

Estudio preliminar de la expresión proteómica cerebral de la región hipocampal de ratas expuestas a diferentes niveles de estrés inducido por el nado forzado

Preliminary study of cerebral proteomics expression of hippocampal region from rats exposed to different stress levels induced by forced swimming

Nasser Guerrero^{1,2}, Rodrigo Torres Saez¹, Carlos Conde Cotes²

RESUMEN

Introducción: en general, los estímulos estresores pueden inducir respuestas adaptativas o mal adaptativas dependiendo, entre otras cosas, de su intensidad y la duración. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios que relacionen cuantitativa y cualitativamente la intensidad de estrés al que es expuesto un animal y la expresión de proteínas del hipocampo. **Objetivo:** evaluar la expresión diferencial de proteínas hipocampales en ratas Wistar-UIS, expuestas a diferentes niveles de estrés inducido por el nado forzado. **Materiales y métodos:** se utilizaron 30 ratas Wistar-UIS machos distribuidas aleatoriamente en 3 grupos según el tiempo de exposición al nado forzado como estímulo estresor (0, 5 y 15 minutos). Después de 24 horas se extrajeron los hipocampos dorsales y se realizó electroforesis bidimensional de las proteínas extraídas. A continuación, se llevó a cabo el procesamiento de las imágenes de los geles obtenidos utilizando el software PDQUEST 2D. Aquellas proteínas en las se detectaron intensidades asociadas a los tiempos de exposición al estímulo, se identificaron de manera presuntiva utilizando la base de datos bioinformática Export Protein Analysis System (EXPASY). **Resultados:** de acuerdo con el análisis proteómico y bioinformático se identificaron 60 proteínas, de las cuales, 38 eran comunes al hipocampo derecho e izquierdo; 13 del hipocampo derecho y 9 del izquierdo. **Conclusión:** se encontraron diferencias en la expresión de proteínas entre el hipocampo derecho e izquierdo del tipo dosis dependientes decrecientes después de haber sometido a los animales a diferentes niveles de estrés inducido por la prueba de nado forzado. *Salud UIS* 2012; 44 (1): 17-27

Palabras clave: Estrés, hipocampo, proteómica, nado forzado

1. Escuela de Química, Facultad de Ciencias.

2. Departamento de Ciencias Básicas. Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander.

Correspondencia: Nasser Guerrero Bermúdez (Biólogo, Magister en Ciencias Básicas Biomédicas), Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, Universidad Industrial de Santander, Campus Universitario Cra 27 calle 9. Pbx: (57) (7) 634400, Ext 1529 Bucaramanga, Colombia; Email: nguerrer@uis.edu.co, nguerrer04@hotmail.com

Recibido: 23 de Febrero de 2012 **Aprobado:** 2 de Abril de 2012

ABSTRACT

Introduction: in general stressful stimuli can induce adaptive maladaptive responses, depending among other things, of their intensity and duration. However, no studies were found in the literature that link quantitatively and qualitatively the intensity of stress to which an animal is exposed, and hippocampal protein expression. **Objective:** to evaluate the differential hippocampal protein expression in Wistar-UIS rats, exposed to dissimilar levels of stress induced by forced swimming. **Materials and methods:** we used 30 rats randomly assigned to 3 groups according to duration of exposure to forced swimming as stressor stimulus (0, 5 and 15 minutes). 24 hours after the dorsal hippocampi were removed and two-dimensional electrophoresis was performed to the extracted proteins. Then, image processing of the gels obtained was performed using the PDQuest 2D software. Those proteins in which intensities were detected associated with the stimulus-exposure times were presumptively identified using Export Protein Analysis System (EXPASY) a bioinformatics database. **Results:** according to the bioinformatic and proteomic analyses we identified 60 proteins, 38 of which were common to both left and right hippocampi, 13 were found only in the right hippocampi and 9 in the left. **Conclusion:** dose-dependent decreasing rate differences in protein expression between the left and right hippocampus were found after animals were subjected to different levels of stress induced by forced swimming test. *Salud UIS* 2012; 44 (1): 17-27

Keywords: Stress, hippocampus, proteomic, forced swimming

INTRODUCCIÓN

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

Hans Selye, considerado el padre del concepto de estrés, lo definió como el síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas no específicas del organismo a diferentes agentes nocivos del ambiente, de naturaleza física o química, provocando un aumento de la tasa metabólica¹. En ese sentido, todos los seres vivos en su vida cotidiana están expuestos a diferentes niveles de estrés. Sin embargo, existen niveles de estrés que inducen respuestas adaptativas, biológicas y comportamentales que son favorables para el individuo y la especie, mientras que niveles altos y/o sostenidos de estrés inducen respuestas mal adaptativas. En esta línea de pensamiento hoy se acepta que muchas de las patologías humanas se asocian a altos niveles de estrés, dentro de las cuales se pueden mencionar depresión, ataques de pánico, fobias, trastornos obsesivo-compulsivos, estrés postraumático, trastornos de memoria, atención, etc¹.

