

**ESTUDIO PROTEÓMICO DEL EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA
MEMORIA ORIGINADA POR LA EXPOSICIÓN AL
LABERINTO EN CRUZ ELEVADO**

VICTOR ALFONSO HERNÁNDEZ RUEDA

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

**ESTUDIO PROTEÓMICO DEL EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE
LA MEMORIA ORIGINADA POR LA EXPOSICIÓN AL
LABERINTO EN CRUZ ELEVADO**

VICTOR ALFONSO HERNÁNDEZ RUEDA

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

DIRECTOR

RODRIGO TORRES SAEZ, Ph. D.
Escuela de Química

CO-DIRECTOR

CARLOS CONDE COTES, Ph. D.
Escuela de Medicina

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

A DIOS, cuya dirección fortalece mi vida

A mis padres, por su amor, esfuerzo y entrega

A mis hermanos y sobrinos como ejemplo de vida

A mis amigos por su cariño sincero y compañía incondicional

*A los profesores y compañeros de los laboratorios de
investigación en Bioquímica y de Neurociencias por su apoyo y respaldo en
la ejecución del proyecto*

Contenido

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO 1: APRENDIZAJE Y MEMORIA	20
1.1. PROCESOS COGNITIVOS: APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	21
1.1.1. Hipocampo y la formación de la memoria.....	23
1.1.2. Mecanismos moleculares en la formación de la memoria.....	26
1.2. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EL ESTUDIO DE LA MEMORIA.....	29
CAPÍTULO 2: LABERINTO EN CRUZ ELEVADO (LCE)	31
2.1. GENERALIDADES DEL LCE COMO MODELO COMPORTAMENTAL	32
2.2. RE-EXPOSICIÓN EN EL LCE	33
2.3. LCE Y LOS PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA	34
CAPÍTULO 3: TÉCNICAS MOLECULARES	37
3.1. INMUNOENSAYOS – ELISA.....	38
3.2. TRANSCRIPCIÓN INVERSA – RT-PCR.....	39
3.3. PROTEÓMICA.....	40
3.3.1. Preparación de muestras	41
3.3.2. Separación de proteínas: Electroforesis 2D-SDS-PAGE.....	42
3.3.3. Espectrometría de Masas.....	45
3.4. ANTECEDENTES EN NEUROPROTEÓMICA	50
CAPÍTULO 4: MATERIALES Y METODOS	53
4.1. ANÁLISIS COMPORTAMENTAL.....	54
4.2. ANÁLISIS DEL NIVEL DE CORTICOSTERONA.....	59
4.3. ANÁLISIS DE TRANSCRIPTOS DEL BDNF.....	60
4.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO.....	60
4.4.1. Preparación de muestras.....	60
4.4.2. Electroforesis 2D-SDS-PAGE.....	62
4.4.3. Espectrometría de Masas.....	65

Contenido

CAPITULO 5: RESULTADOS	68
5.1. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO EN EL LCE	69
5.2. ANÁLISIS DEL NIVEL DE CORTICOSTERONA	71
5.3. ANÁLISIS DE LOS TRANSCRIPTOS DE LOS EXONES I Y II DEL BDNF.....	72
5.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO	74
5.4.1. Análisis 2D SDS-PAGE	74
5.4.2. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF	81
5.4.3. Análisis de factores	86
CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN	94
CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES	110
CAPÍTULO 8: RECOMENDACIONES	113
BIBLIOGRAFÍA	115
ANEXOS	125

Figuras

FIGURAS

Figura 1: Esquema de las principales células, conexiones y flujo de impulsos a través del hipocampo	24
Figura 2: Aspectos moleculares de la potenciación a largo plazo	27
Figura 3: Aspectos moleculares en la formación de nuevas espinas dendríticas	28
Figura 4: Estructura química de la cicloheximida	29
Figura 5: Modelo del mecanismo de inhibición por la cicloheximida	30
Figura 6: Representación esquemática de la electroforesis 2D SDS-PAGE ...	42
Figura 7: Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas	46
Figura 8: Fuente de ionización MALDI	47
Figura 9: Representación esquemática de un espectrómetro de masas MALDI	48
Figura 10: Ratas Wistar dispuestas en cajas vivero	54
Figura 11: Diseño del laberinto en cruz elevado	55
Figura 12: Diseño del procedimiento experimental	57
Figura 13: Distribución de los brazos del laberinto para el registro de datos	58
Figura 14: Representación del análisis mediante el programa PD-Quest	66
Figura 15: Análisis de los parámetros temporales de comportamiento en el LCE	70
Figura 16: Análisis de la frecuencia de entradas en cada tipo de brazo del LCE	72
Figura 17: Valoración de la actividad locomotora y evaluación del riesgo	73

Figuras

Figura 18: Evaluación del nivel de corticosterona	73
Figura 19: Evaluación de los transcritos de los exones I y II del BDNF	74
Figura 20: Correlación lineal entre los spots de los grupos experimentales ...	75
Figura 21: Funciones de las proteínas identificadas por MALDI-TOF	86
Figura 22: Imagen master de los hemisferios cerebrales del hipocampo	87
Figura 23: Representación de los exones del BDNF	104

Tablas

TABLAS

Tabla 1: Variables y niveles del diseño experimental	56
Tabla 2: Protocolo de amplificación de los transcritos del BDNF	60
Tabla 3: Protocolo de separación de proteínas en el isoelectroenfoque	62
Tabla 4: Experimentos generados en el software PD-Quest	64
Tabla 5: Distribución de las imágenes en los diferentes experimentos del software PD-Quest	75
Tabla 6: Resumen general datos de los spots en el hipocampo derecho	76
Tabla 7: Resumen general datos de los spots en el hipocampo izquierdo	77
Tabla 8: Cantidad total de spots detectados en cada grupo experimental	78
Tabla 9: Análisis comparativo entre los diferentes grupos experimentales	81
Tabla 10: Proteínas del hipocampo de ratas Wistar que mostraron variaciones durante el proceso de re-exposición al LCE	82
Tabla 11: Proteínas identificadas y agrupadas por factores en cada región del hipocampo	88
Tabla 12: Variaciones que mostraron las proteínas agrupadas por factores en el hipocampo derecho	92
Tabla 13: Variaciones que mostraron las proteínas agrupadas por factores en el hipocampo izquierdo	93

Anexos

ANEXOS

Anexo A: Composición de las soluciones empleadas en electroforesis	126
Anexo B: Curva de calibración de proteínas	128
Anexo C: Análisis de factores: Correlación de Pearson	129

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BA	Brazo abierto del laberinto
BC	Brazo cerrado del laberinto
BSA	Albumina de suero bovino
BZP	Benzodiazepina
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamino]-1- propano sulfonato
CHX	Cicloheximida
CaMKII	Proteína quinasa calcio/calmodulina tipo II
CREB	Proteína enlazante al elemento de respuesta del AMPc
CRUZ	Cruzamientos realizados en el laberinto
DTT	Ditiotreitol
EBA	Entradas al brazo abierto
EBC	Entradas al brazo cerrado
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ESI	Ionización electrospray
FL34	Frecuencia de cruzamientos de la posición 3 a la posición 4
HCCA	Ácido α -hidroxi-cinnamico
HD	Hipocampo derecho
HI	Hipocampo izquierdo
H.M.	Paciente Henry Molaison
IEF	Isoelectroenfoque
ISP	Inhibidores de la síntesis de proteínas
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
LCE	Laberinto en cruz elevado
MALDI	Desorción/ionización laser asistida por matriz

Abreviaturas

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MS	Espectrometría de masas
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLP	Potenciación a largo plazo
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RT-PCR	Transcripción reversa unida a PCR
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SS	Solución salina
S1	Primera exposición al laberinto
S2	Segunda exposición al laberinto
SSP	Código interno generado en el análisis de imágenes
TBA	Tiempo en el brazo abierto del laberinto
TBC	Tiempo en el brazo cerrado del laberinto
TC	Tiempo en la plataforma central del laberinto
TOF	Tiempo de vuelo
%EBA	Valor relativo de las entradas al brazo abierto
%EBC	Valor relativo de las entradas al brazo cerrado
%TBA	Valor relativo del tiempo en el brazo abierto
%TBC	Valor relativo del tiempo en el brazo cerrado
%TC	Valor relativo del tiempo en la plataforma central

Resumen

RESUMEN

Título: Estudio proteómico del efecto de la cicloheximida sobre la memoria originada por la exposición al laberinto en cruz elevado *

Autor: Victor Alfonso Hernández Rueda **

Palabras clave: Aprendizaje, memoria, hipocampo, electroforesis 2D SDS-PAGE

Descripción:

La formación de la memoria origina alteraciones neurofisiológicas que requieren la síntesis de proteínas. Las ratas re-expuestas al laberinto en cruz elevado muestran cambios en el comportamiento debido a la recuperación del aprendizaje aversivo asociado con la exploración inicial. Además, la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal promueve la recuperación del efecto ansiolítico de los fármacos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la cicloheximida sobre el comportamiento evaluando los procesos de adquisición y consolidación de la memoria, y sobre la síntesis de proteínas en el hipocampo de ratas re-expuestas al laberinto en cruz elevado.

Las ratas fueron inyectadas con cicloheximida (3 mg / kg, ip) 30 min antes o inmediatamente después de la primera experiencia en el laberinto. La re-exposición se realizó en dos intervalos de tiempo, 3 h o 24 h después de la primera exposición. Las ratas se decapitaron y el hipocampo se extrajo y se homogenizó en tampón de lisis. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford y se separaron por electroforesis 2D SDS-PAGE. Los geles fueron escaneados y las imágenes se analizaron con el software PD-Quest.

Las proteínas que mostraron diferencias en los niveles de expresión se analizaron por MALDI-TOF MS y se identificaron en las bases de datos empleando el buscador Mascot. Proteínas expresadas diferencialmente se determinaron en los hemisferios izquierdo y derecho del hipocampo. Se encontró mayor expresión de las proteínas cuando las ratas se re-exponen en intervalos de 24 horas, que puede correlacionarse con un efecto amnésico de cicloheximida. Por último, se encontraron variaciones en la síntesis de proteínas y éstas se pueden vincular a la consolidación de la información adquirida, lo que demuestra que se requiere la síntesis de proteínas para la consolidación del aprendizaje asociado con la exploración inicial del laberinto.

*proyecto de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Maestría en Química. Director: Rodrigo Torres Sáez
Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Codirector: Carlos Conde Cotes

Abstract

ABSTRACT

Title: Proteomic study of cycloheximide effect on memory of Wistar rats caused by exposure to elevated plus maze*

Author: Victor Alfonso Hernández Rueda**

Keywords: Learning, Memory, hippocampus, 2D SDS-PAGE electrophoresis

Description:

Memory formation originates neurophysiological alterations requiring protein synthesis. Rats re-exposed to the elevated plus maze (EPM) exhibit behavioral changes due to the recovery of aversion learning associated with the initial exploration. In addition, inhibition of protein synthesis in the dorsal hippocampus promotes recovery drugs anxiolytic effect. This study was aimed to evaluate cycloheximide effect in both behavioral evaluating acquisition and consolidation processes, and protein synthesis in the rat hippocampus re-exposed to the EPM.

Rats were injected with cycloheximide (3 mg/kg, i.p.) 30 min before or immediately after the first experience in the maze. The re-exposure was done in two time intervals, 3 h or 24 h after the first event. Rats were decapitated and hippocampus was removed and homogenized in lysis buffer. The proteins were quantified by the Bradford method and separated by 2D SDS-PAGE electrophoresis. Gels were scanned and the acquired images were analyzed using the PD-Quest software.

Spot proteins showing different expression levels were analyzed by MALDI-TOF/TOF MS and identified by Mascot. Differentially expressed proteins were determined in the left and right hemispheres from hippocampus. We found higher expression of proteins when rats were re-exposure to intervals of 24 hours, which can be correlated with an amnesic effect of cycloheximide. Finally, we found variations in protein syntheses were found and these can be linked to the consolidation of the acquired information, which shows that protein synthesis is required for consolidation of learning associated with the initial exploration of the EPM.

*Project grade

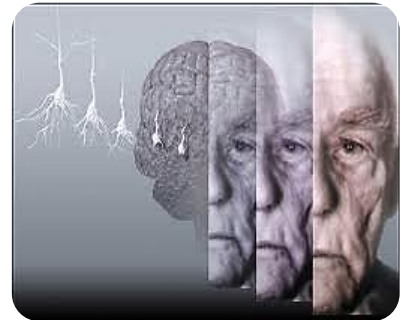
**Faculty of Sciences. School of Chemistry. Master in Chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez
Faculty of Health. School of Medicine. Co-Director: Carlos Conde Cotes

Introducción

“La naturaleza benigna provee de manera que en cualquier parte hallés algo que aprender.”

Leonardo Da Vinci

INTRODUCCIÓN



Introducción

En las últimas décadas ha sido de gran interés conocer los mecanismos moleculares asociados a los circuitos neurales que participan en los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria. Esto se debe al deterioro que presentan dichas funciones cognitivas en diversos trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas. La investigación en esta área del conocimiento ha descrito que la formación de las memorias requiere de varias fases: adquisición, consolidación, evocación y re-consolidación, en las cuales participan diversos mecanismos moleculares mediados por proteínas y están asociadas al proceso de plasticidad sináptica.

En el estudio de la formación de las memorias han sido ampliamente utilizados los inhibidores de la síntesis de proteínas, principalmente cicloheximida y anisomicina, con el fin de conocer como participan dichas macromoléculas en la formación de las memorias. Esto se ha logrado, pues el uso de los inhibidores origina alteraciones conductuales en tareas de aprendizaje y memoria afectando diferencialmente los procesos de su formación. Dichos estudios han establecido que, mientras manipulaciones previas y posteriores muy cercanas al evento de partida alteran la adquisición y la consolidación de la información, respectivamente; las manipulaciones previas a una segunda experiencia alteran la evocación.

Al utilizar los inhibidores de la síntesis de proteínas en diferentes especies animales y variados modelos comportamentales, específicos al estudio de la memoria, se ha demostrado la participación de la síntesis de proteínas en la formación de la memoria a largo plazo. En este caso, diversas investigaciones han determinado la intervención de varias vías de señalización, especialmente las vías de las quinasas *PKA*, *PKC*, *ERK* y *CaMKII*, en la consolidación de la memoria a largo plazo. Varias de estas vías se interconectan y llevan a la activación de factores de transcripción como *CREB*; mecanismo que induce la expresión de genes inmediato-tempranos como *c-fos*, *Arc*, *zif268* y *BDNF*, siendo estos últimos indicadores de actividad neuronal vinculada, en parte, a la formación de las memorias. Además, se

Introducción

ha determinado que el *BDNF* (factor neurotrófico derivado del cerebro) ejerce un rol central en la formación de la memoria a largo plazo, dada su participación en el crecimiento de las dendritas y el establecimiento de nuevas conexiones neuronales.

Por otra parte, se ha determinado que a nivel neuro-anatómico; el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral son estructuras participantes en los procesos de adquisición y consolidación de las memorias. En el caso del hipocampo, este se divide funcionalmente en las regiones dorsal y ventral, estando cada región asociada a un conjunto distinto de comportamientos. Se ha definido que el hipocampo dorsal participa preferentemente del aprendizaje y la memoria espacial, mientras que el hipocampo ventral se asocia principalmente a los comportamientos relacionados con la ansiedad.

Para conocer los mecanismos neuro-moleculares que describen los procesos de aprendizaje y memoria, se hace uso de modelos animales y constructos conductuales que permiten la ejecución de tareas asociadas a estos procesos. En el caso del laberinto en cruz elevado (LCE), aunque es un modelo animal validado mediante parámetros etológicos, fisiológicos y farmacológicos para el estudio de la ansiedad, se ha demostrado que los animales re-expuestos a este modelo presentan cambios en su desempeño comportamental e inclusive resistencia al efecto ansiolítico de las benzodiazepinas, fenómeno conocido como “*one trial tolerance-OTT*”. Este hecho ha sido asociado a un proceso de aprendizaje aversivo respecto a la primera exposición, argumentándose que la información sensorial adquirida durante esta experiencia es consolidada y posteriormente evocada durante la re-exposición; lo cual origina la variación a nivel conductual y en la respuesta farmacológica.

Tomando en cuenta estos aspectos se encuentra que subyacen procesos moleculares vinculados a la formación de memorias asociadas a la experiencia que tiene el roedor en el LCE; pues se ha descrito que frente a un nuevo estímulo y/o medio ambiente el animal adquiere información sensorial que seguidamente es

Introducción

consolidada o almacenada y, finalmente evocada para enfrentar una situación posterior similar al evento inicial. Por lo cual, se ha planteado que los cambios de comportamiento y la resistencia al efecto de drogas tipo ansiolítico observados en roedores re-expuestos al modelo del LCE estarían asociados a la recuperación de la memoria aversiva originada por la experiencia previa. Estas alteraciones encontradas durante la segunda exposición han sido estudiadas a nivel conductual tomando en cuenta diferentes variables del proceso; tiempo de la primera experiencia, intervalo entre las sesiones, tipo y concentración del fármaco ansiolítico, la desactivación de estructuras cerebrales vinculadas con el proceso de formación de las memorias (hipocampo, amígdala, corteza), entre otras; encontrando que las variaciones a nivel conductual y en la respuesta farmacológica dependen directamente del tipo de experiencia.

Sin embargo, no se ha establecido de forma directa la participación de los componentes moleculares asociados a la formación de memorias, específicamente la expresión de transcritos y la síntesis de proteínas, empleando el laberinto en cruz elevado como modelo conductual. Además, considerando que el hipocampo dorsal participa preferentemente en los procesos de aprendizaje y memoria, se planteó evaluar a nivel conductual y a nivel molecular en el hipocampo dorsal de ratas Wistar el efecto de la administración sistémica de cicloheximida, como inhibidor de síntesis de proteínas, sobre los procesos de adquisición y consolidación de la memoria originada por la primera experiencia en el laberinto en cruz elevado. Para ello, se consideró que las manipulaciones previas a la experiencia modifican el proceso de adquisición de información, por lo cual se administró el tratamiento 30 min antes de la primera exposición al laberinto y que manipulaciones cercanas posteriores a la experiencia inicial modifican el proceso de consolidación, por lo cual se administró el tratamiento inmediatamente después de ésta primera exposición. La evaluación de los efectos conductuales se puede observar con la re-exposición al laberinto y para ello, se consideró la evaluación temporal de la memoria; memoria a corto plazo evaluada 3 horas posterior al primer evento y memoria a largo plazo evaluada 24 horas posterior al evento inicial.

Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

*“Somos nuestra memoria, somos ese químerico museo de formas inconstantes,
ese montón de espejos rotos”*

Jorge Luis Borges

Capítulo 1

APRENDIZAJE Y MEMORIA



Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

1.1. Procesos cognitivos: Aprendizaje y memoria

El desarrollo de nuevos conocimientos requiere de la habilidad para asimilar y procesar la información adquirida a partir de la experiencia. Para ello, diferentes procesos neurales o “procesos cognitivos” como la inteligencia, la atención, el aprendizaje, la memoria y el lenguaje son activados para incorporar los nuevos conocimientos. Enfatizando en los procesos de aprendizaje y memoria; la investigación animal describe el aprendizaje como un proceso continuo, en el cual las respuestas del organismo se modifican como resultado de la experiencia y permite a los individuos la adaptación al medio ambiente. No obstante, un aprendizaje es evidenciado, solo sí, ha sido almacenado en la memoria; por lo cual se define la memoria como un proceso cognitivo que permite codificar, almacenar y recuperar la información proporcionada por los sentidos respecto a una situación y/o ambiente específico (Reilly et al., 2013; Morgado, 2011).

En general, se habla de dos tipos de aprendizaje: el aprendizaje asociativo y el aprendizaje no asociativo. En el primero, se origina un cambio conductual producto de la exposición repetida a dos estímulos relacionados por su contigüidad temporal, en el cual se destacan el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante. En el segundo, el cambio conductual es consecuencia de la exposición repetida a un estímulo independiente; este es el caso de la habituación, donde la respuesta conductual se hace cada vez menos intensa frente al estímulo repetitivo. Otros fenómenos más complejos de aprendizaje han sido incluidos en una categoría denominada cognición animal, ya que suponen un nivel distinto de organización de la conducta, tal como ocurre en el caso del aprendizaje espacial (Reilly et al., 2013; Aparicio, 1990).

La memoria puede ser clasificada en función de su alcance temporal y de acuerdo con su contenido. Según el alcance temporal, la memoria se clasifica en *memoria a corto plazo*, la cual es consecuencia de la sensibilización transitoria de la sinapsis; y *memoria a largo plazo*, la cual se origina como resultado del

Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

reforzamiento permanente de la sinapsis debido a la activación genética y la síntesis de proteínas. Según el contenido, la memoria se divide en *memoria no declarativa o implícita* también llamada memoria de procedimiento, por lo cual no requiere de la intención para ser adquirida ni recuperada; y la *memoria declarativa o explícita*, la cual es adquirida y se accede a ella de forma activa, deliberada y consciente. La memoria declarativa está constituida por los subsistemas de la *memoria episódica*, la cual almacena los eventos recientes y/o remotos relacionados con la experiencia del individuo en contextos espacio-temporales específicos; y la *memoria semántica*, en donde son almacenados las representaciones y significados de palabras, conceptos y conocimiento en general (Reilly et al., 2013; Eichenbaum, 2003, 1999).

La formación de la memoria entendida como un proceso requiere de varias fases: la fase de *adquisición* de información a través de los órganos sensoriales, seguida de la fase de *consolidación* mediante la estabilización de los cambios sinápticos a través de la síntesis de proteínas. El acceso a la información se hace mediante la fase de *evocación*, en la cual la información almacenada se integra con los nuevos conocimientos, seguida de la fase de *re-consolidación* de los recuerdos activados y finalmente, la fase de *olvido* lleva a la pérdida de la información (Morgado, 2011). Durante los periodos de adquisición y consolidación, la memoria es susceptible de ser manipulada por el uso de agentes farmacológicos de acción central y periférica, tales como: glucocorticoides, adrenalina, noradrenalina, inhibidores de la síntesis de proteínas; y mediante agentes físicos externos como choques electro-convulsivos o tratamientos hipotérmicos, de manera que el proceso evocación de la memoria es alterado (Sadowski et al., 2011).

En síntesis, una tarea es adquirida cuando el sujeto aprende la relación entre diferentes estímulos o adquiere las habilidades necesarias para responder adecuadamente a los estímulos externos. Esta fase se ha estudiado en múltiples modelos experimentales de condicionamiento clásico y operante, así como en tareas de aprendizaje espacial. El periodo de consolidación inicia luego de producirse el aprendizaje y finaliza cuando la memoria se establece definitivamente. La evocación

Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

implica la activación de la información previamente almacenada y de la manifestación de las respuestas conductuales que evidencian su aprendizaje a partir de las demandas que le presenta el ambiente.

1.1.1. Hipocampo y la formación de la memoria

El hipocampo es una estructura simétrica ubicada al interior del lóbulo temporal medial sobre ambos hemisferios del cerebro. 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) 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. El flujo de información a través del hipocampo procede del giro dentado y desde allí fluye hacia las regiones CA3 y CA1 hasta llegar al subículo, formando así el principal circuito trisináptico intrínseco (Xiong, 2008).

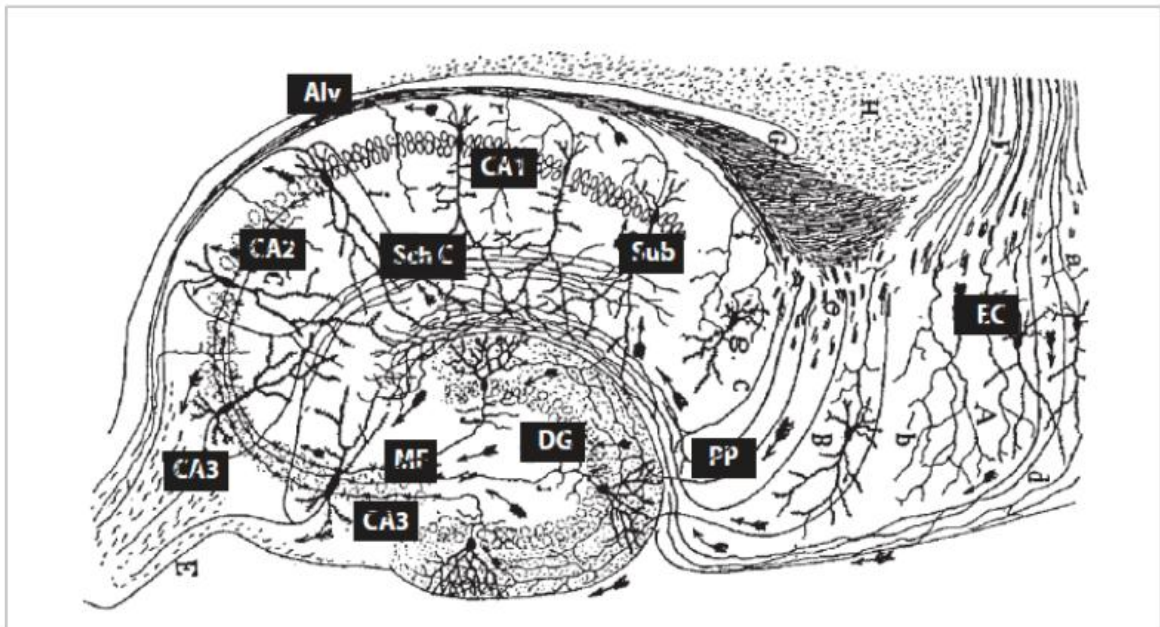
La anatomía del hipocampo en roedores fue extensamente estudiada por Cajal, estableciendo las conexiones y el flujo de los impulsos que se transportan en la formación hipocampal (Fig. 1). Se ha descrito que el hipocampo tiene un rol general en el procesamiento de la información y la subsecuente regulación del comportamiento, por lo cual, se ha subdividido funcionalmente en las regiones dorsal y ventral, cada una asociada a un conjunto distinto de comportamientos; el hipocampo dorsal participa preferentemente del aprendizaje y la memoria espacial, y el hipocampo ventral se asocia principalmente a los comportamientos relacionados con la ansiedad (Bertoglio et al., 2006; Bannerman et al., 2004).

A partir de estudios neurológicos de pacientes con daño o lesión en una región específica del cerebro, se ha conocido que la consolidación de la memoria ocurre de forma progresiva en la escala de tiempo. Este proceso se ha denominado consolidación a nivel de sistemas y puede tomar semanas, meses e incluso años en ser completada. En la década de 1950, al paciente conocido como H.M. le fue removido de forma bilateral el lóbulo temporal medial como tratamiento de la

Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

epilepsia. La cirugía fue exitosa, pero el paciente H.M. sufrió una profunda amnesia; exhibió amnesia anterógrada, es decir, perdió de la capacidad de adquirir nuevas memorias respecto a personas, eventos y lugares. De esta forma le fue afectada la memoria declarativa en sus representaciones de memoria episódica y memoria semántica (Suzuki et al, 2000).

Figura 1. Esquema de las principales células, conexiones y flujo de impulsos a través del hipocampo



Fuente: Xiong, 2008.

Además, H.M. sufrió amnesia retrograda aunque no de forma completa; perdió las memorias de eventos recientes, de meses o de algunos años antes de la cirugía. Sin embargo, mantuvo los recuerdos de eventos fechados once años antes de la operación. Esta observación permitió vincular el lóbulo temporal medial en la consolidación de la memoria a largo plazo y se determinó que el grado de la amnesia esta correlacionada con la extensión del daño a esta región del cerebro. Incluso, permitió concluir que el hipocampo y las estructuras relacionadas están aún activas en el proceso de consolidación durante semanas, meses o años después de la formación inicial de la memoria (Suzuki et al, 2000).

Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

Se ha postulado que la consolidación a nivel de sistemas involucra la reorganización gradual de los circuitos del cerebro y quizás hay transferencia de las memorias recientes a algunas áreas corticales para el almacenamiento permanente. La investigación en décadas pasadas indica que el daño a la estructura hipocampal afecta principalmente las memorias recientes, mientras el daño a la neocorteza afecta las memorias más remotas. Lo cual indica, que el hipocampo juega un rol limitado en el tiempo en la consolidación de nuevas memorias lábiles hacia memorias a largo plazo más estables, las cuales son eventualmente almacenadas en la corteza (Reilly et al., 2013)

Estudios basados en lesiones de la neocorteza, incluyendo la corteza prefrontal, han evidenciado que se producen daños en la consolidación y el almacenamiento de la memoria. Así, las nuevas memorias son inicialmente procesadas en las interconexiones hipocampo-corteza, y para ello el hipocampo conduce la co-activación de varios módulos corticales transfiriendo gradualmente la información a la corteza prefrontal. Sin embargo, se ha sugerido que la consolidación cortical es un proceso lento y gradual, en este aspecto, el hipocampo puede servir como un sistema temporal de las memorias corticales. La consolidación de estas memorias depende del fortalecimiento gradual de las conexiones corticales, lo cual ocurre en función de la reactivación del hipocampo. Una vez las conexiones corticales se consolidan fuertemente las memorias pueden permanecer estables aún en ausencia del hipocampo (Dash et al., 2004).

Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

1.1.2. Mecanismos moleculares en la formación de la memoria

La búsqueda de los mecanismos a nivel molecular y celular que describen los procesos de aprendizaje y memoria, ha tenido grandes progresos al usar la potenciación a largo plazo (*PLP*) como modelo experimental. La *PLP* constituye un incremento persistente en la fuerza de la sinapsis, posterior a la estimulación de elevada frecuencia de una sinapsis química. Diversos experimentos muestran que el aprendizaje induce cambios moleculares relacionados con la plasticidad neuronal en la corteza cerebral y el hipocampo (Stanton et al., 1984). Estudios sobre la iniciación y el mantenimiento de la plasticidad sináptica, principalmente en las neuronas piramidales CA1 del hipocampo, han mostrado que ciertos tipos de aprendizaje y la *PLP* inducida artificialmente pueden producir incrementos o cambios morfológicos en las espinas dendríticas, originando nuevas sinapsis o fortaleciendo las sinapsis existentes, lo cual constituye la principal base estructural de la memoria (Frey et al., 1988).

