

**DETERMINACIÓN DE CAMBIOS EN EL PERFIL PROTEÓMICO DEL
HIPOCAMPO DE RATAS EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO
BAJO CRITERIO DE APRENDIZAJE**

VICTOR ALFONSO HERNÁNDEZ RUEDA



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2010**

**DETERMINACIÓN DE CAMBIOS EN EL PERFIL PROTEÓMICO DEL
HIPOCAMPO DE RATAS EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO
BAJO CRITERIO DE APRENDIZAJE**

VICTOR ALFONSO HERNÁNDEZ RUEDA

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

DIRECTOR

RODRIGO TORRES SAEZ, Ph. D.

Escuela de Química

CODIRECTOR

CARLOS CONDE COTES, Ph. D.

Escuela de Medicina

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2010

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 la Red 2 como muestra de grandeza y éxitos

*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*

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1. Proteómica	18
1.1.1. Estudios proteómicos del sistema nervioso central	19
1.1.2. Preparación de muestras	21
1.1.2.1. Solubilización de proteínas	22
1.1.3. Electroforesis 2D-PAGE	23
1.1.3.1. Fundamentos de las separaciones electroforéticas	23
1.1.3.2. Isoelectroenfoque (IEF)	24
1.1.3.3. Rehidratación y aplicación de la muestra	25
1.1.3.4. Equilibración	25
1.1.3.5. SDS-PAGE	26
1.1.3.6. Métodos de tinción	30
1.1.3.7. Adquisición y análisis de imágenes	31
1.2. Trastornos de estrés y ansiedad	32
1.2.1. Modelos animales en el estudio de la ansiedad	33
1.2.2. Comportamientos animales relacionados con la ansiedad	33
1.2.3. Laberinto en cruz elevado (LCE)	34
1.2.4. Perfil comportamental en el LCE	36
1.2.5. Fenómeno “ <i>One Trial Tolerance</i> ” (OTT)	37
1.2.6. Criterio de aprendizaje	38
1.2.7. Neurobiología de la ansiedad y el aprendizaje	39

2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1. Análisis comportamental	41
2.1.1. Animales	41
2.1.2. Laberinto en cruz elevado (LCE)	41
2.1.3. Procedimiento experimental de la exposición al LCE	41
2.1.4. Registro y análisis de datos comportamentales	43
2.1.5. Análisis estadístico	44
2.2. Análisis 2D-PAGE	44
2.2.1. Preparación de muestras	44
2.2.1.1. Obtención de las muestras	44
2.2.1.2. Solubilización y extracción	44
2.2.1.3. Limpieza	45
2.2.1.4. Cuantificación	45
2.2.2. Electroforesis 2D	46
2.2.2.1. Isoelectroenfoque (IEF)	47
2.2.2.2. SDS-PAGE	48
2.2.2.3. Tinción	49
2.2.2.4. Registro y análisis de imágenes	49
2.2.2.5. Análisis de datos	50
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	51
3.1. Análisis comportamental	51
3.1.1. Tiempo total para alcanzar el criterio de aprendizaje	51
3.1.2. Actividad exploratoria	52
3.2. Preparación de muestras y electroforesis 2D	56

3.3. Análisis de imágenes	57
3.3.1. Cantidad de spots detectados	57
3.3.2. Variación diferencial en la detección de spots de proteínas	59
3.3.2.1. Regiones derechas	59
3.3.2.2. Regiones izquierdas	61
3.3.2.3. Variación entre las regiones derecha-izquierda de un mismo grupo	63
3.3.2.4. Algunas variaciones observadas	64
3.3.2.5. Correlación entre la intensidad del estímulo de estrés vs. la cantidad de spots detectados	68
3.3.2.6. Cambios cuantitativos en el nivel de intensidad de los spots	69
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reacciones de equilibración	24
Figura 2: Fórmulas estructurales de la acrilamida y bis-acrilamida	27
Figura 3: Reacción de polimerización de la acrilamida	28
Figura 4: Desnaturalización de proteínas en SDS-PAGE	29
Figura 5: Estructuras moleculares de los colorantes coomassie R-250 y G-250	30
Figura 6: Digitalización de la imagen	31
Figura 7: Laberinto en cruz elevado (LCE)	35
Figura 8: Distribución de los brazos del laberinto para el registro de datos espacio-temporales	43
Figura 9: Combinación de muestras para la formación de los pools	46
Figura 10: Equipo de isoelectroenfoque: protean IEF cell, bio-rad	48
Figura 11: Equipo de electrofóresis: mini protean system, bio-rad	48
Figura 12: Tiempo acumulado en alcanzar el criterio de aprendizaje para cada grupo	51
Figura 13: Número de entradas a los diferentes tipos de brazo para cada grupo	53

Figura 14: Número de cruzamientos y secuencias entre las zonas 3-4	54
Figura 15: Entradas (%) a los diferentes lugares del laberinto	55
Figura 16: Tiempo (%) en los diferentes lugares del laberinto	56
Figura 17: Variabilidad presentada en los proteomas de las región hipocampal derecha de los diferentes grupos	60
Figura 18: Variabilidad presentada en los proteomas de la región hipocampal izquierda de los diferentes grupos	62
Figura 19: Variabilidad presentada en los proteomas de las regiones hipocampales derecha e izquierda de un mismo grupo	63
Figura 20: Variabilidad en los proteomas de la región derecha en función del estímulo de estrés	65
Figura 21: Variabilidad de las regiones hipocampales derecha e izquierda de un mismo grupo	66
Figura 22: Variabilidad única en los proteomas de las regiones hipocampales derecha e izquierda	66
Figura 23: Variabilidad en la expresión e intensidad de los spots en los proteomas de las regiones hipocampales izquierda y derecha en una pequeña región del gel	67
Figura 24: Variabilidad en la expresión e intensidad en una proteína particular entre los proteomas de las regiones hipocampales	68
Figura 25: Correlación entre la cantidad de spots detectados en función del estímulo estresor	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Grupos establecidos para el análisis comportamental	42
Tabla 2: Distribución de las muestras para la formación de los pools	47
Tabla 3: Distribución de los pools para la electrofóresis 2D	47
Tabla 4: Cantidad de spots detectados en cada gel	58
Tabla 5: Cantidad de spots comunes en las imágenes replica de cada gel	59
Tabla 6: Cantidad de spots con cambios cuantitativos y estadísticos en las regiones hipocampales	70

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Composición de las soluciones utilizadas en electrofóresis	82
ANEXO B	Corrida electroforética	86
ANEXO C	Curva de calibración	87
ANEXO D	Cantidad de proteína extraída de cada muestra	89
ANEXO E	Perfiles de los proteomas de los pools de las muestras hipocampales	92
ANEXO F	Otras comparaciones de las variaciones en los proteomas entre las regiones hipocampales derecha e izquierda	95

RESUMEN

TITULO*: DETERMINACIÓN DE CAMBIOS EN EL PERFIL PROTEÓMICO DEL HIPOCAMPO DE RATAS EXPUESTAS AL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO BAJO CRITERIO DE APRENDIZAJE

Víctor Alfonso Hernández Rueda**

Palabras clave: LCE, Criterio de aprendizaje, 2D-SDS-PAGE

Se determinó la variabilidad en los proteomas de pools de proteínas extraídas del hipocampo de ratas Wistar expuestas en un modelo de ansiedad denominado laberinto en cruz elevado bajo criterio de aprendizaje (intensidad de un estímulo estresor). Se midió el contenido de proteína usando el método de Bradford y se realizó el análisis de electroforesis 2D utilizando strips de 7cm con rango de pIs entre 3-10 corridas en el Protean IEF cell (Bio-Rad); la segunda dimensión se hizo mediante SDS-PAGE en el equipo Mini Protean System (Bio-Rad). La tinción de los geles se realizó con el método de azul de coomassie coloidal. Los geles fueron analizados mediante el software PD-QUEST (Bio-Rad).

Se encontraron diferencias en el nivel de expresión entre las proteínas comunes vinculadas al hipocampo izquierdo y el hipocampo derecho pertenecientes a un mismo grupo estudiado. Igualmente se halló expresión diferencial en algunas de las proteínas entre los diferentes grupos analizados por efecto de la intensidad del estímulo de stress

Dado que la ansiedad se evidencia a través de comportamientos innatos o aprendidos como resultado de la exposición a un peligro y que dicho aprendizaje origina alteraciones neurofisiológicas que provocan modificaciones en la síntesis de proteínas, se pudo observar las variaciones en la perfil proteómico hipocampal asociado a la intensidad del estímulo de estrés. Estos datos son de gran interés en el estudio de los mecanismos neurobioquímicos que delinear los procesos cerebrales de ansiedad-aprendizaje y memoria emocional.

*proyecto de grado

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

ABSTRACT

TITLE*: DETERMINATION OF CHANGES IN PROTEOMIC PROFILE OF RATS HIPPOCAMPUS EXPOSED TO ELEVATED PLUS MAZE WITH LEARNING CRITERION

Victor Alfonso Hernández Rueda **

Keywords: EPM, learning criterion, 2D-SDS-PAGE

We determined the variability in the proteomes of pools of proteins extracted from the hippocampus of Wistar rats exposed in a model of anxiety called elevated plus maze test with learning criterion (stress stimulus intensity). We measured the protein content using the Bradford method and performed the analysis of 2D electrophoresis using 7cm strips with pI range between 3-10 run in the Protean IEF cell (Bio-Rad), the second dimension was by SDS-PAGE in the team Mini Protean System (Bio-Rad). Staining the gels was performed using colloidal coomassie blue. Gels were analyzed using PD-QUEST software (Bio-Rad).

There were differences in expression level between the common proteins associated with the left hippocampus and right hippocampus within the same group studied. It was also found differential expression in some of the proteins between the different groups analyzed for effect of the stress stimulus intensity.

Since anxiety is evidenced through innate or learned behavior as a result of exposure to a hazard and that the learning originates neurophysiological alterations that cause changes in protein synthesis, we observed changes in the hippocampal proteomic profile associated with stress stimulus intensity. These data are of great interest in studies of the mechanisms that delineate neurobiochemistry of the anxiety-learning brain processes and emotional memory.

*Project grade

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

INTRODUCCIÓN

La ansiedad es una emoción esencial, en principio como reacción adaptativa que es altamente conservada durante la evolución, y considerada como un estado que se caracteriza por un incremento de las facultades perceptivas ante una necesidad fisiológica. Así, cuando un individuo se enfrenta a una situación de peligro, se puede observar un conjunto de respuestas conductuales y fisiológicas como mecanismo de alarma que lo prepara a interactuar de manera adecuada con dicha situación.

Con frecuencia se manifiestan reacciones autonómicas tales como: sudoración, taquicardia, alteraciones gastrointestinales, tensión muscular e insomnio, entre otras. No obstante, cuando dichas manifestaciones son inapropiadas frente a una condición externa se habla entonces de ansiedad patológica; estado de malestar caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia en ausencia de un estímulo desencadenante (Baldwin, 2002).

En interacción con el procesamiento cognitivo la ansiedad regula comportamientos en humanos y animales. En estos últimos se han establecido comportamientos distintivos que pueden ser innatos o aprendidos como consecuencia de alteraciones neurofisiológicas, que modifican la estructura neuronal, y específicamente, provocarían alteraciones en la síntesis de proteínas; además de patrones fisiológicos que evidencian la manifestación de ansiedad (Shuhama, 2007).

Por lo tanto, los estudios con animales de laboratorio permiten mejorar el entendimiento de la neurobiología, neuroquímica y neurobioquímica de los trastornos de ansiedad. En estos estudios generalmente se emplean roedores como reactivos biológicos en modelos que representan algún(os) componente(s) de la manifestación de ansiedad para comprender las respuestas del

comportamiento humano bajo condiciones psicológicas y patológicas (Gómez, 2002).

Dentro de los modelos para el estudio de la ansiedad se destaca el modelo del laberinto en cruz elevado (LCE); dispositivo de madera con cuatro brazos dispuestos en forma ortogonal y constituido por: dos brazos cerrados (BC), y dos brazos abiertos (BA). La interpretación más aceptada establece que la exposición a un estímulo novedoso promueve tanto la exploración como la evitación generando un conflicto de aproximación-evitación, ya que la rama abierta elevada refuerza la evitación al representar una zona aversiva para el roedor con respecto a la rama cerrada. Se ha demostrado mediante estudios farmacológicos que el estado de ansiedad de un animal es mayor en las ramas abiertas, ya que los fármacos ansiolíticos aumentan la exploración de dichas ramas, mientras que las drogas con efecto ansiogénico la disminuyen (Botelho, 2003).

En esta dirección, los experimentos de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado presentan diversas manifestaciones comportamentales dependientes de la duración de una primera exposición. El impacto de la primera experiencia ha permitido detectar inclusive, la resistencia o “tolerancia” a fármacos ansiolíticos de la familia de las benzodiazepinas en una segunda exposición, fenómeno conocido como “*One Trial Tolerance*” (OTT). Se ha sugerido que este fenómeno ocurre por un aprendizaje de tipo aversivo, en el que las benzodiazepinas pueden evitar la adquisición de información aversiva, pero no pueden evitar la expresión de la memoria emocional (Stern, 2008).

Uno de los problemas aún sin explicar, es la relación entre la magnitud o duración de la experiencia vivida por un individuo y los cambios neurobiológicos que expliquen sus consecuencias comportamentales. Por lo tanto, el uso de criterios de aprendizaje asociados a tiempos de permanencia continua en los brazos cerrados del laberinto, asegura un tiempo de experiencia y por ende, un periodo de adquisición y consolidación de información respecto a este lugar, quizás

percibiéndolo como “seguro”, pues se acepta que las ratas tienen miedo innato a los lugares abiertos y a las alturas, evidenciando comportamiento de evitación inhibitoria de los brazos abiertos que representan la zona de peligro (Shuhama, 2007).

Estos enfoques de estudio de comportamiento animal pueden ser correlacionados con estudios de neurobioquímica estructural de diferentes zonas del encéfalo. Desde una perspectiva proteómica, se busca analizar mutaciones o cambios, tanto cualitativos como cuantitativos, en la expresión de las proteínas que permitan establecer un vínculo directo con la prevención, el desarrollo y el tratamiento de las patologías del sistema nervioso central. Estos análisis implican el desarrollo de técnicas de separación y purificación de las proteínas, previa extracción del tejido nervioso, principalmente mediante electroforesis bidimensional en geles de poli-acrilamida (2D-SDS-PAGE).

Tomando estos aspectos en consideración, el presente trabajo evaluó el efecto de la intensidad del estímulo de stress (como criterio de aprendizaje animal) sobre la expresión de proteínas (perfil proteómico) del hipocampo de cerebros de ratas expuestas al LCE, para establecer la relación entre los cambios del perfil proteómico (niveles de expresión, presencia o ausencia de proteínas) del hipocampo de ratas expuestas al LCE con los comportamientos indicadores de ansiedad.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Proteómica

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

Mientras que el genoma de un organismo es esencialmente constante a lo largo de la vida, el proteoma tiene un carácter dinámico; la expresión de proteínas cambia en diferentes etapas del ciclo celular y en respuesta a estímulos externos. Es precisamente esta variabilidad del proteoma que lo hace tan atractivo para la investigación biomédica, en donde los análisis proteómicos, principalmente en su enfoque diferencial, conducen a identificar cambios en los patrones de expresión de proteínas entre un estado normal y uno patológico (cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades y trastornos del sistema nervioso central, búsqueda de blancos de fármacos, entre muchos otros) (Colantonio, 2005).

Los análisis proteómicos se realizan en tres etapas: (1) preparación de la muestra; (2) separación de las proteínas, e (3) identificación de las proteínas (Gygi, 2000; Sarka, 2003). La preparación de la muestra busca obtener un extracto de proteínas purificado donde los contaminantes (lípidos, sales, ácidos nucleicos, carbohidratos) no interfieran en la separación. El método más comúnmente utilizado en el proceso de separación es la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (2D-SDS-PAGE).

1.1.1. Estudio proteómico del sistema nervioso central (SNC)

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

La construcción de mapas proteómicos cerebrales constituyen la base de datos de referencia para estudiar cambios en los niveles de proteínas asociadas con el desarrollo, la edad, anormalidades comportamentales o diversos desordenes que dañan el sistema nervioso, tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington, entre otras (Sarka, 2002; Wen, 2003; Nothwang, 2003; Li-Rong, 2004; Vercauteren, 2004; Nielsen 2005; Jae-Won, 2005; Sorolla, 2008).

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

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

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

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

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

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

Análisis del proteoma cerebral de ratones selectivamente criados, con comportamientos relacionados ya sea a baja o alta ansiedad, evaluados en el

laberinto en cruz elevado (LCE), mostraron diferencias cuantitativas y cualitativas en la expresión de proteínas. En estos estudios se destaca la mayor expresión de la enzima glioxilasa-I altamente expresada en los animales de baja ansiedad comparados con los animales de alta ansiedad en diversas regiones del cerebro.

Igualmente la proteína identificada como enolasa-fosfatasa presentó variación en su movilidad electroforética. Estas proteínas se hallan presentes en los glóbulos rojos y glóbulos blancos, respectivamente. Esto ha creado la posibilidad de estudiar su expresión en pacientes que sufren de ansiedad (Kromer, 2005; Ditzen, 2006; Thornalley, 2006). Así mismo, líneas de ratas Wistar han sido selectivamente criadas con comportamiento relacionada a baja o alta ansiedad y usadas para encontrar correlaciones neurobiológicas mediante análisis 2D-PAGE de rasgos de ansiedad (Salome, 2004).

1.1.2. Preparación de muestras

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

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

1.1.2.1. Solubilización de proteínas

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

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

Los agentes reductores como el ditioneitol (DTT) y el 2-mercaptoetanol completan la desnaturalización proteica por ruptura de puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys). Algunas proteínas son susceptibles a modificaciones post-extracción ya sea por hidrólisis química por efecto del pH o por degradación enzimática por la acción de proteasas. Por lo tanto, es necesario utilizar sustancias como el Tris-base o anfolitos *carrier* que mantienen el pH amortiguado y el fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) como inhibidor de proteasas, en algunos casos es necesaria la utilización de mezclas de inhibidores de proteasas (Sarka, 2003; Posch, 2006).

1.1.3. Electroforesis 2D-PAGE

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) es la herramienta más empleada para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma. Dicha técnica permite la separación de cientos o miles de proteínas “spots” en un único gel, mostrando un patrón característico. La electroforesis 2D separa las proteínas de una mezcla según sus dos propiedades moleculares de masa y carga bajo la acción de un campo eléctrico. En la primera dimensión la separación ocurre de acuerdo con el punto isoeléctrico (pI) y se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF). En la segunda dimensión la separación ocurre según el peso molecular y se realiza mediante SDS-PAGE.

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

1.1.3.1. Fundamentos de las separaciones electroforéticas

La *velocidad de migración* de un ión o molécula cargada, v (cm/s), en el seno de un campo eléctrico, es igual al producto de la intensidad del campo eléctrico, E (V cm^{-1}) por la movilidad electroforética μ_e (cm² V⁻¹ s⁻¹). La μ_e es directamente proporcional a la carga eléctrica del analito e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento; las fuerzas de rozamiento se determinan a partir del tamaño y de la forma de la molécula cargada y de la viscosidad del medio en el cual migra.

