

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS

**EFFECTOS DEL ESTRADIOL Y DE LA PROGESTERONA EN LA
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MAP2 EN
EL HIPOCAMPO DE LA RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)

P R E S E N T A:

BIÓL. MARCELA ANDREA REYNA NEYRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



El 11 de febrero de 2004, el Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Biól: Reyna Neyra Marcela Andrea con la tesis titulada: “EFECTOS DEL ESTRADIOL Y DE LA PROGESTERONA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MAP2 EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA” dirigida por el Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

PRESIDENTE: DRA: LOURDES MASSIEU TRIGO
SECRETARIO: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
VOCAL: DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN
VOCAL DR. JESUS CHIMAL MONROY
VOCAL DR. CAMILO RIOS CASTAÑEDA
SUPLENTE DRA. CLORINDA ARIAS ALVAREZ
SUPLENTE DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Marcela Andrea Reyna Neyra
FECHA: 9 de Agosto de 2004
FIRMA: Reyna Neyra

Este proyecto de investigación se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química y el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y la codirección de la Dra. Clorinda Arias Alvarez.

Este proyecto recibió apoyo del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP), Facultad de Química, U.N.A.M. No. 6190-07, así como una beca de estudios de doctorado del CONACyT (Reg. No. 144022) y la DGEP.

**SOMOS LA MEMORIA QUE TENEMOS Y LA RESPONSABILIDAD
QUE ASUMIMOS. SIN MEMORIA NO EXISTIMOS, SIN
RESPONSABILIDAD QUIZÁ NO DEBAMOS EXISTIR.**

JOSÉ SARAMAGO

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A DIOS por permitirme ver el nuevo día y estar conmigo para enfrentarlo.

A mi mamá Mary por tu amor y tu sonrisa, tus palabras de aliento todos los días, por tu compañía, tus consejos, las verdades y por tener esperanza y confianza en mí.

A mis abuelitos Angelita y Ricardo por sus consejos, su amor, y su confianza.

A mis hermanos José Manuel, Mario, Vicky y Sheila por su infinito amor y por su paciencia.

A las pequeñas grandes personas de la familia Reyna Ruiz-García (Manu, Chio y Marianita) por hacer mi vida muy feliz y por sorprenderme y enseñarme siempre algo nuevo

A Nury y Suemy por esas pláticas interminables, por su cariño y por compartir todo conmigo.

A todos mis tíos, primos y sobrinos que aún con la distancia y las circunstancias del momento, están conmigo y por mantener la fé de que todo mejorará.

Agradezco infinitamente y especialmente a Gaby, a Christian (Dr. War), a Aliesha, a Adriana (Adrianita), a Isabel, a Angélica, a Olga, a Andrea, a Tere (mi hermanita), a Edith, a Emanuelle e Iván a José, por su amistad de todo este tiempo, por su apoyo en tiempos no tan prósperos, por dejarme aprender siempre algo de ustedes y por su interés en compartir conmigo. A Luciano, a Mauricio (Moris), a Nelly, a Elizabet, por su siempre buen humor y su entusiasmo, por los viernes que se volvieron sábado y por su amistad incondicional. Por hacer de la estancia en el labo la mejor.

A Karina por ser una gran "Pandapersona", a Paty, a Ricardo (Johny, mi Rey), a Octavio, a la Dra. Zepeda (Ange), a Perla, a Rosi, a Eduardo Mtz (Lalo), a Xavier, por la amistad que me han brindado siempre, por recibirme con los brazos abiertos en su labo y por sus constantes enseñanzas.

A mis amigos de mucho tiempo a Lalo Domínguez, a la Dra. Erika Rodríguez a Alejandra Hernández (que bueno que regresaste), a David Barrera a Luis Manuel Flores por escucharme siempre, por su paciencia, por no olvidarme hasta ahora, por sus consejos y sus palabras que siempre me confortan.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo:

Por dirigir este trabajo de tesis, por permitirme continuar con mi formación académica, por compartir tus conocimientos y por no cesar en tu afán de hacer ciencia. Por la alegría y la confianza que permitieron que concluyera con este trabajo.

A la Dra. Clorinda Arias Alvarez. Por todo el tiempo dedicado a este proyecto, por participar sin condición en mi formación académica, por los comentarios para mejorar este trabajo y por la revisión de esta tesis. Por compartir tantas cosas tanto personales como de trabajo. Por manifestarme tus valores y tu apoyo. Por recibirme siempre con los brazos abiertos. Gracias.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes. Por la revisión de este trabajo, por sus consejos para mejorarlo y por su constancia en las actividades científicas, por dejarme aprender algo de usted siempre.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo, al Dr. Gabriel Roldán Roldán, al Dr. Camilo Ríos Castañeda y al Dr. Jesús Chimal Monroy, por la disposición para la revisión de esta tesis y sus invaluable comentarios para mejorarla.

A esta verdadera máxima casa de estudios, **la UNAM**, por todos los recursos otorgados durante la realización de este proyecto.

Al CONACyT y a la DGEP por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

ÍNDICE

I.	ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	12
II.	RESUMEN	13
III.	ABSTRACT	15
IV.	INTRODUCCIÓN	17
V.	ANTECEDENTES	
	5.1. Estructura de las hormonas esteroides.....	18
	5.1.1.Mecanismos celulares de acción de la progesterona y el estradiol ..	20
	5.2. El ciclo estral de la rata.....	22
	5.3 Efectos del estradiol y de la progesterona en el hipocampo de la rata	24
	5.3.1.Efectos del estradiol y de la progesterona en la plasticidad neuronal en el hipocampo de la rata	26
	5.4.Organización del citoesqueleto	31
	5.4.1. Microtúbulos y proteínas asociadas a microtúbulos (MAPS)	32
	5.4.2. Expresión de la proteína MAP2 en el sistema nervioso central de la rata	35
	5.4.3. Expresión de la proteína Tau en el sistema nervioso central de la rata	39
	5.4.4. Papel del estradiol y de la progesterona en la regulación de MAP2 y Tau en el sistema nervioso central de la rata.....	41
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
VII.	HIPÓTESIS	44

VIII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL	44
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Animales de experimentación y tratamientos hormonales.....	45
9.2 Análisis de las proteínas MAP2 y TAU	
9.2.1. Extracción y electroforesis de proteínas termoestables.....	46
9.2.2. Western blot	47
9.3. Análisis de la expresión del gen de MAP2 por RT-PCR.	
9.3.1. Extracción del RNA total	47
9.3.2. Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	48
9.3.3. Electroforesis de los productos de RT-PCR.....	50
9.4. Análisis inmunohistoquímico de la proteína MAP2 durante el ciclo estral de la rata	
9.4.1. Perfusión de animales y cortes cerebrales	51
9.4.2. Inmunohistoquímica	52
9.4.3. Análisis de la distribución de MAP2 por inmunohistoquímica	53
9.5. Determinación de las concentraciones séricas de estradiol y progesterona por radioinmunoanálisis.....	53
9.6. Análisis de resultados	54

X. RESULTADOS

10.1. Efectos del estradiol y de la progesterona en el contenido de MAP2 y Tau en el hipocampo y la corteza cerebral de la rata.....	55
10.2. Expresión del RNAm de MAP2 en el hipocampo y la corteza cerebral de la rata.....	58
10.3. Contenido de MAP2 y Tau en el hipocampo y la corteza cerebral de la rata durante el ciclo estral	61

10.4. Distribución de la proteína MAP2 en el hipocampo de la rata durante el ciclo estral	64
10.5 Concentraciones séricas de estradiol y progesterona durante el ciclo estral.....	71

XI. DISCUSIÓN

11.1. Regulación región-específica del contenido de la proteína MAP2 por estradiol y progesterona y durante el ciclo estral de la rata	72
11.2. Regulación diferencial de la expresión del gen (mRNA) y de la proteína MAP2 en el hipocampo de la rata por el estradiol y la progesterona	74
11.3. Distribución diferencial de la proteína MAP2 en el hipocampo durante el ciclo estral de la rata.....	75
11.4. Regulación de la proteína Tau en el hipocampo por el E2 y la P4 y durante el ciclo estral	77
11.5. Mecanismos de regulación de la expresión de MAP2 por E2 y P4.	77

XII. CONCLUSIÓN..... 80

XIII. PERSPECTIVAS 81

XIV. REFERENCIAS..... 82

XV. ARTÍCULOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE TESIS

- 1.- **Reyna-Neyra A**, Camacho-Arroyo I, Ferrera P and Arias C. *Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein 2 content in the rat hippocampus. Brain Research Bulletin.* 58 (6):607-612. 2002.

- 2.- **Reyna-Neyra A;** Arias C; Ferrera P; Morimoto S and I. Camacho-Arroyo. *Changes in the content and distribution of microtubule associated protein 2 in the hippocampus of the rat during the estrous cycle.* **Journal of Neurobiology.** Se anexan pruebas de galera.

I. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Este trabajo está dividido en tres secciones principales. En la primera de ellas se revisan los efectos del estradiol (E_2) y de la progesterona (P_4) en el hipocampo de la rata, las características generales de las proteínas de citoesqueleto MAP2 y Tau así como los antecedentes más relevantes sobre las acciones del E_2 y la P_4 en la regulación de la expresión de MAP2 y Tau. Esta sección también incluye el planteamiento del problema, la hipótesis, los objetivos generales y particulares, así como la metodología empleada para realizarlos.

