cada tejido de hipocampo dorsal se dispuso en un tubo eppendorf de 1,5mL y fue homogenizado en 500µL de una solución *buffer* de lisis mediante agitación en vortex a 1200rpm durante 3h. Posteriormente, la muestra se centrifugó por 20min a 13000rpm y 4°C en una centrífuga THERMO IEC CL31R Multispeed. El sobrenadante se separó, se distribuyó en cantidades iguales en cuatro tubos eppendorf de 1,5mL y se almacenó con acetona a -20°C en una proporción 1:4 volumen a volumen, muestra/acetona, durante 12h mínimo. A continuación, esta mezcla fue centrifugada por 15min a 15000xg y 4°C, el sobrenadante se descartó, mientras que el sedimento o *pellet* se lavó 3 veces con 200µL de acetona a -20°C, centrifugando durante 5min a 10000xg y 4°C. Finalmente, cada *pellet* se resuspendió en 100µL de solución *buffer* de lisis usando agitación a 1200rpm durante 2h. Las muestras se almacenaron a -20°C para los experimentos posteriores.

2.2.1.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en cada muestra resuspendida de hipocampo dorsal (HD y HI) se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Para esto se preparó una curva de calibración utilizando patrones de albúmina de suero bovino (fraction V, MERCK) disueltos en solución *buffer* de lisis. Las absorbancias de los patrones y las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800 utilizando el programa UV-Probe 2.33 (ver anexo B). A continuación, se realizaron combinaciones de los extractos de

proteínas del mismo grupo experimental y tejido hipocámpico, de tal manera que se obtuvieron en total 12 combinaciones preparadas a partir de la mezcla de 500µg de proteína de cada muestra, según correspondiera, y se cuantificaron por el método de Bradford utilizando la curva de calibración determinada previamente (figura 12).

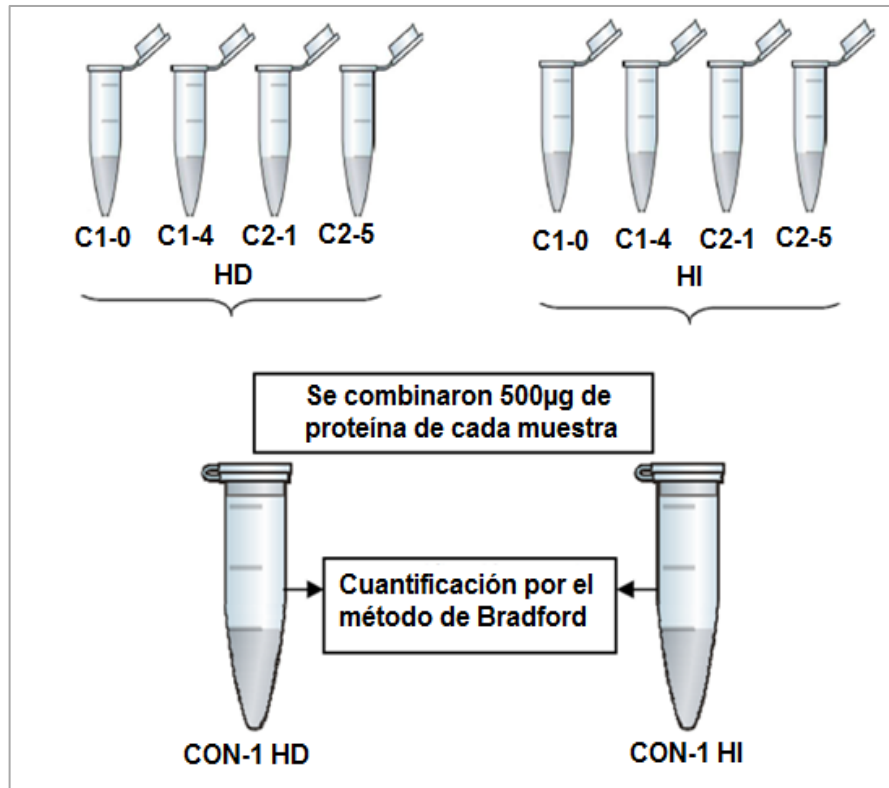


Figura 12. Obtención de las combinaciones de proteínas extraídas del hipocampo dorsal, derecho e izquierdo. Tomada y modificada de Hernández, 2010.

Finalmente, para cada hemisferio se asignaron 6 combinaciones de proteínas, 2 por cada grupo experimental (ver tabla 2).

Tabla 2. Muestras mezcladas para la formación de combinaciones de proteínas del hipocampo derecho (HD) y el hipocampo izquierdo (HI).

| GRUPO EXPERIMENTAL | MUESTRA | Combinación de proteínas |
|--------------------|-----------|--------------------------|
| | Caja-rata | |
| CONTROL | C1-0 | CON-1 HD |
| | C1-4 | |
| | C2-1 | CON-1 HI |
| | C2-5 | |
| | C3-0 | CON-2 HD |
| | C3-5 | |
| | C4-2 | CON-2 HI |
| | C4-3 | |
| SS | C1-2 | SS-1 HD |
| | C1-3 | |
| | C2-2 | SS-1 HI |
| | C2-3 | |
| | C3-2 | SS-2 HD |
| | C3-3 | |
| | C4-1 | SS-2 HI |
| | C4-4 | |
| CHX | C1-1 | CHX-1 HD |
| | C1-5 | |
| | C2-0 | CHX-1 HI |
| | C2-4 | |
| | C3-1 | CHX-2 HD |
| | C3-4 | |
| | C4-0 | CHX-2 HI |
| | C4-5 | |

2.2.2. Electroforesis bidimensional SDS-PAGE

2.2.2.1. Isoelectroenfoque (IEF)

En el proceso se utilizaron tiras de gel inmovilizado (*IPG strips*) de 17cm de longitud, con un rango de pH 3-10 (Bio-Rad). Éstas se rehidrataron durante 10h por el método de rehidratación pasiva, usando un volumen de muestra de 300µL compuesto por 1mg de proteína y solución *buffer* de rehidratación (figura 13).



Figura 13. Separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico. (A) rehidratación de las tiras; (B) y (C) tiras ubicadas en la bandeja y equipo de IEF.

Posteriormente, se realizó el isoelectroenfoque en el equipo Protean IEF cell de Bio-Rad (figura 13) bajo las condiciones presentadas en la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de la corrida para el isoelectroenfoque.

| Etapa | Voltaje (V) | Tiempo (min) | Rampa de voltaje |
|--------------------------------|---|--------------|------------------|
| 1 | 300 | 30 | Lineal |
| 2 | 700 | 30 | |
| 3 | 1000 | 30 | |
| 4 | 1500 | 60 | |
| 5 | 2000 | 60 | |
| 6 | 3000 | 60 | |
| 7 | 7000 | 120 | |
| Final | Voltaje constante: 10000V para alcanzar 80000 voltios por hora (VHR). | | Lenta |
| Tiempo total: ~19 horas | | | |

Protocolo de corrida tomado y modificado de Witzmann *et al.*, 2006

Al finalizar el isoelectroenfoque las tiras de gel inmovilizado pasaron a la etapa de equilibración, donde cada una se puso en contacto por 30 min con 6mL de una solución reductora denominada *buffer* de equilibración I. Luego de retirar esta

solución, se agregó igual volumen de una solución alquilante llamada *buffer* de equilibración II, con la que las tiras interactuaron por 30min. Finalmente, éstas se lavaron en 100mL de solución de corrida.

Es necesario resaltar que la cámara de electroforesis dispuesta para correr la segunda dimensión tiene capacidad únicamente para dos geles, por lo cual sólo se realizó de forma simultánea la rehidratación y el IEF de dos muestras.

2.2.2.2. SDS-PAGE

Una vez que las proteínas se separaron en función de sus propiedades eléctricas, se continuó con su separación en función de su peso molecular (PM), mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS). Se emplearon geles al 12% que se corrieron por 4h a 200V en una cámara Protean xi Cell (Bio-Rad) con 1.5L de *buffer* de corrida, usando una fuente de poder Power Pac HC (Bio-Rad) (figura 14).

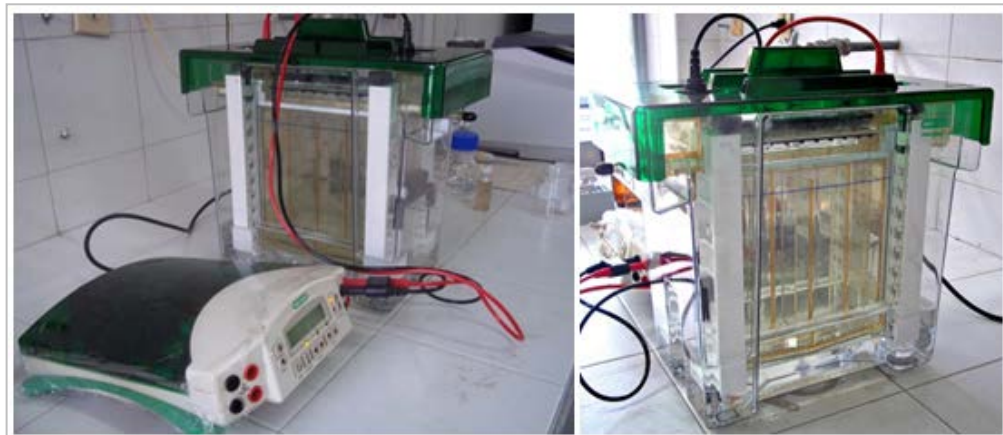


Figura 14. Montaje empleado para la separación de proteínas en función de su peso molecular.

En la tabla 4 se detalla el orden en que se corrieron las 12 muestras obtenidas por combinación de proteínas.

Tabla 4. Corridas de la segunda dimensión en la cámara de electroforesis Protean xi Cell.

| Corrida | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Muestras | SS-1 HD | SS-1 HI | CON-1 HD | SS-2 HD | SS-2 HI | CON-2 HD |
| | CHX-1 HD | CHX-1 HI | CON-1 HI | CHX-2 HD | CHX-2 HI | CON-2 HI |

También se corrieron las dos dimensiones para el marcador de peso molecular 2-D SDS-PAGE Standards (Bio-Rad), con el fin de tener una referencia para calcular los valores aproximados del punto isoeléctrico (pI) y la masa de las proteínas detectadas en las imágenes de los geles.

2.2.2.3. Tinción

Al finalizar la electroforesis bidimensional, se siguió el protocolo para la tinción de los geles con solución de *Coomassie* coloidal G-250, usando un shaker MAXQ 4450 (THERMO) con agitación a 40rpm durante todo el proceso. Cada gel se colocó en 200mL de solución de fijación durante una noche, luego se lavó 3 veces con agua desionizada y se incubó por 1h en solución de sensibilización. Posteriormente se adicionaron 20mL de solución de *Coomassie* G-250 permitiendo que el colorante interactuara con el gel por 20min. Para finalizar el proceso de tinción, el gel se lavó con agua desionizada hasta que el fondo se decolorara y se revelaran las manchas de proteínas.

2.2.2.4. Análisis de imágenes

Una vez se revelaron los geles, sus imágenes fueron obtenidas a través de un scanner marca UMAX PowerLook 2100XL. Las imágenes de los proteomas del hipocampo derecho y el hipocampo izquierdo se analizaron por separado mediante el software *PDQuest* 8.0.1 (Bio-Rad). Posteriormente, se determinaron de forma aproximada los valores de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI)

de las proteínas detectadas en el análisis de imágenes, utilizando el marcador de peso molecular 2-D SDS-PAGE Standards (Bio-Rad). La información obtenida para aquellas proteínas que resultaron interesantes debido a su expresión diferencial, se comparó con las proteínas publicadas en las bases de datos ExPASy.org para el hipocampo de la especie *Rattus norvegicus*, con el fin de identificar de forma cualitativa probables proteínas asociadas con los procesos evaluados en este trabajo.

El protocolo que se empleó para la detección de proteínas en las imágenes de los geles fue el siguiente:

- *Filter Wizard* para filtrar, suavizar y reducir el ruido en las imágenes de los geles. El tipo de filtro utilizado fue *Power Mean* que suprimió el ruido con perfil Gaussiano, usando una ventana de filtrado (o *kernel*) con un tamaño de 3x3 píxeles.
- *Gaussian Model* para determinar los centros de las manchas en el gel, y resolver el solapamiento que se podría presentar entre las manchas de mayor tamaño.
- La cantidad de proteína detectada se definió como la intensidad total de los píxeles en cada mancha, calculada por el *PDQuest* mediante la fórmula

$$(\textit{Spot height}) \cdot \pi \cdot \sigma_x \cdot \sigma_y ,$$

en unidades arbitrarias (UA)¹⁴.

Para cada *match set* se creó un gel patrón, o *master*, constituido por las proteínas detectadas en las seis imágenes del experimento, y las manchas fueron etiquetadas con un número estándar *SSP*¹⁵. Utilizando las herramientas de

¹⁴ *Spot height* es el valor en el eje z de la representación Gaussiana de la mancha y los valores σ son las desviaciones estándar en las coordenadas x y y.

¹⁵ Standard spot number (*SSP*). Los números *SSP* se asignan automáticamente, luego que el *PDQuest* divide la imagen del *master* en filas y columnas, de tal forma que en cada sección

Analyses set manager se determinaron las proteínas comunes a las dos imágenes de cada tratamiento o grupo experimental (CONTROL, SS y CHX), con el fin de establecer el proteoma para cada uno de ellos.