En la electroforesis se puede mantener uno de los parámetros eléctricos (voltaje, corriente, potencia) constante. La resistencia del circuito electroforético, sin

embargo, no permanece constante durante la corrida. La resistencia del buffer disminuye con el incremento de la temperatura causado por calentamiento Joule en sistemas de buffer continuo; en el caso del sistema de buffer discontinuo la resistencia aumenta conforme avanza la corrida, y el calentamiento puede aumentar o disminuir dependiendo de cual parámetro se mantiene constante (potencia generada en un circuito; $P=V.I$) (Sarka, 2003)

1.1.3.2. Isoelectroenfoque (IEF)

El IEF constituye el método electroforético que separa proteínas en función de su punto isoeléctrico (pI). Las proteínas son moléculas anfóteras, es decir, poseen carga neta positiva, negativa o cero, la cual depende de la composición de aminoácidos (tipo de cadena lateral) y del pH del medio en el que se encuentre. 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. Una proteína con carga neta positiva migrará hacia el cátodo perdiendo la carga positiva en su movimiento mientras avanza en el gradiente de pH hasta alcanzar su pI. Una proteína con carga neta negativa migrará hacia el ánodo perdiendo la carga negativa hasta que su carga neta sea cero. Si una proteína difunde desde su pI, inmediatamente se cargará y migrará de regreso a su posición isoeléctrica, esto se conoce como el efecto de enfoque, ya que se concentran las proteínas en sus pIs y separa las proteínas con pequeñas diferencias de carga.

A principios de los años 80 se introdujo una modificación en la realización del IEF, la cual consistió en la co-polimerización de los anfolitos con la matriz de acrilamida creando en el gel un gradiente estable de carga. Estos geles están disponibles en el mercado y se conocen como IPGs, geles en gradiente de pH inmovilizado. Hay variadas opciones en cuanto al rango de pI de separación y la longitud del gel de separación (están disponibles comercialmente IPG desde 7cm hasta 24cm).

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

1.1.3.3. Rehidratación y aplicación de la muestra

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

1.1.3.4. Equilibración

Una vez finalizado el proceso de IEF es necesario completar la desnaturalización de las proteínas reduciendo los puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares. Para ello la tira del gel se sumerge en un buffer que contenga un agente reductor, principalmente Ditioneitol (DTT). Con el fin de evitar la formación

aleatoria de puentes disulfuro en las proteínas reducidas es necesario efectuar un proceso de alquilación de los grupos tioles de los residuos de cisteína, por lo cual, seguido al paso de reducción los geles se colocan en un buffer alquilante con yodoacetamida como agente de alquilación (Fig. 1). Es importante que el buffer mantenga las proteínas solubilizadas en el interior del gel y evite la pérdida de las proteínas por difusión, por lo cual, se emplean agentes como urea, SDS, tris y glicerol (Posch, 2006; Castellanos, cap 20).

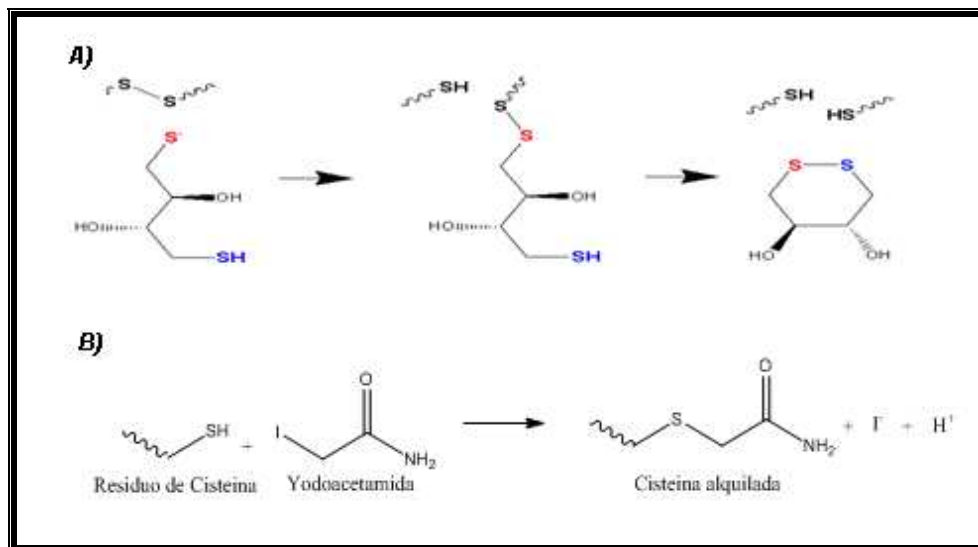


Fig. 1: Reacciones de equilibración: A) reducción, B) alquilación

1.1.3.5. SDS-PAGE

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

la cadena en el proceso de polimerización y concentraciones altas pueden disminuir el tamaño de poro máximo del gel (García, 2000).

El tamaño del poro en los geles de poliacrilamida está determinado por dos parámetros: contenido total de sólidos (%T) y la relación entre el monómero entrecruzador y la cantidad total de monómeros (%C) (Fig. 2). Expresadas en las siguientes ecuaciones:

$$\%T = \frac{g(\text{acrilamida} + \text{bisacrilamida})}{100 \text{ mL}} \times 100$$

$$\%C = \frac{g(\text{bisacrilamida})}{g(\text{acrilamida} + \text{bisacrilamida})} \times 100$$

Las proporciones en que se hallan la acrilamida y el entrecruzador determinan las propiedades físicas del gel como son: densidad, elasticidad, resistencia mecánica y el tamaño del poro. En general se recomiendan valores de 5-15 %T y de 2-4 %C. Cuando el %T aumenta el tamaño del poro disminuye. Si la muestra de estudio es una mezcla compleja con proteínas con un amplio rango de pesos moleculares es posible usar geles en gradiente, en donde el tamaño del poro es mayor cerca a la parte superior, haciéndose más restrictivo a medida que avanza la corrida.

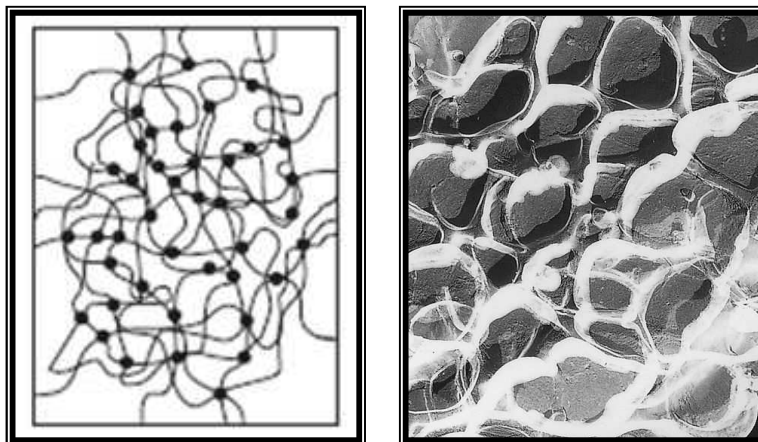


Fig. 2: Estructura del gel de poliacrilamida. Izquierda, vista del diseño del tamiz; Derecha, vista microscópica del tamiz.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por causa de la acción de radicales de persulfato. Las aminas terciarias como la N,N,N',N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizador de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato, mediante una reacción redox, llevando a la formación de largas cadenas de poliacrilamida (Fig. 3).

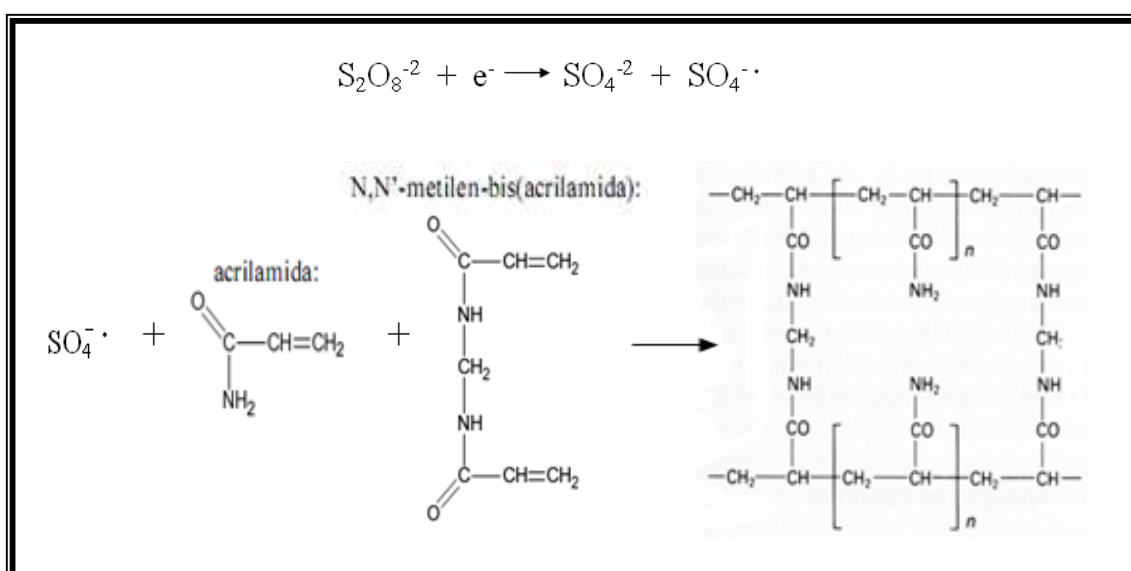


Fig. 3: Reacción de polimerización de la acrilamida y el entrecruzador bis(acrilamida)

En las separaciones electroforéticas con SDS-PAGE, la migración está determinada no por la carga eléctrica intrínseca de las cadenas polipeptídicas, sino por el peso molecular. El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas rodeándolas a lo largo de su cadena a través de las colas hidrofóbicas. Para casi todas las proteínas, el SDS se enlaza en una relación de aproximadamente 1.4g de SDS por g de proteína, confiriendo una carga neta negativa al polipéptido. (Fig. 4).

El SDS además rompe puentes de hidrogeno, bloquea interacciones hidrofóbicas y desenrolla considerablemente los polipéptidos minimizando diferencias en forma molecular al eliminar las estructuras terciaria y secundaria de las proteínas. Las proteínas son totalmente desnaturizadas cuando se utilizan agentes reductores como el 2-mercaptoetanol o el Ditiotreitol (DTT), los cuales rompen los puentes disulfuro entre las cisteínas. Las cadenas polipeptídicas desnaturizadas por el SDS y reducidas, son barras flexibles con carga negativa uniforme por unidad de longitud y dado que el peso molecular es una función lineal de la longitud de la cadena polipeptídica, en geles tamizados las proteínas se separan en función del peso/tamaño molecular.

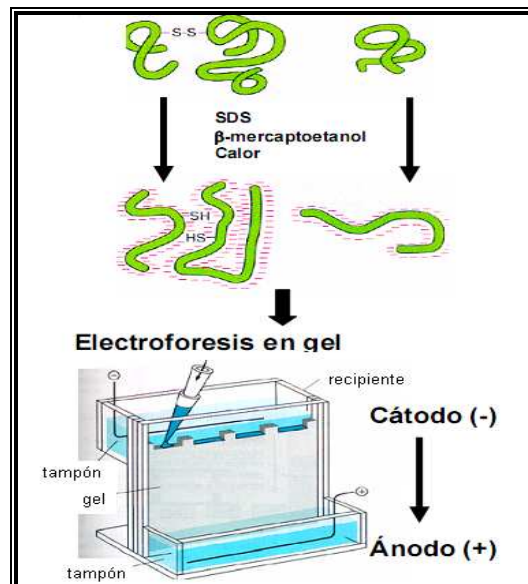


Fig. 4: Desnaturalización de proteínas en SDS-PAGE

Hay dos tipos de sistemas amortiguadores utilizados en electroforesis en gel de proteínas: continuos y discontinuos. Un sistema continuo utiliza el mismo buffer para los tanques y el gel. De acuerdo con Laemmli en un sistema discontinuo un gel de poro grande llamado gel de *stacking* (gel de apilamiento) es colocado en la parte superior del gel de separación. Cada capa del gel discontinuo se hace con un tampón diferente, e igualmente el buffer del tanque difiere de los buffers del gel (García, 2000).

1.1.3.6. Métodos de tinción

El procedimiento analítico más común en la visualización de las proteínas es la tinción. La elección del método de tinción viene determinada por diferentes factores, como la sensibilidad deseada, rango lineal, facilidad de uso, precio y tipo de equipo de adquisición de imagen disponible. Los métodos más usados son la tinción con coomassie blue, la tinción fluorescente con sypro ruby y la tinción con plata.

La tinción con coomassie R-250 (Fig. 5) puede emplearse para la determinación de proteínas cuando estas son abundantes, pero no para la determinación de pureza de proteínas trazas. Esta tinción requiere un medio ácido para la generación de la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van Der Waals, que une a las proteínas y al colorante formando un complejo; esta unión es totalmente reversible en condiciones apropiadas; el límite detectable se halla entre 0.1-0.3 μg de proteína (Xuchu, 2007). El colorante azul de coomassie G-250 (Fig. 5) tiene la capacidad de acomplejarse con ciertos aminoácidos básicos como arginina, tirosina, lisina e histidina proporcionando una sensibilidad de detección proteica de 8-50ng, a la vez de no producir un fondo (background) demasiado intenso. El gel es fácilmente desteñido utilizando agua grado HPLC.

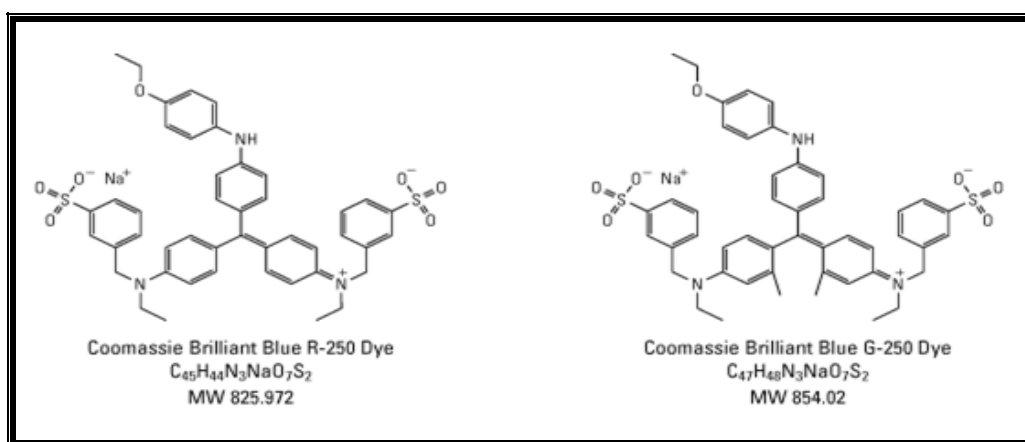


Fig. 5: Estructuras moleculares de los colorantes Coomassie R-250 y G-250

La tinción con plata es muy sensible (1ng de proteína). En este caso el gel es impregnado con iones plata y revelado por tratamiento con formaldehído, el cual reduce los iones plata para formar un precipitado marrón de plata metálica. Esta reducción es promovida por las proteínas. Se ha reportado la tinción de proteínas por otros métodos entre los que se encuentran: eriocromo negro, y el uso de compuestos fluorogénicos por modificación de los aminoácidos de las proteínas, entre otros (García, 2000).

1.1.3.7. Adquisición y análisis de imágenes

Antes de que los geles donde se han separado las proteínas puedan ser analizados con un sistema de evaluación de imágenes, éstos deben ser digitalizados (Fig. 6). Los instrumentos de adquisición de imágenes más comúnmente usados son los densitómetros (GS800, Power Look 2100XL) y los escáneres de fluorescencia (FX ProPlus). Todos ellos funcionan con software de análisis diseñados para detectar y cuantificar “spots” en las imágenes digitales, así como para comparar y analizar estadísticamente los geles de interés. Los softwares de análisis son: PDQuest de Bio-Rad y Decyder de GE.

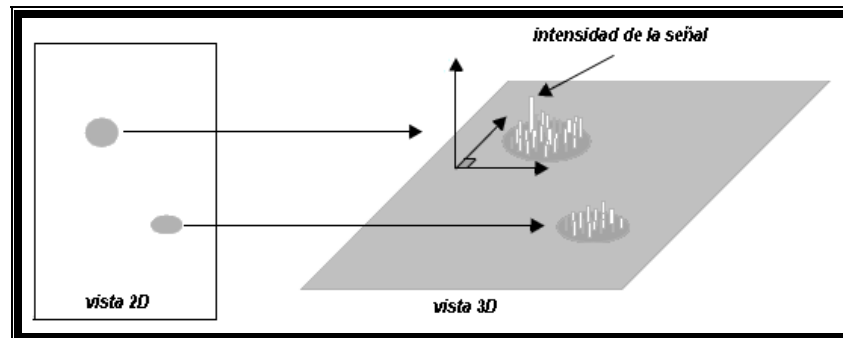


Fig. 6: Digitalización de la imagen

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

1.2. Trastornos de estrés y ansiedad

La ansiedad es una emoción universal que forma parte de la vida cotidiana. La ansiedad normal es causada por la percepción de un peligro actual o potencial que amenaza la seguridad del individuo. Así, cuando se enfrenta a una situación de peligro se puede observar un conjunto de cambios conductuales y vegetativos orientados a contender de manera adecuada con dicha situación. En este caso la persona experimenta nerviosismo o aprehensión, siendo la respuesta razonable y adaptativa; a la vez capacita al individuo para superar la situación con un mecanismo de control que lo lleva nuevamente al estado fisiológico normal.

Por lo tanto, la ansiedad representa al organismo una estrategia adaptativa que proporciona al organismo un mecanismo de alarma que lo prepara para enfrentarse a una situación de peligro. Entonces, la ansiedad también se puede definir como uno de los procesos cerebrales directamente involucrados en la sobrevivencia de diferentes especies animales, especialmente de aquellas que por su naturaleza son víctimas de los depredadores (Botelho, 2003).

La ansiedad excesiva o sostenida, la intensidad de los síntomas y el grado de incapacidad que estos generan al paciente en los ámbitos familiar, social y laboral permiten considerar que ésta se convierte en un estado patológico, constituyéndose actualmente en uno de los padecimientos psiquiátricos más frecuentes (Sandford, 2000; Gómez, 2002).

La ansiedad se manifiesta en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia y los propiamente conocidos desordenes de ansiedad. La asociación de psiquiatría americana *DSM-IV* y la organización mundial de la salud, *ICD-10*, han clasificado los desordenes de ansiedad de acuerdo al perfil sintomático presentado por el individuo en: desorden de ansiedad generalizada, pánico, fobias, desorden obsesivo-compulsivo y desorden de estrés postraumático (Baldwin, 2002; Shuhama, 2007).

1.2.1. Modelos animales en el estudio de la ansiedad

Los modelos animales son el canal más importante para que los desarrollos terapéuticos farmacológicos se incorporen dentro de la perspectiva clínica; además, los modelos animales aportan información sobre el fundamento psicobiológico de las patologías psiquiátricas (Stam, 2007). Se estima que la investigación en el área de la ansiedad utiliza cerca de 30 modelos animales que permiten observar y cuantificar conductas de diversa índole. Estas conductas responden de una manera específica al tratamiento con compuestos ansiolíticos o ansiogénicos.

Dentro de ellos se ha desarrollado un grupo de modelos mediante la identificación y clasificación del repertorio conductual natural de diferentes especies animales, especialmente roedores. Estos modelos incluyen las pruebas de exploración en laberintos: laberinto en cruz elevado, laberintos en forma Y o T; el tablero con hoyos, la caja de luz-oscuridad y la prueba de campo abierto (Gómez, 2002). En estos modelos se observa el instinto animal de protegerse frente a potenciales predadores, aunque estos no sean identificables (Botelho, 2003).

1.2.2. Comportamientos animales relacionados con la ansiedad

Independiente de la prueba que se utilice, existen expresiones comportamentales específicas a las especies que son indicativos de ansiedad. A partir de estudios y observaciones de laboratorio se conoce que los roedores tienden a evitar las áreas no protegidas de un medio ambiente novedoso cuando entran en él. Los roedores típicamente inician su actividad explorando el medio ambiente a lo largo de las paredes evitando los espacios abiertos no protegidos, este comportamiento es conocido como evitación inhibitoria.

Sin embargo, la exploración es evocada por un estímulo novedoso y consiste en actos y posturas comportamentales que permiten recoger información sobre

nuevos objetos y partes no familiares del medio ambiente. No obstante el animal debe superar su inhibición comportamental inducida por su evitación inicial. Si la inhibición permanece el animal no puede obtener información sobre el medio ambiente y esto es considerado una expresión no adaptativa del comportamiento de evitación siendo reflejo de ansiedad.