En la segunda sección se presentan los resultados obtenidos del trabajo experimental, la discusión general del trabajo, las conclusiones, las perspectivas de estudio en esta área y las referencias utilizadas en el mismo.

En la última sección se presentan los dos artículos derivados de este proyecto, en ellos se detallan los materiales y métodos utilizados, los resultados obtenidos, así como la discusión de estos resultados. Uno de estos artículos "Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein 2 content in the rat hippocampus" ya fue publicado en la revista indexada, arbitrada y de circulación internacional *Brain Research Bulletin* (índice de impacto: 2.28) en el volumen 58 número 6 páginas 607-612. El segundo "Changes in the content and distribution of microtubule associated protein 2 in the hippocampus of the rat during the estrous cycle" se encuentra en prensa en la revista *Journal of Neurobiology* (índice de impacto: 3.43).

II. RESUMEN

Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la regulación de la plasticidad neuronal y la neuroprotección por el estradiol (E2) y la progesterona (P4) no se conocen por completo. Considerando que ambos procesos involucran cambios en la organización del citoesqueleto neuronal, en el presente trabajo se estudiaron los efectos del E2 y la P4 en la expresión de dos proteínas que participan en la organización de elementos del citoesqueleto: la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) y la proteína Tau en el hipocampo y en la corteza frontal de ratas adultas ovariectomizadas y durante el ciclo estral mediante las técnicas de Western blot, inmunohistoquímica y transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La expresión de la proteína Tau no se modificó por los tratamientos con E2 y P4, o durante el ciclo estral. Un incremento en el contenido de la proteína MAP2 en el hipocampo pero no en la corteza frontal fue observado con los dos tratamientos. Durante el ciclo estral en el hipocampo, el menor contenido de MAP2 fue encontrado en el día del diestro y se incrementó significativamente en el proestro. Este incremento se mantuvo en los días del estro y el metaestro. En la corteza frontal, ni el contenido de MAP2 ni de Tau se modificó significativamente por el tratamiento con E2 y P4 o durante el ciclo estral. El análisis inmunohistoquímico mostró un incremento en el grosor de las dendritas y en las ramificaciones de las mismas en la región CA1 del hipocampo en el día del proestro así como también una agregación de MAP2 en las dendritas apicales cercanas a los somas de las neuronas piramidales en

comparación con el diestro. En los otros días del ciclo estral no hubo modificación en el patrón de localización respecto al proestro aunque la inmunotinción fue menor. A las 19 h, la inmunotinción de MAP2 fue mayor en el proestro, en comparación con los otros días del ciclo, sin embargo el número de ramificaciones dendríticas aumentó en el diestro y disminuyó en el estro y metaestro respecto a las 12 h. En la región CA3 del hipocampo no hubo cambios en la inmunotinción de MAP2 durante el ciclo estral. En la corteza cerebral el patrón de distribución de MAP2 fue similar durante el ciclo estral. El análisis de la expresión del gen de MAP2 por RT-PCR mostró que los tratamientos con el E2 y la P4 no modificaron la expresión del RNA mensajero de MAP2 en el hipocampo o la corteza frontal. Estos datos sugieren que los cambios en el contenido y la distribución neuronal de MAP2 inducidos por el E2 y la P4 y durante el ciclo estral están involucrados en la regulación de plasticidad neuronal del hipocampo de la rata por estas hormonas y que la expresión de MAP2 es regulada por E2 y P4 a nivel postranscripcional.

III. ABSTRACT

The molecular and cellular mechanisms involved in the regulation of synaptic plasticity in the hippocampus by estradiol (E2) and progesterone (P4) and during the estrous cycle of the rat are not completely understood. Since this process implicates changes in neuronal cytoskeleton, in the present work we studied the effects of E2 and P4 in the expression of two proteins involved in the organization of the cytoskeleton: microtubule associated protein 2 (MAP2) and Tau protein in the hippocampus and the frontal cortex of ovariectomized adult rats and during the estrous cycle by Western blot, immunohistochemistry and reverse transcription coupled to polymerase chain reaction (RT-PCR). While Tau expression was unaffected in either E2 and P4 treatments or during the estrous cycle, an increase in MAP2 protein content in the hippocampus but not in the frontal cortex was observed after E2 and P4 treatments. During the estrous cycle in the hippocampus the lowest content of MAP2 was found on diestrus day, and it significantly increased at proestrus. This increase was maintained on estrus and metestrus days. In the frontal cortex, neither MAP2 nor Tau content was significantly modified by E2 and P4 treatments or during the estrous cycle. The immunohistochemical analysis showed an increase in dendrites thickness and in dendritic branching in CA1 region on proestrus day as well as an aggregation of MAP2 in apical dendrites near to pyramidal somata on this day in comparison with diestrus. This branching pattern diminished during estrous and metestrus days. The analysis during the evening (19 h) of each day of the estrous cycle, showed an increase in immunostaining at proestrus in comparison with the other days the estrous cycle. However, the branching was increased during the diestrus and a

diminution was observed during the estrus and metestrus in comparison with 12 h. In CA3 region of the hippocampus there were no differences in MAP2 immunostaining during the estrous cycle. In the cerebral cortex the distribution of MAP2 pattern was similar during the estrous cycle. The analysis of MAP2 gene expression by RT-PCR showed that E2 and P4 did not modify MAP2 mRNA content in either the hippocampus or the frontal cortex. These data suggest that the changes in the content and neuronal distribution of MAP2 induced by E2 and P4 treatments and during the estrous cycle, are involved in the neuronal plasticity regulated by these hormones in the hippocampus of the rat, and that MAP2 expression is regulated by E2 and P4 at a posttranscriptional level.

IV. INTRODUCCIÓN

El estradiol (E2) y la progesterona (P4) están involucrados en la regulación de la morfología y la función neuronal en el sistema nervioso central. En el hipocampo de ratas adultas el tratamiento con E2 incrementa la densidad de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo de la rata y el tratamiento conjunto con P4 después de 5 h, incrementa el efecto del E2. Durante el ciclo estral, el número de espinas dendríticas presenta una disminución del 30% en el día del estro respecto al día del proestro en la región CA1 del hipocampo de la rata, cuando las concentraciones de E2 y P4 son mayores durante el ciclo (Gould y Woolley, 1990; Woolley y McEwen, 1990) . Estas modificaciones específicas en la morfología neuronal involucran cambios en las proteínas de citoesqueleto que se conoce tienen una participación importante en la formación de axones y dendritas como son las proteínas Tau y MAP2. Estudios *in vitro* utilizando cultivos primarios de neuronas de hipocampo han mostrado que el E2 aumenta el número de ramificaciones dendríticas (Audersik, et al., 2002) y en cultivos de neuronas maduras de hipocampo tratadas con E2 se ha observado un aumento en la expresión de MAP2 (Shah et al., 2003). Hasta el momento no se conoce si el E2 y la P4 participan en la modificación de la morfología neuronal en el hipocampo de la rata *in vivo* a través de la regulación de la expresión o el contenido de proteínas de citoesqueleto como MAP2 y Tau. El conocimiento de estos procesos permitirá establecer si las modificaciones en la morfología neuronal que ejercen el E2 y la P4 en el hipocampo de la rata *in vivo* involucran la participación de las proteínas antes mencionadas.

V. ANTECEDENTES

5.1. Estructura de las hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas son moléculas lipídicas derivadas del colesterol que incluyen a las progestinas como la P4 (del latín: *pr*=a favor y *gestare*=llevar), los andrógenos, los glucocorticoides, los mineralocorticoides y los estrógenos como el E2. La P4 y el E2 de 21 y 18 átomos de carbono respectivamente, se sintetizan principalmente en el ovario (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

La estructura química de la P4 y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21; Fig. 1). La P4 se sintetiza principalmente en el retículo endoplasmático liso de las células del cuerpo lúteo del ovario, durante el ciclo menstrual (Hsueh et al., 1984; Hutchison et al., 1986); otros órganos donde también se ha demostrado su síntesis son la corteza adrenal, la placenta (Goroscope et al., 1985; Perrot-Appianat et al., 1982), el testículo, (Weisz et al., 1980; Dalkin et al., 1992) y el cerebro (Zwain y Yen, 1999; Ukena, et al., 1999). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y la adrenalina (Graham et al., 1997).