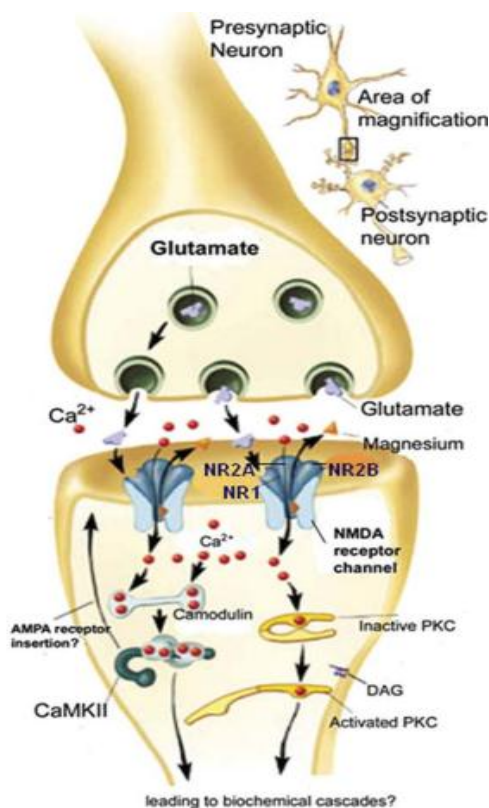
El mecanismo molecular que describe este proceso (Fig. 2) inicia cuando las neuronas pre-sinápticas liberan glutamato y activan los receptores ionotrópicos de *AMPA* (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico). Los receptores activados permiten la entrada de iones Na^+ , lo cual despolariza la neurona post-sináptica. Esta despolarización induce el incremento en la concentración intracelular de iones Ca^{2+} mediante diferentes mecanismos: la activación de los receptores de *NMDA*, la activación de canales dependientes de voltaje y la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares (Alberini et al., 2005; Ahí et al., 2004; Abel et al., 2001).

El mecanismo de señalización continúa cuando el calcio intracelular se une a la calmodulina y el complejo Ca/calmodulina activa la proteína quinasa *CaMKII*. Seguidamente, las proteínas quinasas *PKC* y *MAP* son activadas y participan en la expresión de la *PLP*. Esta modificación de la plasticidad sináptica dependiente de

Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

fosforilación es capaz de soportar la *PLP* por 1-3 horas, periodo conocido como la fase temprana de la *PLP*. El estudio de estas vías de señalización ha proporcionado la evidencia más convincente para ser el mediador principal en la regulación de la fase temprana de la *PLP* y la formación de la memoria (Bonini et al., 2007; Ahí et al., 2004).

Figura 2. Aspectos moleculares de la *PLP*.



Fuente: Wang *et al.*, 2006

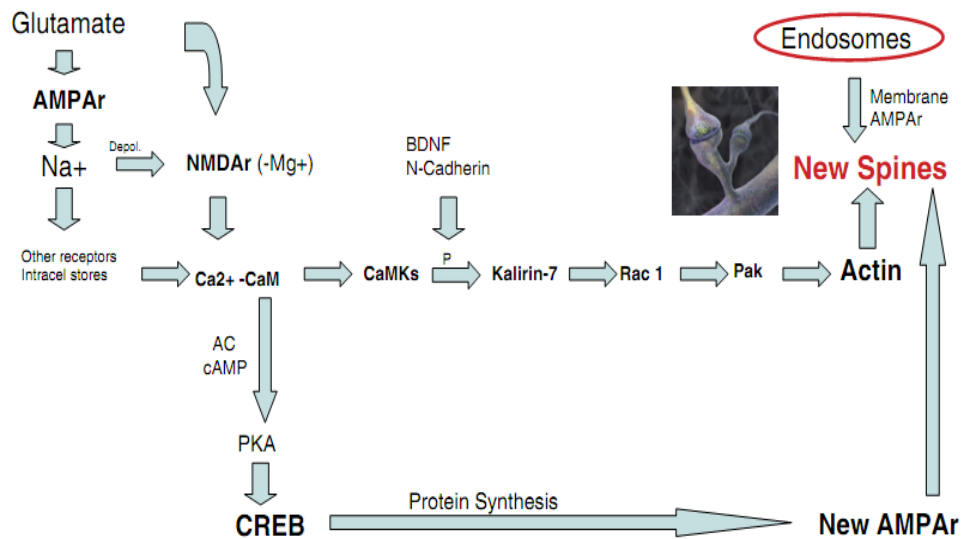
Sin embargo, para mantener la potenciación sináptica las vías de la proteína quinasa A (*PKA*) y *ERK* son activadas. Esta etapa se conoce como la fase tardía de la *PLP* y conduce a la expresión génica y la síntesis de proteínas activada por la proteína enlazante al elemento de respuesta de *AMPc* (*CREB*). En este contexto, estudios a nivel genético y farmacológico han demostrado que el condicionamiento, una tarea de aprendizaje dependiente del hipocampo es regulada por el *AMPc* (Abel et al., 2008). Estudios sobre la memoria del miedo contextual a largo plazo, han concluido que la ubicación espacial y temporal de la vía de señalización de la *PKA* hipocampal es especialmente decisiva en las fases de consolidación y extinción, pero

Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

no en las fases de adquisición y evocación (Nijholt et al., 2008). Igualmente, en tareas de evitación inhibitoria se evidencia que la *PKA* y *MAPK* son requeridas en la formación de la memoria a corto plazo y que la memoria a largo plazo depende de la actividad de la *PKA* y la síntesis de proteínas durante el periodo temprano post-entrenamiento (Quevedo et al., 2004).

Además, estudios sobre la activación de la proteína quinasa *CaMKII* han concluido que cambios morfológicos son inducidos en el citoesqueleto de la neurona; nuevas espinas dendríticas o el alargamiento persistente de sus extremos pocos minutos después de la activación son producidos. Dichos cambios han sido evidentes mediante experimentos con cultivos hipocampales mostrando que la fuente de membrana para la formación de la nueva espina dendrítica o el alargamiento de las espinas existentes podrían ser endosomas reciclados, formados vía endocitosis, que contienen receptores de *AMPA*. En pocas horas estos receptores son insertados en las membranas de las nuevas espinas y su activación disminuye el crecimiento y estabiliza la forma de la espina, proporcionando un mecanismo entre la inducción y la expresión de la plasticidad sináptica (Fig. 3) (Morgado, 2011).

Figura 3. Aspectos moleculares en la formación de nuevas espinas.

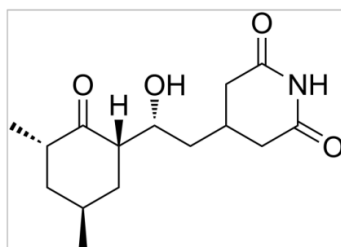


Fuente: Morgado, 2011

1.2. Inhibidores de la síntesis de proteínas en el estudio de la memoria

Cicloheximida y anisomicina son inhibidores de la síntesis de proteínas (ISPs) utilizados para determinar la importancia del proceso de traducción en varias respuestas biológicas, particularmente la memoria (Cohen et al., 2006; Desgranges et al., 2008; Moss et al., 1976). La cicloheximida (CHX), un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces griseus*, es utilizada principalmente como una herramienta experimental que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas y previene la formación de hongos en cultivos bacterianos (Franklin et al., 2005). La CHX tiene la estructura química 3-[2-(3,5-dimetil-2-oxociclohexil)-2-hidroxietil] glutarimida (Fig. 7), siendo el grupo glutarimida el que podría jugar un papel clave en la actividad biológica de la CHX (Poetsch et al., 2010).

Figura 4. Estructura química de la cicloheximida.



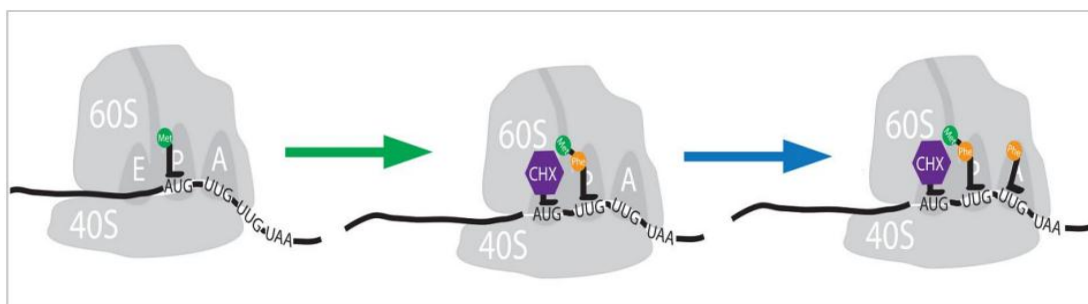
Fuente: Poetsch et al., 2010

Diversos estudios indican que la CHX actúa específicamente sobre la subunidad 60S de los ribosomas eucariontes, interfiriendo con la actividad de la péptidil transferasa y bloquea la translocación del peptidil tRNA del sitio A al sitio P. 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 (Fig. 8) (Franklin et al., 2005). Sin embargo, el sitio de unión exacto de la CHX sigue siendo desconocido, pues no es claro si ésta interactúa directamente o si la inhibición de la translocación resulta de un efecto indirecto.

Capítulo 1: Aprendizaje y memoria

El efecto de los ISPs se establece a partir de la amnesia originada en ciertas tareas conductuales que involucran los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria (Gold, 2008). No obstante, la amnesia retrógrada consecuencia del proceso de inhibición de la síntesis de proteínas cerebrales ha tenido diferentes interpretaciones. Se ha sugerido que es un fracaso de la consolidación o el deterioro de un mecanismo de recuperación; que la síntesis de proteínas juega un papel constitutivo en la formación de la memoria, proporcionando proteínas previo a una experiencia y puede ser activado por el entrenamiento; que la síntesis de proteínas puede ser necesaria para reemplazar las proteínas disponibles antes de aprender, pero 'consumidas' por el aprendizaje; que la inhibición de la síntesis de proteínas afecta el bienestar de las neuronas, lo que lleva a la incapacidad de entregar los recursos necesarios para la formación de la memoria y, que la inhibición de la síntesis de proteínas resulta en funciones neuronales anormales que interfieren con la memoria (Hernández, 2008; Gold, 2008).

Figura 5. Modelo del mecanismo de inhibición de la elongación de las cadenas polipeptídicas por la CHX.



Fuente: Poetsch *et al.*, 2010.

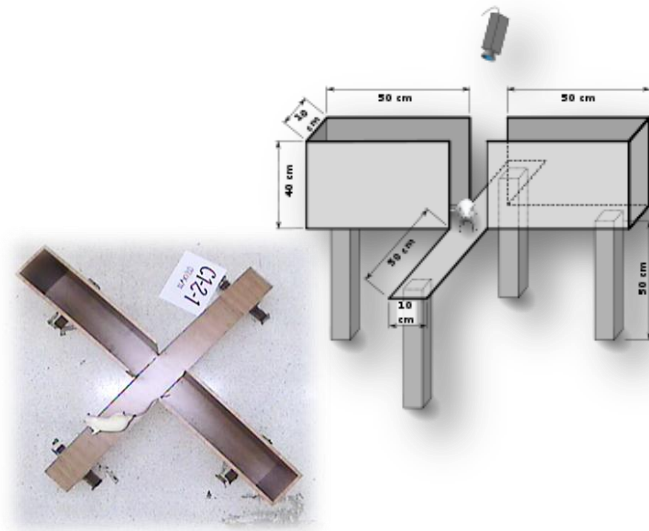
Además, debido a los efectos no deseados de los inhibidores de la síntesis de proteínas, se ha originado un debate en torno a si la síntesis de proteínas es necesaria, o incluso contribuya a la formación y almacenamiento de la memoria (Helmstetter *et al.*, 2010; Alberini, 2008). A pesar de ello, se ha establecido que la síntesis de proteínas sirve como disparador para la consolidación de la memoria siendo el evento inicial en la formación de la memoria a largo plazo (Klann *et al.*, 2008).

“El comportamiento es un espejo en el que cada uno muestra su imagen”

Goethe

Capítulo 2

LABERINTO EN CRUZ ELEVADO



2.1. Generalidades del LCE como modelo comportamental

El Laberinto en Cruz Elevado (LCE) ha sido ampliamente utilizado como modelo animal para evaluar trastornos relacionados con la ansiedad, entre estos fobias (File et al., 1998) y ansiedad generalizada (Lamprea et al., 2000). Este modelo ha sido validado etológica, fisiológica y farmacológicamente, y se fundamenta en la aversión que tienen los roedores a la altura y los espacios abiertos (Lister, 1987). Físicamente, el LCE es un dispositivo de madera con cuatro brazos dispuestos ortogonalmente; dos brazos cerrados (BC) con paredes laterales de 40 cm de altura y dos brazos abiertos (BA) con un borde acrílico de 2 cm. Cada brazo mide 50 x 12 cm y están elevados 50 cm sobre el suelo.

La actividad del animal dentro del laberinto puede ser explicada en una primera instancia como el resultado de la ponderación entre la motivación de explorar y la aversión que experimenta en una determina posición del laberinto. En su estado natural los roedores eligen estar cerca de superficie verticales, preferiblemente rincones y lugares con poca iluminación; los campos abiertos y las alturas inducen comportamientos que permiten inferir estados aversivos. Así, la exposición al LCE genera un conflicto de aproximación-evitación, tomando como criterio de ansiedad la actividad reducida en los BA (Carobrez et al., 2005). Los trabajos realizados con el LCE reportan preferencia de los roedores por los BC. Sin embargo, la administración de fármacos con efecto ansiolítico aumentan la exploración de los BA y los fármacos tipo ansiogénicos la disminuyen, lo que permite argumentar la naturaleza aversiva de los BA.

Existen varios comportamientos específicos que integran la actividad de los roedores en el laberinto. De forma general, la *exploración* del laberinto constituye el comportamiento fundamental, una vez los roedores integran información en cuanto a los “posibles riesgos” se observa *evitación inhibitoria* de los BA. No obstante, el

Capítulo 2: Laberinto en cruz elevado

conflicto de aproximación-evitación al que se enfrenta el animal permite observar otros comportamientos, en algunos casos el animal levanta el cuerpo apoyado en sus patas traseras (*rearing*), o inclina la cabeza y la saca por fuera de los brazos abiertos con el fin de explorar la altura a la que se encuentra (*head-dipping*); en otras ocasiones el animal manteniendo sus patas traseras en los BC estira el cuerpo para explorar la plataforma central y los BA (*risk-assesment*); incluso se puede observar que el animal limpia sus patas delanteras (*grooming*).

Los comportamientos de exploración y evitación inhibitoria pueden ser analizados mediante parámetros espacio-temporales como la frecuencia, absoluta o relativa, de las entradas a los BAs ó BCs y el tiempo, absoluto o relativo, de la permanencia en cada tipo de brazo. Cuando el animal es expuesto por primera vez al laberinto y sin efecto de ningún tratamiento farmacológico se cumplen las siguientes consideraciones; el número de entradas a los BC es mayor que el número de entradas a los BA, y el tiempo que el animal pasa durante la prueba en los BC es mayor que el tiempo que pasa en los BA.

2.2. Re-exposición en el LCE

Se ha encontrado que cuando los animales son re-expuestos al LCE se origina un cambio en el patrón de comportamiento; la actividad en los BAs es significativamente reducida en relación a la experiencia inicial. Además, el efecto ansiolítico de las benzodiazepinas (BZPs) no se observa en el desempeño comportamental de los roedores durante la re-exposición; los animales no presentan las manifestaciones comportamentales de tipo ansiolítico frente al fármaco utilizado, es decir, no hay un aumento en la actividad exploratoria de los BAs. Este fenómeno ha sido comparado con la resistencia farmacológica presentada en los humanos y se conoce como resistencia por un ensayo (*One Trial Tolerance-OTT*), (Bertoglio et al., 2002)

Con el fin de esclarecer y controlar las diferentes variables que pueden afectar el desempeño de los animales y la respuesta ansiolítica del fármaco en la re-

Capítulo 2: Laberinto en cruz elevado

exposición, algunos estudios han tenido en cuenta factores como: el tiempo de exposición durante la primera experiencia, el intervalo de tiempo entre sesiones, la manipulación previa a la exposición, la naturaleza del estímulo aversivo, el tipo y concentración del fármaco utilizado. Además, el OTT ha sido descrito en otros modelos animales y parece estar fuertemente relacionado con la experiencia previa, lo cual altera la eficacia del fármaco ansiolítico.

En virtud de estos hallazgos se han señalado factores que intervendrían en la unión de los fármacos con los complejos del receptor GABA_A como los principales implicados en el desarrollo del OTT (Bertoglio, 2000; Delgado, 2008). No obstante, durante años se han planteado diferentes hipótesis para explicar la reducción del efecto ansiolítico de las BZPs en los roedores re-expuestos al LCE. Las hipótesis sugeridas planteaban la sensibilización al miedo producido por los BAs (Rodgers et al., 1993), un tipo de habituación locomotora (Dawson et al., 1995) ó un cambio cualitativo en el estado emocional producido por la re-exposición al LCE (Holmes et al., 1998). Incluso File et al., (1993) planteó la adquisición de un tipo de fobia durante los primeros 5 minutos, lo cual hace inefectivo el uso de las BZPs, pero con tiempos de exposición acumulados de 20 minutos (sesión 1 + sesión 2) este tipo de fenómeno desaparece.

2.3. LCE y los procesos de aprendizaje y memoria

Actualmente, se plantea que la disminución de la actividad de los BAs bajo los efectos de las BZPs se relaciona con un tipo de aprendizaje aversivo que es adquirido durante la primera exposición. En este aspecto, se ha propuesto que aunque las BZPs pueden evitar la adquisición de información aversiva, estas no pueden evitar la expresión de la memoria emocional adquirida durante esta experiencia (González et al., 1997). En este contexto, han sido empleadas diferentes situaciones que puedan interrumpir el proceso de aprendizaje y poder prevenir la aparición del OTT. Por ejemplo, se han utilizado pruebas de conflicto emocional (Pereira et al., 1999) o mediante limitaciones del tiempo durante la primera sesión

Capítulo 2: Laberinto en cruz elevado

(Dal-Col et al., 2003), incluso se han usado drogas amnésicas como la escopolamina (Bertoglio et al., 2004) y ninguna ha permitido abolir la aparición del OTT.

De manera convencional el tiempo durante la primera sesión (S1) en el LCE es de 5 minutos. Sin embargo utilizando tiempos inferiores, 1 o 2 minutos, aún se evidencia la pérdida de la acción ansiolítica de las BZPs en sesiones posteriores de 5 minutos (Calzavara et al., 2005). Igualmente, incrementando el tiempo de exposición de la primera experiencia a 10 minutos, se evidencia el OTT en sesiones posteriores de 5 minutos (Holmes et al., 1999). Por otra parte, el tiempo entre sesiones parece no afectar la aparición del OTT pues se ha reportado que el fenómeno persiste en un intervalo desde 48 horas a 15 días (File et al., 1990).

En las últimas décadas ha sido planteado que el OTT se produce por la evocación de la memoria emocional adquirida durante la exploración inicial del laberinto, un ambiente potencialmente peligroso (Stern, 2008). Los siguientes resultados han corroborado esta nueva hipótesis; al inactivar regiones cerebrales que participan en el proceso de formación de la memoria en diferentes momentos respecto a las dos sesiones de exposición al LCE, se ha encontrado que el efecto ansiolítico de las BZPs se mantiene durante la segunda exposición.

Por ejemplo, la desactivación temporal con lidocaína del hipocampo dorsal previo a la primera sesión, proceso interpretado como un daño en la adquisición de información; la inactivación de la amígdala basolateral inmediatamente después de la primera sesión, proceso que daña la consolidación de información emocional, y finalmente la desactivación del hipotálamo dorsomedial y de la materia gris periacueductal dorsolateral previo a la segunda sesión, proceso que altera la recuperación de información. Por otra parte, mientras que la administración de una dosis amnésica de clordiaepóxido, dosis 10 veces superior a la dosis ansiolítica, o de escopolamina previo al primer ensayo previene la aparición del fenómeno OTT en el LCE, la administración sistémica de anfetamina o pentilenetetrazol posterior al primer

Capítulo 2: Laberinto en cruz elevado

ensayo, fármacos que favorecen la retención de la memoria, facilita la aparición del OTT en el LCE (Stern,2008).

Sin embargo, a pesar de haberse planteado un proceso de formación de memoria para explicar la aparición del OTT en los animales re-expuestos al LCE, muy pocos estudios han sido direccionados con el fin de investigar los mecanismos moleculares involucrados en este proceso. Entre estos cabe destacar el estudio de Gazarini et al., (2011), en el cual empleando el inhibidor de la síntesis de proteínas anisomicina, con el fin de elucidar la participación de este proceso en la formación de la memoria originada por la exposición al LCE, han demostrado que la administración de anisomicina (80 µg) en el hipocampo dorsal en tiempos cercanos, ya sean previos o posteriores, a la primera exposición mantiene el efecto ansiolítico del midazolam (MDZ; 0.5 mg/Kg, i.p.) en ratas re-expuestas 24 horas después, lo cual sugiere que la información adquirida durante la primera experiencia y consolidada por la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal impacta sobre la respuesta del animal a esta droga y por ende en su desempeño en el LCE.

“A pesar que el código genético es casi universal, el mecanismo necesario para estructurarlo es demasiado complejo, para haber surgido de un sólo golpe”

Francis Crick

Capítulo 3

TÉCNICAS MOLECULARES



3.1. Inmunoensayos – ELISA

En las pruebas de inmunoensayo (ELISA) un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable mediante espectrofotometría. Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten la cuantificación de un antígeno o anticuerpo en solución. Los más comunes son el ELISA directo, indirecto o tipo *sándwich*. Todo ensayo tipo ELISA se realiza fácilmente en cuatro etapas: 1) conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina), 2) unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos de la placa, 3) formación de una o más capas de inmunocomplejos y 4) revelado de la reacción enzimática.

Ante una situación de amenaza o peligro, el organismo reacciona y pone en marcha mecanismos, específicamente del sistema nervioso autónomo y del sistema neuroendocrino, a través de lo que se conoce como el eje Hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenal. En este contexto, la corticosterona es secretada por la corteza adrenal bajo el control de la hormona pituitaria ACTH vía un mecanismo de retroalimentación negativo. La medida de corticosterona en el plasma de ratas, mediante un inmunoensayo competitivo, permite analizar mediante un parámetro fisiológico el nivel de estrés que presenta el animal.

Diversos estudios han demostrado que la memoria es susceptible de modificación ante los efectos del estrés, dependiendo de varios factores como la duración del estresor, su intensidad, el tipo de aprendizaje evaluado y de la fase en que se administre el estímulo estresor (Sandi et al., 2001). Por ejemplo, varias investigaciones han encontrado que el estrés crónico deteriora la memoria en las fases de adquisición, consolidación y evocación, mientras que el estrés agudo no perjudica el aprendizaje y en ocasiones lo facilita, aunque parece tener efectos deletéreos sobre la recuperación de la tarea así como cuando se administra luego de la consolidación (Roozendaal, 2002; Ruetti et al., 2008).

3.2. Transcripción Inversa – RT PCR

En biología molecular, la reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction-PCR*) es usada para amplificar y en la variante de “tiempo real” para cuantificar de forma simultanea una secuencia de interés desde un molde de DNA. Sin embargo, numerosas técnicas han sido desarrolladas para medir la expresión génica en tejidos y células, entre ellas la transcripción reversa (*Reverse Transcription-RT*) acoplada a PCR (RT-PCR).

El éxito de la transcripción reversa depende de la integridad y pureza del mRNA usado como templado. Para ello, deben eliminarse contaminantes, principalmente DNA, y evitar su degradación durante el proceso de extracción y el almacenamiento. El proceso de RT-PCR debe ser optimizado para cada templado; la concentración de magnesio, la concentración de *primers*, las condiciones de temperatura y el número total de ciclos deben ser hallados experimentalmente con el fin de obtener las condiciones óptimas de amplificación. En caso de analizar simultáneamente varios transcritos, proceso conocido como multiplex, en una misma mezcla de reacción se colocan todos los *primers* de las secuencias que se desean amplificar e igualmente se optimizan las concentraciones de los componentes y las condiciones de amplificación.

Los métodos de cuantificación más utilizados implican el uso de colorantes fluorescentes que se intercalan con el DNA de doble cadena o de sondas de oligonucleótidos modificados que emiten fluorescencia cuando hibridan con el cDNA. Los colorantes pueden incluirse directamente en la mezcla de reacción para la cuantificación en tiempo real o ser empleados en geles (agarosa o poliacrilamida) durante la separación de los productos amplificados en el método clásico, así los productos de PCR pueden ser analizados y hacerse fácilmente visibles utilizando bromuro de etidio u otros colorantes fluorescentes bajo luz ultravioleta.

3.3. Proteómica

La proteómica busca describir las características y actividad de cada proteína en una célula o tejido en particular (Colantonio, 2005). Desde esta perspectiva la proteómica estudia el conjunto de las proteínas que son expresadas por la célula bajo condiciones específicas, y aunque los análisis proteómicos no pueden cubrir el número total de proteínas existentes de un sistema biológico en un momento dado, involucra el perfil de expresión de cientos e inclusive miles de proteínas (Wen, 2003). La proteómica incluye diversos enfoques de investigación: la proteómica descriptiva o estructural, la proteómica comparativa o diferencial, la proteómica funcional y el establecimiento de mapas moleculares subproteómicos (Sarka, 2002; Plebani, 2005).

Clásicamente, los análisis proteómicos se realizan en tres etapas: 1) preparación de la muestra, donde se obtienen proteínas libres de interferencias; 2) separación de proteínas, ya sea mediante el uso de geles o empleando cromatografía líquida; y 3) identificación de proteínas, mediante espectrometría de masas al obtener espectros de digestión enzimática, generalmente fragmentos trípticos y su posterior comparación con las bases de datos (Gygi, 2000; Sarka, 2003).

El proteoma tiene un carácter dinámico; la expresión de proteínas cambia en diferentes etapas del ciclo celular y en respuesta a estímulos externos. Es precisamente esta variabilidad en el proteoma que lo hace tan atractivo para la investigación biomédica, pues los análisis proteómicos en su enfoque diferencial, conducen a identificar cambios en los patrones de expresión de proteínas entre un estado normal y un estado patológico (Colantonio, 2005). Este tipo de investigación incluye trastornos del sistema nervioso, en donde los análisis proteómicos permiten entender las múltiples vías moleculares que gobiernan el comportamiento, la cognición y los diferentes trastornos neurológicos y neurodegenerativos que afectan a la población mundial (Morrison, 2002).

Capítulo 3: Técnicas Moleculares

3.3.1. Preparación de muestras

Basados en los análisis proteómicos mediante 2D SDS-PAGE y Espectrometría de Masas (MALDI-TOF), las muestras biológicas sometidas a separación electroforética requieren de un tratamiento previo cuyo objetivo es obtener proteínas libres de otras macromoléculas y contaminantes. Este tratamiento implica la solubilización y la eliminación selectiva de lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y sales mediante precipitación con solventes orgánicos (acetona, alcoholes). Posteriormente, se fracciona la muestra, ya sea por ubicación subcelular, solubilidad diferencial, punto isoelectrico o tamaño/peso molecular.

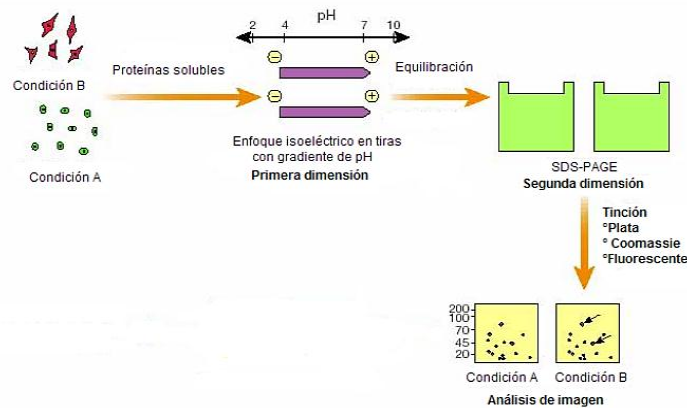
Solubilización de proteínas: En el proceso de solubilización se utilizan mezclas con agentes caotrópicos (urea, tiourea, cloruro de guanidina) que desestabilizan los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas; detergentes, no iónicos o *zwitteriónicos* (CHAPS), que favorecen la ruptura de membranas al romper las interacciones hidrofóbicas; agentes reductores (ditiotreitól-DTT, 2-mercaptoetanol) que rompen los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys); amortiguadores de pH (Tris, anfolitos) e inhibidores de proteasas (PMSF, *Pesptatin*, *Leupeptin*, ortovanadato de sodio y fluoruro de sodio) que evitan las modificaciones post-extracción a causa del pH o por degradación enzimática (Sarka, 2003).

Cuantificación de Proteínas: El ensayo de Bradford es un método sencillo y rápido que emplea el azul de Coomassie-G250 para detectar y cuantificar proteínas. Cuando el azul de Coomassie se une a la proteína, cambia a su forma desprotonada favoreciendo la absorción a 595 nm. El reactivo de Bradford se compone por azul de Coomassie G-250 (0.01 % p/v), etanol (4.7 %v/v) y ácido o-fosfórico (8.5 %v/v) y 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 por cada 100 µL de muestra se adicionan 5 mL del reactivo de Bradford y la absorbancia es medida entre los 5 minutos y 1 hora (como máximo) después de realizar la mezcla (Bradford, 1976).

3.3.2. Separación de proteínas: Electroforesis 2D SDS-PAGE

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D SDS-PAGE) se emplea para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma (Fig. 6). Esta técnica permite la separación de cientos o miles de proteínas “spots” en un único gel, mostrando un patrón característico según las propiedades moleculares de carga y peso. Factores como el pH, la fuerza iónica, el gradiente de potencial, el tiempo de corrida, las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, deben ser considerados pues modifican el patrón de separación. En este punto, la naturaleza de la muestra sirve de guía para alcanzar las mejores condiciones electroforéticas que permitan obtener una óptima separación de las proteínas (Plebani, 2005).

Figura 6. Representación esquemática de 2D SDS-PAGE.