El comportamiento exploratorio puede comprender un amplio espectro de patrones comportamentales diferentes, tales como: comportamientos de evaluación del riesgo (posturas en que el animal estira su cuerpo manteniendo su posición fija), caminar, olfatear y manipular objetos. La exploración puede ser parcial o completamente inhibida por la ansiedad, por lo tanto la exploración reducida puede representar una medida indirecta de la ansiedad (Frauke, 2008).

En ocasiones, los animales tienden a permanecer completamente inmóviles, y de esta manera pasan desapercibidos frente a un estímulo peligroso que se halla a gran distancia; esta inmovilidad tensa, frecuentemente llamada comportamiento de “*freezing*” es usualmente caracterizado por una falta total de movimiento, excepto de aquellos requeridos para respirar. En ciertos casos, cuando la amenaza se encuentra próxima y es posible una ruta de escape, los animales corren hacia un lugar seguro, comportamiento conocido como “*flight*”. Pero cuando el escape es imposible llegan a enfrentar el peligro, por lo cual, el animal adopta una postura erguida y emite chillidos como estrategia de defensa (Shuhama, 2007).

1.2.3. Laberinto en cruz elevado (LCE)

El laberinto en cruz elevado es un dispositivo que consta de cuatro brazos o corredores orientados en forma de cruz, dos de ellos presentan paredes laterales, y se conocen como brazos cerrados (BC); los otros dos carecen de las mismas, y se denominan brazos abiertos (BA) (Fig. 7). Constituye un modelo etológicamente fundamentado y validado como modelo de ansiedad, mediante evaluaciones

comportamentales, fisiológicas y farmacológicas, usando roedores como sujetos experimentales (Delgado, 2008).

Su fundamento se relaciona con el miedo incondicionado y con patrones de comportamiento espontáneo del animal, partiendo del constructo que hipotetiza que los roedores tienden a evitar los lugares abiertos y prefieren los lugares cerrados quizás por ser “sitios seguros”, donde existe poca probabilidad de ser atacado por algún depredador (Botelho, 2003; Delgado, 2008).

Inicialmente, los roedores son colocados en la plataforma central del laberinto; el constructo teórico del modelo determina que el roedor se enfrenta a un conflicto de aproximación-evitación, ya que su instinto los lleva a explorar los cuatro brazos por lo novedoso del medio ambiente en el que se halla, pero en la exploración libre se enfrentan a dos peligros potenciales: la altura a la que se halla el laberinto y el espacio abierto, lo cual los lleva a evitar la exploración (Bertoglio, 2000; Botelho, 2003).

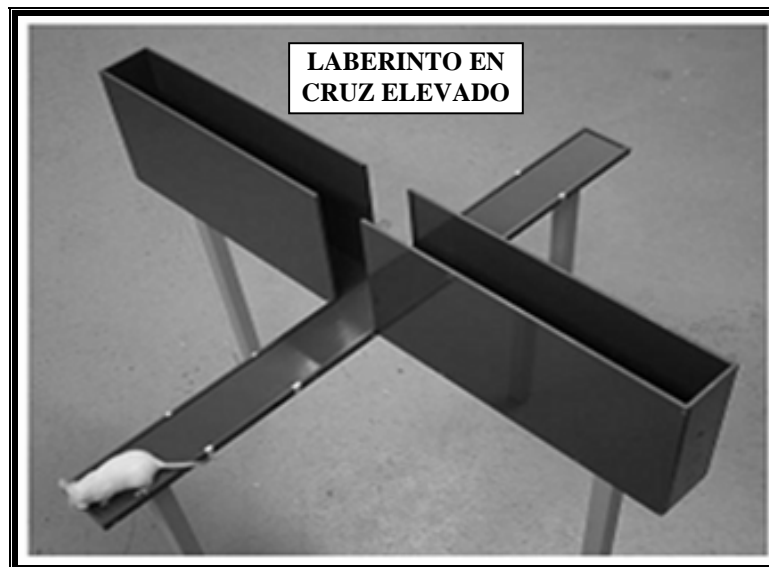


Fig. 7: Laberinto en cruz elevado

1.2.4. Perfil comportamental en el LCE

La actividad del animal dentro del laberinto puede ser explicada en una primera aproximación 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 la rata elige 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, lo que genera que la rata permanezca por más tiempo en los BC y evite los BA.

Existen varios comportamientos específicos que integran la actividad de la rata en el laberinto. Entre ellos: *rearing*, levantamiento del cuerpo apoyado en sus patas traseras; *head-dipping*, se presenta cuando la rata agacha la cabeza y la saca por fuera de los brazos abiertos con el fin de explorar la altura a la que se encuentra; *risk-assesment (evaluación del riesgo)*, en el cual la rata manteniendo sus patas traseras en los BC estira el cuerpo para explorar la plataforma central y los BA; *groomig (acicalamiento)*, la rata limpia sus patas delanteras y el rostro; *exploración*, movimientos del animal a través del laberinto; y *evitación inhibitoria*, permanencia del animal en los BC.

Los comportamientos de exploración y evitación inhibitoria pueden ser analizados mediante parámetros espacio-temporales como son: la frecuencia absoluta o relativa de entradas a los diferentes brazos, y el tiempo absoluto o relativo de permanencia en cada tipo de brazo. Cuando el animal es expuesto por primera vez al laberinto y sin efecto de ningún tratamiento se cumplen las siguientes consideraciones: el número de entradas al BC es mayor que el número de entradas al BA, y el tiempo que la rata gasta durante la prueba en los BC es mayor al tiempo que gasta en los BA. Esto se cumple tanto para los valores absolutos como para los valores relativos en ambos parámetros.

1.2.5. Fenómeno “*One Trail Tolerance*” (OTT)

Este fenómeno se relaciona con el comportamiento de las ratas en el LCE durante una segunda exposición, ya que independientemente de si han recibido o no un tratamiento de fármaco ansiolítico antes de la primera exposición, los animales no presentan manifestaciones comportamentales de tipo ansiolítico frente a fármacos. Por su semejanza con la llamada tolerancia farmacológica, este fenómeno se ha denominado “*One Trial Tolerance (OTT)*”, tolerancia por un primer ensayo (Bertoglio, 2000; Bertoglio, 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 reexposición al LCE, algunos estudios han tenido en cuenta factores como: tiempo de exposición del animal al laberinto en la primera exposición, el tiempo entre sesiones, la manipulación antes de exponerlo por primera vez al LCE, la naturaleza del estímulo aversivo, el tipo y concentración del fármaco utilizado. Además, el OTT también ha sido descrito en otros modelos animales de ansiedad 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 a 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).

Se han planteado diferentes hipótesis para explicar la reducción del efecto ansiolítico de las benzodiazepinas en los roedores re-expuestos al LCE. Sin embargo se ha concluido que este se produce por la evocación de la memoria emocional originada por aprendizaje de tipo aversivo durante la exploración inicial de un medio ambiente potencialmente peligroso (Stern, 2008).

Los siguientes resultados han corroborado esta hipótesis: 1) la desactivación temporal con lidocaína del hipocampo dorsal previo a la primera sesión, de la

amígdala basolateral inmediatamente después de la primera sesión, o del hipotálamo dorsomedial y de la materia gris periacueductal dorsolateral previo a la segunda sesión, lo cual mantiene el efecto ansiolítico de las benzodiazepinas, tales como clordiazepóxido y midazolam durante el segundo ensayo. Estas conclusiones fueron interpretadas como un daño en la adquisición (función del hipocampo), consolidación (función de la amígdala) y recuperación (función del hipotálamo dorsomedial y de la materia gris periacueductal dorsolateral) de la información obtenida durante el primer ensayo; 2) la administración de una dosis amnésica de clordiazepóxido (10 veces superior a la dosis ansiolítica) o escopolamina previo al primer ensayo previene la aparición del fenómeno OTT en el LCE en ratas re-expuestas; y 3) se observó el aumento de la retención de memoria por la administración sistemática, ya sea de anfetamina o pentilinetetrazol posterior al primer ensayo, facilita la aparición del OTT (Stern, 2008).

1.2.6. Criterio de aprendizaje

La implementación de criterios de aprendizaje como herramienta para el estudio del aprendizaje y la memoria han sido ampliamente utilizados (Conde, 1999), con el fin de conocer el mecanismo por el cual el proceso es llevado a cabo, así como para conocer las partes del cerebro involucradas (Bannerman, 2004; Shahidi, 2008; Ove, 2008). Su utilidad se basa en que permiten observar cambios comportamentales asociados a procesos mnemónicos (Frauke, 2008), específicamente, los procesos de adquisición y consolidación del aprendizaje basado en la emoción y la memoria (Conde, 1999; Silva, 2000).

La implementación del criterio de aprendizaje en el LCE está cimentado en estudios que han demostrado que la tendencia exploratoria ocurre principalmente asociada a los lugares del brazo cerrado, sugiriendo que, en el caso de los roedores, el aprendizaje está basado principalmente en una oscilación entre la evaluación del riesgo (lugares centrales) y una exploración de lo seguro (brazos

cerrados); además, el proceso de consolidación de la memoria emocional es dependiente del impacto que el evento haya causado sobre el individuo, y este a su vez depende del tiempo de exposición (Conde, 1999; Silva, 2000; Stern, 2008).

1.2.7. Neurobiología del aprendizaje del comportamiento de evitación inhibitoria

La evidencia generada en los últimos años parece señalar claramente que la estructura y la actividad cerebral se encuentran evolutivamente vinculadas en diferentes especies. La relación establecida durante el proceso evolutivo entre los mamíferos permite estudiar algunas funciones mentales superiores humanas; normales y patológicas en modelos animales. En la actualidad, se reconocen las ventajas metodológicas respecto al control experimental que proporciona la investigación con animales en el estudio de los factores motivacionales y emocionales, así como las posibilidades que se derivan del uso de sujetos animales para el esclarecimiento de las vertientes neurofisiológicas del aprendizaje (Aparicio, 1990; Marcos, 2003).

La acción de los fármacos ansiolíticos o ansiogénicos, el uso de agonistas y antagonistas de diferentes sistemas de neurotransmisión: glutamatérgico, gabaérgico, dopaminérgico, acetilcolinérgico, serotoninérgico, haciendo uso del LCE ha permitido describir el papel que tienen algunas estructuras cerebrales y los mecanismos neuroquímicos y bioquímicos que gobiernan el miedo y la ansiedad (Sandford, 2000). Además se han vinculado diferentes sistemas de neurotransmisión con los procesos de aprendizaje y memoria, y en tareas de evitación en regiones cerebrales como la amígdala y el hipocampo (Myhrer, 2003; Gold, 2003; Viana, 2008).

Se ha establecido que este último juega un papel importante en el aprendizaje espacial y la memoria, además de regular comportamientos relacionados a la ansiedad, ya que lesiones electrolíticas o excitotóxicas producen comportamientos

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

Diversos estudios indican que la síntesis de proteínas es necesaria para la formación de la memoria a largo plazo. Se ha establecido, por ejemplo, que el antibiótico anisomicina inhibe la síntesis de proteínas y origina cambios en el comportamiento de evitación inhibitoria. La anisomicina administrada inmediatamente después del entrenamiento (criterio de aprendizaje) produce deterioro de memoria, alteración que no se observa cuando el fármaco es administrado 24 h después del entrenamiento, por ende, se refuerza la hipótesis en que la memoria a largo plazo depende de la síntesis de proteínas poco después del entrenamiento (Monleón, 2008; Lima, 2009).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Análisis comportamental

2.1.1. Animales

El manejo de los animales se hizo de acuerdo con las normas científicas y técnicas establecidas por la ley 84 de 1989 y la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, las cuales rigen el uso de animales vivos en experimentos e investigación, y a la aprobación del comité de bioética de la Universidad Industrial de Santander.

Se emplearon 40 ratas Wistar machos de 8-10 semanas de edad y pesos entre 260-314 gramos provenientes del bioterio de la facultad de Salud-UIS. Las ratas fueron distribuidas al azar y colocadas en cajas vivero (50x30x15cm) en grupos de cinco animales bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $65\pm 5\%$, ciclos luz/oscuridad de 12 horas, agua y alimento de acceso libre.

2.1.2. Laberinto en cruz elevado

El laberinto en cruz elevado (LCE) utilizado es un dispositivo de madera con cuatro brazos dispuestos ortogonalmente: dos brazos cerrados (BC), con paredes laterales de 40cm de altura y dos brazos abiertos (BA), con un pequeño borde acrílico de 2cm de altura. Cada brazo mide 50x12 centímetros. Todo el aparato se encuentra elevado 50cm sobre el suelo.

2.1.3. Procedimiento experimental de la exposición al LCE

Los animales fueron colocados en la sala de habituación, bajo las mismas condiciones ambientales utilizadas en el bioterio, dos días antes de la sesión

experimental. Todos los animales fueron manipulados por 3 minutos cada día durante los días previos de ser expuestos al laberinto. La exposición al LCE se llevó a cabo durante la fase de luz entre las 13:00 y 16:00 horas.

Las ratas fueron asignadas aleatoriamente en cuatro grupos de trabajo (Tablas 1 y 2). Se realizaron ocho sesiones de experimentación, una por día, exponiendo los animales al LCE pertenecientes a una de las cajas vivero. Cada animal fue pesado y colocado en la plataforma central del laberinto, de cara a uno de los BC. Se permitió su exploración libre hasta que alcanzó el tiempo estipulado como criterio de permanencia en un BC. Para los grupos 2,3 y 4, el tiempo de la sesión de cada animal finalizó una vez se cumplieron 1, 5 o 10 minutos de permanencia continua en un BC del laberinto, respectivamente.

Cada uno de los animales en su actividad exploratoria fue registrado por una cámara de grabación, ubicada en el techo del cuarto de experimentación, enfocando el centro del laberinto. El sistema de grabación se halla conectado a un computador ubicado en un cuarto adyacente al cuarto de experimentación, desde donde se realizó el monitoreo del cumplimiento del criterio. Una vez finalizada la exposición al laberinto se regresó el animal a la caja vivero, habiendo sido marcado previamente con ácido pícrico (reactivo utilizado para identificar los roedores que ya han sido expuestos al laberinto). Entre cada sesión se limpió el laberinto con solución de etanol al 10% v/v.

Tabla 1: Grupos establecidos para el análisis comportamental

Grupo	Consideraciones	n
1	Control –sin exposición al LCE-	10
2	Exposición al LCE (criterio: 1 minuto continuo en BC)	10
3	Exposición al LCE (criterio: 5 minutos continuos en BC)	10
4	Exposición al LCE (criterio: 10 minutos continuos en BC)	10

2.1.4. Registro y análisis de datos comportamentales

El comportamiento de los animales en su actividad exploratoria 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. 8). Esta distribución es la metodología estándar en el registro de datos del laboratorio de neurociencias y comportamiento UIS, y 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.

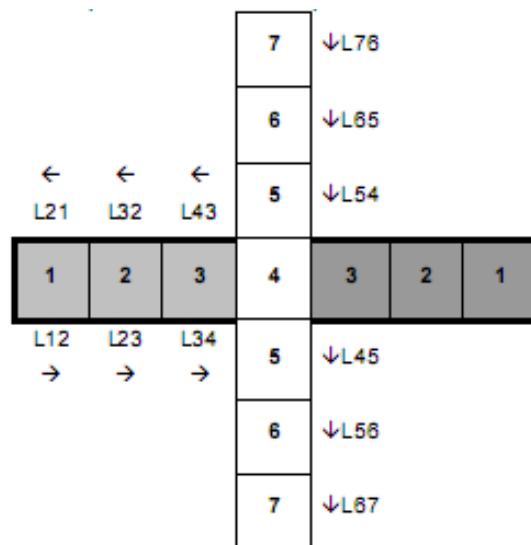


Fig. 8: Distribución de los brazos del laberinto para el registro de datos espacio-temporales del laboratorio NYC UIS-UPB. Las zonas 1-2-3 corresponden a los BC, las zonas 5-6-7 corresponden a los BA y la zona 4 es la plataforma central del laberinto.

El registro de datos para cada video se realizó utilizando el programa computacional PROSTCOM, el cual registra la posición en la que encuentra el animal de acuerdo con la distribución de los brazos, tomando como parámetro del movimiento de una zona a otra el cruce con las cuatro patas.

2.1.5. Análisis estadístico

Los datos del tiempo total de la prueba para alcanzar el criterio, los valores relativos en el número de entradas al brazo cerrado, el total de cruzamientos y la frecuencia de secuencias 3-4, fue comparada para los grupos expuestos al laberinto mediante análisis ANOVA. Los valores relativos del número de entradas y tiempo gastado en cada lugar del laberinto fue comparado mediante ANOVA de dos vías (factores: grupo y zona del laberinto).

2.2. Análisis proteómico

2.2.1. Preparación de las muestras

2.2.1.1. Obtención

Los animales fueron sacrificados por decapitación dos horas después de finalizada la exposición al laberinto, entre las 16:00-18:00 horas del día de experimentación. A cada animal se le extrajo el cerebro, el cual fue colocado en una caja de Petri cubierta de papel humedecido con solución salina (NaCl 0.9%) y puesta sobre hielo seco. Se removió el hipocampo teniendo en cuenta la subdivisión de los hemisferios cerebrales izquierdo-derecho.

Cada muestra hipocampal fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5mL que contenía 500µL de buffer de lisis (anexo A) previamente pesado y marcado. Inmediatamente las muestras fueron nuevamente pesadas para determinar la cantidad de tejido cerebral extraído.

2.2.1.2. Solubilización y extracción

La solubilización de las proteínas se realizó suspendiendo el tejido cerebral en buffer de lisis, la acción de sus componentes lleva a la completa ruptura celular

(lisis por detergentes) y la liberación de proteínas. Las muestras fueron homogenizadas mediante agitación en vortex (1200 rpm) durante aproximadamente 3 horas.

Posteriormente a su homogenización, se centrifugaron las muestras en una centrifuga IEC CL31R Multispeed: 13000 rpm, 4°C, durante 20min. Se separaron 450µL del sobrenadante en cada una de las muestras.

2.2.1.3. Limpieza

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

Se separó cada pellet sedimentado y fueron lavados en 100µL de acetona fría en tres ocasiones, en cada lavado las muestras se mantuvieron durante 10min en el refrigerador y centrifugados a 10.000g, 4°C, durante 10 min. Posteriormente los pellets se dejaron secar al ambiente (20min) y se resolubilizaron en 200µL de buffer de lisis con agitación en vortex a 1200 rpm durante aproximadamente 2 horas.

2.2.1.4. Cuantificación

La cuantificación de las proteínas se realizó usando el método de Bradford. En el ambiente ácido del reactivo, la proteína se une al colorante, coomassie-G250. Esto resulta en un cambio espectral del tinte de rojizo/marrón (máximo de absorbancia a 465nm) a la forma azul del tinte (máximo de absorbancia a 610nm). La diferencia entre las dos formas de la tintura es mayor a 595nm, por lo que es la óptima longitud de onda para medir el color del complejo proteína-colorante.

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

2.2.2. Electroforesis 2D

Para obtener los geles bidimensionales con el objetivo de facilitar la detección de cambios, expresión diferencial o diferencias en la cantidad de proteínas detectadas, se realizaron mezclas de los extractos de proteínas de la misma región hipocampal y del mismo grupo (Fig. 9), resultando 16 pools de proteínas que fueron corridos en pares asignados aleatoriamente (Tablas 2 y 3).