La síntesis de P4 se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a P4 (Fig. 1), por medio de distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

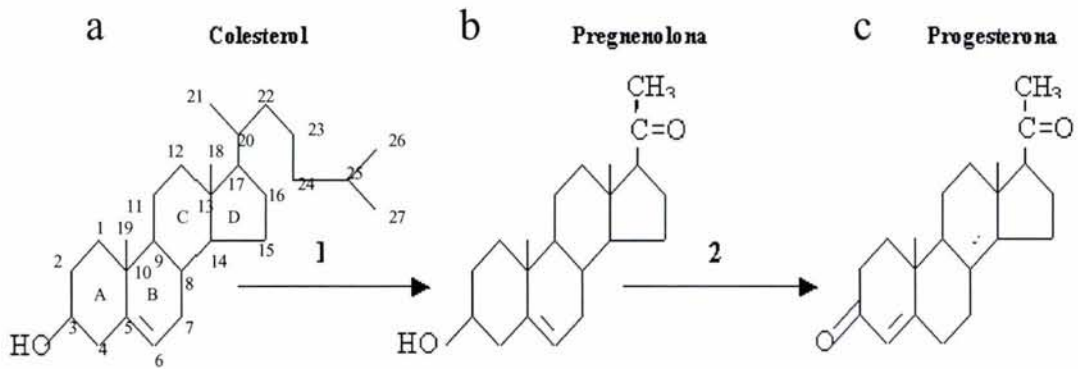


Fig. 1. Biosíntesis de la P4. La biotransformación de colesterol a P4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17 por medio de la enzima 20,22 esteroide liasa +(1), b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3 por medio de la enzima 3 β -OH-esteroide deshidrogenasa (2) y c) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A) (Gore-Langton, 1988).

Una vez que la P4 y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

1. La reducción en el carbono 20 lo que da lugar a la formación de 20 α y 20 β dihidroprogesterona (con actividad biológica, que puede ser similar o diferente a la de progesterona); posteriormente se reduce el anillo A en los carbonos 3 y 5 dando lugar a la formación de ocho pregnandioles o pregnantrioles.
2. La reducción de los pregnandioles forma glucurónidos, lo que incrementa la polaridad de la molécula formándose así compuestos hidrofílicos que facilita su excreción por la orina (Fig. 2).

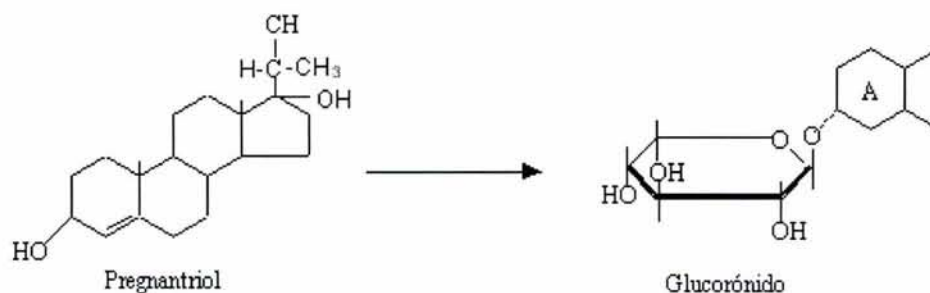


Fig. 2. Principales catabolitos de la P4 (Renwick 1970).

La pregnenolona y la P4 pueden generar compuestos de 19 átomos de carbono como la androstendiona que es el precursor de la testosterona. Estos últimos, pueden ser aromatizados en el anillo A mediante la enzima P450 aromatasa formando compuestos con actividad estrogénica como la estrona y el E2 (Fig. 3).

La síntesis del E2 es regulada por la FSH y LH y se lleva a cabo en el retículo endoplasmático liso en las células de la granulosa del ovario (Gore-Langton y Armstrong, 1988), en células de Sertoli y en el cerebro (Calixto y Brailowsky, 1999).

Una vez que los estrógenos llevan a cabo sus efectos, son transformados a conjugados glucoronidos y sulfatados en el hígado y junto con otros metabolitos del colesterol son excretados en la orina (Ganong et al., 2002).

5.1.1. Mecanismos celulares de acción de la progesterona y el estradiol

Los mecanismos celulares mediante los cuales el E2 y la P4 puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: genómico y no genómico (Bramley, 2003). El primero involucra la interacción del E2 o la P4 con sus receptores nucleares

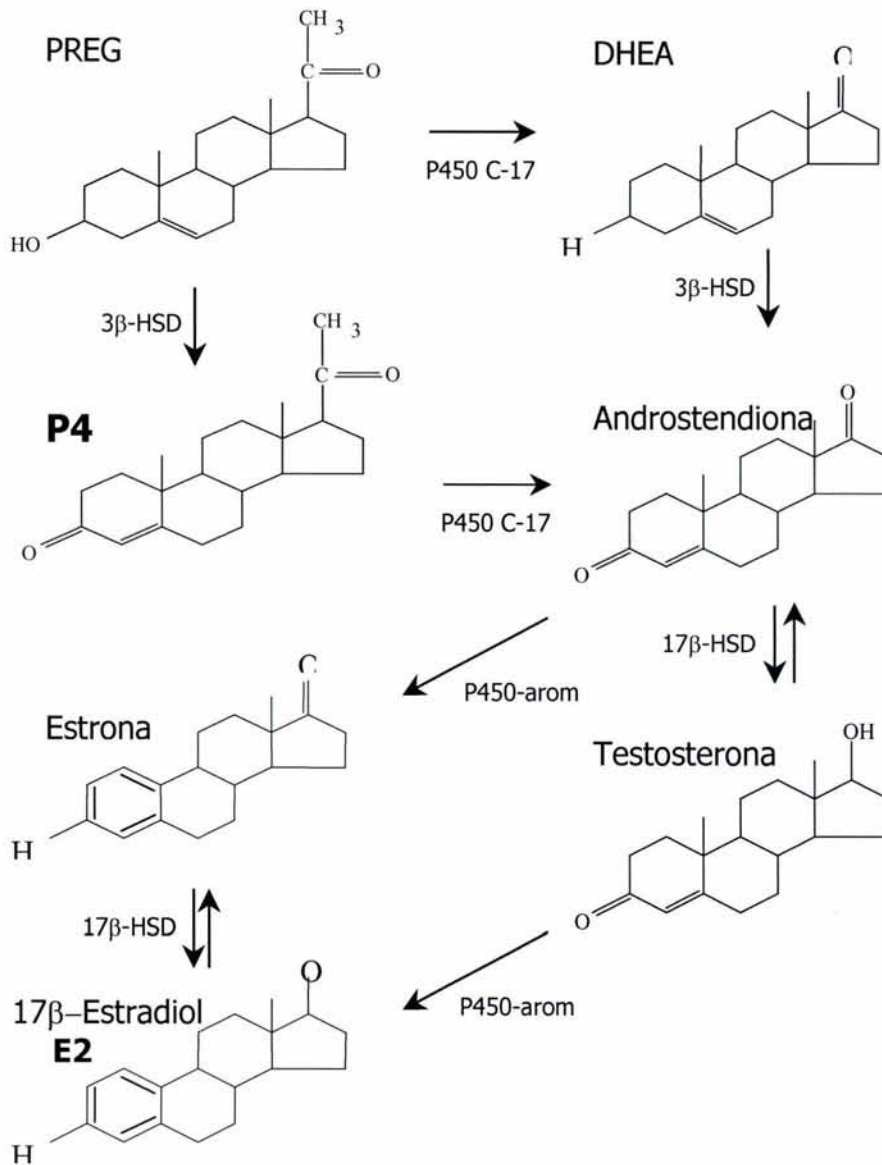


Fig. 3. Biosíntesis del E2. La síntesis del E2 puede ocurrir a partir de la pregnenolona (PREG) y la progesterona (P4) utilizando como intermediario a la androstendiona. A partir de la PREG, la P450-C17 (17 α -hidroxilasa/17-20 liasa), cataliza la 17-hidroxilación y promueve el rompimiento de la unión 17-20 de la PREG para la obtención de dehidroepiandrosterona (DHEA). A partir de ésta y de la P4, la 3 β -HSD (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa) y P450-C17 genera androstendiona, la cual por la 17 β -HSD (17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ceto esteroide reductasa) puede generar testosterona, ambos esteroides por la P450-aromatasa (P450-aromatasa) generan compuestos con actividad estrogénica como la estrona y el 17 β -estradiol (E2). Esquema modificado (Mellon, 1994; Burger, 2002).

(RE y RP respectivamente) (Evans, 1988), mientras que el segundo requiere la interacción del E2 o la P4 al unirse a sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores como el GABA_A, canales iónicos, receptores de tipo tirosina cinasa y receptores de siete dominios transmembranales (Fig. 4) (Camacho-Arroyo, 2003).

5.2. El ciclo estral de la rata

Los ciclos reproductivos de los mamíferos están definidos generalmente por el tipo de ovulación que presentan: la ovulación refleja y la ovulación cíclica. Los mamíferos con ovulación refleja, requieren de la cópula para ovular y la presentan el conejo y el gato, entre otros (Ramírez y Beyer, 1985). La ovulación cíclica puede clasificarse dependiendo de la respuesta del epitelio uterino a la estimulación hormonal en los ciclos menstrual y estral.

Durante el ciclo menstrual las capas superficiales del endometrio se desprenden acompañadas de una hemorragia (menstruación), mientras que en el ciclo estral, el desprendimiento de las células endometriales no provoca esta hemorragia. El ciclo estral se presenta en distintas especies de roedores y se divide en varias etapas (Freeman, 1988).

