



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS**

***EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO POR RESTRICCIÓN DE
MOVIMIENTO SOBRE EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE
FMRP Y SU ASOCIACIÓN A LAS VÍAS PI3K-AKT-mTORc1 Y
MAPK ERK1/2 EN HIPOCAMPO DE RATA***

Memoria para optar al título de Bioquímico

Felipe Ignacio Aguayo Abarca

Dra. Jenny Lucy Fiedler Temer
Directora de Tesis
Profesor patrocinante

Dra. Paulina Soledad Rojas Domínguez
Directora de tesis

Lugar de realización
Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Chile
Santiago-CHILE
Noviembre 2014

Esta memoria de título fue financiada por el proyecto FONDECYT 1120528 y ha dado origen a las siguientes comunicaciones:

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS CIENTÍFICOS NACIONALES

Aguayo, F., Rojas, P., Márquez, R., Pacheco, A., García Perez, A., García-Rojo, G., Muñoz Llanos, M., Fiedler, J.

Acute stress controls FMRP levels and its activity through AKT-mTOR and MAPK ERK1/2 pathways in rat hippocampus. XXXVII Annual Meeting Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. September 30 – October 04, 2014.

García-Pérez, M., Muñoz-Llanos, M., Vidal, E., Moyano, T., Gutiérrez, R., Pacheco, A., **Aguayo, F.**, Fiedler, J.

Acute stress produce changes in specific microRNAs levels that targets genes coding for key proteins involved in neuroplasticity. XXXVII Annual Meeting Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. September 30 – October 04, 2014.

Pacheco, A., Muñoz-LLanos, M., García-Rojo, G., **Aguayo, F.**, García-Pérez, M., Márquez, R., Werner, M., Cidłowski, J., Fiedler, J.

Acute administration of corticosterone to adrenalectomized rats changes miRNAs levels in the hippocampus: relationship with AMPA and NMDA receptors expression. XXXVII Annual Meeting Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. September 30 – October 04, 2014.

Aguayo F., Rojas P., Pacheco A., García G., Muñoz M., Márquez R., Fiedler J.

Effect of acute stress on FMRP phosphorylation by Akt-mTOR and MAPK pathways in rat hippocampus. XII PABMB Congress. Hotel Patagónico – Puerto Varas, Chile, November 9 - 14, 2013.

Pacheco, A., Andrés, S., Muñoz, M., Pizarro, J., **Aguayo, F.**, Peralta, F., Aliaga, E., Fiedler, J.

Emotional stress increases cFOS and Arc early gene products: correlation with mRNAs and protein levels of Matrix Metalloproteinase (MMP) 9 in Rat hippocampus. XII PABMB Congress. Hotel Patagónico – Puerto Varas, Chile, November 9 - 14, 2013.

PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

Fiedler J.L., Muñoz M., García-Rojo G., Pacheco A., **Aguayo F.**, Rojas P.

Differential response of dorsal and ventral rat hippocampus to restraint stress: effect on mRNA levels of proteins related to neuroplasticity. 9th FENS Forum of Neuroscience. Federation of European Neuroscience Societies. Milan, Italy, 2014.

Fiedler J.L., Mauricio Muñoz, Sergio Andrés, Aníbal Pacheco, Valentina Doverni, Gonzalo García, Paulina S. Rojas, **Aguayo F.**

Synaptic remodeling in the hippocampus: relationship with stress and glucocorticoids. 2013 International Workshop in Neuroendocrinology. Santa Clara Eco Resort – Dourado, Brazil, August 4th – 7th, 2013.

“Puesto que esta existencia humana se consume invirtiendo el tiempo en distracciones, ahora es el momento de practicar la concentración.” (Atisha)

AGRADECIMIENTOS

Esta memoria se realizó gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT 1120528 titulado: "Proteins associated to synaptic remodeling are regulated differentially by stress and antidepressants: relationship with microRNAs levels"

En primer lugar quiero agradecer el apoyo incondicional de mi familia, a quienes me recibían los fines de semana y me mandaban de vuelta lleno de cariño y cositas ricas. Gracias por estar ahí a pesar de la lejanía y de las visitas esporádicas. Gracias a mis abuelas Victoria y Carmen por preocuparse siempre de mi nutrición y a mis tatas Carlos y Geselino por preocuparse de mis finanzas. Gracias a mis tías y tíos: Tuti, Pancha, Olga, Mariela, Sandra, Carolina, Anita, Verónica, Fabiola, Pablo y Cristobal porque siempre encontraban la forma de ayudar a mi familia o a mi.

Muchas gracias a los amigos de la familia que también estuvieron presentes: Señora Ana Krause muchas gracias por el apoyo económico brindado por todos estos años, Señora Vero gracias por las paltas que nunca faltaban, y Señora Eugenia gracias por el pancito amasado.

Quiero dar las gracias a mis amigos del colegio, a aquellos que desde chiquititos hemos mantenido una relación de amistad muy especial. A pesar de todos los problemas, la lejanía y la incompatibilidad de tiempo, siempre han estado ahí, con la misma alegría y con el mismo cariño que recuerdo desde que éramos niños. Muchas gracias a la Verito, Francisco, Ita, Cony T., Isabel, María Luisa, Max, Solange, Tatán, Joselin, Mauricio, Pedro G, Choco, Francisca, Carlos y Pedro C. Muchas gracias por enseñarme que la amistad puede trascender al tiempo y a las distancias. Agradezco también a mis profesores del colegio Cherie J., Fabiola J., Julio A., Jimena S., Jaime H., Eric R., Angélica S., Ana V., Carolina P. y Vicente C. Gracias por enseñarme la pasión por las ciencias, el estudio y las artes.

A mis amigos de la carrera, a aquellos que me acompañaron tanto dentro de la universidad, como fuera de ella. Recuerdo especialmente aquellas sesiones de "estudio" que terminaban de cualquier forma, menos estudiando. En particular gracias a la Frenshi,

Juan, Daniel, Adrian, Panchita, Vale C., Pelao, Wala y Chisco por apoyarme en todo lo que necesité. Mención especial para la Lore y el Cris, porque así lo pidieron. Muchas gracias a todos aquellos que estuvieron compartiendo salas de clases y viajes a la playa y al sur: a Noni, Waldo, Foncho, Chaplín, Mabe, Paula, Bárbara, Lesly, Wlady, Clau, Gran, Nico, Nano y Nacho. Cada uno de ustedes representa algo especial, y cada uno compartió conmigo momentos únicos, momentos que quedarán grabados para siempre en mi corazón. Saludos también a Sebastián, Julita y Lalo, quienes fueron mis primeros tutores de laboratorio, y ahora son grandes amigos y colegas.

Muchas gracias a la gente de Kenpo Studio y Titanes RC. Gracias por haberme hecho parte de su grupo y por compartir jornadas completas de deporte y amistad.

A todas aquellas personas con las que tuve la dicha de compartir en las ayudantías. Con ustedes aprendí mucho. Saludos y muchas gracias a los chicos de BQ generación 2013 y al “team FMRP”.

A la gente del laboratorio, quienes desde el primer día me recibieron con mucho cariño y además estuvieron conmigo en la parte final de este proceso. Muchas gracias a Gonzalo, Vale D., Ruth, Chicho, María Alexandra, Mauro y Pancho. Saludos especiales para mi codirectora Paulina Rojas, quien con todo su cariño fue un gran apoyo para realizar esta memoria. Muchas gracias a la señora Xime por ayudarme con los trámites atrasado, muchas gracias a la señora Rafa y a la señora Gladys.

A mis profesores de la facultad: Christian V., Jaqueline P., María Antonieta V., Daniela S., Mario C., Alfonso P. y Mercedes Z. Cada uno de ustedes marcó una huella y sirvió de inspiración para seguir adelante como profesional y también como persona.

A mi profesora guía, la profe Jeny. La palabra gracias no alcanza a expresar todos los sentimientos y agradecimientos que se merece. No ha sido solo una profesora, sino que es lo más cercano a una familia durante estos últimos dos años. Gracias a usted no solamente aprendí a hacer PCRs y vectores lentivirales; gracias a usted he aprendido a ser mejor persona y a hacer de mi entorno una gran familia. Gracias por todo el apoyo

brindado, por darme la oportunidad de seguir adelante siempre. Siempre recordaré que no hay que conformarse con lo que ya se tiene, sino que siempre hay que aspirar a cosas más grandes.

Por último, agradecer de manera muy especial a mis papás. Sé que estos años no han sido fáciles para ninguno de nosotros, los problemas nunca han faltado. Pero si hay algo que he aprendido de ustedes es a no rendirme, a superar los problemas y seguir adelante, siempre dando lo mejor. Muchas gracias por todo el apoyo, por recibirme todos los fines de semana con una comida rica calentita, por las empanadas y pasteles de choclo. A pesar de que a veces no contábamos con todos los medios necesarios para hacer muchas cosas, el cariño y los valores nunca faltaron en nuestra casa. Muchas gracias por darme todas las herramientas para poder crecer y permitirme siempre ser y hacer lo que yo quiero.

Muchas gracias a todos, espero mantener la fuerza y cariño de todos estos años para enfrentar todo lo que se viene.

ÍNDICE GENERAL	Páginas
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estrés y glucocorticoides	1
1.2 Plasticidad sináptica y estrés	2
1.3 FMRP, síntesis local de proteínas y estrés	5
1.4 Relación entre estructura, localización y función de FMRP	5
1.5 Vías de transducción asociadas a la regulación FMRP y su relación a la plasticidad	8
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Reactivos generales	17
4.2 Animales y procedimiento de estrés agudo	17
4.3 Determinación de los niveles séricos de corticosterona	19
4.4 Obtención de los extractos totales de hipocampo para Western blot	20
4.5 SDS-PAGE y Western blot	20
4.6 Obtención de ARN mayores de 200 nt	22
4.7 Transcripción Inversa y PCR cuantitativo	23
4.8 Análisis estadístico	24

5. RESULTADOS	25
5.1 Marcadores de estrés y plasticidad sináptica	25
5.1.1 Niveles de corticosterona plasmática	25
5.1.2 Cuantificación de heces durante la sesión de estrés	25
5.1.3 Determinación del transcrito <i>c-Fos</i> como marcador de actividad sináptica	27
5.1.4 Determinación de los niveles del transcrito <i>Arc</i> y proteína ARC como marcadores de actividad sináptica	28
5.2 Relación del estrés con la activación de vías transduccionales	30
5.2.1 Vía AKT-mTORc1-S6K1	30
5.2.2 Vía de las MAPK ERK1/2	36
5.3 Efectos del estrés agudo sobre FMRP	40
5.3.1 Efectos del estrés agudo sobre el transcrito <i>Fmr1</i>	42
6. DISCUSIÓN	43
6.1 Estrés por restricción de movimiento	43
6.2 Estrés y su relación con la expresión de genes tempranos	44
6.3 Respuesta de FMRP durante el estrés agudo por restricción de movimiento	47
6.4 Efectos del estrés agudo por restricción de movimiento en la activación de vías transduccionales	49
6.5 Rol de los GCs: Respuesta lenta v/s respuesta rápida	52
7. CONCLUSIONES	54
8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	55
9. BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS	Páginas
Figura 1: Dominios conservados de la FMRP	6
Figura 2: Vía PI3K-AKT-mTORc1 y su relación al control de la traducción	10
Figura 3: Vía MAPK ERK1/2 y su relación al control de la traducción	13
Figura 4: Esquema propuesto de las vías transduccionales que regulan a la FMRP	15
Figura 5: Modelo experimental de estrés por restricción de movimiento	18
Figura 6: Marcadores fisiológicos de la respuesta de estrés	26
Figura 7: Cambios en los niveles del transcrito <i>c-Fos</i> durante y posterior al periodo de estrés	27
Figura 8: Variación de los niveles del transcrito <i>Arc</i> y proteína ARC durante y después de la sesión de estrés	29
Figura 9: Variación en los niveles de p-PDK1(Ser241) posterior a la respuesta de estrés	32
Figura 10: Variación en los niveles de p-AKT (Ser473) y AKT durante y posterior a la respuesta de estrés	33
Figura 11: Variación en los niveles de p-mTOR (Ser2448) y mTOR durante y posterior a la respuesta de estrés	34
Figura 12: Niveles de pS6K1 (Ser389) y S6K1 durante y posterior a la respuesta de estrés	35
Figura 13: Niveles de p-MEK durante y posterior a la respuesta de estrés	36
Figura 14: Variación en los niveles de p-ERK1/2 normalizados por ERK1/2 durante y posterior a la respuesta de estrés	37
Figura 15: Variación en los niveles de p-ERK1/2 normalizados por ACTB durante y posterior a la sesión de estrés	38
Figura 16: Niveles de ERK1/2 normalizado por ACTB durante y posterior a la respuesta de estrés	39
Figura 17: Variación en los niveles de p-FMRP y FMRP durante y posterior a la respuesta de estrés	41
Figura 18: Variación en los niveles de los transcritos <i>Fmr1</i> posterior a la sesión de estrés	42
Figura 19: Modelo propuesto para explicar el cambio en los niveles de transcrito de los EGRs <i>c-Fos</i> y <i>Arc</i> en función de las variaciones de la corticosterona presente en el suero durante y posterior al estrés inducido por restricción de movimiento	47

ÍNDICE DE TABLAS

Páginas

Tabla 1: Transcritos que se asocian a la FMRP para su transporte hacia las dendritas	7
Tabla 2: Condiciones utilizadas para el análisis por Western blot	22
Tabla 3: Partidores utilizados para análisis por PCR cuantitativo	24

ABREVIATURAS

ACTH	: Hormona adrenocorticotrófica
ACTB	: β -Actina
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ADNc	: ADN complementario
AKT	: Proteína quinasa B
AMPA	: Receptor para ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ARC	: Proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad
ARN	: Ácido ribonucleico
ARNm	: ARN mensajero
BCA	: Ácido bicinconínico
BDNF	: Factor neurotrófico derivado de cerebro
BSA	: Albúmina de suero bovino
CA1	: Cuerno de Amon 1
CaMKII α	: Quinasa dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina
CORT	: Corticosterona
CRE	: Elemento regulado por AMPc
CREB	: Proteína que une a CRE
CRH	: Hormona liberadora de corticotrofinas
CypA	: Ciclofilina A
DEX	: Dexametasona
DNA-PK	: Proteína quinasa dependiente de ADN
DTT	: Ditiotreitól
EBP1/2	: Proteína de unión de factores de elongación
eEF	: Factor eucariótico de elongación de la traducción
EEM	: Error estándar medio

EDTA	: Ácido etilendiamintetraacético
EGR	: Gen de respuesta temprana
EGTA	: Ácido etilenglicoltetraacético
eIF	: Factor eucariótico de iniciación de la traducción
ERK	: Quinasa regulada extracelularmente
FMRP	: Proteína relacionada al síndrome del X frágil
FXS	: Síndrome del X frágil
GCPR	: Receptor acoplado a proteína G
GCs	: Glucocorticoides
GR	: Receptor de glucocorticoides
GTP	: Guanosín trifosfato
HEPES	: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HHA	: Eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal
KH	: Dominios de homología K
KO	: <i>Knock-out</i>
LTD	: Depresión a largo plazo
LTP	: Potenciación a largo plazo
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	: Quinasa de la MAPK ERK
mGluR1/5	: Receptores metabotrópicos de glutamato 1 y 5
MMP9	: Metaloproteínasa de matriz extracelular 9
mTOR	: Proteína blanco de rapamicina de mamífero
mTORc1	: Complejo 1 mTOR
mTORc2	: Complejo 2 mTOR
MR	: Receptor de mineralocorticoides
NES	: Señal de exportación nuclear

NLS	: Señal de localización nuclear
NMDA	: Receptor para N-metil-D-aspartato
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	: Amortiguador fosfato salino
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PDK1	: Proteína quinasa dependiente de fosfoinositidos
PHLPP1/2	: Proteína fosfatasa rica en dominios PH y repeticiones de Leucina
PI3K	: Fosfatidilinositol-3 quinasa
PIP2	: Fosfatidilinositol bisfosfato
PIP3	: Fosfatidilinositol trisfosfato
PKA	: Proteína quinasa A
PKC	: Proteína quinasa C
PP2A	: Proteína fosfatasa 2A
pre-miRNA	: Pre micro ARN
PSD95	: Proteína de la densidad post-sináptica de 95 kDa
PVN	: Núcleo paraventricular
qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RAS	: Proteína del sarcoma de rata
RBP	: Proteínas que unen ARN
RGG	: Dominios ricos en Arg-Gly-Gly
RNP	: Ribonucleoproteína
RTK	: Receptor tipo tirosina quinasa
S6K1	: Proteína quinasa de la proteína ribosomal S6
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SRE	: Elemento regulado por suero
TBS	: Amortiguador tris salino

TEMED : N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina
TSC : Proteína de la esclerosis tuberosa
TOP3 β : Topoisomerasa de RNA 3 β
UTR : No traducido

RESUMEN

El estrés corresponde a una respuesta fisiológica desencadenada ante una situación amenazante, promoviendo la adaptación y supervivencia. Esta respuesta es específica e involucra la activación de distintos circuitos neuronales y la liberación de mediadores neuroendocrinos. En el caso del estrés psicosocial se liberan principalmente catecolaminas y hormonas esteroidales (glucocorticoides), generando cambios en la transducción de señales (efectos rápidos) y en la expresión génica (efectos lentos) tanto a nivel central como periférico. El hipocampo es uno de los principales blancos de las hormonas del estrés debido a que participa en la retroalimentación negativa de la secreción de los glucocorticoides. Esta estructura es requerida principalmente para el aprendizaje asociativo, adquisición de memoria episódica, declarativa y espacial. Estudios morfológicos y bioquímicos han demostrado que las variaciones en los niveles de glucocorticoides secretados durante el ciclo circadiano y durante el estrés promueven modificaciones neuroplásticas en esta estructura, incluyendo cambios morfológicos, variaciones en la excitabilidad celular y en la eficacia sináptica, entre otras.

Se ha descrito que el alza en la secreción de glucocorticoides inducido por un estrés agudo (episodio único) puede actuar como un modulador positivo o negativo de los procesos de memoria y aprendizaje relacionados al hipocampo. Entre los múltiples efectos del estrés, uno de los más importantes corresponde a los cambios neuroplásticos asociados a la morfología neuronal, en especial de aquellos relacionadas a la neurotransmisión glutamatérgica. Estos cambios además son asociados a procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria, procesos que requieren de síntesis *de novo* de proteínas, involucrando transporte de ARNm hacia las dendritas y control de la traducción a nivel local. En relación a esto, la proteína de Retardo Mental Asociado al X Frágil (FMRP), que se encuentra principalmente en axones y dendritas, ejerce una actividad supresora de la traducción de transcritos que codifican para proteínas involucradas en actividad sináptica. La FMRP es fosforilada en la Ser499 por la quinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K1), modificación que es necesaria para la represión traduccional asociada a polirribosomas estancados. En cultivos neuronales se ha descrito que receptores glutamatérgicos del tipo mGluR1/5 promueve la fosforilación de FMRP por medio de la S6K1 a través de la activación de las vías PI3K-AKT-mTORc1 y MAPK ERK1/2 con una temporalidad distinta. Por otra parte, se ha descrito que los glucocorticoides son capaces de inducir un aumento

en la espinogénesis en dendritas a través de efectos rápidos que son mediados por la activación de diversas vías transduccionales, entre ellas la AKT, las MAPK ERK1/2, PKA y PKC. Estos efectos son inhibidos tanto por antagonistas del receptor de glucocorticoides, como por la actinomicina D (inhibidor de la traducción). En base a estos antecedentes, se propuso la siguiente hipótesis: “El estrés agudo por restricción de movimiento regula la fosforilación de la FMRP en hipocampo de rata, efecto que se correlaciona a la activación de las vías PI3K-AKT-mTORc1 y MAPK ERK1/2”. Ratas macho adultas fueron sometidas a 0,5 o 2,5 h de estrés de restricción de movimiento y fueron sacrificadas inmediatamente finalizado el estímulo. Otro grupo fue eutanasiado luego de 1,5; 6 y 24 h post estrés. La efectividad del estrés se comprobó por el incremento en el número de heces e incremento en el nivel de corticosterona observado por la aplicación de la restricción. A su vez, mediante qPCR se evaluó la respuesta de los genes de respuesta temprana *c-Fos* y *Arc*. Después de 0,5 h de estrés se observó un aumento en ambos ARNm. Por otra parte, usando Western blot se detectó un incremento modesto de la proteína ARC durante la sesión de estrés, alcanzando un máximo a las 1,5 h posterior a la restricción. Además, se determinó que el estrés por restricción de movimiento no cambia el estado de fosforilación de FMRP en Ser499 ni durante ni posterior a la respuesta de estrés. Sin embargo, se observa un aumento en los niveles de FMRP a las 0,5 h de iniciado el estímulo, hecho que es coincidente con la activación de la vía AKT-mTOR. Con respecto a las MAPK ERK1/2, su mayor nivel de fosforilación se detectó a las 6 h posterior al fin de la restricción, evento que sugiere la participación de respuestas lentas producidas por el estrés.

Esta memoria demuestra por primera vez que durante el estrés agudo por restricción de movimiento se observa un aumento en los niveles de la proteína FMRP. Además el procedimiento de estrés promueve la activación de vías transduccionales relacionadas funcionalmente entre sí con un patrón temporal distinto. Queda claro que el estrés desencadena mecanismos que pueden regular procesos celulares críticos para la supervivencia neuronal, pero falta por evaluar la incidencia de estos cambios sobre el comportamiento animal.

SUMMARY

EFFECT OF ACUTE RESTRAINT STRESS ON PHOSPHO-FMRP LEVELS AND ITS ASSOCIATION WITH PI3K-AKT-MTORC1 AND MAPK ERK1/2 PATHWAYS IN RAT HIPPOCAMPUS

Stress is a physiological response triggered in a threaten situation, allowing adaptation and survival. This response is specific and involves the activation of numerous neural circuits and mediates the secretion of different neuroendocrine mediators. In the case of psychosocial stress, catecholamines and glucocorticoids are released, promoting changes on signal transduction pathways (fast effects) and in gene expression (slow effects) at a central and peripheral level. The hippocampus is one of the main targets of stress hormones because it is involved in the negative feed-back of glucocorticoid secretion. This structure is mainly required for associative learning and acquisition of episodic, declarative and spatial memory. Morphological and biochemical studies have shown that fluctuation of glucocorticoids levels, due to stress-induced secretion or circadian rhythm pulses, promotes neuroplastic changes including morphological changes, variations in cellular excitability and synaptic efficacy among others.

It has been reported that an increase on glucocorticoid secretion induced by a single acute stress session may act as a positive or negative modulator of memory and learning processes related to hippocampus. Among of the multiple effects of stress, the most important is related to neuroplastic changes associated with neuronal morphology, especially those associated to glutamatergic neurotransmission. These changes are also linked to processes of learning and memory consolidation, being both dependent of *de novo* local protein synthesis, involving mRNA transport to dendrites and local control of translation process. In line with this, the Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP), mainly found in axons and dendrites, acts suppressing translation of mRNAs encoding proteins involved in the regulation of synaptic activity. FMRP is phosphorylated by S6K1 at Ser499 (p-FMRP), a modification required for mRNA translational repression and its association with stalled polyribosomes. It has been described, in neuronal cultures, that mGluR1/5 type glutamatergic receptor promotes FMRP Ser499 phosphorylation by S6K1

through PI3K-AKT-mTORc1 and MAPK ERK1/2 pathways activation in a different temporal pattern. Otherwise, glucocorticoids are able to induce an increase in dendritic spinogenesis through fast effects mediated by transduccional pathways involving the activation of AKT, MAPK ERK1/2, PKA and PKC. These are inhibited both by glucocorticoid receptor antagonist or Actinomycin D a translation inhibitor. Based on this evidence the following hypothesis was proposed: “Acute restraint stress regulates FMRP phosphorylation in rat hippocampus, effect correlated with the activation of PI3K-AKT-mTORc1 and MAPK ERK1/2 pathways”. Adult male rats were submitted to 0.5 or 2.5 hours of restraint stress session and then were euthanized immediately. In order to evaluate the long-term of stress on hippocampus, another group was sacrificed after 1.5; 6 and 24 hours post stress. The effectiveness of the stress model was proven by the increase in the number of feces during stress procedure and the rise in corticosterone levels by the restriction protocol. In order to evaluate changes in mRNAs of c-Fos and Arc early genes, RT-qPCR was carried out. After 0.5 h of restraint stress an increase in both mRNAs was observed. Using Western-blot analyses, we detect a modest increase in ARC level during the stress procedure, reaching a maximum 1.5 hours after the stress session. Taken altogether these results, we suggest the involvement of ionotropic glutamatergic receptors during the early stress response. It was determined that restraint stress did not change the phosphorylation levels of FMRP at Ser499, during and after the stress response. Nevertheless at 0.5 hours of stress session there was an increase in FMRP levels, which correlates with the AKT-mTORc1 pathway activation. In relation to MAPK ERK1/2 pathway, a peak level of phosphorylation was detected 6 h after restraint, result that suggests the involvement of slow responses produced by stress.