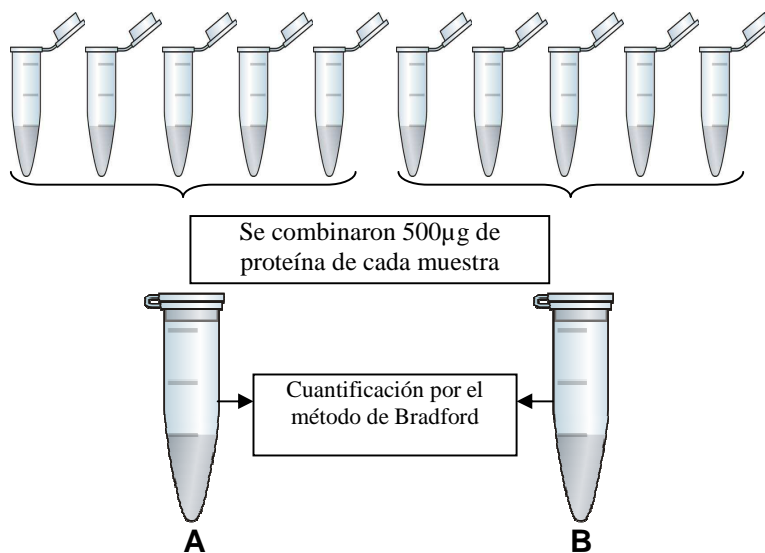


Fig. 9: Combinación de muestras para la formación de los pools

Tabla 2: Distribución de las muestras para la formación de los pools

Grupo	Sección	Muestras	Región Hipocampal*	
			Derecha	Izquierda
1	A	1-5	AD1	AI1
	B	6-10	BD1	BI1
2	A	1-5	AD2	AI2
	B	6-10	BD2	BI2
3	A	1-5	AD3	AI3
	B	6-10	BD3	BI3
4	A	1-5	AD4	AI4
	B	6-10	BD4	BI4

*codificación asignada a los pools formados

Tabla 3: Distribución de los pools para la Electrofóresis 2D

Corrida	pool 1	pool 2
1	BI1	BD1
2	AD2	AI3
3	AI2	BI3
4	AD4	BD3
5	AD3	AI4
6	BD2	BI4
7	AD1	BI2
8	AI1	BD4

2.2.2.1. Isoelectroenfoque (IEF)

En el proceso se utilizaron tiras de rehidratación (ReadyStrip IPG strips, bio-rad) de 7cm de longitud con rango de pH 3-10 y se rehidrataron mediante el método de rehidratación pasiva (sin voltaje) durante 12-16h. Se cargaron 180µg de proteína / 125µL de solución. Posteriormente las muestras fueron colocadas en la bandeja de IEF y corridas en el equipo de IEF, protean IEF cell, bio-rad, bajo los siguientes parámetros; hasta 250 V (20min), hasta 4000 V (2 h, rampa lineal), 4000 V constante hasta llegar a 14000 Vh (tiempo total: 5 h).



Fig. 10: Equipo de Isoelectroenfoque: protean IEF cell, bio-rad

2.2.2.2. SDS-PAGE

Una vez que las proteínas fueron separadas en función de sus propiedades de cargas (pI), se separaron en función de su tamaño o peso molecular mediante electrofóresis SDS-PAGE. Previamente a la separación, las tiras de IEF fueron equilibradas mediante un proceso de reducción-alquilación, para lo cual, fueron colocadas en bandejas de equilibración y se adicionaron 2mL de buffer de equilibración I (anexo A) y se agitaron a 60 rpm, 15min; inmediatamente después se retiró el buffer I y se adicionaron 2mL de buffer de equilibración II (anexo A) y se agitaron a 60 rpm, 15min.

Después de la equilibración cada tira fue sumergida en buffer de corrido (anexo A), durante 30 s y colocadas sobre geles de poliacrilamida al 12%T (soluciones y composición de los geles, anexo A) y corridas a 150 V en el Equipo de electrofóresis mini protean system, bio-rad, durante aproximadamente 1.5 horas.

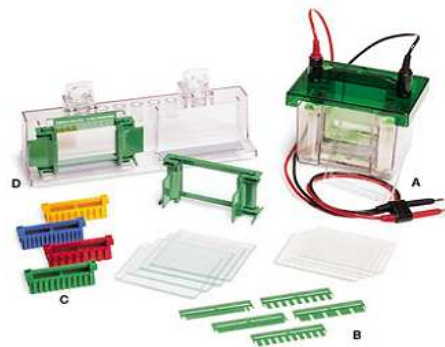


Fig. 11: Equipo de electrofóresis: mini protean system, bio-rad

2.2.2.3. Tinción

Para visualizar las proteínas en el gel éstos deben ser coloreados; para lo cual se utilizó el método de tinción de azul de coomassie coloidal (anexo A). Finalizada la corrida de SDS-PAGE, el gel se sumergió en 50mL de solución de fijación durante toda la noche, posteriormente se lavó el gel con agua desionizada durante 10min en tres ocasiones. Se adicionaron 50mL de solución de equilibración y se mantuvo el gel en está solución durante 1 hora, transcurrido el tiempo se agregaron 5mL de solución de coloración gota a gota y con agitación. Se mantuvo la agitación durante 20min y se descartó la solución colorante. Finalmente se adicionaron 100mL agua grado HPLC para revelar los spots de proteínas y se mantuvo durante 72 horas.

2.2.2.4. Registro y análisis de imágenes

Pasado el tiempo de decoloración se obtuvieron las imágenes de los geles utilizando el escáner UMAX PowerLook 2100XL. Este dispositivo digitaliza las imágenes con 800 x 1600 puntos por pulgada (dpi), lo cual ofrece alta resolución y permite capturar finos detalles cuando se escanean transparencias. Además, este equipo minimiza el ruido de la señal favoreciendo la calidad de la imagen, reduciendo el tiempo de digitalización de ésta y el consumo de energía.

El análisis de las imágenes se hizo mediante el software PD-QUEST, bio-rad versión 8.0.1. Este programa filtra y suaviza la imagen del gel e identifica las manchas proteicas, mediante la creación de una representación gaussiana en tres dimensiones de las manchas clarificadas. La intensidad de las manchas es la suma de las intensidades de todos los pixeles que forman la imagen, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas. Las imágenes importadas fueron filtradas empleando la opción “sal y pimienta” gaussiana de 9 x 9. A continuación fueron analizadas, utilizando los mismos

parámetros de detección para identificar manchas en todos los geles que forman los grupos a analizar.

2.2.2.5. Análisis de datos

El análisis de los datos se realizó mediante comparaciones entre las regiones hipocampales de un mismo grupo, y entre la misma región hipocampal de los diferentes grupos utilizando la prueba de *t-student* y comparaciones múltiples entre las diversas regiones empleando pruebas de análisis de varianza ANOVA. Finalmente se determinó la correlación entre la cantidad de spots detectados en función del tiempo del criterio de aprendizaje.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Análisis comportamental

3.1.1. Evaluación del tiempo total para alcanzar el criterio de aprendizaje

Cada animal fue expuesto al LCE hasta que alcanzó el tiempo estipulado como criterio de aprendizaje; para los grupos 2, 3 y 4, el tiempo fue de 1min, 5min, y 10min en un brazo cerrado (BC) respectivamente. La Fig. 12, muestra el tiempo acumulado promedio de cada grupo para alcanzar el criterio respectivo. Mediante análisis ANOVA de un factor (tiempo total) se determinó que se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tres grupos. Análisis de comparaciones múltiples utilizando el test de Dunn permitió identificar que el grupo con criterio de 1min es estadísticamente diferente de los grupos con criterios de 5min y 10min.

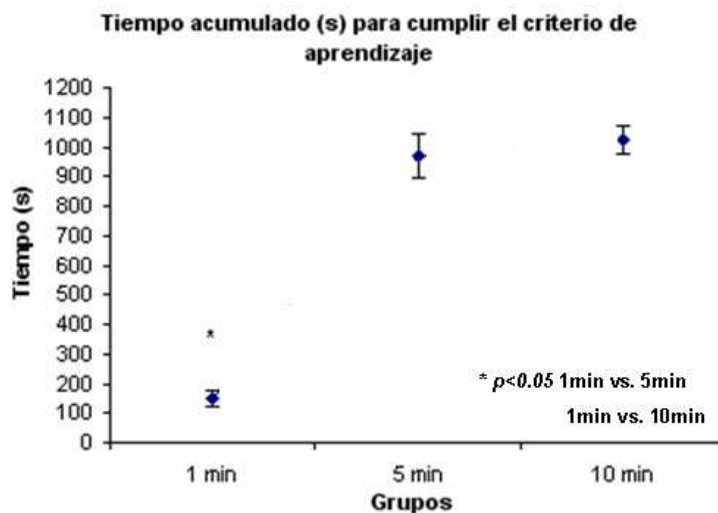


Fig. 12: Tiempo acumulado en alcanzar el criterio de aprendizaje para cada grupo. Los valores están dados en promedio \pm error estándar. ($n=10$). * $p < 0.05$ grupo con criterio de 1min es significativamente diferente del grupo con criterio de 5min y 10min.

Es adecuado encontrar diferencias estadísticas entre los tiempos totales entre los grupos 1min vs. 5min y 1min vs. 10min, ya que siendo el tiempo del criterio mayor, hace que se incremente el tiempo total de la prueba. No obstante, no se hallan tales diferencias en el tiempo total acumulado entre los grupos de 5min vs. 10min. Es conocido que el animal presenta su mayor actividad exploratoria durante los primeros minutos de la prueba (Carobrez, 2005), por lo tanto, estos datos muestran que hasta cierto tiempo de la prueba, previo a alcanzar el criterio de 5min el animal ya ha adquirido la información aversiva necesaria que lo hace evitar los brazos abiertos y aún evitar su exploración dentro de los brazos cerrados, ya que se mantiene sólo en uno de ellos.

3.1.2. Actividad exploratoria

La Fig. 13, muestra la cantidad de entradas a los diferentes tipos de brazos. Análisis ANOVA de un factor (entradas a los brazos) mostró diferencias significativas entre los grupos al evaluar las entradas al brazo cerrado (EBC) y no se hallaron tales diferencias en las entradas al brazo abierto (EBA). Esto indica que los animales sin ningún tratamiento farmacológico previo presentan el mismo comportamiento exploratorio de los brazos abiertos. Sin embargo, se esperaría que a un mayor tiempo de exposición al laberinto, el animal presentara una mayor actividad exploratoria en estos brazos representado en un mayor valor en las EBA.

No obstante, favoreciendo la hipótesis del aprendizaje aversivo (Stern, 2008), los datos muestran que sin importar cual larga sea la prueba, el animal con la información adquirida en su experiencia inicial (primeros minutos de la prueba) ya es capaz de evitar la exploración de los BA y ha adquirido el comportamiento de evitación inhibitoria.

Las EBC son significativamente diferentes entre los grupos. Comparaciones múltiples posteriores utilizando la prueba de Tukey mostraron que tal diferencia se halla entre los grupos con criterio 1min vs. 5min. Esto evidencia que durante la

prueba el animal aunque evita la exploración de los brazos abiertos, se mantiene moviéndose entre los brazos cerrados a medida que la prueba se hace más larga hasta alcanzar el criterio asociado a la permanencia continua en un BC. Sin embargo esta actividad se ve reducida en los animales del grupo con criterio de 10min y no se hallan diferencias estadísticas entre este grupo comparado con los otros dos, indicando que su actividad aún dentro de las zonas “seguras” es muy baja, lo cual se asocia a la manifestación de ansiedad patológica, pues estos animales adquirieron rápidamente el comportamiento de evitación inhibitoria.

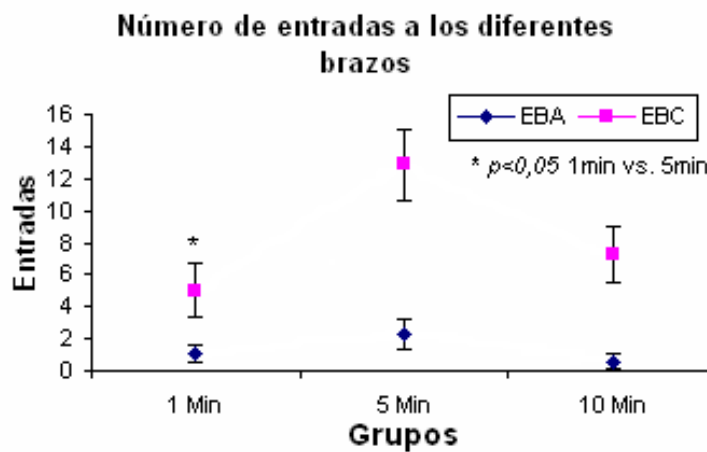


Fig. 13: Número de entradas a los diferentes tipos de brazos para cada grupo. Los valores están dados en promedio \pm error estándar. (n=10). * $p < 0,05$ grupo con criterio de 1min es significativamente diferente del grupo con criterio de 5min.

La Fig. 14, muestra otros parámetros complementarios que evidencian como fue la exploración. Análisis ANOVA de un factor del número total de cruzamientos revelaron diferencias significativas entre los grupos analizados. Comparaciones múltiples empleando nuevamente la prueba de Tukey, evidenciaron que tales diferencias se originan entre los grupos con criterio de 1min vs. 5min, mostrando igualmente que a mayor tiempo de la prueba mayor es la actividad de exploración del animal. Sin embargo, nuevamente se observa una disminución en este parámetro para el grupo con criterio de 10min sin hallar diferencias estadísticas

entre este grupo comparado con los otros dos, reflejando una rápida adquisición del comportamiento de evitación inhibitoria.

Analizando el número total de secuencias entre las zonas 3 y 4, parámetro que se utiliza para evaluar comportamiento de evaluación del riesgo, análisis ANOVA de un factor mostró diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Comparaciones múltiples utilizando el método de Holm-Sidak revelan que tales diferencias se originan entre los grupos con criterio de 1min vs. 5min, lo cual es adecuado entre estos grupos, ya que a mayor tiempo general de la prueba, el comportamiento de evaluación del riesgo es estadísticamente diferente, siendo mayor en el grupo de 5min. No obstante los animales del grupo con criterio de 10min, no presentan diferencias en dicho comportamiento al compararlo con los otros dos grupos.

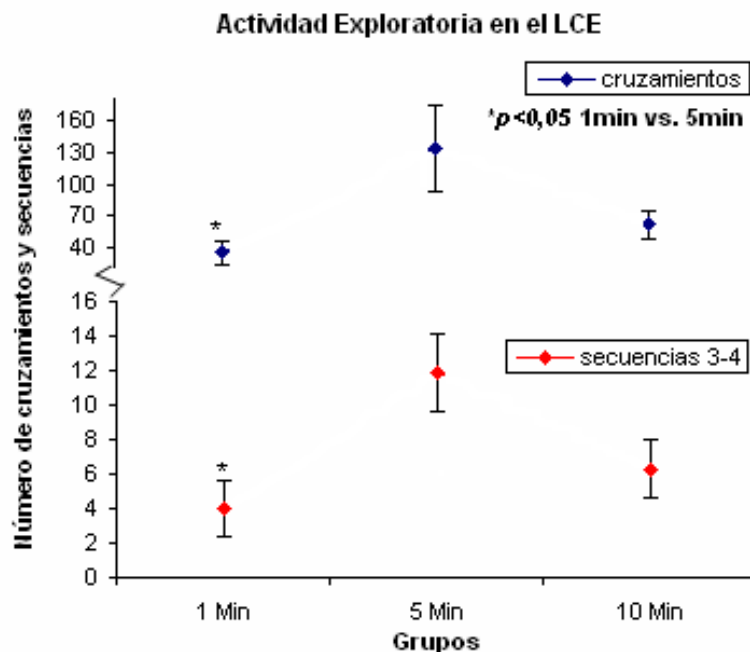


Fig. 14: Superior: Número de cruces dentro del laberinto para cada grupo. Inferior: Número de secuencias en las zonas 3 y 4 para cada grupo. Los valores están dados en promedio ± error estándar. (n=10). * p<0.05 grupo con criterio de 1min es significativamente diferente del grupo con criterio de 5min.

Haciendo un análisis ANOVA de dos factores (grupo y zona del laberinto) para el número total de entradas a los diferentes lugares (Fig. 15), no se hallaron diferencias estadísticas por efecto del grupo (tiempo del criterio) lo cual refleja que todos los animales se comportan de manera semejante en su exploración del laberinto sin importar el tiempo total de la prueba. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas significativas por efecto de la zona en la que se encuentra el animal. Comparaciones múltiples empleando la prueba de Bonferroni mostraron que dichas diferencias se originan entre las zonas de los BC y la zona central en comparación con las zonas de los BA, indicando que naturalmente los roedores prefieren permanecer en los lugares protegidos, percibiéndolos como seguros, ya que su exposición a las zonas abiertas le representan un peligro ambiental potencial (Bothelo, 2003)

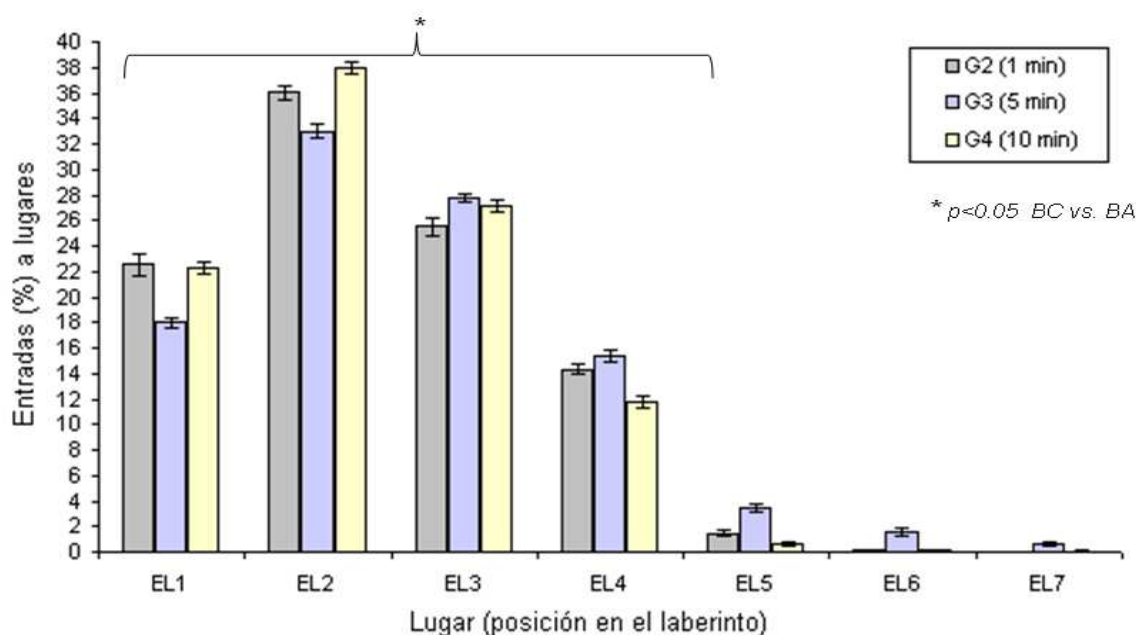


Fig. 15: Entradas (%) a los diferentes lugares del laberinto. Los valores están dados en promedio \pm error estándar. (n=10). * $p < 0.05$ zonas de los BC y zona central son significativamente diferente de las zonas del BA.

Análisis ANOVA de dos factores (grupo y tiempo en cada lugar) del tiempo permanecido en cada zona durante la prueba (Fig. 16) mostró diferencias entre los grupos. La prueba de Bonferroni mostró diferencias estadísticamente significativas

entre el tiempo de las zonas de los BC en comparación a las zonas de los BA y de la zona central, evidenciando que el animal prefiere pasar la mayor parte del tiempo en los lugares protegidos. Igualmente, se hallaron diferencias entre el porcentaje de tiempo en un mismo lugar entre los diferentes grupos, se observa un aumento significativo en el tiempo que el animal pasa en la zona 1 del laberinto y una disminución significativa en la zona 3 a medida que aumenta el criterio de aprendizaje, hecho que evidencia que la exploración del riesgo disminuye significativamente en función del tiempo de la prueba, manifestando el comportamiento de evitación inhibitoria con un aumento significativo en el tiempo pasado en el lugar 1.