Las neurociencias han asociado al estrés con muchas estructuras del sistema nervioso central, entre ellas el hipocampo y la amígdala, estructuras particularmente susceptibles a los efectos del estrés no controlado, provocando cambios a través de la plasticidad neuronal

principalmente en el hipocampo, estructura que juega un papel crucial en el aprendizaje, la memoria y las emociones². Por otro lado, la proteómica aplicada a la identificación y cuantificación de proteínas cerebrales, está siendo utilizada ampliamente en las neurociencias con el fin de buscar marcadores diagnósticos y nuevos sitios de acción de medicamentos^{3,4,5}. En este sentido, se recurre con frecuencia al uso de modelos animales que ilustren mecanismos psicopatológicos para estudiar el comportamiento de los seres humanos, siendo las ratas uno de los modelos más empleados para estos estudios^{1,6,7}. En modelos animales, el estrés severo crónico produce atrofia del hipocampo y la corteza prefrontal, e hipertrofia de la amígdala lateral¹. Estas alteraciones morfológicas se acompañan de deterioro en la memoria, el aprendizaje y el procesamiento emocional de los estímulos sensoriales y pueden constituirse en modelos de depresión inducidos por la persistencia del estrés.

Dentro de los modelos para el estudio de estrés y depresión se destaca la prueba de nado forzado, descrita por primera vez por Porsolt⁸. Es actualmente una de las pruebas más utilizadas para evaluar distintos tipos de tratamiento antidepressivos en modelos animales. Algunos de los argumentos a su favor como modelo de depresión se fundamentan en el hecho de que incluye la exposición a un estímulo estresor “inescapable” que induce comportamientos homologables con algunas manifestaciones depresivas en el humano (comportamientos del tipo “desesperanza aprendida”)⁹ y por una razonable sensibilidad a los efectos de algunos fármacos antidepressivos.

Aunque se han encontrado estudios de análisis proteómico dirigido al hipocampo, que demostraron la asimetría lateral empleando un enfoque combinado de electroforesis bidimensional 2-D PAGE y espectrometría de masas¹⁰, no se ha usado la prueba del nado forzado, como modelo de depresión para determinar la relación entre magnitud del estrés y expresión proteómica en la estructura cerebral involucrada. Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión diferencial de proteínas hipocampales en ratas Wistar-UIS, expuestas a diferentes niveles de estrés inducido por el nado forzado.

METODOLOGÍA

Material biológico

Se emplearon 30 ratas Wistar-UIS machos con un peso entre 180 y 200 gramos al comienzo de las observaciones (2 meses de edad aproximadamente), provenientes del bioterio de la facultad de salud de la Universidad Industrial de Santander; mantenidas bajo temperatura

controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad de $65\% \pm 5$, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas siendo encendida la luz a las 7 de la mañana, y con libre acceso de comida y agua. Las ratas fueron distribuidas al azar de acuerdo con el tratamiento (tiempo de exposición a la prueba de nado forzado) y colocadas en cajas viveros (50cm x 30cm x 15cm). Se conformaron 3 grupos experimentales con 10 animales cada uno (Grupo 1: 5 minutos de exposición; Grupo 2: 15 minutos de exposición y Grupo 3: Sin exposición al nado forzado) donde cada animal fue expuesto durante un tiempo correspondiente según la asignación aleatoria que le correspondió (**Tabla 1**).

Prueba de nado forzado

El tanque utilizado para la prueba de nado forzado, consistió en un cilindro de acrílico de 45 cm de altura; con un diámetro de 30 cm conteniendo agua a una temperatura de 21°C hasta un nivel de 32 cm para que el animal no alcance a tocar con la cola el fondo del tanque. En la base del cilindro se encuentra una válvula por donde se realiza la evacuación del agua una vez haya concluido la exposición de cada animal (**Figura 1**).

Tabla 1. Grupos establecidos para el análisis experimental.

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

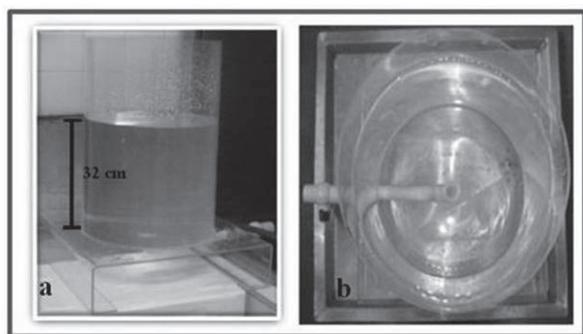


Figura 1. Tanque del nado forzado. a) Vista frontal del tanque con las condiciones de laboratorio, b) Vista superior

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

Procedimientos

Todos los animales fueron trasladados del bioterio de reproducción al bioterio de experimentación con 72 horas de anticipación al experimento. Las condiciones ambientales de ambas dependencias son semejantes. Los animales fueron manipulados por el experimentador una vez al día durante 1 minuto como forma de adaptación previa a las pruebas de nado forzado. Veinticuatro (24) horas después de finalizada la exposición a la prueba de nado forzado, los animales fueron sacrificados por decapitación. 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% (p/v)). Una vez lavado el cerebro se extrajo la el hipocampo teniendo en cuenta la subdivisión de los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo (**Figura 2**). El tejido húmedo fue pesado, rotulado y se mantuvo en nitrógeno líquido hasta su posterior uso en las pruebas de análisis proteómico.