Fuente: http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/A_Ramos/2d.html

Isoelectroenfoque (IEF): Separa las proteínas en función de su punto isoelectrico (pI), es decir, en un gradiente de pH y bajo la acción de un campo eléctrico una proteína se moverá a la posición en el gradiente donde su carga neta sea cero. Actualmente se usan geles en gradiente de pH inmovilizado- IPGs, en los cuales los anfolitos se co-polimerizan con la matriz de acrilamida creando un gradiente estable de carga; estos IPGs se encuentran en diferentes rangos de pH y longitud. El gradiente de voltaje aplicado durante la separación y el tiempo total de la corrida del IEF deben hallarse experimentalmente, pues estas condiciones dependerán de la complejidad de la muestra.

Capítulo 3: Técnicas Moleculares

Rehidratación: Previo a la corrida del IEF es necesario rehidratar los IPGs y cargar la muestra. El volumen final de carga depende de la longitud del IPG; 7cm (125 μ L), 11cm (200 μ L), 17cm (300 μ L), 18cm (315 μ L), 24cm (450 μ L) y se realiza mediante uno de los siguientes métodos: **rehidratación pasiva**, la muestra es incluida en el buffer de rehidratación, el gel es colocado sobre el buffer y se mantiene en reposo durante 12-16 horas; **rehidratación activa**, a diferencia de la anterior el proceso se realiza bajo la acción de un campo eléctrico favoreciendo la absorción de proteínas de alto peso molecular, o mediante el uso de **taza de carga**, en este método la muestra es aplicada después de la rehidratación del gel, lo cual resulta favorable cuando el rango de pH del IPG es alcalino. (García, 2000; Colantino, 2005).

Equilibración: Cuando la corrida de IEF ha finalizado es necesario asegurar la ruptura de los puentes disulfuro intra o inter-moleculares. Para ello, la tira del gel se sumerge en un buffer reductor que contiene DTT. Seguidamente y con el fin de evitar la formación aleatoria de puentes disulfuro en las proteínas reducidas, es necesario efectuar un proceso de alquilación de los grupos tioles en los residuos de cisteína. Para ello, las tiras del gel se colocan en un *buffer* con iodoacetamida como agente alquilante. Es importante que el *buffer* mantenga las proteínas solubilizadas en el interior del gel y evite la pérdida por difusión, por lo cual, en estos *buffers* se emplean nuevamente mezclas que favorecen la solubilización (Posch, 2006).

SDS-PAGE: Es la segunda etapa del proceso de separación bidimensional y separa las proteínas en función del peso molecular mediante geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzante N,N'-metilen-bis-acrilamida, el cual forma una red tridimensional que actúa como tamiz durante el proceso electroforético. El SDS desnaturaliza las proteínas y se enlaza en una relación de aproximadamente 1.4 g de SDS por gramo de proteína, confiriendo una carga neta negativa al polipéptido.

Capítulo 3: Técnicas Moleculares

La poliacrilamida origina geles que favorecen la visualización de las manchas de proteínas durante tiempo prolongado. Variando la concentración de los monómeros (acrilamida, bisacrilamida) se controla el tamaño del poro en el gel, el cual se determina por la relación del %T y el %C expresados en las siguientes ecuaciones:

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

En general se recomiendan valores entre 5-15 %T y entre 2-4 %C. Además, geles en gradiente son usados para separar proteínas de mezclas complejas; el tamaño del poro es mayor en la parte superior y disminuye a medida que avanza la corrida electroforética. El sistema amortiguador utilizado puede ser continuo o discontinuo; el continuo utiliza un *buffer* a igual pH para el tanque y el gel, en el sistema discontinuo un gel de *stacking* (apilamiento) es colocado sobre el gel de separación y los *buffers* utilizados se preparan a diferente pH.

Tinción de geles: La elección del método de tinción se determinada por factores como la sensibilidad, el rango lineal, la facilidad de uso, los costos, el equipo de adquisición de imágenes y la compatibilidad con análisis posteriores. Los métodos de tinción más comunes y de acuerdo al rango de sensibilidad son: la tinción con plata (1 ng de proteína), la tinción fluorescente con *Sypro Ruby* (1-10 ng de proteína); la tinción con azul de Coomassie Coloidal G-250 (8-50 ng de proteína) y la tinción con azul de Coomassie R-250 (0.1-0.3 µg de proteína).

Adquisición y análisis de imágenes: La adquisición de las imágenes se realiza con los instrumentos adecuados dependiendo del método de tinción elegido. Los equipos comúnmente usados son los densitómetros y los escáneres de fluorescencia. Todos ellos funcionan con un software de análisis diseñados para detectar y cuantificar “*spots*” en las imágenes digitales, así como para comparar y analizar estadísticamente los geles de interés. Los softwares de análisis (*PDQuest-Bio-Rad*; *Decyder-GE*) permiten analizar los geles teniendo en cuenta los siguientes parámetros: obtención de la imagen digitalizada, adecuación del tamaño y

Capítulo 3: Técnicas Moleculares

orientación de la imagen, identificación de las manchas de proteínas, comparación y determinación de manchas coincidentes, y la evaluación cualitativa, cuantitativa y estadística de los datos.

Análisis de datos: Existe variación cuando los niveles de expresión son alterados en $\pm 30\%$ y se considera estadísticamente significativa si está dentro del intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$). Para ello, se aplica el análisis de expresión diferencial mediante las pruebas *t-student* y ANOVA, para encontrar manchas que muestren cambios significativos en sus niveles de expresión. El Análisis de Componentes Principales que se usa para encontrar valores extremos o atípicos. El Análisis de Patrones de Expresión que permite encontrar patrones en la variación de expresión y perfiles de expresión diferencial, y el Análisis Discriminante que busca las manchas proteicas que permiten discriminar entre los grupos y crear “clasificadores” capaces de asignar una muestra a un grupo determinado en función del perfil de expresión.

Análisis de Patrones: También llamado análisis de grupos (o análisis de “cluster”) es una clasificación no supervisada que se basa en varias técnicas estadísticas multivariantes. Su finalidad es dividir un conjunto de observaciones o datos en grupos, de forma que los perfiles de los objetos en un mismo grupo sean muy similares entre sí y distintos de los perfiles de los objetos de grupos diferentes. Es un proceso para agrupar objetos similares, para lo cual es necesario definir la similitud a través de un método matemático: la distancia Euclídea, que da más importancia a las medidas de las variables, y el coeficiente de Pearson, en el que tiene más valor la tendencia que las medidas de las variables.

3.3.3. Espectrometría de Masas

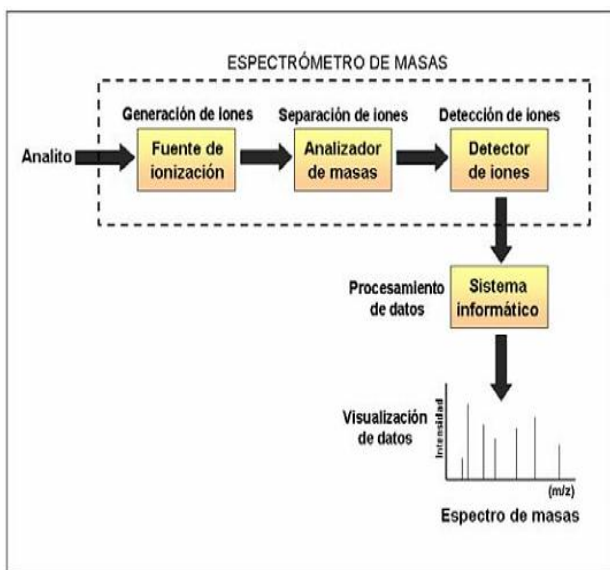
La Espectrometría de Masas (EM) como técnica analítica es extremadamente sensible, de gran versatilidad y cuyos campos de aplicación experimentan un crecimiento vertiginoso. Se basa en la separación de especies cargadas mediante un analizador de masas de acuerdo con su razón masa/carga y posteriormente

Capítulo 3: Técnicas Moleculares

detectadas como corrientes iónicas, cuyas intensidades son proporcionales a sus abundancias respectivas (Karas et al., 1988).

Espectrómetros de masas

Figura 7. Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas.

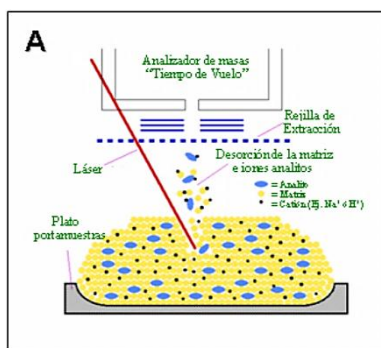


Los espectrómetros de masas están constituidos por un sistema de inyección, una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector (Fig. 7). La introducción de la muestra puede realizarse directamente en la fuente de iones mediante una sonda o en el caso de mezclas a través de un sistema intermediario: un cromatógrafo de gases, un cromatógrafo líquido o un equipo de electroforesis capilar.

Fuente: Moral, 2007.

Fuente de ionización: La EM cuenta con gran variedad de fuentes de ionización; la introducción de las técnicas de ionización suaves (MALDI, ESI) permiten el análisis de biopolímeros. En la ionización utilizando una fuente MALDI (Fig. 8) el analito se mezcla con una matriz (ácido α -ciano-hidroxicinámico, ácido sinápico, etc) y seguidamente, pulsos de un láser inciden sobre la disolución sólida. La excitación de las moléculas de la matriz origina el calentamiento de los cristales y conduce a la sublimación localizada y la expansión en fase gaseosa de la matriz y la muestra. La matriz absorbe la mayor parte de la energía incidente y minimiza el daño de la muestra. El proceso de ionización implica la transferencia protónica en fase gaseosa desde las moléculas de matriz fotoionizadas a las moléculas de la muestra. Otros procesos de ionización sugeridos incluyen las reacciones ion-molécula y la desorción de iones preformados.

Figura 8. Fuente de ionización MALDI.



Fuente: Moral, 2007

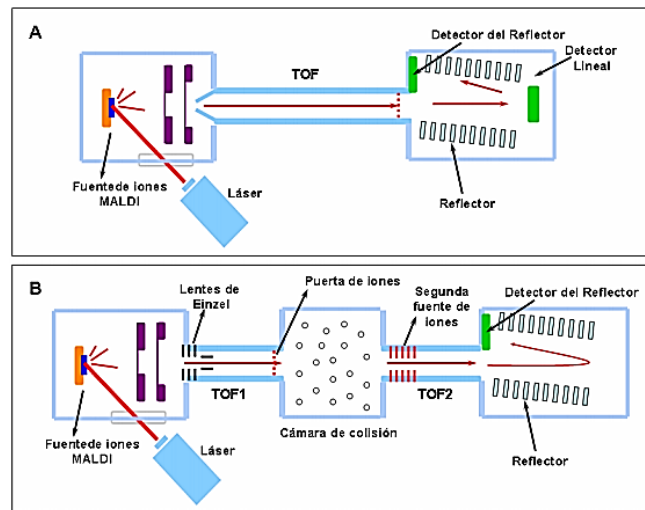
Analizador de masas: Los iones son separados y enfocados hacia el detector de acuerdo con el valor m/z mediante un analizador de masas; estos pueden ser de tipo magnético, cuadrupolares, trampa de iones o un tubo de tiempo de vuelo (*Time-Of-Flight*, TOF), etc. En un equipo con analizador TOF (Fig. 9), los iones son extraídos en pulsos de la fuente de ionización y acelerados para lograr la uniformidad de la energía cinética antes de que entren al analizador. Posteriormente, los iones con movimiento rectilíneo uniforme atraviesan el tubo de vacío y el tiempo necesario para atravesarlo (tiempo de vuelo) depende de la razón m/z de cada ion. Los analizadores TOF son muy sensibles pero presentan baja resolución espectral, no obstante se emplea un reflectrón (reflector iónico electrostático) que incrementa la resolución espectral a expensas de la sensibilidad y la limitación en el alcance de masas. Los analizadores TOF son directamente compatibles con las técnicas de ionización por pulsos, siendo ampliamente utilizada la EM MALDI-TOF.

Detector de masas: La detección dependerá del tipo de analizador utilizado. Cuando la separación se realiza de forma secuencial con base en la razón m/z el espectro de masas completo se registra en el dominio del tiempo a través de un detector puntual. Por su parte, un analizador que separa iones en el espacio, permite que su arribo al detector pueda ser registrado de forma simultánea mediante un detector compuesto. En dependencia del analizador, los espectrómetros de masas pueden utilizar detectores puntuales, compuestos o ambos. Los detectores en su funcionamiento emplean multiplicadores electrónicos; un ión positivo o negativo proveniente del analizador y registrado en el dinodo de conversión, causa la emisión

Capítulo 3: Técnicas Moleculares

de partículas secundarias, que son aceleradas e impactan al cátodo con suficiente energía que al chocar con las paredes internas emiten electrones. Los electrones pasan al multiplicador electrónico e impactan nuevamente las paredes causando una cascada de electrones, que finalmente origina una corriente medible al final del multiplicador electrónico, proporcional a la abundancia de cada ión.

Figura 9. Representación esquemática de un espectrómetro de masas. A) MALDI-TOF. B) MALDI-TOF-TOF.



Fuente: Moral, 2007.

Identificación de proteínas mediante datos de EM

La EM proporciona medidas muy precisas de la masa molecular y la carga de las proteínas o péptidos en una muestra. El análisis de proteínas intactas proporciona información rápida y valiosa sobre el perfil proteico de una muestra, aunque para identificar una proteína no es práctico basarse únicamente en su relación m/z , pues existen factores que hacen variar la masa real de una proteína respecto a la masa teórica de la base de datos. Además, cuanto mayor es la masa de una proteína menor es la exactitud de la medida. El uso de analizadores de masas en tándem utilizando ionización ESI ó MALDI (p. ej. ESI-triple-cuadrupolo; ESI-Qq-TOF; MALDI-TOF-TOF), permite determinar la secuencia de aminoácidos (total o parcial) de un péptido ya que se fragmenta de modo predecible al colisionar con un gas (disociación inducida por colisión-CID); los espectros de fragmentación de tan solo

Capítulo 3: Técnicas Moleculares

unos pocos péptidos son suficientes para la identificación de la proteína de forma inequívoca.

Tripsinización: Se han desarrollado estrategias complementarias para la identificación de proteínas, como la “huella peptídica”. Esta técnica se basa en las medidas de las masas de los péptidos obtenidos tras la digestión enzimática de una proteína. La tripsina es la proteasa más comúnmente utilizada; su corte altamente reproducible en el extremo C-terminal de los residuos de lisina y arginina permite identificar la proteína mediante la comparación de los valores de masa peptídica medidos con los valores calculados en la digestión virtual de todas las proteínas en la base de datos. La fiabilidad de este método depende de varios factores, entre ellos la precisión en la medida de la masa de los péptidos, el número de proteínas presentes en la muestra digerida, el tamaño de la proteína digerida y la calidad de las bases de datos empleada.

Búsqueda en bases de datos: Tras la adquisición de los datos, éstos son enfrentados a las bases de datos. Existen sistemas de puntuación como el algoritmo denominado *Molecular Weight Search* o “MOWSE”, cuyo objetivo es compensar los problemas potenciales a la hora de registrar los valores m/z de los péptidos. Los programas informáticos que analizan los datos generados por EM (Mascot, ProFound, etc), evalúan y ordenan los resultados de acuerdo con estos sistemas de puntuación al comparar los valores m/z obtenidos experimentalmente con los datos teóricos de las bases de datos. Durante el proceso de búsqueda es necesario considerar la cantidad de posibles errores cometidos por la tripsina durante la fragmentación, la tolerancia en los valores m/z y el rango taxonómico de la búsqueda pues estos parámetros influyen en el proceso de puntuación y por ende en los resultados de la búsqueda.

3.4. Antecedentes en neuroproteómica

Actualmente los avances en los análisis proteómicos permiten estudiar las múltiples vías neurales que describen el comportamiento, la cognición y la respuesta del sistema nervioso a las enfermedades (Pusch et al., 2003). Los análisis proteómicos hacen parte de estudios relacionados con aprendizaje y memoria, ansiedad, daño cerebral, isquemia, adicciones, enfermedades neurodegenerativas, depresión, desorden bipolar, epilepsia, tumores cerebrales, entre muchos otros procesos cerebrales, con el fin de elucidar cambios en la expresión de las proteínas que participan en los mecanismos moleculares que describen estos procesos (Sowell et al., 2008; Supawadee, 2007; Nielsen, 2005;). En este aspecto, los mapas proteómicos cerebrales constituyen los datos de referencia para analizar la expresión diferencial de proteínas asociadas al desarrollo, a la edad, a los cambios de comportamiento o a los desórdenes neurodegenerativos (Alzheimer, Parkinson, Huntington) (Li-Rong, 2004; Nielsen 2005; Sorolla, 2008).

Los mecanismos moleculares relacionados con la edad del cerebro humano han sido analizados mediante estudios proteómicos, basados en 2D SDS-PAGE, de tejido cerebral post-mortem, y ha permitido hallar diferencias en la expresión de proteínas con función antioxidante en el cerebro (Wen, 2003). Por otra parte, estudios con modelos animales han establecido perfiles de proteínas del cerebelo de ratas en desarrollo y ratas adultas, identificando cerca de 3000 manchas proteicas en geles bidimensionales; 67 proteínas fueron marcadores de comparación entre los proteomas del cerebelo de ratas en desarrollo (0, 3, 7, 14, 21 días post-natal) mostrando aumento en la abundancia a medida que el cerebelo maduraba, así se estableció que 29 proteínas están involucradas en el desarrollo del sistema nervioso central (Morrison, 2002).

Igualmente, el enfoque comparativo de los análisis proteómicos realizados post-mortem a tejidos cerebrales de pacientes con enfermedad de Alzheimer y proteomas de tejido cerebral control (pacientes de la misma edad) revelaron que 37 proteínas

Capítulo 3: Técnicas Moleculares

son expresadas significativamente de forma diferente. Estas proteínas están implicadas en el metabolismo de carbohidratos, el transporte de lípidos, la respuesta al estrés, la neurotransmisión y muchas de ellas participan en la patogénesis de la enfermedad (Morrison, 2002). Análisis proteómicos post-mortem del estriado y la corteza de cerebral de pacientes con enfermedad de Huntington comparados con proteomas de muestras controles (misma edad y sexo), mostraron incremento en la expresión de proteínas de antioxidación celular (defensa antioxidante) (Sorolla, 2008). Además, el uso de ratas transgénicas ha permitido analizar la respuesta del proteoma hipocampal a la expresión de proteínas mutantes presentes en formas familiares de la enfermedad de Alzheimer (Vercauteren, 2004).

En los estudios de comportamiento relacionados con baja o alta ansiedad, utilizando el LCE, los análisis del proteoma cerebral de ratones selectivamente criados han mostrado diferencias cuantitativas y cualitativas en la expresión de proteínas. En estos estudios se destaca la mayor expresión de la enzima glioxilasa-I en diversas regiones del cerebro en los animales de baja ansiedad. Esta proteína está presente en los glóbulos rojos, lo cual ha creado la posibilidad de analizar su expresión en pacientes con trastorno de ansiedad (Kromer, 2005; Ditzen, 2006; Thornalley, 2006). Así mismo, líneas de ratas Wistar que han sido criadas selectivamente con comportamiento relacionada a baja o alta ansiedad se han usado para encontrar correlaciones neurobiológicas mediante análisis 2D-PAGE de rasgos de ansiedad (Salome, 2004).

Por otro lado, se ha determinado que los hipocampos dorsales derecho e izquierdo, de ratas machos Wistar bajo criterio de aprendizaje en el LCE o sometidas a situación de estrés en la prueba de nado forzado, presentan diferencias en el número de proteínas detectadas, siendo mayor en la región hipocampal derecha (Guerrero, 2012; Hernández, 2010; Piccoli et al., 2007). Asimismo, en estudios que incluyen EM, se identificaron 41 proteínas con diferencias entre el hipocampo derecho y el hipocampo izquierdo de ratas machos adultas Sprague Dawley. Estas proteínas participan en el metabolismo celular, en el transporte de vesículas, en la

Capítulo 3: Técnicas Moleculares

estructura del citoesqueleto y en el procesamiento de proteínas (Samara et al., 2011).

Además, el análisis reveló que la región derecha contiene alta abundancia de enzimas relacionadas con el metabolismo celular y la región izquierda tiene mayor concentración de proteínas localizadas principalmente en los astrocitos. Por medio de inmunotransferencia, se confirmó que algunas proteínas específicas como dinamina-1, DRP2 y sinapsina-1, se expresan en mayor proporción en la región derecha. 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 en 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.

Capítulo 4: Materiales y Métodos

“Las recompensas y los castigos pueden ser muy eficaces en el cambio del comportamiento. Pero, al mismo tiempo, se puede crear una adicción a las recompensas y castigos”

Barry Schwartz

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Análisis comportamental

Animales

El manejo de los animales se realizó de acuerdo con las normas científicas y técnicas establecidas por la Ley 84 de 1989 (Cap. IV, Art. 23-26) y la Resolución 8430 de 1993 (Tit. IV, Art. 83-93) del Ministerio de Salud, normas que rigen el uso de animales vivos en experimentación e investigación. Además, se contó con la aprobación del comité de bioética de la Universidad Industrial de Santander.

Se emplearon 96 ratas Wistar machos entre 8-10 semanas de edad con pesos comprendidos entre 260-300 gramos, procedentes del bioterio de la facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en grupos de seis animales y colocadas en cajas vivero (50x30x15cm) (Fig. 10) bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura de 21 ± 1 °C, humedad relativa de 65 ± 5 %, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, agua y alimento de acceso libre. Las ratas se manipularon durante 1 min 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.

Figura 10. Ratas Wistar dispuestas en su caja vivero.

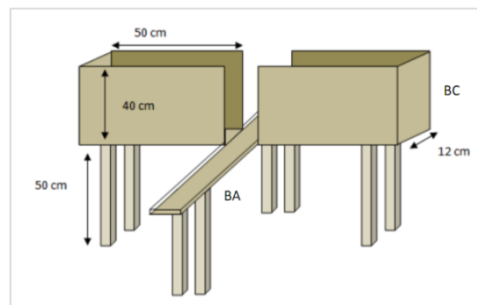


Capítulo 4: Materiales y Métodos

Laberinto en cruz elevado

El laberinto en cruz elevado (LCE) que se utilizó es un dispositivo de madera con cuatro brazos dispuestos ortogonalmente; dos brazos cerrados (BC) con paredes laterales de 40 cm de altura y dos brazos abiertos (BA) con un pequeño borde acrílico de 2 cm de altura. Cada brazo mide 50 x 12 cm y todo el aparato se encuentra elevado 50 cm sobre el suelo (Fig. 11).

Figura 11. Diseño del laberinto en cruz elevado.



Fuente: Célis, 2008.

Diseño experimental

Con el fin de evaluar el efecto de la administración sistémica de la cicloheximida (CHX) en los procesos de adquisición y consolidación de la memoria originada por la exposición al LCE, se empleó el protocolo de re-exposición utilizando un diseño experimental 2^3 ; se consideraron tres variables, cada una con dos niveles de análisis (Tabla 1). Para cada variable se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones: en la variable “fármaco” se consideró la administración de solución salina (SS 0.9%) como control y la administración de CHX (3 mg/Kg) como inhibidor de la síntesis de proteínas. En el caso de la variable “tiempo de inyección” la administración previa a la primera sesión (Pre S1) permite evaluar los efectos de la CHX sobre la etapa de adquisición de información y la administración inmediatamente después de la primera sesión (Post S1) permite evaluar el efecto de la CHX sobre la etapa de consolidación de la información. La administración del fármaco se hizo de forma intraperitoneal (i.p.). Igualmente, en la variable “intervalo entre sesiones”, es decir, el tiempo que

Capítulo 4: Materiales y Métodos

pasa entre la sesión 1 (primera exposición) y la sesión 2 (re-exposición) permite hacer una evaluación de la memoria en función de la clasificación temporal; el tiempo de 3 h implica la ventana temporal de la memoria a corto plazo, la cual no requiere de la síntesis de proteínas; y el tiempo de 24 h permite tener una aproximación a la formación de la memoria a largo plazo, la cual si requiere de la síntesis de proteínas para ser establecida.

Tabla 1. Variables y niveles del diseño experimental

Variable	Niveles	
Fármaco	SS	CHX
Tiempo de la inyección	Pre S1	Post S1
Intervalo entre sesiones	3 h	24 h

Procedimiento experimental

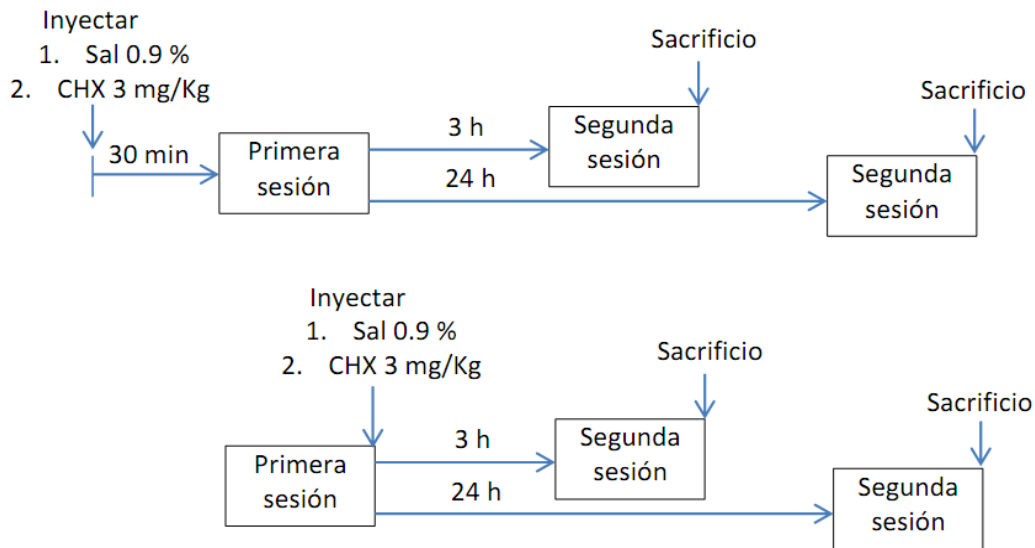
Los animales fueron trasladados a la sala de habituación tres días previos a la primera sesión experimental bajo las mismas condiciones ambientales utilizadas en el bioterio y manipulados durante 1 minuto cada día. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente en ocho grupos de trabajo, cantidad de grupos resultantes del diseño experimental (Fig. 12), con un tamaño de muestra de doce animales. Valor que de acuerdo a las observaciones del grupo de neurociencias es el tamaño de muestra que evidencia variaciones comportamentales. De acuerdo con el diseño experimental y con el objetivo de evitar condiciones de estrés por aislamiento se consideró que los animales de una misma caja fueran asignados al mismo grupo, de esta forma, a cada grupo experimental le correspondieron dos cajas de animales.

La exposición al LCE se llevó a cabo durante la fase de luz entre las 13:00 y 18:00 horas bajo iluminación de 300 lux. Para ello, se realizaron 16 jornadas de experimentación, trabajando con una caja por día, de acuerdo al diseño experimental. Cada animal fue pesado, colocado en la plataforma central del laberinto de cara a uno de los BC y se permitió su exploración libre durante cinco

Capítulo 4: Materiales y Métodos

minutos en cada sesión. La experiencia de cada animal en el laberinto fue registrada a través de un sistema de grabación y monitoreada desde un cuarto adyacente a la sala de experimentación. Una vez finalizó el tiempo de la exposición al laberinto, se regresó el animal a la caja vivero habiendo sido previamente identificado. Después de cada exposición se limpió el laberinto con solución de etanol al 10% v/v.

Figura 12. Diseño del procedimiento experimental.



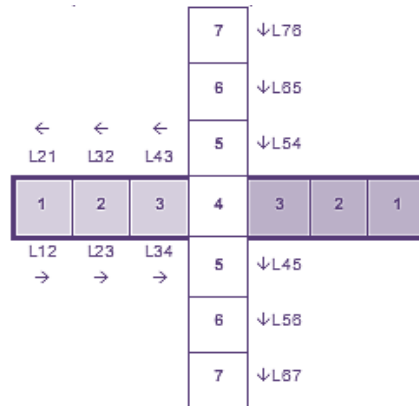
Registro de datos comportamentales

El comportamiento de los animales en su actividad exploratoria dentro del laberinto esta descrito por movimientos espacio-temporales. Por lo cual, el LCE se dividió en 13 zonas; 3 zonas en cada brazo y una zona central (Fig. 13). Esta distribución constituye la metodología estándar para el registro de datos en el laboratorio de neurociencias y comportamiento, UIS. Se basa en el principio de la no lateralidad espacial de la rata frente a la exploración libre del LCE; lo cual indica, que estadísticamente la rata no tiene preferencia en la exploración de un brazo del mismo tipo respecto al otro ubicado al lado opuesto del primero. Cada video fue observado y las posiciones en las que estuvo el animal fueron registradas. Para ello, se colocó una plantilla con la distribución del laberinto arriba mencionada

Capítulo 4: Materiales y Métodos

sobre la figura del laberinto en el video y se registraron las posiciones utilizando el algoritmo PROSTCOM. Este programa permite introducir la posición en la que se encuentra el animal de acuerdo con la distribución de los brazos tomando como parámetro del movimiento de una zona a otra cuando el animal cruza con las cuatro patas.

Figura 13. Distribución de los brazos del laberinto para el registro de datos espacio-temporales.



Fuente: Celis, 2008.

Análisis de datos comportamentales

Los datos de comportamiento, específicamente las variables clásicas como los valores absolutos y relativos de las entradas a los BAs, el tiempo de permanencia en los BAs, los BCs y la plataforma central del laberinto fueron evaluados mediante pruebas de correlación y regresión lineal comparando los datos de la segunda sesión frente a los datos de la primera sesión, con el fin de hallar variaciones en el comportamiento durante la segunda sesión por efecto de la cicloheximida en términos del tiempo entre sesiones (3 o 24 h). También se efectuaron pruebas de ANOVA de dos vías para determinar que variables afectan significativamente el comportamiento de los roedores durante la segunda sesión. Finalmente, los datos de comportamiento se correlacionaron con los datos de intensidad de los spots de proteínas de interés seleccionados.