El análisis proteómico en cada *match set* consistió en la comparación de los proteomas obtenidos para cada tratamiento, permitiendo determinar:

- Proteínas comunes en los grupos CONTROL, SS y CHX
- Proteínas comunes en los grupos CONTROL y SS
- Proteínas comunes en los grupos CONTROL y CHX
- Proteínas comunes en los grupos SS y CHX
- Proteínas únicas en cada tratamiento

Adicionalmente, se evaluaron los cambios en la expresión de proteínas en función de las intensidades totales de las manchas comunes entre los grupos experimentales. Con el objetivo de seleccionar, o filtrar, los resultados para presentar un análisis cualitativo de los cambios más destacados, se compararon los valores promedio y los errores estándar de las intensidades, calculados inicialmente para los *SSPs* en cada tratamiento.

Para concluir el análisis, se realizó la búsqueda de las proteínas de interés en las bases de datos del servidor ExPASy.org, mediante los valores de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) calculados por el PDQuest, considerando un margen de error de $PM \pm 2$ y $pI \pm 0,2$.

queden aproximadamente el mismo número de puntos. Los dos primeros dígitos del número SSP corresponden a las coordenadas x y y de las secciones (Bio-Rad *online*, PDQuest, 2012).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis del comportamiento en el LCE

Usando el programa computacional PROSTCOM, para cada rata expuesta al LCE se obtuvieron los tiempos de permanencia en la plataforma central y en las diferentes posiciones de los brazos abiertos (BA) y cerrados (BC), además del número de entradas en cada uno de ellos.

Para evaluar el comportamiento de las ratas en el laberinto, se consideraron principalmente las siguientes variables:

- Número de entradas a los brazos abiertos (EBA)
- Tiempo en los brazos abiertos (TBA)
- Número de entradas a los brazos cerrados (EBC)
- Tiempo en los brazos cerrados (TBC)
- Tiempo en la plataforma central (TC)
- Número de cruzamientos o cambios de posición (CRUZ)
- Porcentaje de entradas a los brazos abiertos (%EBA):

$$\%EBA = \frac{EBA}{EBA + EBC} \times 100 \quad (3)$$

- Porcentaje de entradas a los brazos cerrados (%EBC):

$$\%EBC = \frac{EBC}{EBA + EBC} \times 100 \quad (4)$$

Como punto de partida para realizar el análisis, se utilizó el método de los cuartiles Q (medida de posición no central) como una herramienta de estadística descriptiva

para interpretar y representar gráficamente las variables evaluadas en los grupos de ratas SS y CHX, expuestos al LCE en las sesiones 1 (S1) y 2 (S2). Adicionalmente, los datos obtenidos durante la S2 fueron analizados a través del paquete estadístico SIGMASTAT 3.5 utilizando la prueba t para las medidas paramétricas, y la prueba U de Mann Whitney para las no paramétricas. Estas pruebas se realizaron con el propósito de comparar los tratamientos SS y CHX, para obtener evidencias estadísticas de su comportamiento en la S2. Para ello se estableció un valor de $p < 0,05$ como indicador de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos cotejados.

En la figura 15 se observa que las ratas de los grupos CHX y SS, entraron a los BA cuando fueron expuestas por primera vez al LCE. Este comportamiento se esperaba en S1, ya que los roedores suelen explorar el ambiente novedoso como posible mecanismo de evaluación de riesgo (Conde *et al*, 2001; Bertoglio & Carobrez, 2000).

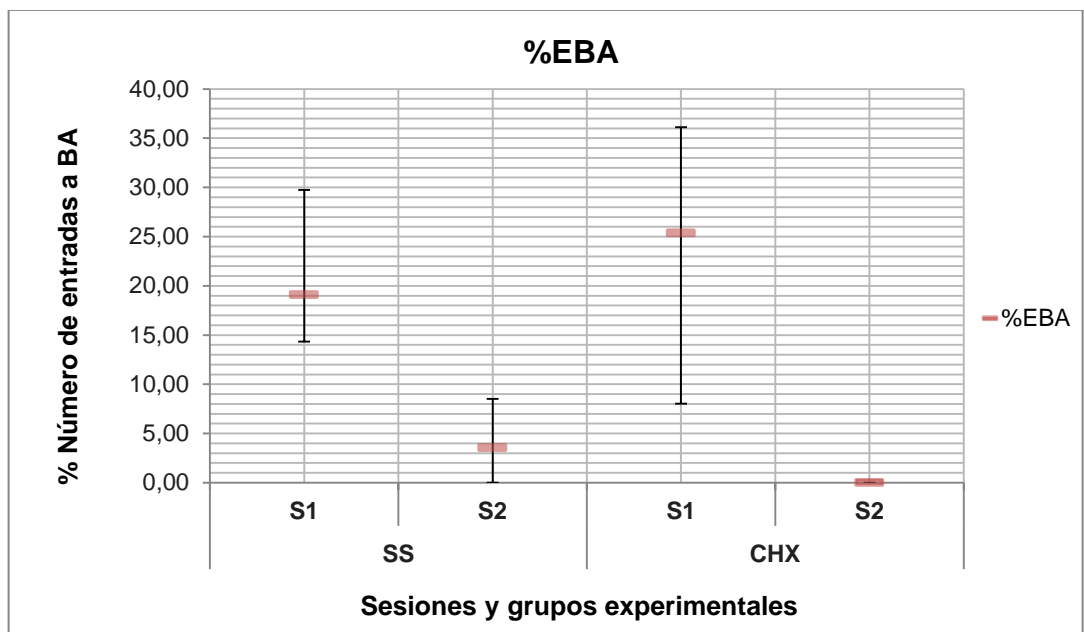


Figura 15. Porcentaje del número de entradas en los brazos abiertos (%EBA) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE. Los datos están representados por la mediana \pm Q (n=8).

La exploración de los BA en la S1, les tomó en promedio 33,4 y 30,3 segundos a los grupos SS y CHX, respectivamente (figura 16). Tiempos similares fueron invertidos en la plataforma central desde la cual los roedores podían valorar el riesgo antes de desplazarse hacia otra posición del laberinto (figura 17).

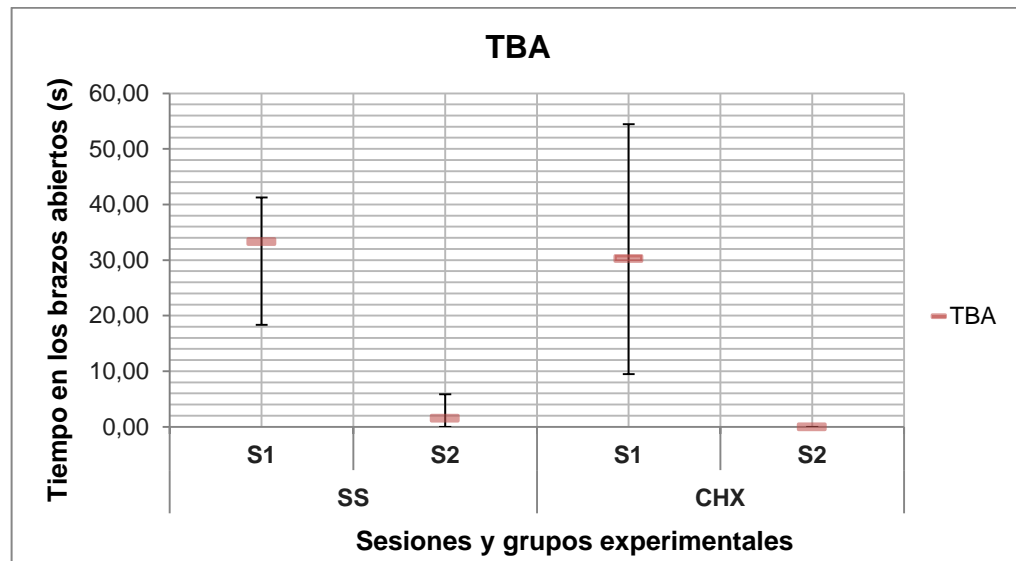


Figura 16. Tiempo en los brazos abiertos (TBA) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE. Los datos están representados por la mediana±Q (n=8).

A pesar que las ratas en los grupos SS y CHX se arriesgaron a explorar los BA en la S1, éstas prefirieron quedarse en los BC tal como se observa en la figura 18, donde el tiempo invertido en los brazos cerrados fue en promedio 244,4 y 235,6 segundos para SS y CHX en la S1, respectivamente. De igual forma, en la figura 19 se evidencia que el porcentaje de entradas en los BC (%EBC) es superior al %EBA en la primera experiencia sobre el LCE (figura 15). Este comportamiento corrobora la inclinación natural de los roedores a permanecer en los sitios cerrados que les confieren mayor protección frente a sus depredadores.

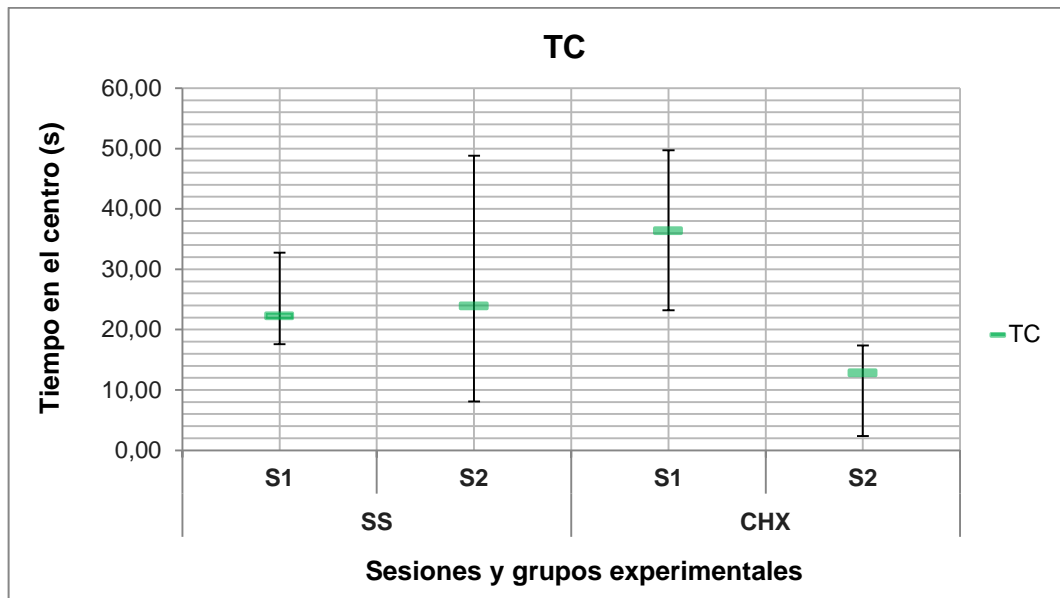


Figura 17. Tiempo en la plataforma central (TC) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE. Los datos están representados por la mediana±Q (n=8).

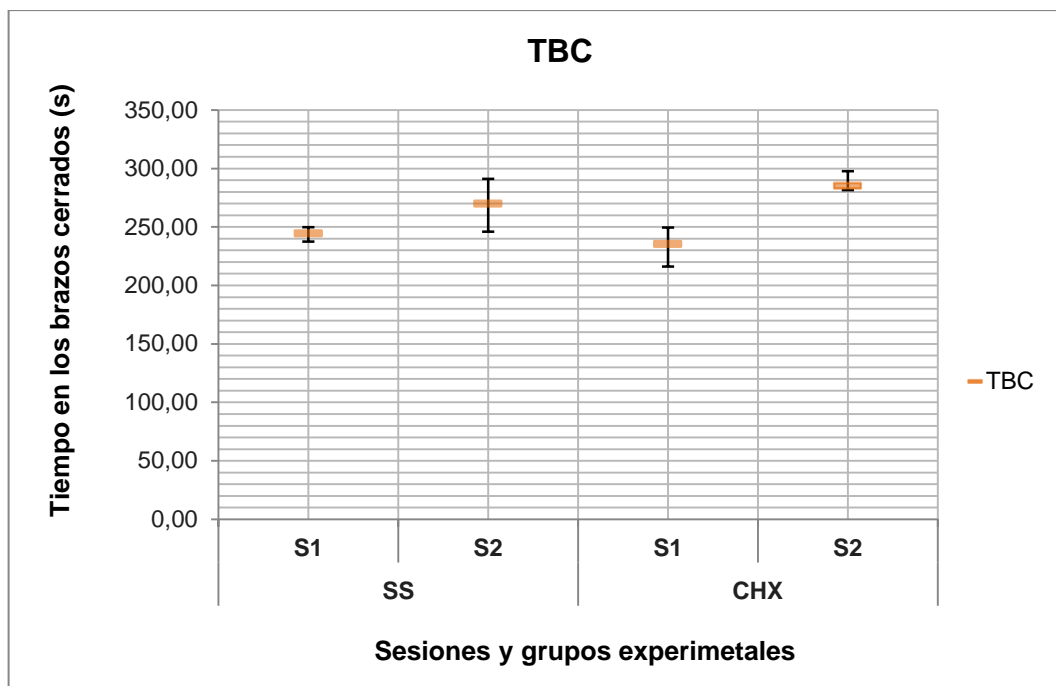


Figura 18. Tiempo en los brazos cerrados (TBC) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE. Los datos están representados por la mediana±Q (n=8).