For the first time, this thesis demonstrated that acute restraint stress promotes an increase in FMRP levels during stress, together with the activation of signal transduction pathways functionally related triggered by stress with a different temporal pattern. It is clear that stress triggers mechanisms that can regulate critical cellular processes for neuronal survival, but it remains to evaluate the impact of these changes on animal behavior.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estrés y glucocorticoides

El cerebro es una estructura del sistema nervioso central que no sólo procesa información del medio externo, sino que también integra y regula distintos parámetros fisiológicos relacionados a acciones conscientes, como el estado de alerta, dormir, estudiar, caminar, y muchas otras acciones relacionadas al diario vivir. Dicha regulación está mediada por distintos sistemas efectores, como por ejemplo el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (eje HHA), el sistema nervioso autónomo, sistema endocrino y sistema inmune, entre otros. A su vez, estos sistemas liberan una diversidad de mediadores químicos, los cuales ejercen acciones en distintos órganos y tejidos blancos. Esta diversidad de respuesta involucran respuestas que pueden ir desde cambios en la expresión génica hasta respuestas tan complejas como aquellas relacionadas con la conducta del sujeto.

El cerebro es el órgano que interpreta las experiencias percibidas ya sea como amenazante o no amenazante, determinando la respuesta fisiológica y el comportamiento ante tales situaciones. Dentro del cerebro está el hipocampo, que corresponde a una estructura cerebral necesaria para el aprendizaje asociativo y participa también en la adquisición de la memoria episódica, declarativa, espacial y además al conectarse con el hipotálamo controla negativamente el eje HHA (McEwen, 1999).

Los individuos responden de forma distinta a estímulos externos y cuando éstos son amenazantes se desencadena una serie de respuestas fisiológicas que resultan en adaptación. Este proceso se conoce como alostasis, el cual es un componente crucial para el mantenimiento de la homeostasis del individuo. Sin embargo, la respuesta alostática trae consigo un costo, el cual se conoce como carga alostática (McEwen y Gianaros, 2010). Cuando la carga alostática no puede ser compensada por el organismo, ésta conducirá inevitablemente a la aparición de patologías asociadas a una pérdida de los mecanismos homeostáticos asociados a la respuesta de estrés (McEwen y Magarinos, 2001; McEwen, 2003; McEwen y Milner, 2007).

La respuesta fisiológica de estrés comienza cuando se estimula los núcleos paraventriculares (PVN) del hipotálamo a través de la activación de vías sensoriales, provocando la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) hacia el sistema portal hipofisiario, que es un sistema de vasos sanguíneos que comunica al hipotálamo con la pituitaria anterior (o adenohipófisis). La CRH a nivel hipofisiario induce la liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) hacia el torrente sanguíneo sistémico. Esta hormona, a nivel de la corteza suprarrenal, estimula la esteroidogénesis y por ende la liberación de glucocorticoides (GC) hacia el torrente sanguíneo (Tsigos y Chrousos, 2002). Posteriormente, cuando los GCs alcanzan el cerebro, por mecanismo de feed-back negativo sobre el hipotálamo y la pituitaria anterior, se inhibe el eje HHA. (Ulrich-Lai y Herman, 2009). Sin embargo, el hipocampo es la estructura que impone un control inhibitorio sobre la actividad del eje HHA en situaciones de estrés.

Los GC son hormonas esteroidales sintetizadas en las glándulas suprarrenales que presentan un modo de secreción circadiana y episódica en respuesta a estrés ambiental y fisiológico, donde comandan una serie de mecanismos adaptativos que le permiten al cuerpo mantener la homeostasis (Revollo y Cidlowski, 2009). Al unirse a su receptor (GR, del inglés "*Glucocorticoid Receptor*"), los GCs activan una serie de cambios celulares; en parte al controlar el cambio en la expresión génica actuando como factor transcripcional producto de su dimerización, y también pueden unir a otros factores transcripcionales provocando efectos represores y/o activadores. Además, los GCs son capaces de producir eventos no genómicos rápidos en el citoplasma a través de la interacción con algunas quinasas (Revollo y Cidlowski, 2009).

1.2. Plasticidad sináptica y estrés

El tejido neuronal es capaz de modificar su complejidad dendrítica y a la vez, el número de sinapsis funcionales encargadas de recibir los diferentes tipos de estímulos. Esta capacidad se conoce como neuroplasticidad, la cual es importante en procesos como aprendizaje y consolidación de la memoria, entre otros (Morris et al., 2003). Por esto es

importante controlar a nivel local la síntesis de proteínas requeridas para la plasticidad sináptica a nivel dendrítico.

Se han descrito distintos mecanismos que participan en el transporte de transcritos hacia las dendritas. Uno de ellos consiste en la poliadenilación citoplasmática de algunos transcritos, que corresponde a una señal de destinación a las dendritas y que además les confiere mayor estabilidad frente a la acción de nucleasas (Weill et al., 2012). Ejemplos de estas modificaciones corresponde a los transcritos de la CaMKII α (Wu et al., 1998) y de la MMP9 (Dziembowska et al., 2012). Mediante el uso de ratones transgénicos que producen a nivel neuronal una proteína fluorescente verde modificada para reconocer el ARNm de β -actina, se ha demostrado que alrededor de un 25% del transcrito se localiza en las dendritas basales de la zona CA1 del hipocampo, asociado a complejos de ribonucleoproteínas (RNP). Este estudio, además mostró que los transcritos se encuentran en un estado dinámico de ensamblaje y desensamblaje con las RNPs. Tras una depolarización se favorece el desensamblaje del complejo, lo cual puede resultar en una mayor disponibilidad del transcrito para su traducción, degradación, o asociación a nuevos complejos (Park et al., 2014).

Otros elementos importantes en el control del transporte y la traducción local de transcritos en las dendritas corresponden a las proteínas de unión a ARN (RBP) (Pascual et al., 2012). Una proteína importante en estos procesos es la FMRP (del inglés "*Fragile X Mental Retardation Protein*") (Sidorov et al., 2013). Diversa evidencia indica un rol clave de la FMRP en el proceso de consolidación de la potenciación a largo plazo (LTP). El fenómeno de potenciación se considera como un modelo de aprendizaje en el cual aumenta la eficacia sináptica excitadora a través de modificaciones a nivel post sináptico que incluyen cambios en la configuración de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

Finalmente, se ha demostrado que la traducción de proteínas a nivel dendrítico es importante para la consolidación de la LTP, memoria y aprendizaje, procesos que dependen tanto de la organización celular como del grado de complejidad de las redes neurales (Hernandez y Abel, 2008; O'Donnell y Sejnowski, 2014). Más aún, en dendritas se

ha documentado la presencia de polirribosomas estancados en la fase de elongación de la traducción, proceso en el cual proteínas como la FMRP regulan dicho control (Ceman, 2003; Graber et al., 2013). Dada la evidencia presentada, se concluye que en las dendritas existe la maquinaria necesaria para regular el proceso de traducción en forma local.

Es importante destacar que distintos modelos de estrés agudo favorecen el aprendizaje asociativo, donde el aumento de los GCs es requisito para la facilitación del aprendizaje y no está asociado a la otra hormona de estrés: la epinefrina (Shors, 2001; Beylin y Shors, 2003). Estudios *in vitro* han demostrado que en cortes de hipocampo la adición de corticosterona (CORT) aumenta la densidad de espinas dendríticas de manera dependiente de la dosis de la hormona (Bader et al., 2012). Este efecto es bloqueado por antagonistas del GR y del receptor ionotrópico de glutamato del tipo NMDA y a su vez, por inhibidores de las vías de las MAPK, PKA, PKC y la PI3K (Bader et al., 2012). En trabajos recientes, se ha descrito que el GR es abundante en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, y más aún está presente en las espinas dendríticas (Jafari et al., 2012; Chen et al., 2013). Además, el tratamiento agudo de cortes hipocampales de rata con dexametasona (DEX, agonista del GR) induce la fosforilación de la ERK1/2, efecto bloqueado por antagonistas del GR (Jafari et al., 2012). Modelos *in vivo* también han demostrado la activación de diversas vías transduccionales en respuesta a estrés, entre las que destacan las MAPK ERK1/2, AKT, CaMKII y PLC γ . Estas cascadas se inhiben al usar un antagonista específico del GR (Chen et al., 2012). Estos antecedentes indican que el GR unido a su hormona media acciones no genómicas en tejido neural y que se consideran como acciones rápidas de esta hormona. Por otro lado, el incremento de la espinogénesis inducida por CORT es abolido por la cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) y no por actinomicina D (inhibidor de la transcripción), lo que sugiere fuertemente que la espinogénesis requiere del proceso de traducción desencadenado por la CORT (Bader et al., 2012).

1.3. FMRP, síntesis local de proteínas y estrés

El control del transporte y la traducción de los transcritos a nivel de las dendritas son de suma importancia en el contexto de la neuroplasticidad. Por lo tanto es importante determinar la participación de FMRP en la respuesta de estrés. Dicha proteína se describió en la enfermedad conocida como Síndrome del X Frágil (FXS), la cual es causada por una mutación en el promotor del gen *Fmr1* que produce un silenciamiento parcial o total de la transcripción, causando una pérdida de la función por ausencia de la proteína. Esta patología se caracteriza por alteraciones psiquiátricas características del espectro autista, lo cual se relaciona a un aumento en el número de filopodios, que corresponden a formas inmaduras de las espinas dendríticas (de Esch et al., 2013).

La FMRP se expresa en mayor cantidad en hipocampo, núcleos basales y cerebelo (Feng et al., 1997). Dado que la FMRP es capaz de inhibir a concentraciones nanomolares la traducción de diversos ARNm *in vitro*, se deduce su rol en la plasticidad sináptica en relación al proceso traduccional (Laggerbauer et al., 2001). Ratones KO para la FMRP presentan una mayor LTD, sugiriendo que la proteína se relaciona a una represión de la traducción de transcritos que codifican proteínas asociadas a este fenómeno (Huber, 2002). Se ha descrito que la traducción dendrítica del transcrito de la proteína ARC, una proteína involucrada en LTD, está regulado por la FMRP (Niere et al., 2012). En relación a esto, la proteína ARC presente a nivel dendrítico es capaz de interactuar con proteínas de citoesqueleto y además favorece la internalización de los receptores ionotrópicos de tipo AMPA, lo que media el establecimiento de la LTD (Shepherd y Bear, 2011).

1.4. Relación entre estructura, localización y función de la FMRP

En cultivos primarios de neuronas hipocampales se ha demostrado que la FMRP está localizada en el cono de crecimiento axonal y en dendritas inmaduras y maduras (Antar et al., 2005; Antar et al., 2006). Se ha observado un aumento tanto en los niveles de la FMRP, como de su transcrito en las dendritas frente a estimulación con agonistas del mGluR1/5

(receptores asociados a proteína Gq) o frente a un estímulo depolarizante, efecto que es sensible a inhibidores de la PKC y quelantes del Ca^{2+} (Antar et al., 2004).

La FMRP posee una señal de localización (NLS) y exportación nuclear (NES), por lo que puede ingresar y salir del núcleo (Figura 1) (Eberhart et al., 1996). Además, posee 3 dominios de unión a mRNA que corresponden a dos dominios KH (de su sigla en inglés *K Homology Domain*) y un dominio RGG (dominio rico en la secuencia aminoacídica: Arg-Gly-Gly) (Figura 1) (Ashley et al., 1993; Siomi et al., 1993).



Figura 1: Dominios conservados de la FMRP. En la figura se esquematiza la ubicación de los principales dominios conservados de la proteína, además del sitio de fosforilación en Ser499 (modificado de Ascano, Mukherjee et al. 2012).

Se han descrito variantes de *splicing* que afectan la longitud del dominio KH2, lo que genera isoformas con distintas afinidades para diferentes ARNm (Xie et al., 2009). Por otra parte, los ARNm capaces de interactuar con la FMRP poseen dos secuencias conservadas, ACUK y WGGGA (donde K = G o U y W = A o U), y ambas secuencias pueden variar en el número de repeticiones y en la posición en el transcrito en las regiones 3' y 5' UTR, como también en la secuencia codificante (Ascano et al., 2012). En la Tabla 1, se destacan algunos transcritos regulados por la FMRP que son relevantes para los mecanismos neuroplásticos.

Para regular la traducción de los transcritos asociados a la FMRP, debe existir algún tipo de mecanismo que permita la transición entre un estado de traducción inactivo a uno activo. La FMRP posee varios residuos de Ser susceptibles de ser fosforilados. Uno de esos residuos corresponde a la Ser499, cuya fosforilación se relaciona a la inhibición de la traducción de los transcritos asociados a la FMRP (Ceman, 2003). Sin embargo, la fosforilación de la FMRP en la Ser499 no modifica la capacidad de asociación a sus transcritos blanco ni su ubicación subcelular. En contraste, la FMRP no fosforilada permite la desrepresión traduccional de los transcritos (Ceman, 2003).

Tabla 1: Transcritos que se asocian a la FMRP para su transporte hacia las dendritas.

PROTEÍNA	FUNCIÓN	REFERENCIA
PP2A (subunidad catalítica)	Serina/Treonina Fosfatasa, Transducción de señales	(Ascano et al., 2012)
mTOR	Serina/Treonina Quinasa, Transducción de señales	(Ascano et al., 2012)
GRIN2a	Subunidad Receptor Ionotrópico de glutamato tipo NMDA	(Ascano et al., 2012)
mGluR5	Receptor metabotrópico de glutamato 5	(Ascano et al., 2012)
PSD-95	Proteína adaptadora que ancla receptores tipo NMDA	(Ascano et al., 2012)
GR (Receptor de glucocorticoides)	Receptor citosólico, factor transcripcional	(Ascano et al., 2012)
CaMKII α	Quinasa dependiente de calcio, Transducción de señales	(Ascano et al., 2012)
SAPAP 1-4	Proteína adaptadora que interactúa con proteínas sinápticas y de citoesqueleto	(Ascano et al., 2012)
SHANK 1-3	Proteína adaptadora que interactúa con proteínas sinápticas y de citoesqueleto	(Ascano et al., 2012)
HOMER	Proteína adaptadora que interactúa con proteínas sinápticas y de citoesqueleto	(Ascano et al., 2012)
MMP9	Proteasa de matriz extracelular	(Janusz et al., 2013)
ARC	Proteína adaptadora que media la endocitosis del receptor tipo AMPA	(Park et al., 2008; Niere et al., 2012)

Algunos estudios reportan que la FMRP forma un complejo con la topoisomerasa de ARN 3 β (TOP3 β), permitiendo el transporte de la enzima hacia las dendritas, proceso que es independiente del estado de fosforilación de la FMRP. No obstante, la traducción local depende del estado de fosforilación de la FMRP y además de la interacción con la TOP3 β (Xu et al., 2013). Más aún, animales KO para TOP3 β muestran un fenotipo dendrítico característico del FXS, destacando la importancia de esta enzima en la formación de la sinapsis. Por otro lado, no se ha descartado que la interacción de FMRP con otras proteínas dependa de su estado de fosforilación. De hecho, la fosforilación en la Ser499 inhibe su interacción con DICER, enzima que participa en el procesamiento de los pre-miRNAs. En relación a esto, la asociación entre la FMRP con DICER inhibe la actividad de esta última, permitiendo una acumulación de los pre-miRNA (Cheever y Ceman, 2009; Edbauer et al., 2010).

1.5. Vías de transducción asociadas a la regulación FMRP y su relación a la plasticidad

En cultivo primario hipocampal se ha descrito que agonistas de mGluR1/5 activan a la PP2A, fosfatasa que permite una rápida desfosforilación de la FMRP (menor a un minuto) (Narayanan et al., 2007). A pesar de que se ha demostrado que la desfosforilación no afecta la vida media de la FMRP (Ceman, 2003), se ha descrito que la FMRP desfosforilada es susceptible de ser marcada para su posterior degradación vía ubiquitinación (Nalavadi et al., 2012).

Por otra parte, se ha descrito que la estimulación de cultivos neuronales con agonistas del mGluR1/5, promueve la fosforilación de la S6K1, quinasa de la FMRP. Los cambios en la p-S6K1 responden a un patrón temporal diferencial que involucra como primer evento la fosforilación mediada por el complejo mTORc1 y en una segunda oleada la participación de la ERK1/2 (Narayanan et al., 2008; Magnuson et al., 2012; Darnell y Klann, 2013).

Se ha descrito que la estimulación de cultivos primarios neuronales corticales con glutamato y etopósido (agente que daña el ADN) promueve la activación de la vía PI3K-AKT-mTORc1, la que está relacionada a mantención de la viabilidad celular (Jeon et al., 2011; Jeon et al., 2012). A su vez, se observó un aumento en los niveles de la FMRP en asociación a la activación de la vía mencionada, sugiriendo que la traducción del ARNm de esta proteína estaría regulada por dicha vía (Jeon et al., 2011; Jeon et al., 2012). Alternativamente, el aumento de la FMRP podría corresponder a un fenómeno de regulación sobre la traducción de su transcrito (Jeon et al., 2011; Jeon et al., 2012). La vía PI3K-AKT-mTORc1 es altamente conservada y es activada por un sinnúmero de estímulos. Controla procesos como metabolismo energético, síntesis de proteínas, inhibición de apoptosis, sobrevivencia celular y neuroprotección, entre otros (Guertin et al., 2006). Tras la activación de un receptor tipo tirosina quinasa (RTK), se reclutan una serie de proteínas a la membrana, entre ellas la PI3K, enzima que cataliza la conversión de fosfatidilinositol(3,4)-bisfosfato (PIP2) a fosfatidilinositol(3,4,5)-trisfosfato (PIP3). El

cambio en estos lípidos sirve como señales de anclaje para proteínas que poseen dominios de plekstrina, como la quinasa AKT (Hemmings y Restuccia, 2012). Esta enzima, al unirse al PIP3 cambia su conformación permitiéndole ser sustrato de la quinasa PDK1, siendo fosforilada en el residuo Thr308. Esta modificación le confiere a la AKT una actividad parcial suficiente como para inactivar mediante fosforilación a los inhibidores del complejo mTORc1 (TSC1 y TSC2), conduciendo a la activación de la mTOR por autofosforilación en Ser2481. Por otra parte, la fosforilación de AKT en la Ser473, promovida por mTORc2 y por DNA-PK, le otorga una máxima actividad asociada a una mayor especificidad por sustratos (Guertin et al., 2006). La desfosforilación de la AKT en Thr308 por la PP2A y en Ser473 por la PHLPP1/2, junto con la conversión de PIP3 a PIP2 por la PTEN, inhiben la señalización de esta parte de la vía (Hemmings y Restuccia, 2012).

Uno de los principales blancos de la AKT es el complejo mTORc1, que juega un rol importante en el desarrollo neuronal, en integración de señales relacionadas a variaciones en los niveles de nutrientes y en la síntesis de proteínas (Graber et al., 2013). El complejo mTORc1, formado por un núcleo catalítico mTOR y las proteínas Raptor y PRAS40, regula el proceso de iniciación de la síntesis de proteínas mediante fosforilación de la 4-EBP1/2 y también participa en la regulación del proceso de elongación a través de la fosforilación de la S6K1 (Figura 2)(Magnuson et al., 2012).

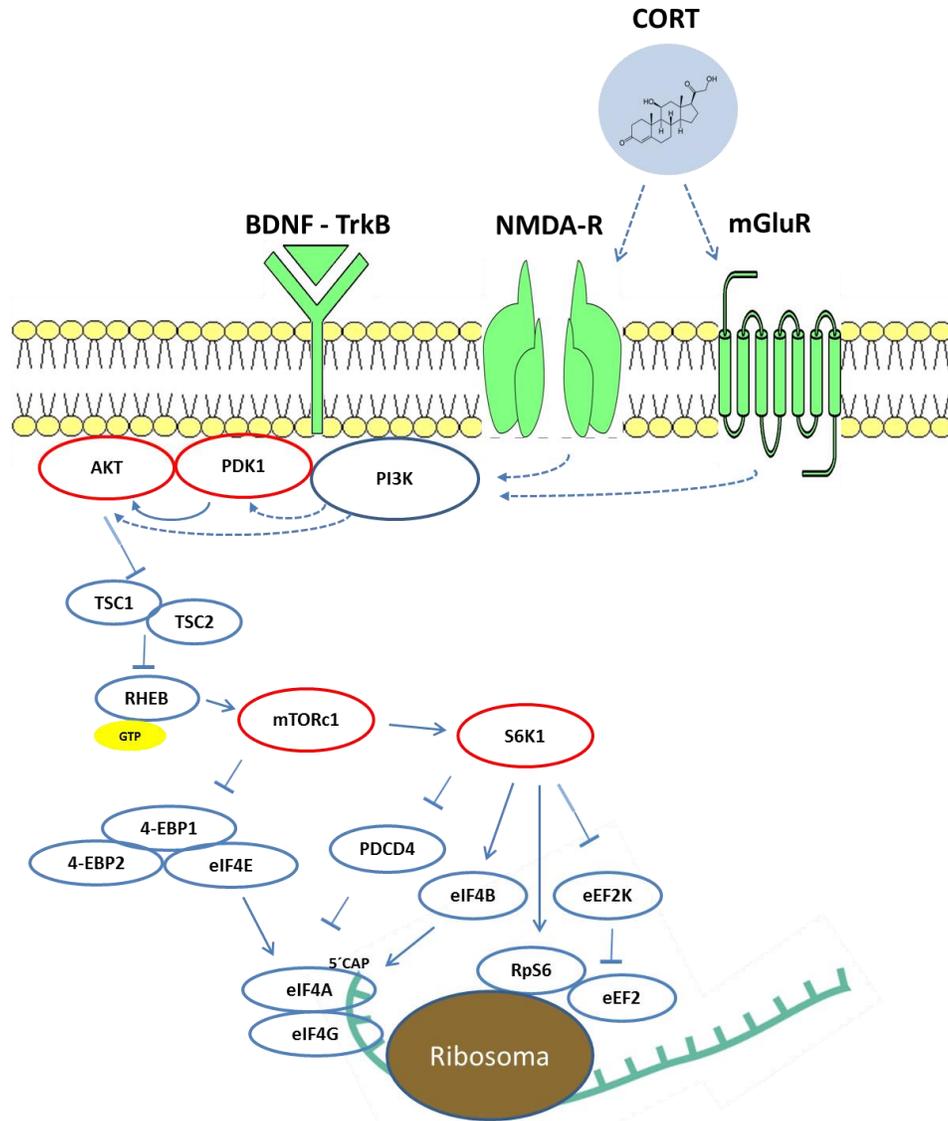


Figura 2: Vía PI3K-AKT-mTORc1 y su relación con el control de la traducción. La estimulación con GCs produce un aumento de la actividad glutamatérgica, que activa los receptores NMDA-R y mGluR, los que indirectamente activan a la PI3K-AKT-mTORc1-S6K1. Por otra parte el BDNF, a través de su receptor TrkB, activa directamente la vía. La 4-EBP1/2 al asociarse al factor de iniciación de la traducción eucariótico (eIF4E) reprime su actividad. Sin embargo, esta interacción es debilitada por la fosforilación por mTORc1, permitiendo que eIF4E libre forme un complejo con eIF4G y el eIF4A, que se une al extremo 5'UTR y gracias a su actividad helicasa permite la formación del complejo de iniciación de la traducción CAP-dependiente. Por otra parte la S6K1 regula el proceso de iniciación de la traducción al aumentar la actividad helicasa del eIF4A en forma indirecta tras la fosforilación del eIF4B, regulador de la actividad helicasa. Además la S6K1 fosforila a PDCD4 que es un inhibidor de eIF4A, favoreciéndose de otra forma la actividad helicasa. Por otro lado, basalmente la quinasa del factor eEF2 (eEF2K) mantiene en un estado reprimido al eEF2, condición que es revertida por la fosforilación de la eEF2K por S6K1. La activación de la vía produce una activación del factor de iniciación eIF4E que es clave en el proceso de iniciación de la traducción. Además, la S6K1 controla tanto factores de iniciación como de elongación, permitiendo la traslocación del ribosoma durante la fase de elongación. Por último, la S6K1 media la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en varios sitios, aunque su relevancia funcional aún no se conoce (Magnuson et al., 2012).