4.2. Análisis de corticosterona

La toma de muestras de sangre para cada uno de los animales se realizó cinco minutos después de concluida la segunda sesión de exposición al LCE. Los animales fueron decapitados y se tomaron 4 mL de sangre desde el cuello. Cada muestra fue centrifugada a 3500 g durante 15 minutos. Una vez separado el plasma del contenido celular sanguíneo se procedió a pipetear 0,5 mL en un eppendorf previamente congelado y marcado. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta la realización del experimento. Una vez obtenidas las muestras, mediante la prueba de ELISA se determinó la concentración de corticosterona utilizando el kit “*corticosterone rat/mouse ELISA*”. Para la lectura de la absorbancia se empleó el lector Ultramark, Microplate Imaging System (BioRad, 2002) y el software Microplate Manager 5.2.1.

La ELISA para corticosterona se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit, el cual constaba de una placa de 96 pozos de polietileno. Las muestras se descongelaron gradualmente. En cada pozo fueron colocados 10 μL de calibrante o muestra, y mezclados con 100 μL de buffer de incubación y 50 μL de enzima conjugada (corticosterona conjugada con peroxidasa). Se dejó en incubación durante 2 h con agitación a temperatura ambiente. Seguidamente, se descartó el contenido de los pozos y se lavaron con solución de lavado en cuatro ocasiones. Se adicionaron 200 μL de solución del sustrato (TMB y H_2O_2) y se incubó por 30 min sin agitación en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 50 μL de solución de parada y la placa se colocó en el equipo de lectura (ELISA) para realizar la lectura de absorbancia a 450 nm.

Posteriormente se graficó la relación absorbancia/concentración con los valores estándar de la curva arrojados por la lectura del plato y se calculó la concentración de las muestras ajustando los valores de absorbancia a la línea de tendencia logarítmica obtenida a partir de la gráfica. Los datos de la concentración de corticosterona en el plasma sanguíneo (ng/mL) fueron evaluados con pruebas t-student, para comparar las concentraciones entre grupos.

4.3. Análisis de transcritos

Parte de las muestras de los hipocampos derechos e hipocampos izquierdos fue tratada para aislar el RNA. Los tejidos fueron pesados y colocados en un tubo eppendorf que contenía 500 μ L del reactivo *TRI Reagent* (promega) y se homogenizó mediante agitación en vortex a 1200 rpm. Seguidamente, se siguió el protocolo del proveedor para la extracción y conservación del RNA. La pureza, calidad, y concentración del RNA fue determinada mediante un equipo NanoDrop 2000. Finalmente fueron amplificados los transcritos del exón I (Forward primer CAGGACAGCAAAGCCACAAT; reverse primer GCCTTCATGCAACCGAAGTA) y el exón II (Forward primer TACTTCATCCAGTTCCACCAG; reverse primer TGGACGTTTGCTTCTTTCAT) del BDNF. El proceso de RT-PCR se realizó mediante multiplex empleando el kit de RT-PCR de promega, usando un termociclador PT-100 (Bio-rad) mediante el protocolo de amplificación indicado en la tabla 2.

Tabla 2: Protocolo de amplificación

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	# de ciclos
Transcripción inversa	45	45.0	1
	95	2.0	1
Amplificación	95	0.2	
	60	0.5	45
	68	1.0	
	68	7.0	1
	4		End

4.4. Análisis proteómico

4.4.1. Preparación de muestras

Los animales fueron sacrificados por decapitación cinco minutos después de finalizar la re-exposición al laberinto; entre las 13:00-15:00 horas para los animales cuyo intervalo entre sesiones fue de 24 h, y entre las 16:00-18:00 horas para los

Capítulo 4: Materiales y Métodos

animales cuyo intervalo entre sesiones fue de 3 h. Se realizó la ruptura del cráneo y se extrajo el cerebro, el cual fue colocado sobre papel humedecido con solución salina (NaCl 0.9%) introducido en una caja de Petri enfriada sobre hielo seco. Se efectuó la disección del hipocampo teniendo en cuenta la subdivisión de los hemisferios cerebrales: hipocampo derecho (HD) e hipocampo izquierdo (HI). Cada muestra hipocampal fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 mL que contenía solución salina con el objetivo de realizar un lavado previo y eliminar residuos de sangre. Seguidamente, fue trasladado a otro tubo que contenía 500 μ L de buffer de lisis (anexo A) previamente pesado y marcado. Inmediatamente los tubos fueron nuevamente pesados para determinar por diferencia la cantidad de tejido cerebral extraído.

Solubilización de proteínas: Las muestras fueron homogenizadas mediante agitación en vortex a 1200 rpm durante aproximadamente 3 h. Posteriormente fueron centrifugadas a 13.000 rpm, 4 °C, durante 20 min en la centrifuga *THERMO IEC CL31R Multispeed*. De cada muestra se separaron 450 μ L del sobrenadante y se precipitaron las proteínas con acetona fría (-20°C) en relación 1:4 muestra-solvente. Después de la adición del solvente, las muestras fueron sometidas a agitación en vortex a 500 rpm durante 5 min y se mantuvieron a -20°C durante 12 horas. El pellet de proteína fue obtenido por centrifugación a 10.000 g, 4°C, durante 10 min. Seguidamente, los pellets fueron lavados con acetona (-20°C, 3 x 100 μ L). Tras cada lavado las muestras se mantuvieron durante 10 min en el refrigerador y se centrifugaron nuevamente (10.000 g, 4°C, 10 min). Posteriormente los pellets se dejaron secar al ambiente durante 10 min y finalmente se re-suspendieron en 100 μ L de buffer de lisis mediante agitación en vortex a 1200 rpm durante 2 h.

Cuantificación de proteínas: La concentración de proteínas en cada muestra re-suspendida de hipocampo dorsal (HD y HI) se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Para esto, una curva de calibración fue realizada utilizando patrones de albúmina de suero bovino (fraction V, MERCK). Con el fin de evitar alteraciones en los valores de las absorbancias debido a la presencia de los

Capítulo 4: Materiales y Métodos

componentes del buffer de lisis, este fue utilizado como blanco y medio de dilución de los patrones. 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).

4.4.2. Electroforesis 2D-SDS-PAGE

Isoelectroenfoque (IEF): En el proceso se utilizaron tiras de gel inmovilizado (*IPG strips*) de 17 cm de longitud, con un rango de pH 3-10 lineal (Bio-Rad). Éstas se rehidrataron durante 12-16 h por el método de rehidratación pasiva, usando un volumen de muestra de 300 µL compuesto por 1 mg de proteína y solución buffer de rehidratación. Las muestras muy concentradas se diluyeron con buffer de lisis para mantener constante la relación del buffer de rehidratación (1:1 muestra-buffer). Finalmente, las tiras se corrieron en el Equipo de Isoelectroenfoque, Protean IEF cell (Bio-Rad) bajo las condiciones indicadas en la tabla 3.

Tabla 3: Protocolo de corrida en el IEF

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	60	
8	10000	60	
Final	10000	CTE, hasta 80000 Vh	Rapida

Equilibración: Las tiras de IEF fueron equilibradas mediante un proceso de reducción-alkilación, para lo cual, fueron colocadas en bandejas de equilibración y se adicionaron 6 mL de buffer de equilibración I (Anexo A), se agitaron a 60 rpm durante 30 min; pasado este tiempo se retiró el buffer I y se adicionó igual volumen de

Capítulo 4: Materiales y Métodos

buffer de equilibración II (Anexo A), se agitaron a 60 rpm durante 30 min. Finalmente las tiras se lavaron en buffer de corrido (Anexo A) para ser procesadas en el siguiente paso de la separación electroforética.

SDS-PAGE: Una vez que las proteínas se separaron en función de sus propiedades eléctricas, se continuó con la separación en función del peso molecular (PM) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Las tiras fueron colocadas sobre el gel de separación y estabilizadas con gel de agarosa. Junto a la tira de IEF se colocó un trozo de papel “wick” humedecido con marcador de peso molecular. Para la separación de las proteínas se emplearon geles al 12 %T y fueron corridas a 150 V. Bajo estas condiciones la corrida electroforética tardó aproximadamente 6 h. Para este proceso se utilizó la cámara Protean xi Cell (Bio-Rad), la cual emplea 1.5 L de *buffer* de corrida, y una fuente de poder Power Pac HC (Bio-Rad).

Tinción de geles: La visualización de las proteínas se realizó mediante el método de tinción con azul de Coomassie Coloidal (Anexo A) usando un *shaker* MAXQ 4450 (THERMO) con agitación a 40 rpm durante todo el proceso. Brevemente, una vez finalizada la corrida de SDS-PAGE el gel se sumergió en solución de fijación durante 12 horas. Posteriormente, se lavó el gel con agua desionizada (3 x 10 min) y se adicionó solución de equilibración, se agitó durante 1 h. Transcurrido este tiempo se agregó solución de coloración, gota a gota y manteniendo la agitación, sobre la solución de equilibración. Finalmente, el gel se mantuvo en agitación durante 12 horas. Para eliminar el exceso de colorante el gel se lavó con agua tipo HPLC hasta obtener el mejor contraste entre las manchas de proteínas y el *background* (aproximadamente 24 horas).

Adquisición y análisis de imágenes: Las imágenes de los geles fueron obtenidas utilizando el escáner ChemBio (Bio-Rad) y analizadas mediante el software PD-QUEST, versión 8.0.1 (Bio-Rad). Este programa filtra, suaviza e identifica las manchas de proteínas en la imagen del gel mediante la creación de

Capítulo 4: Materiales y Métodos

una representación gaussiana en tres dimensiones de las manchas clarificadas. Inicialmente, cada una de las imágenes fue depurada mediante alineamiento, corte, arreglo de color y aplicación del filtro “sal y pimienta” con un tamaño de ventana de filtro (*kernel*) de 3 x 3.

El análisis de las imágenes se realizó generando cuatro experimentos independientes en el programa PD-Quest teniendo en cuenta la región hipocampal y el tiempo de inyección. Cada uno de estos experimentos se subdividió en cuatro grupos seleccionando las imágenes de acuerdo al fármaco utilizado y el tiempo de intervalo entre sesiones (Tabla 4). En cada experimento el programa genera una imagen maestra “master” que reúne todas las manchas, con una distribución gaussiana, identificadas en los geles que conforman cada grupo.

Con el objetivo de compensar las posibles variaciones entre geles debidas a diferencias en la eficacia de la tinción, se aplicó el método de normalización mediante el modelo de regresión local “*Local Regression Model*”, éste calcula una curva en el diagrama de dispersión que minimiza la distancia a todos los puntos de la gráfica y asigna el factor de normalización para cada mancha. En seguida el programa densitometra las manchas proteicas, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas.

Tabla 4: Experimentos generados en el software PD-Quest.

Experimento	Región	Tiempo de inyección	Grupos	n imágenes
1*	HD	Pre S1	SS 3h; SS 24h; CHX 3h; CHX 24h	24
2	HD	Post S1	SS 3h; SS 24h; CHX 3h; CHX 24h	24
3*	HI	Pre S1	SS 3h; SS 24h; CHX 3h; CHX 24h	24
4	HI	Post S1	SS 3h; SS 24h; CHX 3h; CHX 24h	24

*Se analizaron en la tesis de pregrado Ortiz, 2014

Una vez detectadas las manchas de proteínas en las imágenes de los geles de cada experimento, se realizó una revisión pormenorizada de cada imagen con el fin de verificar las manchas detectas y hacer correcciones en cuanto a: eliminación de artefactos detectados como manchas, adición de otras manchas que no fueron

Capítulo 4: Materiales y Métodos

inicialmente detectadas, corrección en los emparejamientos que el programa automáticamente realiza desde el gel master con cada imagen del experimento. La figura 14 muestra cada etapa del proceso de identificación y comparación de las manchas de proteínas en el software PD-Quest.

Análisis de datos: Se realizó el Análisis de Expresión Diferencial para poder trabajar con un conjunto de datos reducido que incluyó sólo aquellas manchas con un valor $p < 0.05$ en la prueba *t-student* y con niveles de expresión alterados en $\pm 30\%$ (es decir, las manchas que consideramos diferencialmente expresadas). Con ese conjunto de datos se realizó el Análisis de Componentes Principales y se efectuaron pruebas de correlación con los datos de comportamiento.

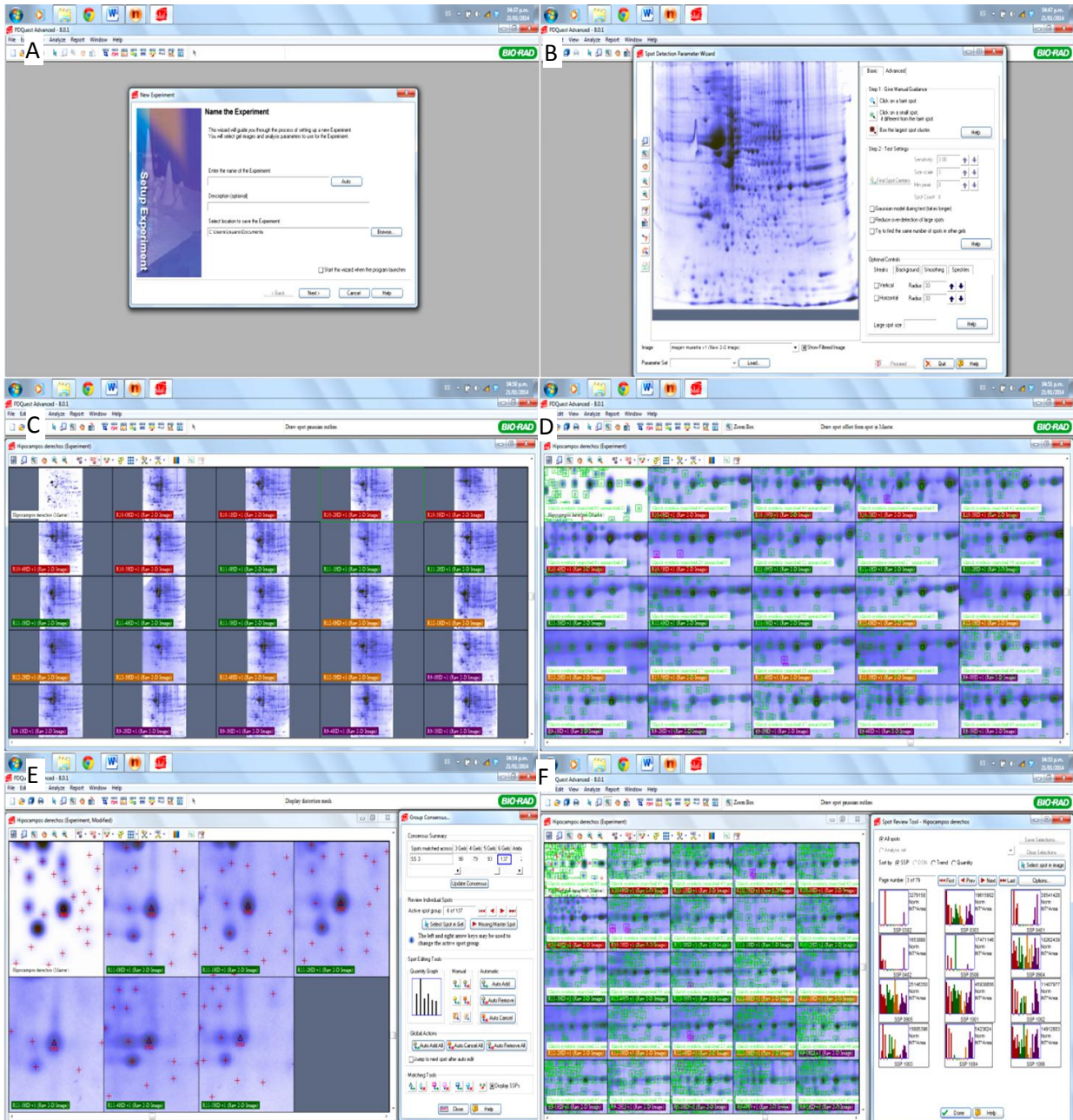
4.4.3. Espectrometría de Masas

Digestión con tripsina “en gel”: Las manchas de proteínas seleccionadas de acuerdo a los criterios establecidos y que eran visiblemente de fácil manipulación se identificaron mediante la huella peptídica obtenida por Espectrometría de Masas (MALDI-TOF). Para ello, las manchas proteicas fueron escindidas manualmente del gel bidimensional y fueron desteñidas con acetonitrilo (50%) en bicarbonato de amonio (Anexo A). Una vez se eliminó el colorante las piezas del gel fueron deshidratadas con acetonitrilo y seguidamente rehidratadas con solución de Tripsina (Promega) y se mantuvieron durante 12-16 horas a 37°C. Finalmente, se separó la fracción líquida, la cual contiene la mezcla de péptidos trípticos.

Obtención de la huella peptídica: Se aplicó 1 μL de la mezcla de fragmentos trípticos a 1 μL de solución de la matrix, ácido α -ciano-4hidroxicinnámico (HCCA), cuya concentración fue de 5 mg/mL en TA30 (ACN 30%, TFA 0.1%). La mezcla (2 μL) se depositó en un portamuestras MALDI “*Stained Steel Plate*” (Bruker-Daltonics) y se dejó cristalizar a temperatura ambiente. Los datos de MALDI-MS se obtuvieron de forma manual en un espectrómetro de masas MALDI Xtremeflex (Bruker-Daltonics),

Capítulo 4: Materiales y Métodos

Figura 14. Representación del proceso de análisis mediante el programa PDQuest 2-D. A) Creación de un nuevo experimento. B) Detección de manchas. C) Vista general del experimento. D) Emparejamiento de las manchas (las marcas verdes son manchas equivalentes en todos los geles). E) Ejemplo del resultado obtenido tras el análisis de los geles de un mismo grupo (grupo *consensus*). F) Ejemplo del resultado obtenido tras el análisis de cada mancha en todos los geles del experimento (*Spot Review*).



Capítulo 4: Materiales y Métodos

en el Laboratorio de Espectrometría de Masas en el Parque científico Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander. Los espectros de masas fueron tomados en el modo reflectron positivo, con frecuencia de láser de nitrógeno (337 nm) de 50 Hz, con voltaje de aceleración iónica de 25 kV, tiempo de retardo de 140 ns y se acumularon entre 500 y 1000 espectros individuales.

Análisis de espectros y obtención de la lista de datos m/z : El análisis de los datos de masas se llevó a cabo con el software flexAnalysis (Bruker-Daltonics). Para obtener una mayor exactitud, los espectros MALDI-TOF se calibraron internamente empleando como referencia señales de masa de fragmentos de Albumina Bovina (BSA) con error en las masas peptídicas de 50 ppm. Se realizó la detección de los valores m/z y se eliminaron los valores de masas contaminantes (tripsina, queratinas, aductos de sodio o señales resultantes de la oxidación de metioninas).

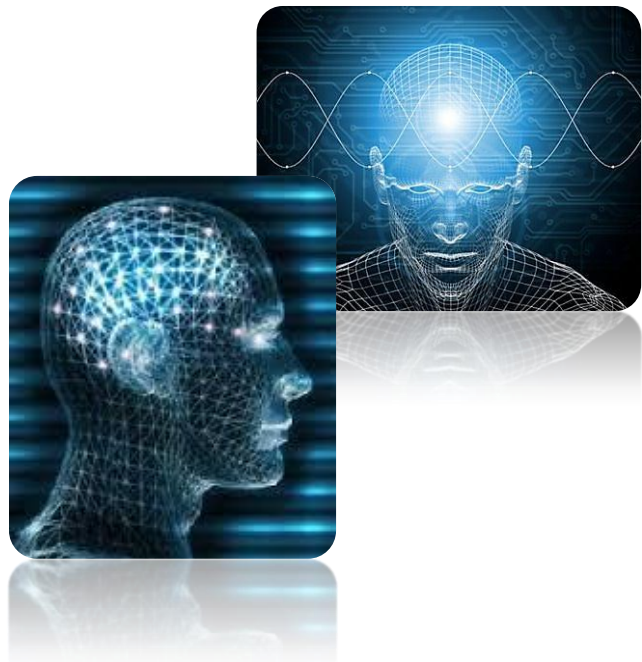
Búsqueda en Mascot por huella peptídica: La lista de valores m/z obtenida para cada espectro de huella peptídica de las proteínas procesadas fue introducida en Mascot mediante la herramienta Biotools del software del espectrómetro. En el proceso de identificación se restringieron los parámetros de búsqueda de la siguiente forma; los errores de la tripsina fue limitado a uno, se utilizó la base de datos swissprot; se restringió la taxonomía a mamíferos y la tolerancia en las masas peptídicas fue de 100 ppm. A partir de esta información, la identificación es significativa con un score igual o superior a 60 puntos.

Capítulo 5: Resultados

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado,
un esfuerzo total es una victoria completa”*

Mahatma Gandhi

Capítulo 5
RESULTADOS



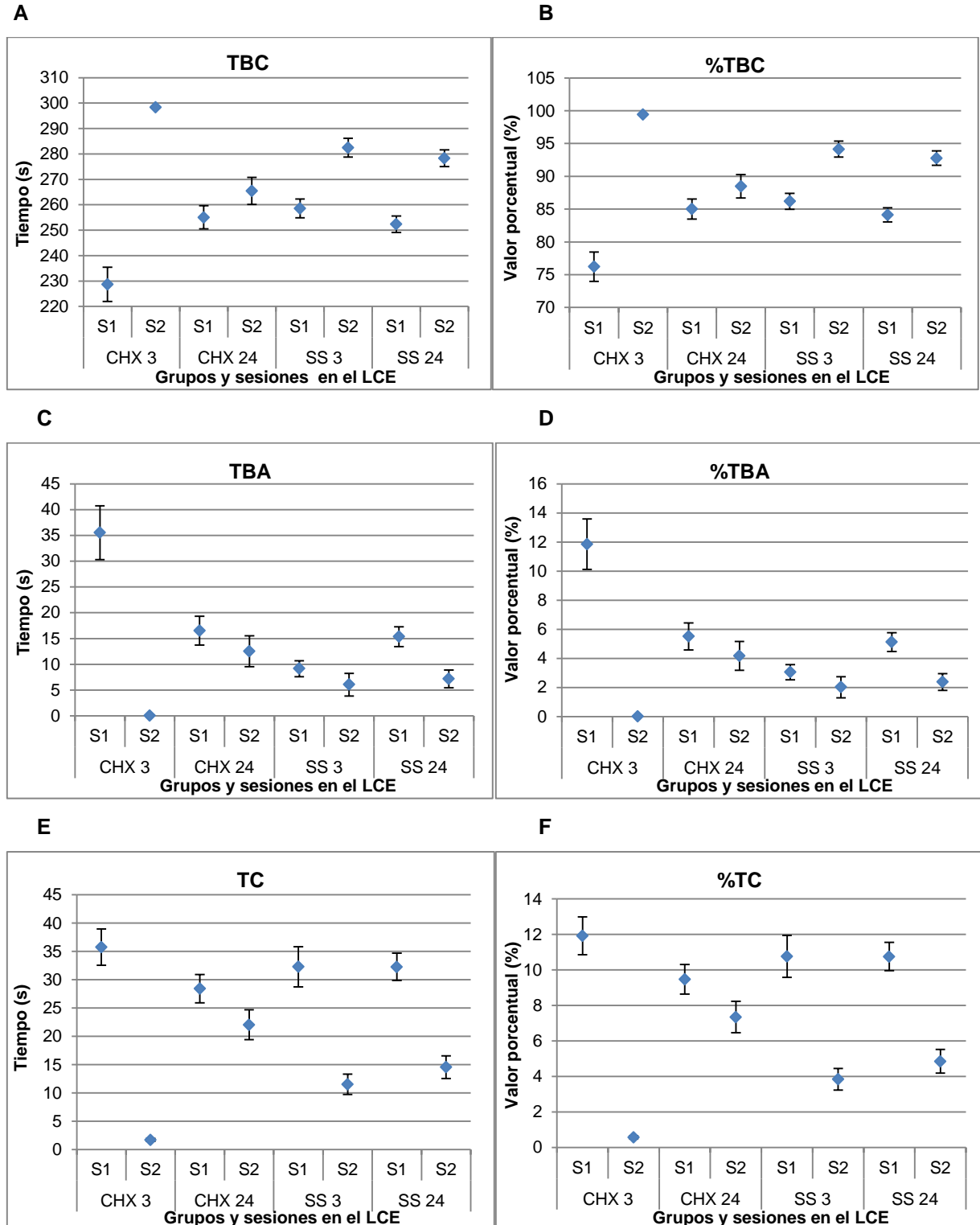
5.1. Análisis del comportamiento en el LCE

A partir de los datos del registro de las posiciones en el LCE que se obtuvieron mediante el programa computacional PROSTCOM, se analizaron las siguientes variables de estudio: los valores absolutos del tiempo de permanencia en, la plataforma central (TC), los brazos abiertos (TBA) y los brazos cerrados (TBC) del laberinto. Además, se obtuvieron sus respectivos valores relativos: porcentaje de tiempo en la plataforma central (%TC), porcentaje de tiempo en el brazo abierto (%TBA) y porcentaje de tiempo en el brazo cerrado (%TBC). Igualmente, se analizaron las frecuencias de entradas a cada uno de los brazos tanto en su valor absoluto como relativo representadas por las siguientes variables: número de entradas al brazo abierto (EBA y %EBA) y número de entradas al brazo cerrado (EBC y %EBC). Por otra parte, con el fin de evaluar la actividad locomotora de los animales al interior del laberinto se consideró la variable cruzamientos (CRUZ). Finalmente, para analizar la evaluación del riesgo que realizan los animales se consideró la variable representada por la frecuencia de transición de la posición 3 a la posición 4 (FL34) al interior del LCE.

Como análisis inicial, se graficaron los valores promedios de cada una de las variables descritas arriba (n=12, para cada animal se realizó el registro de datos por triplicado) con su respectivo error estándar para interpretar las variables evaluadas en los grupos experimentales de ratas. Los grupos controles fueron inyectados con solución salina (SS) y re-expuestos en dos tiempos entre sesiones (SS 3h y SS 24h). Los otros grupos fueron tratados con cicloheximida (CHX) y re-expuestos en dos tiempos entre sesiones (CHX 3h y CHX 24h). La exposición al LCE se realizó en dos sesiones (S1 y S2) cada una con duración de 5 minutos. La administración del tratamiento (SS o CHX) se hizo vía intraperitoneal (i.p.) inmediatamente después de la primera sesión con el objetivo de analizar los efectos de la CHX sobre la fase de consolidación de la memoria. Adicionalmente, los datos obtenidos durante la S2 fueron analizados a través del paquete estadístico SIGMASTAT 3.5 utilizando la

Capítulo 5: Resultados

Figura 15: Análisis de los parámetros temporales. **A)** Valor absoluto del TBC. **B)** Valor relativo (%) del TBC. **C)** Valor absoluto del TBA. **D)** Valor relativo (%) del TBA. **E)** Valor absoluto del parámetro TC. **F)** Valor relativo (%) del parámetro TC.



Capítulo 5: Resultados

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 y 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 comparados.

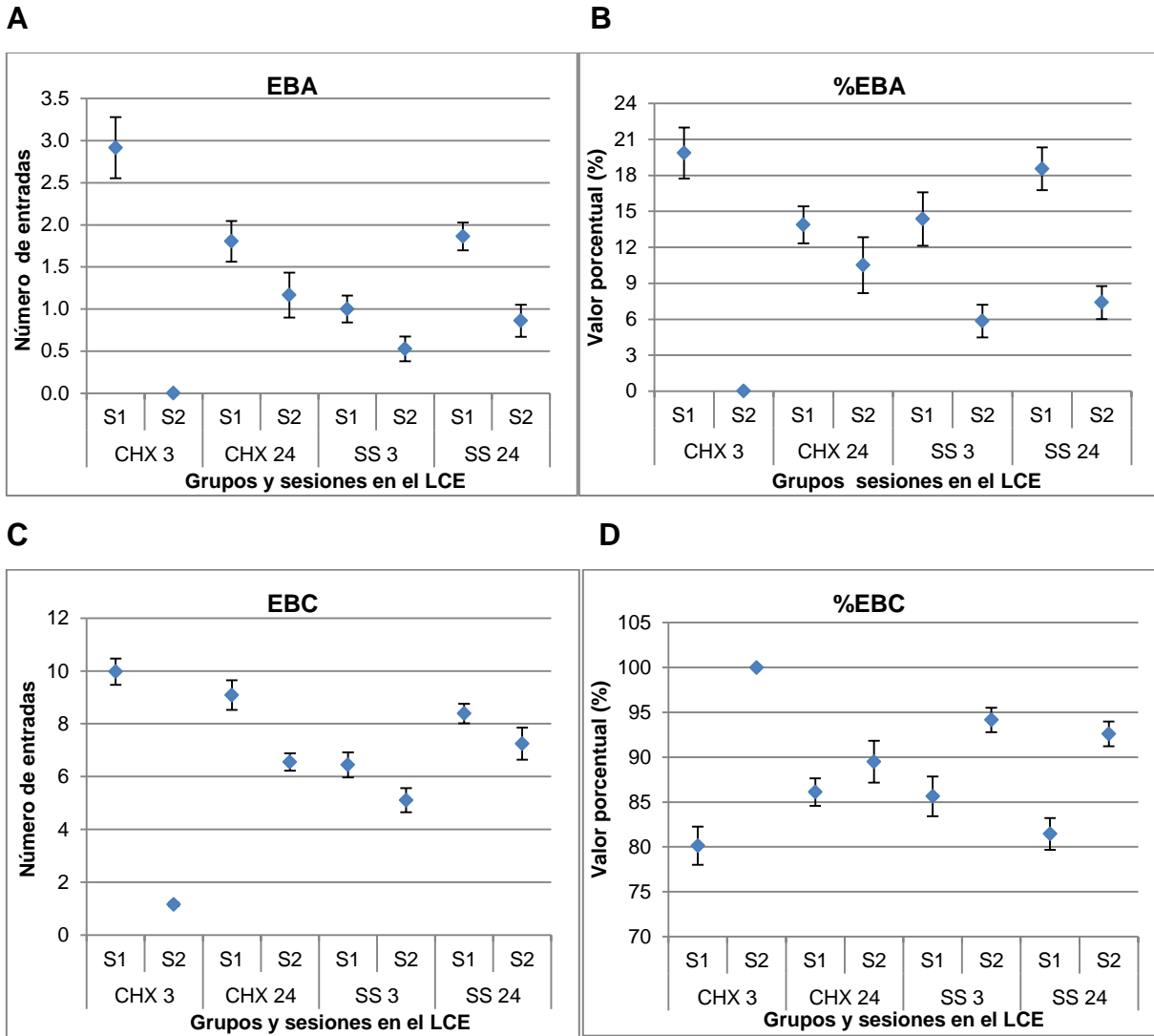
En la figura 15 se analizan los parámetros temporales, en la figura 16 se muestran graficados las entradas a los brazos del laberinto tanto en sus valores absolutos como relativos y la figura 17 evidencia la actividad locomotora y la evaluación del riesgo mediante los parámetros cruzamientos (CRUZ) y frecuencia de transición de la posición 3 a la posición 4 del laberinto (FL34), respectivamente.