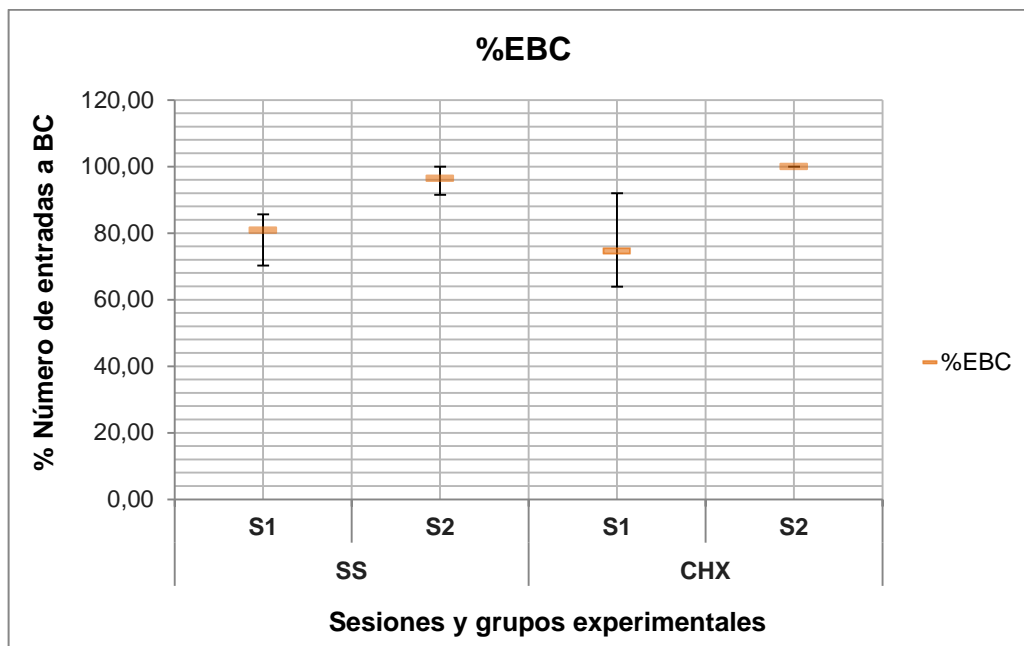


Figura 19. Porcentaje de entradas en los brazos cerrados (%EBC) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE. Los datos están representados por la mediana \pm Q (n=8).

De las representaciones gráficas para las variables evaluadas en S1 es posible deducir que los grupos SS y CHX se comportaron de forma similar, que era lo esperado en la primera exposición al LCE donde las ratas fueron sometidas a una nueva tarea de aprendizaje. Sin embargo, el efecto del compuesto cicloheximida sobre la memoria, se evidenció en la segunda sesión mediante el estudio de las variables %EBA, TBA, TC y cruzamientos (CRUZ).

Se esperaba que, si la inhibición de síntesis de proteínas interfería con la consolidación de la información asociada a la primera experiencia en el LCE; en la S2 el grupo CHX presentaría un deterioro en la memoria a largo plazo que se vería reflejado en una actividad exploratoria mayor que la del grupo SS. Este comportamiento estaría sustentado en que las ratas con una memoria deficiente, al ser re-expuestas al LCE, no recordarían los sitios seguros y peligrosos por lo cual explorarían más allá de los BC. Mientras que las ratas en el grupo SS

reducirían o eliminarían la exploración de las zonas de riesgo identificadas en la S1, y permanecerían preferencialmente en los BC.

No obstante, el procesamiento estadístico de las variables %EBA, TBA, TC, TBC y %EBC utilizando la prueba U de Mann Whitney no reportó diferencias significativas entre los grupos SS y CHX en la S2, ya que se obtuvieron valores de p mayores a 0,05. Por lo tanto, si el aumento o la disminución de la actividad exploratoria en la S2 se consideran indicadores de amnesia o memoria en el LCE, respectivamente; estos resultados sugieren que la inhibición de la síntesis de proteínas, bajo las condiciones del experimento, no afectó la consolidación de la memoria. En la figura 15 se puede observar que durante la S2, las ratas en el grupo CHX no entraron a los brazos abiertos, sino que permanecieron todo el tiempo entre los BC y la plataforma central del LCE (figuras 17 y 18).

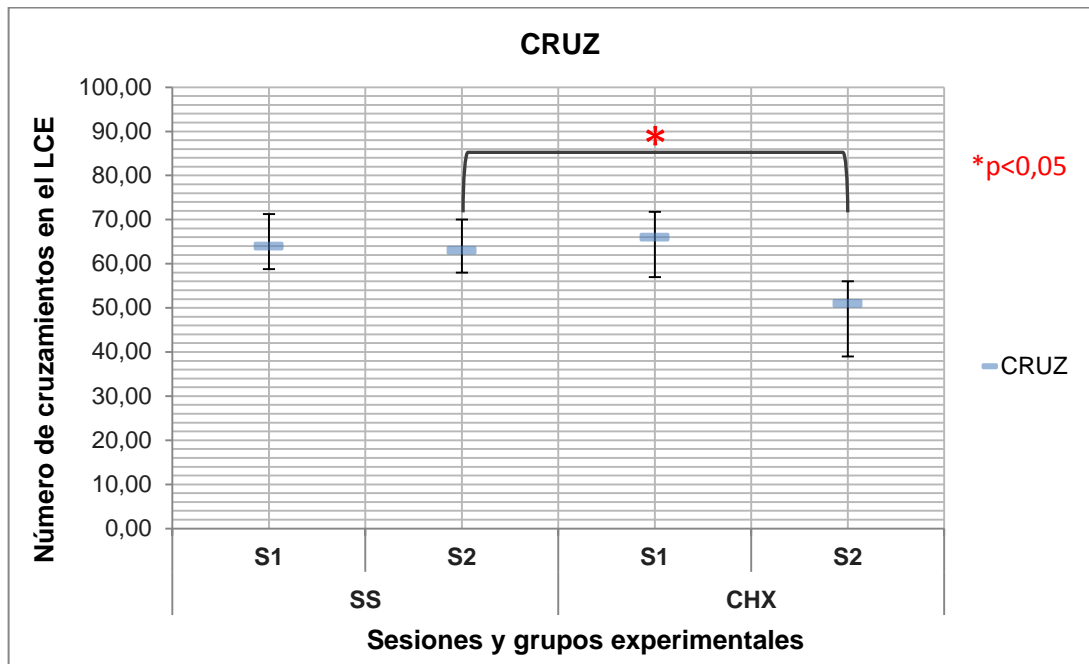


Figura 20. Número de cruzamientos (CRUZ) para los grupos experimentales SS y CHX durante las sesiones 1 (S1) y 2 (S2) en el LCE. . Los datos están representados por la mediana±Q (n=8).

Por otro lado, el uso de la prueba t permitió determinar que el número de CRUZ en el LCE fue significativamente diferente ($*p < 0,05$) entre los grupos experimentales, siendo mayor el promedio de cruzamientos en SS respecto a CHX durante la S2 (figura 20). Esto indica que las ratas en el grupo SS se movieron más que aquellas en el grupo CHX, dado que las primeras presentaron un pequeño %EBA, mientras que las segundas no se desplazaron hacia los BA en la S2 (figura 15).

Adicionalmente, se emplearon regresiones múltiples lineales para modelar la relación entre las variables independientes (tratamiento, sesión y cruzamientos), con cada una de las variables dependientes: TBA, TC, y %EBA. Los resultados obtenidos, sugieren que las variables dependientes evaluadas no presentaron una relación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) con el tratamiento (tto-n), es decir, que la forma en que procedieron las variables TBA, TC y %EBA no fue consecuencia de la administración vía intraperitoneal de SS, ni CHX. Sin embargo, se logró establecer que la variable TC presentó una correlación positiva con el número de cruzamientos (CRUZ), mientras que los cambios en las variables %EBA y TBA se correlacionaron positivamente con la sesión (ses-n). Esto se evidencia en las figuras 15 y 16 donde los valores de %EBA y TBA tienden a disminuir de la S1 a la S2; lo que sería un comportamiento similar al fenómeno *OTT* que se presenta en el LCE cuando los roedores están bajo el efecto de fármacos ansiolíticos (Fernandes & File, 1996; Bertoglio & Carobrez, 2002).

Estos resultados a nivel comportamental no reportan cambios significativamente diferentes que estén relacionados con los tratamientos CHX y SS. Esto conlleva a deducir que la administración vía intraperitoneal de 1mg/kg de cicloheximida a ratas machos Wistar, no permite evidenciar un efecto amnésico o deterioro significativo de la memoria emocional asociada con la experiencia en el LCE.

3.2. Análisis proteómico

Las imágenes digitales de los geles (ver anexo C), fueron analizadas mediante el software *PDQuest* 8.0.1 de Bio-Rad. Para ello se crearon dos experimentos o *match sets*: uno en el que se agregaron las imágenes de los hipocampos derechos (HD) y otro para las imágenes de los hipocampos izquierdos (HI) (ver tabla 5). Esto con el objetivo de evaluar no sólo el efecto de los tratamientos, sino también la asimetría del hipocampo dorsal.

Tabla 5. Experimentos creados en el *PDQuest* para el análisis proteómico.

| <i>Match set</i> | TRATAMIENTO O GRUPO EXPERIMENTAL | | | | | |
|------------------|----------------------------------|-------|------|------|-------|-------|
| | CONTROL | | SS | | CHX | |
| HD | CON-1 | CON-2 | SS-1 | SS-2 | CHX-1 | CHX-2 |
| HI | CON-1 | CON-2 | SS-1 | SS-2 | CHX-1 | CHX-2 |

Antes de realizar las comparaciones de los proteomas en cada experimento, las manchas de proteínas en cada gel fueron normalizadas mediante el método de regresión local¹⁶ con el fin de compensar las variaciones que no estuvieran relacionadas con la expresión, por ejemplo las inconsistencias en el proceso de tinción.

3.2.1. Análisis de proteínas en el hipocampo dorsal derecho (HD)

A partir del *match set* creado para el análisis de los HD, se determinó la cantidad de manchas comunes a cada tratamiento y se obtuvo un gel *master* compuesto por 945 proteínas que constituyen el proteoma general del HD (ver tabla 6 y anexo C). Los resultados evidencian que los grupos SS y CHX expresaron un mayor

¹⁶ El modelo de regresión local es el método de normalización más sofisticado que posee el *PDQuest*, y consiste en modelar una curva en el diagrama de dispersión que minimiza la distancia a todos los puntos en la gráfica, calculando un factor de normalización para cada mancha (Bio-Rad *online*, *PDQuest*, 2012).

número de proteínas (~17%), respecto al grupo CONTROL (tabla 6). Este aumento en el conteo de proteínas, pudo darse como consecuencia de la experiencia en el LCE o como una respuesta del organismo frente a la punción realizada para administrar la solución salina y la cicloheximida en los grupos respectivos.

Tabla 6. Cantidad de manchas detectadas para los tratamientos CONTROL, SS y CHX en los hipocampos dorsales derechos (HD).

| Imagen Muestra | Tratamiento | Número de manchas detectadas |
|-------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| CON-1 HD | CONTROL | 548 |
| CON-2 HD | | |
| SS-1 HD | SS | 714 |
| SS-2 HD | | |
| CHX-1 HD | CHX | 706 |
| CHX-2 HD | | |
| <i>Master HD</i> | | 945 |

También se estableció que en el proteoma del HD, 379 manchas son comunes a los tres tratamientos, 55 son comunes en CONTROL y SS, 63 se hallan tanto en CHX como en CONTROL, y 147 manchas se presentan en común para CHX y SS (figura 21). Además se determinó que 51, 133 y 117 proteínas se expresaron de forma única en CONTROL, SS y CHX, respectivamente (figura 21).

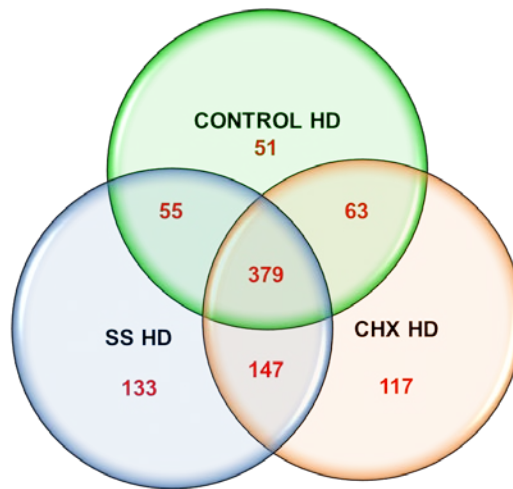


Figura 21. Cantidad de manchas comunes en los tratamientos CONTROL, SS y CHX de los hipocampos derechos (HD).

Tomando en cuenta que, si la inhibición de síntesis de proteínas afectó la consolidación de la memoria asociada con la tarea en el LCE durante la primera sesión, y que los hipocampos se extrajeron inmediatamente después de la segunda sesión en el LCE, justo después de la adquisición; en el grupo CHX se evidenciaría ausencia y/o diferencias en la expresión de las proteínas que podrían estar implicadas en el proceso de consolidación, respecto a los grupos SS y CONTROL.

En la figura 21 se observa que hay 55 manchas comunes en SS y CONTROL que están ausentes en el proteoma de CHX, y podrían corresponder a proteínas del metabolismo normal de las ratas machos Wistar, que se inhibieron en el HD luego del tratamiento con cicloheximida. Mediante el análisis cuantitativo de estas proteínas en CONTROL y SS se encontró que hay 4 proteínas interesantes debido a su expresión diferencial (figura 22).