En cortes de hipocampo y cultivos hipocampales la mTOR, factores de iniciación de la traducción (eIF4E) y 4-EBP1/2 son detectadas en el soma y en las dendritas (Tang et al., 2002). En el mismo trabajo se observó que en cultivos hipocampales la 4-EBP1/2 y la eIF4E se distribuyen con un patrón punteado, colocalizados mayoritariamente con la proteína PSD95 (marcador posrtsináptico) y escasamente con Sinapsina (marcador presináptico) (Tang et al., 2002). Más aún, la vía PI3K-AKT-mTORc1 juega un rol importante en el desarrollo neuronal y la morfogénesis dendrítica de neuronas hipocampales (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). El uso de un inhibidor de mTORc1 (rapamicina), tanto *in vitro* como *in vivo* provoca un bloqueo de la LTP y de la consolidación de memoria a largo plazo (Stoica et al., 2011; Lyu et al., 2013). En hipocampo de ratones KO para *Fmr1* se ha reportado un aumento en la actividad tanto de la mTORc1 y de la AKT, asociado a una disminución en la actividad de la PTEN y aumento en los niveles de la subunidad p110 β de la PI3K (Sharma et al., 2010). En linfocitos aislados de pacientes FXS, se reportaron efectos similares acompañados por el aumento en los niveles de fosforilación de S6K1 y eIF4E. Además, se demostró en estos sujetos un aumento en los niveles de fosforilación de AKT y S6K1 en el lóbulo frontal (Hoeffler et al., 2012). Todas estas evidencias sugieren un rol importante de la vía PI3K-AKT-mTORc1 y de la FMRP en la plasticidad neural.

La FMRP puede ser regulada a través de la S6K1 vía activación de la MAPK (del inglés “*Mitogen Activated Protein Kinase*”) ERK1/2. Existe evidencia de que la activación de RTKs, receptores acoplados a proteína G e ionotrópicos promueven un aumento en los niveles de p-ERK1/2 (O'Dell et al., 2010). Es así que un aumento en los niveles de la proteína RAS-GTP activa a la quinasa RAF, que fosforila a MEK (del inglés “*MAPK/ERK Kinase*”). Esta quinasa fosforila a ERK1 y ERK2, también conocidas como p44 y p42 MAPK respectivamente (Figura 3). Estas enzimas corresponden a Ser/Thr quinasa que fosforilan a distintos efectores tanto del citoplasma, como de factores transcripcionales en el núcleo (Thomas y Huganir, 2004).

En cultivos hipocampales la vía de las MAPK ERK1/2 se activa mediante influjos de Ca²⁺ gatillados por la activación del receptor de NMDA. Utilizando inhibidores de MEK se ha demostrado que esta vía está involucrada en la consolidación de la memoria en ratas y se

ha implicado en cambios locales de receptores glutamatérgicos en la superficie de las espinas (Kelly et al., 2003; Patterson et al., 2010). Durante la LTP en hipocampo existe la activación de la maquinaria traduccional mediada por ERK1/2 y mTORc1 (Gelinás et al., 2007). La estimulación de una fracción enriquecida en elementos dendríticos hipocampales (sinaptoneurosomas) con agonistas del mGluR1/5 promueve el aumento en la actividad de la S6K1 por fosforilación en Thr389 y Thr421/Ser424 mediante la activación de mTORc1 y las ERK1/2, respectivamente (Page et al., 2006). Esta evidencia sugiere que las MAPK ERK1/2 regulan toda la maquinaria traduccional río abajo de la S6K1 en la sinapsis y probablemente también la actividad de la FMRP.

En resumen:

- ✓ El estrés agudo produce efectos beneficiosos en la consolidación de la memoria.
- ✓ Los GCs son capaces de modular cambios en la morfología de las dendritas del hipocampo, probablemente por medio de cascadas transduccionales a través de eventos rápidos que no involucrarían el mecanismo canónico de estas hormonas.
- ✓ FMRP, debido a su participación en el transporte de transcritos hacia las dendritas y a su actividad represora de la traducción, juega un papel importante en la regulación de la plasticidad sináptica.
- ✓ Las vías transduccionales que regulan la actividad de FMRP han demostrado aumento en su actividad en respuesta a los GCs, lo que corresponde a un efecto rápido de estas hormonas a través de su interacción con el GR que media la activación de vías transduccionales, como la PI3K-AKT-mTORc1 y MAPK ERK1/2.

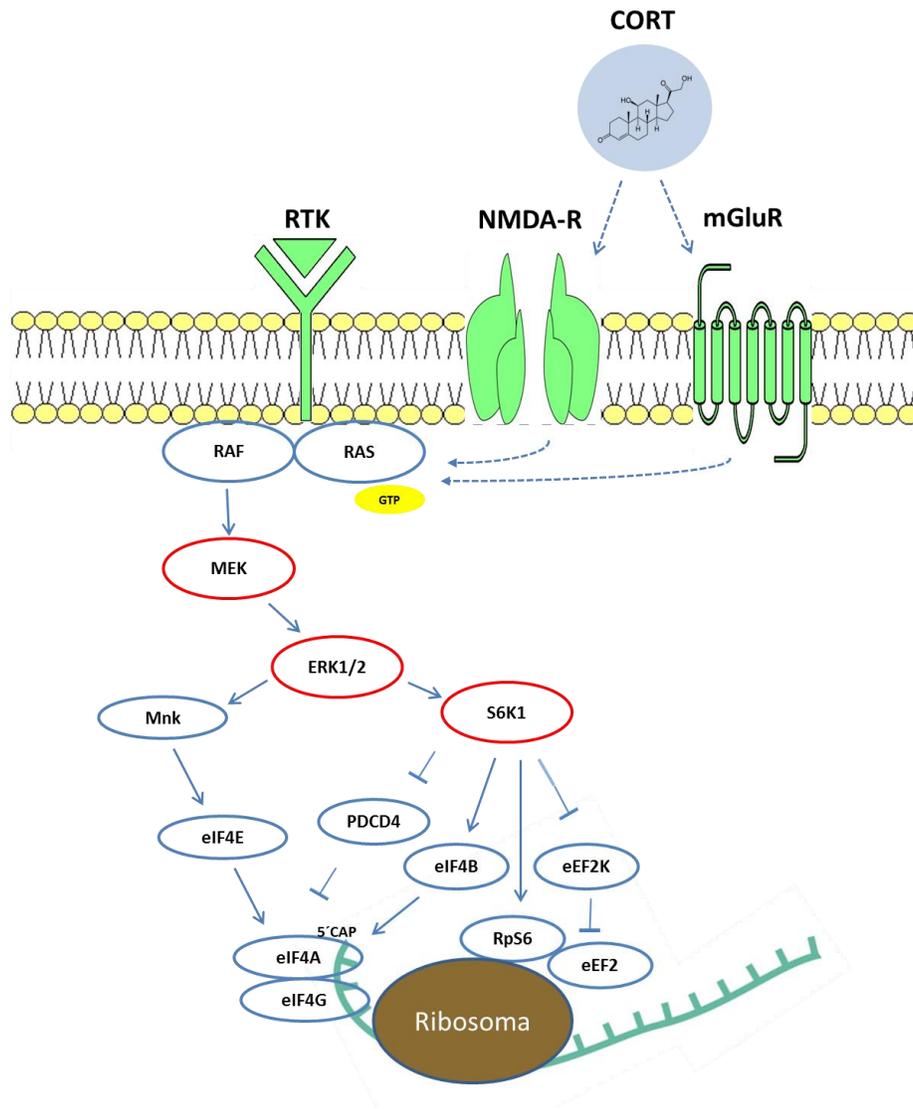


Figura 3: Vía MAPK ERK1/2 y su relación con el control de la traducción. La estimulación con GCs produce un aumento de la actividad glutamatérgica que activa los receptores NMDA-R y mGluR, los que indirectamente activan a RAS. Por otra parte, algunos RTKs activan directamente la vía. La activación de la vía produce una fosforilación del factor de iniciación eIF4E, mediada por las MAPK ERK1/2, que es clave en el proceso de iniciación de la traducción. Además, la S6K1 controla tanto factores de iniciación como de elongación.

2. HIPÓTESIS

A la fecha, solo se ha registrado en un modelo de cultivo hipocampal primario que la fosforilación de FMRP depende la estimulación de los mGluR1/5, pero no se ha reportado ningún cambio en el estado de fosforilación ante otro estímulo y, más importante aún, no existen estudios que den cuenta de cambios del estado de fosforilación de esta proteína en modelos *in vivo* (Narayanan et al., 2007).

Dado que los antecedentes apuntan a una respuesta rápida ejercida por los GCs en el tejido neuronal hipocampal, mediada por cascadas transduccionales que podrían tener relación con la regulación de la FMRP (Figura 4), y por consiguiente su función, se propone la siguiente hipótesis:

“El estrés agudo por restricción de movimiento promueve un aumento en el estado de fosforilación de la FMRP en hipocampo de rata, efecto que se correlaciona a la activación de las vías PI3K-AKT-mTORc1 y MAPK ERK 1/2”

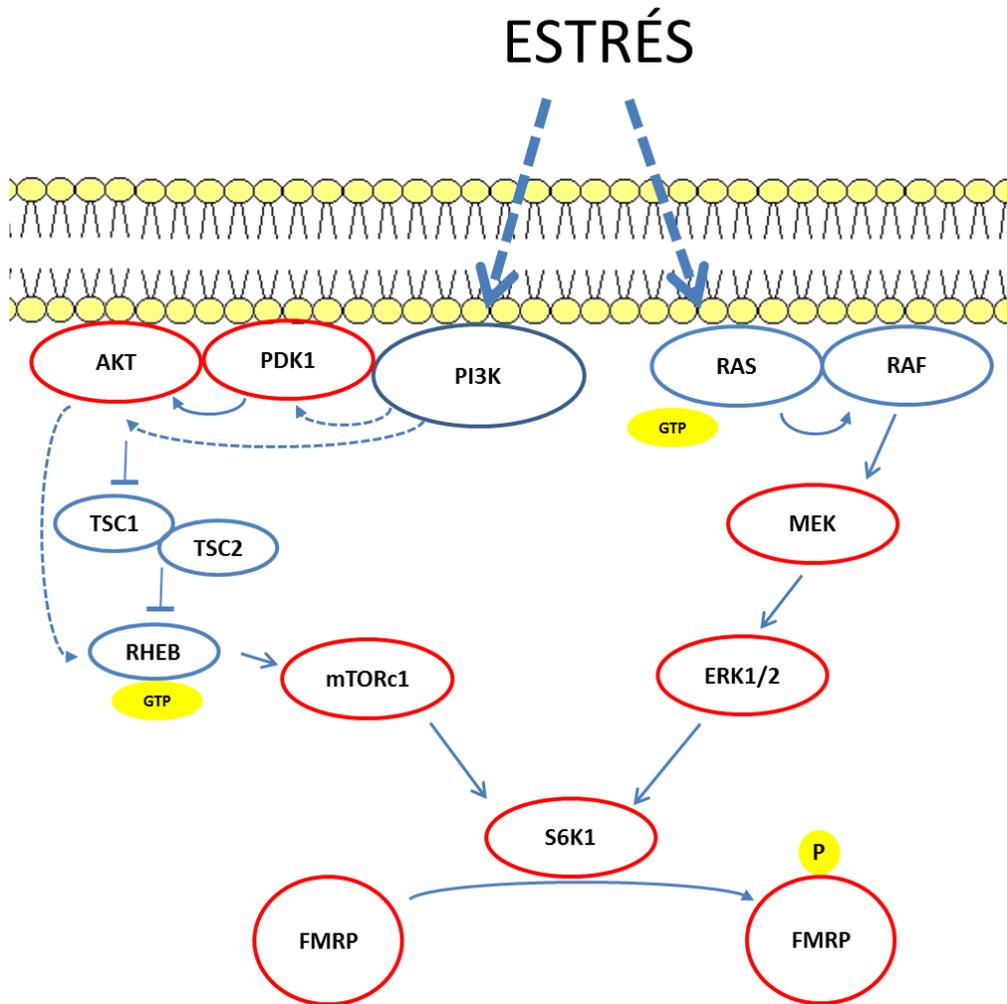


Figura 4: Esquema propuesto de las vías transduccionales que regulan a la FMRP. Las flechas discontinuas indican relación indirecta; las flechas continuas indican relación directa. El estrés agudo por restricción de movimiento activa las vías de la PI3K/AKT/mTORc1 y MAPK ERK1/2, quienes en conjunto activan a la S6K1, encargada de fosforilar a la FMRP.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Determinar los efectos del estrés agudo por restricción de movimiento en el estado de fosforilación de la FMRP y su asociación a las vías AKT-mTORc1-S6K1 y MAPK en hipocampo de rata (Figura 4).

3.2. Objetivos específicos:

- 1.- Determinar la activación de vías transduccionales relacionados a la fosforilación de la FMRP en respuesta al estrés por restricción de movimiento en hipocampo de rata.
- 2.- Determinar si el estrés por restricción de movimiento cambia el patrón de fosforilación de FMRP en hipocampo de rata.
- 3.- Determinar si existe relación entre los niveles de la FMRP con su correspondiente nivel de ARNm en hipocampo de rata.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. REACTIVOS GENERALES

- **BioRAD Laboratories** (Hercules, CA, EE.UU.): azul de bromo fenol, persulfato de amonio.
- **Merck** (Darmstadt, Alemania): KCl, etanol absoluto (p.a.), acetona (p.a.), cloroformo (p.a.), KH_2PO_4 , ditiotreititol, glicerol, Tween 20, Triton X-100, Tris HCl.
- **Sigma-Aldrich** (Saint Louis, MO, EE.UU.): Rojo Ponceau, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, HEPES, EGTA, albúmina de suero de bovino, EDTA.
- **Winkler** (Santiago, Chile): Tris-base, Bis, *N*, *N'*-metilen-bis-acrilamida, acrilamida, NaCl, SDS, glicina, sacarosa, Na_2HPO_4 .
- **Invitrogen** (Carlsbad, CA, EE.UU.): TEMED.
- **Roche** (Basilea, Suiza): Cóctel inhibidor de proteasas 25X, inhibidor de fosfatasa 25X.
- **Thermo Scientific** (Waltham, MA, EE.UU.): Estándar de masa molecular para geles de poliacrilamida, kit de ensayo de proteínas BCA.
- **Biological Industries** (Kibbutz Beit-Haemek, Israel): Sustrato quimioluminiscente para la detección de la actividad de la peroxidasa conjugada a los anticuerpos secundarios (EZ-ECL).
- **Enzo Life Science** (Farmingdale, NY, EE.UU.): Kit de determinación de corticosterona.

4.2. Animales y procedimiento de estrés agudo

Se trabajó con ratas *Sprague Dawley* macho, con un peso entre 220-250 g al inicio de los experimentos, las cuales fueron criadas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile en condiciones estandarizadas de ciclo luz-oscuridad de 12 horas, a una temperatura de $\pm 22^\circ \text{C}$ y con una humedad de 45%. Los animales tuvieron libre disponibilidad de agua y alimentos, y se pesaron diariamente hasta alcanzar alrededor de 300 g para acostumbrarlos a la manipulación humana por una semana. Las ratas se dividieron en dos grupos experimentales: estrés agudo y grupo control.

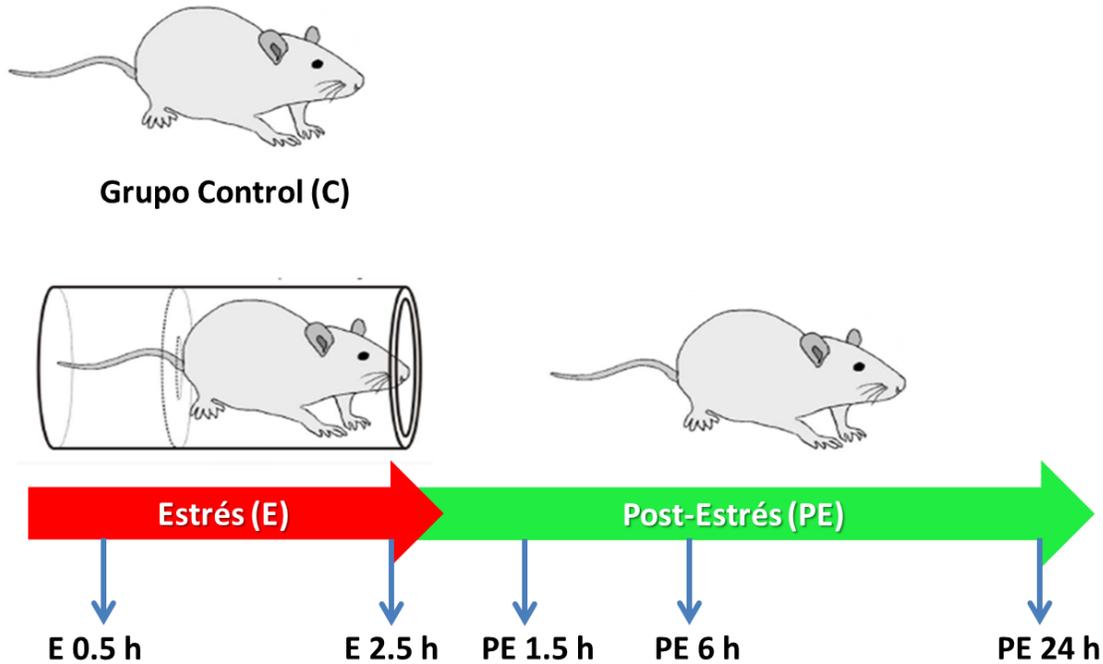


Figura 5: Modelo experimental de estrés por restricción de movimiento. Se establecieron distintos grupos experimentales: grupo control (C) que no es sometido a estrés, el grupo que es sometido a restricción de movimiento durante 0,5 h (E 0,5) o durante 2,5 h (E 2,5), los cuales fueron sacrificados inmediatamente al finalizar el período de estrés. Para determinar la evolución de la respuesta de estrés, animales fueron estresados durante 2,5 h y se sacrificaron después de 1,5 h (PE 1,5), de 6 h (PE 6) y de 24 h (PE 24) post período de estrés.

En este estudio no se consideró la utilización de ratas hembras puesto a que éstas presentan ciclo estral (4 días) donde se observan variaciones de hormonas sexuales (estradiol y la progesterona) las cuales pueden influir sobre los parámetros evaluados.

Se utilizó el modelo de estrés por restricción de movimiento, el que consiste en mantener a los animales en tubos de acrílico transparente (80 mm de diámetro) para disminuir su capacidad de movimiento, pero no para inmovilizarlos completamente. Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo establecido en el laboratorio, en una sola sesión de 2,5 horas, tiempo durante el cual los animales no tuvieron acceso a agua ni a comida. Además, las sesiones de restricción de movimiento se realizaron durante la mañana (entre 9:00 AM y 12:00 PM) para evitar efectos no específicos debido a ciclos circadianos. Se cuantificó el número de heces defecadas por los animales durante la sesión de estrés. Posteriormente, los animales se eutanasiaron con una guillotina a distintos tiempos

durante y después del protocolo de estrés: a 0,5 horas (E 0,5) y 2,5 horas (E 2,5) de haberlos introducidos al tubo, y a 1,5 horas (PE 1,5), 6 horas (PE 6) y 24 horas (PE 24) posterior al término de la sesión de estrés. Rápidamente y en condiciones estériles y libres de nucleasas, se extrajeron los hipocampos totales y se dividieron en hemisferio derecho e izquierdo. Luego se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. A su vez, se recolectó una muestra de sangre en un tubo falcon sin anticoagulante para obtener una fracción de suero.

4.3. Determinación de los niveles séricos de corticosterona

La muestra de sangre se centrifugó a $4000 \times g$ durante 15 minutos. El suero obtenido se almacenó en un refrigerador a -20°C para la determinación cuantitativa de los niveles séricos de corticosterona mediante un ensayo inmunoenzimático con un rango de detección de 32 - 20,000 pg/mL. Se realizó la dilución de los estándares de la hormona (32, 160, 800, 4000, 20000 pg/mL) y de las muestras (1:40) en el amortiguador proporcionado por el fabricante. A continuación, se agregó 100 μL de las diluciones en una placa de 96 pocillos, la cual está previamente recubierta con un anticuerpo (anti oveja Ig G) que reconoce al anticuerpo que se une específicamente a la corticosterona (preparado en cabra). Sobre ella se agregaron 50 μL de corticosterona conjugada a fosfatasa alcalina, la cual compite con la hormona presente tanto en las muestras como en los estándares por la unión al anticuerpo que reconoce a la corticosterona presente en la placa. Posteriormente, se adicionaron a todos los pocillos, excepto al blanco y al que determina la unión no específica, 50 μL de un anticuerpo policlonal que reacciona contra la corticosterona libre (conjugada y no conjugada). Después, se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con agitación suave y luego de tres lavados con 400 μL de un amortiguador provisto por el fabricante, se agregó el sustrato de la fosfatasa alcalina (p-nitrofenilfosfato) el cual genera un producto de color amarillo (p-nitrofenol). Luego de una hora se detuvo la reacción mediante la adición de una solución provista por el fabricante. A continuación, se determinó la absorbancia del producto coloreado a 405 nm

en un lector de placa (Expert 96, Asys Hitech, Augendorf, Austria). La lectura de la absorbancia de la curva estándar se usó para calcular la concentración de corticosterona en los sueros de los animales.

4.4. Obtención de los extractos de proteínas totales de hipocampo para Western blot

Los hipocampos congelados se homogeneizaron en un homogeneizador vidrio-vidrio en 200 μ L de amortiguador de lisis (Tris HCl 50 mM pH = 7,0 , NaCl 150 mM, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,5 mM, Tritón X-100 1,0%) y en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas y cóctel de inhibidores de fosfatasa. Las muestras se sonicaron (Transsonic Digital D-78224 SinGen/HTW, ELMA, Alemania) a 4°C durante cinco minutos y luego fueron centrifugadas (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Alemania) a 21.380 x g durante 30 minutos a 4°C y se descartó el sedimento. En el sobrenadante se realizó la cuantificación de las proteínas mediante un kit que se basa en el método del ácido bicinonínico (Sapan et al., 1999) en microplacas y que utiliza suero bovino albúmina (BSA) como estándar y se midió la absorbancia a 562 nm. Una vez conocida la concentración de proteínas, las muestras se desnaturaron en una relación 3:1 con un amortiguador de carga (concentración final de: Tris 250 mM pH 6,8, SDS 5%, glicerol 6,7% v/v, DTT 0,512 mg/mL, azul de bromo fenol 13,33 mg/mL). Finalmente, las muestras se alicuotaron e hirvieron a 100°C durante 10 minutos y por último, éstas se congelaron a -80°C para su análisis mediante Western blot.