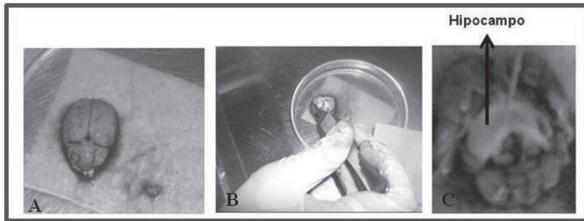


Figura 2. Obtención de la muestra A) Cerebro de la rata, B) y C) Extracción del hipocampo dorsal

La solubilización de las proteínas se realizó suspendiendo el tejido cerebral en un buffer de lisis (Tris base (40 mM), Solución CHAPS4% (p/v), con suplementos de Urea (7M), tiourea (2M) y PMSF (1mM) como inhibidor de proteasas. Las muestras fueron homogenizadas mediante agitación en vortex (1200 rpm) durante aproximadamente 4 horas. Posteriormente a su homogenización, las muestras se centrifugaron en un equipo IEC CL31R Multispeed (Marca: ThermoScientific): a 13000 rpm, 4°C, durante 20 min. La concentración de proteínas solubles se determinó por la metodología de Bradford¹¹.

Una vez obtenidos los extractos de proteínas totales solubles, éstas fueron separadas mediante electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE). En el proceso se utilizaron tiras de rehidratación (ReadyStrip IPG strips, Bio-rad) de 7 cm de longitud con rango de pH 3-10 y se rehidrataron mediante el método de rehidratación pasiva (sin voltaje) durante 12 a 16 horas. Una vez que las proteínas fueron separadas en función de sus propiedades de carga (pI)(50 μ A (microamperios)), se separaron en función de su tamaño o peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida (12% p/v) de 12 cm. Para visualizar las proteínas en el gel éstos fueron teñidos utilizando azul de Coomassie coloidal.

Una vez teñidas las proteínas en los geles de SDS-PAGE, éstas fueron escaneadas con un densitómetro (UMAX PowerLook 2100XL) para adquirir las imágenes de los geles teñidos. Este dispositivo digitaliza las imágenes utilizando 800 x 1600 puntos por pulgada (dpi), lo cual ofrece alta resolución y permite capturar finos detalles cuando se escanean transparencias. Las diferencias de intensidad y cantidad de manchas (spots) se analizaron con ayuda del software PDQUEST 2D (Bio-rad versión 8.0.1). Por último, aquellas proteínas expresadas, bajo los diferentes tiempos de exposición de la prueba de nado forzado, que presentaron diferencias significativas en sus intensidades, fueron identificadas con la ayuda de la base de datos bioinformática EXPASY, utilizando la

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

Para la identificación y posterior análisis de las proteínas fueron realizados 60 geles, de los cuales 30 correspondieron al hipocampo derecho y 30 al izquierdo.

El software PDQUEST 2D, Bio-rad versión 8.0.1 cuantifica la densidad de las manchas proteicas, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas.

Finalmente el programa emite una imagen maestra “master” que reúne todas las manchas, con una distribución gaussiana, identificadas en los geles que conforman cada grupo.

Después de realizar un examen cuidadoso y haciendo una depuración de las manchas, fueron seleccionadas solamente aquellas cuyos intervalos de confianza (95%) de las intensidades no se superpusieran asumiéndolas como probablemente diferentes. Se verificó para cada uno de los grupos (5 y 15 minutos de exposición) con respecto al grupo control, y entre los grupos estudiados, las variaciones de la expresión de las manchas de proteínas analizadas.

De manera presuntiva, y como una manera de encontrar la posible identidad de aquellas manchas que presentaron diferencias en sus niveles de expresión, se realizó una comparación entre los valores de masa molecular (PM) y punto isoelectrico (pI) de las proteínas identificadas en el estudio (muestras experimentales) con respecto a los pesos moleculares y puntos isoelectricos de aquellas proteínas encontradas en la base de datos bioinformática EXPASY, correspondiente a los valores teóricos. Se asignaron las identidades a aquellas proteínas que presentaron diferencias en sus valores de PM iguales o menores a ± 2.0 KDa, y diferencias en los valores de pI iguales o menores de ± 0.2 unidades con respecto a los valores de PM y pI de las bases de datos. El criterio de identificación se determinó teniendo en cuenta las variaciones que se han reportado en las proteínas identificadas, separadas por 2D-PAGE, que se encuentran reportadas en la base de datos (SWISS 2D-PAGE). Estas aplicaciones están disponibles en el sistema experto de análisis de proteínas (EXPASY). Como criterio de búsqueda para hipocampo, fueron utilizados los términos: cerebro de rata, hipocampo, Wistar (ratbrain, hippocampus, Wistar).