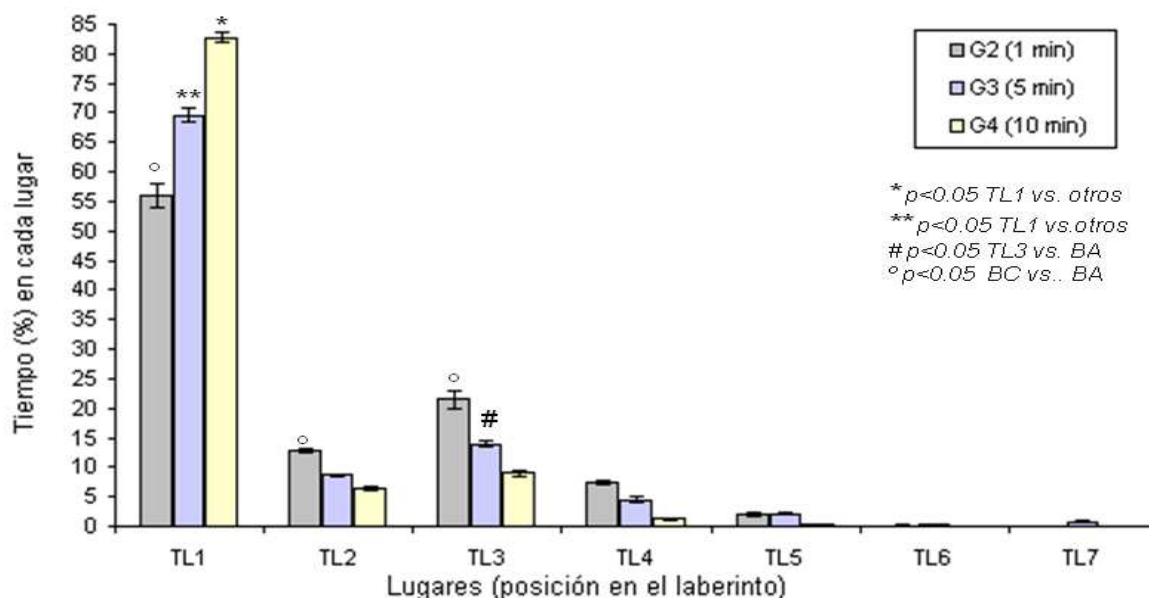


Fig. 16: Tiempo (%) en los diferentes lugares del laberinto. Los valores están dados en promedio \pm error estándar. (n=10).

3.2. Preparación de muestras y electrofóresis 2D

Las muestras fueron solubilizadas con agitación en vortex durante 3 horas a 1200 rpm. Posteriormente fueron centrifugadas a 13.000 rpm a 4°C durante 20 minutos para separar el material interferente. De cada muestra se separaron 450 μ L del sobrenadante para evitar contaminación con el material sedimentado y se realizó

la precipitación de proteínas con acetona fría (-20°C) en relación 1:4 muestra:solvente. Cada muestra fue cuantificada por el método de Bradford, para ello se realizó una curva de calibración utilizando albúmina como patrón (Anexo C). El método establecido permitió extraer en promedio $71,6 \pm 22,2$ μg proteína / mg de tejido (Anexo D). Finalmente se mezclaron 500 μg de proteína de cada muestra en la formación de los “pools” colectados, los cuales fueron nuevamente cuantificados.

Cada pool fue corrido en la electrofóresis bidimensional. Después de decolorar los geles por 72 horas fueron escaneados mediante un scanner UMAX Powerlook 2100 XL. Se obtuvieron las imágenes de los patrones de proteínas que se observan en el Anexo E.

3.3. Análisis de las imágenes

Una vez escaneados los geles fueron analizados en el software PDQuest 2D de Bio-Rad (versión 8.0.1). En el programa se incluyeron todos los geles que se compararon. Con el objetivo de compensar las posibles variaciones entre geles debidas a diferencias en la eficacia de la tinción, se aplicó el método de normalización más sofisticado disponible en el software, 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 grafica 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.

3.3.1. Cantidad total de spots detectados

Se hizo la detección de spots bajo los siguientes parámetros: smoothing, Power Mean 3x3; background removal, floating ball 65; remove vertical streaks 65; remove horizontal streaks 65; sensitivity 5.8462 y Gaussian fit spots. Inicialmente

se realizó el análisis de todos los geles que conformaron el experimento y se obtuvieron los datos de cantidad total de spots detectados para cada gel mostrados en la tabla 4.

El programa crea una imagen maestra “master” de los spots asignando una distribución gaussiana, e identifica los spots coincidentes en cada uno de los geles automáticamente. No obstante, se realizó una revisión manual pormenorizada, la edición y corrección de alguna 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”.

Tabla 4: Cantidad de spots detectados en el software PDQuests en cada gel obtenido a partir de los pools de proteínas colectados del hipocampo de cerebros de ratas Wistar expuestas al LCE bajo criterio de aprendizaje y teñidos con el método de azul de Comassie Coloidal

Grupo	Región	Pool	Spots	Grupo	Región	Pool	Spots
Control	Derecha	AD1	496	Criterio 5min	Derecha	AD3	460
		BD1	505			BD3	504
	Izquierda	AI1	477		Izquierda	AI3	461
		BI1	480			BI3	458
Criterio 1min	Derecha	AD2	440	Criterio 10min	Derecha	AD4	549
		BD2	459			BD4	573
	Izquierda	AI2	434		Izquierda	AI4	505
		BI2	437			BI4	489

Para las regiones hipocampales derecha e izquierda de cada grupo se obtuvieron dos geles (ej: AD1 y BD1). Con el fin de eliminar la variabilidad individual en la expresión de proteínas, se realizó otro análisis en el cual se tomaron estas dos imágenes como geles replica. En estos análisis, se incluyó únicamente la cantidad de spots comunes en estos dos geles en la imagen “master”, la cual se tomó como la cantidad de spots presentes en esta región para los análisis posteriores, llegando a obtener los datos mostrados en la tabla 5.

3.3.2. Variación diferencial en la detección de spots de proteínas: Grupos expuestos al laberinto vs. Grupo control.

Se analizó la cantidad total de spots detectados para las regiones hipocampales de los grupos con exposición al laberinto en comparación con el grupo control para determinar la variabilidad proteómica obtenida en estos geles en función del criterio aplicado. A continuación se muestran las relaciones obtenidas entre las regiones hipocampales de los diferentes grupos estudiados.

Tabla 5: Cantidad de spots comunes en las imágenes replica de los geles obtenidos a partir de los pools de proteínas colectados del cada región hipocampal de cerebros de ratas Wistar evaluadas en el LCE bajo criterio de aprendizaje y teñidos con el método de azul de Coomassie Coloidal

Grupo	Región Hipocampal Derecha	Región Hipocampal Izquierda
Grupo control	467	469
Grupo con criterio de 1min	406	426
Grupo con criterio de 5min	442	435
Grupo con criterio de 10min	515	479

3.3.2.1. Regiones Derechas

Se comparó la cantidad de spots detectados en los geles de las regiones hipocampales derechas de los diferentes grupos y se obtuvo la variabilidad descrita en la Fig. 17.

Se encontró que la cantidad de spots detectados disminuye cuando los animales son expuestos en tiempos cortos al laberinto, ya que se presentó una disminución del 13% en la cantidad de spots detectados en el grupo con criterio de 1min con respecto al grupo control. No obstante, se incrementó la cantidad de proteínas detectadas se incrementó a medida que se aumentó el tiempo de exposición al laberinto. A su vez, se produjo una variación menor en el grupo con criterio de 5min, pues las proteínas detectadas disminuyen en un 5% respecto al control.

Además se observa que las proteínas aumentan su expresión pues se presentó un aumento del 9% en este grupo con respecto al grupo de 1min. Esto muestra que la exposición al laberinto origina cambios neurobiológicos asociados al estímulo estresor, y que dichos cambios son marcados durante los inicios del estímulo estresor, ya que estos datos muestran como el organismo del animal vuelve a su estado fisiológico normal, lo cual se corrobora con la expresión de proteínas expresadas, ya que la cantidad de proteínas detectadas en el grupo de 5min es similar al del grupo control, lo cual indicaría familiarización y/o adaptación al nuevo medio ambiente en el que se halla el animal.

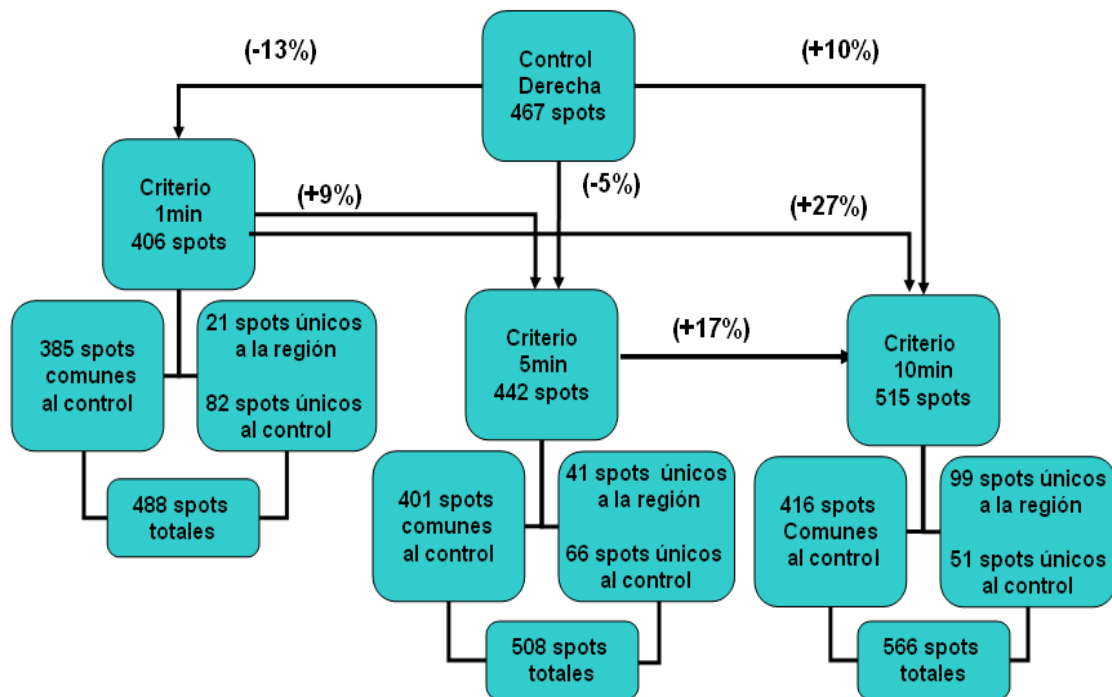


Fig. 17: Variabilidad presentada en los proteomas de las regiones hipocampales derechas de ratas Wistar evaluadas en el LCE bajo criterio de aprendizaje. Los geles fueron teñidos con el método de azul de Coomassie Coloidal y analizados en el software PDQuest (versión 8.0.1)

También, se pudo observar que cuando dicho estímulo estresor se incrementa aún más, es decir, cuando el grupo de ratas se trabaja con criterio de 10min, se pudo detectar un aumento del 10% en la expresión de proteínas con respecto al control, y del 27% y 17% con respecto a los grupos de 1min y 5min, respectivamente. Esto

evidencia la fase de consolidación del aprendizaje del comportamiento de evitación soportando la hipótesis que argumenta que el aprendizaje se consolida con una fase de síntesis de proteínas posterior al evento que lo origina (Bekinschtein, 2007).

Por otra parte, se encontró que los animales que no son expuestos al laberinto, es decir el grupo control, presentan una regulación diferencial en la expresión de proteínas entre las regiones hipocampales derechas de los diferentes grupos, pues se encontraron spots únicos a cada región. Se evidenció un aumento en la cantidad de spots comunes al control a medida que se aumentó el criterio de aprendizaje, originando una disminución en los spots únicos al control. Sin embargo, se observó un marcado aumento en función del tiempo del criterio en la cantidad de spots únicos en esta región hipocampal.

3.3.2.2. Regiones Izquierdas

Se comparó la cantidad de spots detectados en las regiones hipocampales izquierdas de los diferentes grupos y se determinó la variabilidad observada en la Fig. 18.

En el caso de las regiones hipocampales izquierdas se observó la misma tendencia descrita para las regiones hipocampales derechas, pero con variaciones menos marcadas. El grupo con criterio de 1min presentó una disminución en la expresión de proteínas del 9% comparada con el grupo control. En el caso del grupo con criterio de 5min el descenso es mayor al observado en la región derecha, ya que se presentó una variación del 7% respecto al grupo control y un aumento del 2% comparado al grupo con criterio de 1min. Finalmente, en el caso del grupo con criterio de 10min se presentó un aumento del 2% en comparación al grupo control, y del 12% y 10% respecto a los grupos de 1min y 5min, respectivamente.

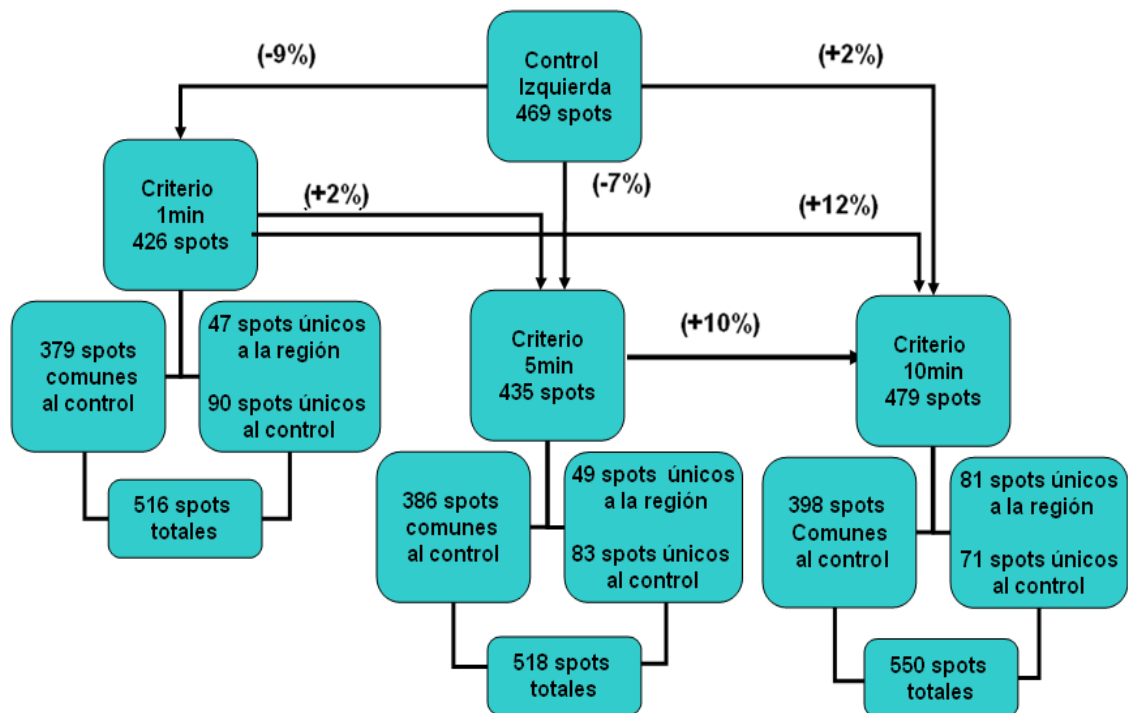


Fig. 18: Variabilidad presentada en los proteomas de las regiones hipocampales izquierdas de ratas Wistar evaluadas en el LCE bajo criterio de aprendizaje. Los geles fueron teñidos con el método de azul de Coomassie Coloidal y analizados en el software PDQuest (versión 8.0.1)

De la misma manera, se presentó variación diferencial entre las regiones por efecto del estímulo estresor, pues se detectaron spots únicos en las regiones hipocampales izquierdas al compararlas con el grupo control, el cual también presenta spots únicos expresados en él. De la misma forma, aumentó la cantidad de spots comunes al control en función del estímulo estresor, observándose una disminución en la cantidad de spots únicos al control y un aumento en la cantidad de spots únicos a la región hipocampal izquierda de cada grupo.

Estos datos evidencian que la consolidación de información asociada al aprendizaje del comportamiento de evitación inhibitoria implica alteraciones neurobioquímicas ligadas a la supresión, regulación y/o expresión de proteínas; presentándose de manera diferente en los hemisferios cerebrales, pues se determinó una mayor participación en dicho proceso de la zona hipocampal

derecha, al mostrar mayores variaciones en el proteoma. Además se realizaron otros análisis comparando los datos obtenidos (Anexo E).

3.3.2.3. Variación entre Región derecha vs. Región izquierda de un mismo grupo de ratas Wistar

Se determinó la variación en el proteoma de las regiones hipocampales derecha e izquierda de un mismo grupo, observando los cambios presentados en la Fig. 19. En el caso del grupo control la cantidad de spots detectados es muy similar, tan solo se presentó una diferencia de 2 spots. Se observa diferenciación regional al hallar spots únicos a cada una de las regiones hipocampales de un mismo grupo. Además, éstas diferencias se dieron en función del estímulo estresor, siendo mayor la diferencia entre los spots detectados en las regiones hipocampales para los grupos con criterios de 1min y 10min.

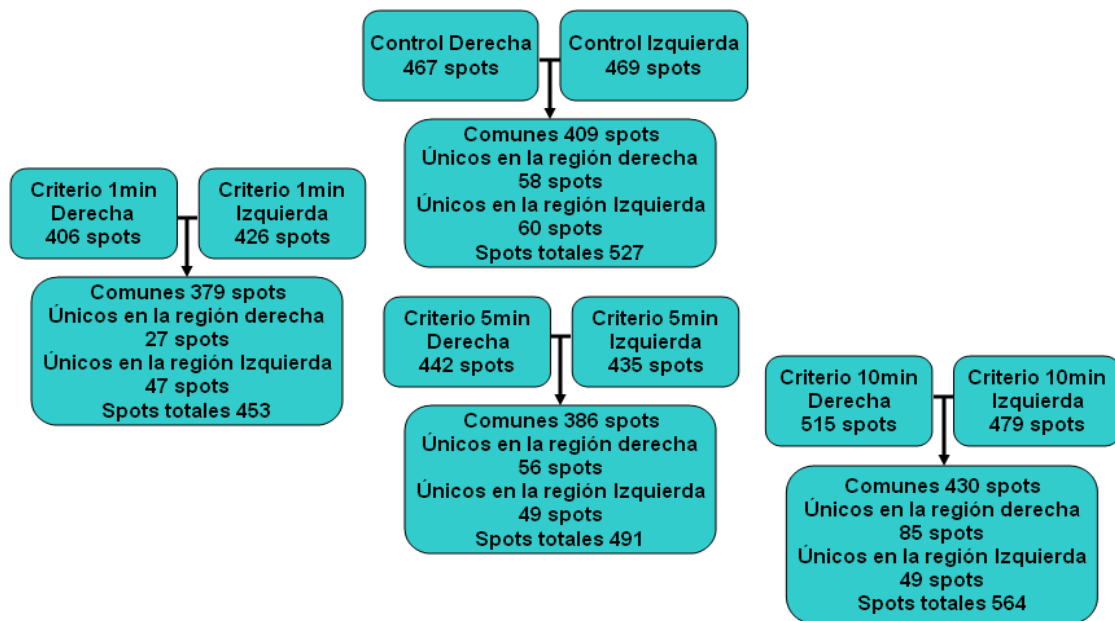


Fig. 19: Variabilidad presentada en los proteomas de las regiones hipocampales derecha e izquierda de un mismo grupo de ratas Wistar evaluadas en el LCE bajo criterio de aprendizaje. Los geles fueron teñidos con el método de azul de Coomassie Coloidal y analizados en el software PDQuest (versión 8.0.1)

Igualmente se observó la variación en la cantidad de spots únicos a cada región hipocampal, principalmente por variaciones en la cantidad de spots únicos presentes en la región derecha, evidenciando más fuertemente la regionalización hipocampal en la consolidación de la información asociada al aprendizaje aversivo vinculado con la manifestación de ansiedad.