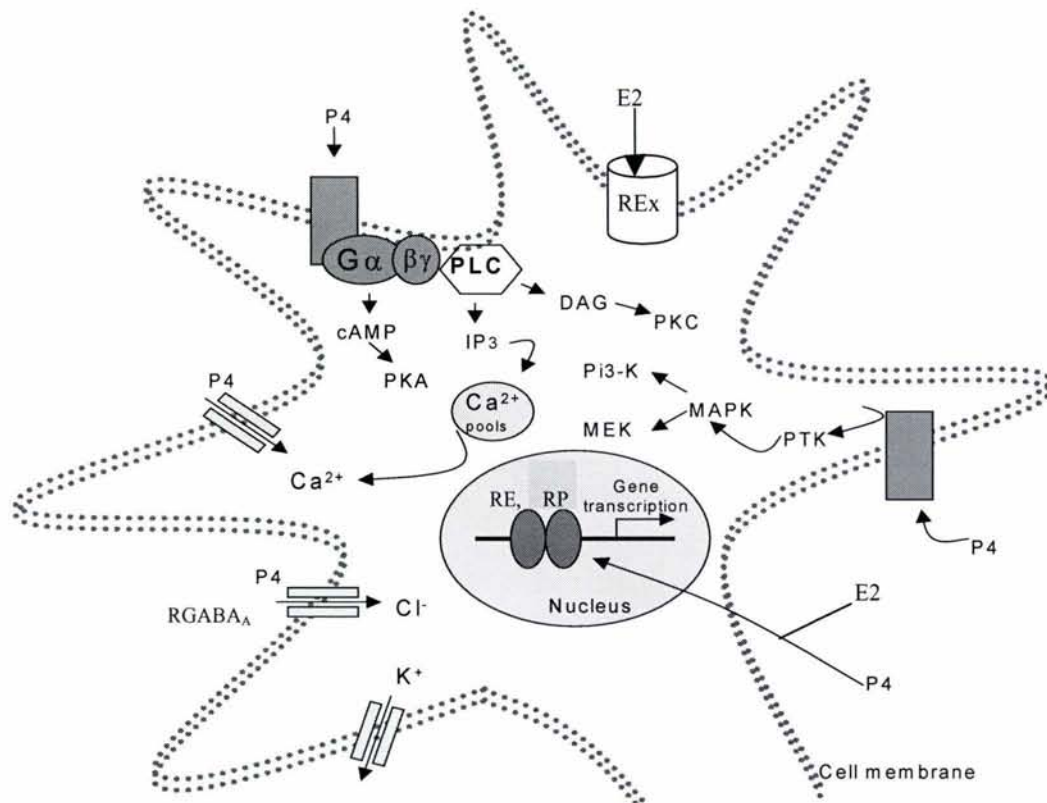


Fig. 4. Mecanismos celulares de acción de la P4 y el E2 (Modificado de Camacho-Arroyo, 2003). Los efectos de la P4 y el E2 ocurren por 2 diferentes mecanismos celulares: 1) en la membrana, incluyen receptores membranales y canales, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares; 2) en el núcleo donde receptores a P4 y a E2 (RP y RE) que son moduladores directos de la expresión génica, mediante la interacción del complejo hormona-receptor con elementos de respuesta hormonal, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA. G: Proteína G, $\alpha\beta\gamma$: Subunidades de la proteína G, PKA: Proteína Cinasa A, RGABA_A: Receptor a GABA tipo A, RP: Receptor a P4, PLC: Fosfolipasa C, IP₃: Inositol Trifosfato, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PTK: Proteína de Tirosina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, MEK: Cinasa de MAPK, Cl⁻: Cloro, Ca²⁺: Calcio, K⁺: Potasio.

El ciclo estral de la rata se divide en cuatro etapas (proestro, estro, metaestro y diestro) que se caracterizan de acuerdo a la concentración de E2, P4, FSH y LH y por la abundancia de diferentes tipos celulares que se encuentran en un frotis vaginal. La duración media del ciclo estral se ha considerado entre 4.4-4.8 días (Freeman, 1988). Durante el estro y el metaestro la concentración de E2 en sangre es basal (~20 pg/ml), mientras que en la noche del diestro se presenta un incremento (~40 pg/ml) hasta alcanzar su concentración máxima (>50 pg/ml) al medio día del proestro (Freeman, 1988) (Fig. 5). Este incremento activa la liberación de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo que a su vez desencadena la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) por la hipófisis. Durante la tarde del proestro la concentración de E2 disminuye rápidamente hasta alcanzar valores basales en las primeras horas de la mañana del estro (Freeman, 1988).

El aumento significativo en la concentración de LH es seguido por un incremento en la secreción de P4, unas horas después de este aumento se presenta la ovulación y el comportamiento sexual característico de lordosis y posteriormente ocurre la cópula en la madrugada del estro. Durante el ciclo estral, la concentración de P4 se incrementa significativamente dos veces. Primero se presenta un incremento de origen folicular durante la tarde del proestro (>50 ng/ml) y otro de origen luteal que ocurre alrededor del mediodía del metaestro (~25 ng/ml), el cual se prolonga hasta la mañana del diestro y regresa a concentraciones basales en la tarde de ese mismo día (Freeman, 1988) (Fig. 5).

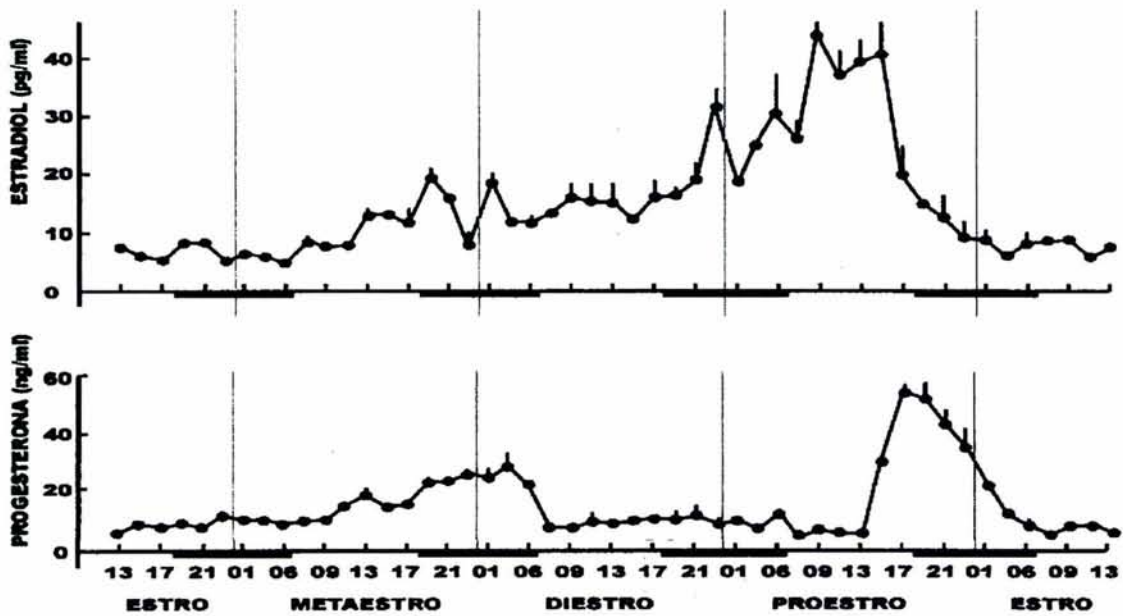


Fig. 5. Concentraciones séricas de E2 y P4 durante el ciclo estral de la rata. Las concentraciones fueron obtenidas en intervalos de 2 horas a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan los intervalos de oscuridad en la colonia de ratas y los números en la base representan la hora del día (Tomado de Freeman, 1988).

5.3. Efectos del estradiol y de la progesterona en el hipocampo de la rata

Diversos estudios han mostrado que el hipocampo es una de las regiones del sistema nervioso central donde el E2 y la P4, inducen modificaciones en su estructura y función.

La organización celular del hipocampo fue descrita por Ramón y Cajal (1911) y es la misma que se utiliza actualmente (Amaral y Witter, 1995). Esta estructura, está organizada en regiones que se denominan como CA (Cornu Amonis), el giro dentado y el subiculum las cuales a su vez se dividen en regiones específicas que presentan tipos celulares y proyecciones neuronales características (Fig. 6). El

hipocampo se ha relacionado directamente con el establecimiento de la memoria espacial y el aprendizaje (Kandel et al. 2000) por el mecanismo de potenciación a largo plazo, el cual se conoce puede estar regulado por las concentraciones endógenas de E2 en la rata (Good et al., 1999). Esta región es considerablemente susceptible al daño neuronal por diferentes agentes neurotóxicos (Holscher, 2003).

En los roedores adultos como la rata, los diferentes tipos celulares que conforman esta estructura presentan diferentes respuestas al E2 y a la P4, los cuales modifican la plasticidad neuronal del hipocampo, la cual está relacionada con cualquier cambio en la estructura y la función de las neuronas que pueda contribuir al aprendizaje, la memoria y la recuperación del daño (Sánchez et al., 2000).