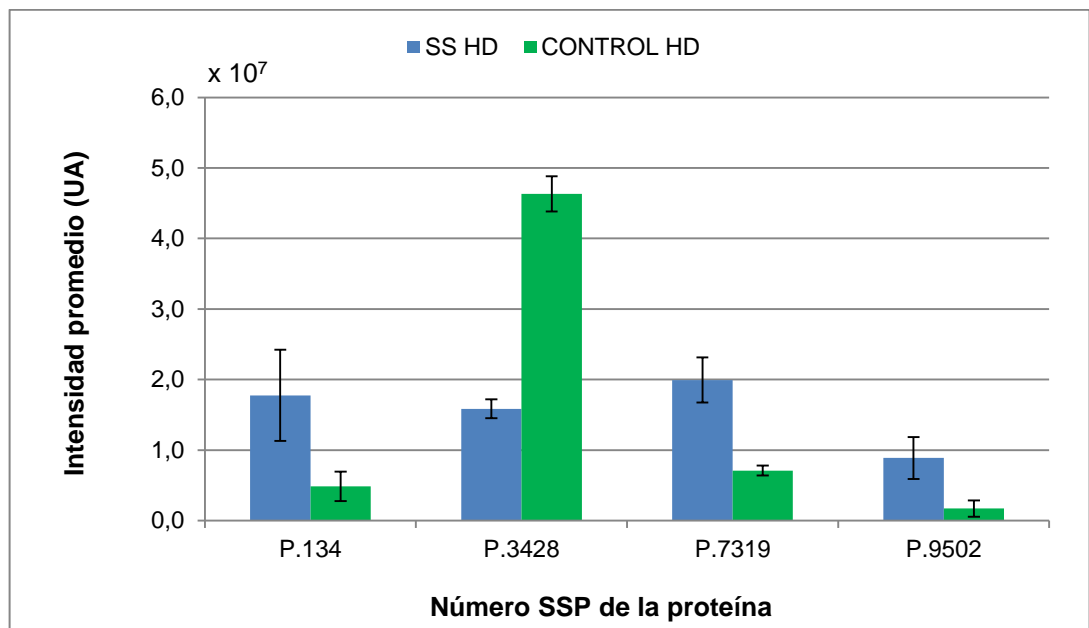


Figura 22. Intensidad de las proteínas expresadas diferencialmente en SS HD y CONTROL HD, que están ausentes en CHX HD. Las barras están representadas por el promedio \pm desviación estándar.

En el caso de las proteínas P.134, P.7319 y P.9502 se evidencia un aumento en la intensidad de las manchas para el tratamiento SS (figura 22), lo cual podría significar que una mayor síntesis de estas proteínas es necesaria para la formación de la memoria asociada al LCE; mientras que en respuesta a este proceso la proteína P.3428 es inhibida, ya que su intensidad disminuye frente al CONTROL (figura 22).

Por otro lado, se estableció que hay 147 manchas detectadas en común para SS y CHX, que no están en el grupo CONTROL (figura 21); sugiriendo que la experiencia en el LCE conduce a la expresión de nuevas proteínas en el HD. Sin embargo, el tratamiento con 1mg/kg de cicloheximida vía i.p., condujo a cambios en la expresión de algunas de estas proteínas en el grupo CHX respecto a SS (figura 23).

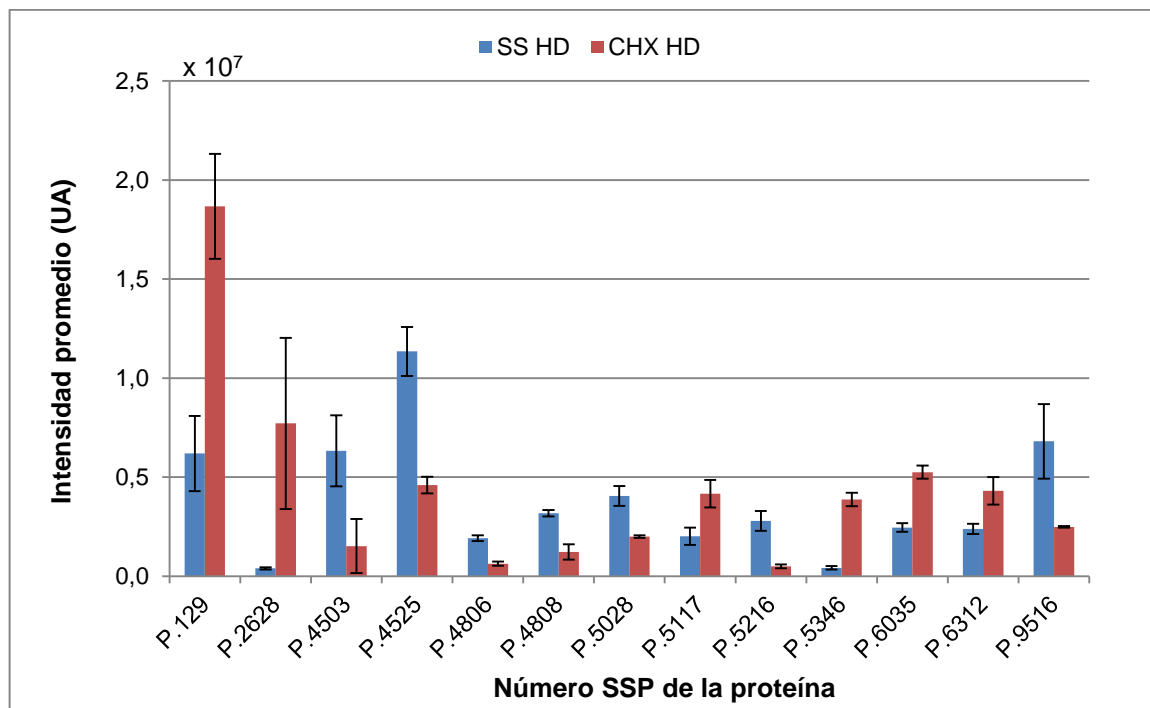


Figura 23. Intensidad de las proteínas expresadas diferencialmente en SS HD y CHX HD, que están ausentes en CONTROL HD. Las barras están representadas por el promedio \pm desviación estándar.

Los resultados en la figura 23 indicarían, que bajo las condiciones de este experimento, algunas proteínas fueron reguladas en el HD según el tratamiento farmacológico. Las manchas con números SSP 129, 2628, 5117, 5346, 6035 y 6312 presentaron una mayor intensidad en el grupo CHX, mientras que las 7 proteínas restantes inhibieron su expresión respecto a SS (figura 23). De acuerdo con esto P.4503, P.4525, P.4806, P.4808, P.5028, P.5216 y P.5916, podrían corresponder a proteínas que se sintetizan como respuesta a la tarea de aprendizaje en el LCE, y que se ven afectadas por la administración de cicloheximida vía i.p.

Los valores de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) calculados para las proteínas destacadas en las figuras 22 y 23, se presentan en la tabla 7. Al realizar la búsqueda en las bases de datos, no se hallaron coincidencias entre los datos

obtenidos experimentalmente y los que han sido determinados para proteínas en el hipocampo de ratas Wistar.

Tabla 7. Proteínas destacadas en el hipocampo dorsal derecho (HD).

| Número SSP | PM (KDa) | pI |
|------------|----------|------|
| P.129 | 25,09 | <4.5 |
| P.134 | 24,21 | <4.5 |
| P.2628 | 127,62 | 5,88 |
| P.3428 | 76,79 | 6,22 |
| P.4503 | 107,64 | 6,25 |
| P.4525 | 101,18 | 6,29 |
| P.4806 | 178,84 | 6,22 |
| P.4808 | 177,98 | 6,25 |
| P.5028 | 20,35 | 6,58 |
| P.5117 | 23,15 | 6,66 |
| P.5216 | 37,23 | 6,49 |
| P.5346 | 49,13 | 6,57 |
| P.6035 | 17,79 | 6,74 |
| P.6312 | 46,28 | 6,73 |
| P.7319 | 53,77 | 7,48 |
| P.9502 | 92,05 | >8.5 |
| P.9516 | 82,15 | >8.5 |

3.2.2. Análisis de proteínas en el hipocampo dorsal izquierdo (HI)

El *match set* en el cual se analizaron las imágenes de los geles para HI, generó un *master* con 796 manchas (anexo C, tabla 8), de las cuales 296 son comunes a los tres grupos experimentales (figura 24). Al igual que en HD, se evidencia un conteo de proteínas menor en el grupo CONTROL respecto a SS y CHX (tabla 8), que permite sostener la idea, que en el hipocampo dorsal se están sintetizando nuevas proteínas en respuesta a la actividad exploratoria en el LCE y/o al procedimiento realizado para administrar los tratamientos.

Tabla 8. Cantidad de manchas detectadas para los tratamientos CONTROL, SS y CHX en los hipocampos dorsales izquierdos (HI).

| Imagen Muestra | Tratamiento | Número de manchas detectadas |
|------------------|-------------|------------------------------|
| CON-1 HI | CONTROL | 485 |
| CON-2 HI | | |
| SS-1 HI | SS | 555 |
| SS-2 HI | | |
| CHX-1 HI | CHX | 573 |
| CHX-2 HI | | |
| <i>Master HI</i> | | 796 |

También se determinó que algunas proteínas se expresan de forma única en cada grupo, mientras que otras son comunes en CHX-SS, CONTROL-SS, y CONTROL-CHX como se presenta en la figura 24. De la misma forma que en HD, se estudiaron las diferencias de expresión de aquellas manchas que estarían ausentes en CHX como consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas, y de las que aún bajo dicho tratamiento, se expresaron en el HI.

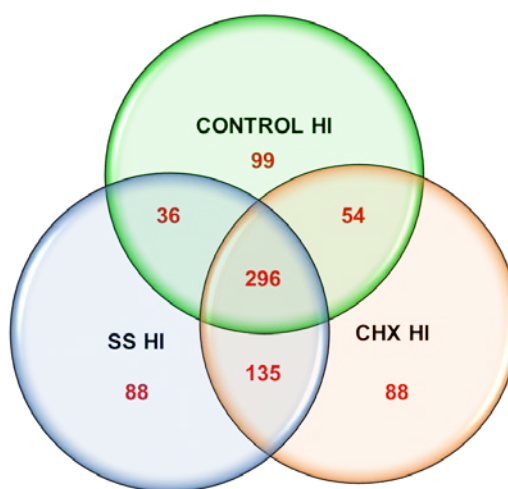


Figura 24. Cantidad de manchas comunes en los tratamientos CONTROL, SS y CHX de los hipocampos izquierdos (HI).

Se encontró que de las proteínas comunes en CONTROL y SS, hay 6 que se expresan de forma diferencial (figura 25); donde P.4442, P.4640 y P.4751 disminuyen su intensidad total en SS, mientras que en P.9027, P.9220 y P.9422 la cantidad de proteína detectada aumenta debido a la experiencia en el LCE (figura 25).

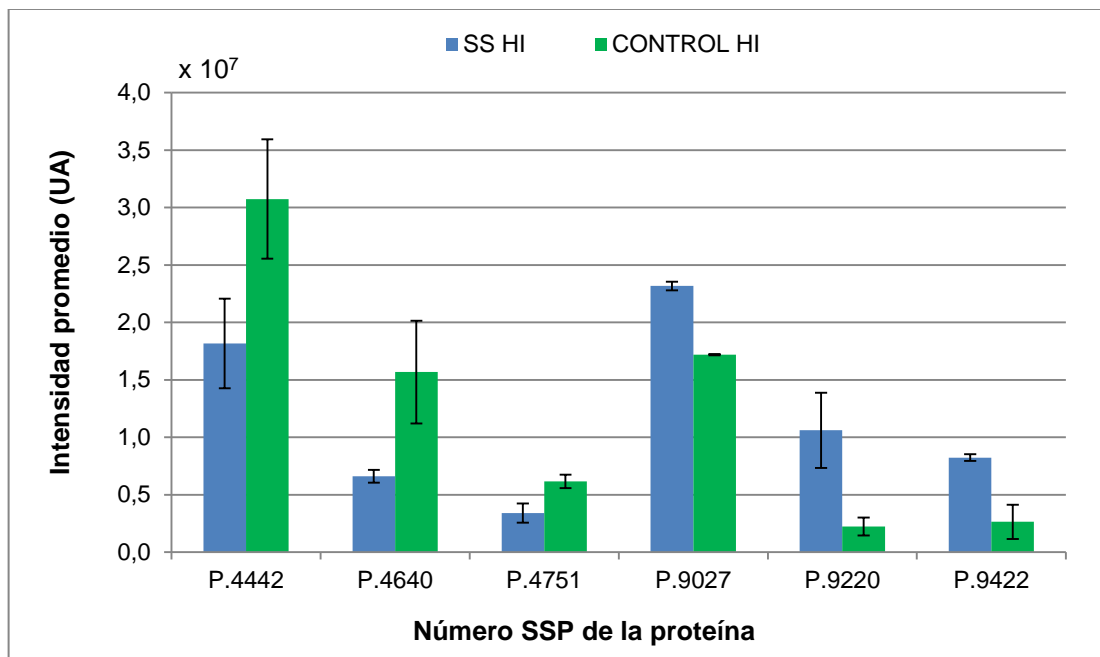


Figura 25. Intensidad de las proteínas expresadas diferencialmente en CONTROL HI y SS HI, que están ausentes en CHX HI. Las barras están representadas por el promedio \pm desviación estándar.