RESULTADOS

De acuerdo con el análisis de todos los geles que conformaron el experimento se obtuvieron inicialmente los datos de la cantidad de manchas detectadas en el hipocampo derecho e izquierdo. En el hipocampo de las

ratas estudiadas se obtuvo lo siguiente: En el hemisferio derecho se detectaron 331 manchas en el grupo control (sin exposición al nado T0), 268 en el tratamiento de 5 minutos de exposición a la prueba de nado forzado (T5) y 145 en el tratamiento de 15 min de exposición (T15) (**Figura 3**).

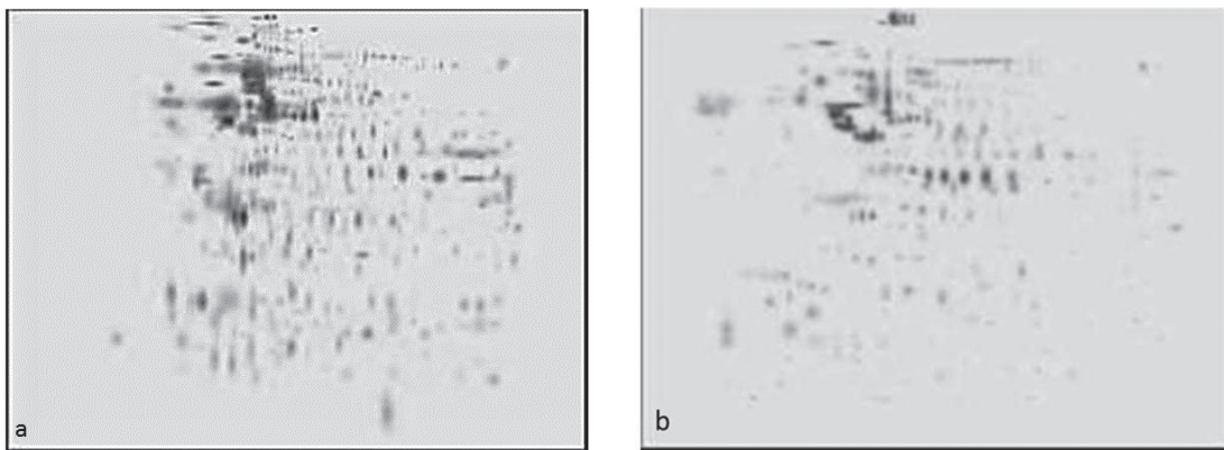


Figura 3. Geles masters (a) Hipocampo derecho (HD) y (b) Hipocampo izquierdo (HI). Nótese la expresión diferencial de manchas mucho mayor en el HD con respecto al HI. Cada una de las imágenes se obtuvo al analizar 10 geles de cada tratamiento

De igual forma, en el hemisferio izquierdo del hipocampo se detectaron 149 manchas en el grupo control (sin exposición al nado T0), 178 en el tratamiento de 5 minutos de exposición a la prueba (T5) y 99 en el tratamiento de 15 min (T15) (**Tabla 2 y figura 3**).

Teniendo en cuenta los criterios enunciados anteriormente y de acuerdo con el análisis proteómico y comparándolo con la base de datos EXPASY, se encontraron 60 proteínas que presentaron diferencias en sus niveles de expresión en los grupos analizados, de las cuales 38 son comunes al hipocampo derecho e izquierdo (HD/HI); 13 se encontraron solo en el hipocampo derecho (HD) y 9 en el hipocampo izquierdo (HI), (**Figura 4**).

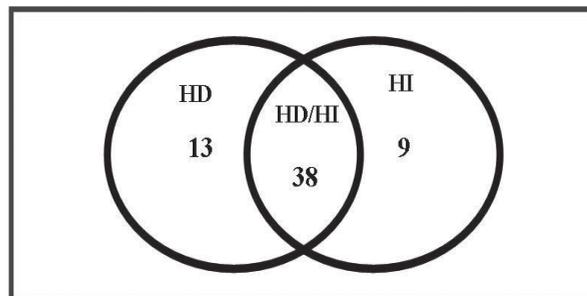


Figura 4. Proteínas detectadas según la base de datos EXPASY. La figura muestra la cantidad de proteínas expresadas en el hipocampo derecho (HD), en el hipocampo izquierdo (HI) y en ambas estructuras cerebrales (HD/HI)

Tabla 2. Cantidad de manchas detectadas inicialmente en el programa PDQuests a partir de las muestras del hipocampo derecho e izquierdo en ratas wistar UIS sometidas al nado forzado.