4.5. SDS-PAGE y Western blot

Las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida-SDS, utilizando un gel concentrador compuesto por 5% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), SDS 0,1%, Tris 125 mM a pH 6,8 y el gel separador por Tris 375 mM pH 8,8; SDS 0,1% y 12% o 15% de

acrilamida/bis-acrilamida (29:1). La electroforesis se realizó en una cámara Mini Protean III (BioRad, EE.UU.) con amortiguador de electroforesis Tris 2,5 mM, SDS 0,01%, glicina 19 mM. Luego, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de poro de 0,2 μm (BioRad, EE.UU.) en una celda de transferencia mini Trans-blot (mini Protean III, BioRad, EE.UU.), con amortiguador de transferencia se utilizó glicina 19 mM, Tris 2,5 mM en metanol 20% v/v para proteínas menores a 100 kDa, y metanol 5% para proteínas mayores a 100 kDa. La transferencia se realizó en una fuente con hielo (aproximadamente a 4°C). Posteriormente, las membranas se lavaron con PBS 1X con o sin Tween 20 o TBS 1X con o sin Tween 20, dependiendo de las proteínas a evaluar.

Las incubaciones de anticuerpo primario se realizaron durante toda la noche en las condiciones descritas en la Tabla 2. Luego de incubar con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno en el amortiguador en el cual fue utilizado el anticuerpo en cuestión. Después, se incubaron las membranas con el anticuerpo anti especie en una dilución 1:10000 en Leche 3% p/v TBS-Tween 0,1% v/v durante dos horas, posterior a lo cual se repitieron los tres lavados de cinco minutos en el amortiguador correspondiente.

Para el revelado de las membranas, se incubó con el sustrato de quimioluminiscencia para la peroxidasa durante un minuto. Para la exposición de las membranas se utilizó el equipo G:BOX Chemi XT4 (Syngene, Frederick, MD, EE.UU) y su software GeneSys. Las bandas obtenidas se analizaron mediante densitometría con el programa UN-SCAN-IT gel, Automated Digitizing System Versión 4,1 Windows (Silk Scientific Inc., Orem, UT, EE.UU.). Para determinar cambios semicuantitativos, la intensidad de banda de las proteínas se normalizó respecto de la intensidad de banda de la proteína constitutiva β -actina, o a la forma total de la misma y finalmente se relativizó con respecto al control.

Tabla 2: Condiciones utilizadas para el análisis por Western blot.

PROTEÍNA	Peso Molecular	Nº CATÁLOGO	FABRICANTE	HOSPEDERO	DILUCIÓN	SOLUCIÓN DE BLOQUEO E INCUBACIÓN
p-AKT (Ser473)	60 kDa	9271S	Cell Signalling	Conejo	1:500	Leche 0,5%-PBS 1X
AKT total	60 kDa	4691P	Cell Signalling	Conejo	1:500	Leche 2%-PBS 1X
p-PDK1 (Ser241)	58-66 kDa	3438P	Cell Signalling	Conejo	1:10000	BSA 3%-TBS 1X Tween 0.1%
p-mTOR (Ser2448)	290 kDa	ab51044	Abcam	Conejo	1:2000	BSA 5%-TBS 1X Tween 0.1%
mTOR total	290 kDa	ab2732	Abcam	Conejo	1:1000	Leche 5%-TBS 1X Tween 0.1%
S6K1-P (S389)	70 kDa	9234	Cell Signalling	Conejo	1:1000	BSA 1%-TBS 1X Tween 0,1%
S6K1 total	70 kDa	2708	Cell Signalling	Conejo	1:2000	BSA 3%-TBS 1X Tween 0.1%
MEK-P	45 kDa	9121	Cell Signalling	Conejo	1:5000	BSA 5%-TBS 1X Tween 0.1%
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	44/42 kDa	4377	Cell Signalling	Conejo	1:500	Leche 3%-TBS 1X Tween 0.1%
ERK1/2 total	44/42 kDa	F1708	Santa Cruz	Conejo	1:1000	Leche 3%-PBS 1X
p-FMRP (Ser499)	70 kDa	ab48127	Abcam	Conejo	1:250	BSA 3%-TBS 1X Tween 0.1%
FMRP total	70 kDa	4317	Cell Signalling	Conejo	1:1000	BSA 3%-TBS 1X Tween 0.1%
ARC	55 kDa	156002	Synaptic System	Conejo	1:1000	Leche 1%-PBS 1X
c-FOS	41 kDa	ab7963	Abcam	Conejo	1:200	BSA 5%-PBS 1X Tween 0,1%
ACTB	42 kDa	A5316	Sigma	Ratón	1:5000	Leche 3%-TBS 1X Tween 0.1%

4.6. Obtención de ARN mayores de 200 nt

El tejido hipocampal se homogeneizó en hielo con Ultraturax (OMNI International, Tissue Master 125) en 700 μ L de la solución comercial QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, California, EEUU) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se agregó 140 μ L de cloroformo, se agitó suavemente por 15 seg y se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Después, se centrifugó por 15 min a 12000 x g a 4°C y se recuperó la fase acuosa, a la cual se agregó un volumen de etanol 70% y se mezcló. Para obtener un mejor rendimiento y calidad de la muestra y separar los ARN mayores a 200 nt, se vertió el extracto en una columna comercial RNeasy Mini spin column (Qiagen, California, EEUU), donde se centrifugó a 8000 x g por 15 seg a temperatura ambiente. Se realizó un lavado con amortiguador RWT (Qiagen, California, EEUU) y dos lavados más con amortiguador RPE (Qiagen, California, EEUU). Finalmente, se realizó dos eluciones consecutivas con un volumen de 15 μ L de H₂O libre de Nucleasas, obteniendo un volumen final de 30 μ L. La integridad de la muestra fue evaluada con un gel desnaturante de agarosa y su concentración fue cuantificada por método espectrofotométrico (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific).

4.7. Transcripción Inversa y PCR cuantitativo

Se realizó la transcripción inversa con 5000 ng de ARN, 500 µg de partidores oligo dT (Invitrogen, California, EEUU) y 0,01 µg de cada nucleótido (Invitrogen, California, EEUU). La mezcla se calentó por 5 min a 65°C y luego se enfrió rápidamente en hielo para desnaturar las hebras de RNA. Luego, se agregó amortiguador 5X First Strand Buffer (Invitrogen, California, EEUU), 40 U de inhibidor de RNAsa rRNasin (Promega, Wisconsin, EEUU) y 0,2 µmol de DTT, se mezcló y se calentó por 5 min a 42°C para que los partidores se apareen al ARN mensajero. Finalmente, se agregó 200 U de Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA), se completó a un volumen final de 20 µL y se incubó a 42°C por 50 min y después a 70°C por 15 min. El primer calentamiento sirve para que la enzima realice la retrotranscripción, mientras que la segunda fase de alta temperatura sirve para inactivar la enzima.

Para el PCR cuantitativo se utilizó 10 ng de ADNc como molde. Además, se agregó partidores a una concentración final de 0,12 µM y se mezcló con Brilliant II Ultra-fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) y se completó a un volumen final de 20 µL. Se utilizó un perfil térmico estándar para todas las amplificaciones, que consiste de las siguientes fases: desnaturación inicial a 95°C por 10 min, 40 ciclos de desnaturación a 95°C por 15 seg, alineamiento a 60°C por 15 seg y extensión a 72°C por 20 seg. Cada reacción fue realizada en duplicado con su blanco y se llevó a cabo su curva de fusión para corroborar la presencia de un solo amplicón. La cuantificación se calculó en base al método del $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ corregido por las eficiencias de los partidores (Schmittgen y Livak, 2008). Los partidores utilizados con sus respectivas eficiencias se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3: Partidores utilizados para análisis por PCR cuantitativo.

GEN	NÚMERO DE ACCESO	PARTIDOR SENTIDO (5'→3')	PARTIDOR ANTISENTIDO (5'→3')	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (PB)	EFICIENCIA (%)
<i>ActB</i>	NM_031144.3	TTGTCCCTGTATGCCTCTGGTC	ACCGCTCATTGCCGATAGTG	346	94,7
<i>CypA</i>	NM_017101.1	CGAGCTGTTGCAGACAAAG	CAAAGACCACATGCTTGCC	324	100
<i>Arc</i>	XM_006241734.1	GCATCTGTTGACCGAAGTGTC	GCACCCAAGACTGGTATTGCTG	455	138
<i>c-Fos</i>	NM_022197.2	CTGCAGCCAAGTGCCGGAATC	TGACCGGCTCCAAGGATGGCT	321	130,4
<i>Fmr1</i>	XM_006229536.1	TTGCCACCAAGTCCCTACC	AGTGGCATTAGCGATGCTGT	243	125,9

4.8. Análisis Estadístico

Para el análisis se utilizó el programa computacional estadístico GraphPadPrisma versión 4.0 (GraphPad Software Incorporated). Las muestras se analizaron por test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de comparación múltiple de Dunn's, test no paramétrico de Mann Whitney y t-test pareado, todos con un intervalo de confianza del 95%.

5. RESULTADOS

En esta memoria se evaluaron durante y posterior al periodo de estrés, modificaciones en marcadores fisiológicos, marcadores de actividad sináptica y vías transduccionales asociadas a la regulación de la FMRP, tanto a nivel de transcritos como a nivel de proteínas. Para esto, se establecieron distintos grupos experimentales: el grupo control (**C**) el cual no es sometido a estrés, el grupo que es sometido a restricción de movimiento durante 0,5 horas (**E 0,5**) o durante 2,5 horas (**E 2,5**), los cuales fueron sacrificados inmediatamente al finalizar el periodo de estrés. Para determinar la evolución de la respuesta de estrés, otros grupos de animales fueron estresados durante 2,5 horas y se sacrificaron después de 1,5 horas (**PE 1,5**), de 6 horas (**PE 6**) y de 24 horas (**PE 24**) post-período de estrés.

5.1. Marcadores de estrés y actividad sináptica

5.1.1. Niveles de corticosterona plasmática

El estímulo de restricción de movimiento activa el eje neuroendocrino HHA, produciendo un rápido aumento en los niveles de las hormonas CRH y ACTH que median la liberación de CORT en la corteza suprarrenal, hormona que media la respuesta fisiológica. Al analizar los valores séricos de CORT se observa que durante la sesión de estrés se produce un aumento significativo tanto en animales E 0,5 y E 2,5 en relación al grupo control (Figura 6A, Kruskal Wallis, $p=0,0012$). Estos niveles se reestablecen al valor del control a las 1,5 horas posterior a la sesión. Además, 24 horas post-estrés se observa que los niveles de CORT son más elevados que el grupo control (Figura 6B, t-Test de Mann Whitney de una cola, $p=0,0087$).

5.1.2. Cuantificación de heces durante la sesión de estrés

Se ha documentado que el estrés por restricción de movimiento produce un aumento en la cantidad de heces defecadas por las ratas, debido a la liberación central de CRH (Nakade et al., 2007; Nakade et al., 2007). Es por esto que la cuantificación de las heces

durante la sesión de estrés representa una aproximación no invasiva que permite evaluar el estado de estrés del animal.

En la Figura 6C se observa que durante la sesión de estrés todas las ratas defecan 4 a 5 veces más, en comparación a las ratas del grupo control. Al normalizar respecto a la extensión del tiempo de restricción se observa que la mayor evacuación de heces se realiza durante la primera media hora de estrés (Figura 6D).

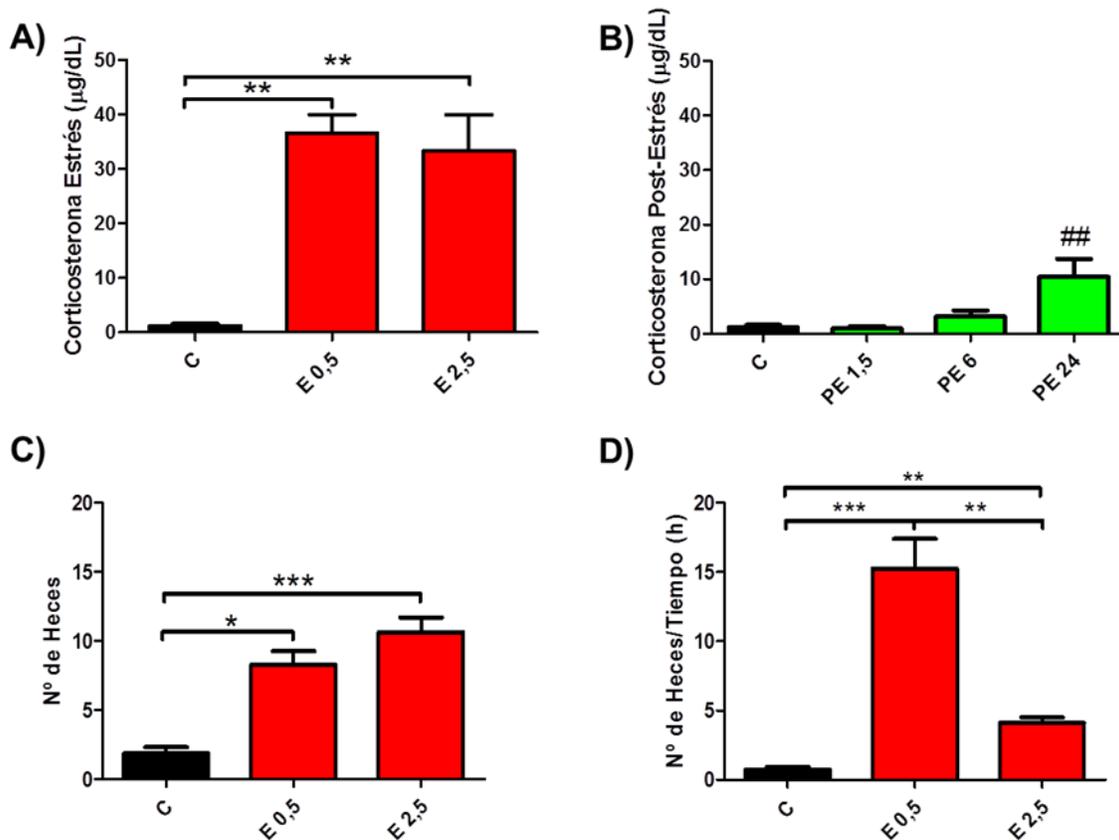


Figura 6: Marcadores fisiológicos de la respuesta de estrés. (A) Niveles de CORT durante y (B) posterior la sesión restricción de movimiento. Los niveles de CORT fueron determinados en suero mediante EIA. En A y B los datos representan el promedio \pm EEM de animales C (n=7), E 0,5 (n=7), E 2,5 (n=7), PS 1,5 (n=3), PS 6 (n=7) y PS 24 (n=7); P=0,0012 (estrés) y P= 0,0698 (post-estrés). (C) Niveles de heces durante el período de estrés. Las heces evacuadas aumentan significativamente a E 0,5 y E 2,5. (D) Niveles de heces durante el período de estrés normalizados por el tiempo de restricción. Se observa un mayor aumento en E 0,5 respecto al grupo control. Las distintos grupos para C y D corresponden a: C (n=7), E 0,5 (n=7) y E 2,5 (n= 17). Los resultados representan el promedio \pm EEM, éstos se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis, con post test de Dunn. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. ##p<0,01: PE 24 v/s C. Análisis por t-Test de Mann Whitney.

5.1.3. Determinación del transcrito *c-Fos* como marcador de actividad sináptica

Para determinar si el estrés agudo por restricción de movimiento provoca efectos a nivel hipocampal, se evalúan los niveles de transcrito del gen *c-Fos* como marcador de actividad sináptica. *c-Fos* es un gen de respuesta temprana (EGR), lo que significa que los niveles de su transcrito aumentan, en forma independiente de la síntesis de proteína, en respuesta a la exposición de un animal a un estímulo que produce activación de receptores celulares asociados a factores neurotróficos, neurotransmisores, influjos de calcio y/o depolarizaciones (Kovács, 1998).

Se observa que a los 30 min de estrés hay un aumento de los niveles del transcrito de *c-Fos*, el cual disminuye al final de la sesión de estrés. A las 24 horas posteriores a la sesión de restricción se observa un aumento significativo en sus niveles (Figura 7), lo que se correlaciona con un aumento en la CORT observada en esa temporalidad (Figura 6).

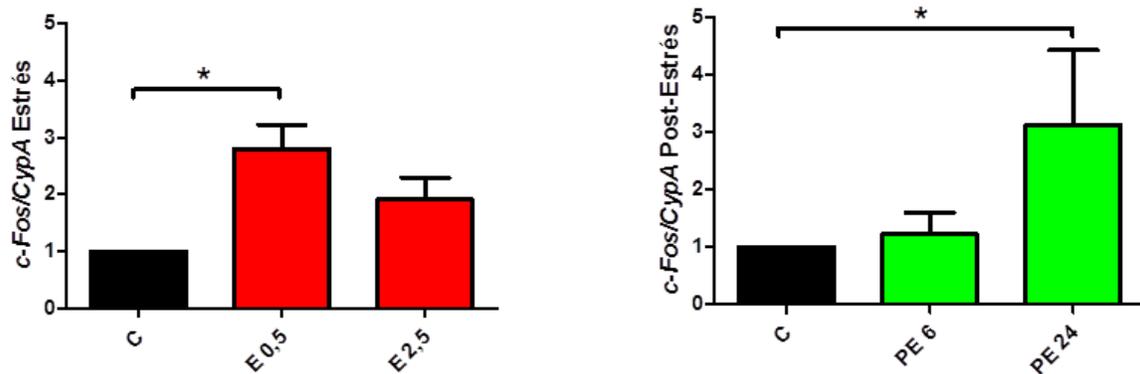


Figura 7: Cambios en los niveles del transcrito *c-Fos* durante y posterior al período de estrés. Representación gráfica de los resultados de qPCR obtenidos para el transcrito *c-Fos* normalizado por *CypA*. Las condiciones corresponden a: C (n=5), E 0,5 (n=5), E 2,5 (n=5), PE 6 (n=5) y a las 24 horas post estrés (n=5); $P=0,0206$ (estrés) y $P= 0,0344$ (post-estrés). Se observa un aumento significativo en los niveles de *c-Fos* a la 0,5 hrs. de estrés y 24 hrs. post-estrés. Los resultados representan el promedio \pm EEM, éstos se analizaron por análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, con post test de Dunn. * $p<0,05$.

5.1.4. Determinación de los niveles del transcrito *Arc* y proteína ARC como marcadores de actividad sináptica.

Se ha descrito que el estrés produce un aumento de la actividad sináptica excitatoria (Moghaddam et al., 1994). De acuerdo a esto, se evaluaron los niveles de transcrito del gen *Arc* (Korb y Finkbeiner, 2011), puesto que es usado como marcador de actividad sináptica en respuesta a procesos de aprendizaje y memoria (Shepherd y Bear, 2011).

Se observa un aumento del ARNm de *Arc* a la media hora de iniciada la sesión de estrés (t-Test pareado de una cola, $p= 0,0106$; Figura 8A), valores que retornan a niveles del control a las 2,5 h de estrés. Por otra parte, en 24 PE se observa un aumento significativo de aproximadamente 2,4 veces respecto al control (Figura 8B).

En relación a los niveles de proteínas (Figura 8C), se observa que durante la sesión de estrés en E 0,5 los niveles de ARC respecto a actina aumentan en aproximadamente un 40% respecto al control (Figura 8D). En PE 1,5 se observó el mayor aumento, correspondiente a aproximadamente 3 veces en relación al control. Dichos niveles vuelven a valores muy similares a los del estrés a las 6 horas posterior a la sesión, retornando a los niveles del control a las 24 horas (Figura 8E).

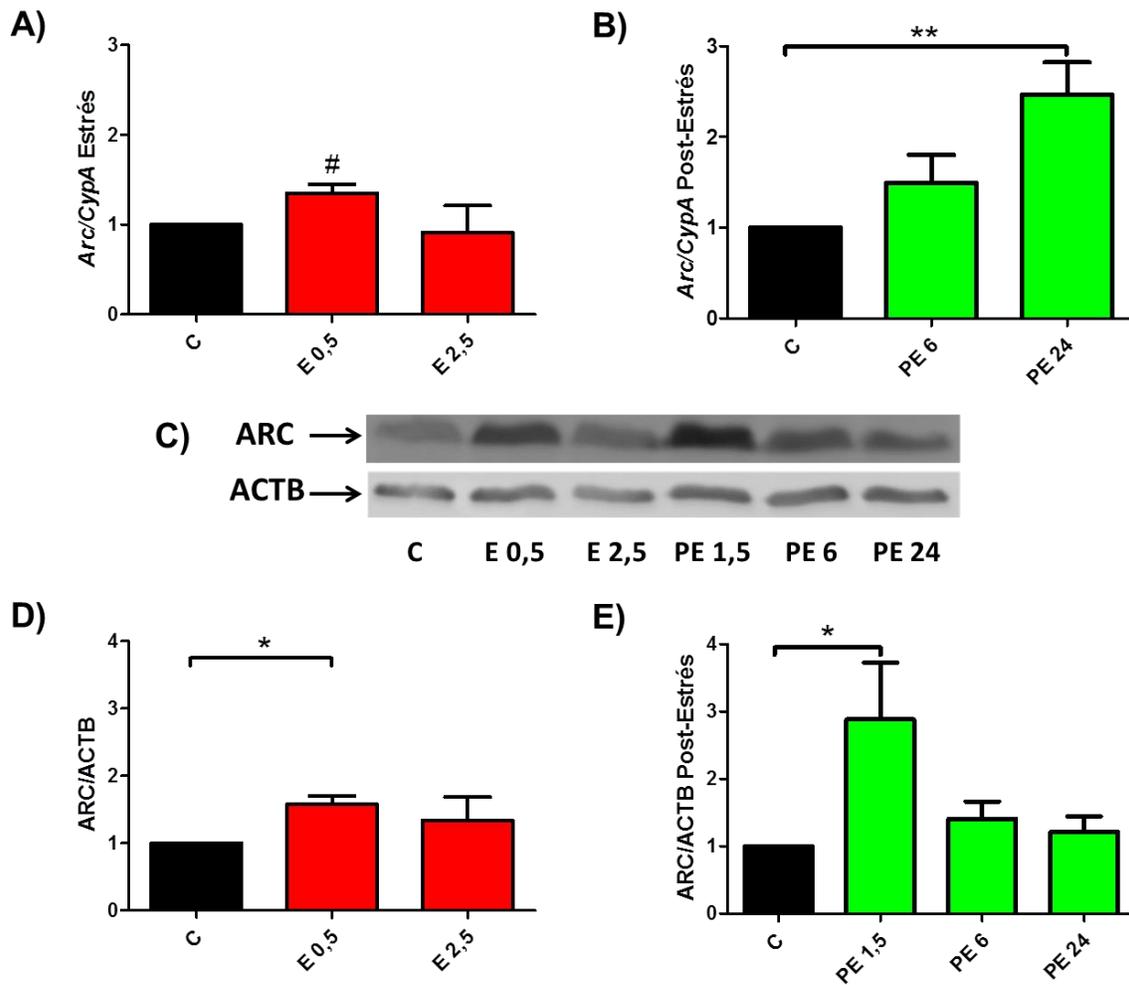


Figura 8: Variación de los niveles del transcrito *Arc* y proteína ARC durante y después de la sesión de estrés. Representación gráfica del análisis por qPCR para *Arc* normalizado por *CypA* durante la sesión de estrés **(A)** y posterior al estrés **(B)**. Se observa un aumento significativo en los niveles del transcrito en PE 24. Las gráficas **B** y **C** representan el promedio \pm EEM de C (n=5), E 0,5 (n=5), E 2,5 (n=5), PE 6 (n=5) y PE 24 (n=5); P= 0,0543 (estrés) y P= 0,0127 (post-estrés). **(C)** Geles representativos del Western blot para ARC y ACTB. Representación gráfica del Western blot para ARC normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(D)** y posterior al estrés **(E)**. Se observa un leve aumento en los niveles de la proteína ARC en E 0,5, y un mayor aumento en PE 1,5. Las gráficas **D** y **E** muestran el promedio \pm EEM de C (n=7), E 0,5 (n=7), E 2,5 (n=7), PE 1,5 (n=3), PE 6 (n=7) y PE 24 (n=7); P=0,0259 (estrés) y P=0,0418 (post estrés). Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn. *p<0,05, **p<0,01 #p<0,01: E 0,5 v/s C. Análisis por t-Test pareado de una cola.