Por otro lado, se determinó que hay 8 proteínas comunes en SS y CHX cuya expresión vale la pena destacar. Las manchas de códigos P.7036, P.7412, P.8058, P.8349 y P.8504 presentan una mayor intensidad en el grupo SS (figura 26), sugiriendo que la síntesis de estas proteínas podría haberse inhibido en el HI, debido al tratamiento con cicloheximida. No obstante, para P.117, P.1309 y P.8056 sucedió el caso contrario, ya que éstas se expresaron mayoritariamente en CHX (figura 26).

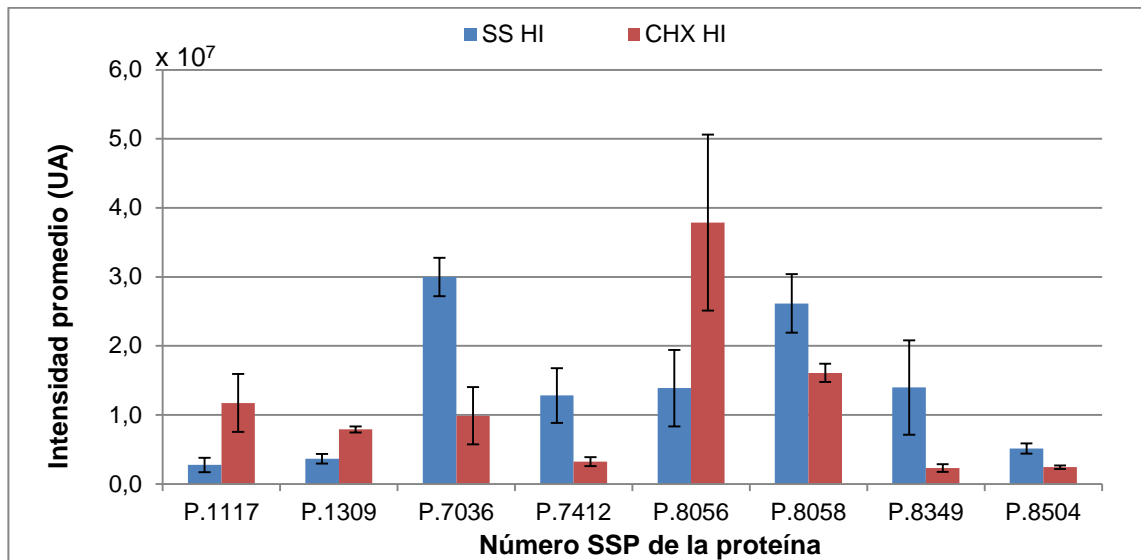


Figura 26. Intensidad de las proteínas expresadas diferencialmente en SS HI y CHX HI, que están ausentes en CONTROL HI. Las barras están representadas por el promedio \pm desviación estándar.

Los valores de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) calculados por el *PDQuest* para las proteínas resaltadas en las figuras 25 y 26, se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Proteínas destacadas en el hipocampo dorsal izquierdo (HI).

| Número SSP | PM (KDa) | pI |
|------------|----------|------|
| P.1117 | 24,21 | <4.5 |
| P.1309 | 51,73 | <4.5 |
| P.4442 | 79,54 | 6,18 |
| P.4640 | 116,21 | 6,28 |
| P.4751 | 165,48 | 6,25 |
| P.7036 | 17,80 | 7,73 |
| P.7412 | 69,05 | 6,84 |
| P.8056 | 17,20 | >8.5 |
| P.8058 | 18,43 | >8.5 |
| P.8349 | 54,04 | >8.5 |
| P.8504 | 91,34 | >8.5 |
| P.9027 | 20,53 | >8.5 |
| P.9220 | 39,49 | >8.5 |
| P.9422 | 84,44 | >8.5 |

Estos fueron comparados con las proteínas en las bases de datos y se encontraron coincidencias, dentro de los parámetros establecidos, para P.4442, P.4640, P.7036 y P.7412 (tabla 10).

Tabla 10. Proteínas encontradas en las bases de datos de proteínas para el hipocampo en la especie *R. norvegicus*.

| Número SSP | PROTEÍNA |
|------------|---|
| P.4442 | Receptor tipo I de la proteína interleucina 1, IL-1-RAPL-1 (PM: 79,77KDa; pl: 5,94) |
| P.4640 | Contactina-6, Cntn 6 (PM: 114,06KDa; pl: 6,11) |
| P.7036 | Subunidad α -1/2 de hemoglobina, Hba1 (PM: 15,32KDa; pl: 7,81) |
| P.7412 | Prostaglandina G/H sintasa 2 o ciclooxigenasa 2, Cox-2 (PM: 69,16KDa; pl: 7,01) |

Se encontró que la mancha etiquetada con el número SSP P.4442, podría corresponder al receptor tipo I de la proteína interleucina 1, IL-1-RAPL-1 (figura 27), que se localiza en el citoplasma y la membrana celular, y está presente en el proceso de crecimiento de las dendritas (Piton *et al.*, 2008). La función de esta proteína consiste en regular la secreción y la diferenciación presináptica, mediante la inhibición de la actividad de los canales de voltaje de tipo neural (*N-type*) dependientes de calcio. Además, puede activar las quinasas c-Jun N-terminal (*JNKs*), que son quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que responden a estímulos de estrés (Gambino *et al.*, 2007)(Piton *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que P.4442 presentó una mayor expresión en el grupo CONTROL y se ausentó en el proteoma de CHX (figura 25), podría inferirse que la cantidad detectada de IL-1-RAPL-1 en el HI del grupo SS, disminuyó como consecuencia de la experiencia en el LCE. Esto se estaría presentando, debido a la regulación de la IL-1-RAPL-1 para activar los canales de voltaje dependientes de calcio y dar lugar a la *LTP*, que conduce a la consolidación de la memoria.



Figura 27. Estructura 3D de IL-1-RAPL-1 (rata) basada en DOI:[10.2210/pdb1t3q/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1t3q/pdb). Tomado de SWISS-MODEL Repository, P59824.

Por su lado, se estableció que la mancha P.4640 pertenece posiblemente a la contactina-6 (Cntn6), una proteína de membrana expresada específicamente en las células neuronales localizadas en el hipocampo, el cerebelo y el tronco encefálico (Cui *et al.*, 2004). Su función consiste en mediar las interacciones en la superficie celular durante el desarrollo del sistema nervioso, participando en la ruta de señalización de la proteína transmembranal *Notch*, que sirve como receptor de señales extracelulares (Cui *et al.*, 2004). De acuerdo con la figura 25, en el HI esta proteína sólo se detectó en los grupos CONTROL y SS, destacándose una mayor expresión en el primero.

Para el caso de las proteínas expresadas diferencialmente en SS y CHX, se encontró que la mancha P.7036 en el HI, podría tratarse de la subunidad α -1/2 de hemoglobina, Hba1 (figura 28). La Hba1 es una proteína que participa en el transporte de oxígeno desde los pulmones hasta diversos tejidos periféricos y regula la percepción sensorial del dolor (Garrick *et al.*, 1975). De acuerdo con los resultados observados en la figura 26, tanto SS como CHX podrían haber expresado esta proteína en HI como respuesta a la inyección i.p. que se realizó para administrar los tratamientos. Sin embargo, hay una mayor intensidad de

P.7036 en SS, sugiriendo que en CHX la inhibición de síntesis de proteínas redujo su expresión, regulando en menor proporción el posible dolor que se ocasionó en los animales debido a la punción.

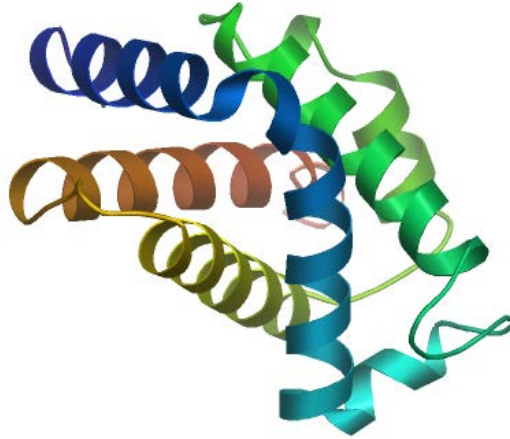


Figura 28. Estructura 3D de Hba1 (rata) basada en DOI:[10.2210/pdb2qls/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb2qls/pdb). Tomado de SWISS-MODEL Repository, P01946.

Por último, se encontró una coincidencia entre los valores de PM y pl de la proteína P.7412 en HI, con la ciclooxygenasa 2, Cox-2 (figura 29). Esta enzima es una proteína de membrana que se expresa a través del cerebro, y está enriquecida en la corteza y el hipocampo. Su función es mediar la formación de prostaglandinas a partir del araquidonato, y puede jugar un papel importante como mediadora de la inflamación y/o de la señalización de prostanoides en la actividad dependiente de la plasticidad (Yamagata *et al.*, 1993). Tomando en cuenta los resultados reportados en la figura 26, es posible que en respuesta a la punción realizada antes de la S1, las ratas en el grupo SS hayan presentado una mayor expresión de Cox-2 en contraste con CHX.



Figura 29. Estructura 3D de Cox-2 (rata) basada en DOI:[10.2210/pdb1pxx/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1pxx/pdb). Tomado de SWISS-MODEL Repository, P35355.

3.2.3. Comparación de los proteomas de los hipocampos dorsales derecho e izquierdo

A partir de los datos presentados en las tablas 6 y 8, es posible deducir que se presenta lateralidad en la expresión de proteínas sobre el hipocampo dorsal, ya que en general, hay un mayor conteo de proteínas en el HD. Luego de realizar una comparación entre los *match sets* creados para HD y HI se encontró que éstos tienen en común 566 manchas, mientras que 379 proteínas se expresan únicamente en el HD y 230 en el HI (ver ejemplo en la figura 30).

Este análisis cualitativo de los proteomas obtenidos para ambos hemisferios del hipocampo dorsal, apoya los resultados reportados por Samara *et al.*, 2011 que plantean una asimetría lateral entre el hipocampo derecho e izquierdo de ratas saludables.

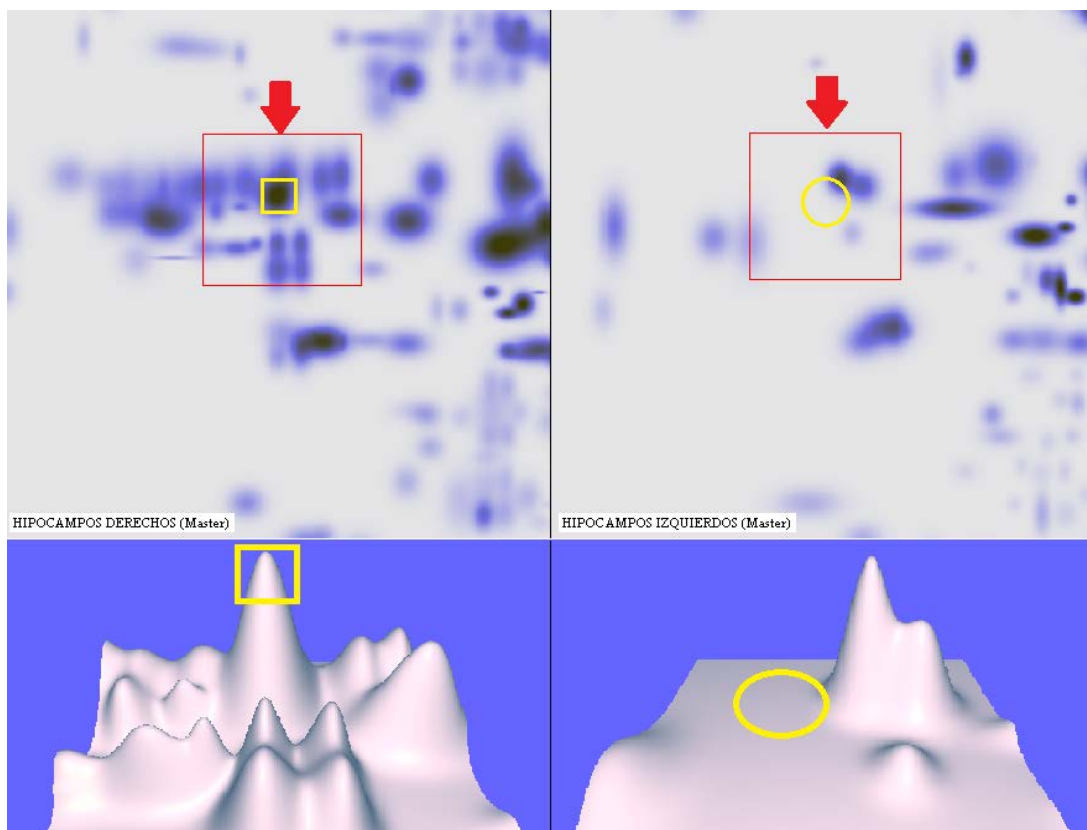


Figura 30. Expresión de la proteína SSP 1544 presente en el proteoma del HD y ausente en el HI.