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

Las 60 proteínas detectadas por técnicas bioinformáticas se encuentran en las **Tablas 3, 4 y 5**. Estas son proteínas que participan en la estructura del citoesqueleto, en las vías de señalización celular, enzimas relacionadas

con el metabolismo, transporte y el tráfico endocítico, neuroplasticidad, procesamiento, plegamiento y degradación de proteínas, proceso de transcripción y proteínas receptoras.

Tabla 3. Proteínas expresadas en el hipocampo derecho e izquierdo, con sus códigos y comparando las masas y puntos isoeléctricos experimentales con los teóricos.

Origen	Código Interno	Protein ID from SwissProt	Nombre de la proteína	Masa Exp	PI Exp	Masa Teórica	PI Teórico
HD/HI	O08557	DDAH1_RAT	N(G),N(G)-dimethylargininedimet hylaminohydro...	32,01	5,94	31,42	5,75
HD/HI	O08697	ARL2_RAT	ADP-ribosylation factor-like protein 2	20,88	5,58	20,83	5,65
HD/HI	O35244	PRDX6_RAT	Peroxiredoxin-6	24,1	5,6	24,81	5,64
HD/HI	O35264	PA1B2_RAT	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB...	26,75	5,65	25,58	5,57
HD/HI	O35353	GBB4_RAT	Guanine nucleotide-binding protein subunit be...	38,8	5,6	37,36	5,74
HD/HI	P04182	OAT_RAT	Ornithineaminotransferase, mitochondrial	49,3	6,4	48,33	6,53
HD/HI	P04639	APOA1_RAT	Apolipoprotein A-I	29,48	5,66	30,06	5,52
HD/HI	P51907	EAA3_RAT	Excitatory amino acidtransporter 3	55,99	5,99	56,77	5,95
HD/HI	P52555	ERP29_RAT	Endoplasmicreticulumresidentprotein 29	28,89	6,13	28,57	6,23
HD/HI	P54311	GBB1_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/...	36	5,6	37,37	5,6
HD/HI	P63039	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	59,7	5,9	60,95	5,91
HD/HI	P84076	HPCA_RAT	Neuron-specific calcium-binding protein hippo...	20,84	4,81	22,42	4,87
HD/HI	Q04940	NEUG_RAT	Neurogranin	76,5	6,73	74,96	6,53
HD/HI	Q0PGW2	LCHN_RAT	Protein LCHN	5,02	5,4	51,36	5,18
HD/HI	Q566Q8	CK068_RAT	UPF0696 protein C11orf68 homolog	27,7	5,2	27,49	5,28
HD/HI	Q63279	K1C19_RAT	Keratin, type I cytoskeletal 19	44,8	5,1	44,63	5,21
HD/HI	Q68VK5	TSN5_RAT	Tetraspanin-5	29,1	4,67	30,33	4,59
HD/HI	Q6Q0N1	CNDP2_RAT	Cytosolic non-specificdipeptidase	52,3	5,3	52,69	5,43
HD/HI	Q8K4V4	SNX27_RAT	Sorting nexin-27	59,7	5,8	61,01	5,95
HD/HI	Q8VD52	PLPP_RAT	Pyridoxalphosphatephosphatase	31,2	5,4	33,11	5,45
HD/HI	Q9JJM9	SEPT5_RAT	Septin-5	42,78	6,32	42,85	6,34
HD/HI	Q9Z214	HOME1_RAT	Homerproteinhomolog 1	41,3	5,2	41,3	5,39
HD/HI	P35370	OPRX_RAT	Nociceptin receptor	41,12	8,44	40,52	8,5
HD/HI	O08661	O08661_RAT	Ryanodine receptor type II	62,4	5,1	62,52	5,17
HD/HI	P59824	IRPL1_RAT	Interleukin-1 receptor accessory protein-like...	77,9	5,8	79,77	5,94
HD/HI	P62994	GRB2_RAT	Growth factor receptor-bound protein 2	24,19	5,76	25,2	5,89