5.2. Relación del estrés con la activación de vías transduccionales

La activación de las vías AKT-mTORc1 y MAPK ERK1/2 confluyen en la fosforilación de la S6K1, que es la única quinasa de la FMRP reportada a la fecha. Se determinó cambios en la actividad de estas vías durante y posterior a la sesión de estrés.

5.2.1. Vía AKT-mTORc1-S6K1

Se determinó la activación de la vía AKT-mTORc1-S6K1 en extractos totales hipocampales. Para ello, se evaluó la variación del estado de fosforilación de estas proteínas en relación a los niveles de β -actina (ACTB, control de carga) y/o en relación a los niveles de la proteína total, datos que fueron normalizados respecto al grupo control.

De esta forma, se evaluó los niveles de fosforilación de la proteína PDK1, la cual está involucrada en la fosforilación de AKT. Se observó que durante la sesión de estrés los niveles de fosforilación no cambian en relación al control (Figura 9B). Sin embargo, en el grupo PE 6 se observó un aumento de alrededor de 1,25 veces el control (t-Test pareado de una cola, $p = 0,0261$), mientras que en el grupo PE 24 se observó un aumento de aproximadamente 1,3 veces respecto al grupo control (Figura 9C).

Río abajo de la PDK1 se midieron los niveles de p-AKT relativos a AKT, donde no se observó cambio ni durante ni después de la sesión de estrés (Figuras 10B y 10C). Sin embargo, al analizar los niveles de la p-AKT normalizados por ACTB se observa una disminución sólo en PE 24 (Figuras 10D y 10E). Por otra parte, se observa un aumento en la fosforilación de AKT durante el estrés (0,5 y 2,5 h) respecto al nivel observado a las 24h (t-Test de Mann Whitney de una cola; $p = 0,0079$, t-Test de Mann Whitney de una cola, $p = 0,0317$, respectivamente). No se observó cambio significativo en los niveles de AKT total ni durante ni después de la sesión de estrés (Figuras 10F y 10G), por lo que el aumento en los niveles de fosforilación de AKT se debe a un aumento en la actividad de la vía.

Posteriormente, se evaluó los niveles de p-mTOR y mTOR total, ya que es un blanco de AKT y a su vez regula la actividad de la S6K1. La relación de p-mTOR/mTOR total, no se modificó ni durante ni después del periodo de estrés (Figuras 11B y 11C). Adicionalmente en los niveles de p-mTOR relativos a ACTB se observa que durante el período de estrés (0,5 y 2,5 h) existe un incremento en comparación a aquellos animales sacrificados 24 h después de la restricción (Figuras 11D y 11E)(t-Test de Mann Whitney de una cola; p=0,026, t-Test de Mann Whitney de una cola; p=0,026, respectivamente). Los niveles totales de la proteína no cambian ni durante ni posterior a la sesión de estrés (Figuras 11F y 11G).

Como último eslabón de la vía se estudió a la proteína S6K1, la cual es fosforilada directamente por la mTORc1 en la posición Ser389. Para evaluar su respuesta se midió los niveles de p-S6K1 (Ser389), S6K1 y la relación de cada una de éstas con ACTB. Al analizar los niveles de p-S6K1 normalizados por S6K1, no se obtuvieron conclusiones importantes debido al bajo número de réplicas experimentales (Figuras 12B y 12C). La misma conclusión se obtuvo al analizar los niveles de p-S6K1 relativos a ACTB (Figuras 12D y 12E). Los niveles totales de S6K1 relativos a ACTB no muestran cambios (Figuras 12F y 12G).

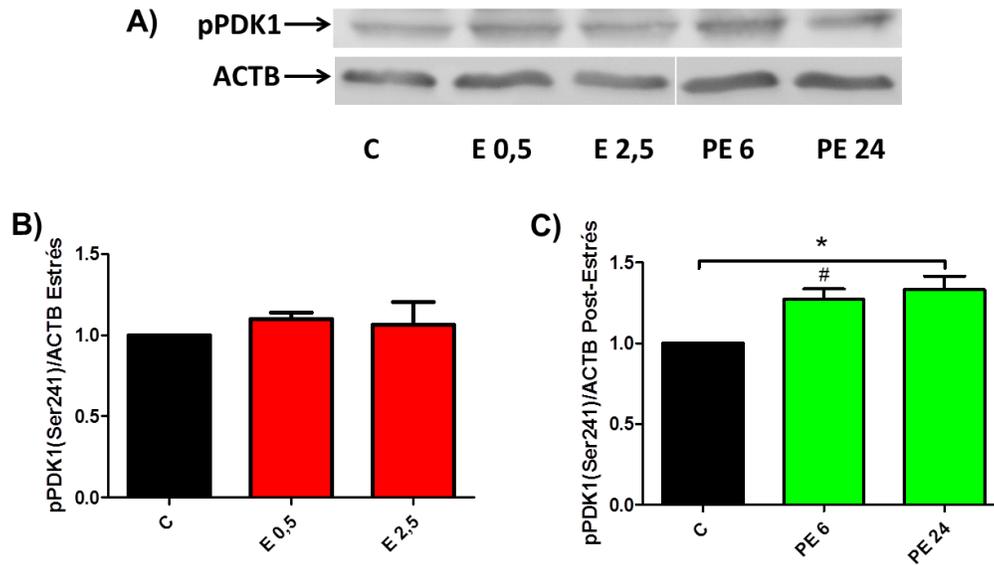


Figura 9: Variación en los niveles de p-PDK1(Ser241) posterior a la respuesta de estrés. (A) Geles representativos para p-PDK1 y ACTB. Representación gráfica del Western blot para p-PDK1 normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(B)** y posterior a la sesión de estrés **(C)**. Se observa un aumento de aproximadamente 1,3 veces los niveles de p-PDK1, respecto a los niveles del grupo control en PE 24. Los gráficos **B** y **C** muestran el promedio \pm EEM de C (n=3), S 0,5 (n=3), S 2,5 (n=3), PS 6 (n=3) y PS 24 (n=3); P=0,2793 (estrés) y P= 0,0281 (post-estrés). Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn. ***p<0,05**. #**p<0,05**: C v/s PE 6. Análisis por t-Test pareado de una cola.

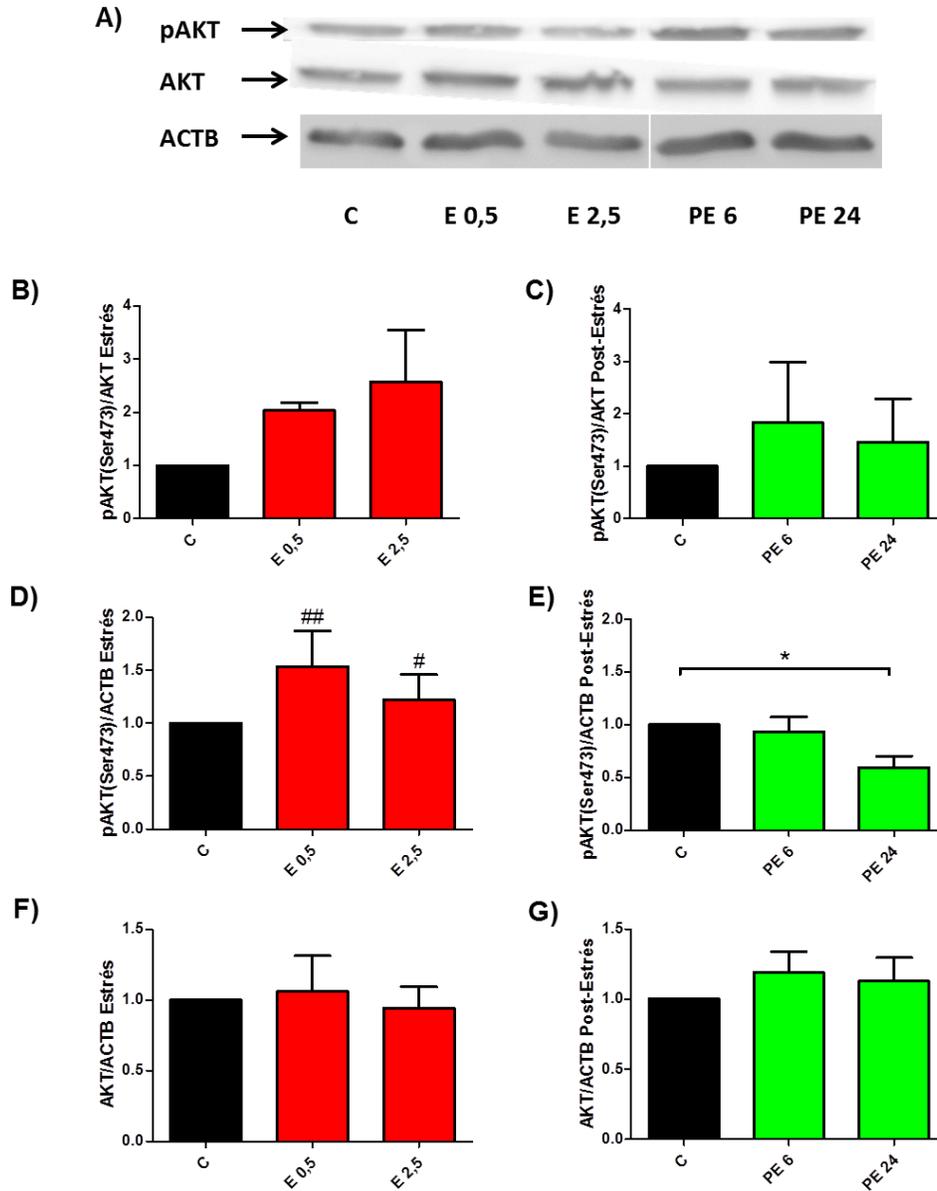


Figura 10: Variación en los niveles de p-AKT (Ser473) y AKT durante y posterior a la respuesta de estrés.

(A) Geles representativos para p-AKT(Ser473), AKT y ACTB. Representación gráfica del análisis por Western blot para los niveles p-AKT normalizado por AKT durante la sesión de estrés **(B)** y posterior a ésta **(C)**. Los gráficos **B** y **C** representan el promedio \pm EEM de C (n=3), S 0,5 (n=3), S 2,5 (n=3), PS 6 (n=3) y PS 24 (n=3); $P=0,0605$ (estrés) y $P=0,6611$ (post-estrés). Representación gráfica del análisis por Western blot para p-AKT normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(D)** y posterior a ésta **(E)**. Los gráficos **D** y **E** representan el promedio \pm EEM de C (n=5), S 0,5 (n=5), S 2,5 (n=5), PS 6 (n=4) y PS 24 (n=4); $P=0,1698$ (estrés) y $P=0,0199$ (post-estrés). Representación gráfica del análisis por Western blot para AKT normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(F)** y posterior a ésta **(G)**. Los gráficos **F** y **G** representan el promedio \pm EEM de C (n=3), S 0,5 (n=3), S 2,5 (n=3), PS 6 (n=3) y PS 24 (n=3); $P=0,7248$ (estrés) y $P=0,7248$ (post-estrés). Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn's. * $p<0,05$.

$p<0,05$, ## $p<0,01$: E 2,5 v/s PE 24, E 0,5 v/s PE 24 respectivamente. Análisis por t-Test de Mann Whitney de una cola.

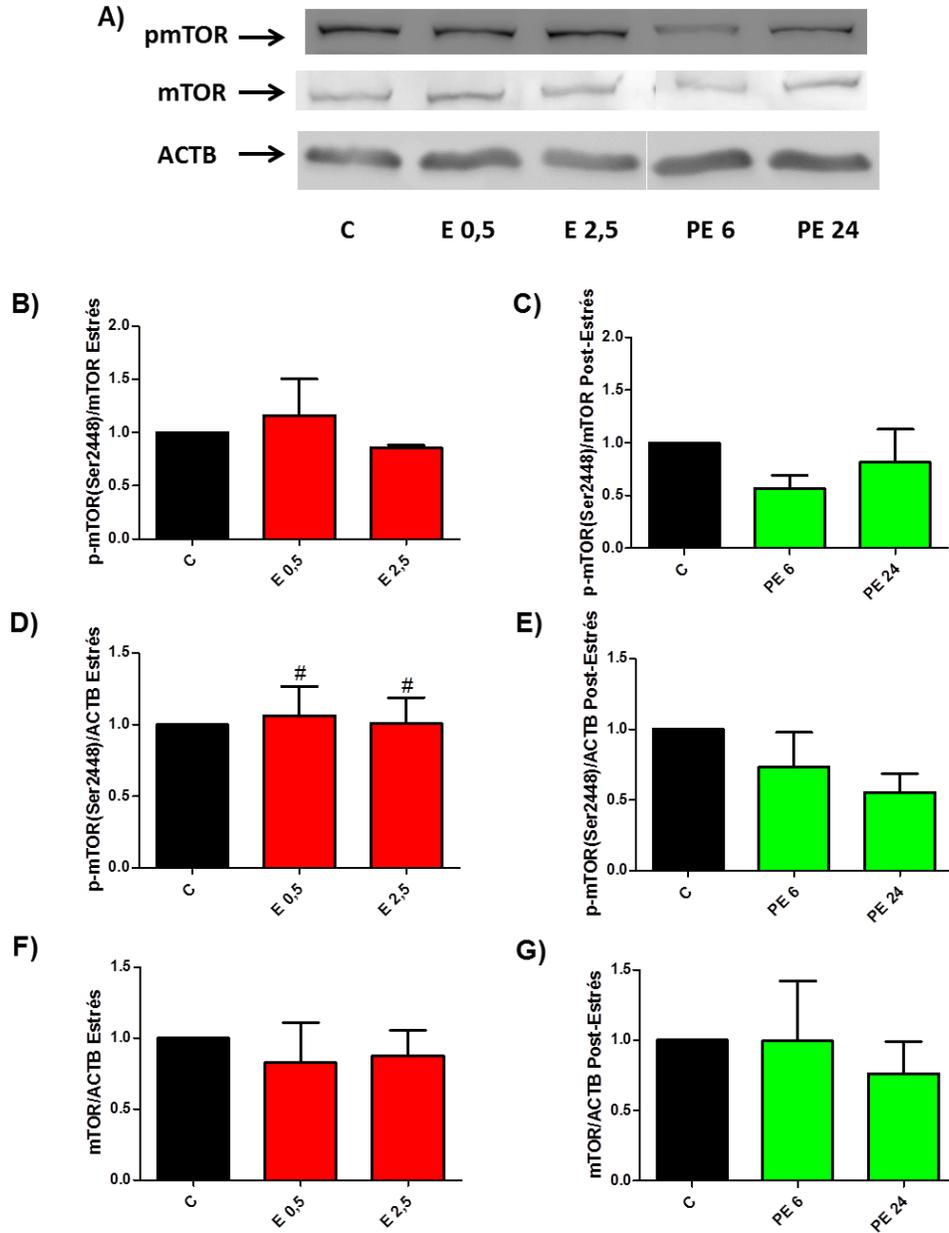


Figura 11: Variación en los niveles de p-mTOR (Ser2448) y mTOR durante y posterior a la respuesta de estrés. (A) Geles representativos para p-mTOR (Ser2448), mTOR y ACTB. Representación gráfica del análisis por Western blot para p-mTOR normalizado por mTOR durante la sesión de estrés (B) y posterior a ésta (C). Los gráficos B y C representan el promedio \pm EEM de C (n=3), S 0,5 (n=3), S 2,5 (n=3), PS 6 (n=3) y PS 24 (n=3); P=0,2890 (estrés) y P=0,2420 (post-estrés). Representación gráfica del análisis por Western blot para p-mTOR normalizado por ACTB durante la sesión de estrés (D) y posterior a ésta (E). Los gráficos D y E representan el promedio \pm EEM de C (n=6), S 0,5 (n=6), S 2,5 (n=6), PS 6 (n=5) y PS 24 (n=5); P=0,8438 (estrés) y P= 0,1338 (post-estrés). Representación gráfica del análisis por Western blot para mTOR normalizado por ACTB durante la sesión de estrés (F) y posterior a ésta (G). Los gráficos F y G representan el promedio \pm EEM de C (n=3), S 0,5 (n=3), S 2,5 (n=3), PS 6 (n=3) y PS 24 (n=3); P=0,6611 (estrés) y P=0,8355 (post-estrés). Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn. #p<0,05: E 2,5 v/s PE 24 y E 0,5 v/s PE 24. Análisis por t-Test de Mann Whitney de una cola.

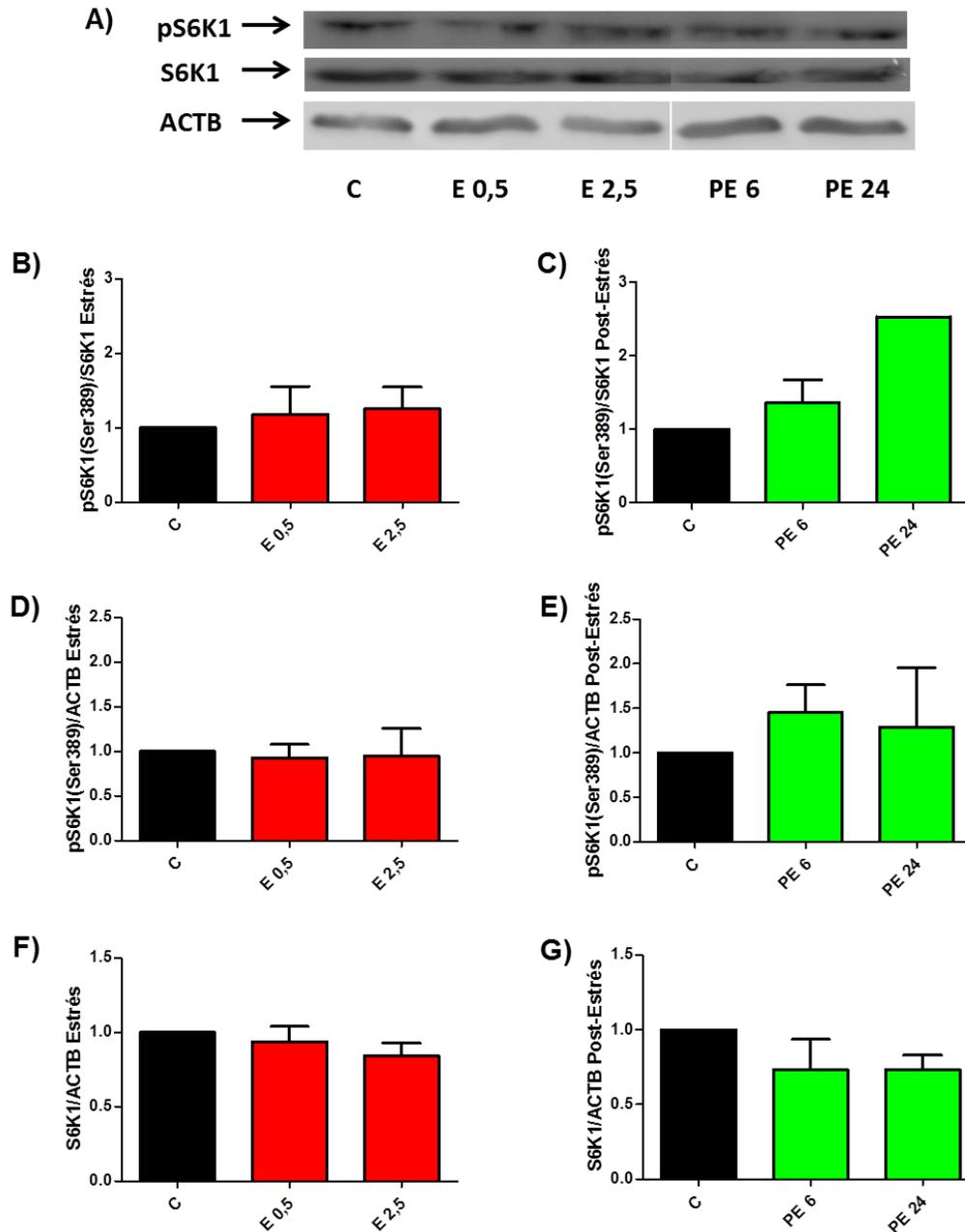


Figura 12: Niveles de p-S6K1 (Ser389) y S6K1 durante y posterior a la respuesta de estrés. (A) Geles representativos para p-S6K1(Ser473), S6K1 y ACTB. Representación gráfica del análisis por Western blot para p-S6K1 normalizado por S6K1 durante la sesión de estrés **(B)** y posterior a ésta **(C)**. Los gráficos **B** y **C** representan el promedio \pm EEM de C (n=2), S 0,5 (n=2), S 2,5 (n=2), PS 6 (n=2) y PS 24 (n=2); P=1,0000 (estrés) y P=0,1504 (post-estrés). Representación gráfica del análisis por Western blot para p-S6K1 normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(D)** y posterior a ésta **(E)**. Los gráficos **D** y **E** representan el promedio \pm EEM de C (n=2), S 0,5 (n=2), S 2,5 (n=2), PS 6 (n=2) y PS 24 (n=1); P=1,0000 (estrés) y P=0,5553 (post-estrés). Representación gráfica del análisis por Western blot para S6K1 normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(F)** y posterior a ésta **(G)**. Los gráficos **F** y **G** representan el promedio \pm EEM de C (n=3), S 0,5 (n=3), S 2,5 (n=3), PS 6 (n=3) y PS 24 (n=2); P=0,1385 (estrés) y P=0,3875 (post-estrés). Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn.

5.2.2. Vía MAPK ERK1/2

Para evaluar cambios en la actividad de esta vía, se midieron los niveles de p-MEK, p-ERK1/2 y ERK1/2 en relación a la ACTB durante las distintas temporalidades del diseño experimental.

Se demostró que no hay cambios significativos en los niveles de fosforilación de la p-MEK durante y posterior al estrés (Figuras 13B y 13C). Con respecto a p-ERK1/2 normalizado por ERK1/2, no se observa cambio significativo durante y posterior a la sesión de estrés (Figuras 14B-E). Sin embargo, al comparar esta relación entre los grupos E 2,5 y PE 6 se observa cambio significativo en los niveles de p-ERK1/ERK1 (t-Test de Mann-Whitney de una cola, $P=0,0476$), mientras que p-ERK2/ERK2 no muestra cambios.