3.3. Relación entre el comportamiento en el LCE y la expresión de proteínas en el hipocampo dorsal

A nivel proteómico se encontraron algunas diferencias en el conteo y la expresión de proteínas entre los grupos SS y CHX. Sin embargo, desde el punto de vista comportamental los resultados reflejan que una dosis de cicloheximida de 1mg/kg administrada vía i.p. 15 min antes de la primera sesión, no sería suficiente para evidenciar deterioro de la memoria asociada al LCE en la sesión 2. De acuerdo con esto, se estaría presentando un comportamiento similar al que ocurre en el fenómeno *OTT*, en el que los roedores expuestos al LCE en una segunda prueba bajo el efecto de benzodiacepinas, reducen su actividad exploratoria a pesar del tratamiento ansiolítico (Bertoglio *et al.*, 2005).

La ausencia de cambios significativos en el comportamiento de SS y CHX durante la S2, podría sugerir que:

- La concentración del inhibidor en el hipocampo dorsal no sería efectiva para interrumpir la síntesis de proteínas relacionada con la primera experiencia en el LCE.
- La síntesis de proteínas inhibida por la cicloheximida, pudo ser recuperada a lo largo de las 48 horas previas a la segunda sesión en el LCE.
- La inhibición de síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal, podría conducir a otras respuestas metabólicas que regulasen su efecto sobre la consolidación de la memoria.
- La inhibición de síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal, no estaría afectando directamente la formación de la memoria asociada a la tarea en el LCE.

Adicionalmente, las dos proteínas encontradas en las bases de datos y vinculadas al HI (Hba1 y Cox-2), sugerirían que hubo respuestas metabólicas relacionadas con el dolor, posiblemente debido a la punción realizada para administrar los tratamientos, que podría ser una razón por la cual se redujo la movilidad en las ratas del grupo CHX durante la segunda sesión.

4. CONCLUSIONES

- A nivel comportamental no se presentaron cambios estadísticamente significativos asociados con los tratamientos CHX y SS.
- La administración vía intraperitoneal de 1mg/kg de cicloheximida en ratas machos Wistar, no fue suficiente para evidenciar un efecto amnésico o deterioro de la memoria emocional asociada con la experiencia en el LCE.
- El conteo de proteínas en el hipocampo dorsal derecho (HD) e izquierdo (HI), fue mayor en los grupos SS y CHX expuestos al LCE, respecto al grupo CONTROL.
- Se demostró que no sólo hay proteínas que se inhiben, sino otras que aumentan su expresión en el hipocampo dorsal de ratas Wistar, como respuesta a la experiencia en el LCE y/o la punción y/o un efecto indirecto del tratamiento.
- Es posible que las manchas P.4442, P.4640, P.7036 y P.7412 expresadas diferencialmente en el HI, correspondan a las proteínas IL-1-RAPL-1, Cntn6, Hba1 y Cox-2, respectivamente.
- Se confirmó la asimetría del hipocampo dorsal, ya que el número total de manchas detectadas en el HD es mayor que en el HI.

5. RECOMENDACIONES

- Determinar una dosis mayor de CHX vía intraperitoneal que cause amnesia en las ratas Wistar expuestas al LCE, la cual se evidencie a través de cambios en el comportamiento y en la expresión de proteínas en el hipocampo dorsal, sin causar intoxicación ni deteriorar la actividad locomotora de los roedores.
- Emplear controles que sean inyectados con los diferentes tratamientos, y no sean expuestos al LCE, con el objetivo de garantizar que los cambios a nivel comportamental y proteómico no se dan como consecuencia de la punción, sino de la actividad del inhibidor de síntesis de proteínas sobre el hipocampo dorsal.
- Evaluar los cambios comportamentales y proteómicos para diferentes intervalos de tiempo entre la primera y la segunda sesión en el LCE, con el propósito de establecer el momento propicio para evidenciar el efecto de la cicloheximida sobre la memoria asociada a la tarea en la sesión 1.
- Determinar si el comportamiento durante la segunda sesión en el LCE, puede modificarse al variar los tiempos de administración intraperitoneal de la CHX; por ejemplo, 30 min antes o inmediatamente después de la primera exposición.
- Aumentar la resolución de los geles bidimensionales obtenidos para muestras de hipocampo empleando tiras de gel inmovilizado con diferentes gradientes de pH, especialmente en el rango 4-7 en el cual se detecta un gran número de manchas que podrían estar presentando cambios interesantes pasados por alto al emplear tiras de pH 3-10 que ofrecen ventanas de separación más pequeñas debido a su amplio rango de pH.

- Identificar las proteínas de interés empleando técnicas de Proteómica como la espectrometría de masas.
- Aplicar técnicas de genómica como la reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa (*RT-PCR*), con el objetivo de identificar los genes de las proteínas que estarían expresándose diferencialmente en el hipocampo dorsal, luego del tratamiento con cicloheximida.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, H. Electrophoretic Analyses of Protein. *In*: Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization. CRC Press, 2005. p. 71-132.

Bailey, K.R., Crawley, J.N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. *In*: Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2ed. CRC Press, 2009. p. 77-101.

Bannerman, D.M., Rawlins, J.N.P., McHugh, S.B., Deacon, R.M.J., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H.J., Feldon, J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2004, 28(3), p. 273-83.

Bertoglio, L.J., Carobrez, A.P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2002, 72(1-2), p. 449-55.

Bertoglio, L.J., Carobrez, A. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 2000, 108(2), p. 197-203.

Bertoglio, L.J., Anzini, C., Lino de Oliveira, C., Carobrez, A.P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Behavioural Brain Research*, 2005, 162(1), p. 99-107.

Bio-Rad [online]. PDQuest: user guide for version 7.4.0 Windows and Macintosh. <URL: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/PDQuest_v74.pdf> [cited 6 feb 2012].

Bio-Rad [online]. Protean IEF Cell: instruction manual [cited 14 jun 2012]. <URL: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006164B.pdf>>

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, p. 248-54.

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

Cammarota, M., Bevilaqua, L.R.M., Medina, J.H., Izquierdo, I. Studies of Short-Term Avoidance Memory. *In*: Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging. CRC Press, 2007. p. 193-208.

Carboni, L., Piubelli, C., Righetti, P.G., Jansson, B., Domenici, E. Proteomic analysis of rat brain tissue: comparison of protocols for two-dimensional gel electrophoresis analysis based on different solubilizing agents. *Electrophoresis*, 2002, 23(24), p. 4132-41.

Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2005, 29(8), p. 1193-205.

Célis, C. A. Modelado por redes neuronales artificiales backpropagation del comportamiento exploratorio de ratas Wistar en laberinto en cruz elevado. Trabajo de grado Físico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2008.

Conde, C.A., Ayala, J.O., Botelho, S., Berena, A., Velásquez, M.C. La vía visual puede ser el disparador de ansiogenicidad en el modelo del laberinto en cruz elevado. *Salud UIS*, 2001, 33:191-196.

Conde, C.A., Becerra, C., Botelho, S. Papel de la amígdala en la ponderación de la severidad del estímulo aversivo: su relación con la memoria emocional en modelos comportamentales. *Salud UIS* 2001, 33:245-259.

Conde, C., Costa, V., Tomaz, C. Prostcom: un conjunto de programas para registro y procesamiento de datos comportamentales en investigaciones de fisiología y farmacología. *Biotemas*, 2000, 13 (1), p. 145-159.

Cui, X.Y., Hu, Q.D., Tekaya, M., Shimoda, Y., Ang, B.T., Nie, D.Y., Sun, L., et al. NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(24), p. 25858-65.

Dolan, R.J. Emotion, cognition, and behavior. *Science*, 2002, 298(5596), p. 1191-4.

Dyballa, N., Metzger, S. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2009, 30, p. 2-5.

Díaz, A., Contreras, J., Medina, A.C., Silveyra, G.A., Antaramian, A., Quirarte, G.L., Prado, R.A. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term

memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2009, 91(3), p. 310-4.

Eichenbaum, H. The hippocampus, episodic memory, declarative memory, spatial memory...Where does it all come together? *International Congress Series*, 2003, 1250, p. 235-244.

Escobar, M.L., Derrick, B. Long-Term Potentiation and Depression as Putative Mechanisms for Memory Formation. *In: Neural Plasticity and Memory: From Genes To Brain Imaging*. CRC Press, 2007. p. 15-46.

Fernandes, C., File, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1996, 54(1), p. 31-40.

File, S.E., Zangrossi, H., Viana, M., Graeff, F. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology*, 1993, 111, p. 491-494.

Finn, D.A., Purdy, R.H., Koob, G.F. (2004). Animal Models of Anxiety and Stress-Induced Behavior: Effects of Neuroactive Steroids. *In: Neurosteroid Effects in the Central Nervous System: The Role of the GABA-A Receptor*. CRC Press, 2004.

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

Franklin, T.J., Snow, G. A. (2005). Inhibitors of protein biosynthesis. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action*. 6ed. SpringerLink, 2005. Vol. 1, p. 85-105.

Gallo, M. Reversible Inactivation of Brain Circuits in Learning and Memory Research. *In: Neural Plasticity and Memory: From Genes To Brain Imaging*. CRC Press, 2007. p. 157-173.

Gambino, F., Pavlowsky, A., Bégle, A., Dupont, J.L., Bahi, N., Courjaret, R., Gardette, R., et al. IL1-receptor accessory protein-like 1 (IL1RPL1), a protein involved in cognitive functions, regulates N-type Ca²⁺-channel and neurite elongation. *PNAS*, 2007, 104(21), p. 2-7.

Garbis, S., Lubec, G., Fountoulakis, M. Limitations of current proteomics technologies. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1077(1), p. 1-18.

Garfin, D.E. Electrophoretic methods. In: Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research. Academic Press, 1995. p. 53-103.

Garrick, L., Sharma, V., McDonald, M.J., Ranney, H.M. Rat Haemoglobin Heterogeneity. *Biochemistry Journal*, 1975, 149, p. 245-258.

Guerrero, N. Evaluación comportamental y proteómica cerebral (amígdala e hipocampo) en ratas expuestas a diferentes niveles de estrés inducido por el nado forzado. Trabajo de grado Magister en Ciencias Biomédicas. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2012.

Görg, A., Weiss, W. Protein profile comparisons of microorganisms, cells and tissues using 2D gels. In: Proteome Analysis: interpreting the Genome. Elsevier Inc., 2004. p. 19-73.

Henningsen, R., Gale, B.L., Straub, K.M., DeNagel, D.C. Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2002, 2(11), p. 1479-88.

Hernández, V. A. Determinación de cambios en el perfil proteómico del hipocampo de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado bajo criterio de aprendizaje. Trabajo de grado Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2010.

Holsboer, F., Ströhle, A. Anxiety and Anxiolytic Drugs. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, 2005. p. 1-35.

Labar, K.S., Ledoux, J.E. Fear and Anxiety Pathways. In: Understanding Autism: From Basic Neuroscience to Treatment. CRC Press, 2006. p. 133-154.

Leimgruber, R.M. Extraction and Solubilization of Proteins for Proteomic Studies. In: The Proteomics Protocols Handbook. 2005. p. 1-18.

Luft, A.R., Buitrago, M.M., Kaelin, A., Dichgans, J., Schulz, J.B. Protein synthesis inhibition blocks consolidation of an acrobatic motor skill. *Learning & Memory*, 2004, 11(4), p. 379-82.

Max Plank Institute of Psychiatry [online]. Behavioral phenotyping of animal models in psychiatric research: establishing and running the EMOLAB at the MPIP. <URL: <http://www.mpipsykl.mpg.de/en/institute/services/emolab/index.html>> [cited: 10 jun 2012].

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

Mendonça, F.H., Guimarães, F.S. Intra-hippocampal administration of cycloheximide attenuates the restraint-induced exploratory deficit of an elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 1998, 91(1-2), p. 207-11.

Mielke, S.P., Krishnan, V.V. Estimation of protein secondary structure content directly from NMR spectra using an improved empirical correlation with averaged chemical shift. *Journal of structural and functional genomics*, 2005, 6(4), p. 281-5.

Molloy, M., Herbert, B., Slade, M., Rabilloud, T., Nouwens, A., Williams, K., Gooley, A. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *European journal of biochemistry*, 2000, 267(10), p. 2871-81.

Moss, D.E., Fahrney, D. Anisomycin, acetoxycycloheximide, cycloheximide, and puromycin as inhibitors of rat brain acetylcholinesterase in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 1976, 26(6), p. 1155-7.

Nature [online]. Rat genome unveiled, published online 1 april 2004 [cited: 10 jun 2012]. <URL: <http://www.nature.com/news/2004/040401/full/news040329-11.html>>

OMS. Trastornos neurológicos: desafíos para la salud pública. *Salud Mental*, 2006. p. 29-45.

Piton, A., Michaud, J.L., Peng, H., Aradhya, S., Gauthier, J., Mottron, L., Champagne, N., et al. Mutations in the calcium-related gene *IL1RAPL1* are associated with autism. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(24), p. 3965-74.

Posada, J. A., Buitrago, J. P., Medina, Y., Rodríguez, M. Trastornos de ansiedad según distribución por edad, género, variaciones por regiones, edad de aparición, uso de servicios, estado civil y funcionamiento/discapacidad según el Estudio Nacional de Salud Mental-Colombia. *NOVA-PUBLICACIÓN CIENTÍFICA*, 2006, 4(6), 33-41.

Posch, A. 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation, volume 1. Humana Press, 2008.

Ramirez, V. Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity Underlying Long-Term Memory Formation. *In*: *Neural Plasticity and Memory: From Genes To Brain Imaging*. CRC Press, 2007. p. 47-66.