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

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

Origen	Código Interno	Protein ID from SwissProt	Nombre de la proteína	Masa Exp	PI Exp	Masa Teórica	PI Teórico
HD	A8WCF8	TPRGL_RAT	Tumor protein p63-regulated gene 1-like prote...	29,97	6,73	29,84	6,91
HD	P11884	ALDH2_RAT	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	54,48	6,63	56,48	6,63
HD	P22199	MCR_RAT	Mineralocorticoid receptor	10,69	5,5	10,67	5,49
HD	P31044	PEBP1_RAT	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	19,98	5,31	20,8	5,47
HD	P45592	COF1_RAT	Cofilin-1	19,1	8,34	18,53	8,22
HD	P61983	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma	29	5	28,3	4,8
HD	Q99JA8	NGB_RAT	Neuroglobin	15,26	5,35	16,98	5,39
HD	Q9QWR2	Q9QWR2_RAT	Calcium-binding protein P23K beta	17,2	4,8	16,85	4,7
HD	P97829	CD47_RAT	Leukocyte surface antigen CD47	34,5	9,17	32,99	8,91
HD	P07483	FABPH_RAT	Fatty acid-binding protein, heart	15,78	5,97	14,53	5,90
HD	P26772	CH10_RAT	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	10,82	8,80	10,90	8,89
HD	Q7TSC7	Q7TSC7_RAT	Jacob	24,97	8,94	25,87	8,99
HD	P62775	MTPN_RAT	Myotrophin	14,85	5,31	12,86	5,27
HD	P21707	SYT1_RAT	Synaptotagmin-1	46,36	8,47	47,39	8,57

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

Origen	Código Interno	Protein ID from SwissProt	Nombre de la proteína	Masa Exp	PI Exp	Masa Teórica	PI Teórico
HI	O88209	O88209_RAT	PKH alpha	57,53	7,08	56,28	7,02
HI	P31977	EZRI_RAT	Ezrin	68,35	5,99	69,39	5,83
HI	P55094	NR2C2_RAT	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	63,46	5,88	65,34	6,06
HI	P60571	PANX2_RAT	Pannexin-2	75,13	7,3	74,43	7,27
HI	P70615	LMNB1_RAT	Lamin-B1	66,44	5,36	66,6	5,16
HI	O08697	ARL2_RAT	ADP-ribosylation factor-like protein 2	21,62	5,68	20,83	5,67
HI	O35244	PRDX6_RAT	Peroxiredoxin-6	24,15	5,63	24,81	5,64
HI	Q80WE1	FMR1_RAT	Fragile X mental retardationprotein 1 homolo...	64,89	6,69	66,78	6,77
HI	P68255	1433T_RAT	14-3-3 protein theta	25.86	4.83	27.77	4.69
HI	Q62845	CNTN4_RAT	Contactin-4	76.31	6.19	77.05	6.05

Del total de las proteínas expresadas en el análisis proteómico, se destacaron las asociadas con la plasticidad neuronal. La **Figura 5** representa algunos ejemplos de esas proteínas ilustrando la relación entre la intensidad del estímulo estresor y su nivel de expresión.

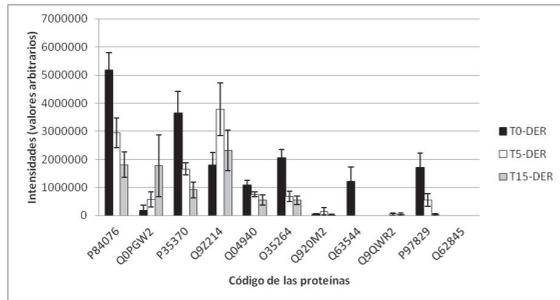


Figura 5. Relación de la expresión de proteínas que intervienen en la plasticidad neuronal con la intensidad del estímulo estresor. Códigos: P84076: Proteína hipocalcina neuronal específica de unión a calcio; Q0PGW2: *Proteína LCHN*; P35370: *Receptor de nociceptina*; Q9Z214: *Proteína homóloga 1 Homer*; Q04940: Neurogranina; O35264: *Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa IB...*; Q920M2: Proteína 39 de señalización RING; Q63544: *Gamma-sinucleína*; Q9QWR2: *Proteína de unión a calcio beta P23K*; P97829: Antígeno de superficie de los leucocitos CD47; Q62845: *Contactina-4*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, además de la lateralización del hipocampo con respecto al número de manchas detectadas inicialmente por el programa, se observó una asimetría en el hipocampo derecho con relación a las proteínas asociadas con la neuroplasticidad, presentándose un 23% de expresión de proteínas en el hipocampo derecho con relación a un 11,11% en el hipocampo izquierdo como se muestra en la comparación de la **Figura 6 y 7**.

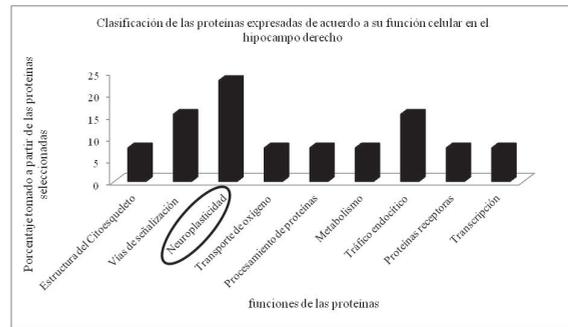


Figura 6. Gráfico de barra que relaciona la cantidad de proteínas expresadas con su función celular, según el análisis proteómico en el hipocampo derecho. El porcentaje citado fue calculado a partir del total de proteínas seleccionadas de acuerdo al criterio enunciado anteriormente (citado en el ítem 3.3.1)