5.3.1. Efectos del estradiol y de la progesterona en la plasticidad neuronal en el hipocampo de la rata.

En modelos experimentales *in vivo*, el E2 y la P4 han sido ampliamente utilizados como compuestos neuroprotectores en diversos paradigmas de daño neuronal. Se ha reportado que la administración de E2 previa al daño neuronal producido por isquemia, disminuye el daño neuronal en la región CA1 del hipocampo del gerbo y de la rata así como la expresión del RNAm de la proteína precursora del péptido β -amiloide (Sudo, 1997; McCullough y Hurn, 2003, Shi, et al., 1998) que en su forma agregada forma las placas seniles o amiloideas las cuales son consideradas como un marcador histopatológico en la enfermedad de

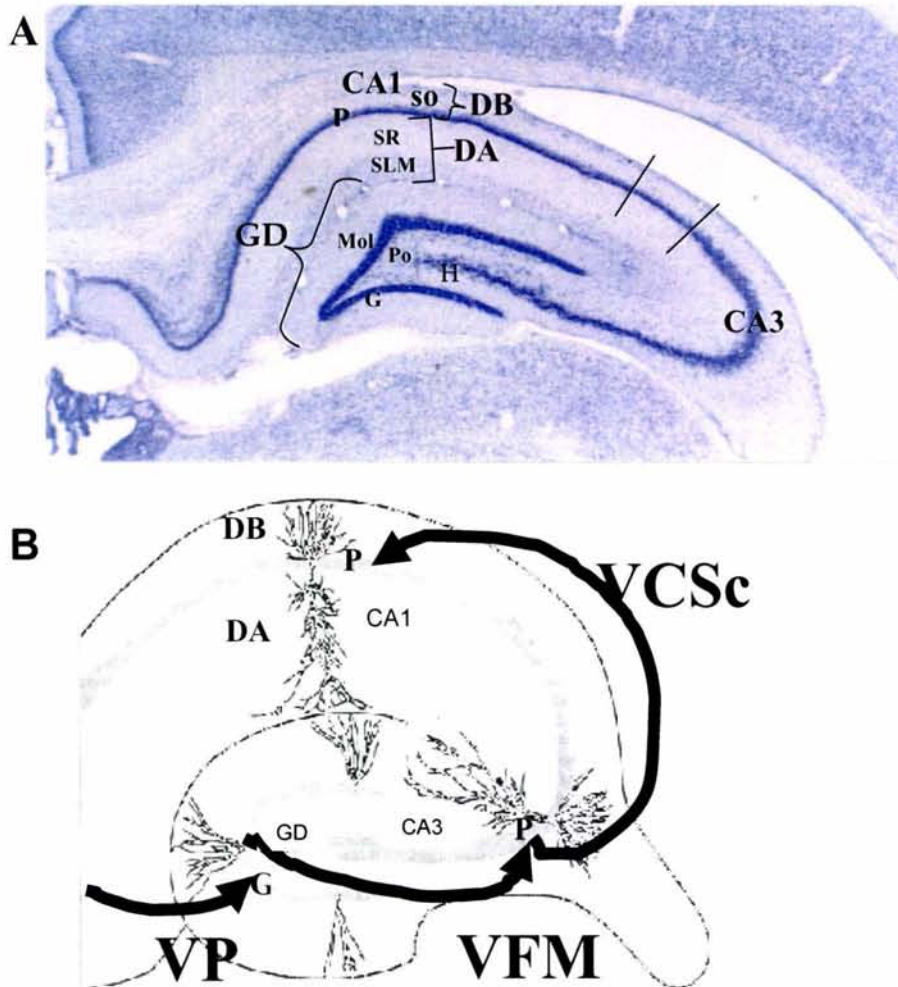


Fig. 6. Morfología y vías de conectividad intrínsecas del hipocampo de la rata. Tinción de Nissl de un corte coronal del cerebro de la rata que muestra la morfología general del hipocampo (A) y las vías de conectividad intrínsecas del hipocampo (B). **CA1-CA3** Cornu Amonis 1-3. **SO** estratum oriens. **P** estratum piramidal. **SR** estratum radiatum. **SLM** estratum lacunosum molecular. **DB** dendritas basales. **DA** dendritas apicales. **GD** giro dentado. **Mol** estratum molecular, **Po** estratum polimórfico, **G** estratum granular. **H** hilus (A). **VP** vía perforante proveniente de la corteza entorrinal hacia G. **VFM** vía de las células musgosas proveniente de las células granulares del GD hacia P de CA3. **VCSc** vía de las colaterales de Schaffer de P de CA3 hacia P de CA1 (B) Las células piramidales de CA1 proyectan de nuevo a la corteza entorrinal (Modificado de Amaral y Witter, 1995).

Alzheimer (EA) (Bonnefont, et al., 1998). Algunos estudios epidemiológicos han establecido una relación que involucra la disminución de las deficiencias cognitivas asociadas a la EA en mujeres que reciben terapia de reemplazo hormonal en la etapa postmenopáusica (Paganini-Hill y Henderson, 1996. Green y Simpkins, 2000). En modelos murinos el los cuales se induce una desaferentación similar a la que ocurre en la EA el crecimiento dendrítico es potenciado por el E2 en ratas ovariectomizadas (Stone et al., 2000; Rosovsky et al., 2002). Por otra parte el tratamiento combinado de E2 y P4 tiene un efecto protector en contra del daño neuronal inducido por inyecciones intrahipocampales de colchicina en la rata (Vongher y Frye, 1999). También diferentes estudios *in vitro* en los que se emplean cultivos primarios de neuronas corticales e hipocampales han demostrado que el E2 previene la muerte inducida por glutamato o por N-metil-D-aspartato (NMDA) (Reagan y Guo, 1997). En la línea celular hipocampal HT22, los efectos neurotóxicos producidos por el péptido β -amiloide disminuyen por la administración de E2 (Bonnefont, et al., 1998).

Por otro lado, se conoce que el E2 y la P4 modifican la morfología de la región CA1 del hipocampo de la rata y del mono *Cercopithecus aethiops sabaesus* (Gould y Woolley, 1990; Woolley y McEwen, 1990; Leranth et al., 2002). Estos estudios demostraron que el E2 solo o en combinación con la P4 aumentan el número de espinas de las dendritas apicales de la región CA1 (estratum radiatum y lacunosum molecular) del hipocampo de las ratas hembra en comparación con las ratas tratadas con vehículo (Gould et al., 1990). Posteriormente Woolley y McEwen (1990) reportaron que la densidad de espinas dendríticas en la región

CA1 se modifica significativamente durante el ciclo estral, siendo 30% mayor en la tarde del proestro cuando se presentan la concentración máxima de E2 y P4 durante el ciclo estral en comparación con el estro donde las concentraciones de E2 y P4 disminuyen significativamente. En este estudio también se demostró que existe un aumento significativo en el número de sinapsis entre axones y espinas dendríticas en CA1 y no se registró ningún cambio en los parámetros antes mencionados en alguna otra región del hipocampo (Woolley y McEwen, 1990; Woolley y McEwen, 1993).

Estos estudios dieron la pauta para explorar los mecanismos celulares que determinan los efectos mediados por el E2 y la P4 y las modificaciones ultraestructurales que se originan por acción de estas hormonas.

Así, uno de los mecanismos que se ha propuesto para explicar el aumento en el número de espinas dendríticas, está relacionado con la activación de los receptores a glutamato particularmente del tipo NMDA ya que al utilizar antagonistas de este receptor como el 2-APV, pero no antagonistas para receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) o kainato se inhibe el efecto (Woolley y McEwen, 1994; Murphy y Segal, 1996).

Por otro lado se ha propuesto que la formación de espinas dendríticas y el establecimiento de sinapsis involucra también la participación de los RE y RP ya que el uso de antagonistas de E2 como el tamoxifen, el ICI182-780 y de P4 como el RU-486 inhiben los efectos del E2 y la P4 (Woolley y McEwen, 1993; McEwen et al., 2001; Gazzalley et al., 2002).

Entre las modificaciones ultraestructurales más importantes que se han descrito como consecuencia del aumento de espinas dendríticas por E2, se encuentra el aumento en el número de sinapsis que involucran botones sinápticos múltiples que se conectan con botones presinápticos existentes (Yankova et al., 2001).

En ratas macho gonadectomizadas, el E2 no modifica el número de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo respecto a los tratados con vehículo a diferencia de la testosterona que induce significativamente el número de espinas (Leranth et al., 2003; Leranth et al., 2004). Sin embargo, en el ratón hembra se ha reportado que el E2 no modifica el número de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo respecto a los animales tratados con vehículo (Li et al., 2004). Estos reportes muestran que el E2 presenta un efecto específico dependiente del sexo y de la especie.

En cultivos primarios de hipocampo, se ha demostrado que el E2 incrementa al doble la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales y que este aumento es dependiente del tiempo (Murphy y Segal, 1996). Sin embargo, la P4 bloquea este efecto a través de uno de sus metabolitos (la tetrahidroprogesterona), el cual potencia la actividad GABAérgica aumentando la inhibición neuronal (Rudick y Woolley, 2001. Smith et al., 1998. Segal y Murphy, 2001).

Estos reportes demuestran que el hipocampo es una región considerablemente plástica en respuesta al E2 y la P4 y que estos efectos ocurren en sitios específicos en las neuronas como son las dendritas las cuales junto con el axón determinan la polaridad neuronal (Barlett y Banker, 1984).