5.2. ANÁLISIS DEL NIVEL DE CORTICOSTERONA

La toma de la muestra de sangre para cada uno de los animales se realizó en una sala experimental diferente a la utilizada para la manipulación y la evaluación comportamental, cinco minutos después de concluida la segunda exposición al laberinto. Por medio de la muestra de sangre tomada, se obtuvieron los niveles de concentración de corticosterona en plasma. La comparación entre los niveles de los grupos inyectados con SS o CHX, ya sea 30 min previos (Ortiz, Kristty 2014) o inmediatamente después de la primera sesión, se presenta en la Figura 18. Un análisis por medio de la prueba *t-student* demostró que no existieron diferencias significativas entre los grupos que fueron tratados previamente a la primera sesión en los niveles de concentración de esta hormona. Sin embargo, si hay deferencias entre los grupos inyectados post primera sesión. Lo cual indica que los animales presentaron mayor nivel de estrés en este tratamiento.

Capítulo 5: Resultados

Figura 16: Frecuencia de entrada en cada tipo de brazo. **A)** Valor absoluto de las EBA. **B)** Valor relativo (%) de las EBA. **C)** Valor absoluto de las EBC. **D)** Valor relativo (%) de las EBC.



5.3. ANÁLISIS DE LOS TRANSCRIPTOS DE LOS EXONES I Y II DEL BDNF

Una vez procesadas las muestras del hipocampo, el ARN total fue extraído mediante el reactivo TRI Reagent y cuantificado empleando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La concentración de ARN fue en promedio de 900 µg/L. La

Capítulo 5: Resultados

pureza del ARN fue evaluada mediante la relación de lecturas de absorbancia a 280/260 nm, la cual es indicada por el equipo, y mediante la absorbancia directa a 260 nm. En todas las muestras se obtuvo ARN de alta calidad y alta pureza.

Figura 17: A) Valoración de la actividad locomotora mediante el valor absoluto de los cruzamientos (CRUZ) **B)** Valoración de la evaluación del riesgo mediante la frecuencia de transición de la posición 3 a la 4.

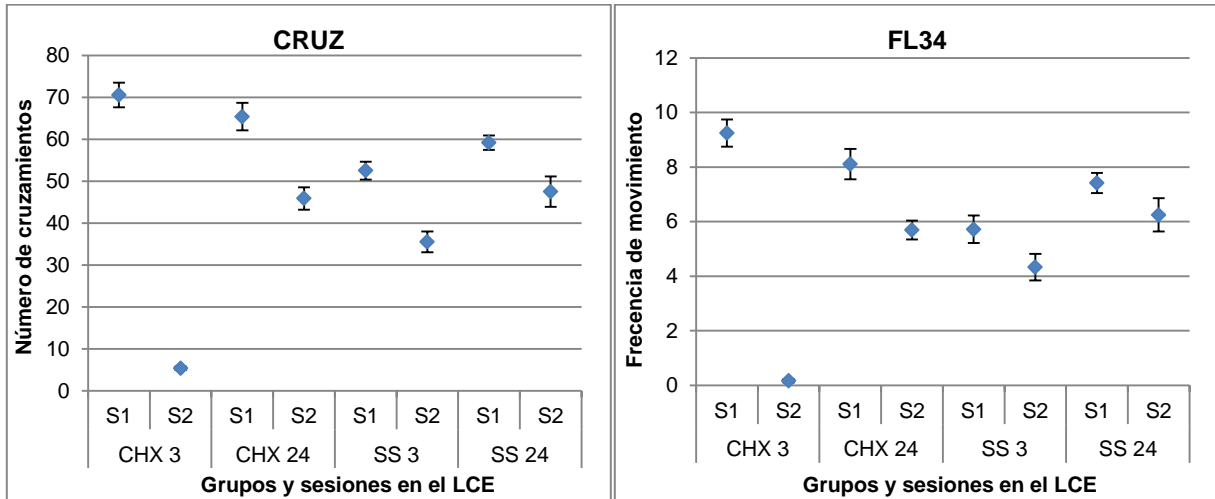
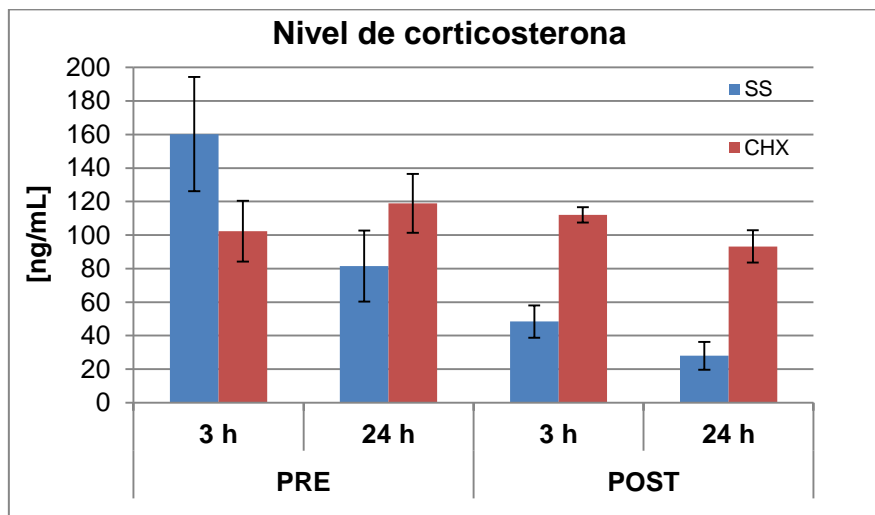
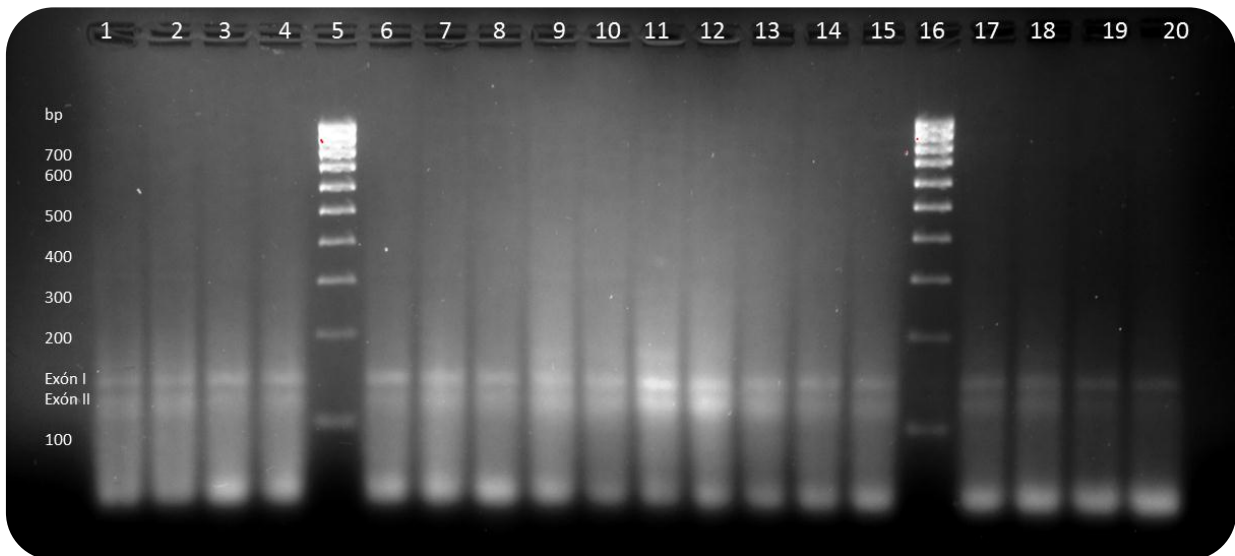


Figura 18: Evaluación del nivel de corticosterona en los diferentes grupos experimentales, inyectados con SS o CHX, previo a la S1 (PRE) o inmediatamente después de la S1 (POST) y re-expuestas en dos intervalos entre sesiones (3h o 24h).



Capítulo 5: Resultados

Figura 19: Transcritos de los exones I y II del BDNF en la región derecha del hipocampo de ratas Wistar. Los carriles 5 y 16 corresponden al marcador de pares de bases (Hyperladder IV). Los demás carriles corresponden a los amplificados de las muestras del hipocampo derecho; exón I 144 bp, exón II 115 bp.



5.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO

5.4.1. Análisis 2D SDS-PAGE

Los geles bidimensionales de proteínas fueron digitalizados en el escáner *ChemBio* y las imágenes se analizaron empleando el software *PDQuest 8.0.1* de Bio-Rad. Para ello se crearon cuatro experimentos de análisis en el programa, uno por cada región hipocampal (HD, HI) y cada tiempo de inyección, previo a la primera sesión (Ortiz, K. 2014) o post S1 agrupando las imágenes del mismo tratamiento y tiempo de re-exposición (SS3, SS24, CHX3, CHX24), seis imágenes en cada grupo para un total de 96 imágenes (Tabla 5).

Capítulo 5: Resultados

Cada imagen fue inicialmente procesada (cortada, rotada, filtrada) y con el objetivo de compensar las posibles variaciones entre geles debidas a diferencias en la eficacia de la tinción, las imágenes fueron normalizadas mediante el modelo de regresión local “*local regression model*”. Este modelo calcula una curva en el diagrama de dispersión que minimiza la distancia a todos los puntos de la gráfica y asigna un factor de normalización para cada mancha. En seguida el programa mide por densitometría la intensidad de las manchas proteicas, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas.

Tabla 5. Distribución de las imágenes en los diferentes experimentos

EXPERIMENTOS							
Tiempo de inyección							
PRE				POST			
Región Hipocampal				Región Hipocampal			
HD		HI		HD		HI	
Grupos	<i>n</i>	Grupos	<i>n</i>	Grupos	<i>n</i>	Grupos	<i>n</i>
SS3	6	SS3	6	SS3	6	SS3	6
SS24	6	SS24	6	SS24	6	SS24	6
CHX3	6	CHX3	6	CHX3	6	CHX3	6
CHX24	6	CHX24	6	CHX24	6	CHX24	6

La detección de spots se hizo bajo los siguientes parámetros: *smoothing*, empleando el filtro *Power Mean 3x3*; la eliminación del fondo mediante la opción *floating ball*, la eliminación de líneas verticales y horizontales mediante el parámetro *streaking*, todos con nivel de operación de 65 unidades; se trabajó con nivel de sensibilidad de 5.8462 y se consideró el modelo *Gaussian fit* para detectar los *spots*. Establecidos los parámetros, el programa crea una imagen maestra “master” de las manchas asignándoles una distribución gaussiana. Además, se asignó una mancha de referencia para originar un diagrama de ubicación con coordenadas (x,y) con el fin de identificar las manchas coincidentes en cada uno de los geles de forma automática. No obstante, se realizó una revisión manual pormenorizada, la edición y corrección de algunas de las manchas o de los emparejamientos detectados automáticamente. Los análisis cualitativos, cuantitativos y estadísticos aplicando la prueba t-student se realizaron respecto a la imagen “master” en cada uno de los experimentos.

Capítulo 5: Resultados

Hipocampos derechos (HD)

A partir del experimento creado para el análisis de los HD de las ratas inyectadas post S1, se determinó la cantidad de manchas en cada uno de los geles y se obtuvo el gel master, el cual se consideró como el proteoma general del HD bajo las condiciones de este trabajo y se empleó como referencia para comparar los diferentes grupos analizados (Tabla 6).

Tabla 6: Resumen general - Hipocampo derecho

Nombre gel	Grupo replica	Spots	Matched	% Match 1 ^a	% Match 2 ^b	Coef corr
R11-0HD	SS 3	449	449	100	47	0.663
R11-1HD	SS 3	383	383	100	40	0.761
R11-2HD	SS 3	485	485	100	51	0.736
R11-3HD	SS 3	312	312	100	33	0.697
R11-4HD	SS 3	415	415	100	44	0.709
R11-5HD	SS 3	391	391	100	41	0.674
R9-0HD	SS 24	488	488	100	51	0.784
R9-1HD	SS 24	521	521	100	55	0.707
R9-2HD	SS 24	508	508	100	54	0.661
R9-3HD	SS 24	574	574	100	61	0.811
R9-4HD	SS 24	418	418	100	44	0.721
R9-5HD	SS 24	567	567	100	60	0.815
R12-0HD	CHX 3	534	534	100	56	0.747
R12-1HD	CHX 3	368	368	100	39	0.743
R12-2HD	CHX 3	259	259	100	27	0.529
R12-3HD	CHX 3	270	270	100	28	0.677
R12-4HD	CHX 3	337	337	100	35	0.480
R12-5HD	CHX 3	460	460	100	48	0.668
R10-0HD	CHX 24	562	562	100	59	0.722
R10-1HD	CHX 24	635	635	100	67	0.829
R10-2HD	CHX 24	543	543	100	57	0.775
R10-3HD	CHX 24	548	548	100	58	0.740
*R10-4HD	CHX 24	817	817	100	86	1.000
R10-5HD	CHX 24	353	353	100	37	0.593

*Gel de referencia para construir la imagen master

^a Match de los spots del gel incluidos en el master

^b Match de los spots del gel vs spots totales del master

Hipocampos izquierdos (HI)

A partir del experimento creado para el análisis de los HI, se determinó la cantidad de manchas en cada uno de los geles y se obtuvo el gel master que constituye el proteoma general del HI, para analizar la expresión de proteínas en los diferentes grupos experimentales (Tabla 7).

Tabla 7: Resumen general - Hipocampo Izquierdo

Nombre gel	Grupo replica	Spots	Matched	% Match 1 ^a	% Match 2 ^b	coef corr
R11-0HI	SS 3	413	413	100	52	0.744
R11-1HI	SS 3	485	485	100	61	0.759
R11-2HI	SS 3	420	420	100	53	0.730
R11-3HI	SS 3	433	433	100	55	0.744
R11-4HI	SS 3	424	424	100	54	0.762
R11-5HI	SS 3	344	344	100	43	0.731
R9-0HI	SS 24	492	492	100	62	0.788
R9-1HI	SS 24	538	538	100	68	0.813
R9-2HI	SS 24	569	569	100	72	0.759
R9-3HI	SS 24	404	404	100	51	0.757
R9-4HI	SS 24	568	568	100	72	0.787
R9-5HI	SS 24	388	388	100	49	0.725
R12-1HI	CHX 3	441	441	100	56	0.726
R12-2HI	CHX 3	422	422	100	53	0.767
R12-3HI	CHX 3	465	465	100	59	0.749
R12-4HI	CHX 3	279	279	100	35	0.709
R12-5HI	CHX 3	273	273	100	34	0.741
R10-0HI	CHX 24	451	451	100	57	0.709
R10-1HI	CHX 24	403	403	100	51	0.794
*R10-2HI	CHX 24	687	687	100	87	1.000
R10-3HI	CHX 24	353	353	100	45	0.676
R10-4HI	CHX 24	374	374	100	47	0.750
R10-5HI	CHX 24	464	464	100	59	0.748

*Gel de referencia para construir la imagen master
^a Match de los spots del gel incluidos en el master
^b Match de los spots del gel vs totales del master

Comparación HD vs HI

Cantidad total de “spots” detectados: Realizando un análisis consenso por grupo experimental, se determinó la cantidad total de manchas detectadas en todos los geles de un mismo grupo. Los resultados de estos valores totales (Tabla 8) se analizaron y evidencian que los grupos re-expuestos 24h para ambos tratamientos (SS y CHX), e igualmente para ambos tiempos de inyección (pre y post) expresaron un mayor número de proteínas, respecto al grupo respectivo re-expuesto 3h después.

Este aumento en el conteo de proteínas, incluso cuando se usa cicloheximida, pudo darse como consecuencia de la experiencia en el LCE o como una respuesta del organismo frente a la punción realizada para administrar la SS o la CHX en los grupos respectivos. No obstante, el aumento en el número de proteínas cuando se prolonga el tiempo entre sesiones puede ser referente de la fase de consolidación del aprendizaje originado en la primera experiencia, pues soporta la hipótesis que establece como necesario una fase de síntesis de proteínas que consolida el aprendizaje posterior al evento que lo origina (Bekinschtein, 2007).

Tabla 8: Cantidad de spots detectados en cada grupo (en todos los geles del grupo)

Tiempo de inyección	Región	Tratamiento-tiempo (h) entre sesiones					
		SS 3	SS 24	CHX 3	CHX 24	Δ SS24-SS3	Δ CHX24-CHX3
Pre S1	HD	587	685	614	764	98	150
	HI	582	765	563	733	183	170
Post S1	HD	575	629	548	629	54	81
	HI	563	643	590	660	80	70

Análisis de correlación de los “spots” detectados en cada grupo:

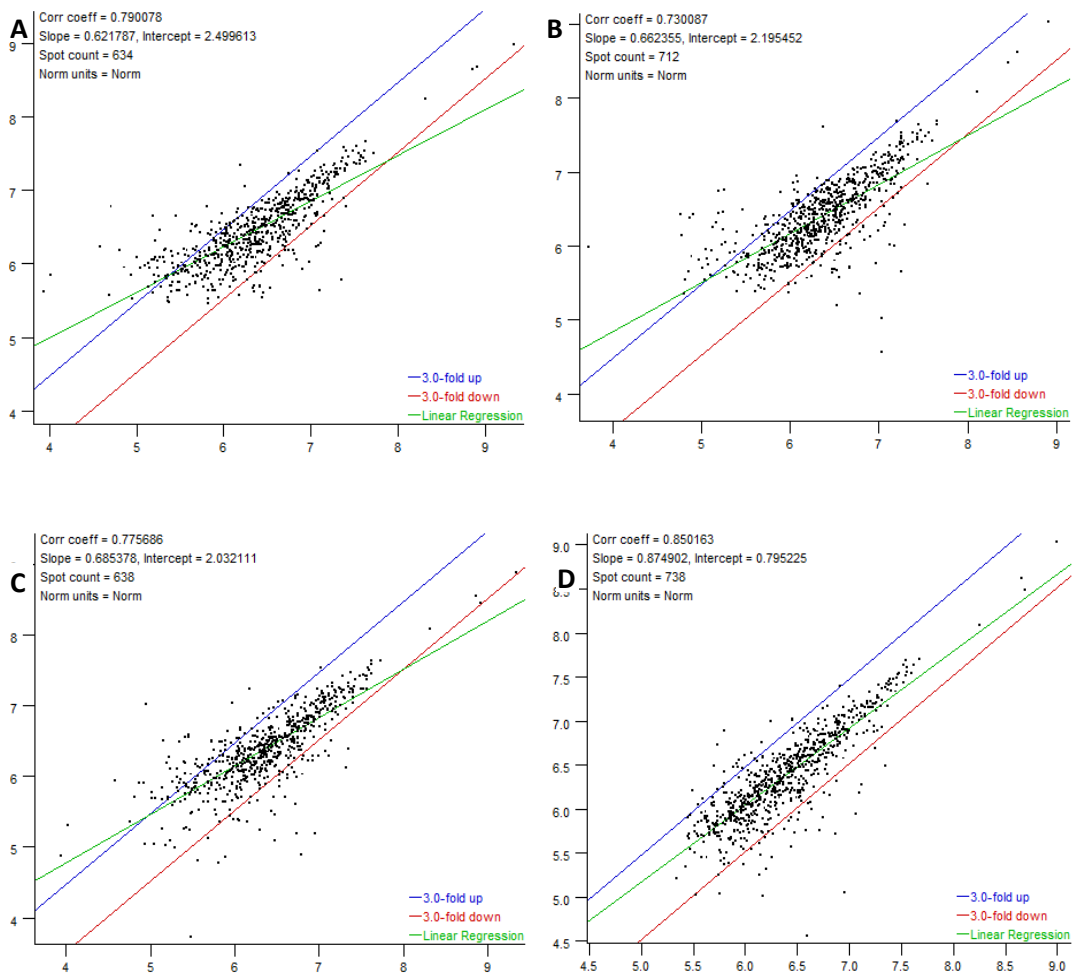
Se realizó un análisis de correlación lineal entre las manchas detectadas en los diferentes grupos con el fin determinar cuáles manchas presentaban variaciones en su nivel de intensidad en términos del grupo experimental, se calculó el coeficiente de correlación entre las comparaciones que se realizaron, al igual que los valores de la pendiente y el intercepto. Se especificó un valor de diferencia del 30% en la intensidad de las manchas entre los grupos comparados.

En la figura 19 se observan las correlaciones efectuadas, las líneas azul y roja indican los límites considerados para no tener cambios en la expresión, aquellas manchas que estuvieron fuera de estos límites fueron consideradas para análisis posteriores. La línea verde indica la recta calculada por el modelo de correlación lineal. Las comparaciones realizadas se hicieron entre los grupos con el mismo tratamiento variando el tiempo de re-exposición (Fig. 19A y 19B) y seguidamente se compararon teniendo en cuenta el mismo tiempo de re-exposición variando el tratamiento (Fig. 19C y 19D). Todos los análisis presentan un coeficiente de correlación mayor a 0.7 indicando un buen valor en este parámetro de análisis.

Análisis comparativos realizados entre los diferentes grupos y regiones del hipocampo: Igualmente se realizaron comparaciones cuantitativas (diferencias de $\pm 30\%$) y análisis estadístico con la prueba *t-student* tomando como significativas aquellas manchas con valor $p < 0.5$. En la tabla 9 se observan la cantidad de manchas diferentes cuando se compararon los diferentes grupos de trabajo. De esta cantidad de manchas se seleccionaron aquellas que se consideraron de fácil manipulación manual posterior y eran completamente identificadas como una mancha sin alteraciones o superposición con otras. Finalmente, se establecieron cuales proteínas eran comunes entre las variaciones analizadas y se estableció el grupo de proteínas que serían identificadas por MALDI-TOF MS.

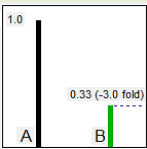
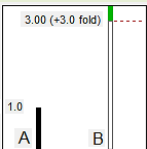
Capítulo 5: Resultados

Figura 20: Análisis de correlación lineal realizados entre los grupos experimentales. **A)** SS3 (eje x) vs SS24 (eje y) **B)** CHX3 (eje x) vs CHX24 (eje y) **C)** SS3 (eje x) vs CHX3 (eje y) **D)** SS24 (eje x) vs CHX24 (eje y).



Capítulo 5: Resultados

Tabla 9: Análisis comparativos entre los diferentes grupos

Análisis realizado	Tipo	Grupo de comparación		Spots Totales		Spots Seleccionados*	
		A	B	HD	HI	HD	HI
Cuantitativo		CHX 3	CHX 24	49	16	3	2
		SS 24	CHX 24	37	22	5	5
		SS 3	CHX 3	44	35	7	10
		SS 3	SS 24	28	11	35	2
Cuantitativo		CHX 3	CHX 24	63	40	19	20
		SS 24	CHX 24	23	17	3	4
		SS 3	CHX 3	71	9	15	1
		SS 3	SS 24	76	24	29	9
Estadístico	Prueba <i>t-student</i>	CHX 3	CHX 24	72	14	45	11
		SS 24	CHX 24	22	40	8	20
		SS 3	CHX 3	21	18	10	11
		SS 3	SS 24	97	97	58	36

*Spots que eran fácilmente visibles y podían escindir-se sin ambigüedad

5.4.2. Análisis por Espectrometría de Masas MALDI-TOF

Proteínas identificadas por Espectrometría de Masas MALDI-TOF: De todas las proteínas que presentaron variaciones en los análisis cuantitativos, estadístico y de correlación lineal se seleccionaron alrededor de 106 manchas para su identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Cada mancha fue escindida manualmente y procesada para obtener fragmentos trípticos y poder identificarla mediante la huella peptídica. Los espectros de masas fueron obtenidos en el equipo MALDI TOF XtremeFlex (Brucker Daltonics) y analizados en el software FlexAnalysis (Brucker Daltonics), para finalmente obtener la lista de datos m/z . La búsqueda realizó mediante la herramienta Biotools del software, la cual constituye una interfaz para el motor de búsqueda Mascot. En el proceso de búsqueda se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: Taxonomía – mamíferos, errores en el

Capítulo 5: Resultados

Tabla 10. Proteínas del hipocampo de ratas Wistar que mostraron variaciones durante el proceso de re-exposición al LCE

N°	SSP	AC Número	ID_proteína	Nombre completo	MW (KDa)	pI	Score	Matches	Coverage	Función
1	5205	A1A5P0	BORG5_RAT	Cdc42 effector protein 1	41.1	6.81	41	6	13	Regulación
2	3204	A1A5Q6	SMK_RAT	Sperm motility kinase	74.7	9.63	49	11	14	Enzimática
3	3707	B2DD29	BRSK1_RAT	Serine/threonine-protein kinase BRSK1	85.7	9.39	54	18	17	Enzimática
4	7202	B2GV91	LYRM2_RAT	LYR motif-containing protein 2	10.4	10.3	60	5	44	
5	7801	B2RYU8	LYRM1_RAT	LYR motif-containing protein 1	14.4	9.73	57	4	27	Apóptosis
6	4104	D3Z8N2	RN187_RAT	E3 ubiquitin-protein ligase RNF187	26.9	5.43	57	6	25	Ubiquitinación
7	7605	D3ZF42	SENP7_RAT	Sentrin-specific protease	118.1	5.6	47	5	4	Ubiquitinación
8	7301	D3ZRW8	EKI2_RAT	Ethanolamine kinase 2	45.4	6.47	42	6	11	Enzimática
9	4110	D3ZS74	OMA1_RAT	Metalloendopeptidase OMA1	57.7	9.36	41	5	10	Regulación
10	3107	O08839	BIN1_RAT	Myc box-dependent-interacting protein 1	64.7	4.95	40	6	8	Regulación
11	4103	O35780	BHE40_RAT	Class E basic helix-loop-helix protein 40	45.9	8.07	53	4	13	Transcripción
12	5701	O54960	CAPON_RAT	Carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein	55.8	5.74	36	5	7	Regulación
13	OO11	P01355	CCKN_RAT	Cholecystokinin	13.0	8.96	62	5	39	
14	6108	P04636	MDHM_RAT	Malate dehydrogenase, mitochondrial	36.1	8.93	39	6	21	Enzimática
15	1104	P08025	IGF1_RAT	Insulin-like growth factor I	17.6	9.53	63	5	26	Regulación
16	2008	P08503	ACADM_RAT	Medium-chain specific acyl- CoA dehydrogenase, mitochondrial	46.9	8.63	63	4	10	Enzimática
17	6402	P09606	GLNA_RAT	Glutamine synthetase	43.0	6.64	111	15	34	Enzimática
18	6304	P0C279	CPEB1_RAT	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1	62.0	7.51	40	8	12	Traducción
19	8304	P12346	TRFE_RAT	Serotransferrin	78.5	7.14	48	14	23	Transporte
20	6505	P15429	ENOB_RAT	Beta-enolase	47.3	7.08	91	11	17	Enzimática
21	4211	P17764	THIL_RAT	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	45.0	8.92	59	4	7	Enzimática
22	2107	P19234	NDUV2_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	27.7	6.23	67	5	21	Transporte
23	2109	P22288	GCH1_RAT	GTP cyclohydrolase 1	27.2	8.42	56	5	21	Transcripción
24	3111	P22288	GCH1_RAT	GTP cyclohydrolase 1	27.2	8.42	41	3	9	Enzimática
25	2101	P23363	BDNF_RAT	Brain-derived neurotrophic factor	28.5	8.91	80	9	24	Neuroplasticidad
26	4301	P29321	EPHA8_RAT	Ephrin type-A receptor 8 (Fragment)	41.6	8.82	39	5	20	Neurogenesis
27	4305	P31000	VIME_RAT	Vimentin	53.8	5.06	46	10	22	Estructural