Rodriguez, C., Bermúdez, F. Memory Reconsolidation or Updating Consolidation? In: Neural Plasticity and Memory: From Genes To Brain Imaging. CRC Press, 2007. p. 209-224.

Sahin, N.O. Proteomics: A New Emerging Area of Biotechnology. In: Pharmaceutical Biotechnology. 2006. p. 83-146.

Samara, A., Vougas, K., Papadopoulou, A., Anastasiadou, E., Baloyanni, N., Paronis, E., Chrousos, G., et al. Proteomics reveal rat hippocampal lateral asymmetry. *Hippocampus*, 2001, 21(1), p. 108-19.

Sanchez, J.C., Hochstrasser, D., Rabilloud, T. In-gel sample rehydration of immobilized pH gradient. In: Methods in Molecular Biology: 2-D Proteome Analysis Protocols. Humana Press, 1999.

Schneider, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., et al. Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactidomycin. *Nat Chem Biol.*, 2010, 6(3), p. 209-217.

Simón, V.M. La participación emocional en la toma de decisiones. *Psicothema*, 1997, 9(3), p. 365-376.

Smejkal, G.B. Proteins Staining in Polyacrylamide Gels. In: Separation Methods in Proteomics. CRC Press, 2006. p. 439-452.

Speicher, D.W. Overview of proteome analysis. In: Proteome Analysis: interpreting the Genome. Vol. 22. Elsevier Inc., 2004. p. 1-18.

Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N. Fundamental Neuroscience. In: Journal of Immunology. 3 ed. Elsevier Inc., 2008.

SWISS-MODEL Repository [online]. P01946: model 3D structure [cited: 13 feb 2012].<URL:http://swissmodel.expasy.org/repository/smr.php?sptr_ac=P01946&cs m=DEF6857594C42A99>

SWISS-MODEL Repository [online]. P35355: model 3D structure [cited: 13 feb 2012].<URL:http://swissmodel.expasy.org/repository/smr.php?sptr_ac=P35355&cs m=98E418825D98FF0C>

SWISS-MODEL Repository [online]. P59824: model 3D structure [cited: 13 feb 2012].<URL:http://swissmodel.expasy.org/repository/smr.php?sptr_ac=P59824&cs m=3684FCCD0A0B3FD9>

Tulving, E. Organization of Memory: quo vadis? In: The cognitive Neurosciences. Cambridge, MA: MIT Press, 1995. p. 839-847.

Tulving, E. Episodic memory: from mind to brain. Annual review of psychology, 2002, 53, p. 1-25.

Vercauteren, F.G.G., Bergeron, J.J.M., Vandesande, F., Arckens, L., Quirion, R. Proteomic approaches in brain research and neuropharmacology. European Journal of Pharmacology, 2004, 500(1-3), p. 385-98.

Witzmann, F.A. Preparation of Mammalian Tissue Samples for Two-Dimensional Electrophoresis. In: The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, 2005. p. 31-35.

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

Xiong, H. Hippocampus and Spatial Memory. In: Neuroimmune Pharmacology. Springer, 2008. p. 55-64.

Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Worley, P.F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. Neuron, 1993, 11: 371-386.

ANEXOS

ANEXO A

Composición de las soluciones utilizadas para el análisis proteómico

Las soluciones detalladas a continuación se prepararon con agua desionizada.

1. Homogenización de los tejidos

Solución *buffer* de lisis

| Componente | Concentración |
|-------------------|---------------|
| Urea | 7 M |
| Tiourea | 2 M |
| Ditiotreitol | 100 mM |
| Tris base | 40 mM |
| EDTA | 1 mM |
| PMSF | 1 mM |
| Anfolitos pH 3-10 | 1,0% (v/v) |
| CHAPS | 4,0% (p/v) |

2. Isoelectroenfoque

Solución *buffer* de rehidratación

| Componente | Concentración |
|--------------------|---------------|
| Urea | 8 M |
| Ditiotreitol | 50 mM |
| Anfolitos pH 3-10 | 0,2% (v/v) |
| CHAPS | 2,0% (p/v) |
| Azul de bromofenol | 0,001% |

Solución de equilibración I

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

Solución de equilibración II

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

3. SDS-PAGE

Solución acrilamida/bis-acrilamida 30%

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

Solución Tris-HCl pH 8,8

| Componente | Concentración |
|---|---------------|
| Tris base | 1,5 M |
| Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado | |

Solución SDS

| Componente | Concentración |
|------------|---------------|
| SDS | 10,0% (p/v) |

Solución de persulfato de amonio

| Componente | Concentración |
|----------------------|---------------|
| Persulfato de amonio | 10,0% (p/v) |

Preparación del gel de separación al 12% (20x20cm)

| Componente | Cantidad |
|-------------------------------|-------------|
| Agua desionizada | 17,6 mL |
| Acrilamida/bis acrilamida 30% | 22,0 mL |
| Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 | 14,3 mL |
| SDS 10% | 550 μ L |
| Persulfato de amonio 10% | 275 μ L |
| TEMED | 110 μ L |

Solución *buffer* de corrida concentrada

| Componente | Concentración |
|------------|---------------|
| Glicina | 1,44% (p/v) |
| Tris base | 0,20% (p/v) |
| SDS | 0.10% (p/v) |

A partir de ésta, se prepara la *buffer* de corrida diluida con agua destilada al 10% (v/v) que se agrega a la cámara de electroforesis para correr la segunda dimensión.

4. Soluciones de tinción con azul de *Coomassie* coloidal

Solución de fijación

| Componente | Concentración |
|-------------------|---------------|
| Metanol | 50,0% (v/v) |
| Ácido o-fosfórico | 2,0% (v/v) |

Solución de incubación o sensibilización

| Componente | Concentración |
|-------------------|---------------|
| Metanol | 33,0% (v/v) |
| Ácido o-fosfórico | 3,0% (v/v) |
| Sulfato de amonio | 17,0% (p/v) |

Solución colorante azul de *Coomassie* (0.06%)

| Componente | Cantidad |
|--------------------------------|----------|
| Azul de <i>Coomassie</i> G-250 | 120 mg |
| Metanol | 20 mL |

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

ANEXO B

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

Inicialmente se preparó un patrón concentrado de BSA de 1 mg/mL a partir del cual se realizaron diluciones para obtener las diferentes concentraciones de BSA con las que se elaboró la curva de calibración (tabla 1).

Tabla 1. Preparación de los patrones de BSA para la curva de calibración.

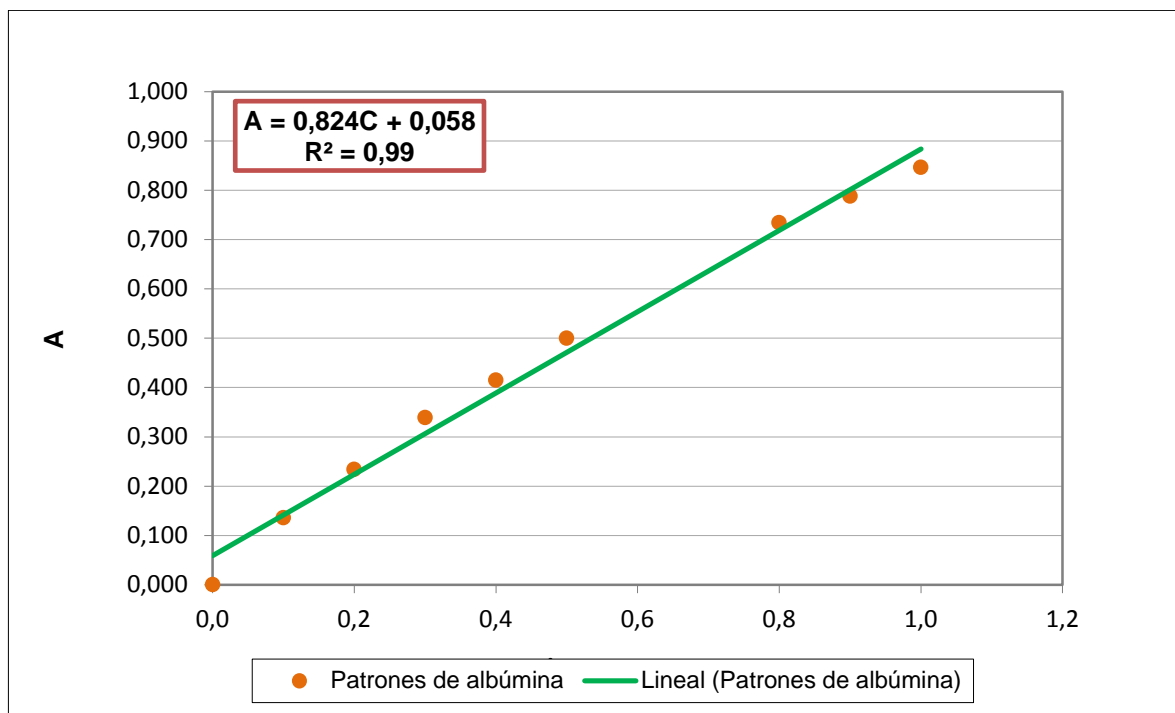
| Concentración (mg/mL) | Patrón concentrado (μL) | Solución <i>buffer</i> de lisis (μL) |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Blanco | 0,0 | 100,0 |
| 0,1 | 10,0 | 90,0 |
| 0,2 | 20,0 | 80,0 |
| 0,3 | 30,0 | 70,0 |
| 0,4 | 40,0 | 60,0 |
| 0,5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

De cada patrón se tomaron 20 μL que fueron diluidos en 1 mL de reactivo de Bradford. Posteriormente, se midieron sus absorbancias y se obtuvo la ecuación para la curva de calibración presentada en la figura 1.

$$C = \frac{A - 0,058}{0.824},$$

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

Figura 1. Curva de calibración patrones de BSA usando el método de Bradford.



Por otro lado, las muestras de hipocampo dorsal fueron diluidas en una relación 1:20 muestra:buffer de lisis, con el objetivo de que sus absorbancias estuvieran dentro del intervalo de la curva de calibración y fuese posible realizar la interpolación para establecer su concentración.

Para medir la absorbancia, al igual que en los patrones, se tomaron 20 μ L de cada muestra diluida más 1 mL de reactivo de Bradford.

En las tablas 2 y 3 se pueden observar las concentraciones de proteínas obtenidas para cada una de las muestras y las combinaciones que finalmente se utilizaron para la electroforesis bidimensional.

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

| GRUPO EXPERIMENTAL | MUESTRA | CONCENTRACIÓN (mg/mL) | | Combinación de proteínas | |
|--------------------|---------|-----------------------|-------------------|--------------------------|---------------------|
| | | Caja-rata | Hipocampo derecho | | Hipocampo izquierdo |
| CONTROL | C1-0 | | 9.15 | 9.83 | C-1 HD |
| | C1-4 | | 11.50 | 6.41 | |
| | C2-1 | | 4.18 | 10.39 | C-1 HI |
| | C2-5 | | 7.65 | 12.72 | |
| | C3-0 | | 7.60 | 4.42 | C-2 HD |
| | C3-5 | | 7.43 | 11.84 | |
| | C4-2 | | 7.74 | 10.65 | C-2 HI |
| | C4-3 | | 9.83 | 8.28 | |
| SS | C1-2 | | 7.87 | 6.92 | SS-1 HD |
| | C1-3 | | 13.08 | 12.76 | |
| | C2-2 | | 4.01 | 1.61 | SS-1 HI |
| | C2-3 | | 6.43 | 5.63 | |
| | C3-2 | | 4.66 | 4.54 | SS-2 HD |
| | C3-3 | | 7.31 | 5.51 | |
| | C4-1 | | 7.67 | 7.45 | SS-2 HI |
| | C4-4 | | 6.87 | 13.81 | |
| CHX | C1-1 | | 5.68 | 6.97 | CHX-1 HD |
| | C1-5 | | 6.07 | 1.73 | |
| | C2-0 | | 5.00 | 3.33 | CHX-1 HI |
| | C2-4 | | 4.83 | 5.78 | |
| | C3-1 | | 8.59 | 8.21 | CHX-2 HD |
| | C3-4 | | 10.05 | 8.23 | |
| | C4-0 | | 8.93 | 13.57 | CHX-2 HI |
| | C4-5 | | 7.57 | 11.38 | |