3.3.2.4. Algunas variaciones observadas en los proteomas obtenidos

Se hallaron diferencias en la cantidad de proteínas detectadas entre las regiones hipocampales de un mismo grupo, y entre la misma región hipocampal de los diferentes grupos, hallándose expresión diferencial por efecto del criterio de aprendizaje (intensidad del estímulo estresor). La figura 20 muestra un ejemplo de las diferencias detectadas en los geles de la región hipocampal derecha de los diferentes grupos. Los datos mostraron que en el grupo control no se detectaron las proteínas que son visualmente identificables en menor intensidad en los grupos con criterio de 1min y 5min, y fácilmente notorias en el grupo con criterio de 10min.

Igualmente, se puede observar en la Fig. 21 como el grupo de proteínas señalado varió en función del estímulo estresor, mostrando además diferenciación regional en los hemisferios hipocampales. En el caso de la región hipocampal izquierda se encuentran presentes en el grupo control, pero se hacen no detectables en función del criterio. El caso contrario se presenta en la región derecha, en donde no son muy identificables en el grupo control, pero se hacen detectables en función del criterio.

En la Fig. 22 se puede observar como en cierta región hipocampal en función del criterio de aprendizaje pudo detectarse spots únicos en un proteoma. Es así como el grupo de proteínas señalado solo se encuentra presente en la región derecha del grupo con criterio de 5min.

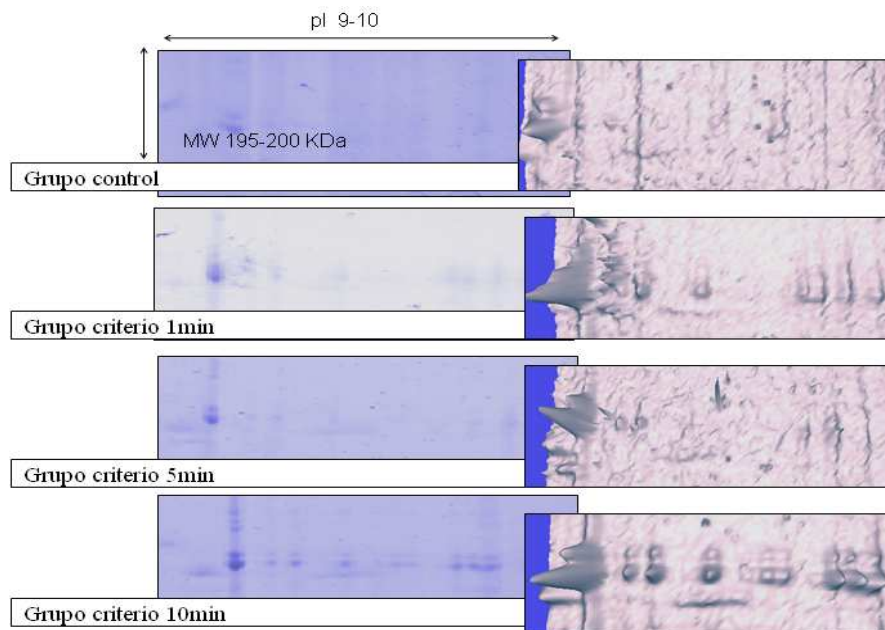


Fig. 20: Variabilidad en los proteomas de las regiones hipocampales derechas de ratas Wistar evaluadas en el LCE bajo criterio de aprendizaje en función del estímulo estresor (tiempo de exposición). Los geles fueron teñidos con el método de azul de Coomassie Coloidal y analizados en el software PDQuest (versión 8.0.1). Las proteínas observadas presentan propiedades de WM: 195-200 KDa y pI: 9-10.

Lo cual indica que existen proteínas que pueden ser expresadas en un momento específico dentro de una situación particular, las cuales podrían estar vinculadas a plasticidad neuronal y/o mecanismos asociados a los procesos de aprendizaje-ansiedad directamente relacionados a esta región hipocampal. Estas proteínas efectuarían una función específica, que deja de ser necesaria en el transcurso de la asimilación del evento, pues no son expresadas en los grupos anteriores, control y criterio de 1min y vuelve a ser regulada, no detectando su expresión nuevamente en el caso del grupo con criterio de 10min.

La Fig. 23, muestra la variación en la intensidad y/o expresión de un grupo de proteínas en una pequeña región del gel. Evidenciando nuevamente los cambios en la expresión de proteínas en función del criterio empleado y manifestado regionalmente, siendo la región hipocampal derecha la principal afectada por los cambios neurales involucrados en estos procesos.

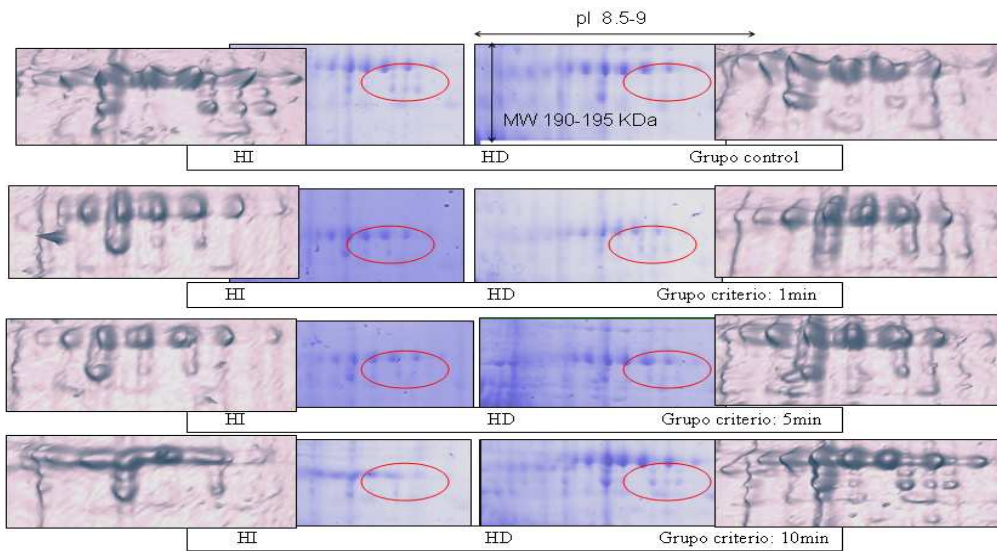


Fig. 21: Variabilidad de las regiones hipocámpales izquierda y derecha de un mismo grupo de ratas Wistar evaluadas en el LCE bajo criterio de aprendizaje en función del estímulo estresor (tiempo de exposición). Los geles fueron teñidos con el método de azul de Coomassie Coloidal y analizados en el software PDQuest (versión 8.0.1). Las proteínas observadas presentan propiedades de MW: 190-195 KDa y pI: 8.5-9

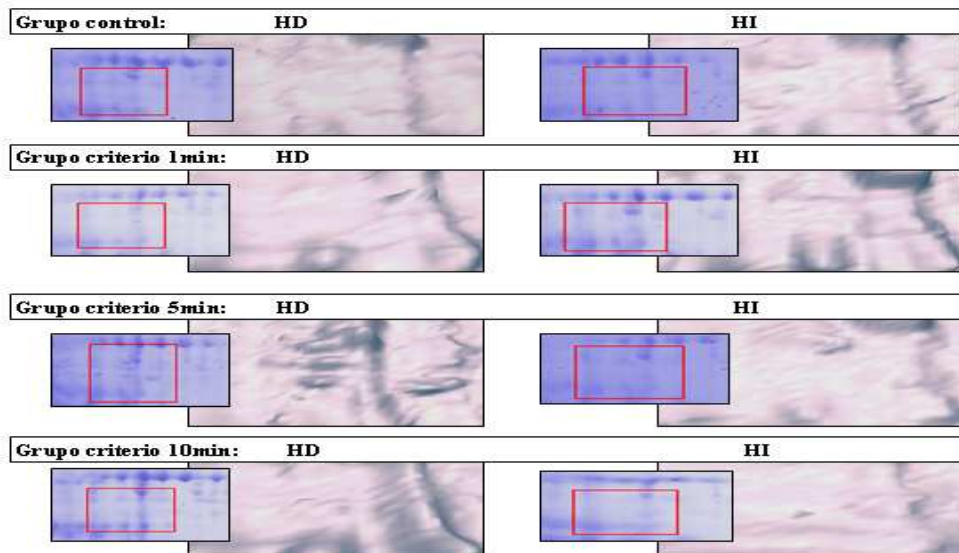


Fig. 22: Variabilidad única en uno de los proteomas de las regiones hipocámpales izquierda y derecha de ratas Wistar evaluadas en el LCE bajo criterio de aprendizaje en función del estímulo estresor (tiempo de exposición). Los geles fueron teñidos con el método de azul de Coomassie Coloidal y analizados en el software PDQuest (versión 8.0.1). Las proteínas observadas presentan propiedades de MW: 80-85 KDa y pI: 8-8.5

No obstante, existen algunas proteínas vinculadas a la región hipocampal izquierda que se ven drásticamente modificadas en su expresión. Este es el caso que se observa en la Fig. 24, en donde una proteína particular cambia su nivel de expresión en la región hipocampal derecha, aumentando su expresión en función del criterio empleado y disminuyendo su expresión hasta no detectarse en la zona hipocampal izquierda igualmente asociado al aumento del estímulo de estrés (criterio de aprendizaje). Esto muestra cambios neuronales opuestos vinculados a este tipo de procesos cerebrales.

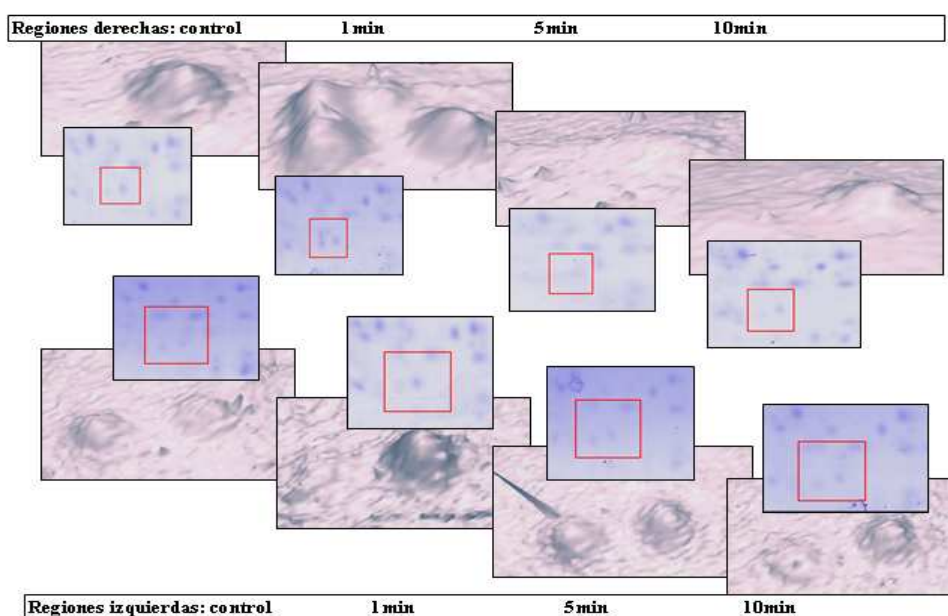


Fig. 23: Variabilidad en expresión e intensidad en los proteomas de las regiones hipocampales izquierda y derecha de ratas Wistar evaluadas en el LCE bajo criterio de aprendizaje en función del estímulo estresor (tiempo de exposición) en una pequeña región del gel. Los gels fueron teñidos con el método de azul de Coomassie Coloidal y analizados en el software PDQuest (versión 8.0.1). Las proteínas observadas presentan propiedades de MW: 15-20 KDa y pI: 4-4.5

3.3.2.5. Correlación entre la intensidad del estímulo estresor vs. la cantidad de proteínas detectadas.

Se realizó la correlación entre la cantidad de spots detectados y la intensidad del estímulo estresor y se determinó que existe relación lineal, en la expresión de proteínas en función del criterio, siendo la correlación estadísticamente significativa, $p < 0.05$ para los valores de las pendientes y $p < 0.001$ para los valores constantes. La Fig. 25 muestra las ecuaciones obtenidas para los datos de spots totales teniendo en cuenta los datos de todos los geles (línea media), o haciendo distinción entre las regiones hipocampales derecha e izquierda (líneas superior e inferior, respectivamente) con lo cual se mejora el coeficiente de correlación.

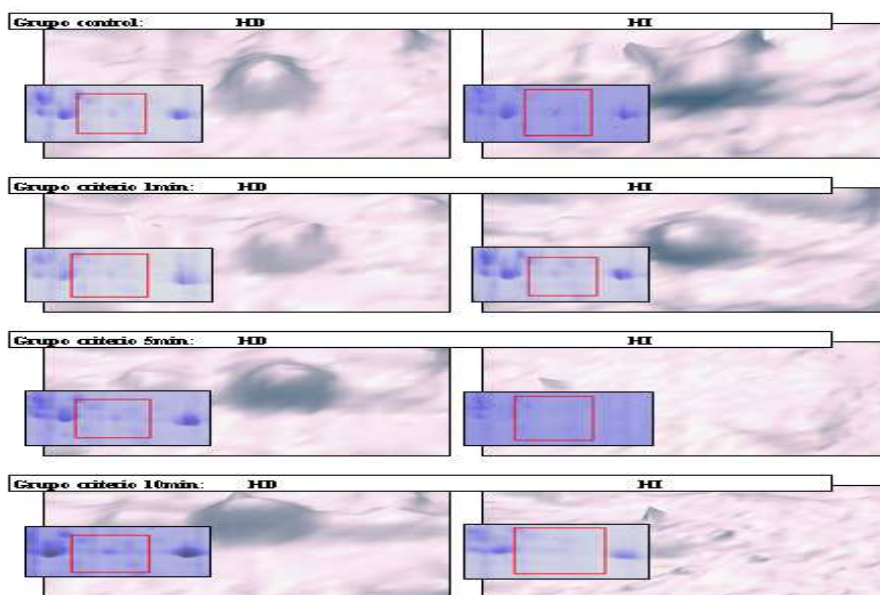


Fig. 24: Variabilidad en expresión e intensidad en los proteomas de las regiones hipocampales izquierda y derecha de ratas Wistar evaluadas en el LCE bajo criterio de aprendizaje en función del estímulo estresor (tiempo de exposición) en una proteína particular. Los geles fueron teñidos con el método de azul de Coomassie Coloidal y analizados en el software PDQuest (versión 8.0.1). Las proteínas observadas presentan propiedades de MW: 65 KDa y pI: 8.5

Ecuación	n	r
Spots totales = $429.045 + (9.695 * \text{Criterio})$	12	0.835
Spots Derecha = $430,680 + (12,529 * \text{Criterio})$	6	0.935
Spots Izquierda = $427,410 + (6,861 * \text{Criterio})$	6	0.981

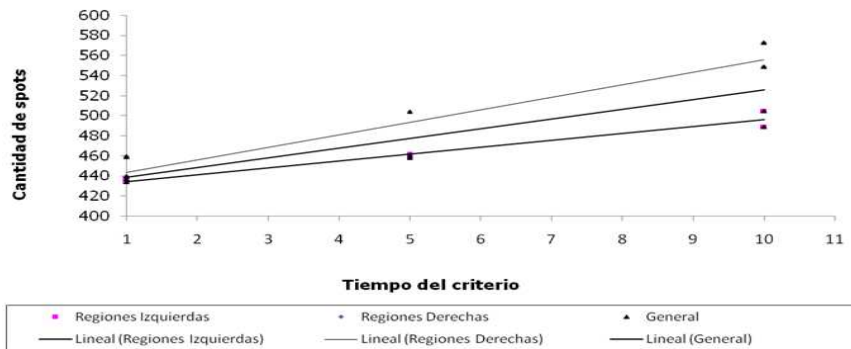


Fig. 25: Correlación entre la cantidad de spots detectados en función de la intensidad del estímulo estresor. La correlación es estadísticamente significativa, $p < 0.05$ para los valores de las pendientes y $p < 0.001$ para los valores constantes. Las ecuaciones fueron obtenidas teniendo en cuenta los datos de spots totales de todos los geles (línea media), o haciendo distinción entre las regiones hipocámpicas derecha e izquierda (líneas superior e inferior, respectivamente)

3.3.2.6. Cambios cuantitativos en el nivel de intensidad

Los datos de intensidad de la expresión de proteínas fueron analizados en el PDQuest. Sólo se consideraron significativas aquellas manchas con niveles de expresión alterados en $\pm 30\%$ y valores $p < 0.05$, de acuerdo a la prueba *t-student*, y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 6 y otras comparaciones en el Anexo F.

Estos resultados muestran la variación en el proteoma de ratas sometidas al LCE bajo criterio de aprendizaje, indicando que la exposición a este modelo, como modelo de ansiedad generalizada y quizás del desorden de estrés postraumático (Bothelo, 2003) origina cambios neuroproteómicos vinculados con el estímulo de estrés. Además, estos estudios brindan las herramientas y abren la posibilidad de estudiar las proteínas involucradas en dichas modificaciones para vincularlas con los trastornos de ansiedad mencionados, y los procesos de aprendizaje y memoria emocional igualmente analizados en este modelo.

Tabla 6: Cantidad de spots con cambios cuantitativos y estadísticos en las regiones hipocampales derechas (D) e izquierdas (I) de los diferentes grupos estudiados (Control: 1; Criterio de 1min: 2; Criterio de 5min: 3; Criterio de 10min: 4). Los análisis se realizaron en el software PDQuest (versión 8.0.1)

Spots con diferencias cuantitativas del $\pm 30\%$ en el nivel de expresión	
Comparaciones	Cantidad de spots
D1 vs. D2	67
D1 vs. D3	61
D1 vs. D4	65
I1 vs. I2	54
I1 vs. I3	53
I1 vs. I4	64
D1 vs. I1	58
D2 vs. I2	61
D3 vs. I3	71
D4 vs. I4	66
Spots con significancia estadística $p < 0.05$, de acuerdo a la prueba <i>t-student</i>	
D1 vs. D2	36
D1 vs. D3	35
D1 vs. D4	33
I1 vs. I2	17
I1 vs. I3	17
I1 vs. I4	20
D1 vs. I1	31
D2 vs. I2	26
D3 vs. I3	26
D4 vs. I4	31

Observaciones semejantes han sido publicadas teniendo en cuenta otros estímulos estresores y modelos de otras enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia; la privación materna de ratas neonatales durante periodos tempranos post-natales constituye un estado estresante, resultando presumiblemente en la perturbación del desarrollo normal del cerebro. Recientes

investigaciones clínicas y de laboratorio indican que la separación maternal durante periodos críticos del desarrollo del cerebro pueden originar daños en la citoarquitectura hipocampal contribuyendo a la desestabilización del aprendizaje y anomalías comportamentales por modificaciones en la expresión de proteínas específicas como el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) (Kuma, 2004).

La exposición a un medio ambiente estresante causa efectos a largo plazo sobre el comportamiento animal y la plasticidad neuronal, además de estar implicado en muchos desordenes humanos tales como depresión, ansiedad y enfermedades cardiovasculares. Previa experiencia estresante pueden modificar la respuesta animal a nuevos estímulos aversivos. Se ha demostrado que 2h de retención causan un amplio incremento en la síntesis de proteínas del cerebro de rata que sobrepasan los cambios fisiológicos relacionados al estrés (Mendoca, 1998).

Esto sugiere que un incremento en la síntesis de proteínas puede jugar un papel importante en los eventos moleculares que llevan a cambios en plasticidad neuronal después de una situación de estrés agudo, estando la formación hipocampal involucrada en la modulación de respuestas de estrés-aprendizaje-memoria emocional, ya que se ha demostrado que la administración intra-hipocampal de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas disminuye el déficit exploratorio inducido por retención en un LCE, sugiriendo que el bloqueo de síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal durante el periodo de retención disminuyen las consecuencias comportamentales del estrés (Mendoca, 1998).