Capítulo 5: Resultados

28	4103	P35280	RAB8A_RAT	Ras-related protein Rab-8A	23.8	9.15	65	5	20	Transporte
29	1107	P35704	PRDX2_RAT	Peroxiredoxin-2	21.9	5.34	62	6	20	Enzimática
30	2003	P35704	PRDX2_RAT	Peroxiredoxin-2	21.9	5.34	69	8	22	Enzimática
31	5601	P35745	ACYP2_RAT	Acylphosphatase-2	10.9	9.3	44	5	45	Enzimática
32	1001	P37377	SYUA_RAT	Alpha-synuclein	14.5	4.74	74	7	41	Regulación
33	5103	P39069	KAD1_RAT	Adenylate kinase isoenzyme 1	21.7	7.66	67	6	30	Enzimática
34	5101	P45352	TYSY_RAT	Thymidylate synthase	35.3	6.01	48	5	18	Enzimática
35	4409	P45352	TYSY_RAT	Thymidylate synthase	35.3	6.01	35	4	10	Enzimática
36	4404	P47860	K6PP_RAT	6-phosphofructokinase type C	86.6	6.95	82	12	14	Enzimática
37	5105	P47973	TTP_RAT	Tristetraprolin	34.3	8.8	45	4	11	Transcripción
39	6102	P48500	TPIS_RAT	Triosephosphate isomerase	27.3	6.89	80	10	58	Enzimática
40	6104	P52020	ERG1_RAT	Squalene monooxygenase	64.6	8.72	35	5	7	Enzimática
41	4309	P52020	ERG1_RAT	Squalene monooxygenase	64.6	8.72	39	7	7	Enzimática
42	5304	P54283	CACB1_RAT	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-1	65.9	6.2	64	5	9	Transporte
43	4204	P57790	KEAP1_RAT	Kelch-like ECH-associated protein 1	70.8	6.04	57	5	11	Transcripción
44	3001	P59647	FXVD5_RAT	FXVD domain-containing ion transport regulator 5	19.3	8.85	57	4	13	Transporte
45	2105	P61214	ARL4A_RAT	ADP-ribosylation factor-like protein 4A	22.7	9.26	41	4	24	Transmisión de señales
46	4613	P62813	GBRA1_RAT	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1	51.9	9.34	80	9	16	Transporte
47	4306	P62916	TF2B_RAT	Transcription initiation factor IIB	35.3	8.67	50	6	22	Transcripción
48	5202	P63326	RS10_RAT	40S ribosomal protein S10	18.9	10.2	50	3	12	Estructural
49	5203	P70615	LMNB1_RAT	Lamin-B1	66.8	5.16	56	9	15	Estructural
50	6502	P85834	EFTU_RAT	Elongation factor Tu, mitochondrial (Fragments)	49.9	7.23	62	5	15	Traducción
51	7205	P85970	ARPC2_RAT	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	34.5	6.84	92	10	24	Regulación
52	2106	Q00981	UCHL1_RAT	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	25.2	5.14	168	15	51	Ubiquitinación
53	6201	Q02527	MGAT3_RAT	Beta-1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	62.6	8.75	45	7	20	Enzimática
54	7304	Q32Q06	AP1M1_RAT	AP-1 complex subunit mu-1	48.7	6.82	41	9	17	Transporte
55	4609	Q32Q90	APOP1_RAT	Apoptogenic protein 1, mitochondrial	23.0	10.1	39	5	20	Apóptosis
56	2303	Q3B8Q1	DDX21_RAT	Nucleolar RNA helicase 2	86.5	9.39	43	6	7	Transcripción
57	4307	Q498M5	SH3R2_RAT	Putative E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF2	80.7	9.85	29	4	5	Ubiquitinación
58	4610	Q4V8B5	CC116_RAT	Coiled-coil domain-containing protein 116	60.4	9.46	46	6	7	
59	6605	Q4V8F9	HSDL2_RAT	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	58.6	5.85	51	11	16	Enzimática

Capítulo 5: Resultados

60	4308	Q4VSI4	UBP7_RAT	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	129.4	5.31	47	12	13	Ubiquitinación
61	4314	Q53E76	GTDC1_RAT	Glycosyltransferase-like domain-containing protein 1	45.1	6.25	42	7	27	Enzimática
62	1004	Q5BK18	NARFL_RAT	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NARFL	53.8	6.09	54	4	6	Transcripción
63	3206	Q5BKC9	NGEF_RAT	Ephexin-1	81.5	5.85	54	10	18	Neurogenesis
64	3103	Q5EGY4	YKT6_RAT	Synaptobrevin homolog YKT6	22.4	6.44	64	5	26	Transporte
65	4102	Q5EGY4	YKT6_RAT	Synaptobrevin homolog YKT6	22.5	6.44	63	5	18	Transporte
66	4504	Q5HZA6	PPCEL_RAT	Prolyl endopeptidase-like	84.5	6.08	40	7	11	Proteolisis
67	1302	Q5J2D6	GGNB1_RAT	Gametogenetin-binding protein 1	41.2	5.78	48	4	11	Diferenciación
68	4106	Q5M818	RM16_RAT	39S ribosomal protein L16	29.0	10.3	82	8	22	Traducción
69	2104	Q5M965	THG1_RAT	Probable tRNA(His) guanylyltransferase	35.2	8.44	45	3	9	Transcripción
70	4101	Q5M9G0	DCTD_RAT	Deoxycytidylate deaminase	20.4	8.11	48	3	12	Enzimática
72	4403	Q5PPF5	ZGPAT_RAT	Zinc finger CCCH-type with G patch domain-containing protein	56.6	5.32	40	5	11	Transcripción
73	4717	Q5U2Y1	GTF2L_RAT	General transcription factor II-I	110.7	6.38	37	5	4	Transcripción
74	5407	Q5XIK2	TMX2_RAT	Thioredoxin-related transmembrane protein 2	34.2	9.06	46	5	21	Regulación
75	5806	Q5XIS8	MID51_RAT	Mitochondrial dynamics protein MID51	51.7	8.04	48	4	7	Regulación
76	5102	Q62868	ROCK2_RAT	Rho-associated protein kinase 2	161.4	5.69	45	12	10	Transmisión de señales
77	0007	Q63053	ARC_RAT	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	45.6	5.35	62	6	13	Neuroplasticidad
78	3202	Q63147	HEM0_RAT	5-aminolevulinate synthase, erythroid-specific, mitochondrial	65.6	8.42	46	6	10	Enzimática
79	5802	Q63630	RHOX5_RAT	Homeobox protein Rhox5	23.2	5.83	61	4	17	Transcripción
80	2309	Q63679	KDM3A_RAT	Lysine-specific demethylase 3A	137.5	8.32	33	5	4	Transcripción
82	0006	Q63754	SYUB_RAT	Beta-Synuclein	14.5	4.48	86	6	35	Estructural
83	4105	Q642B2	ZN672_RAT	Zinc finger protein 672	54.0	9.59	41	6	13	Transcripción
84	3101	Q64632	ITB4_RAT	Integrin beta-4	200.5	5.6	52	20	16	Estructural
85	5807	Q66HC1	TDRD3_RAT	Tudor domain-containing protein 3	73.2	9.31	54	4	5	Transcripción
86	7210	Q6AXX6	F213A_RAT	Redox-regulatory protein FAM213A	25.7	9.19	46	6	25	Regulación
87	5804	Q6AXZ2	LRC46_RAT	Leucine-rich repeat-containing protein 46	36.3	5.13	53	5	16	
88	5204	Q61FU7	K1C42_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 42	50.5	5.09	54	5	13	Estructural
89	4405	Q6MG81	FKBPL_RAT	FK506-binding protein-like	38.3	6.53	42	7	21	Enzimática
90	4107	Q6TA25	FGOP2_RAT	FGFR1 oncogene partner 2 homolog	29.4	5.58	38	6	20	Regulación

Capítulo 5: Resultados

91	1214	Q6XFR6	GLPC_RAT	Glycophorin-C	10.5	4.97	49	2	34	Estructural
92	2103	Q7M0E7	RM14_RAT	39S ribosomal protein L14, mitochondrial	16.0	10.8	67	5	65	Traducción
93	7302	Q810D1	CHP2_RAT	Calcineurin B homologous protein 2	22.5	5.34	48	9	54	Transporte
94	1108	Q8CJ99	SCLT1_RAT	Sodium channel and clathrin linker 1	80.6	5.98	47	4	5	Transporte
95	7403	Q8R4G8	KCTD1_RAT	BTB/POZ domain-containing protein KCTD1	29.7	6.6	84	7	28	Transcripción
96	3205	Q99MF4	I11RA_RAT	Interleukin-11 receptor subunit alpha	47.3	8.07	54	4	13	Transmisión de señales
97	4708	Q9EQG6	KDIS_RAT	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	197.2	6.26	68	9	4	Neurogénesis
98	1306	Q9EQN5	SMBP2_RAT	DNA-binding protein SMUBP-2	109.4	8.85	45	4	3	Transcripción
99	1101	Q9ERR2	COMD5_RAT	COMM domain-containing protein 5	24.6	6.66	56	3	16	Diferenciación
100	5402	Q9ESM0	IP6K1_RAT	Inositol hexakisphosphate kinase 1	50.0	6.79	65	7	21	Enzimática
101	1114	Q9JHS6	ASIC4_RAT	Acid-sensing ion channel 4	59.3	6.99	43	7	8	Transporte
102	7306	Q9JJ31	CUL5_RAT	Cullin-5	91.4	8.08	45	11	14	Ubiquitinación
103	1201	Q9QZP1	GEMI2_RAT	Gem-associated protein 2	30.9	5.37	65	7	13	Transcripción
104	7203	Q9WTY2	REM2_RAT	GTP-binding protein REM	37.5	7.21	51	6	21	Transmisión de señales
105	4505	Q9WVA9	NPFF_RAT	Pro-FMRamide-related neuropeptide FF	13.1	9.69	32	2	14	Regulación
106	4707	Q9Z1E1	FLOT1_RAT	Flotillin-1	47.8	6.71	45	5	17	Regulación

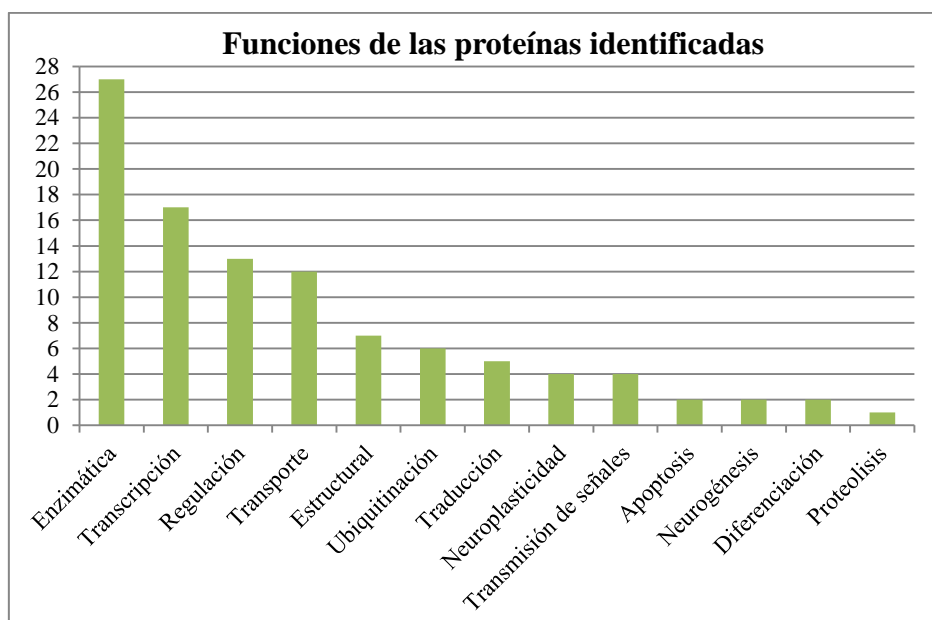
rompimiento de la tripsina – 1, Modificaciones fijas – Alquilación de la Cys con iodoacetamina, tolerancia en la masa de los péptidos – 100 ppm. En la Tabla 10 se relaciona la información de todas las proteínas seleccionadas con variaciones en el proceso e identificadas por la huella peptídica. De acuerdo a la taxonomía fijada se obtuvieron resultados significados con un score mayor o igual a 61 puntos.

Las proteínas de la tabla 10, las cuales se encuentran señaladas (círculo rojo) en la figura 21 pueden ser clasificadas en diferentes grupos funcionales. En la figura 20 se observa que principalmente estas proteínas desempeñan funciones enzimáticas (27 proteínas), seguida por proteínas que participan en el proceso de transcripción (17 proteínas), pasando por funciones de regulación, transporte, traducción, neuroplasticidad y en menor cantidad proteínas asociadas a los procesos de

Capítulo 5: Resultados

apoptosis, neurogénesis y proteólisis. Esto evidencia la complejidad del sistema nervioso a la hora de interpretar y almacenar la información a partir de las experiencias previas y su posterior modulación para enfrentar situaciones similares.

Figura 21: Funciones de las proteínas que presentaron variaciones y fueron identificadas mediante la huella peptídica por MALDI-TOF

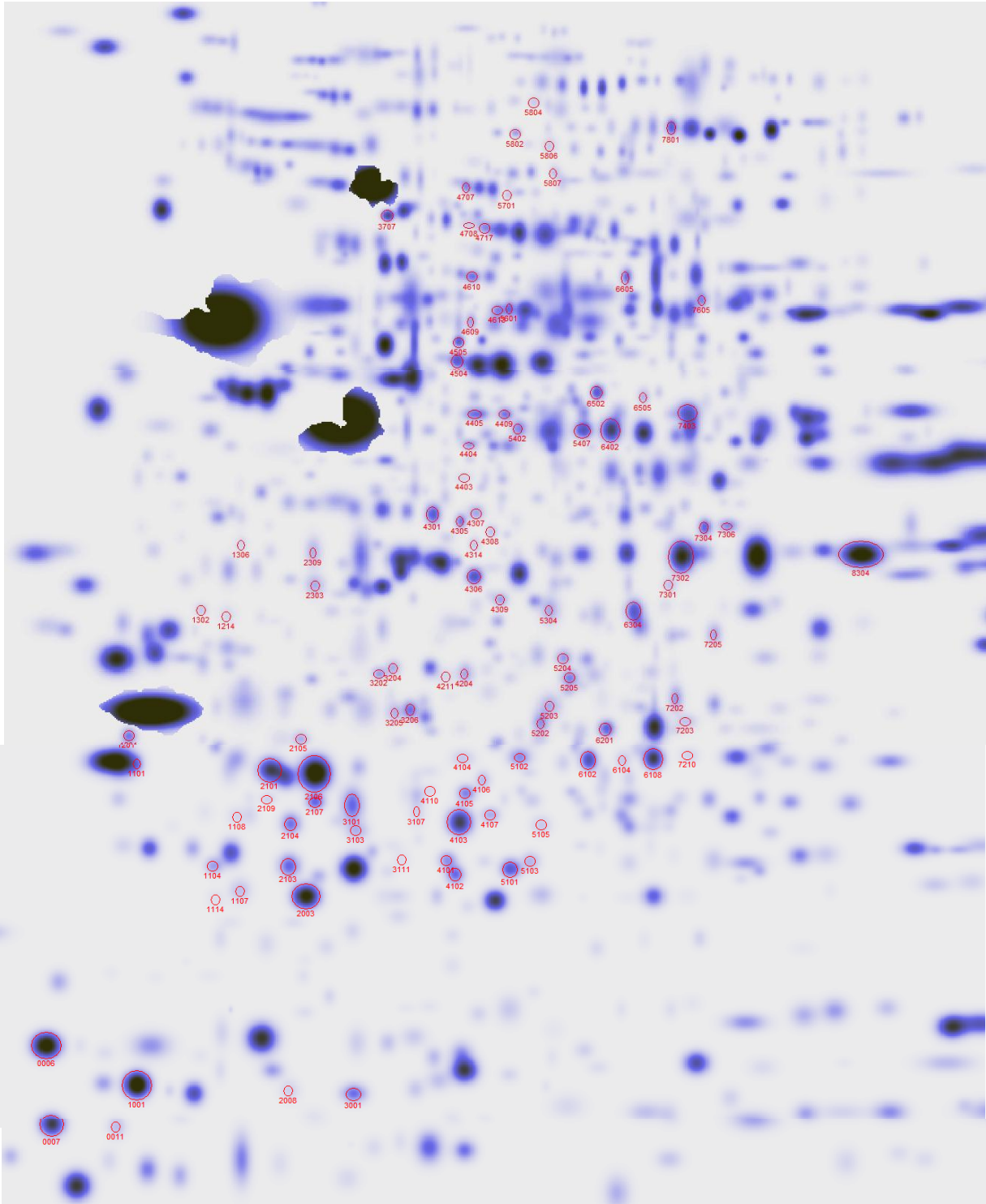


5.4.3. Análisis de factores

Las proteínas identificadas (Tabla 10) se analizaron junto a las variables de comportamiento mediante análisis de factores (correlación de Pearson) con el fin de establecer la relación entre la expresión de proteínas y los resultados del comportamiento. En la tabla 11 se muestran los diferentes factores generados, indicando las proteínas y parámetros de comportamiento que están correlacionados. Los factores fueron creados realizando un enfoque diferencial entre las regiones del hipocampo.

Capítulo 5: Resultados

Figura 22: Imagen master originada de la comparación de los hemisferios cerebrales HD y HI. Sobre la imagen están marcados los spots que presentaron variaciones significativas y eran fácilmente escindidos del gel. El número de cada spots corresponde al código SSP designado por el programa PD-Quest. (ver información de cada proteína identificado en la tabla 10).



Capítulo 5: Resultados

Tabla 11: Proteínas identificadas y agrupadas por factores en cada región del hipocampo

HIPOCAMPO DERECHO		
FACTOR 1		
SSP	Nombre completo	Función
4106	39S ribosomal protein L16	Traducción: Forma parte de la subunidad grande del RNAr.
4110	Metalloendopeptidase OMA1	Regulación: Contribuye con el sistema de control de calidad mitocondrial, el metabolismo de lípidos y la temperatura corporal.
5304	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-1	Transporte: Contribuye a la función del canal de Ca modulando la inhibición de proteína G.
1101	COMM domain-containing protein 5	Transducción de señales: Regula la activación de NF-Kappa B, un factor de transcripción.
7203	GTP-binding protein REM	Transducción de señales: Enlaza GTP hasta saturación y exhibe baja velocidad de hidrólisis.
3205	Interleukin-11 receptor subunit alpha	Transducción de señales: Receptor para interleukin-11, involucrado en procesos de proliferación y diferenciación.
3202	5-aminolevulinate synthase, erythroid-specific, mitochondrial	Enzimática: Cataliza la reacción Succinyl-CoA + glycine = 5-aminolevulinate + CoA + CO2 en la membrana mitocondrial.
7210	Redox-regulatory protein FAM213A	Regulación: Participa en la regulación redox celular, actúa como antioxidante.
FACTOR 2		
SSP	Nombre completo	Función
0006	Beta-Synuclein	Neuroplasticidad: Participa en los procesos de plasticidad sináptica.
0007	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	Neuroplasticidad: Regula la morfología celular y del citoesqueleto. Requerida para consolidar la actividad sináptica y la consolidación de la MLP.
1001	Alpha-synuclein	Regulación: Puede participar en la regulación de liberación y transporte de dopamina.
4609	Apoptogenic protein 1, mitochondrial	Apóptosis: Participa en la regulación de la apoptosis.
5804	Leucine-rich repeat-containing protein 46	No identificada.
CRUZ	Variable del número de cruzamientos en la actividad exploratoria al interior del LCE	
EBA	Variable del número de entradas al brazo abierto del LCE	
EBC	Variable del número de entradas al brazo cerrado del LCE	
%EBA	Variable del valor relativo del número de entradas al brazo abierto del LCE	
%TBA	Variable del valor relativo del tiempo de permanencia en el brazo abierto del LCE	
TBA	Variable del tiempo de permanencia en el brazo abierto del LCE	
FACTOR 3		
SSP	Nombre completo	Función
4308	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	Ubiquitinación: Regula la hidrólisis de la ubiquitinación de proteínas marcadas.
4405	FK506-binding protein-like	Regulación: Estabiliza la proteína p21 al enlazarse a Hsp90 y p21.
5802	Homeobox protein Rhox5	Transcripción: posible factor de transcripción regulado por el desarrollo.
6505	Beta-enolase	Enzimática: Cataliza la reacción 2-phospho-D-glycerate = phosphoenolpyruvate + H2O.
5102	Rho-associated protein kinase 2	Enzimática: Regulador en el citoesqueleto de actina y la polaridad celular.
4307	Putative E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF2	Ubiquitinación: Inhibe la actividad fosfatasa de PPP1CA, la cual participa en la plasticidad sináptica a largo plazo.
5202	40S ribosomal protein S10	Estructural: Componente de la subunidad ribosomal 40S.
6502	Elongation factor Tu, mitochondrial (Fragments)	Biosíntesis de proteínas: Promueve el enlace dependiente de GTP del aminoacil-tRNA a el sitio A de los ribosomas.

Capítulo 5: Resultados

TIEMPO	Variable del tiempo entre sesiones (3h, 24h)	
FACTOR 4		
SSP	Nombre completo	Función
7205	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	Regulación: Actúa como enlazante de actina del complejo Arp 2/3, el cual regula la polimerización de actina.
2303	Nucleolar RNA helicase 2	Transcripción: Cofactor para la transcripción activada por JUN.
2309	Lysine-specific demethylase 3A	Transcripción: Juega un rol central en el código de las histonas.
4717	General transcription factor II-I	Transcripción: Interactúa con la maquinaria basal de la transcripción al coordinar la formación del complejo multiproteínico en el promotor C-Fos.
7403	BTB/POZ domain-containing protein KCTD1	Transcripción: Puede reprimir la actividad transcripcional de los miembros de la familia AP-2.
3101	Integrin beta-4	Estructural: Juega un rol estructural crítico en las interacciones focales entre células.
3707	Serine/threonine-protein kinase BRSK1	Enzimática: Juega un rol clave en la polarización de las neuronas.
4409	Thymidylate synthase	Enzimática: Contribuye en la vía biosintética de thymidylato mitocondrial.
6605	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	Enzimática: Tiene actividad deshidrogenasa no esteroidea.
7302	Calcineurin B homologous protein 2	Transporte: Es un cofactor integral en la regulación del pH celular.
7304	AP-1 complex subunit mu-1	Transporte: Desempeña un papel en selección de proteínas en la red trans-Golgi (TGN) y endosomas.
FACTOR 5		
SSP	Nombre completo	Función
1114	Acid-sensing ion channel 4	Transporte: Canal iónico con alta afinidad por el sodio.
1302	Gametogenetin-binding protein 1	Diferenciación: Induce la fragmentación mitocondrial.
2105	ADP-ribosylation factor-like protein 4A	Transmisión de señales: Proteína que enlaza GTP.
5101	Thymidylate synthase	Enzimática: Contribuye en la vía biosintética de thymidylato mitocondrial.
7605	Sentrin-specific protease	Ubiquitinación: Proteasa que deconjugua SUMO2 y SUMO3 de proteínas específicas.
%TC	Variable del valor relativo del tiempo de permanencia en la zona central del LCE	
TC	Variable del tiempo de permanencia en la zona central del LCE	
HIPOCAMPO IZQUIERDO		
FACTOR 1		
SSP	Nombre completo	Función
4106	39S ribosomal protein L16	Traducción: Forma parte de la subunidad grande del RNAr.
4110	Metalloendopeptidase OMA1	Regulación: Contribuye con el sistema de control de calidad mitocondrial, el metabolismo de lípidos y la temperatura corporal.
5304	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-1	Transporte: Contribuye a la función del canal de Ca modulando la inhibición de proteína G.
4308	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	Ubiquitinación: Regula la hidrólisis de la ubiquitina de proteínas marcadas.
4101	Deoxycytidylate deaminase	Enzimática: Suple los sustratos nucleotídicos para la thymidylate sintetasa.
4103	Class E basic helix-loop-helix protein 40	Transcripción: Actúa como represor transcripcional.
4104	E3 ubiquitin-protein ligase RNF187	Ubiquitinación: Actúa como un coactivador de la expresión de genes mediado por JUN.

Capítulo 5: Resultados

4105	Zinc finger protein 672	Transcripción: Involucrada en la regulación transcripcional.
4211	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	Enzimática: Juega un rol principal en el metabolismo de cuerpos cetonicos.
4305	Vimentin	Estabilizadora: Se encuentra unida a algunos organelos.
4403	Zinc finger CCCH-type with G patch domain-containing protein	Transcripción: Actua como represor transcripcional.
4404	6-phosphofructokinase type C	Enzimática: Participa en el proceso de glicolisis. Cataliza la reacción ATP + D-fructose 6-phosphate = ADP + D-fructose 1,6-bisphosphate.
4610	Coiled-coil domain-containing protein 116	No identificada
TTO	Variable del tratamiento administrado a los roedores (SS, CHX)	

FACTOR 2

SSP	Nombre completo	Función
1101	COMM domain-containing protein 5	Transducción de señales: Regula la activación de NF-Kappa B, un factor de transcripción.
1107	Peroxiredoxin-2	Enzimática: Participa en la regulación redox eliminando peroxidos.
7203	GTP-binding protein REM	Transducción de señales: Enlaza GTP hasta saturación y exhibe baja velocidad de hidrólisis.
0006	Beta-Synuclein	Neuroplasticidad: Participa en los procesos de plasticidad sináptica.
0007	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	Neuroplasticidad: Regula la morfología celular y del citoesqueleto. Requerida para consolidar la actividad sináptica y la consolidación de la MLP.
1001	Alpha-synuclein	Regulación: Puede participar en la regulación de liberación y transporte de dopamina.
1108	Sodium channel and clathrin linker 1	Transporte: Regula la actividad del canal de sodio al anclar a clathrin.
1201	Gem-associated protein 2	Transcripción: Juega un papel importante en el splicing de pre-ARNm celulares
1214	Glycophorin-C	Estructural: Juega un rol importante al ayudar a mantener las propiedades de la membrana.
2103	39S ribosomal protein L14, mitochondrial	Traducción: Puede formar parte de 2 intersubunidades en el ensamble de ribosomas.
3001	FXFD domain-containing ion transport regulator 5	Transporte: Participa en la regulación de canales iónicos.
5103	Adenylate kinase isoenzyme 1	Enzimática: Participa en la regulación de la homeostasis de la energía celular.
5105	Tristetraprolin	Transcripción: Involucrada en la regulación post-transcripcional.
6102	Triosephosphate isomerase	Enzimática: Participa en el metabolismo de carbohidratos. Cataliza D-glyceraldehyde 3-phosphate = glycero phosphate.
6104	Squalene monooxygenase	Enzimática: Participa en la biosíntesis de esteroles. Cataliza Squalene + NADPH + O ₂ = (3S)-2,3-epoxy-2,3-dihydrosqualene + NADP ⁺ + H ₂ O.

FACTOR 3

SSP	Nombre completo	Función
4405	FK506-binding protein-like	Regulación: Estabiliza la proteína p21 al enlazarse a Hsp90 y p21.
5802	Homeobox protein Rhox5	Transcripción: posible factor de transcripción regulado por el desarrollo.
6505	Beta-enolase	Enzimática: Cataliza la reacción 2-phospho-D-glycerate = phosphoenolpyruvate + H ₂ O.
1114	Acid-sensing ion channel 4	Transporte: Canal iónico con alta afinidad por el sodio.
7205	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	Regulación: Actua como enlazante de actina de el complejo Arp 2/3, el cual regula la polimerización de actina.
1306	DNA-binding protein SMUBP-2	Transcripción: Actua como un regulador transcripcional.
4204	Kelch-like ECH-associated protein 1	Transcripción: Tiene actividad transcripcional.

Capítulo 5: Resultados

5203	Lamin-B1	Estructural: Componente de la capa fibrosa de la lamina nuclear.
5701	Carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein	Regulación: Participa en la regulación de la síntesis de NO neuronal.
5807	Tudor domain-containing protein 3	Transcripción: Participa como coactivador de la transcripción y regulador de la traducción.
7306	Cullin-5	Ubiquitinación: Componente de complejos que median la ubiquitinación.

FACTOR 4

SSP	Nombre completo	Función
5102	Rho-associated protein kinase 2	Enzimática: Regulador en el citoesqueleto de actina y la polaridad celular.
2303	Nucleolar RNA helicase 2	Transcripción: Cofactor para la transcripción atizada por JUN.
2309	Lysine-specific demethylase 3A	Transcripción: Juega un rol central en el código de las histonas.
4717	General transcription factor II-I	Transcripción: Interactúa con la maquinaria basal de la transcripción al coordinar la formación del complejo multiproteínico en el promotor C-Fos.
7403	BTB/POZ domain-containing protein KCTD1	Transcripción: Puede reprimir la actividad transcripcional de los miembros de la familia AP-2.
4504	Prolyl endopeptidase-like	Proteólisis: Participa en la degradación de proteínas, tiene actividad endopeptidasa.
4613	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1	Transporte: Componente del receptor de GABA, inhibidor del sistema nervioso.
5601	Acyphosphatase-2	Enzimática: Cataliza un acylphosphate + H ₂ O = a carboxylate + phosphate.
5806	Mitochondrial dynamics protein MID51	Regulación: Participa en el fisión mitocondrial.
7801	LYR motif-containing protein 1	Apóptosis: Puede promover la proliferación celular y la inhibición de apoptosis.

FACTOR 5

SSP	Nombre completo	Función
5205	Cdc42 effector protein 1	Regulación: Involucrado en la organización del citoesqueleto de actina.
5402	Inositol hexakisphosphate kinase 1	Enzimática: Convierte inositol hexakisphosphate (InsP6) to diphosphoinositol pentakisphosphate (InsP7/PP-InsP5).
CRUZ	Variable del número de cruzamientos en la actividad exploratoria al interior del LCE	
EBA	Variable del número de entradas al brazo abierto del LCE	
EBC	Variable del número de entradas al brazo cerrado del LCE	
%EBA	Variable del valor relativo del número de entradas al brazo abierto del LCE	
%TBA	Variable del valor relativo del tiempo de permanencia en el brazo abierto del LCE	
TBA	Variable del tiempo de permanencia en el brazo abierto del LCE	
TBC	Variable del tiempo de permanencia en el brazo cerrado del LCE	
%TC	Variable del valor relativo del tiempo de permanencia en la zona central del LCE	
TC	Variable del tiempo de permanencia en la zona central del LCE	

Establecidos los factores de agrupamiento de las proteínas y las variables comportamentales se realizó la verificación de las variaciones cuantitativas y estadísticas en los niveles de intensidad de las proteínas para establecer que modificaciones presentaron. En las tablas 12 y 13 se indican los códigos SSP de las proteínas agrupadas en su respectivo factor con el tipo de variación que presentó.