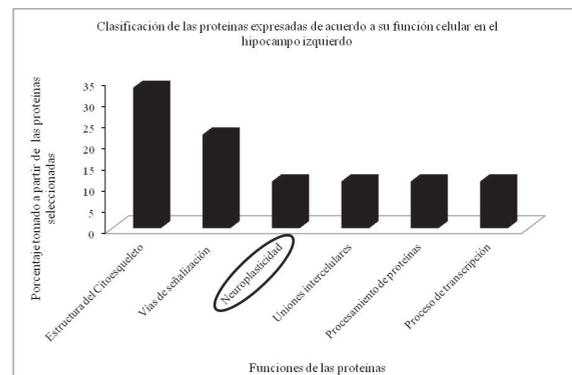


Figura 7. Gráfico de barra que relaciona la cantidad de proteínas expresadas con su función celular, según el análisis proteómico en el hipocampo izquierdo. El porcentaje citado fue calculado a partir del total de proteínas seleccionadas de acuerdo al criterio enunciado anteriormente (citado en el ítem 3.3.1)

DISCUSIÓN

Del total de las proteínas obtenidas en el análisis proteómico, aproximadamente el 20% intervienen en la neuroplasticidad cerebral entre las cuales podemos mencionar a manera de ejemplos: la proteína *hipocalcina neuronal específica de unión a calcio*, la cual juega un papel fundamental en la depresión a largo plazo (tipo de plasticidad neuronal en el que hay una reducción de la eficacia de la sinapsis neuronal). La *proteína LCHN*, interviene en la neuritogénesis, así como en la recuperación neuronal y/o reestructuración de la isquemia transitoria cerebral tras el hipocampo. El *receptor de nociceptina*, que es un ligando natural acoplado a la proteína G, anteriormente llamado receptor de opioide¹², y juega un papel fundamental en la neuroplasticidad del hipocampo, en el aprendizaje y la memoria. El *Antígeno de superficie de los leucocitos CD47*, el cual participa en la formación de la memoria y la plasticidad sináptica. La *Contactina-4*, interviene en la sinaptogénesis. La *Proteína homóloga 1*, juega un papel importante en los cambios estructurales que se producen en las sinapsis durante el desarrollo y plasticidad neuronal de larga duración. La *Neurogranina*, que juega un papel en la plasticidad sináptica y aprendizaje espacial. El *Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa IB*, es una proteína importante durante el desarrollo del cerebro y las neuronas del hipocampo. La *Proteína 39 de señalización RING*, participa en la potenciación a largo plazo: transmisión de señales entre dos neuronas en forma duradera. La *Gamma-sinucleína*, a pesar de que originalmente caracterizaron a esta proteína en el núcleo y citoplasma, micrografías electrónicas evidenciaron que en la región CA3 del hipocampo de la rata esta proteína se encuentra restringida al citoplasma de las terminaciones presinápticas¹³, donde desempeña un papel en la integridad de la red de neurofilamentos e interviene en la modulación de la arquitectura axonal durante el desarrollo y en el adulto y la *Proteína de unión a calcio beta P23K*, interviene en la proliferación axonal y plasticidad sináptica.

Con respecto a la relación expresión proteica vs intensidad del estímulo de las proteínas asociadas con la neuroplasticidad, se observó que la proteína *hipocalcina neuronal específica de unión a calcio*, el *receptor de nociceptina*, la *gamma-sinucleína* y el *antígeno de superficie de los leucocitos CD47*, disminuyeron a medida que aumentó la intensidad del estímulo (dosis-efecto decreciente), siendo esta la tendencia de la mayor parte de las proteínas expresadas según el análisis proteómico general. En el caso específico de la proteína *receptora de nociceptina*, algunos estudios indican que

juega un papel fundamental en la neuroplasticidad, así como en el aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo. Además, se ha demostrado que inhibe la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP)¹², modula una serie de funciones cerebrales, incluyendo las emociones y los comportamientos instintivos. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos indicarían que al aumentar el tiempo de exposición al estímulo de nado forzado, las ratas no sólo disminuyen su expresión de proteínas en el hipocampo, sino que también se afecta la capacidad de aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo, tal como se observó.

Lo anterior demuestra que la exposición a la prueba del nado forzado origina cambios neurobiológicos asociados al estímulo estresor, y que dichos cambios son más marcados a medida que se aumenta la intensidad del estresor. Estudios llevados a cabo *in vivo e in vitro* indican que la magnitud del estrés (en duración e intensidad) deteriora la memoria en el hipocampo, lo cual interferiría con la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) hipocámpica (o procesos relacionados)¹⁴. En el equivalente experimental de la indefensión aprendida (donde las ratas no pueden realizar ninguna respuesta adaptativa para escapar del estímulo estresor), se produce un deterioro de la memoria y el aprendizaje¹⁴. Por esta razón, el efecto del estrés pareciera afectar el rango fisiológico de la plasticidad sináptica de manera que se favorecería el desarrollo de la depresión sobre la potenciación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio se detectó la expresión de proteínas asociadas con la neuroplasticidad, con un claro efecto dosis-dependiente decreciente, indicando que la intensidad del estímulo estresor a que fue sometido el animal durante la prueba de nado forzado, probablemente podría afectar la memoria y el aprendizaje.