Por otro lado, numerosas investigaciones acerca de la memoria, usando igualmente inhibidores de síntesis de proteínas (cicloheximida), sobre modelos animales como el rotarod y el laberinto de agua, han asociado la síntesis de nuevas proteínas a la formación y el mantenimiento de la memoria a largo plazo en el hipocampo; para el caso de este último modelo, los estudios revelan una baja expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y de la proteína cinasas activadas por mitógenos (MAP-K), demostrando una posible

relación entre la síntesis de proteínas en la retención de la memoria espacial y la expresión BDNF/MAP-K en el hipocampo (Morrison, 2002).

Actualmente se ha despertado un gran interés por el estudio de los procesos neurobiológicos que pueden estar asociados con el deterioro cognitivo, los déficits en el aprendizaje y el deterioro de la memoria emocional, debido a la estrecha relación que tienen estos con los trastornos neurológicos en pacientes con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y Esclerosis múltiple. A pesar de las diversas investigaciones, aún no se han elucidado completamente los aspectos neurobioquímicos que están implicados, ni se conocen concretamente, las síntesis de proteínas responsables de la manifestación de ansiedad y consolidación de la memoria, debido a la complejidad de los sistemas y procesos involucrados en daños del sistema nervioso central (Morrison, 2002).

Por lo tanto, estos resultados, posibilitan el conocimiento de los mecanismos proteómicos involucrados en los procesos cerebrales de aprendizaje-ansiedad. También brindan la opción de búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, ya que los modelos animales para los desordenes de ansiedad se han creado en base a las reacciones comportamentales originadas en situaciones experimentales de estrés, y no a los mecanismos moleculares patológicos, puesto que las drogas empleados para el tratamiento de estos trastornos psiquiátricos actúan sobre blancos moleculares específicos (Gold, 2003; Myher, 2003).

Una creciente cantidad de evidencia demuestra que los agentes usados en los desordenes de ansiedad alteran el proteoma del cerebro de rata después de la administración crónica y existen diversas proteínas alteradas asociadas con varias funciones celulares que cambian después de situaciones de estrés. Recientemente la enolasa-fosfatasa fue identificada como biomarcador de un estudio proteómico de rasgo de ansiedad en ratones, lo cual provee soporte a la idea de que un fenotipo de modelos de ratones de ansiedad basado en proteómica (Szego, 2010).

CONCLUSIONES

Los animales pertenecientes a los grupos con criterios de 1min y 5min presentaron variaciones estadísticas significativamente mayores en los parámetros comportamentales analizados: tiempo total de la prueba, entradas a los brazos, total de cruzamientos y secuencias entre los lugares 3 y 4. Sin embargo, no se observaron tales diferencias con los animales del grupo con criterio de 10min, evidenciando la adquisición del comportamiento de evitación inhibitoria asociado a la permanencia continua en un brazo cerrado.

La exposición de las ratas al Laberinto en Cruz Elevado origina cambios neurobiológicos asociados con la cantidad de proteínas detectadas en las regiones hipocampales derecha e izquierda, siendo dependientes de la intensidad del estímulo de estrés (criterio). Se halló una correlación directa estadísticamente significativa, entre la cantidad de proteínas detectadas y la intensidad del estímulo estresor, estando relacionado al aprendizaje del comportamiento de evitación inhibitoria.

Los cambios neurobiológicos originados por la nueva experiencia que enfrenta el roedor durante tiempo cortos del evento (grupo con criterio 1min) lleva a una disminución en la cantidad de proteínas detectadas; el aumento del tiempo del criterio (grupos con criterio 5min y 10min) y la familiarización y/o adaptación al nuevo ambiente permite regular la expresión de proteínas y las nuevas síntesis vinculadas a la consolidación de la información adquirida.

Las variaciones detectadas entre las regiones hipocampales muestran que el procesamiento de la información aversiva adquirida, está disociado en los hemisferios cerebrales dentro del hipocampo. Se determinó una mayor participación en dicho proceso de la zona hipocampal derecha, ya que presentó mayores variaciones en el proteoma. Dichas variaciones están asociadas a una mayor expresión de las proteínas en esta región, observándose variaciones opuestas en las mismas proteínas dentro de la región hipocampal izquierda.

RECOMENDACIONES

Determinar cambios a nivel proteómico dentro de las regiones de proteínas que mostraron baja resolución, aumentando la longitud de los strips (geles de la primera dimensión) empleados en la corrida del isoelectroenfoque. Además esto permitiría esclarecer cambios asociados en la expresión del hipocampo de ratas expuestas al LCE de una manera más específica a proteínas que presentan isoformas con pequeñas diferencias en sus puntos isoeléctricos.

Efectuar un mapeo proteómico identificando las proteínas que presentaron variaciones en su expresión por espectrometría de Masas MALDI-TOF y/o ESI-MS, ya sea por el nivel de intensidad o por expresión diferencial entre los grupos analizados, con el fin de monitorear dichas variaciones en asociación a pruebas de ansiedad-memoria utilizando el protocolo de prueba-reprueba en el LCE, y evidenciar a nivel comportamental la evocación de la memoria emocional y determinar su correlación con las variaciones neuroproteómicas.

BIBLIOGRAFÍA

Aparicio, Juan José. **Los modelos animales en los actuales estudios sobre el aprendizaje humano.** *Psicothema*. 1990, 3(1), 59-72

Baldwin, David S. Birtwistle, Jon. **An Atlas of DEPRESSION; Chapter 5: Clinical Descriptions of the anxiety disorders.** (2002): The Parthenon publishing group.

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, 273–283

Bekinschtein Pedro, Cammarota Martin, Muller Igaz Lionel, Bevilaqua Lia R.M, Izquierdo Ivan, and 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

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 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

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.

Botelho de Oliveira, Silvia. Conde Cotes, Carlos Arturo. **Modelos Animales de Estrés Post-traumático.** *Salud UIS*. 2003: 35, -107

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

Castellanos Lila, González Luis Javier y Padrón Gabriel. **PROTEÓMICA (capítulo 20).**

Colantonio, David A. Daniel W. Chan. **The clinical application of proteomics.** *Clinica Chimica Acta.* 2005; 357, 151–158

Conde, Carlos Arturo; Costa, Victor; Tomaz, Carlos. **Measuring emotional memory in the elevated T-Maze using training to criterion procedure.** *Pharmacology biochemistry and behavior.* 1999; 63, 63-69

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

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

Frauke, Ohl; Saskia S. Arndt; F. Josef vander ,Staay. **Pathological anxiety in animals.** *The Veterinary Journal.* 2008; 175, 18-26

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

Gold Paul E. **Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory.** *Neurobiology of Learning and Memory.* 2003: 80, 194-210

Gomez, Claudia. Saldivar, Alfredo. **Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica.** *Salud Mental.* 2002; 25, 14-24

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

Jae-Won Yang, Piotr Suder, Jerzy Silberring, Gert Lubec. **Proteome análisis of Mouse primary astrocytes.** *Neurochemistry International.* 2005: 47, 159-172

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

Kuma Hiromi, Takanori Miki, Yoshiki Matsumoto, He Gu, Hong-Peng Li, Takashi Kusaka, Irawan Satriotomo, Hanayo Okamoto, Toshifumi Yokoyama. **Early**

maternal deprivation induces alterations in brain-derived neurotrophic factor expression in the developing rat hippocampus. *Neuroscience Letters*. 2004: 372, 68–73

Lima, Ramón H; Rossato, Janine; Furini, Cristiane R; Bevilaqua, Lia R; Izquierdo, Iván; Cammarota, Martín. **Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 2009; 91,466-472

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

Marcos, José; Ferrandiz, Pilar; Redondo, Jaime. **Aprendizaje humano y aprendizaje animal: ¿una o dos psicologías del aprendizaje?** *Rev. de Psicolog. Gral. y Aplic.* 2003; 56 (1), 45-59

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

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

Monleón Verdú, Santiago; Arenas Fenollar, M. Carmen; Ferrer Añó, Aránzazu and Parra Guerrero, Andrés. **Effects of anisomycin on inhibitory avoidance in male and female CD1 mice.** *Psicothema*. 2008; 20(3), 456-459

Myhrer Trond. **Neurotransmitter systems involved in learning and memory in therat: a meta-analysis based on Studies of four behavioral tasks.** *Brain Research Reviews*. 2003: 41, 268–287

Nascimento Hackl, Luciane Pereira; Padua Carobrez, Antonio. **Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytice effects revealed in the elevated plus-maze task in rats.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 2007; 88, 177-185

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

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

Ove Ogren, Sven; Eriksson, Therese M; Elvander-Tottie, Elin; D`Addario, Claudio; Ekstrom, Joanna C; Svenningsson, Per; Meister, Bjorn; Kehr, Jan; Stied, Oliver. **The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory.** *Behavioural Brain Research*. 2008, 195, 54-77

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

Rogers, Jason L; Hunsaker, Michael R; Kesner, Raymond P. **Effects of ventral and dorsal CA1 subregional lesions on trace fear conditioning.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 2006; 86, 72-81

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

Sandford, John J. Argyropoulos, Spilios V. Nutt, David J. . **The psychobiology of anxiolytic drugs Part 1: basic neurobiology.** *Pharmacology & Therapeutics*. 2000; 88, 197- 212

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

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

Shahidi, Siamak; Komaki, Alireza; Mahmoodi, Minoo; Lashgari, Reza. **The role of GABAergic transmission in the dentate gyrus on acquisition, consolidation and retrieval of an inhibitory avoidance learning and memory task in the rat.** *Brain Research*. 2008; 1204, 87 – 93

Shuhama, Rosana. Del-ben, Cristina. Loureiro, Sonia. and Graeff, Frederico. **Animal defense strategies and anxiety disorders.** *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.* 2007; 79(1), 97-109

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*N. 2008: 45, 667–678

Stam, Rianne. **PTSD and stress sensitisation: A tale of brain and body Part 2: Animal models.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2007; 31, 558–584

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

Supawadee Sriyam, Supachok Sinchaikul, Payungsak Tantipaiboonwong, Ching Tzao, Suree Phutrakul, Shui-Tein Chena. **Enhanced detectability in proteome studies.** *Journal of Chromatography B,* 849 (2007) 91–104

Szego Éva M, Tamás Janáky, Zoltán Szabó, Attila Csorba, Géza Müller, György Lévyay, Attila Simor, Hajnalka Kompagne, Katalin A. Kékesi Gábor Juhász. **A mouse model of anxiety molecularly characterized by altered proteína Networks in the brain proteome.** *European Neuropsychopharmacology.* 2010: 20, 96-111

Thornalley Paul J. **Unease on the role of glyoxalase 1 in high-anxiety-related behavior.** *TRENDS in Molecular Medicine.* 2006; 12, 195-199

Vercauteren Freya G. G, Clerens Stefan, Roy Line, Hamel Nathalie, Arckens Lut,. **Early dysregulation of hippocampal proteins in transgenic rats with Alzheimer’s disease-linked mutations in amyloid precursor protein and presenilin 1.** *Molecular Brain Research.* 2004: 132, 241–259

Viana Milena de Barros, Zangrossi Hélio Jr, MassaroOnusic Gustavo. **5-HT1A receptors of the lateral septum regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in rats.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2008: 89, 360-366

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.* 21 (2003) 209–216

Xuchu Wang, Xiaofang Li, Yinxin Li. **A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic análisis.** *Biotechnol Setter.* 2007: 29, 1599–1603

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
PMSF	1 mM	200.0 μ L (Stock 25 mM)

2. Soluciones para Isoelectroenfoque

2.1. Buffer de rehidratación

Buffer rehidratación	
Componente	Concentración
Urea	8 M
DTT	50 m M
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 %
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

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% (peso/volumen)

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

3.5. Persulfato amónico (APS) al 10%

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

3.6. Geles separador (12%) y concentrador (5%)

Composición de los geles (1 gel)		
	Separador (12%)	Staking (5%)
Componente	Cantidad	Cantidad
H ₂ O (desionizada)	1.6 mL	930.0 µL
Acrilamida-bisacrilamida (30%)	2.0 mL	230.0 µL
Tris base, pH 8.8-6.8	1.3 mL	375.0 µL
SDS (10%)	50.0 µL	15.0 µL
Persulfato de amonio (10%)	25.0 µL	30.0 µL
TEMED	10.0 µL	3.0 µL

3.8. Buffer de corrido

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

4. Soluciones de Tinción Azul de Coomassie Coloidal

4.1. Solución de fijación

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

4.2. Solución de Equilibración

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

4.3. Solución colorante

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

ANEXO B

Corrida Electroforética



a) Preparación del Equipo de electroforesis; **b)** Ensamble de los vidrios del gel; **c- d)** Adición de la solución del gel de separación; **e)** Adición de la solución del gel de staking; **f)** Ubicación del peine para la formación de los pozos; **g)** Retiro del peine; **h-l)** Ensamble de la cámara electroforética; **m)** Arreglo de los parámetros de corrida en la fuente de poder; **ñ)** Vista de la corrida electroforética; **o-p)** Culminación de la corrida y retiro de los vidrios; **q)** Desensamble de los vidrios; **r-t)** Retiro del gel y colocado en la solución de coloración.

ANEXO C

Curva de Calibración

Se prepararon 2mL de solución de albúmina de concentración 1mg/mL y se obtuvieron los patrones que se describen en la tabla 1.

Tabla 1: Patrones de la curva de calibración

Patrón	Concentración (mg/mL)	μL solución	μL buffer
1	Blanco	0.0	250.0
2	0.1	25.0	225.0
3	0.2	50.0	200.0
4	0.3	75.0	175.0
5	0.4	100.0	150.0
6	0.5	125.0	125.0
7	0.6	150.0	100.0
8	0.7	175.0	75.0
9	0.8	200.0	50.0
10	0.9	225.0	25.0
11	1.0	250.0	0.0

1. De cada patrón se tomaron 20.0 μL y se adicionó 1.0 mL del reactivo de Bradford
2. Las muestras problema (20.0 μL muestra/1mL Bradford), presentaron alta concentración, por lo cual se realizaron diluciones 1:30, para que el valor de absorbancia estuviera dentro del rango de la curva.

De cada patrón se realizaron lecturas de absorbancia por triplicado, se obtuvo el valor promedio y se graficó la absorbancia promedio vs concentración del patrón (Fig.1). La tabla 2 muestra los valores calculados para la concentración de cada pool muestras hipocampales.

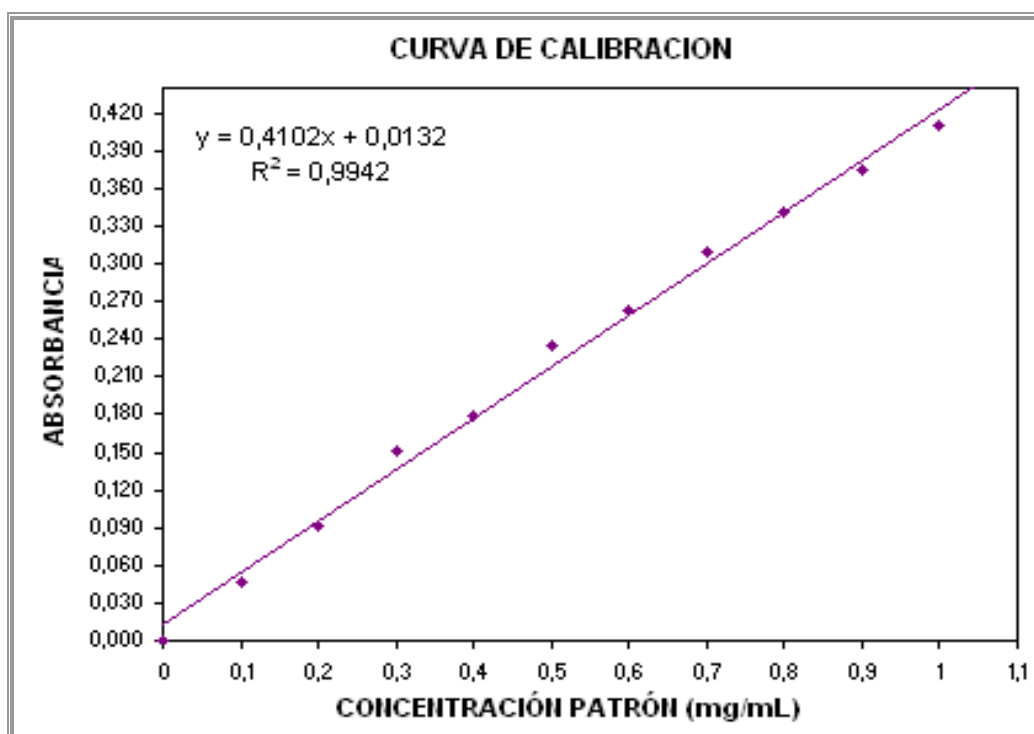


Fig. 1: Curva de Calibración

Tabla 2: Concentración de cada pool de proteínas

POOLS	[µg/ µL]
A11	10,0
B11	16,2
AD1	12,5
BD1	9,5
A12	17,4
B12	12,6
AD2	12,3
BD2	12,8
A13	13,3
B13	14,8
AD3	14,6
BD3	19,1
A14	13,9
B14	13,7
AD4	15,7
BD4	16,6

ANEXO D

Cantidad de proteína extraída de cada muestra

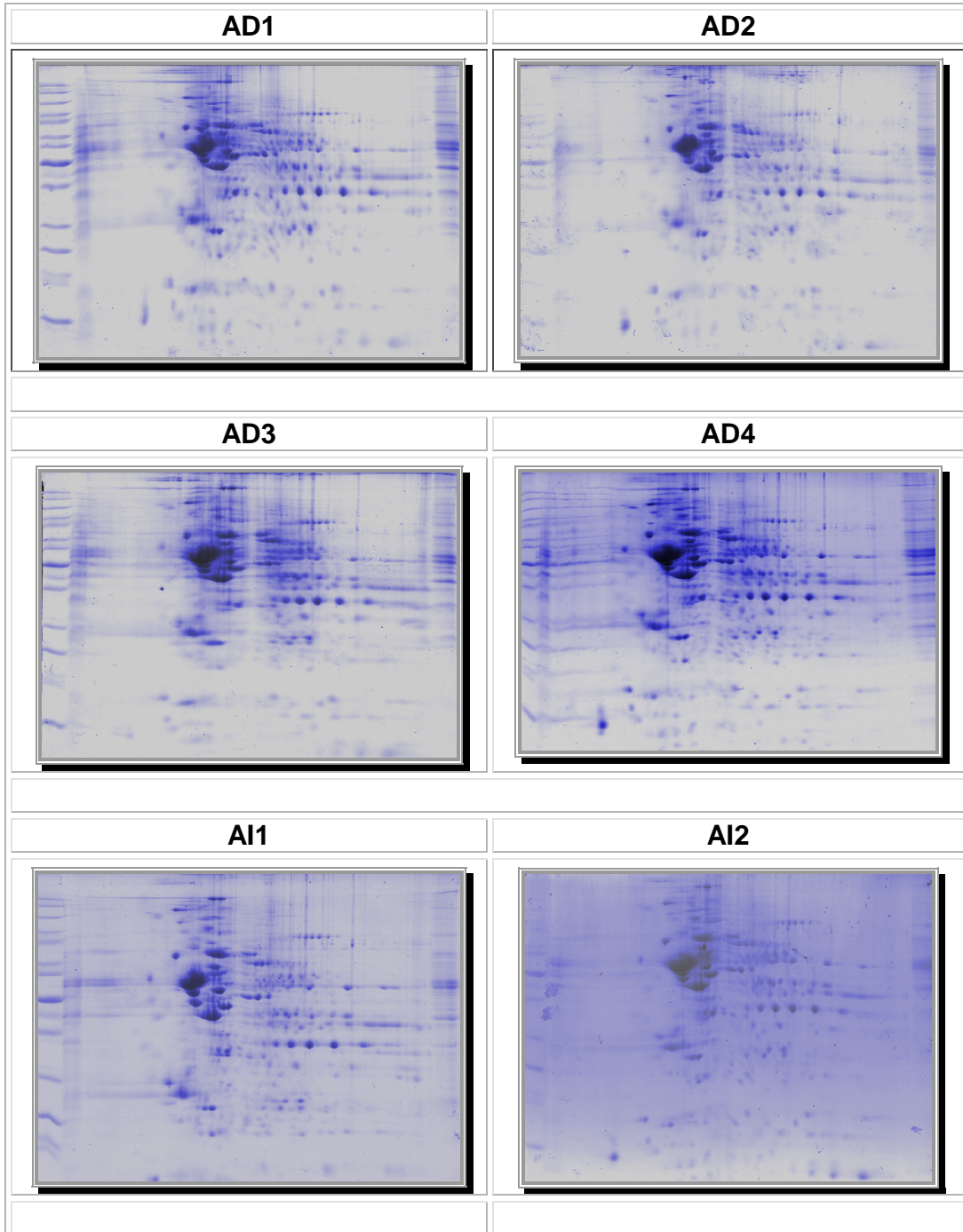
mtra	caja	animal	grupo	region	Wmuestra (mg)	[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	μg proteína / mg tejido
1	C1	1	4	HI	33,6	9,2	54,8
2			4	HD	36,7	9,2	50,3
3		2	4	HI	35,4	6,7	38,1
4			4	HD	55,2	6,9	25,1
5		3	3	HI	44,3	12,7	57,3
6			3	HD	23,7	11,8	99,7
7		4	2	HI	53,7	13,0	48,4
8			2	HD	54,8	7,9	28,9
9		5	1	HI	35,8	6,7	37,4
10			1	HD	68,8	9,0	26,2
11	C2	1	4	HI	43,0	19,2	89,2
12			4	HD	53,8	19,4	71,9
13		2	3	HI	46,8	15,9	68,1
14			3	HD	58,8	27,2	92,7
15		3	3	HI	38,9	16,7	85,9
16			3	HD	48,7	31,9	130,9
17		4	2	HI	47,2	18,1	76,6
18			2	HD	53,6	18,7	69,8
19		5	1	HI	41,5	15,6	75,1
20			1	HD	43,6	17,0	78,1
21	C3	1	4	HI	49,5	16,2	65,3
22			4	HD	51,6	22,9	88,8
23		2	3	HI	42,3	14,8	70,1
24			3	HD	50,6	24,3	96,0
25		3	2	HI	54,8	18,3	66,9
26			2	HD	40,9	20,0	97,9
27		4	2	HI	57,3	25,5	88,9
28			2	HD	55,4	15,4	55,6
29		5	1	HI	52,0	19,5	74,9
30			1	HD	42,8	15,3	71,4