Capítulo 5: Resultados

Tabla 13. Variaciones de las proteínas del hipocampo izquierdo agrupadas en factores

Factor	SSP proteína	Cuantitativo					Cuantitativo					Prueba t student			
		A B	CHX 3 CHX 24	SS 24 CHX 24	SS 3 CHX 3	SS 3 SS 24	CHX 3 CHX 24	SS 24 CHX 24	SS 3 CHX 3	SS 3 SS 24	CHX 3 CHX 24	SS 24 CHX 24	SS 3 CHX 3	SS 3 SS 24	
1	4101						X							X	
	4103													X	
	4104										X				
	4105						X							X	
	4106													X	
	4110										X				
	4211													X	
	4305													X	
	4308									X					
	4403										X				
	4404												X		
	2	4610												X	
5304														X	
0006														X	
0007														X	
1001											X				
1101														X	
1107											X			X	
1108														X	
1201							X							X	
1214											X				
2103											X				
3		3001									X				
	5103													X	
	5105				X										
	6102				X		X								
	6104										X				
	1114													X	
	1306						X								
	4204						X	X							
	4405						X	X							
	5203													X	
	5701													X	
	4	5802										X			
5807											X				
6505												X			
7205														X	
7306														X	
2303														X	
2309							X								
4504							X					X			
4613												X			
4717														X	
5102							X							X	
5601														X	
5806													X		
7403													X		
7801													X		
5	5205									X				X	
	5402									X				X	

Capítulo 6: *Discusión*

“La ciencia es incapaz de resolver los últimos misterios de la naturaleza, porque en el último análisis nosotros mismos somos parte de la naturaleza, es decir, del misterio que tratamos de resolver”

Max Planck

Capítulo 6
DISCUSIÓN



Capítulo 6: Discusión

Con el objetivo de indagar los mecanismos moleculares asociados a la formación de la memoria durante una primera experiencia en el laberinto en cruz elevado y basados en la teoría de la consolidación, la cual argumenta que se requiere de la síntesis de proteínas durante la formación de la memoria; se planteó que el uso de la CHX, modificaría el patrón de comportamiento y la expresión de proteínas durante una segunda experiencia en este modelo conductual. Así, el enfoque proteómico basado en electroforesis 2D seguido de espectrometría de masas (MALDI-TOF), permitió construir mapas de proteínas del hipocampo de ratas (Fig. 21) e identificar aquellas proteínas que presentaron diferencias significativas en función de las variables de estudio: tratamiento, tiempo de inyección e intervalo de tiempo entre sesiones (Tabla 10).

En el tratamiento se empleó SS como control y CHX como inhibidor de la síntesis de proteínas; en el caso de la evaluación del tiempo de inyección se tuvo en cuenta que los inhibidores de la síntesis de proteínas interrumpen la formación de la memoria si son administrados antes o inmediatamente después de un entrenamiento y/o nueva experiencia, por lo cual se administró el tratamiento 30 minutos previos o inmediatamente después de la S1, con el fin de evaluar las fases de adquisición y consolidación de la memoria; finalmente, considerando la evaluación del efecto del tratamiento a corto y a largo plazo, se consideró la re-exposición al laberinto con intervalo de tiempo entre sesiones de 3h o 24h, para observar las variaciones en términos de la memoria a corto y a largo plazo, respectivamente.

Cuando se usan los inhibidores de síntesis de proteínas se ha sugerido que, para experimentos *in vivo* con este tipo de compuestos podría ser más conveniente utilizar vías de administración sistémicas, pues a pesar de su falta de especificidad no inducen apoptosis en el cerebro como suele ocurrir con tratamientos a nivel local (Flint et al., 2007). Por esta razón, en el presente estudio la administración de SS y CHX se hizo de forma sistémica empleando la vía intraperitoneal (i.p.). En el estudio y revisión del uso de los inhibidores de la síntesis de proteínas, se encontró que

Capítulo 6: Discusión

dosis de 0,5 - 0,6 mg/kg, i.p. de CHX no son tóxicas y reducen la síntesis de proteínas en el cerebro alrededor de un 75% durante los primeros 20 minutos después de su administración; pasadas 12 horas se ha restaurado en su mayor parte la capacidad de síntesis y su normalización es completa luego de las 48 horas (Luft et al., 2004). 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 agua, demuestran un profundo deterioro en la retención de la información respecto al grupo control y a otro grupo con dosis de 0,5 mg/kg. La dosis más alta (1mg/kg) de CHX no se consideró tóxica ya que no se reportó un deterioro significativo a nivel locomotor o motivacional (McGauran et al., 2008).

Igualmente, empleando la CHX para bloquear la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal durante periodos de re-exposición, se concluyó que la CHX puede disminuir las consecuencias comportamentales del estrés. En este contexto, el estudio de la administración intraventricular (i.c.v.) de CHX en el hipocampo dorsal de ratas machos Wistar, encontró que la CHX puede prevenir la reducción en la exploración del laberinto en cruz elevado (LCE) después de haberles inducido estrés, lo cual sugiere que la inhibición de la síntesis de nuevas proteínas estaría atenuando el comportamiento derivado de dicha emoción (Mendoca et al., 1998)

Por otra parte, el estudio de la tolerancia al efecto de fármacos ansiolíticos ha establecido que el OTT puede desarrollarse debido a la memoria derivada de la experiencia previa que tiene el roedor en ciertos aparatos incluyendo el LCE. Para ello, la actividad en el hipocampo dorsal está implicada en la consolidación de la memoria a largo plazo, un proceso que requiere de la síntesis de proteínas. Sin embargo, es desconocido si la interrupción de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal puede prevenir este fenómeno y explicar por qué los animales no responden a las benzodiazepinas durante la re-exposición al LCE. En este contexto, la administración intrahipocampal de anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en ambos hemisferios cerebrales ya sea 15 min previos o a las 0, 3, 6 h después de la exposición al LCE, demostró que la administración de la anisomicina

Capítulo 6: *Discusión*

(80 µg) en tiempos cercanos a la experiencia, preservó el efecto ansiolítico del midazolam (MDZ; 0.5 mg/kg, i.p.) en ratas re-expuestas al LCE 24 h después, lo cual sugiere que la información consolidada por la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal impactó sobre la respuesta del animal a éste fármaco (Gazarini et al., 2011).

En estudios que relacionan la formación de la memoria durante la primera experiencia en el LCE; uno de ellos planteó evaluar el efecto de la CHX (1mg/kg, i.p) sobre la memoria emocional y la expresión de proteínas en el hipocampo dorsal de ratas wistar. La administración de la CHX se hizo 15 min previos a la primera exposición y la re-exposición 48 h después. El estudio concluyó que a nivel comportamental 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 lateral entre los hemisferios hipocampales, detectando mayor cantidad de proteínas en el hipocampo derecho. Además, se determinó que el conteo de proteínas en los hipocampos dorsales de las ratas expuestas al LCE fue mayor que en las ratas no expuestas, lo cual establece que la experiencia en el LCE lleva a un aumento en la síntesis de las proteínas (Álvarez, 2012).

Además, en el estudio de los cambios generados por la CHX sobre la memoria a largo plazo y el perfil proteómico del hipocampo dorsal de ratas expuestas al LCE, se evaluó el comportamiento de ratas wistar inyectadas con CHX (3 mg/mL, i.p.) 30 minutos previos a la primera experiencia y re-expuestas 3 h ó 24 h después, y concluyó que las ratas disminuyen significativamente la exploración en la segunda experiencia. Esta disminución fue mayor para los grupos tratados con la CHX y se expone que este resultado se debe posiblemente a la disminución de la actividad locomotora originada por la administración de la CHX. Los resultados sugieren que la CHX no afectó la memoria a largo plazo, pero si afectó la actividad exploratoria del animal (Ortiz, 2014).

El análisis de los parámetros de comportamiento en el presente estudio empieza con la figura 15, la cual muestra las gráficas de las variables temporales y su relación

Capítulo 6: Discusión

con cada grupo y la sesión de exposición. En la figura 15A se compara el TBC entre la S1 y la S2 de los diferentes grupos experimentales, se observa que este parámetro es mayor durante la S2. Sin embargo, se esperaba que el comportamiento durante la S1 fuese similar entre los diferentes grupos (sin diferencias significativas) ya que la administración del tratamiento (SS o CHX) se hizo posterior a esta sesión; hecho que no se observa en el comportamiento de los animales del grupo CHX 3h, pues el TBC durante la S1 es diferente a los otros tres grupos de estudio. Igualmente, este patrón se repite cuando se analizan los valores relativos del mismo parámetro, el %TBC (Fig. 15B).

El aumento del TBC tiene correspondencia con la disminución del TBA durante la S2. Se observa en la figura 15C que los animales salen a explorar los BAs cuando fueron expuestos por primera vez al LCE; comportamiento que se esperaba en la S1 pues los roedores suelen explorar los ambientes novedosos como posible mecanismo de evaluación del riesgo (Conde *et al*, 2001; Bertoglio & Carobrez, 2000). Nuevamente se esperaba que el TBA fuera homogéneo para todos los grupos; hecho que solamente se observó para los animales de los grupos re-expuestos 24 h después de la S1. Para los animales de los grupos re-expuestos 3 h después de la S1 este parámetro de comportamiento se encontró alterado; en el grupo CHX 3h el TBA es mayor, mientras que en el grupo SS 3h es menor al compararlos con los grupos re-expuestos 24 h. Esta observación se mantiene cuando se analizan los valores relativos del TBA (%TBA), indicando una posible alteración en las condiciones iniciales de la reactividad de los animales durante la primera exposición al laberinto.

No obstante, al comparar el TBA entre las dos sesiones (S2 vs S1) en cada grupo experimental (Fig. 15C), se observa que hay una disminución del TBA durante la S2 en todos los grupos. Esto hecho ha sido observado en muchos estudios durante la fase de re-exposición, incluso cuando se emplean benzodiazepinas durante la S2, lo cual indica que la experiencia previa (S1) influye en la exploración del BA durante la

Capítulo 6: Discusión

re-exposición (S2). El perfil observado en los diferentes grupos al analizar el TBA se vuelve a repetir en el parámetro relativo, el %TBA (Fig. 15D).

Al evaluar el tiempo en la plataforma central del laberinto (TC), se observa (Fig. 15E) que el patrón de comportamiento es similar en todos los grupos durante la S1 y, al igual que el TBA, la actividad en esta región del laberinto es reducida durante la S2 en los diferentes grupos indicando nuevamente disminución en la actividad exploratoria durante la re-exposición. Este patrón de comportamiento se repite en la evaluación de los valores relativos del tiempo en la plataforma central, %TC (Fig. 15F). Estas observaciones en los parámetros temporales del comportamiento, corroboran la inclinación natural de los roedores a permanecer en los sitios cerrados, ya que les confieren mayor protección frente a peligros potenciales. En el caso del LCE estos sitios corresponden a los BCs del laberinto. Este patrón de comportamiento y la experiencia que tiene el animal durante la S1 establecen las modificaciones conductuales observadas durante la re-exposición, las cuales indican disminución en la actividad exploratoria del laberinto evitando los BAs, ya que representan zonas de peligro potencial como espacios abiertos y alturas.

Al analizar los grupos tratados con solución salina se observa en los parámetros temporales (Figuras 15A, 15C, 15E), que los valores en la S2 son reducidos cuando la re-exposición se realiza 24 h después. No obstante, se puede analizar que hay una diferencia en función del intervalo entre sesiones, lo cual se planteó para encontrar diferencias entre la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo. En este contexto, se observa en el grupo re-expuesto 3 h después, no hay diferencia en el TBA entre las sesiones; lo cual indicaría que el animal no tiene un procesamiento a corto plazo que le permita reconocer los espacios de peligro y por ende, vuelve a explorarlos. Por el contrario, cuando la re-exposición es 24 h después, se presenta una reducción en la exploración de este tipo de brazo, lo cual se interpreta como la manifestación del *OTT* y por lo tanto, se evidencia consolidación de la información aversiva adquirida durante la primera experiencia y el recobro de la memoria durante la re-exposición con el fin de evitar esta zona del laberinto.

Capítulo 6: Discusión

Por otro lado, se esperaba que, sí 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 similar a la S1. 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 nuevamente los diferentes sitios del laberinto. Igualmente, los mismos parámetros en los grupos tratados con cicloheximida evidencian un efecto temporal; los animales re-expuestos 3h después de la S1 mostraron actividad reducida durante la S2, caso contrario a los animales re-expuestos 24h después de la S1, pues no se encontraron diferencias significativas entre las dos sesiones, evidenciando un efecto amnésico de la dosis suministrada (3 mg/Kg) con un intervalo entre sesiones de 24 h. Los animales se comportaron de forma similar en ambas sesiones.

La figura 16A muestra las EBA y se observa que durante la S2 este parámetro es reducido al compararlo con la S1 en todos los grupos experimentales, lo cual indica que los roedores evitan entrar en este tipo de brazos durante la re-exposición y nuevamente se establece una modificación en el comportamiento originada por la experiencia previa que tienen los animales. Este patrón se repite en el valor relativo de esta variable (%EBA, Fig. 16B). De igual forma, en la figura 16C se evidencia que el número de EBC disminuye en la S2 al compararla con la S1 del mismo grupo, este comportamiento corrobora la inclinación natural de los roedores a permanecer en los sitios cerrados que les confieren mayor protección frente a sus depredadores. No obstante el valor porcentual de las EBC (Fig. 16D), muestra un mayor valor en la S2, hecho que se presenta al tener menor actividad el roedor durante esta sesión y por ende el valor total de entradas es reducido.

Capítulo 6: *Discusión*

Los cruzamientos (CRUZ) disminuyeron en la S2 para todos los grupos experimentales como se puede observar en la Figura 17A. Estos resultados son atribuidos a la disminución de la exploración, la cual puede interpretarse como disminución de la actividad locomotora (Igaz, Vianna, Medina, & Izquierdo, 2002) Especialmente en el grupo CHX 3h se observa que los animales se mantuvieron casi totalmente inmóviles al interior del brazo cerrado, y por ende la actividad en los BA fue completamente disminuida. Esto pudo deberse a un efecto quizás de dolor/negativo causado por la CHX y que se mantuvo activo durante las 3 horas siguientes a la primera experiencia afectando el comportamiento durante la re-exposición. No obstante los demás grupos manifestaron buena actividad locomotora, evidenciándose una reducción significativa durante la S2 al compararla con la S1 en cada grupo experimental.

Al analizar la frecuencia de transición desde la posición 3 a la posición 4 del laberinto, parámetro utilizado para investigar la evaluación del riesgo que hace el animal; se encontró que hay una disminución en la S2 respecto a la S1 en todos los grupos, lo cual está directamente relacionado con la disminución en el número de CRUZ y por ende en la menor actividad que tiene el animal durante la re-exposición.

Adicionalmente, se emplearon regresiones múltiples lineales para modelar la relación entre las variables independientes (tratamiento, sesión e intervalo entre sesiones), con cada una de las variables dependientes: TBA, TC, %TC, EBA, %EBA, CRUZ, TBC1-2, TBA1-2, TC1-2, %TC1-2, CRUZ1-2, %EBA1-2. Las variables dependientes con asignaciones 1-2 corresponden a los valores de la S2. Se analizó cada variable dependiente frente a cada variable independiente y se encontró que hay una relación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los siguientes casos:

1. El tratamiento modifica las variables TBA y CRUZ1-2.
2. La sesión se relaciona ampliamente con las variables TBA, TC, %TC, EBA, %EBA, CRUZ.

Capítulo 6: *Discusión*

3. El intervalo entre sesiones está relacionado con las variables CRUZ, TBC1-2, TBA1-2, TC1-2, %TC1-2, %EBA1-2, CRUZ1-2.

Los resultados obtenidos sugieren que las variaciones en el comportamiento de los roedores se deben principalmente a la sesión y al intervalo entre sesiones y no al tratamiento como se esperaba. En cuanto a la sesión, los cambios en los parámetros espacio-temporales son debidos al fenómeno de OTT, pues como se mencionó antes hay disminución en la actividad de los roedores durante la re-exposición. Hecho que se confirma con las variaciones debidas al intervalo entre sesiones ya que muestra principalmente que estos cambios están presentes en la S2. El tratamiento empleado evidencia variación en el TBA, sin embargo como se evidencia en la figura 15C este cambio está presente desde la S1 entre los grupos siendo diferente en el grupo CHX 3h. No obstante, el tratamiento modifica el patrón de cruzamientos en la S2 indicando disminución en la actividad locomotora del roedor.

Estos resultados a nivel comportamental evidencian alteraciones en el comportamiento de los diferentes grupos durante la primera sesión, pues se esperaba que las diferentes variables analizadas fuesen similares en todos los grupos. En los grupos tratados con SS se reconoce el OTT después de 24 h entre sesiones. En los grupos tratados con CHX, la re-exposición a 3 h muestra un posible daño locomotor en los animales o una reacción negativa que perturbó el comportamiento de los animales. No obstante, los animales re-expuestos 24 h después no evidencian OTT, lo cual podría interpretarse como una alteración en el proceso de consolidación de la memoria. Esto conlleva a deducir que la administración vía intraperitoneal de 3mg/kg de cicloheximida a ratas machos Wistar, permitió evidenciar un efecto amnésico o deterioro significativo de la memoria emocional asociada con la experiencia en el LCE.

Capítulo 6: Discusión

El análisis de las imágenes generadas a partir de las proteínas extraídas de las regiones hipocampales (Fig. 20) permitió establecer cuales proteínas presentaron modificaciones en su expresión por efecto de los parámetros de estudio. Comparaciones con datos publicados muestran que, de las proteínas identificadas (Tabla 10) alrededor del 40% ya han sido reportadas por otros autores como proteínas del hipocampo de rata (Fountoulakis et al., 2005). Basados en los mecanismos moleculares que describen la formación de la memoria se establece que la acción de *CaMKII*, vía molecular que describe la fase temprana de la PLP, es dependiente de la síntesis de proteínas y de la acción del factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF* por sus siglas en ingles). El *BDNF* se asocia con las contracciones de las espinas que se encuentran en alargamiento por la activación sináptica. En este aspecto, es ampliamente aceptado que la formación de la memoria a largo plazo depende de la síntesis de proteínas de *novo* del hipocampo y la señalización del *BDNF* durante o inmediatamente después de la adquisición de las memorias.

El *BDNF* es un producto de la síntesis de proteínas esenciales que se ha convertido en uno de los mediadores moleculares más potente, no sólo de la plasticidad sináptica central, sino también en las interacciones de comportamiento entre un organismo y su medio ambiente. En este contexto, se ha encontrado que doce horas después de la fase de adquisición en una tarea de aprendizaje asociativo, hay una fase dependiente de la síntesis de proteínas y del *BDNF* en el hipocampo de rata, lo cual es fundamental para la persistencia del almacenamiento de la memoria a largo plazo (Bekinschtein et al., 2007). En el presente estudio se encontró que el *BDNF* es modificado en su expresión; la mancha con SSP 2101 (Tabla 10) fue asignada a esta proteína con un score de 80 puntos, el cual es significativo de acuerdo a los parámetros de búsqueda ($sco \geq 60$).

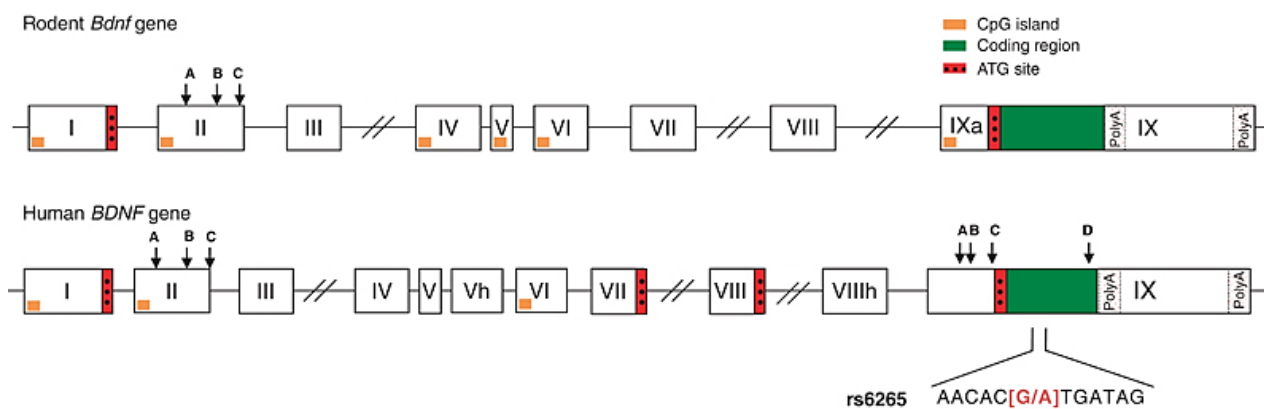
La identificación del *BDNF* fue posible, pues se encontró que la modificación en esta mancha fue generada al comparar mediante la prueba *t-student* ($p < 0.05$) los

Capítulo 6: Discusión

grupos control (SS3 vs SS24). No obstante, modificaciones en los grupos tratados con CHX no fueron encontradas, quizás por efecto del proceso de inhibición de la síntesis de proteínas originado. Además, el *BDNF* no presentó correlación con otras proteínas o los parámetros de comportamiento, pues no se halló vinculado a ninguno de los factores de agrupación generados por el análisis de correlación de Pearson.

Igualmente en el análisis de los transcritos de los exones I y II del *BDNF* no se halló variación significativa en su expresión entre ninguno de los grupos experimentales. El gen del *BDNF* en rata consiste de ocho exones 5' no codificantes y un exón 3' común codificante de la proteína (Fig. 23). Once variantes del mRNA del *BDNF* son generados por *splicing* alternativo. La expresión de los transcritos del *BDNF* exón-específicos es regulado en las etapas del desarrollo y en las regiones cerebrales tanto en ratas normales como en ratas estresadas (Lu-Yuan et al., 2008)

Figura 23: Representación de los exones del BDNF. Superior: Gen en roedores. Inferior: Gen en humanos.



Fuente: Boulle *et al.*, 2012.

Estos resultados permiten establecer que estas secuencias son transcritas a sus correspondientes ARNm, pero que su traducción fue modificada por las condiciones experimentales, pues al no existir variación en el proceso de transcripción para estos exones, la inhibición del proceso de traducción por la CHX conlleva a que no se generen diferencias de expresión entre los grupos tratados con el inhibidor en función del intervalo entre sesiones (CHX3 vs CHX24) e incluso no se hallaron variaciones entre los grupos con diferente tratamiento (SS3 vs CHX3; SS24 vs

Capítulo 6: Discusión

CHX24). La diferencia fue hallada entre los grupos control en términos del intervalo entre sesiones (SS3 vs SS24), mostrando la posible participación del *BDNF* en respuesta a la experiencia que tiene el roedor en el laberinto y la formación de su correspondiente memoria.

Además, se ha concluido que el *BDNF* induce la transformación de la fase temprana de la *PLP* a la fase tardía, aún en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. Sin embargo, la expresión de *BDNF* es disminuida en animales inyectados con cicloheximida, lo cual demuestra el rol de la síntesis de proteínas en la retención de la memoria junto con una posible relación entre la síntesis de proteínas y la expresión del *BDNF* hipocampal (Marie et al., 2008). Otros resultados indican que, en el hipocampo de rata, existe una vía de señalización *in vivo* para la síntesis de *BDNF* mediada por *p38 MAPK*, la cual a su vez es activada por canales de calcio regulados por voltaje y/o receptores de adenosina A1 (Kato Semba et al., 2009). La localización del receptor de *BDNF* en sinapsis glutamatérgicas hacen este sistema atractivo como un regulador, dinámico y dependiente de actividad, de la transmisión excitatoria y la plasticidad sináptica, ya que el *BDNF* activa la consolidación sináptica a través de la transcripción y el tráfico dendrítico rápido de ARNm codificado por el gen inmediatamente temprano, *Arc* (Bramham et al., 2005).

Los estudios sobre los genes inmediato-tempranos (*IEGs*), en particular *Arc*, ofrecen otra perspectiva sobre el argumento de la exigencia de la síntesis de nuevas proteínas en la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria (Holloway et al., 2011). El *IEG Arc* y su proteína son inducidos dinámicamente en respuesta a la actividad neuronal, y están directamente implicados en la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria (Bramham et al., 2005). Igualmente, la proteína ARC fue encontrada en este trabajo con el SSP 0007 (Tabla 10) y un score significativo de 62 puntos en la búsqueda en Mascot, pero no fue vinculada a ningún factor mediante la correlación de Pearson.

Capítulo 6: Discusión

La identificación de ARC fue posible, ya que la mancha codificada con el SSP 0007 presentó variación al comparar los grupos experimentales mediante la prueba *t-student* ($p < 0.05$). Se encontró que esta mancha varió entre los grupos re-expuestos a corto plazo, 3 h después de la S1, en función del tratamiento empleado (SS3 vs CHX3). No se encontraron variaciones entre los demás grupos de trabajo en términos del tratamiento (SS24 vs CHX24), o en términos del intervalo entre sesiones (SS3 vs SS24; CHX3 vs CHX24). Esto permite analizar la modificación en la expresión de esta proteína en función del tratamiento empleado a corto plazo y muestra la actividad temprana de la misma en el proceso de consolidación. Se ha demostrado que la memoria a largo plazo depende de la síntesis de proteínas en respuesta a la elevada regulación de nuevos mensajeros de transcripción (Watanabe et al., 2005) y se propone que la estabilización de una huella de memoria es un proceso continuo y permanente, que no tiene un punto final discreto y no se puede reducir a una sola determinista "cascada molecular". Por el contrario, las huellas de la memoria se mantienen dentro de redes metaestables, que deben integrar y actualizar las huellas del pasado con los nuevos aprendizajes (Miyashita et al., 2008).

Además, recientemente se ha puesto de manifiesto que el proceso de consolidación requiere no sólo de la síntesis de proteínas, sino también de la degradación. En este caso, se habla de los recientes descubrimientos sobre las funciones de ubiquitinación y degradación de las proteínas en la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Fioravante et al., 2011). Varias de estas proteínas fueron identificadas en el presente trabajo, lo cual indica la participación del sistema de degradación proteica vinculada al proceso de formación de la memoria, entre estas la proteína *Cullin-5* (SSP 7306), la proteína *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7* (SSP 4308), la proteína *Putative E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF2* (SSP 4307), la proteína *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1* (SSP 2106), la proteína *Sentrin-specific protease* (SSP 7605) y la proteína *E3 ubiquitin-protein ligase RNF 187* (SSP 4104). En el caso de *Cullin-5* es interesante mencionar

Capítulo 6: Discusión

que está involucrada en la inhibición de los procesos de proliferación celular y en transporte de calcio intracelular.

Estas proteínas asociadas al proceso de ubiquitinación se hallaron correlacionadas con otras proteínas y los parámetros de comportamiento mediante la correlación de Pearson. En el caso del HD las proteínas con SSP 4307 y 4308 hacen parte del factor 3 y la proteína con SSP 7605 al factor 5. Para el HI son relevantes las proteínas con SSP 4104 y 4308, pues están asociadas al factor 1 y la proteína con SSP 7306 vinculado al factor 3. Esto evidencia la participación de estos procesos en la formación de la memoria originada por la experiencia que tiene el roedor en el LCE (Tabla 11), mostrando su actividad en ambos hemisferios cerebrales.

Hablando específicamente de los factores de correlación, el análisis permitió asociar proteínas vinculadas al proceso de formación de la memoria. En el caso del hipocampo derecho el factor principal (factor 1) correlacionó a la “*subunidad beta de los canales de calcio dependientes de voltaje*”, la cual contribuye a la función del canal de calcio mediante el aumento de la corriente de calcio ya sea: desplazando los voltaje de activación e inactivación, modulando la inhibición de la proteína G o mediante el control de la focalización de la subunidad alfa-1 en la membrana. La *proteína REM*, la cual es miembro de la familia RGK de pequeñas proteínas enlazantes de GTP y que están relacionadas con las proteínas Ras. La expresión de las proteínas RGK interfiere con el ensamble de los canales de calcio y disminuye dramáticamente la amplitud de la corriente que surge de los canales de calcio activados por alto voltaje pre-existentes. Este efecto resulta probablemente de la interacción directa de las proteínas RGK con la subunidad beta del canal.

También la *proteína Commd5*, la cual participa en la cascada molecular que conduce a la síntesis del factor de transcripción NF- κ B, el cual además de las funciones en la supervivencia celular presenta diversas funciones en el sistema nervioso, incluyendo la plasticidad, el aprendizaje y la memoria neuronal. Además de los estímulos que activan el NF- κ B en otros tejidos, en el sistema nervioso puede ser

Capítulo 6: Discusión

activado por factores de crecimiento (*BDNF*, *NGF*) utilizando el glutamato como neurotransmisor. Recientemente se ha mostrado un gran interés por el papel de NF- κ B en el sistema nervioso, ya que puede regular el aprendizaje y la memoria, en parte, por la modulación de la plasticidad, la función sináptica, así como el crecimiento de las dendritas.

Se ha demostrado que los genes que disponen de sitios de unión para el NF- κ B, tienen un mayor aprendizaje en la siguiente transcripción genética, lo que sugiere que este factor en el sistema nervioso es importante para la plasticidad y el aprendizaje. Muchos de estos genes diana de NF- κ B son los receptores de glutamato (*AMPA* y *NMDA-R-R*), los factores de crecimiento (*BDNF*, *NGF*), citoquinas (*TNF-alfa*, *TNFR*), quinasas (*PKA*) y las proteínas de unión sináptica (*PSD-95*). La transcripción genética regulada por calcio es esencial para diversos procesos fisiológicos, incluyendo la plasticidad adaptativa asociada con el aprendizaje. Se ha encontrado que señales sinápticas activan el factor de transcripción NF- κ B por una vía que requiere la participación de la Kinasa CaMKII y el aumento del nivel de calcio intracelular (Boersma et al., 2011).

La transcripción genética dependiente de actividad sináptica es crucial para la plasticidad neuronal a largo plazo y la memoria a largo plazo. Se demostró, empleando un modelo de ratones deficientes en el factor NF- κ B, que este factor de transcripción regula la formación de la memoria espacial, la transmisión sináptica y la plasticidad. A través de experimentos de perfiles genéticos y análisis de regiones regulatorias identificaron que la subunidad catalítica de la proteína kinasa A (*PKA*), un regulador esencial de la memoria, como un gen objetivo del factor NF- κ B y su rol crítico en los procesos de aprendizaje y memoria. La plasticidad estructural de las espinas dendríticas y la sinapsis es un mecanismo fundamental que gobiernan los circuitos neurales y forman la base para el almacenamiento de la información en el cerebro. Se ha encontrado que la subunidad p65 del factor transcripcional NF- κ B, es necesaria para el aprendizaje y la formación de la memoria, para el control de las

Capítulo 6: Discusión

sinapsis excitatorias y para la formación y la morfología de las espinas dendríticas. las neuronas hipocampales (Heckscher et al., 2007).