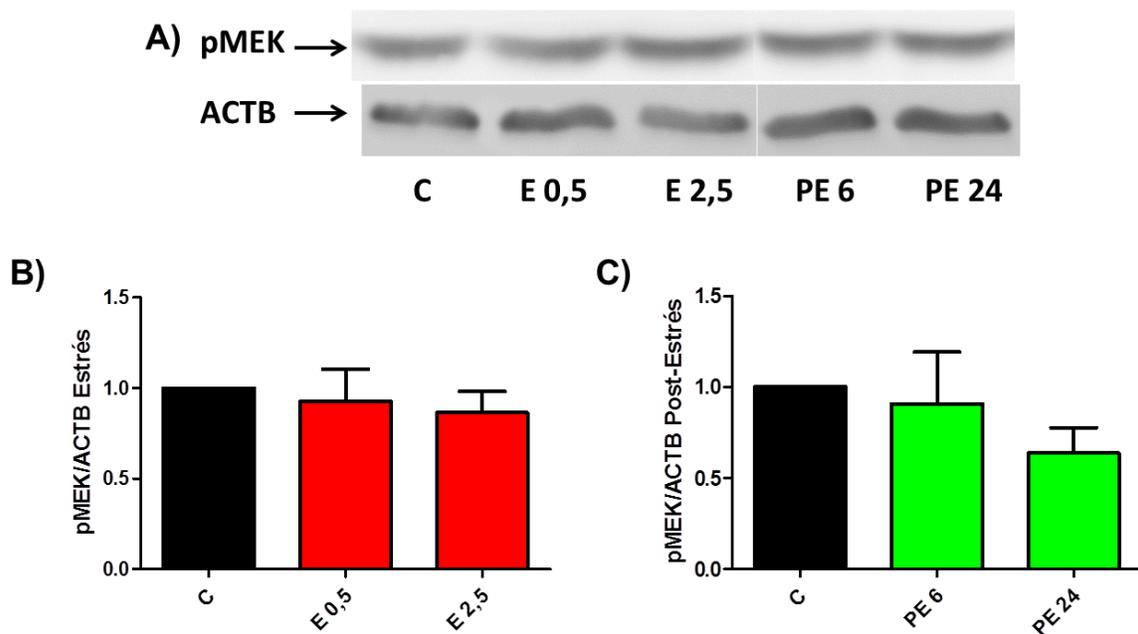


Figura 13: Niveles de p-MEK durante y posterior a la respuesta de estrés. (A) Geles representativos para p-MEK y ACTB. Representación gráfica del análisis por Western blot para p-MEK normalizado por ACTB durante la sesión de estrés (B) y posterior a ésta (C). Los gráficos B y C representan el promedio \pm EEM de C (n=3), S 0,5 (n=3), S 2,5 (n=3), PS 6 (n=3) y PS 24 (n=3); $P=0,7248$ (estrés) y $P= 0,1385$ (post-estrés). Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn.

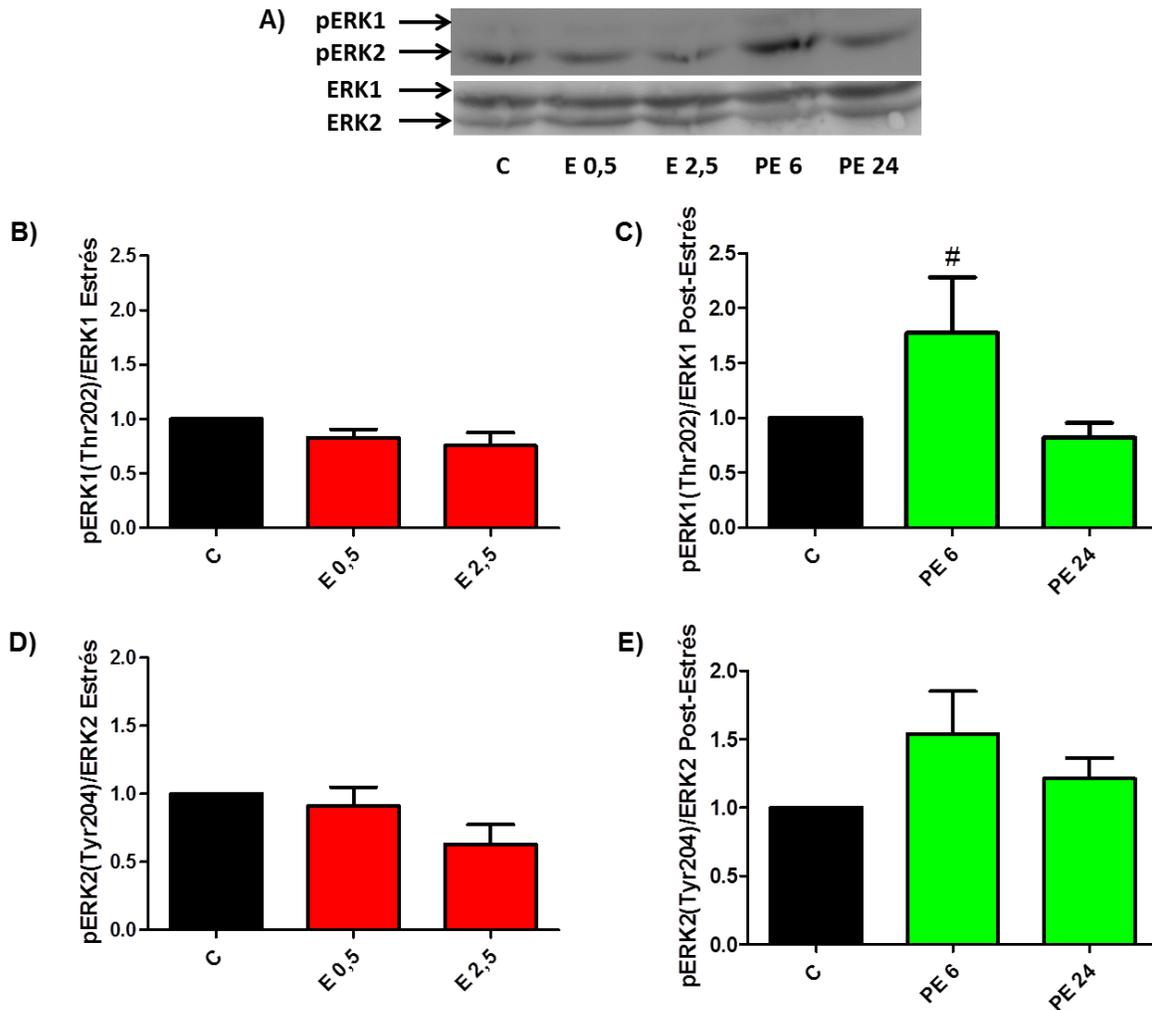


Figura 14: Variación en los niveles de p-ERK1/2 normalizados por ERK1/2 durante y posterior a la respuesta de estrés. (A) Geles representativos para p-ERK1/2 y ERK1/2. Representación gráfica del análisis por Western blot de p-ERK1 normalizado por ERK1 durante la sesión de estrés **(B)** y posterior a ésta **(C)**. Representación gráfica del análisis por Western blot para p-ERK2 normalizado por ERK2 durante la sesión de estrés **(D)** y posterior a ésta **(E)**. Los gráficos **B, C, D y E** representan el promedio \pm EEM de C (n=5), S 0,5 (n=5), S 2,5 (n=5), PS 6 (n=5) y PS 24 (n=5); P=0,1698 (estrés p-ERK1/ERK1), P=0,4317 (post-estrés p-ERK1/ERK1), P= 0,2366 (estrés p-ERK2/ERK2), P=0,7251 (post-estrés p-ERK2/ERK2). Los datos fueron analizados por análisis no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn. #p<0,05: E 2,5 v/s PE 6. Análisis por t-Test de Mann Whitney.

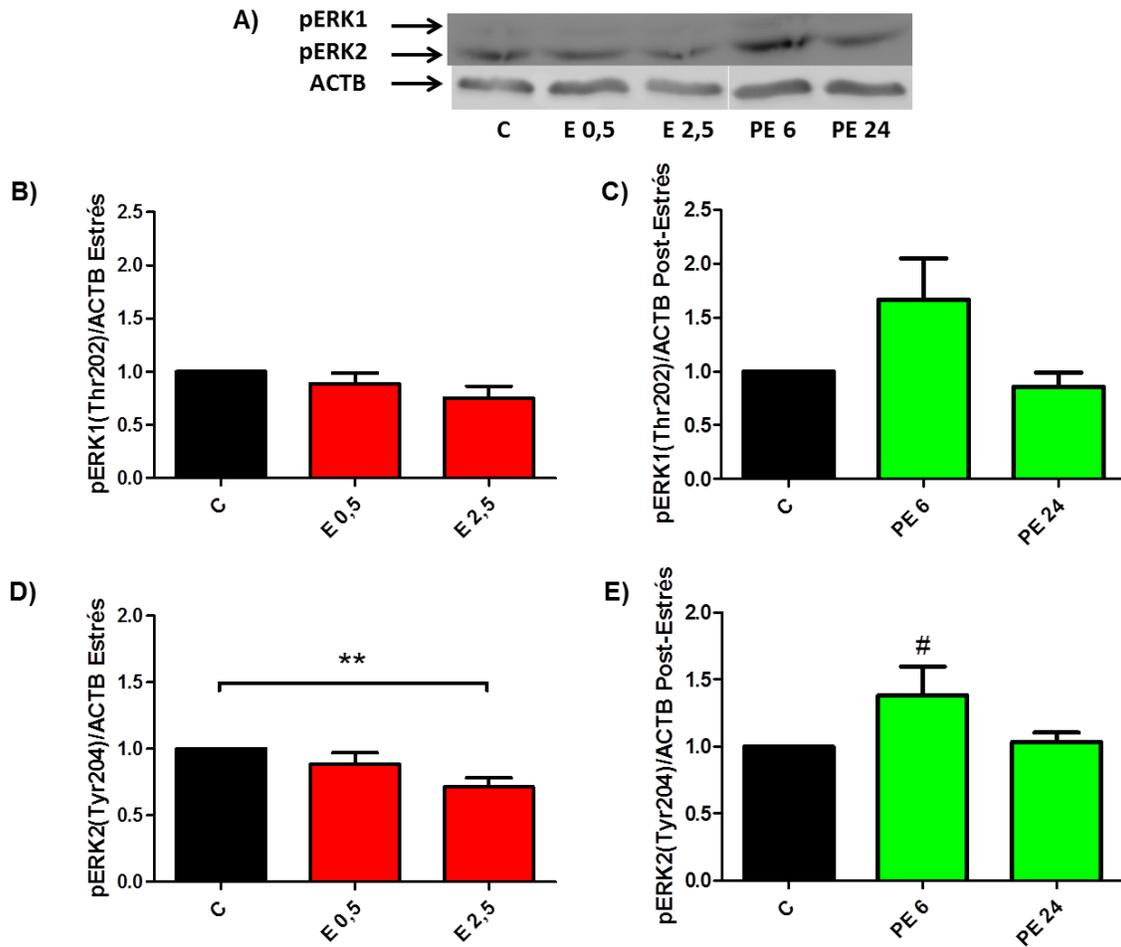


Figura 15: Variación en los niveles de p-ERK1/2 normalizados por ACTB durante y posterior a la sesión de estrés. (A) Geles representativos para p-ERK1/2 y ACTB. Representación gráfica del análisis por Western blot para p-ERK1 normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(B)** y posterior a ésta **(C)**. Representación gráfica del análisis por Western blot para p-ERK1 normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(D)** y posterior a ésta **(E)**. Los gráficos **B, C, D y E** representan el promedio \pm EEM de C (n=5), S 0,5 (n=5), S 2,5 (n=5), PS 6 (n=5) y PS 24 (n=5); P=0,0821 (estrés p-ERK1/ACTB), P=0,1244 (post-estrés p-ERK1/ACTB), P=0,0158 (estrés p-ERK2/ACTB), P=0,7716 (post-estrés p-ERK2/ACTB). Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn. ****p<0,01.** **#p<0,05:** E 2,5 v/s PE 6. Análisis por t-Test de Mann Whitney.

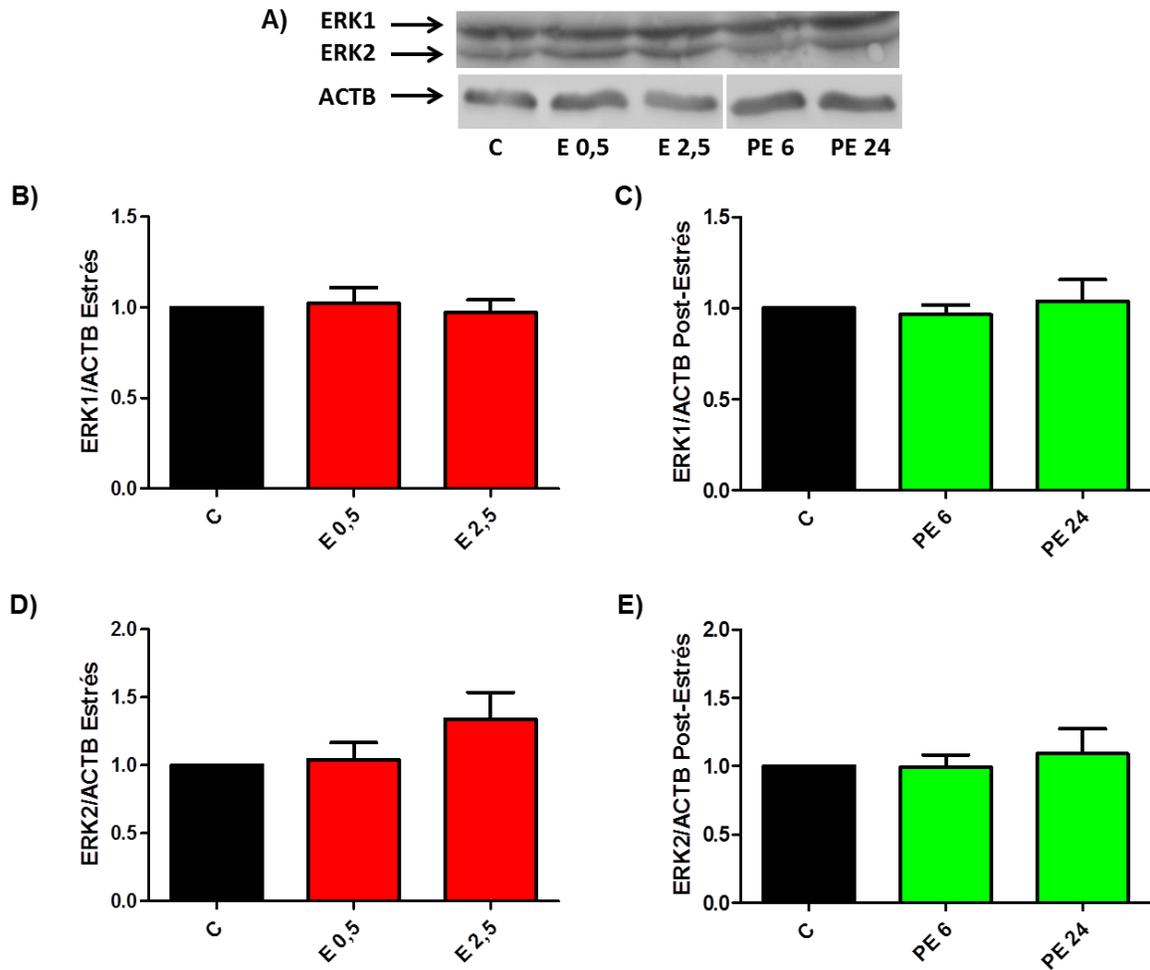


Figura 16: Niveles de ERK1/2 normalizado por ACTB durante y posterior a la respuesta de estrés. (A) Geles representativos para ERK1/2 y ACTB. Representación gráfica del análisis por Western blot para ERK1 normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(B)** y posterior a ésta **(C)**. Representación gráfica del análisis por Western blot para ERK2 normalizado por ACTB durante la sesión de estrés **(D)** y posterior a ésta **(E)**. Los gráficos **B, C, D y E** representan el promedio \pm EEM de C (n=6), S 0,5 (n=6), S 2,5 (n=6), PS 6 (n=6) y PS 24 (n=6); P=0,6306 (estrés ERK1/ACTB), P= 0,8038 (post-estrés ERK1/ACTB), P=0,5451 (estrés ERK2/ACTB), P=0,7704 (post-estrés ERK2/ACTB). Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn.

Al analizar los niveles de p-ERK1/2 normalizados por ACTB, no se observa variaciones en los niveles de p-ERK1 durante la sesión de estrés (Figura 15B). A las 2,5 h posterior al estrés p-ERK2 disminuye significativamente respecto al grupo control (Figura 15D). Posterior al estrés no se observan cambios significativos en la actividad de p-ERK1/2 (Figuras 15C y 15E). Sin embargo, al comparar los grupos E 2,5 y PE 6, p-ERK2 muestra diferencias significativas (t-Test de Mann-Whitney de una cola, $P=0,0278$). Finalmente, se cuantificó los niveles totales de ERK1/2, y no se observó variación tanto en los niveles de ERK1 como en los de ERK2 ni durante ni posterior al estrés (Figuras 16B-E).

5.3. Efectos del estrés agudo sobre FMRP

El estado de fosforilación de la FMRP se ha relacionado directamente a su actividad como represora de la traducción de los transcritos asociados a ésta, donde la fosforilación en la posición Ser499 es clave para esta actividad. Por lo tanto, es importante determinar si el estrés agudo por restricción de movimiento ejerce algún efecto sobre la fosforilación de FMRP, relacionado a la activación de las vías PI3K/AKT/mTOR/S6K1 y MAPK ERK1/2.

Durante el estrés no se observó cambios en los niveles de la relación p-FMRP/FMRP, mientras posterior al estrés hay un aumento en la dispersión de los datos que no permite concluir resultados claros (Figura 17B y 17C). Además los niveles de p-FMRP en relación a la ACTB tampoco muestran cambios, sugiriendo que debido al estrés se producen cambios en los niveles de la proteína total (Figura 17D).

Si bien no se observó una correlación de los niveles de fosforilación de la FMRP a los tiempos donde las vías muestran el peak de su actividad, se observó un aumento del nivel

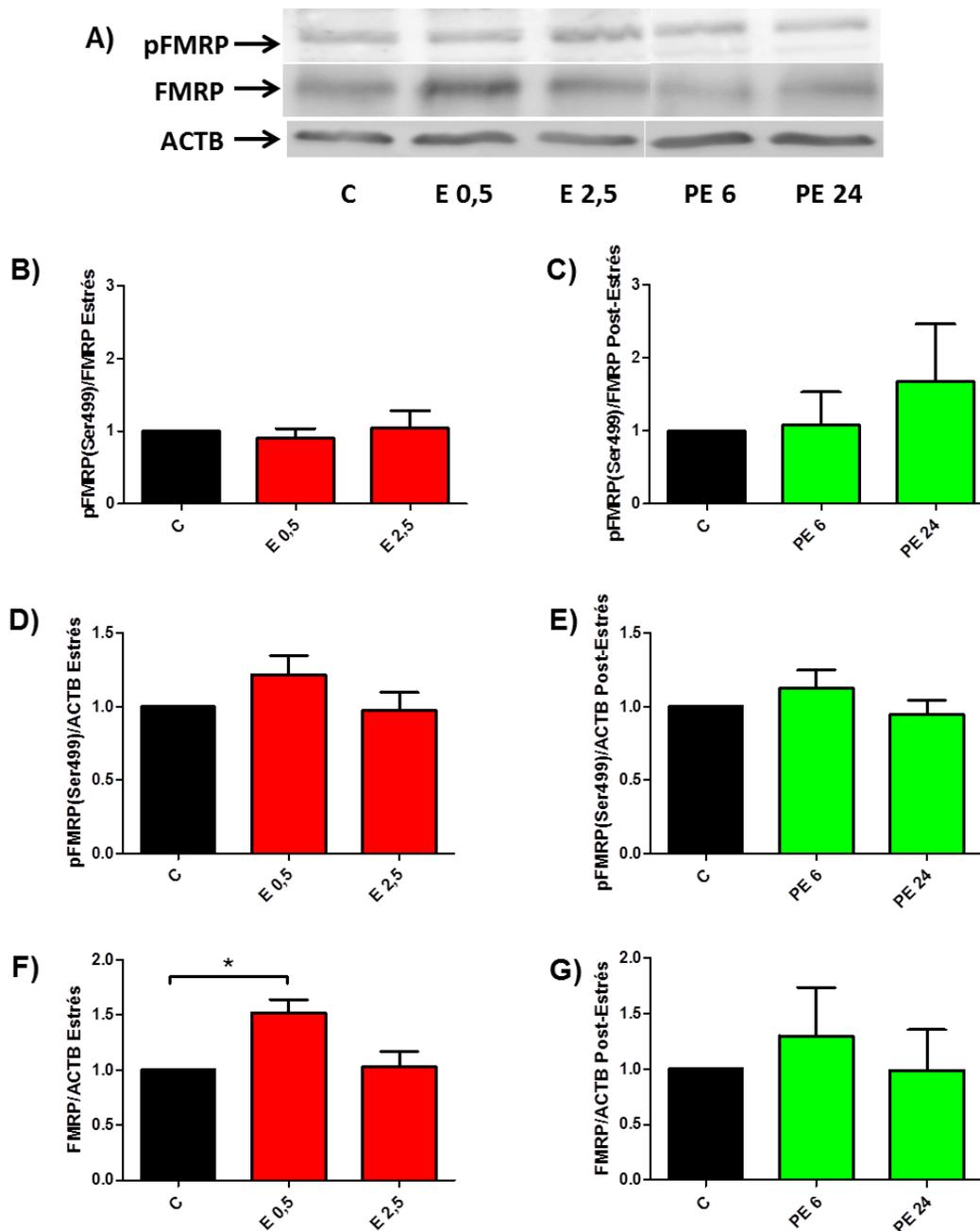


Figura 17: Variación en los niveles de p-FMRP(Ser499) y FMRP durante y posterior a la respuesta de estrés. (A) Geles representativos para p-FMRP, FMRP y ACTB. Representación gráfica del análisis por Western blot para p-FMRP normalizado por FMRP durante la sesión de estrés (B) y posterior a ésta (C). Los gráficos B y C representan el promedio \pm EEM de C (n=6), S 0,5 (n=5), S 2,5 (n=6), PS 6 (n=4) y PS 24 (n=4); $p=0,9346$ (estrés) y $p=0,6792$. Representación gráfica del análisis por Western blot para p-FMRP normalizado por ACTB durante la sesión de estrés (D) y posterior a ésta (E). Los gráficos D y E representan el promedio \pm EEM de C (n=6), S 0,5 (n=6), S 2,5 (n=6), PS 6 (n=6) y PS 24 (n=6); $p=0,2554$ (estrés) y $p=0,4936$. Representación gráfica del análisis por Western blot para FMRP normalizado por ACTB durante la sesión de estrés (F) y posterior a ésta (G). Los gráficos F y G representan el promedio \pm EEM de C (n=7), S 0,5 (n=6), S 2,5 (n=7), PS 6 (n=5) y PS 24 (n=5); $p=0,0129$ (estrés) y $p=0,6619$. Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn. * $p<0,05$.

de la FMRP total a las 0,5 horas de iniciada la sesión de estrés (Figura 17F), lo que coincide con el aumento de actividad de la vía de la PI3K-AKT-mTOR.

5.3.1. Efectos del estrés agudo por restricción de movimiento sobre los niveles de los transcritos de *Fmr1*

Se evaluó por qPCR el nivel de transcritos de la *Fmr1*, dado que se observó un incremento en el nivel de la proteína a 0,5 h de iniciada la respuesta de estrés.

Aunque no se observan cambios en los niveles de este transcrito durante la sesión de estrés (Figura 18A), se observó un aumento significativo en PE 24, de 1,5 veces respecto a los niveles del grupo control (Figura 18B).