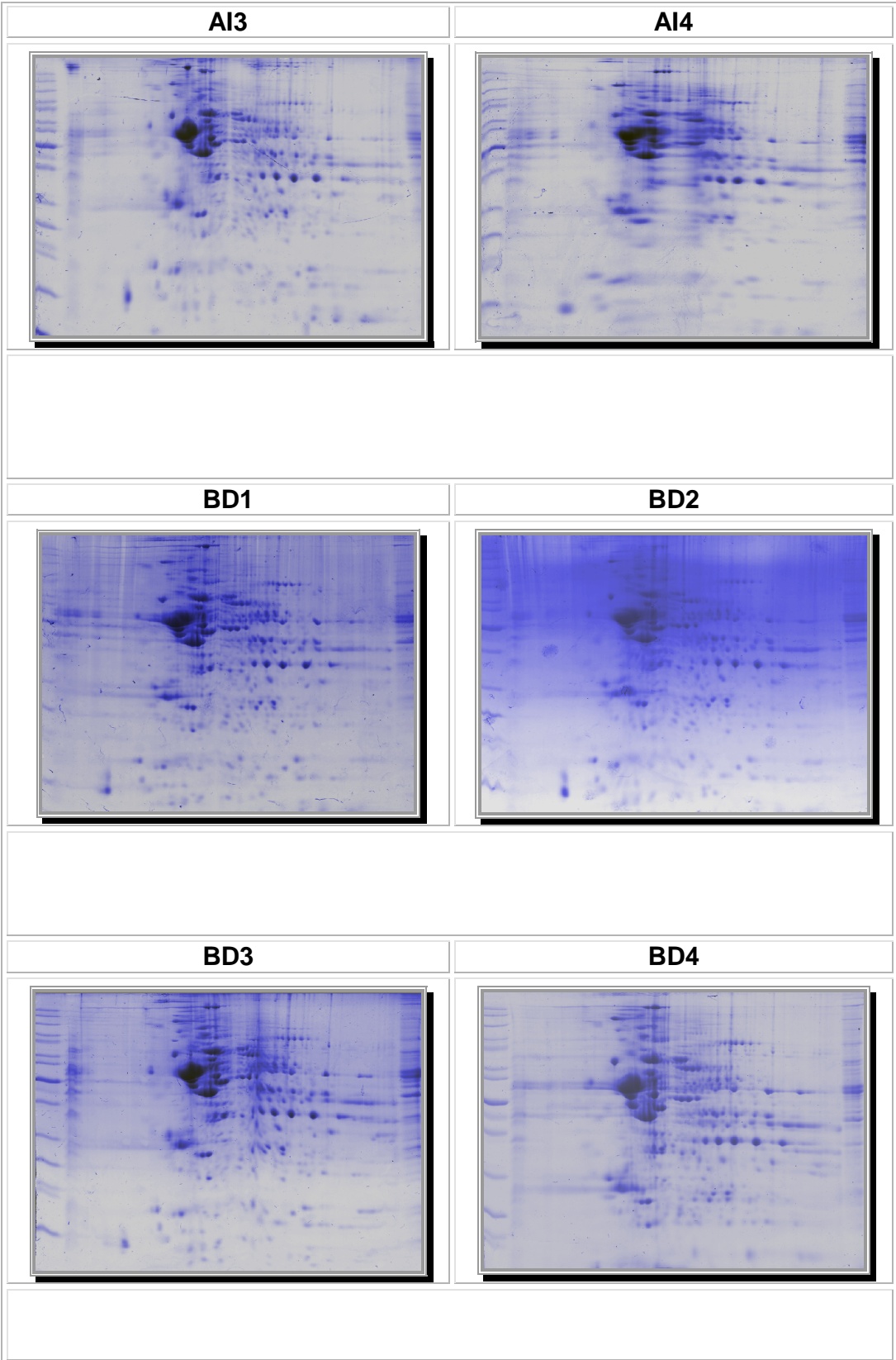
31	C4	1	4	HI	45,3	25,1	110,8
32			4	HD	55,3	22,4	81,2
33		2	3	HI	49,1	11,6	47,1
34			3	HD	53,3	23,9	89,7
35		3	2	HI	55,1	18,7	67,9
36			2	HD	54,8	22,9	83,5
37		4	1	HI	48,7	22,1	90,6
38			1	HD	45,1	19,2	85,3
39		5	1	HI	50,9	18,2	71,6
40			1	HD	47,9	14,3	59,9
41	C5	1	4	HI	51,3	17,9	69,9
42			4	HD	45,2	18,8	83,3
43		2	4	HI	47,4	17,7	74,7
44			4	HD	44,3	22,4	101,3
45		3	3	HI	50,3	14,4	57,3
46			3	HD	49,8	15,6	62,7
47		4	2	HI	60,6	20,9	69,1
48			2	HD	53,8	18,3	68,1
49		5	1	HI	48,6	14,8	60,7
50			1	HD	47,7	13,7	57,6
51	C6	1	4	HI	57,7	22,0	76,3
52			4	HD	68,1	27,1	79,6
53		2	3	HI	55,0	19,2	69,9
54			3	HD	59,8	22,6	75,8
55		3	3	HI	50,1	21,7	86,7
56			3	HD	51,0	16,1	62,9
57		4	2	HI	46,9	15,5	65,9
58			2	HD	54,0	30,5	112,8
59		5	1	HI	51,7	17,9	69,5
60			1	HD	47,4	15,1	63,8
61	C7	1	4	HI	43,2	17,7	82,1
62			4	HD	50,4	24,6	97,5
63		2	3	HI	50,4	28,8	114,2
64			3	HD	42,3	15,9	75,2
65		3	2	HI	48,2	18,7	77,5
66			2	HD	56,7	22,9	80,8
67		4	2	HI	44,5	24,8	111,5

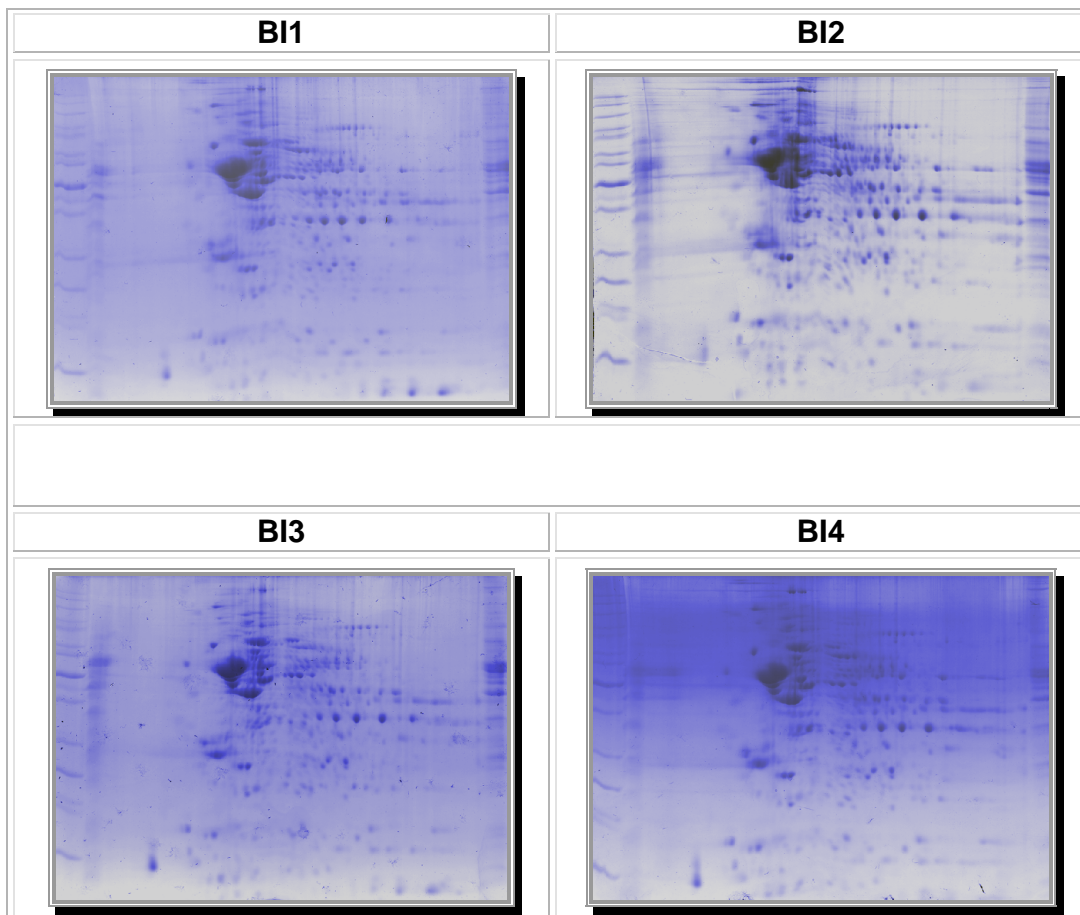
68			2	HD	52,0	20,5	78,7	
69		5	1	HI	43,2	15,5	71,6	
70			1	HD	55,9	18,2	65,2	
71	C8	1	4	HI	54,1	7,6	27,9	
72			4	HD	48,8	6,3	26,1	
73		2	3	HI	57,2	20,7	72,3	
74			3	HD	41,7	22,9	109,8	
75		3	2	HI	76,9	11,7	30,4	
76			2	HD	56,1	16,1	57,5	
77		4	1	HI	45,9	13,9	60,6	
78			1	HD	43,3	9,4	43,6	
79		5	1	HI	52,0	21,1	81,3	
80			1	HD	46,3	7,0	30,3	
							promedio	71,6
							desviación estándar	22,2

ANEXO E

Perfiles de proteínas de los pool de muestras hipocampales
Strips 7cm; pI 3-10; MW: 200-10 KDa







ANEXO F

Otras comparaciones de las variaciones en los proteomas entre las regiones hipocampales derecha e izquierda

Resumen regiones del mismo grupo					
Análisis	Cantidad	variaciones			
		vs. 1	vs. 2	vs. 3	vs. 4
Spots totales detectados en D1-I1	530	0 %	(+) 17%	(+) 8%	(-) 6%
Spots totales detectados en D2-I2	452	(-)15%	0 %	(-) 8%	(-)20%
Spots totales detectados en D3-I3	493	(-) 7%	(+) 9%	0 %	(-)13%
Spots totales detectados en D4-I4	564	(+) 6%	(+) 25%	(+)14%	0 %
Spots comunes en D1-I1	409	0 %	(+) 8%	(+) 6%	(-) 5%
Spots comunes en D2-I2	379	(-) 7%	0 %	(-) 2%	(-)12%
Spots comunes en D3-I3	386	(-) 6%	(+) 2%	0 %	(-)10%
Spots comunes en D4-I4	430	(+) 5%	(+) 13%	(+)11%	0 %
Spots en D1 y no en I1	58	0 %	(+)123%	(+) 4%	(-)31%
Spots en D2 y no en I2	26	(-) 55%	0 %	(-)54%	(-)69%
Spots en D3 y no en I3	56	(-) 3%	(+)115%	0%	(-)33%
Spots en D4 y no en I4	84	(+)45%	(+)223%	(+)50%	0%
Spots en I1 y no en D1	63	0 %	(+) 34%	(+)24%	(+)29%
Spots en I2 y no en D2	47	(-)25%	0 %	(-) 8%	(-) 4%
Spots en I3 y no en D3	51	(-)19%	(+) 9%	0 %	(+) 4%
Spots en I4 y no en D4	49	(-)22%	(+) 4%	(-) 4%	0%

Resumen regiones hipocampales de los diferentes grupos					
Análisis	Cantidad	variaciones			
		vs. 1	vs. 2	vs. 3	vs. 4
Spots detectados en D1	467	0 %	(+) 15%	(+)6%	(-) 9%
Spots detectados en D2	406	(-)13%	0 %	(-)8%	(-)21%
Spots detectados en D3	442	(-) 5%	(+) 9%	0 %	(-)14%
Spots detectados en D4	515	(+)10%	(+)27%	(+)17%	0 %
Spots detectados en I1	469	0 %	(+) 10%	(+)8%	(-) 2%
Spots detectados en I2	426	(-) 9%	0 %	(-)2%	(-)11%
Spots detectados en I3	435	(-) 7%	(+) 2%	0 %	(-) 9%
Spots detectados en I4	479	(+) 2%	(+)12%	(+)10%	0 %

Comparaciones entre regiones derechas		
Análisis	Cantidad	%
Spots detectados en D1	467	80
Spots detectados en D2	406	69
Spots detectados en D3	442	75
Spots detectados en D4	515	88
Spots totales D1-D2-D3-D4	586	100
Spots comunes D1-D2-D3-D4	330	56
Spots diferentes en las regiones	256	44
Spots solo en D1	15	2.6
Spots solo en D2	5	0.9
Spots solo en D3	11	1.9
Spots solo en D4	69	12
Spots comunes D1-D2-D3	24	4.1
Spots comunes D1-D2-D4	27	4.6
Spots comunes D1-D3-D4	39	6.7
Spots comunes D2-D3-D4	8	1.4
Spots comunes solo D1-D2	4	0.7
Spots comunes solo D1-D3	8	1.4
Spots comunes solo D1-D4	20	3.4
Spots comunes solo D2-D3	4	0.7
Spots comunes solo D2-D4	4	0.7
Spots comunes solo D3-D4	18	3.1
Spots comunes D1-D2	385	79
Spots en D1 y no en D2	82	17
Spots en D2 y no en D1	21	4
Spots totales en D1-D2	488	100
Spots comunes D1-D3	401	79
Spots en D1 y no en D3	66	13
Spots en D3 y no en D1	41	8
Spots totales D1-D3	508	100
Spots comunes D1-D4	416	73
Spots en D1 y no en D4	51	9
Spots en D4 y no en D1	99	18
Spots totales D1-D4	566	100
Reguladas en D3; en D1, no D2	47	57
Permanecen reguladas en D4	39	83

Reguladas en D4; en D1, no D2	59	72
Reguladas en D4; en D1, no D3	47	71
Expresadas en D2, permanecen en D3	12	57
Expresadas en D2, permanecen D4	12	57
Expresadas en D2 permanecen D3-D4	8	38
Expresados en D3, permanecen D4	26	63

Comparaciones entre las regiones Izquierdas		
Análisis	Cantidad	%
Spots detectados en I1	469	80
Spots detectados en I2	426	72
Spots detectados en I3	435	74
Spots detectados en I4	479	81
Spots totales I1-I2-I3-I4	589	100
Spots comunes I1-I2-I3-I4	325	55
Spots diferentes entre regiones	264	45
Spots solo en I1	27	4.6
Spots solo en I2	14	2.4
Spots solo en I3	17	2.9
Spots solo en I4	48	8.1
Spots comunes I1-I2-I3	23	3.9
Spots comunes I1-I2-I4	19	3.2
Spots comunes I1-I3-I4	29	4.9
Spots comunes I2-I3-I4	16	2.7
Spots comunes solo I1-I2	12	2
Spots comunes solo I1-I3	9	1.5
Spots comunes solo I1-I4	25	4.2
Spots comunes solo I2-I3	9	1.5
Spots comunes solo I2-I4	9	1.5
Spots comunes solo I3-I4	8	1.4
Spots comunes I1-I2	379	73
Spots en I1 y no I2	90	17
Spots en I2 y no I1	47	9
Spots totales I1-I2	516	100
Spots comunes I1-I3	386	75
Spots en I1 y no en I3	83	16
Spots en I3 y no en I1	49	9

Spots totales I1-I3	518	100
Spots comunes I1-I4	398	72
Spots en I1 y no en I4	71	13
Spots en I4 y no en I1	81	15
Spots totales I1-I4	550	100
Reguladas en I3; en I1, no I2	38	42
Permanentes reguladas en I4	29	76
Reguladas en I4; en I1, no I2	54	60
Reguladas en I4; en I1, no I3	44	53
Expresadas en I2, permanecen en I3	24	51
Expresadas en I2, permanecen en I4	25	53
Expresadas en I2, permanecen en I3-I4	16	67
Expresadas en I3, permanecen en I4	24	49

Otros cambios cuantitativos y estadísticos	
Spots con diferencias cuantitativas comunes en la región Derecha	8
Spots con diferencias cuantitativas comunes en la región Izquierda	8
Spots con cambios estadísticos comunes en la región Derecha	2
Spots con cambios estadísticos comunes en la región Izquierda	3
Spots con diferencias cuantitativas comunes entre las regiones de los diferentes grupos	3
Spots con diferencias estadísticas comunes entre las regiones de los diferentes grupos	0
Spots con diferencias cuantitativas comunes en D2 vs. D3	20
Spots con diferencias cuantitativas comunes en D2 vs. D4	17
Spots con diferencias cuantitativas comunes en D3 vs. D4	20
Spots con diferencias cuantitativas comunes en I2 vs. I3	16
Spots con diferencias cuantitativas comunes en I2 vs. I4	20
Spots con diferencias cuantitativas comunes en I3 vs. I4	16
Spots con diferencias estadísticas comunes en D2 vs. D3	8
Spots con diferencias estadísticas comunes en D2 vs. D4	5
Spots con diferencias estadísticas comunes en D3 vs. D4	9
Spots con diferencias estadísticas comunes en I2 vs. I3	3
Spots con diferencias estadísticas comunes en I2 vs I4	8
Spots con diferencias estadísticas comunes en I3 vs. I4	6