En el caso del factor 2 del HD fueron agrupadas las proteínas *Alpha synuclein* (SSP 1001), *Beta synuclein* (SSP 0006) y *ARC* (SSP 0007), las cuales están asociadas a procesos de neuroplasticidad. Las sinucleinas son una pequeña familia de proteínas solubles ampliamente expresadas en el sistema nervioso central. Alfa y beta se expresan predominantemente en la neocórtex del cerebro, el hipocampo, el tálamo y el cerebelo. La familia sinucleína, que incluye alfa, beta y gamma isoformas, es mejor conocida por los papeles patológicos que desempeñan en trastornos neurodegenerativos y algunos tipos de cáncer. Los estudios realizados vinculan la alfa sinucleína con la enfermedad de Parkinson, lo cual ha generado un gran interés en la comprensión del mecanismo de la participación de las sinucleinas en la neurodegeneración. Se sabe menos sobre el papel fisiológico normal de estas proteínas, aunque los estudios han documentado claramente su capacidad para facilitar la transmisión sináptica, posiblemente a través de la inhibición de la fosfolipasa D.

Estas proteínas presentaron variaciones estadísticas analizadas mediante la prueba *t student* ($p < 0.05$) al comparar los grupos experimentales re-expuestos a corto plazo, 3 h después de la S1, en términos del tratamiento (SS3 vs CHX3), lo cual evidencia a corto plazo la participación de estas proteínas en la actividad neural asociada a la experiencia que tiene el roedor en el LCE. El análisis de correlación de Pearson permitió asociar las variaciones de estas proteínas con los parámetros de comportamiento, entre ellos los asociados a la actividad locomotora (CRUZ) y la actividad en las zonas de peligro (EBA y TBA) y su regreso a las zonas protegidas (EBC). Este factor permite elucidar algún tipo de procesamiento asociado a la información aversiva que los roedores están adquiriendo al explorar los BA, considerados potencialmente peligrosos.

Conclusiones

“Los argumentos más fuertes no prueban nada, siempre y cuando las conclusiones no son verificadas por la experiencia. La ciencia experimental es la reina de las ciencias y la meta de toda especulación”

Roger Bacon

Capítulo 7

CONCLUSIONES



Conclusiones

El uso de la CHX inyectada inmediatamente después de la primera sesión utilizada en el presente trabajo, no evidenció un cambio observable en el comportamiento de los roedores durante la S2 cuando fueron re-expuestos 3 h después. No obstante, se alcanzó a determinar un efecto amnésico por efecto del inhibidor cuando los roedores fueron re-expuestos a las 24 h (CHX3 vs CHX24) evidenciando la posible modificación de la memoria aversiva originada en la primera experiencia por el uso del inhibidor de la síntesis de proteínas, lo cual confirma la participación de este suceso en la formación de la memoria. Estos resultados permiten corroborar la hipótesis que argumenta la necesidad de la síntesis de proteínas en la formación de la memoria cuando los roedores exploran por primera vez el LCE.

El enfoque proteómico basado en la Electroforesis 2D SDS-PAGE y la Espectrometría de Masas MALDI-TOF, permitió la identificación de las proteínas que presentaron variaciones entre los grupos experimentales basadas en las diferencias estadísticas mediante la prueba *t-student* ($p < 0.05$) y los cambios de expresión de $\pm 30\%$ en el nivel de intensidad. Se analizaron 106 proteínas, de las cuales el 30% fueron identificadas de forma significativa de acuerdo a los parámetros de búsqueda en Mascot ($score > 60$). Estas proteínas presentan diferentes funciones siendo la más representativas las proteínas con función enzimática y en menor grado las proteolíticas. Igualmente se destacan las proteínas con funciones en los procesos de neuroplasticidad, transducción de señales y ubiquitinación, las cuales se asocian al procesos de formación de la memoria, entre ellas las proteínas *BDNF* y *Arc*.

El análisis de transcritos de los exones I y II del BDNF mediante RT-PCR convencional no evidenció diferencias en el nivel de expresión de los RNAm correspondientes a estos transcritos, lo cual permitió establecer que no hay modificaciones a nivel transcripcional en la expresión de BDNF asociada a los grupos de estudio. No obstante, la expresión de la proteína se ve modificada entre los grupos control por efecto del intervalo entre sesiones (SS 3 vs SS 24), lo cual

Conclusiones

evidencia variaciones en el proceso de traducción proteica asociada a la experiencia del roedor en el LCE.

El análisis de factores mediante la correlación de Pearson evidenció la agrupación de proteínas que están asociadas al proceso de formación de la memoria mediada por la variación en los niveles de calcio intracelular, mecanismo que lleva a la expresión de genes inmediato temprano como *Arc*, mediante la activación de factores de transcripción. Los factores mostraron correlacionadas proteínas con diferentes funciones, principalmente de neuroplasticidad, transporte, transducción de señales y ubiquitinación, mostrando la complejidad de los sistemas de integración de información y potenciación sináptica cuya finalidad es la formación de la memoria.

Recomendaciones

“Si nuestra mente se ve dominada por el enojo, desperdiciamos la mejor parte del cerebro humano: la sabiduría, la capacidad de discernir y decidir lo que está bien o mal”

Dalai Lama

Capítulo 8

RECOMENDACIONES



Recomendaciones

1. 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.
2. Implementar técnicas de análisis proteómico diferencial como electroforesis DIGE o marcajes isotópicos como ICAT, iTRAQ, los cuales permiten determinar de manera más precisa variaciones en la expresión de proteínas utilizando técnicas acopladas como HPLC MS/MS (MALDI TOF-TOF; ESI qTOF).
3. Implementar técnicas de análisis de transcritos en tiempo real con el fin de eliminar variaciones por efecto de tinción y análisis convencionales. Pueden desarrollarse análisis transcriptómicos globales, a través de *microarrays*, los cuales permitan identificar variaciones en la expresión de diferentes transcritos asociados al proceso de formación de la memoria originada por la experiencia que tiene el roedor en el LCE.
4. Realizar análisis proteómicos que permitan elucidar más detalladamente los mecanismos moleculares asociados en cada etapa de la formación de la memoria, principalmente la fase de consolidación, obteniendo muestra de hipocampo en diferentes tiempos post primera sesión, sin efectuar la segunda re-exposición la cual está finalmente asociada a la fase de evocación y el proceso de reconsolidación.

Bibliografía

*“La mente que se abre a una nueva idea,
jamás volverá a su tamaño original”
Albert Einstein*

BIBLIOGRAFÍA



Bibliografía

- Abel, Ted. Lattal, K. Matthew. **Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval.** *Current Opinion in Neurobiology.* 2001; 11, 180-187
- Abel, Ted. Nguyen, Peter V. Chapter 6: **Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP dependent protein kinase.** In: Wayne S. Sossin, Jean-Claude Lacaïlle, Vincent F. Castellucci and Sylvie Belleville, Editor(s), *Progress in Brain Research.* 2008; 169, 97-115
- Ahi, Janak. Radulovic, Jelena. Spiess, Joachim. **The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory.** *Behavioural Brain Research.* 2004; 149, 17-31
- Alberini, Cristina M. **The role of protein synthesis during the labile phases of memory: Revisiting the skepticism.** *Neurobiology of Learning and Memory.* 2008; 89, 234-246
- Alberini, Cristina M. **Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes?** *Trends in Neurosciences.* 2005; 28, 51-56
- Álvarez, Marilyn Rocío. **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.** Tesis de grado Química. Universidad industrial de Santander, 2012
- Aparicio, Juan José. **Los modelos animales en los actuales estudios sobre el aprendizaje humano.** *Psicothema.* 1990, 3(1), 59-72
- 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.
- Bekinschtein, Pedro. Cammarota, Martín. Müller Igaz, Lionel. Bevilaqua, Lia R.M. Izquierdo, Iván. Medina, Jorge H. **Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus.** *Neuron.* 2007; 53, 261-277
- Berchtold, N. C., Oliff, H. S., Isackson, P. Cotman, C. W. **Hippocampal BDNF mRNA shows a diurnal regulation, primarily in the exon III transcript.** *Brain research. Molecular brain research.* 1999; 71(1), 1122
- Bertoglio, Leandro Jose; Regiane Lourenço, Samia Joca; Silveira Guimaraes, Francisco. **Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated with in the hippocampus.** *Behavioural Brain Research.* 2006; 175, 183–188
- Bertoglio, L.J., Carobrez, A.P. **Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2.** *Behav. Pharmacol.* 2004; 15, 45–54.

Bibliografía

- 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, 449–455.
- Bertoglio, Leandro J, Carobrez Antonio P. **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, 197-203
- Boccia, M.M. Blake, M.G. Acosta, G.B. Baratti, C.M. **Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice: Effects of a new different learning task.** *Neuroscience.* 2005; 135, 19-29
- Boersma MC, Dresselhaus EC, De Biase LM, Mihalas AB, Bergles DE, Meffert MK. **A Requirement for Nuclear Factor- κ B in Developmental and Plasticity-Associated Synaptogenesis.** *J. Neurosci.* 2011; 31 (14), 5414–25
- Bonini, J.S. Da Silva, W.C. Bevilaqua, L.R.M. Medina, J.H. Izquierdo, I. Cammarota, M. **On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory.** *Neuroscience.* 2007; 147, 37-45
- Boule f, D L A van den Hove, S B Jakob, B P Rutten, M Hamon, J van Os, K-P Lesch, L Lanfumey, H W Steinbusch and G Kenis. **Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders.** *Molecular Psychiatry.* 2012; 17, 584-596
- 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, 248–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Bramham, Clive R. Messaoudi, Elhoucine. **BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis.** *Progress in Neurobiology.* 2005; 76, 99-125
- 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. 223546.
- Carboni, L., Piubelli, C., Pozzato, C., Astner, H., Arban, R., Righetti, P. G., Hamdan, M., et al. **Proteomic analysis of rat hippocampus after repeated psychosocial stress.** *Neuroscience.* 2006; 137(4), 1237-46
- 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, 1193-1205
- Cohen, Hagit. Kaplan, Zeev. Matar, Michael A. Loewenthal, Uri. Kozlovsky, Nitsan. Zohar, Joseph. **Anisomycin, a protein synthesis inhibitor, disrupts traumatic memory consolidation and attenuates posttraumatic stress response in rats.** *Biological Psychiatry.* 2006; 60(7) 767-776

Bibliografía

- Colantonio, David A. Daniel W. Chan. **The clinical application of proteomics.** *Clinica Chimica Acta.* 2005; 357, 151–158 21
- Dal-Col, M., Pereira, L., Rosa, V., Calixto, A., Carobrez, M. **Lack of midazolam-induced anxiolysis in the elevated plus maze trial 2 is dependent on the length of trial 1.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2003; 74, 395-400
- Dash, Pramod K. Hebert, April E. Runyan, Jason D. **A unified theory for systems and cellular memory consolidation.** *Brain Research Reviews.* 2004; 45, 30-37
- Delgado Rico, Hernán Dario. **Efectos del bloqueo del sistema nervioso autónomo periférico sobre la memoria emocional y la ansiedad evaluadas en el laberinto en cruz elevado.** Tesis de maestría. 2008. Universidad Industrial de Santander
- Desgranges, Bertrand. Lévy, Frédéric. Ferreira, Guillaume. **Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory.** *Brain Research.* 2008; 1236, 166-175
- Ditzen Claudia, Archana M. Jastorff, Melanie S. Kessler, Mirjam Bunck, Larysa Teplytska. **Protein Biomarkers in a Model Mouse in Extremes in Trait anxiety.** *Molecular & Cellular Proteomics.* 2006; 5, 1914–1920
- Dowson, G., Tricklebank, M. **Use of elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents.** *Trends Pharmacology Sci.* 1990; 16, 33-36
- File S. E., Mabbut P., Hitchcott P. **Characterization of the phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus maze.** *Psychopharmacology.* 1990; 102, 98-101
- 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
- File S. E., Gonzales L., Gallant R. **Role of the Basolateral Nucleus of the Amygdala in the Formation of a Phobia.** *Neuropsychopharmacology.* 1998; 19, 397-405
- Fioravante, Diasynou. Byrne, John H. **Protein degradation and memory formation.** *Brain Research Bulletin.* 2011; 85, 14-20
- Flint, R. W. Jr. S. Valentine. And d. Papandrea, Jr. **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, 833–844 27.
- Fountoulakis, M., Tsangaris, G. T., Maris, A., & Lubec, G. **The rat brain hippocampus proteome.** *Journal of chromatography. B,* 2005; 819(1), 115-29
- Franklin, T.J., Snow, G. A. **Inhibitors of protein biosynthesis.** In: *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action.* 6ed. SpringerLink, 2005. Vol. 1, p. 85-105.

Bibliografía

- Frey, Uwe. Krug, Manfred. Reymann, Klaus G. Matthies, Hansjuergen. **Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro.** *Brain Research*. 1988; 452, 57-65
- García Pérez, Hilda Marilín. **Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia.** UNIV DIAG, 2000; 1(2), 31-41
- Gazarini, L. Stern, C. A. J. and Bertoglio, L. J. **Protein synthesis in dorsal hippocampus supports the drug tolerance induced by prior elevated plus-maze experience.** *Neuroscience*. 2011;179, 179–187
- Gold, Paul E. **Protein synthesis inhibition and memory: Formation vs amnesia.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 2008; 89, 201-211
- Gonzales, L. E., File, S. E. **A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus.** *J Neurosci*. 1997; 17. 1505-11
- Gordon, Rita Ya. Mugantseva, Ekaterina A. Khutzian, Sergei S. Podolski, Igor Ya. **Cycloheximide-induced inhibition of protein synthesis in hippocampal piramidal neurons is time-dependent: Differences between CA1 and CA3 areas.** *Neuroscience Letters*. 2009; 461, 249–251
- 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.
- Gygi, Steven P. Corthals, Garry L. Yanni Zhang, Yvan Rochon, and Ruedi Aebersold. **Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis based proteome analysis technology.** *PNAS*. 2000: 97(17), 9390–9395
- Helmstetter, F.J. George F. Koob, Michel Le Moal. Richard F. Thompson. **Protein Synthesis and Memory.** *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*. 2010; 112-118
- Hernández, Pepe J. Ted Abel. **The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 2008; 89(3) 293-311
- 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
- Heckscher ES, Fetter RD, Marek KW, Albin SD, Davis GW. **NF-kappaB, IkappaB, and IRAK control glutamate receptor density at the Drosophila NMJ.** *Neuron*. 2007; 55 (6), 859–73
- Holloway, Crystal M. McIntyre, Christa K. **Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 2011; 95, 425-432

Bibliografía

- Holmes, A., Rodgers, R. J. **Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state?** *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998; 60, 473-488
- Holmes, A., Rodgers, R. J. **Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze.** *Neuroscience Biobehavioral reviews.* 1999; 23, 971-980
- Karas M, Hillenkamp F. **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons.** *Anal Chem.* 1988; 60, 2239-301
- Katoh, Semba, R. Tsuzuki, M. Miyazaki, N. Kaneko, R. Ichisaka, S. Takahashi, Y. Kitajima, S. Hata, Y. Yamada, H. Kato, K. **Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for in vivo brain-derived neurotrophic factor production in the rat hippocampus.** *Neuroscience.* 2009; 163, 352–361
- Klann, Eric J. Sweatt, David. **Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation.** *Neurobiology of Learning and Memory.* 2008; 89, 247-259
- Kobayashi, H., Yokoyama, M., Matsuoka, Y., Omori, M., Itano, Y., Kaku, R., Morita, K., et al. **Expression changes of multiple brain-derived neurotrophic factor transcripts in selective spinal nerve ligation model and complete Freund's adjuvant model.** *Brain research.* 2008; 1206, 13-9
- Kromer, S. A., Kessler, M. S., Milfay, D., Birg, I. N., Bunck, M., Czibere, L., Panhuysen. **Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety.** *Journal Neuroscience.* 2005; 25, 4375–4384
- Lamprea, M., Cardenas, F. P., Silveira, R., Morato, S., Walsch, T. J. **Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms.** *Behavioural Brain Research.* 2000; 117, 97-105
- Li-Rong Yu, Thomas P. Conrads, Takuma Uo, Yoshito Kinoshita, Richard S. **Global Analysis of the Cortical Neuron Proteome.** *Molecular & Cellular Proteomics.* 2004: 3, 896–907
- Lister, R. G. **The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse.** *Psychopharmacology.* 1987; 92, 180-185
- Lu-Yuan. Christian, Kimberly. Lu, Bai. **BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?** *Neurobiology of Learning and Memory.* 2008; 89, 312-32
- 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.
- Marie, Anne. McGauran, T. J. Moore, Bernadette. Madsen, Declan. Barry, Daniel. O'Dea, Shirley. Mahon, Bernard P. Commins, Sean. **A possible role for protein synthesis,**

Bibliografía

extracellular signal-regulated kinase, and brain-derived neurotrophic factor in long-term spatial memory retention in the Water Maze. *Behavioral Neuroscience*. 2008; 122, 805–815

McGauran, A.M.T., Moore, J.B., Madsen, D., array, 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.

Mendonca, F.H. Guimaraes F.S. **Intra-hippocampal administration of cycloheximide attenuates the restraint-induced exploratory deficit of an elevated plus maze.** *Behavioural Brain Research*. 1998; 91, 207–211

Milekic, Maria H. Alberini, Cristina M. **Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation.** *Neuron*. 2002; 36, 521-525

Miyashita, Teiko. Kubik, Stepan. Lewandowski, Gail. Guzowski, John F. **Networks of neurons, networks of genes: An integrated view of memory consolidation.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 2008; 89, 269-284

Morgado, Bernal, I. **Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data.** *Neuroscience*. 2011; 176, 12-19

Morrison, Richard S. Yoshito Kinoshita, Mark D. Johnson, Joshua K. McBee, Thomas P. Conrads, and Timothy D. Veenstra. **Proteomic Analysis in the Neurosciences.** *Molecular & Cellular Proteomics*. 2002; 1, 553–560

Moss, D. E. Fahrny, D. **Anisomycin, acetoxycycloheximide, cycloheximide, and puromycin as inhibitors of rat brain acetylcholinesterase in vitro.** *Journal of neurochemistry*. 1976; 26, 1155-1157

Nielsen, Peter Aa. Olsen, Jesper V. Podtelejnikov, Alexandre V. Andersen, Jens R. Mann, Matthias and Wisniewski, Jacek R. **Proteomic Mapping of Brain Plasma Membrane Proteins.** *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005; 4, 402–408

Nijholt, Ingrid M. Ostroveanu, Anghelus. Scheper, Wouter A. Penke, Botond Luiten, Paul G.M. Van der Zee, Eddy A. Eisel, Ulrich L.M. **Inhibition of PKA anchoring to A-kinase anchoring proteins impairs consolidation and facilitates extinction of contextual fear memories,** *Neurobiology of Learning and Memory*. 2008; 90, 223-229

Nothwang, Hans BERD. Becker, Michael. Ociepka, Kornelia. Protein analysis in the rat auditory brainstem by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular Brain Research*. 2003; 116, 59–69

Ortiz, K. S. **Determinación de los cambios generados por la cicloheximida sobre la memoria a largo plazo y el perfil proteómico del hipocampo dorsal de ratas wistar expuestas al laberinto en cruz elevado bajo criterio de aprendizaje.** Tesis de grado Química. Universidad industrial de Santander, 2014

Bibliografía

Pereira, J. K., Vieira, R. J., Konishi, C. T., Ribeiro, R. A., Frussa-Filho, R. **The phenomenon of “one trial tolerance” to the anxiolytic effect of a motivational conflict situation.** *Life Sci.* 1999; 65, 101-107

Piccoli, Giovanni .Verpelli, Chiara. Nairn, Angus C.Tonna, Noemi. Bachi, Angela. Romorini, Stefano. Sala, Carlo. Alessio, Massimo. **Proteomic analysis of activity-dependent synaptic plasticity in hippocampal neurons.** *Journal of Proteome Research.* 2007; 6, 3203-3215

Plebani, Mario. **Proteomics: The next revolution in laboratory medicine?** *Clinica Chimica Acta.* 2005; 357, 113–122

Posch Anton, Paulus Aran, and Brubacher Mary Grace. **Tools for Sample Preparation and Prefractionation in Two-Dimensional Gel(2D) Electrophoresis.** *Taylor & Francis Group, LLC.* 2006

Pusch W, Flocco M, Leung S, Thiele H, Kostrzewa M. **Mass spectrometry-based clinical proteomics.** *Pharmacogenomics.* 2003; 4(4), 463-476

Quevedo, João. Vianna, Mônica R.M. Martins, Márcio Rodrigo. Barichello, Tatiana. Medina, Jorge H. Roesler, Rafael. Izquierdo, Ivan. **Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats.** *Behavioural Brain Research.* 2004; 154, 339-343

Reilly, Melissa A; and Kim, Jeansok J (January 2013) **Learning and Memory.** In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.DOI: 10.1002/9780470015902.a0000172.pub2

Rodgers, R., Shepherd, J. K. **Influence of prior maze experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus maze and light/dark test of anxiety in mice.** *Psychopharmacology.* 1993; 113, 237-242

Sadowski, Renee N. Canal, Clint E. Gold, Paul E. **Lidocaine attenuates anisomycin-induced amnesia and release of norepinephrine in the amygdala.** *Neurobiology of Learning and Memory.* 2011; 96, 136-142

Salome Nicolas, Peter Salchner, Odile Viltart, Henrique Sequeira, Alexandra Wigger, Raine Landgraf, and Nicolas Singewald. **Neurobiological Correlates of High (HAB) Versus Low Anxiety-Related Behavior (LAB): Differential Fos Expression in HAB and LAB Rats.** *Biol Psychiatry.* 2004; 55, 715–723

Samara, A. Vougas,K. Paronis, E. Papadopoulou, A.Chrousos, G.P. Anastasiadou, E. Tsangaris, G. Baloyanni, N. **Proteomics reveal rat hippocampal lateral asymmetry.** *Hippocampus.* 2011; 21,108–119

Sarka Beranova-Giorgianni, Michael J. Pabst, Tara M. Russell, Francesco Giorgianna, Dominic M. Desiderioa. **Preliminary analysis of the mouse cerebellum proteome.** *Molecular Brain Research.* 2002; 98, 135–140

Bibliografía

- Sarka Beranova-Giorgianni. **Proteome analysis by two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations.** *Trends in Analytical Chemistry*. 2003; 22(5), 273-281
- Silva R.H, Frussa-Filho R. **The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory–anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine.** *Journal of Neuroscience Methods*. 2000: 102, 117–125
- Sorolla Alba, Reverter-Branchat Gemma, Tamarit Jordi, Ferrer Isidre, Ros Joaquim, Cabisco Elisa. **Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease.** *Free Radical Biology & Medicine*. 2008: 45, 667–678
- Sowell, Rena A. Joshua B. Owen, D. Allan Butterfield. **Proteomics in animal models of Alzheimer’s and Parkinson’s diseases.** *Ageing Research Reviews*. 2009; 8, 1–17
- Stanton, P. K. Sarvey, J. M. **Blockade of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis.** *The Journal of Neuroscience*. 1984; 4, 3080-3088
- Stern C.A.J, Carobrez A.P, Bertoglio L.J. **Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2008: 90, 545 550
- Stickgold, Robert. Walker, Matthew P. Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep? *Trends in Neurosciences*. 2005; 28, 408-415
- Supawadee Sriyam, Supachok Sinchaikul, Payungsak Tantipaiboonwong, Ching Tzao, Suree Phutrakul, Shui-Tein Chena. **Enhanced detectability in proteome studies.** *Journal of Chromatography B*, 2007; 849, 91–104
- Suzuki, Wendy A., and Clayton, Nicola S. **The hippocampus and memory: a comparative and ethological perspective.** *Current Opinion in Neurobiology*. 2000;10:768–773
- Thornalley Paul J. **Unease on the role of glyoxalase 1 in high-anxiety-related behavior.** *TRENDS in Molecular Medicine*. 2006; 12, 195-199
- 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
- Wanisch, Klaus. Wotjak,Carsten T. Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2008; 90, 485–494
- Watanabe, Hikaru. Takaya, Tomohiro. Shimoi, Toshinobu. Ogawa, Hiroto. Kitamura, Yoshiichiro. Oka, Kotaro. **Influence of mRNA and protein synthesis inhibitors on the long-term memory acquisition of classically conditioned earthworms.** *Neurobiology of Learning and Memory*, 2005; 83, 151-157

Bibliografía

Wen Chen, Jianguo Ji, Xiaoman Xu, Sizhi He. **Proteomic comparison between human young and old brains by two-dimensional gel electrophoresis and identification of proteins.** *Int. J. Devl Neuroscience.* 2003; 21, 209–216

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

Anexos

*“Poca ciencia aleja muchas veces de Dios,
y mucha ciencia conduce siempre a Él”
Francis Bacon*

ANEXOS



ANEXO A**Composición de las soluciones utilizadas en Electroforesis****1. Buffer de Lisis**

Buffer de Lisis (5 mL)		
Componente	Concentración	Cantidad
Tris base	40 mM	0.024 g
Urea	7 M	2.145 g
Tiourea	2 M	0.760 g
CHAPS	4 % (p/v)	0.200 g
DTT	100 mM	0.077 g
PMSF	1 mM	200 µL (Stock 25 mM)
Anfolitos	1 % (v/v)	500 µL
EDTA	1 mM	1.46 mg

2. Soluciones para Isoelectroenfoco**2.1. Buffer de rehidratación**

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

2.2. Buffer de Equilibración I

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

2.3. Buffer de Equilibración II

Buffer equilibración II	
Componente	Concentración
Urea	6 M
Tris-HCl pH 8.8	0.375 M
SDS	2.00%
Glicerol	20%
Iodoacetamida	13.5 mM

3. Soluciones para SDS-PAGE**3.1. Acrilamida/bisacrilamida 30% (29.2% acrilamida, 0.8% bisacrilamida)**

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

3.2. Tampón para el gel separador Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

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

Anexos

3.3. Tampón para el gel concentrador Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

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

3.4. SDS al 10% (p/v)

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

3.5. Persulfato de amonio (APS) al 10%

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

3.6. Preparación del gel de separación

Composición del gel (12%, 20x20)	
Componente	Cantidad
H ₂ O (desionizada)	17.6 mL
Acrilamida-bisacrilamida	22 mL
Tris base, pH 8.8-6.8	14.3 mL
SDS (10%)	550 µL
APS (10%)	275 µL
TEMED	110 µL

3.7. Preparación buffer de corrido

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

4. Soluciones tinción Coomassie coloidal

4.1. Solución de fijación

Solución fijación (500 ml)		
Componente	Concentración	Cantidad
Metanol	50.00%	250.0 ml
Ácido fosfórico	2.00%	10.0 ml
Aforar a 500 ml con agua HPLC		

4.2. Solución de Equilibración

Solución equilibración (200 ml)		
Componente	Concentración	Cantida
Metanol	33.00%	66.0 ml
Sulfato de amonio	17.00%	34.0 g
Ácido fosfórico	3.00%	6.0 ml
Aforar a 200 ml con agua HPLC		

4.3. Solución de coloración

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

ANEXO B

Curva de calibración

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Inicialmente se preparó una solución de BSA (1 mg/mL) a partir del cual se realizaron diluciones en buffer de lisis para obtener las diferentes concentraciones de BSA con las que se elaboró la curva de calibración (tabla 1).

Tabla 1. Patrones curva de calibración

Patrón	Concentración (mg/mL)	μL solución de BSA 1mg/mL	μL buffer de lisis
1	Blanco	0	250
2	0.1	25	225
3	0.2	50	200
4	0.3	75	175
5	0.4	100	150
6	0.5	125	125
7	0.6	150	100
8	0.7	175	75
9	0.8	200	50
10	0.9	225	25
11	1.0	250	0

De cada patrón se tomaron 20.0 μL y se adicionó 1.0 mL del reactivo de Bradford. Las muestras problema (20.0 μL muestra/1mL Bradford), se diluyeron en relación 1:20. De cada patrón se realizaron lecturas de absorbancia por triplicado, se obtuvo el valor promedio y se graficó la absorbancia promedio vs concentración del patrón (Fig.1).

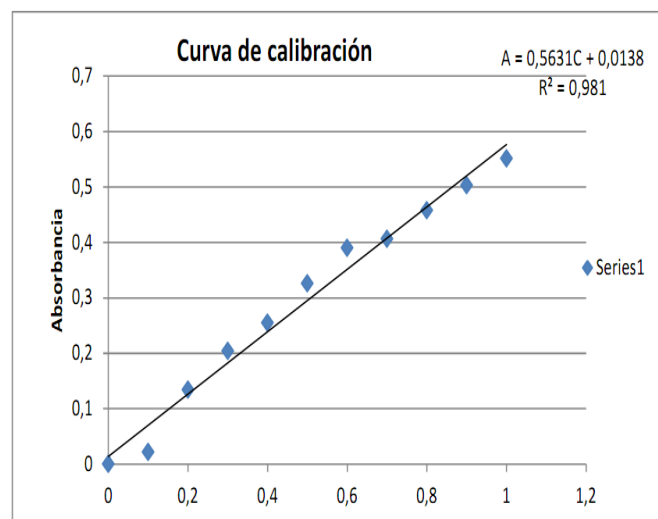


Figura 1: Curva de calibración

ANEXO C

Análisis de factores

Correlación de Pearson

A partir del análisis en factores mediante la correlación de Pearson se determinó que algunas de las proteínas identificadas junto a los parámetros de comportamiento se pueden agrupar mediante factores. A continuación se observan los parámetros de la correlación establecida para cada región hipocampal.

Hipocampo Derecho

```
Principal components/correlation          Number of obs   =      24
                                           Number of comp. =       5
                                           Trace           =     113
Rotation: orthogonal varimax (Kaiser off) Rho              =    0.6946
```

Component	Variance	Difference	Proportion	Cumulative
Comp1	36.3561	24.4177	0.3217	0.3217
Comp2	11.9384	.233523	0.1056	0.4274
Comp3	11.7049	.631064	0.1036	0.5310
Comp4	11.0738	3.65826	0.0980	0.6290
Comp5	7.41557	.	0.0656	0.6946

Hipocampo Izquierdo

```
Principal components/correlation          Number of obs   =      23
                                           Number of comp. =       5
                                           Trace           =     113
Rotation: orthogonal varimax (Kaiser off) Rho              =    0.6903
```

Component	Variance	Difference	Proportion	Cumulative
Comp1	20.5212	2.88124	0.1816	0.1816
Comp2	17.6399	.570087	0.1561	0.3377
Comp3	17.0698	4.3396	0.1511	0.4888
Comp4	12.7302	2.69094	0.1127	0.6014
Comp5	10.0393	.	0.0888	0.6903