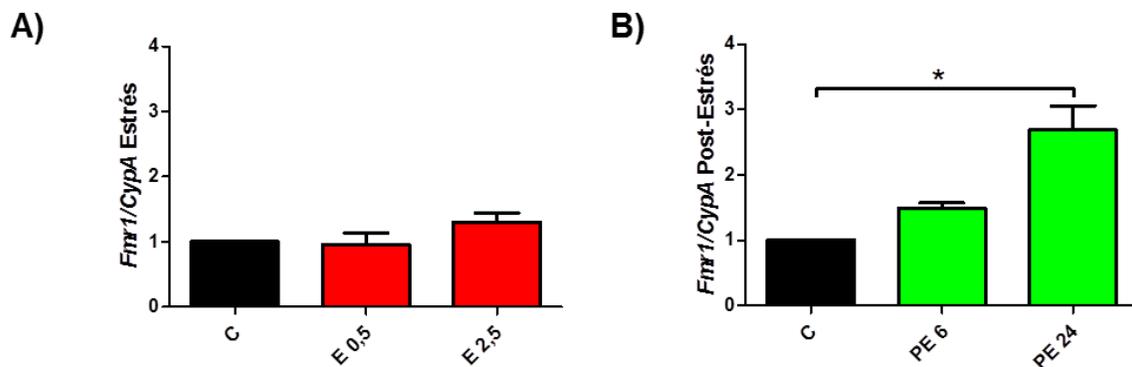


Figura 18: Variación en los niveles de los transcritos *Fmr1* posterior a la sesión de estrés. Representación gráfica de los resultados de qPCR obtenidos para el transcrito *Fmr1* normalizado por *CypA* durante el estrés (A) y posterior a éste (B). $p=0,1825$ (estrés) y $p=0,0241$ (post-estrés). Los gráficos A y B representan el promedio \pm EEM de C (n=3), E 0,5 (n=3), E 2,5 (n=3), PE 6 (n=3) y PE 24 (n=3). Los datos se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis con post test de Dunn. * $p<0,05$.

6. DISCUSIÓN

En esta memoria se demostró que el estrés por restricción de movimiento produce un aumento en los niveles de los transcritos asociados a EGR como *c-Fos* y *Arc* durante la sesión de estrés en el hipocampo, fenómeno que ha sido relacionado a un aumento en la actividad excitadora (Moghaddam et al., 1994). Adicionalmente, la proteína ARC incrementó sus niveles durante el estrés, aunque se observó un alza mayor a las 1,5 h posterior al estrés.

La FMRP es una proteína que participa tanto en el transporte de ARNm desde el núcleo hacia las dendritas, como así mismo participa en la regulación traduccional de estos transcritos a nivel dendrítico. Se determinó que el estrés por restricción de movimiento no promueve cambios en su estado de fosforilación. No obstante, se observó un aumento de la proteína total a la media hora de iniciado el estrés y, al final de la sesión de estrés, se observaron niveles similares al control. Estos cambios no se deben a variaciones en los niveles de su transcrito *Fmr1*. Además, se demostró que las vías transduccionales asociadas al control de la fosforilación de FMRP se activan con un patrón temporal distinto. Así, durante el estrés se observa un aumento de la actividad de la vía AKT-mTORc1, mientras que se observa una disminución a las 24 post-estrés. En contraste, la activación de las MAPK ERK1/2 disminuye durante el estrés, observándose un incremento en el estado de fosforilación durante el período de 6 h post-estrés. Dado que no se observan variaciones en los niveles totales de las proteínas evaluadas, los efectos observados corresponden a un aumento en la actividad de dichas vías.

6.1. Estrés por restricción de movimiento

El estrés corresponde a una respuesta fisiológica del organismo cuando percibe una amenaza. Entre los distintos modelos de estrés animal, uno de los más utilizados corresponde al estrés por restricción de movimiento debido a que es sencillo de realizar, altamente reproducible entre laboratorios, además de ser indoloro para el animal. Los síntomas físicos y psicológicos generados en este modelo parecen ser efecto del malestar

y el sentimiento aversivo al ser restringidos (Buynitsky y Mostofsky, 2009). Se ha reportado efectos tanto positivos como negativos del estrés agudo sobre la memoria, el aprendizaje y otros comportamientos (Shors, 2001; Beylin y Shors, 2003; Buynitsky y Mostofsky, 2009). Es por ello que, para entender los efectos de la respuesta de estrés agudo por restricción de movimiento, se deben establecer los mecanismos a través de los cuales el estrés regula la plasticidad neural.

6.2. Estrés y su relación con la expresión de genes tempranos

c-Fos pertenece a la familia de los EGR, por lo que en condiciones basales su expresión es baja, mientras que ante el incremento en la actividad neuronal se induce un aumento de la expresión génica, por lo cual es ampliamente utilizado para mapear actividad de circuitos neuronales (Kovács, 1998). En el modelo de restricción utilizado en este estudio se mostró que se produce un alza de los niveles de *c-Fos* a los 0,5 h de estrés (Figura 6A). En nuestro laboratorio se ha observado que *c-Fos* aumenta a las 0,5 h y decae a las 2,5 h de estrés, existiendo un aumento de mayor cuantía en hipocampo ventral que el dorsal. Esta expresión diferencial está de acuerdo con que en este modelo se producen cambios en vías asociadas al miedo, afectando principalmente al hipocampo ventral (Fiedler, 2014). Si bien el aumento en los niveles de *c-Fos* descritos por nuestro grupo son mayores a los reportados en esta memoria, proponemos que la magnitud del cambio puede responder a los niveles de CORT (Figura 19). Esta suposición se basa en que el *peak* de *c-Fos* se observa cuando los niveles de la hormona han incrementado en respuesta al estrés, pero no han alcanzado su máximo nivel (datos no mostrados)(Fiedler, 2014). Por otro lado, se observó que los niveles de transcrito de *c-Fos* aumentaron 24 h posterior a la sesión de estrés, aunque con una gran dispersión. Esto se puede deber al leve aumento de CORT observado a las 24 h posterior al fin de la sesión de estrés. Recientemente, en nuestro grupo hemos determinado que la administración de una dosis única de CORT (10 mg/kg) a animales previamente adrenalectomizados promueven un incremento en el transcrito *c-Fos* 0,5 h posterior a la inyección (Pacheco, 2014).

El gen *c-Fos* posee diferentes motivos reguladores a los cuales se unen factores transcripcionales y coactivadores. La secuencia CRE (del inglés “*cAMP Response element*”) es reconocida por el factor transcripcional CREB, cuya actividad es regulada por fosforilación mediada por la PKA y la CaMKII. Además, el gen tiene secuencias SRE (del inglés “*Serum Response Element*”), el cual responde a un complejo ternario formado por la proteína SRF (del inglés “*Serum Response Factor*”), TCF y ELK1 o SAP1, siendo estos últimos blancos de fosforilación mediadas por las MAPK ERK1/2 y PKC. El gen *c-Fos* posee secuencias AP-1, (del inglés “*Activator Protein 1*”) que permite la unión del dímero c-FOS/c-JUN, el cual regula negativamente la transcripción del gen *c-Fos* constituyéndose como un mecanismo de autorregulación (Kovács, 1998). Estos antecedentes sugieren que la expresión del *c-Fos* es regulada por un sinnúmero de factores transcripcionales, cuya actividad puede estar modulada por mediadores de la respuesta de estrés que ejercen su acción a nivel hipocampal. En relación a esto, hay que destacar que el estrés promueve la activación de vías noradrenérgicas que al activar receptores β -adrenérgicos podrían promover la vía PKA-CREB culminando en un aumento de la transcripción del gen *c-Fos*.

A su vez, podemos proponer que el estrés agudo produce un aumento en la actividad neuronal, proposición basada en el aumento de *c-Fos* y que, de acuerdo a diversos antecedentes, es probable que esté asociado al incremento en la actividad glutamatérgica (Moghaddam et al., 1994; Lowy et al., 1995). Por esto resultó importante determinar variaciones en *Arc*, el cual es otro EGR. En condiciones basales el gen *Arc* se transcribe a un bajo nivel, mientras que ante estímulos que producen daño cerebral y entrenamientos de aprendizaje, entre otros, se incrementan sus niveles convirtiéndolo en un buen marcador de actividad del tejido cerebral y en especial del hipocampo (Korb y Finkbeiner, 2011).

En esta memoria observamos una tendencia al aumento de *Arc* durante la media hora de estrés (test no paramétrico de Kruskal Wallis, $p=0,0543$). Destacamos que la cuantía del cambio es menor que la observada para *c-Fos* y que probablemente existe un cambio significativo a tiempos más cortos de estrés. La región promotora de *Arc* posee distintos elementos reguladores y, al igual que *c-Fos*, posee un elemento CRE y un elemento SRE

(Korb y Finkbeiner, 2011), sugiriendo que ambos genes responden a estímulos similares y que eventualmente responden con el mismo patrón temporal. Con la finalidad de determinar si ambos genes cambian su expresión rápidamente en función del estrés se propone medir variaciones en los niveles tanto de *c-Fos* y *Arc* a los 15 minutos de iniciada la sesión de estrés y determinar si su aumento es rápido. Por otra parte, se determinó que los niveles de la proteína ARC incrementan a la 30 min de estrés, cambio que no se correlaciona con un incremento significativo de sus transcritos, sugiriendo que el incremento de ARC pudiese estar relacionado a la variación en el recambio o en la síntesis de la proteína. Durante el período de recuperación del estrés (1,5 h posterior al estrés) se observa un mayor aumento en ARC, variación que concuerda con el modelo propuesto por Shepherd y Bear (Shepherd y Bear, 2011). Estos autores proponen un modelo en el cual la activación de receptores NMDA estimula la traducción de la proteína posterior al incremento del transcrito. Los resultados de esta memoria, en conjunto con otros antecedentes del laboratorio que indican que el aumento en la proteína es precedida por el incremento del transcrito durante el inicio de la respuesta de estrés, son coincidentes con el modelo propuesto por Shepherd. Este modelo considera la activación de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, cuya participación en nuestro modelo deberá ser evaluada mediante ensayos farmacológicos. Existe evidencia de que ratas sometidas a estrés agudo por inmovilización presentan un aumento en la liberación de glutamato en el hipocampo, hecho que es mediado por los GC (Moghaddam et al., 1994; Lowy et al., 1995). Además, el estrés agudo por restricción de movimiento aumenta los niveles de la subunidad GluA1 del receptor ionotrópico de tipo AMPA expuesto en la membrana sináptica (Whitehead et al., 2013).

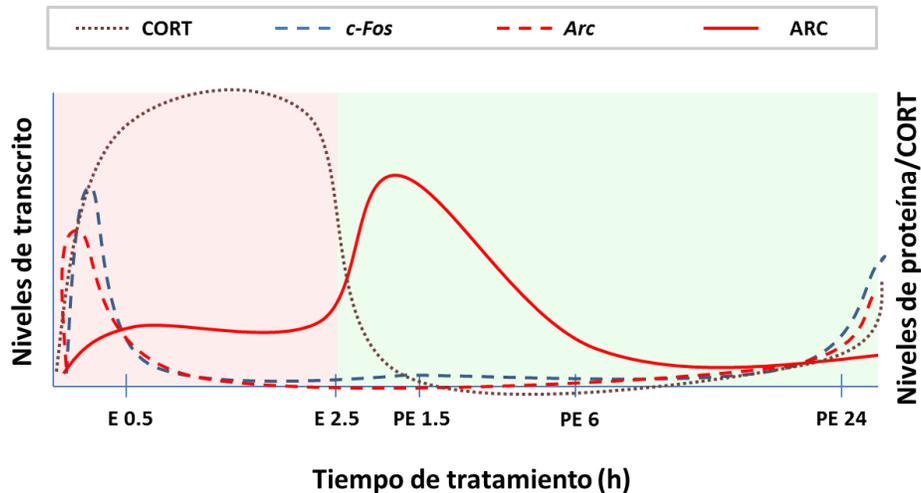


Figura 19: Modelo propuesto para explicar el cambio en los niveles de transcritos de los EGRs *c-Fos* y *Arc* en función de las variaciones de la corticosterona presente en el suero durante y posterior al estrés inducido por restricción de movimiento. Los transcritos de *c-Fos* y *Arc* aumentan rápidamente durante el periodo en que se observa un alza de CORT durante el inicio del estrés y retornan prontamente a sus niveles basales. Los niveles de la proteína ARC incrementan durante el estrés. Se propone que el incremento en los niveles de ARC observado a las 0,5 h de estrés sería producto del alza de su transcritos. Por otro lado se observó una segunda oleada de respuesta en los niveles de ARC a 1,5 h posteriores al estrés, sugiriendo que este proceso estaría relacionado una desrepresión en la maquinaria traduccional permitiendo el incremento en esta proteína.

6.3. Respuesta de FMRP durante el estrés agudo por restricción de movimiento

Se ha descrito que el estrés agudo provoca efectos favorables para la consolidación de memoria y aprendizaje (Shors, 2001; Beylin y Shors, 2003). En este contexto, la FMRP participa como un regulador maestro en el control de la traducción local de proteínas en las espinas dendríticas (Ceman, 2003). En esta memoria se esperaba observar disminución en los niveles de fosforilación de la FMRP, lo que implicaría un aumento en la traducción de algunas proteínas a nivel dendrítico. No obstante, no se observaron cambios significativos en los niveles de p-FMRP en relación a ACTB durante la sesión de estrés.

Niere (2012) presenta evidencia de que una disminución en el nivel de fosforilación de la FMRP se correlaciona a una aumento de los niveles de la proteína ARC (Niere et al., 2012). Si bien en esta memoria no se observan cambios significativos en los niveles de p-FMRP/FMRP durante o posterior al estrés, sí se observó un incremento en los niveles de

FMRP/ACTB a las 0,5 h de iniciado el estrés y una tendencia al aumento en los niveles de p-FMRP/ACTB (Figura 15D, t-Test pareado de una cola C v/s E 0,5 ; $p= 0,0745$). Estos cambios retornan a valores del control al final del período de estrés (2,5 h). De acuerdo a esto, se podría proponer que el estrés promueve un aumento en la síntesis de la FMRP lo que podría favorecer la traducción de ARC.

Estos resultados concuerdan con los experimentos de Jeon (Jeon et al. 2011; 2012), donde la estimulación de cultivos corticales primarios con agentes que inducen despolarización como glutamato, y daño al DNA como etopósido, producen un aumento de los niveles totales de FMRP asociado a la activación de la vía PI3K-AKT-mTORc1. En nuestro modelo no se descarta que el aumento de los niveles de la FMRP observado a las 0,5 h de iniciado el estrés sea por la activación de esta vía. De esta forma, el incremento en la FMRP en respuesta al estrés privilegiaría por algún mecanismo un incremento en su función de transporte de transcritos hacia las dendritas por sobre la represión traduccional. Será importante determinar si el estrés y períodos posteriores a éste influyen la abundancia relativa de la FMRP y p-FMRP en las dendritas, lo que podría impactar en el rol que pudiesen tener ambas formas en el contexto de la función neuronal.

Si bien la vía PI3K-AKT-mTORc1 promueve la traducción de proteínas, la FMRP participa como un antagonista de la función de esta vía. En relación a esto, se ha descrito que en experimentos de coimmunoprecipitación con anticuerpos de FMRP, se ha detectado la presencia del ARNm de la mTOR, sugiriendo que la vía PI3K-AKT-mTORc1 estaría regulada por la FMRP en un equilibrio dinámico. En esta memoria no se detectaron cambios significativos en los niveles totales de la mTOR, aunque es factible que pudiesen existir cambios locales.

Las variaciones en los niveles de FMRP observados tempranamente durante el estrés no se relacionan con variaciones en sus transcritos. Sin embargo, se detectó un incremento en el transcrito *Fmr1* a las 24 h posterior a la sesión de estrés, cambio que fue temporalmente coincidente con aquellos observados para los ARNm de *Arc* y *c-Fos*. Estos cambios sugieren la presencia de elementos regulatorios comunes en la región promotora

de estos tres genes. De hecho, se ha reportado aumento de los niveles del transcrito de *Fmr1* en cultivos hipocampales primarios en respuesta a estimulación con KCl y agonistas del los receptores de mGluR1/5, efecto que sería mediado por la PKC y Ca^{2+} (Antar et al., 2004). Además, la región promotora de *Fmr1* posee elementos CRE y el aumento en la expresión del gen es promovido por la fosforilación de CREB inducida por la activación de los mGluR1/5 (Wang et al., 2012). La activación de los mGluR1/5 y del receptor tipo AMPA produce una disminución de FMRP en las espinas dendríticas sin cambios en la localización del transcrito *Fmr1*, lo que sugiere que estos receptores glutamatérgicos regulan la distribución y/o estabilidad de la proteína FMRP (Antar et al., 2004). De hecho, se ha descrito que estos mismos estímulos inducen la ubiquitinación de la FMRP, aunque no se ha demostrado si este proceso requiere o no de la defosforilación de proteína y más aún, si este proceso comanda la degradación (Nalavadi et al., 2012).

6.4. Efectos del estrés agudo por restricción de movimiento en la activación de vías transduccionales

En esta memoria se observó la activación de la vía PI3K-AKT-mTORc1 durante la sesión de estrés, mientras que 6 h posterior a la restricción se observó la activación de las MAPK ERK1/2. Dichos resultados indican que el estrés desencadena mecanismos de transducción de señales relacionados entre sí, con un patrón temporal distinto. Bader et al. (2012) ya había documentado en su trabajo la activación de la vía PI3K-AKT-mTORc1 ante la estimulación con GCs sobre cultivos neuronales (Bader et al., 2012). Modelos de izquemia-reperusión cerebral y cardiaco revelan que los GCs ejercen un efecto protector que es mediado por la activación rápida de esta vía y por la temporalidad en que se observan estos efectos correspondería a una acción rápida de los GCs (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Limbourg et al., 2002).

En esta tesis se determinó que la proteína quinasa AKT muestra su máximo nivel de fosforilación durante el estrés y 24 h posterior a la restricción se observa un nivel menor al control. Esta respuesta no tiene correlación con la observada en la fosforilación de la

mTOR durante la sesión de estrés. Este resultado discordante se puede deber a que los anticuerpos usados para medir p-mTOR y mTOR total están diseñados contra el núcleo catalítico mTOR. Por lo tanto, la medición registrada correspondería a la señal emitida tanto por el núcleo de mTORc1 y mTORc2.

Se ha descrito que la estimulación de cultivos neuronales con agonistas de los mGluR1/5, promueve un aumento en la actividad de la mTORc1 y las MAPK ERK1/2. Estas vías confluyen en la fosforilación de la S6K1 (quinasa de la FMRP) en la Ser389 por la mTORc1, y en Ser421/424 mediadas por las MAPK ERK1/2 (Narayanan et al., 2008; Magnuson et al., 2012; Darnell y Klann, 2013).

Narayanan et al. (2008), describió a la S6K1 como única quinasa de la FMRP y correlacionó temporalmente aumentos en p-FMRP con p-S6K1. Si bien este autor evaluó sólo la fosforilación en la Ser421/424 de la S6K1 mediada por las MAPK ERK1/2, también observó una inhibición en los niveles de la p-FMRP al usar la rapamicina, que es un inhibidor de mTOR (Narayanan et al., 2008). Aunque la literatura indica que la fosforilación en Ser389 de la S6K1 estaría mediado por la vía mTORc1, a la fecha no se ha descrito si la actividad máxima de la p-S6K1 requiere además de las fosforilaciones mediada por la vía de las MAPK ERK1/2. En relación a esto, existen antecedentes que muestran que el incremento en la fosforilación de 4-EBP1 (blanco de la mTORc1) es coincidente con la activación de las MAPK ERK1/2 y no con los niveles de la p-S6K1 en Ser389, lo que sugiere que la regulación de la actividad de la S6K1 puede involucrar diferentes fosforilaciones u otros mecanismos no considerados hasta la fecha (Magnuson et al., 2012; Sumi et al., 2014).

Llama nuestra atención que la p-PDK1 muestre un aumento en sus niveles a las 6 h posterior al estrés. Esta enzima mantiene un nivel basal de fosforilación y su actividad está regulada por su localización subcelular. El resultado obtenido podría tener relación con el hecho de que PDK1 puede fosforilar a la MEK en cultivos celulares y en ensayos *in vitro*. Si bien, la PDK1 no es necesaria para la activación de la MEK, su actividad aumenta en presencia de la PDK1, lo que coincide con la activación de las MAPK ERK1/2 posterior a la sesión de estrés (Sato et al., 2004). No se descarta que el aumento en la fosforilación de

PDK1 esté relacionado al aumento en la actividad de las MAPK ERK1/2 registrado en este trabajo.

La otra vía analizada en esta tesis es la de las MAPK ERK1/2, en la cual se observó una activación a las 6 horas posterior a la sesión de estrés. Dado que no observamos variaciones en los niveles de su ARNm (datos no mostrados) estos cambios podrían estar asociados a modificaciones en el proceso de traducción y/o degradación.

La activación de las MAPK ERK1/2 6 h después del evento de estrés, sugiere la participación de algún mecanismo que se gatilla posterior al término del estímulo, el cual podría ser una consecuencia de los efectos genómicos producidos por los GCs. De hecho, en ratones sometido a 30 minutos de restricción de movimiento se ha descrito un aumento en la actividad de la ERK1/2 a nivel nuclear 2 horas posterior al estrés, además de un aumento en los niveles de las proteínas RAS y RAF1 (efectores río arriba de la vía MAPK ERK1/2). Dicho trabajo también demuestra que en líneas celulares neuronales los transcritos de *Erk1/2*, *Ras* y *Raf1* aumentan posterior a la estimulación con GCs, sugiriendo que la vía es regulada por los efectos genómicos de los GCs (Revest et al., 2005).

En la línea celular HEK-293 se ha reportado que la estimulación del β 2-AR produce una activación de las MAPK ERK1/2, la cual es independiente de la generación de AMPc y de la actividad de la PKA, pero que depende de las β -arrestina1/2 y las GRK5/6. Dicha estimulación produce la internalización del receptor, manteniendo la ERK1/2 activa en el citoplasma (Shenoy et al., 2006). Este fenómeno se observa también con otros receptores acoplados a proteína G (GPCR), lo que sugiere que dichos mecanismos podrían regular la actividad de la vía en el hipocampo (Luttrell et al., 2001; Luttrell, 2002). Se ha reportado que los GCs median la expresión de la β -arrestina1 en distintas líneas celulares, lo cual genera una redirección de la señalización de los GCPR. Dicho aumento en los niveles de la proteína son observados a las 12 h de exposición de los cultivos a DEX (Oakley et al., 2012). Estos antecedentes permiten postular que el aumento en la actividad de las ERK1/2 observado a las 6 h posterior al estrés se deberían a los efectos genómicos de los GCs.

6.5. Rol de los GCs: Respuesta lenta v/s respuesta rápida

Los GCs son hormonas esteroidales esenciales para mediar la respuesta del organismo al estrés, tanto a corto como a largo plazo. Entre los efectos sistémicos destacan: aumento rápido de la glicemia, inmunosupresión y broncodilatación, entre otros. Debido a su naturaleza hidrofóbica, pueden penetrar fácilmente dentro de distintos órganos y tejidos, entre ellos la barrera hemato-encefálica (Revollo y Cidlowski, 2009). Además, es la principal hormona adrenal que media la consolidación de memoria (Beylin y Shors, 2003).

En un estudio *ex vivo* utilizando cortes de hipocampo se demostró que la aplicación aguda (20 min) de CORT induce oleadas de expresión génica (Morsink et al., 2006). Análisis del transcriptoma evidenció que luego de 1 h de la adición de la CORT hubo una reducción en los niveles de transcritos y luego de 3 h se observaron además un aumento. En cambio, a las 5 h post adición de la hormona se observaron sólo incrementos en los niveles de transcritos. Los genes asociados a dichos cambios se agruparon en categorías de acuerdo a su función y se destacan aquellas relacionadas a transducción de señales, regulación de la transcripción, regulación de la traducción, citoesqueleto, transporte iónico y sinapsis, entre otras funciones (Morsink et al., 2006). Esto indica que parte de los efectos observados en esta tesis podrían corresponder a los efectos genómicos de los GCs.

Si bien los GCs modulan una respuesta genómica observada a largo plazo, existe otro tipo de respuesta rápida asociada a una interacción con vías transduccionales, generando respuestas celulares necesarias tanto para la adaptación al estrés y a la neuroplasticidad.