El desarrollo de la polaridad neuronal fue caracterizado en detalle en cultivos de baja densidad de neuronas hipocampales (Barlett y Banker, 1984) y la caracterización de axones y dendritas incluyó su estructura sináptica, receptores, canales iónicos, contenido ribosomal, presencia de microcuerpos y la composición del citoesqueleto que es conservada en el cultivo (Kosik y Cáceres, 1991. Heidemann et al, 1981) lo que permitió la caracterización de los elementos del citoesqueleto los cuales presentan una estructura y función específicas en cada uno de los compartimentos neuronales (Solomon, 1992).

5.4 Organización del citoesqueleto.

El citoesqueleto neuronal está constituido básicamente de tres elementos filamentosos como son los filamentos de actina, los neurofilamentos y los microtúbulos de los cuales depende la morfología neuronal tanto en el cerebro en desarrollo como en adultos (Fig. 7) (Kandel et al., 2000).

La actina es la proteína del citoesqueleto más abundante en todas las células y en las neuronas están presentes dos isoformas que son la β y γ -actina cuya proporción en el cerebro de la rata es de 2:1. Esta proteína presenta diversas modificaciones postraduccionales que dan origen a formas adicionales de actina las cuales se conoce presentan una estructura globular bilobulada (Choo y Bray, 1978; Flanagan y Lin, 1979).

De los filamentos de tamaño intermedio del citoesqueleto, los neurofilamentos, son las proteínas representativas. Las subunidades de neurofilamentos se expresan diferencialmente en el desarrollo y se conoce que en

la neurogénesis, las subunidades de neurofilamentos ligeros (NF-L) y medios (NF-M) de 61 y 90 kDa respectivamente son coexpresadas, mientras que la expresión de la subunidad de neurofilamentos pesados (NF-H) de 115 kDa se presenta hasta el período postnatal.

Otro de los elementos del citoesqueleto determinantes de la forma neuronal son los microtúbulos los cuales se describirán a continuación con mayor detalle.

5.4.1. Microtúbulos y proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)

Los microtúbulos están conformados por heterodímeros de α y β -tubulina conformando protofilamentos que a su vez conforman la pared cilíndrica del microtúbulo. El número de protofilamentos puede variar de 9 a 16 *in vitro* y solo 13 *in vivo* (Chrétien y Wade, 1991; Nogales et al., 1998). Los microtúbulos presentan una organización en haces y su polaridad es distinta, presentando un extremo más (+) (*plus end*) de crecimiento rápido y un extremo menos (-) (*minus end*) de crecimiento lento los cuales son determinantes en la función del microtúbulo (Alberts et al., 2002).

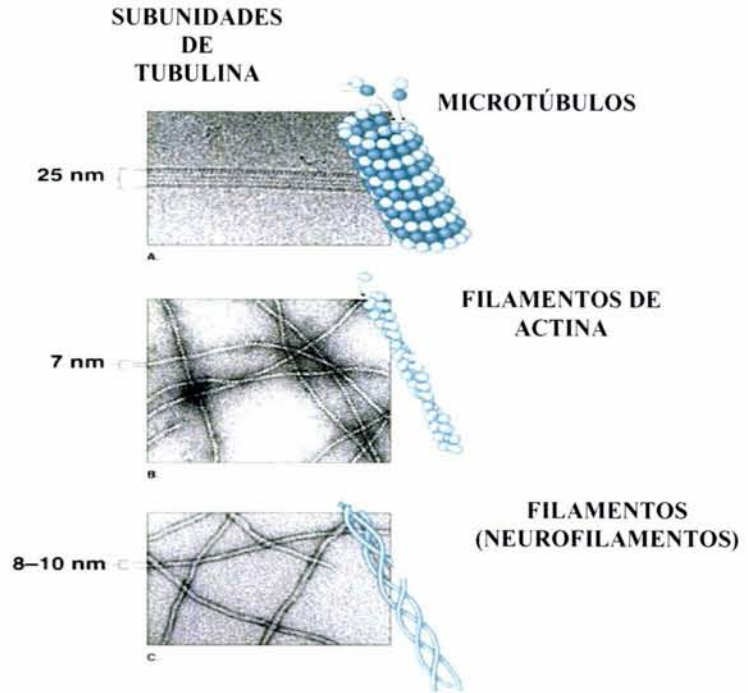


FIG. 7. Elementos del citoesqueleto neuronal.

La formación de un microtúbulo requiere de monómeros de tubulina (α y β) que presentan 40 % de similitud en su secuencia, contienen 450 aminoácidos y su peso molecular es de 50 kDa. Una vez que éstos se dimerizan pueden formar un microtúbulo para lo cual, en la etapa inicial (nucleación) se requiere de la presencia de la γ -tubulina la cual se ubica en el centro organizador de microtúbulos (MTOC) constituyendo un anillo que sirve como el sitio iniciador de la unión de dímeros de tubulina (Alberts et al., 2002).

La α tubulina siempre se encuentra asociada a un trifosfato de guanosa (GTP) en un sitio no intercambiable (sitio-N), a diferencia de la β tubulina que presenta un sitio-E donde el GTP puede ser intercambiado por difosfato de guanosa (GDP). La unión de GTP a la tubulina, es determinante en la formación

de un microtúbulo ya que favorece la asociación de monómeros adyacentes y el crecimiento (polimerización) del microtúbulo (Wade et al., 2001; Lynch et al., 2000).

El dominio central de la tubulina está constituido por los aminoácidos 207-384 y presenta el dominio de unión entre monómeros y protofilamentos.

Hacia el dominio carboxilo terminal (C-terminal) constituido por los aminoácidos 384-450 se encuentra el sitio de unión a proteínas motoras y proteínas estructurales asociadas a microtúbulos (Nogales et al., 1998).

Las *proteínas motoras* asociadas a los microtúbulos están representadas por las kinesinas y dineínas, las cuales regulan el transporte de organelos y proteínas a través del microtúbulo por un mecanismo dependiente de ATP. Las *proteínas estructurales* asociadas a microtúbulos están representadas por la catanina, la estatmina y las proteínas que promueven el ensamble de microtúbulos denominadas MAPs de las que MAP1A, MAP1B, MAP2 y la MAP Tau son las más estudiadas (Sánchez et al., 2000). Estas proteínas tienen como diferencia principal la secuencia de interacción con los microtúbulos. MAP1A y MAP1B se unen a los microtúbulos por una secuencia que presenta repeticiones de aminoácidos del tipo (KKE) (lisina, lisina y ácido glutámico) (Faruki y Karsenti, 1994). MAP2 y Tau, presentan 3 a 4 repeticiones de 18 aminoácidos separadas por inter-repeticiones de 13 ó 14 aminoácidos hacia el extremo C-terminal que conforman el dominio de unión a la tubulina.

Las MAPs participan en la organización de la estructura del citoplasma neurítico al estabilizar los microtúbulos y promover su polimerización. Estas proteínas en su mayoría, son termoestables y presentan diferentes sitios que son

susceptibles de ser fosforilados o glicosilados promoviendo así la unión y la estabilización de los microtúbulos (Matus, 1988; Avila et al., 1994). La fosforilación de estas proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más importantes que afecta la capacidad de las MAPs para unirse a los microtúbulos ya que a mayor número de grupos fosfato unidos, menor es la capacidad de unirse a los microtúbulos (Avila et al., 1994).

Estudios *in vitro*, han mostrado que el uso de oligonucleótidos antisentido para algunos mRNA que codifican para proteínas MAP2 y Tau inhiben su expresión y alteran de manera importante la plasticidad de las neuronas, ya que los somas muestran una marcada inhibición de la extensión de neuritas y de la formación de dendritas y axones (Dinsmore y Solomon, 1991; Cáceres y Kosik 1990; González-Billault et al., 2002).

5.4.2. Expresión de la proteína MAP2 en el sistema nervioso central de la rata

La proteína MAP2 es el tipo de MAP más abundante en el cerebro. MAP2 presenta 4 isoformas generadas por procesamiento alternativo de un mismo gen que se encuentra localizado en el cromosoma 2 y contiene 20 exones (Neve et al., 1986, Sánchez et al., 2000) (Fig. 8).

Las isoformas de MAP2 en el mamífero se han denominado como de alto y de bajo peso molecular. MAP2A (280 kDa) y MAP2B (270 kDa) son de alto peso molecular (HMWMAP2) y son generadas por un mRNA de 9 Kb. Las de bajo peso molecular (LMWMAP2) son MAP2C (70 kDa) y MAP2D (75 kDa) y se generan por un mRNA de 6 Kb.

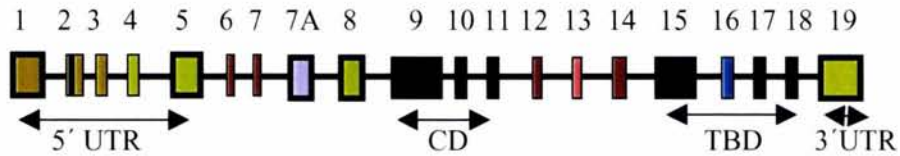


Fig. 8. Estructura del gen de MAP2. Representación esquemática de los exones del gen de MAP2 en donde se señalan los exones que codifican para la región 5' no traducida (5'UTR), el dominio central (CD), el dominio de unión a tubulina (TBD) así como la región 3' no traducida (3'UTR) (Sánchez et al., 2000).