La liberación de neurotransmisores y algunas otras funciones cerebrales, modulan a corto y largo plazo la eficacia sináptica y éstos son regulados por los iones de calcio, el cual, a su vez es regulado por las proteínas de unión a calcio¹⁵. En el presente estudio se expresaron dos proteínas que están relacionadas con la unión a calcio y que juegan un papel fundamental en la plasticidad neuronal, entre ellas están la proteína *hipocalcina neuronal específica de unión a calcio* y la *Proteína de unión a calcio beta P23K*. En la primera se observó una expresión de dosis efecto decreciente mientras que la segunda, no se detectó en el grupo control, pero sí una baja expresión en los otros grupos (T5 y T15), como se muestra en la figura 5.

Estudios previos indican que el calcio juega un papel principal en la mediación de distintos eventos intracelulares, que incluyen la plasticidad neuronal, la supervivencia y la muerte celular^{16,17}. La falta de movilización de calcio citosólico sería responsable de cambios en la excitabilidad sináptica, cambios que probablemente conforman la “memoria de aprendizaje”¹⁶. De acuerdo con la expresión decreciente de estas proteínas ocasionadas por la intensidad del estímulo estresor, se provocarían cambios neurobiológicos que podrían influir sobre la memoria y el aprendizaje.

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

CONCLUSIONES

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

Se encontró una lateralidad funcional importante entre el hipocampo derecho e izquierdo con relación a la expresión de las proteínas asociadas a la neuroplasticidad.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología y al Laboratorio de Neurociencias y Comportamiento de la Universidad Industrial de Santander. Se agradece también el apoyo financiero de Colciencias a través del Proyecto N° 201124300099092.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores manifestamos no tener conflictos de interés.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

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

REFERENCIAS

1. Botelho de Oliveira S, Conde C. Modelos animales de estrés post-traumático. *Salud UIS* 2003; 35: 97-107.
2. Badowska-Szalewska E, Spodnik E, Klejbor I, Moryś J. Effects of chronic forced swim stress on hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor (TrkB) immunoreactive cells in juvenile and aged rats. *Acta Neurobiol Exp* 2010; 70: 370–81.
3. Colantonio D, Chan D. The clinical application of proteomics. *Clinica chimica acta* 2005; 357: 151-58
4. LaBaer, J. So, you want to look for biomarkers. *Journal of proteome research* 2005; 4: 1053-59.
5. Morrison R, Kinoshita Y, Johnson M, McBee J, Conrads T y Veenstra T. Proteomic analysis in the neurociencia. *Molecular & celular proteomic* 2002; 1: 553-60.
6. Gómez C y Saldivar A. Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental* 2002; 25: 14-24.
7. Mustaca E, Kamenetzky G. Alcoholismo y ansiedad: modelos animales. *International journal of psychology and psychological therapy* 2006; 6: 343-64
8. Porsolt R, Bertin A, Jalfre M. “Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants”. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 1977; 229 (2): 327–36.
9. Seligman E. Hipótesis de la desesperanza aprendida: fall in helplessness. *Psychology today* 1973; Vol. 7: 43-8.
10. Samara A, Vougas K, Papadopoulou A,

- Anastasiadou E, Baloyanni N, Paronis E, et al. Proteomics reveal rat hippocampal lateral asymmetry. *Hippocampus* 2011; 21:108-19.
11. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal biochem* 1976; 72: 248-354.
 12. Kuzmin A, Madjid N, Johansson B, Terenius L, Ogren S. The nociceptin system and hippocampal cognition in mice a pharmacological and genetic analysis. *Brain research* 2009; 1305 suppl: S7-19.
 13. Buchman V, Hunter H, Piñon L. Persyn. A member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system. *The journal of neuroscience*, 1998; 18(22):9335-41.
 14. Kim J y Diamond D. "The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories". *Neuroscience* 2002; 3: 453-62.
 15. Fountoulakis M, Tsangaris G, Maris A, Lubec G. The rat brain hippocampus proteome. *Journal of chromatography b*. 2005 ; 819 : 115-29.
 16. Rasmussen H. The calcium messenger system. *N engl J Med* 1986; 314: 1094-01.
 17. Bebhuck J, Arfken C, Dolan-Manji S, Murphy J, Hasanat K, Manji HK. A preliminary investigation of a protein kinase C inhibitor in the treatment of acute mania. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57: 95-7.