En modelos distintos, se ha observado una activación de la vía PI3K-AKT en respuesta a GCs (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Limbourg et al., 2002). Numakawa et al. (2009) describió que la presencia de CORT o DEX produce un aumento en los niveles de fosforilación de AKT, ERK1/2 y PLC γ en cultivo cortical primario. Este efecto es mediado tanto por GCs como por el GR. Además, se observó que el GR es capaz de coimmunoprecipitar con el TRKB (receptor de la neurotrofina BDNF), interacción que se debilita al estimular tanto con CORT como con DEX (Numakawa et al., 2009). Otros trabajos más recientes postulan a un GR acoplado a proteína G (GCPR) como mediadores

de las respuesta no genómicas de los GCs. Usando una corticosterona unida a BSA, la cual no puede atravesar la membrana plasmática, e inhibidores generales de GCPRs, se observa una reducción en la fosforilación de Pyk2, que corresponde a una proteína río abajo de la activación de la PKC (Yang et al., 2013). Ninguno de estos efectos se vio alterado en presencia de antagonistas de GR y MR (receptor de mineralocorticoides), lo que sugiere que las respuestas rápidas mediadas por los GCs se relacionarían a otra entidad diferente de los receptores esteroidales (Yang et al., 2013; Yoshiya et al., 2013). Hasta la fecha existe poca evidencia de la acción de los CGs con las vías involucradas en el remodelamiento de dendritas y espinas dendríticas. Sin embargo, en ratón se ha descrito la presencia de GR en la membrana celular muscular, el cual sería necesario para mediar los efectos no genómicos de los GCs en dicho tejido (Pérez et al., 2013).

7. CONCLUSIONES

- ✓ El estrés agudo por restricción de movimiento genera cambios tanto en los marcadores de actividad glutamatérgica en hipocampo, como en los marcadores fisiológicos de estrés, aumentando la cantidad de heces defecadas y la secreción de corticosterona.
- ✓ No se observa efecto del estrés agudo por restricción de movimiento sobre el estado de fosforilación de FMRP, a pesar de que observamos activación de las vías transduccionales relacionadas a su fosforilación.
- ✓ El estrés agudo por restricción de movimiento provoca un incremento en los niveles de FMRP a las 0,5 h de estrés. Sin embargo, se debe estudiar con más detalle si este aumento se debe al alza de CGs y/o a la liberación de glutamato.
- ✓ El estrés agudo por restricción de movimiento gatilla la activación de cascadas transduccionales con un patrón temporal diferente. Efectos similares se han observado en cultivo hipocampal primario tras la estimulación con glutamato.
- ✓ El aumento de los niveles de la FMRP total es coincidente con la activación de la vía PI3K-AKT-mTORc1. Estos resultados sugieren que esta cascada de señalización podría regular la traducción del ARNm de FMRP.

8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

De los resultados obtenidos en esta tesis, se observan varias tendencias que no alcanzan a ser significativas al ser analizadas por los test estadísticos (Figura 10D-E, 11D-E, 14D-E, 15 D-E). Para que estos resultados adquieran robustez estadística, sería conveniente aumentar el número de animales utilizado para estas determinaciones.

En el contexto de la plasticidad sináptica, es importante establecer si los cambios observados en los niveles de proteínas ocurren a nivel de las espinas dendríticas. Para esto, conviene realizar experimentos de inmunofluorescencia para determinar si los niveles de proteínas cambian a nivel de las dendritas o del soma neuronal. Si bien en nuestro laboratorio se utiliza un animal para dos determinaciones experimentales distintas, para corroborar este postulado se debe considerar el uso de un mayor número de animales en el diseño experimental. Otra aproximación apropiada para resolver este problema es la extracción de una fracción enriquecida en elementos pre y post sinápticos (sinaptoneurosomas). Esta fracción se obtiene mediante centrifugaciones diferenciales y el uso de filtros, pero requiere gran cantidad de tejido.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Antar, L. N., R. Afroz, J. B. Dichtenberg, R. C. Carroll y G. J. Bassell, (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* **24**(11): 2648-2655.
- Antar, L. N., J. B. Dichtenberg, M. Plociniak, R. Afroz y G. J. Bassell, (2005). Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav* **4**(6): 350-359.
- Antar, L. N., C. Li, H. Zhang, R. C. Carroll y G. J. Bassell, (2006). Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol Cell Neurosci* **32**(1-2): 37-48.
- Ascano, M., N. Mukherjee, P. Bandaru, J. B. Miller, J. D. Nusbaum, D. L. Corcoran, C. Langlois, M. Munschauer, S. Dewell, M. Hafner, Z. Williams, U. Ohler y T. Tuschl, (2012). FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature* **492**(7429): 382-386.
- Ashley, C. T., K. D. Wilkinson, D. Reines y S. T. Warren, (1993). FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* **262**(5133): 563-566.
- Bader, M., Y. Komatsuzaki, Y. Hatanaka, G. Murakami, H. Mukai, Y. Hojo, M. Saito, T. Kimoto y S. Kawato, (2012). Corticosterone Induces Rapid Spinogenesis via Synaptic Glucocorticoid Receptors and Kinase Networks in Hippocampus. *PLoS ONE* **7**(4): e34124.
- Beylin, A. V. y T. J. Shors, (2003). Glucocorticoids are necessary for enhancing the acquisition of associative memories after acute stressful experience. *Horm Behav* **43**(1): 124-131.
- Buynitsky, T. y D. I. Mostofsky, (2009). Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* **33**(7): 1089-1098.
- Ceman, S., (2003). Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet* **12**(24): 3295-3305.
- Cheever, A. y S. Ceman, (2009). Phosphorylation of FMRP inhibits association with Dicer. *Rna* **15**(3): 362-366.
- Chen, D. Y., D. Bambah-Mukku, G. Pollonini y C. M. Alberini, (2012). Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII α -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nat Neurosci* **15**(12): 1707-1714.
- Chen, K.-C., E. M. Blalock, M. A. Curran-Rauhut, I. Kadish, S. J. Blalock, L. Brewer, N. M. Porter y P. W. Landfield, (2013). Glucocorticoid-dependent hippocampal transcriptome in male rats: pathway-specific alterations with aging. *Endocrinology* **154**(8): 2807-2820.
- Darnell, J. C. y E. Klann, (2013). The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat Neurosci* **16**(11): 1530-1536.
- de Esch, C. E. F., S. Zeidler y R. Willemsen, (2013). Translational endpoints in fragile X syndrome. *Neurosci Biobehav Rev* **46**(2014): 256-269.
- Dziembowska, M., J. Milek, A. Janusz, E. Rejmak, E. Romanowska, T. Gorkiewicz, A. Tiron, C. R. Bramham y L. Kaczmarek, (2012). Activity-dependent local translation of matrix metalloproteinase-9. *J Neurosci* **32**(42): 14538-14547.
- Eberhart, D. E., H. E. Malter, Y. Feng y S. T. Warren, (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* **5**(8): 1083-1091.
- Edbauer, D., J. R. Neilson, K. A. Foster, C.-F. Wang, D. P. Seeburg, M. N. Batterson, T. Tada, B. M. Dolan, P. A. Sharp y M. Sheng, (2010). Regulation of Synaptic Structure and Function by FMRP-Associated MicroRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* **65**(3): 373-384.

- Feng, Y., C. A. Gutekunst, D. E. Eberhart, H. Yi, S. T. Warren y S. M. Hersch, (1997). Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. J Neurosci **17**(5): 1539-1547.
- Fiedler, J. L., Muñoz, M., García-Rojo, G., Pacheco, A., Aguayo, F., Rojas, P. (2014). Differential response of dorsal and ventral rat hippocampus to restraint stress: Effects on mRNA levels of proteins related to neuroplasticity. 9th FENS Forum of Neuroscience. Milan, Italy, Federation of European Neuroscience Societies: 388.
- Gelinas, J. N., J. L. Banko, L. Hou, N. Sonenberg, E. J. Weeber, E. Klann y P. V. Nguyen, (2007). ERK and mTOR signaling couple beta-adrenergic receptors to translation initiation machinery to gate induction of protein synthesis-dependent long-term potentiation. J Biol Chem **282**(37): 27527-27535.
- Graber, T. E., S. Hébert-Seropian, A. Khoutorsky, A. David, J. W. Yewdell, J.-C. Lacaille y W. S. Sossin, (2013). Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity. Proc Natl Acad Sci U S A **110**(40): 16205-16210.
- Graber, T. E., P. K. McCamphill y W. S. Sossin, (2013). A recollection of mTOR signaling in learning and memory. Learn Mem **20**(10): 518-530.
- Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald y D. M. Sabatini, (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. Dev Cell **11**(6): 859-871.
- Hafezi-Moghadam, A., T. Simoncini, Z. Yang, F. P. Limbourg, J.-C. Plumier, M. C. Rebsamen, C.-M. Hsieh, D.-S. Chui, K. L. Thomas, A. J. Prorock, V. E. Laubach, M. A. Moskowitz, B. A. French, K. Ley y J. K. Liao, (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. Nature Medicine **8**(5): 473-479.
- Hemmings, B. A. y D. F. Restuccia, (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(9): a011189.
- Hernandez, P. J. y T. Abel, (2008). The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. Neurobiol Learn Mem **89**(3): 293-311.
- Hoeffler, C. A., E. Sanchez, R. J. Hagerman, Y. Mu, D. V. Nguyen, H. Wong, A. M. Whelan, R. S. Zukin, E. Klann y F. Tassone, (2012). Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. Genes Brain Behav **11**(3): 332-341.
- Huber, K. M., (2002). Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. Proc Natl Acad Sci USA **99**(11): 7746-7750.
- Jafari, M., R. R. Seese, A. H. Babayan, C. M. Gall y J. C. Lauterborn, (2012). Glucocorticoid Receptors are Localized to Dendritic Spines and Influence Local Actin Signaling. Mol Neurobiol **46**(2): 304-315.
- Janusz, A., J. Milek, M. Perycz, L. Pacini, C. Bagni, L. Kaczmarek y M. Dziembowska, (2013). The Fragile X mental retardation protein regulates matrix metalloproteinase 9 mRNA at synapses. J Neurosci **33**(46): 18234-18241.
- Jaworski, J., S. Spangler, D. P. Seeburg, C. C. Hoogenraad y M. Sheng, (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. J Neurosci **25**(49): 11300-11312.
- Jeon, S., J. Seo, S.-I. Yang, J. Choi, D. Wells, C. Shin y K. Ko, (2011). Cellular stress-induced up-regulation of FMRP promotes cell survival by modulating PI3K-Akt phosphorylation cascades. J Biomed Sci **18**(1): 17.

- Jeon, S. J., S.-H. Han, S.-I. Yang, J. w. Choi, K. J. Kwon, S. H. Park, H. Y. Kim, J. H. Cheong, J. H. Ryu, K. H. Ko, D. G. Wells y C. Y. Shin, (2012). Positive feedback regulation of Akt-FMRP pathway protects neurons from cell death. J Neurochem **123**(2): 226-238.
- Kelly, A., S. Laroche y S. Davis, (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. J Neurosci **23**(12): 5354-5360.
- Korb, E. y S. Finkbeiner, (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. Trends Neurosci **34**(11): 591-598.
- Kovács, K. J., (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. Neurochem Int **33**(4): 287-297.
- Kumar, V., M.-X. Zhang, M. W. Swank, J. Kunz y G.-Y. Wu, (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. J Neurosci **25**(49): 11288-11299.
- Laggerbauer, B., D. Ostareck, E. M. Keidel, A. Ostareck-Lederer y U. Fischer, (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. Hum Mol Genet **10**(4): 329-338.
- Limbourg, F. P., Z. Huang, J.-C. Plumier, T. Simoncini, M. Fujioka, J. Tuckermann, G. Schütz, M. A. Moskowitz y J. K. Liao, (2002). Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. J Clin Invest **110**(11): 1729-1738.
- Lowy, M. T., L. Wittenberg y B. K. Yamamoto, (1995). Effect of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats. J Neurochem **65**(1): 268-274.
- Luttrell, L. M., (2002). Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. Can J Physiol Pharmacol **80**(5): 375-382.
- Luttrell, L. M., F. L. Roudabush, E. W. Choy, W. E. Miller, M. E. Field, K. L. Pierce y R. J. Lefkowitz, (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2449-2454.
- Lyu, D., W. Yu, N. Tang, R. Wang, Z. Zhao, F. Xie, Y. He, H. Du y J. Chen, (2013). The mTOR signaling pathway regulates pain-related synaptic plasticity in rat entorhinal-hippocampal pathways. Mol Pain **9**: 64.
- Magnuson, B., B. Ekim y Diane C. Fingar, (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. Biochem J **441**(1): 1-21.
- McEwen, B. S., (1999). Stress and hippocampal plasticity. Annu Rev Neurosci **22**: 105-122.
- McEwen, B. S., (2003). Mood disorders and allostatic load. Biol Psychiatry **54**(3): 200-207.
- McEwen, B. S. y P. J. Gianaros, (2010). Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. Ann N Y Acad Sci **1186**: 190-222.
- McEwen, B. S. y A. M. Magarinos, (2001). Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. Hum Psychopharmacol **16**(S1): S7-S19.
- McEwen, B. S. y T. A. Milner, (2007). Hippocampal formation: shedding light on the influence of sex and stress on the brain. Brain Res Rev **55**(2): 343-355.
- Moghaddam, B., M. L. Bolinao, B. Stein-Behrens y R. Sapolsky, (1994). Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. Brain Res **655**(1-2): 251-254.
- Morris, R. G. M., E. I. Moser, G. Riedel, S. J. Martin, J. Sandin, M. Day y C. O'Carroll, (2003). Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1432): 773-786.

- Morsink, M. C., P. J. Steenbergen, J. B. Vos, H. Karst, M. Joëls, E. R. De Kloet y N. A. Datson, (2006). Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. J Neuroendocrinol **18**(4): 239-252.
- Nakade, Y., H. Fukuda, M. Iwa, K. Tsukamoto, H. Yanagi, T. Yamamura, C. Mantyh, T. N. Pappas y T. Takahashi, (2007). Restraint stress stimulates colonic motility via central corticotropin-releasing factor and peripheral 5-HT₃ receptors in conscious rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(4): G1037-1044.
- Nakade, Y., C. Mantyh, T. N. Pappas y T. Takahashi, (2007). Fecal pellet output does not always correlate with colonic transit in response to restraint stress and corticotropin-releasing factor in rats. J Gastroenterol **42**(4): 279-282.
- Nalavadi, V. C., R. S. Muddashetty, C. Gross y G. J. Bassell, (2012). Dephosphorylation-Induced Ubiquitination and Degradation of FMRP in Dendrites: A Role in Immediate Early mGluR-Stimulated Translation. J Neurosci **32**(8): 2582-2587.
- Narayanan, U., V. Nalavadi, M. Nakamoto, D. C. Pallas, S. Ceman, G. J. Bassell y S. T. Warren, (2007). FMRP Phosphorylation Reveals an Immediate-Early Signaling Pathway Triggered by Group I mGluR and Mediated by PP2A. J Neurosci **27**(52): 14349-14357.
- Narayanan, U., V. Nalavadi, M. Nakamoto, G. Thomas, S. Ceman, G. J. Bassell y S. T. Warren, (2008). S6K1 Phosphorylates and Regulates Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) with the Neuronal Protein Synthesis-dependent Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade. J Biol Chem **283**(27): 18478-18482.
- Niere, F., J. R. Wilkerson y K. M. Huber, (2012). Evidence for a fragile X mental retardation protein-mediated translational switch in metabotropic glutamate receptor-triggered Arc translation and long-term depression. J Neurosci **32**(17): 5924-5936.
- Numakawa, T., E. Kumamaru, N. Adachi, Y. Yagasaki, A. Izumi y H. Kunugi, (2009). Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC- signaling for glutamate release via a glutamate transporter. Proc Natl Acad Sci U S A **106**(2): 647-652.
- O'Dell, T. J., S. A. Connor, J. N. Gelinas y P. V. Nguyen, (2010). Viagra for your synapses: Enhancement of hippocampal long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors. Cell Signal **22**(5): 728-736.
- O'Donnell, C. y T. J. Sejnowski, (2014). Selective memory generalization by spatial patterning of protein synthesis. Neuron **82**(2): 398-412.
- Oakley, R. H., J. Revollo y J. A. Cidlowski, (2012). Glucocorticoids regulate arrestin gene expression and redirect the signaling profile of G protein-coupled receptors. Proc Natl Acad Sci U S A **109**(43): 17591-17596.
- Pacheco, A., Muñoz-LLanos, M., García-Rojo, G., Aguayo, F., García-Pérez, M., Márquez, R., Werner, M., Cidlowski, J., Fiedler, J. (2014). Acute administration of corticosterone to adrenalectomized rats changes miRNAs levels in the hippocampus: relationship with AMPA and NMDA receptors expression. XXXVII ANNUAL MEETING SOCIEDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE CHILE. Puerto Varas - Chile SOCIEDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE CHILE: 149.
- Page, G., F. A. L. Khidir, S. Pain, L. Barrier, B. Fauconneau, O. Guillard, A. Piriou y J. Hugon, (2006). Group I metabotropic glutamate receptors activate the p70S6 kinase via both mammalian target of rapamycin (mTOR) and extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) signaling pathways in rat striatal and hippocampal synaptoneurosome. Neurochem Int **49**(4): 413-421.
- Park, H. Y., H. Lim, Y. J. Yoon, A. Follenzi, C. Nwokafor, M. Lopez-Jones, X. Meng y R. H. Singer, (2014). Visualization of dynamics of single endogenous mRNA labeled in live mouse. Science **343**(6169): 422-424.

- Park, S., J. M. Park, S. Kim, J.-A. Kim, J. D. Shepherd, C. L. Smith-Hicks, S. Chowdhury, W. Kaufmann, D. Kuhl, A. G. Ryazanov, R. L. Huganir, D. J. Linden y P. F. Worley, (2008). Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. Neuron **59**(1): 70-83.
- Pascual, M. L., L. Luchelli, M. Habif y G. L. Boccaccio, (2012). Synaptic activity regulated mRNA-silencing foci for the fine tuning of local protein synthesis at the synapse. Commun Integr Biol **5**(4): 388-392.
- Patterson, M. A., E. M. Szatmari y R. Yasuda, (2010). AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. Proc Natl Acad Sci U S A **107**(36): 15951-15956.
- Pérez, M. H.-A., J. Cormack, D. Mallinson y G. Mutungi, (2013). A membrane glucocorticoid receptor mediates the rapid/non-genomic actions of glucocorticoids in mammalian skeletal muscle fibres. J Physiol **591**(Pt 20): 5171-5185.
- Revest, J.-M., F. Di Blasi, P. Kitchener, F. Rougé-Pont, A. Desmedt, M. Turiault, F. Tronche y P. V. Piazza, (2005). The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. Nat Neurosci **8**(5): 664-672.
- Revollo, J. R. y J. A. Cidlowski, (2009). Mechanisms Generating Diversity in Glucocorticoid Receptor Signaling. Ann N Y Acad Sci **1179**(1): 167-178.
- Sapan, C. V., R. L. Lundblad y N. C. Price, (1999). Colorimetric protein assay techniques. Biotechnol Appl Biochem **29 (Pt 2)**: 99-108.
- Sato, S., N. Fujita y T. Tsuruo, (2004). Involvement of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in the MEK/MAPK signal transduction pathway. J Biol Chem **279**(32): 33759-33767.
- Schmittgen, T. D. y K. J. Livak, (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.
- Sharma, A., C. A. Hoeffler, Y. Takayasu, T. Miyawaki, S. M. McBride, E. Klann y R. S. Zukin, (2010). Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. J Neurosci **30**(2): 694-702.
- Shenoy, S. K., M. T. Drake, C. D. Nelson, D. A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R. T. Premont, O. Lichtarge y R. J. Lefkowitz, (2006). beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. J Biol Chem **281**(2): 1261-1273.
- Shepherd, J. D. y M. F. Bear, (2011). New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. Nat Neurosci **14**(3): 279-284.
- Shors, T. J., (2001). Acute stress rapidly and persistently enhances memory formation in the male rat. Neurobiol Learn Mem **75**(1): 10-29.
- Sidorov, M. S., B. D. Auerbach y M. F. Bear, (2013). Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity. Mol Brain **6**: 15.
- Siomi, H., M. C. Siomi, R. L. Nussbaum y G. Dreyfuss, (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. Cell **74**(2): 291-298.
- Stoica, L., P. J. Zhu, W. Huang, H. Zhou, S. C. Kozma y M. Costa-Mattioli, (2011). Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. Proc Natl Acad Sci U S A **108**(9): 3791-3796.
- Sumi, K., S. Higashi, M. Natsume, K. Kawahata y K. Nakazato, (2014). Temporal changes in ERK phosphorylation are harmonious with 4E-BP1, but not p70S6K, during clenbuterol-induced hypertrophy in the rat gastrocnemius. Appl Physiol Nutr Metab **39**(8): 902-910.
- Tang, S. J., G. Reis, H. Kang, A.-C. Gingras, N. Sonenberg y E. M. Schuman, (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 467-472.

- Thomas, G. M. y R. L. Huganir, (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci **5**(3): 173-183.
- Tsigos, C. y G. P. Chrousos, (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. J Psychosom Res **53**(4): 865-871.
- Ulrich-Lai, Y. M. y J. P. Herman, (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. Nat Rev Neurosci **10**(6): 397-409.
- Wang, H., Y. Morishita, D. Miura, J. R. Naranjo, S. Kida y M. Zhuo, (2012). Roles of CREB in the regulation of FMRP by group I metabotropic glutamate receptors in cingulate cortex. Mol Brain **5**: 27.
- Weill, L., E. Belloc, F.-A. Bava y R. Méndez, (2012). Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. Nat Struct Mol Biol **19**(6): 577-585.
- Whitehead, G., J. Jo, E. L. Hogg, T. Piers, D.-H. Kim, G. Seaton, H. Seok, G. Bru-Mercier, G. H. Son, P. Regan, L. Hildebrandt, E. Waite, B.-C. Kim, T. L. Kerrigan, K. Kim, D. J. Whitcomb, G. L. Collingridge, S. L. Lightman y K. Cho, (2013). Acute stress causes rapid synaptic insertion of Ca²⁺-permeable AMPA receptors to facilitate long-term potentiation in the hippocampus. Brain **136**(Pt 12): 3753-3765.
- Wu, L., D. Wells, J. Tay, D. Mendis, M. A. Abbott, A. Barnitt, E. Quinlan, A. Heynen, J. R. Fallon y J. D. Richter, (1998). CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. Neuron **21**(5): 1129-1139.
- Xie, W., N. Dolzhanskaya, G. LaFauci, C. Dobkin y R. B. Denman, (2009). Tissue and developmental regulation of fragile X mental retardation 1 exon 12 and 15 isoforms. Neurobiol Dis **35**(1): 52-62.
- Xu, D., W. Shen, R. Guo, Y. Xue, W. Peng, J. Sima, J. Yang, A. Sharov, S. Srikantan, J. Yang, D. Fox, Y. Qian, J. L. Martindale, Y. Piao, J. Machamer, S. R. Joshi, S. Mohanty, A. C. Shaw, T. E. Lloyd, G. W. Brown, M. S. H. Ko, M. Gorospe, S. Zou y W. Wang, (2013). Top3 β is an RNA topoisomerase that works with fragile X syndrome protein to promote synapse formation. Nat Neurosci **16**(9): 1238-1247.
- Yang, S., F. Roselli, A. V. Patchev, S. Yu y O. F. X. Almeida, (2013). Non-receptor tyrosine kinases integrate fast glucocorticoid signaling in hippocampal neurons. J Biol Chem **288**(33):23725-39.
- Yoshiya, M., Y. Komatsuzaki, Y. Hojo, M. Ikeda, H. Mukai, Y. Hatanaka, G. Murakami, M. Kawata, T. Kimoto y S. Kawato, (2013). Corticosterone rapidly increases thorns of CA3 neurons via synaptic/extranuclear glucocorticoid receptor in rat hippocampus. Front Neural Circuits **7**: 191.