

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***EFFECTO DEL ESTRÉS AGUDO POR RESTRICCIÓN DE  
MOVIMIENTO SOBRE EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN  
PROCESAMIENTO Y LOCALIZACIÓN DE CRMP2 EN  
HIPOCAMPO DE RATA ADULTA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica  
Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

**ANA VALENTINA DOBERTI MARTÍNEZ**

**Directora de Tesis: Dra. Jenny Fiedler**

**Santiago-CHILE**

**Octubre 2013**

## **ÍNDICE GENERAL**

	<b>Página</b>
Índice General	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	v
Abreviaturas	vi
Resumen	viii
Summary	xi
<b>1. Introducción</b>	
1.1. Homeostasis, alostasis y estrés.	1
1.2. Plasticidad sináptica y estrés.	3
1.3. Vías de transducción de señales involucradas en neuroplasticidad.	5
1.4. GSK3 $\beta$ y su rol en la homeostasis neuronal.	6
1.5. CRMP2 y acción en la dinámica de microtúbulos.	9
<b>2. Hipótesis y Objetivos</b>	
2.1. Hipótesis	13
2.2. Objetivo General	13
2.3. Objetivos Específicos	13
<b>3. Materiales y Métodos</b>	
3.1. Reactivos Generales	15
3.2. Metodología	16
3.2.1. Animales y procedimiento de estrés agudo	16
3.2.2. Preparación de los tejidos	16
3.2.3. Obtención de los extractos totales de hipocampo	17
3.2.4. SDS-PAGE e inmunowestern blot	18
3.2.5. Determinación de los niveles séricos de corticosterona	19
3.2.6. Inmunohistoquímica	20
3.2.7. Análisis Bioinformático	21

3.2.8. Análisis Estadístico	21
<b>4. Resultados</b>	
4.1. Objetivo 1: Evaluar parámetros fisiológicos como marcadores de estrés en rata adulta.	22
4.2. Objetivo 2: Estudiar los efectos del estrés por restricción de movimiento sobre las fosforilaciones de GSK3 $\beta$ y CRMP2 en extracto completo de hipocampo de rata adulta.	26
4.3. Objetivo 3: Estudiar los efectos del estrés sobre la localización celular de CRMP2-P en distintas zonas y estratos hipocampales.	34
4.4. Objetivo 4: Estudiar los efectos del estrés sobre la activación de calpaínas, y el clivaje de CRMP2 por parte de éstas.	41
<b>5. Discusión</b>	
5.1. El modelo de estrés agudo por restricción de movimiento es efectivo.	43
5.2. Efectos contrapuestos del estrés en la señalización GSK3 $\beta$ y CRMP2.	45
5.3. Localización de CRMP2 y su rol a nivel nuclear.	50
5.4. En estrés crónico, a diferencia del estrés agudo, se observa adaptación.	53
<b>6. Conclusiones</b>	55
<b>7. Limitaciones del estudio</b>	56
<b>8. Bibliografía</b>	57
<b>9. Material Suplementario</b>	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Esquema del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.	2
Figura 2	Estructura anatómica del hipocampo.	4
Figura 3	Proteínas involucradas en la dinámica de microtúbulos y su regulación.	8
Figura 4	Esquema resumen de la vía GSK3 $\beta$ -CRMP2.	12
Figura 5	Cuantificación de las heces de animales control y estresados.	23
Figura 6	Cuantificación de corticosterona por ensayo inmunocompetitivo en plasma de ratas a distintos tiempos de eutanasia post estrés.	23
Figura 7	Análisis de inmunowestern blot para Arc a distintos tiempos de eutanasia post estrés.	25
Figura 8	Arc en estrés crónico y agudo.	25
Figura 9	Inmunowestern blot para GSK3 $\beta$ a distintos tiempos de eutanasia post estrés.	27
Figura 10	Inmunowestern blot para CRMP2 a distintos tiempos de eutanasia post estrés.	29
Figura 11	Representación gráfica de la correlación entre los valores de CRMP2-P y GSK3 $\beta$ -P.	30
Figura 12	Curva de tiempo de estimulación con 5HT 100 nM en cortes de hipocampo <i>ex vivo</i> .	31
Figura 13	GSK3 $\beta$ en estrés agudo y crónico.	33
Figura 14	CRMP2 en estrés agudo y crónico.	33
Figura 15	Localización de la toma de imágenes en microscopio confocal.	35
Figura 16	Inmunohistoquímica para CRMP2-P y MAP2A en el <i>stratum pyramidale</i> del CA3 de hipocampo de ratas a distintos tiempos post estrés.	37
Figura 17	Inmunohistoquímica para CRMP2-P y MAP2A en el <i>stratum pyramidale</i> del CA1 de hipocampo de ratas a distintos tiempos post estrés.	38
Figura 18	Inmunohistoquímica para CRMP2-P y MAP2A en el <i>stratum radiatum</i> del CA3 de hipocampo de ratas a distintos tiempos post estrés.	39
Figura 19	Inmunohistoquímica para CRMP2-P y MAP2A en el <i>stratum radiatum</i> del CA1 de hipocampo de ratas a distintos tiempos post estrés.	40

<b>Figura 20</b>	Immunowestern blot para fodrina a distintos tiempos de eutanasia post estrés.	42
<b>Figura 21</b>	Esquema de la participación de PP2A en la regulación de los niveles de fosforilación de GSK3 $\beta$ y CRMP2.	49
<b>Figura 22</b>	Dominios conservados de CRMP2.	52