Todas las isoformas de MAP2 presentan un dominio de unión a la subunidad reguladora de la proteína cinasa A (PKA) localizado hacia el extremo N-terminal, un dominio rico en prolinas (PRD) que se encuentra antes del dominio de unión a tubulina, el cual se ha propuesto, regula la función del dominio de unión a tubulina. La presencia del dominio central es la diferencia principal entre las isoformas de MAP2 ya que está ausente en las formas MWLMAP2 (Fig. 9).

Las isoformas de MAP2 se expresan de manera diferencial durante el desarrollo en el cerebro de la rata. En homogenados totales de cerebro se ha reportado que MAP2A se presenta desde etapas embrionarias y a los 10 días de edad alcanza su expresión máxima y permanece así en animales adultos. El contenido de MAP2B es constante desde etapas embrionarias hasta la edad adulta (Matus, 1988).

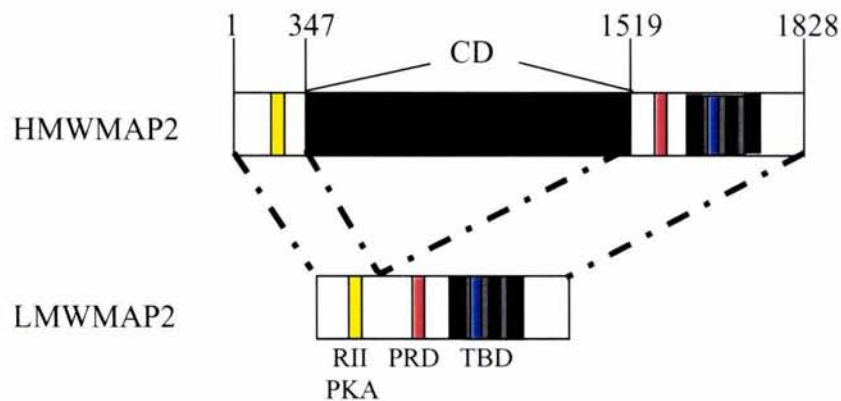


Fig. 9. Isoformas de MAP2. Las isoformas de MAP2 se denominan de alto peso molecular (HMWMAP2) y de bajo peso molecular (LMWMAP2), el esquema muestra la presencia del dominio de unión a la subunidad reguladora de la proteína cinasa A PKA (RII), el dominio central (CD) en las formas HMWMAP2 a diferencia de las LMWMAP2 en donde está ausente. El dominio rico en prolinas (PRD) y el dominio de unión a tubulina (TBD) está presente en ambas isoformas (Modificado de Sánchez et al., 2000).

De las isoformas de bajo peso molecular detectadas en homogenados totales de cerebros se ha reportado que MAP2C se presenta en alto contenido en etapas embrionarias, manteniéndose constante hasta los 10 días de la etapa postnatal, posteriormente disminuye significativamente en etapas adultas. En este estadio se ha reportado su expresión únicamente en células del bulbo olfatorio y en células de la retina (Tucker y Matus, 1988). La isoforma MAP2D se ha detectado en el cerebro desde el día 5 postnatal. MAP2A y MAP2B son las formas de MAP2 predominantes en etapas adultas (Matus, 1988).

MAP2A y MAP2B, están en su mayoría localizadas en los cuerpos neuronales y en dendritas donde principalmente se asocian a microtúbulos, los estabiliza e incrementa su tamaño lo cual constituye una base molecular para la plasticidad morfológica (Pryer et al., 1992; Ávila et al., 1994). En las espinas

dendríticas MAP2 también se ha encontrado asociada a actina lo que modifica la estabilidad de los microfilamentos y probablemente la estructura de la espina (Selden y Polard, 1983; Morales y Fifkova, 1989; Pedrotti e Islam, 1997). El dominio central de MAP2A y MAP2B, se ha asociado con la permanencia de sus RNAm en las dendritas y la resistencia a ser transportados hacia los axones (Kindler y Garner, 1994).

MAP2C y MAP2D se encuentran en cualquier compartimento neuronal y a diferencia de los RNAm de las formas de alto peso molecular, los RNAm que codifican para MAP2C y MAP2D no se presentan en las dendritas (Kindler y Garner, 1994).

MAP2 participa en la remodelación dendrítica ya que las regiones que presentan una alta inmunoreactividad a MAP2 están asociadas a una mayor arborización dendrítica. Por otro lado se ha sugerido que MAP2 participa en la plasticidad inducida por la potenciación a largo plazo que es el mecanismo celular que participa en el establecimiento de la memoria, esto debido a su localización y a la interacción con otros elementos determinantes de la potenciación como receptores a glutamato y PKA entre otros (Johnson y Jope, 1992; Kaech et al., 2001).

Una de las evidencias más importantes de la participación de MAP2 en la plasticidad neuronal fue obtenida al comparar la morfología neuronal del hipocampo de ratones que no expresan el gen de MAP2 [Knock Out (KO)] al compararlos con los ratones silvestres. Los ratones KO para MAP2 mostraron microtúbulos desorganizados y una significativa disminución en la longitud de las dendritas apicales en comparación con los ratones silvestres. Los animales KO

para MAP2 no presentan mortalidad prematura, sin embargo presentan una disminución del peso corporal del 10 a 20% respecto a los animales silvestres (Harada et al., 2002).

En el hipocampo del gerbo, la disminución en el contenido de MAP2 se ha asociado con el daño neuronal provocado por isquemia (Yanagahara et al., 1985) y la administración intrahipocampal de NMDA en la rata, reduce significativamente la inmunopositividad a MAP2, sin presentar cambios en la inmunopositividad para la proteína Tau (Johnson y Jope, 1992).

5.4.3. Expresión de la proteína TAU en el sistema nervioso central de la rata.

Tau es un tipo de MAP que se expresa principalmente en axones donde promueve el ensamble de los microtúbulos. En la rata, la proteína Tau presenta seis isoformas generadas por procesamiento alternativo de un solo gen, el cual se encuentra en el cromosoma 17 y presenta 16 exones (Kosik et al., 1989). Solo dos isoformas de Tau han sido identificadas en el cerebro de la rata en etapas prenatales. En el cerebro de la rata adulta, se han identificado de cuatro a seis isoformas (Francon et al., 1982). Las isoformas de Tau presentan entre 353 a 441 aminoácidos y sus pesos moleculares van de 45 a 65 kDa. Tau puede presentar diferentes modificaciones postraduccionales como son fosforilaciones o glicosilaciones que son determinantes en la función de esta proteína.

La proteína Tau se une a los microtúbulos por medio de 4 regiones repetidas codificadas por los exones 9 a 12 que se disponen hacia el extremo C-terminal. Durante etapas adultas, el dominio de unión a tubulina de Tau, presenta

3 ó 4 regiones repetidas de 18 aminoácidos que hacen más eficiente el ensamble de microtúbulos a diferencia del dominio de unión a tubulina presente en etapas fetales que solo presenta 3 repeticiones (Hirokawa et al., 1988). Existe una diferencia más en la proteína Tau en la etapa adulta que es la presencia de una o dos inserciones de 29 aminoácidos en la región amino terminal la cual conforma el dominio de proyección de la proteína y puede regular la interacción de Tau con otros elementos del citoesqueleto, con las mitocondrias y con la membrana plasmática (Brandt et al., 1995; Goedert et al., 1989, Rendon et al., 1990). Los dominios de proyección de las MAPs son también importantes por que determinan el espacio entre los microtúbulos ya sea de la dendrita o del axón y pueden incrementar el diámetro de estas estructuras (Chen et al., 1992).

Tau presenta una expresión diferencial durante el desarrollo en el cerebro de la rata y se considera que hacia los 20 días de desarrollo postnatal, Tau juvenil (TAU J) que se presenta desde etapas embrionarias disminuye considerablemente y no se presenta durante la etapa adulta. Hacia este período de disminución significativa de TAU J se presenta Tau en su forma adulta (Matus, 1988).

En ratones KO para Tau, se ha observado que la MAP1A, puede compensar la función de Tau. Sin embargo, el diámetro del axón de las neuronas disminuye considerablemente respecto a los animales control (Harada et al., 1994). En las neuronas del sistema nervioso periférico que proyectan un axón muy largo y de diámetro mayor en comparación con el de neuronas del sistema nervioso central, se ha reportado la presencia de una secuencia adicional en el N-terminal de Tau, por lo que se ha considerado ésta, como una isoforma diferente a la cual se le denomina como Tau de alto peso molecular (Georgieff et al., 1993).

Entre las modificaciones postraduccionales que presenta la proteína Tau se encuentra la fosforilación. En la secuencia de Tau, se han detectado por anticuerpos monoclonales al menos 30 sitios como susceptibles de fosforilación (Levenstone y Reynolds, 1997). El estado de fosforilación de TAU es importante ya que Tau en estado hiperfosforilado, (más de nueve grupos fosfato asociados a la proteína) promueve la formación de filamentos helicoidales apareados que forman las marañas neurofibrilares características de la EA las cuales también han sido descritas en pacientes con síndrome de Down y en pacientes con la enfermedad de Parkinson que presentan demencia (Braak y Braak. 1991; Buée et al., 2000).