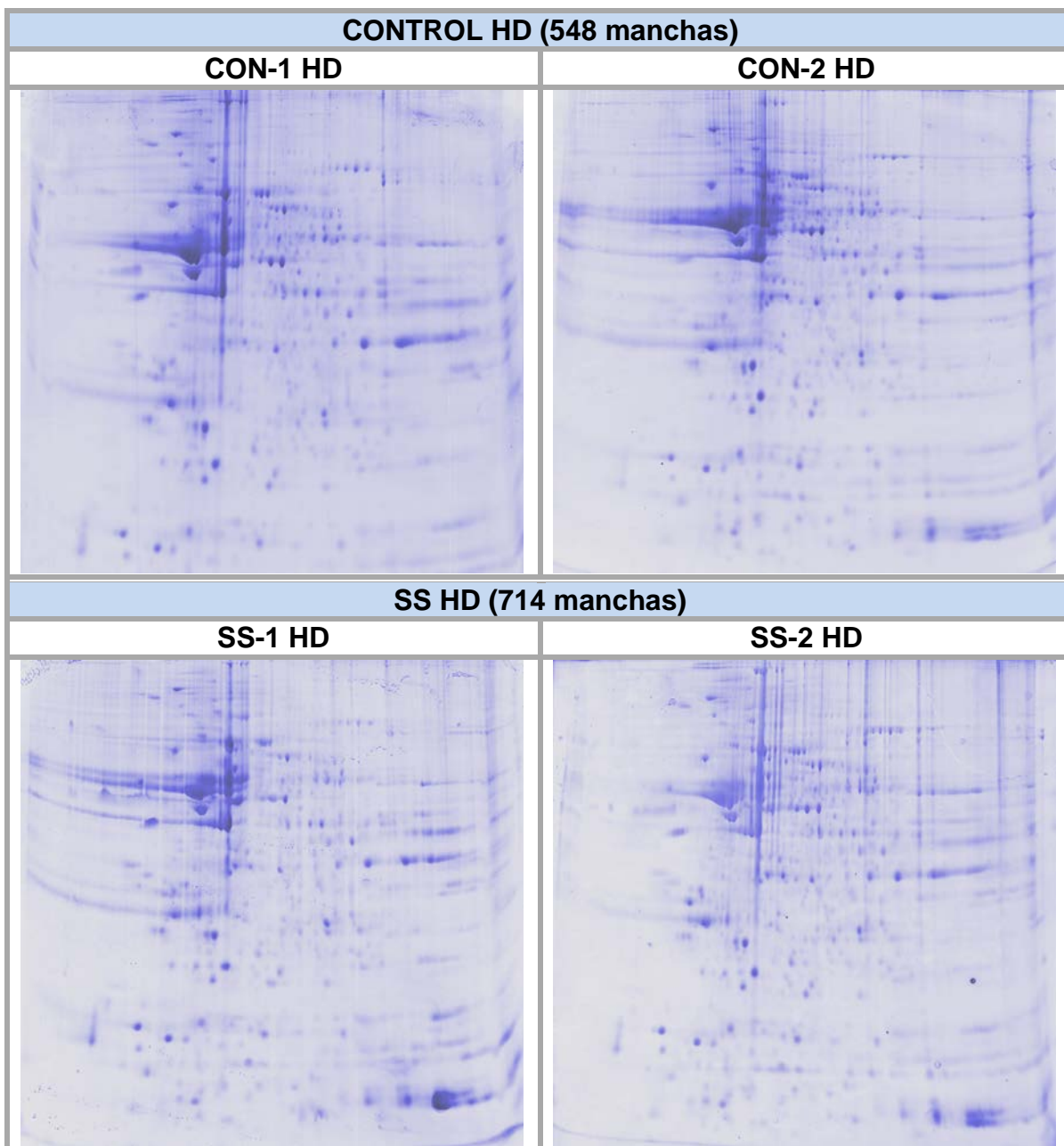
Tabla 3. Concentración de proteínas en las muestras combinadas que se emplearon para electroforesis bidimensional.

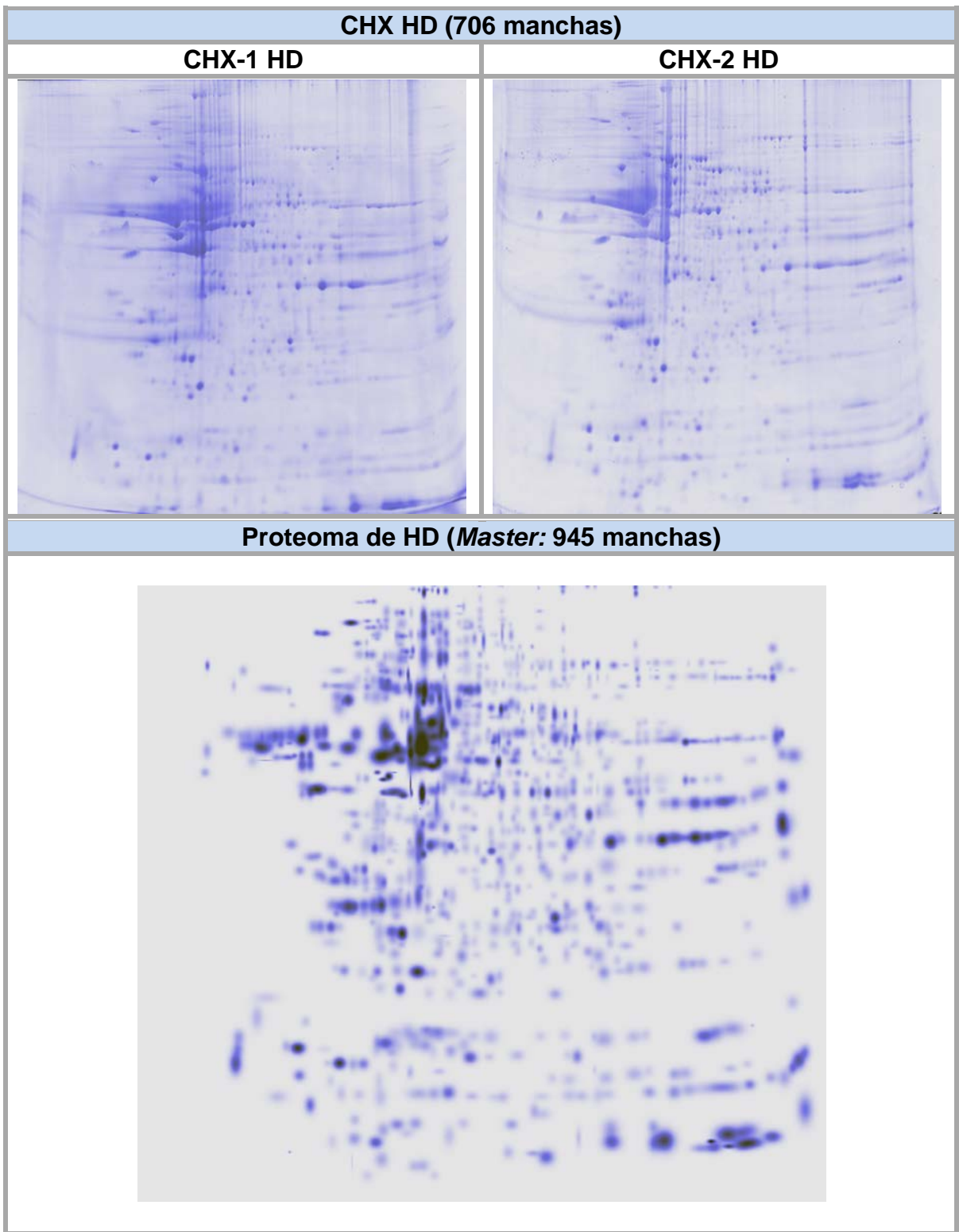
| COMBINACIÓN DE PROTEÍNAS | | | |
|--------------------------|---------|-----------------------|---------------------|
| GRUPO EXPERIMENTAL | MUESTRA | CONCENTRACIÓN (mg/mL) | |
| | | Hipocampo derecho | Hipocampo izquierdo |
| CONTROL | C-1 | 7.45 | 8.57 |
| | C-2 | 8.64 | 7.91 |
| SS | SS-1 | 5.80 | 6.22 |
| | SS-2 | 6.00 | 6.90 |
| CHX | CHX-1 | 6.05 | 6.41 |
| | CHX-2 | 7.74 | 10.19 |

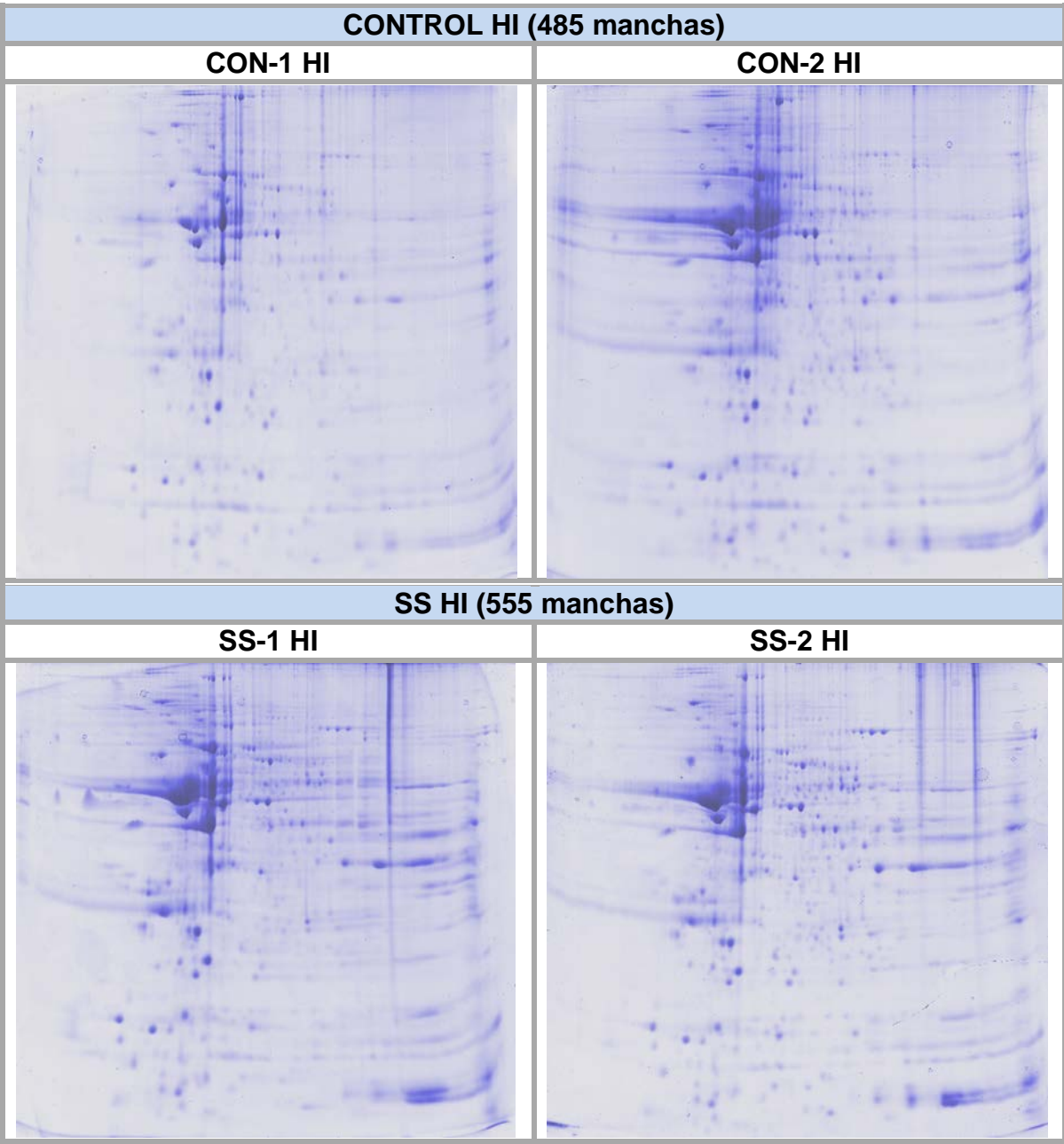
ANEXO C

Proteoma de las doce muestras de hipocampo dorsal que resultaron de la combinación de proteínas

Tiras de isoelectroenfoque de 17 cm; pH 3-10; Peso molecular 200-10 KDa.

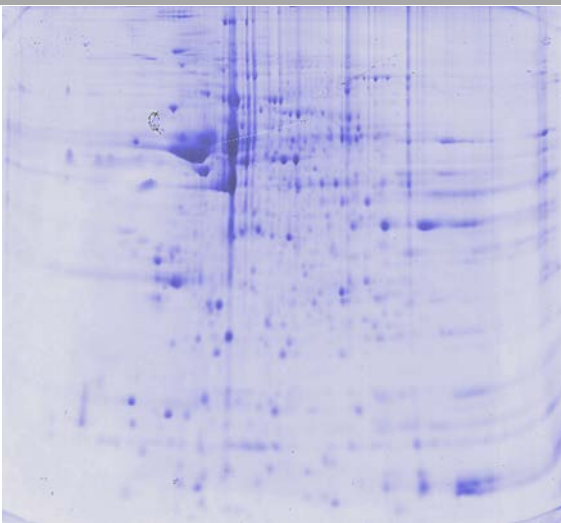




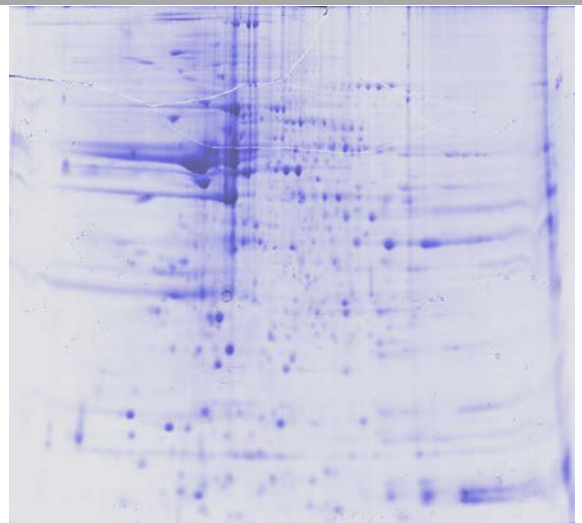


CHX HI (573 manchas)

CHX-1 HI



CHX-2 HI



Proteoma de HI (Master: 796 manchas)