Los antecedentes anteriores muestran la importancia de las proteínas de citoesqueleto MAP2 y tau en la regulación de la morfología neuronal, sin embargo, no se conoce la relación entre estas proteínas y su regulación *in vivo* por el E2 y la P4 los cuales modifican la morfología neuronal del hipocampo.

5.4.4. Papel del estradiol y de la progesterona en la regulación de la expresión de las proteínas MAP2 y Tau en el sistema nervioso central de la rata.

La evidencia de los efectos del E2 y la P4 en la regulación de MAP2 y Tau, está relacionada principalmente con estudios realizados *in vitro*. Estos estudios han demostrado que el E2 aumenta la expresión de Tau y la inmunopositividad a MAP2 en cultivos hipotalámicos pero no de tubulina (Ferrerira y Caceres, 1991; Dueñas et al., 1996). En cultivos primarios obtenidos de neuronas de la amígdala de la rata, se ha observado que el E2 aumenta la inmunopositividad a MAP2 (Lorenzo et al., 1992).

Recientemente, en cultivos primarios de neuronas de hipocampo tratadas con las dosis de E2 que se conoce inducen un aumento en el número de espinas dendríticas, se ha reportado un aumento en el número de ramificaciones dendríticas pero no en la longitud del axón o en el número de ramas del axón (Audersirk et al., 2003).

En cultivos de neuronas maduras de hipocampo tratadas con E2 se ha observado un aumento en la expresión de MAP2C, en conjunto con el aumento en microtúbulos inestables que participan en la polaridad neuronal (Shah et al., 2003). En ensayos de polimerización-despolimerización para la obtención de microtúbulos a partir de homogenados totales de cerebro de rata, se ha observado que la P4 se une a MAP2 e inhibe el ensamble de microtúbulos (Murakami et al., 2000).

Estudios *in vivo* utilizando homogenados de hipófisis de ratas tratadas con E2 han mostrado que éste induce la expresión de MAP2 y Tau, pero no de tubulina (Matsuno et al., 1998).

Los trabajos mencionados anteriormente, sugieren que el E2 y la P4 pueden tener una influencia importante en la plasticidad neuronal al regular la expresión de MAPs o por la interacción con otros elementos del citoesqueleto.

VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se conoce que el E2 y la P4 modifican el número de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo de ratas ovariectomizadas que reciben reemplazo hormonal así como durante el ciclo estral. En los animales ovariectomizados y tratados con E2 Y P4, el número de espinas dendríticas es mayor respecto a los animales ovariectomizados tratados con vehículo. Durante el ciclo estral de la rata, el número de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo es 30% mayor durante el proestro cuando las concentraciones plasmáticas de E2 y P4 son máximas.

Estos procesos implican modificaciones en elementos del citoesqueleto que se conoce tienen una función importante en la forma neuronal como las proteínas MAPs. Sin embargo, no se conoce si los efectos del E2 y la P4 relacionados con la plasticidad neuronal tanto en condiciones de reemplazo hormonal como durante el ciclo estral, pudieran estar mediados a través de la regulación de la expresión de proteínas del citoesqueleto como MAP2 y Tau que participan en la regulación de la función de los microtúbulos en el sistema nervioso central de la rata y que tienen una distribución específica en los compartimentos neuronales que confieren polaridad a la neurona ya que como se mencionó anteriormente MAP2 está localizada en las dendritas donde ocurren las modificaciones morfológicas debidas al E2 y la P4 y Tau en los axones, por lo que en este trabajo se estudiaron los efectos del E2 y la P4 sobre la expresión de estas proteínas en el hipocampo de la rata.

VII. HIPÓTESIS.

Si el aumento en el número de espinas dendríticas inducido por el E2 y la P4 y observado durante el ciclo estral en el hipocampo de la rata, requiere de la participación de proteínas del citoesqueleto, entonces el E2 y la P4 regularán la expresión de proteínas que participan en la estructura morfológica de las dendritas del hipocampo como MAP2 pero no de Tau.

VIII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto del E2 y de la P4 en la regulación de la expresión de las proteínas del citoesqueleto MAP2 y Tau en el hipocampo de la rata, así como los cambios en estas proteínas durante el ciclo estral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Conocer los efectos del E2 y de la P4 en el contenido de MAP2 y Tau tanto a nivel de la proteína, así como del RNAm de MAP2 en el hipocampo y en la corteza frontal de la rata.
- Determinar los cambios en el contenido de MAP2 y Tau en el hipocampo y en la corteza frontal de la rata durante el ciclo estral.
- Conocer la distribución regional de MAP2 durante el ciclo estral en el hipocampo de la rata.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Animales de experimentación y tratamientos hormonales.

Hembras adultas de la cepa Wistar (230-250 g) fueron mantenidas en un ciclo 12:12 h luz:oscuridad (encendido de luces a las 6:00 AM) con agua y comida *ad libitum* en un ambiente de temperatura controlada (22°C). Los animales fueron ovariectomizados bajo anestesia con ketamina (80 mg/kg). Dos semanas después fueron aleatoriamente asignados a los siguientes grupos: **(1)** administración diaria por vía subcutánea de vehículo (aceite de maíz/etanol al 10%) por 2 días ; **(2)** E2 (1.0, 2.5, 5.0 ó 10.0 µg/100 g de peso corporal) por 2 días, **(3)** P4 (0.1, 0.2, 0.4 ó 0.8 mg/100 g) y **(4)** E2 (5 µg/100 g) administrado como se señaló anteriormente seguido de P4 (0.4 mg/100 g) en el día 3. Estas dosis de esteroides producen concentraciones hormonales séricas similares a los reportados en el proestro (McCarty et al., 1995; Bettini et al. 1992). Veinticuatro horas después de la última dosis el hipocampo (subículo, asta de Ammon y giro dentado) y la corteza frontal se disecaron con base en el Atlas de Paxinos y Watson (1986) e inmediatamente se procesaron para la extracción de proteínas. En el caso de los experimentos de expresión génica, las regiones cerebrales antes mencionadas se obtuvieron 6, 12, y 24 h después de la última dosis. Todos los experimentos se realizaron en grupos de 5 animales independientes en cada caso.

Para estudiar la expresión de MAP2 y Tau y la distribución de MAP2 durante el ciclo estral, se determinó la etapa del ciclo estral por medio del análisis citológico de frotis vaginales. El día del proestro se distinguió por la presencia de

células epiteliales nucleadas, el día del estro por células epiteliales cornificadas, el día del metaestro por células epiteliales cornificadas y leucocitos y finalmente el día del diestro por pocas células epiteliales cornificadas y leucocitos en abundancia. Las ratas que presentaron 4 ciclos consecutivos fueron sacrificadas a las 12:00 h y 19:00 h del proestro, estro, metaestro y diestro debido a que en estos horarios se presentan las concentraciones máximas del E2 y la P4 durante el proestro y metaestro. De cada grupo se disecaron el hipocampo y la corteza frontal como en el experimento anterior. Se utilizaron 5 animales para cada día del ciclo estral y por cada condición temporal.

9.2 Análisis de las proteínas MAP2 y TAU.

9.2.1. Extracción y electroforesis de proteínas termoestables.

El hipocampo y la corteza frontal fueron homogenizados en un buffer de piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etansulfónico) (PIPES) (80 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de MgCl₂ y 100 mM de PIPES, pH 6.8, con los inhibidores de proteinasas PMSF (0.1 mM) y leupeptina (0.1 mM). Las muestras fueron centrifugadas a 4500 g por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue obtenido, se adicionaron 0.75 M de NaCl y 0.2% de β-mercaptoetanol, se calentó por 5 min a 95°C y fue centrifugado nuevamente a 12 000 g por 10 min (Herzog y Weber, 1978). La fracción termoestable enriquecida de MAPs fue colectada y almacenada a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas fue determinada por el procedimiento de Bradford (Bradford, 1976).

Cinco microgramos de proteínas termoestables del hipocampo y de la corteza frontal fueron depositados en un gel de SDS-poliacrilamida con un gradiente de concentración del 5 al 10% y separados a 50 mA (80 V).

9.2.2. Western blot con anticuerpos específicos para MAP2 y Tau.

Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa que se bloqueó con una solución de PBS-albúmina al 5% durante 2 h. La membrana se incubó con un anticuerpo monoclonal dirigido contra MAP2 (5 µg/ml, clona AP20, Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN), o tau (tau-1,1 µg/ml, clona PC1C6, Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) que reconoce todas las isoformas de Tau, durante 18 h a 4°C y posteriormente se lavaron con PBS 3 veces durante 5 min. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con IgG anti-ratón (1:500). Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó el kit de ABC-biotina-avidina-peroxidasa (Vector, Burlingame, CA), utilizando como sustrato 3-3'-diaminobencidina disuelta en Tris 100 mM y con H₂O₂. Los controles negativos se realizaron al eliminar de la incubación al anticuerpo primario. En todos los experimentos se utilizó a α -tubulina como un control de carga de proteínas ya que ésta no se modifica por la administración de E2 y P4 (Ferreira y Cáceres, 1991; Murakami et al., 2001).

9.3. Análisis de la expresión del gen de MAP2 por RT-PCR.

9.3.1. Extracción del RNA total.

El RNA total fue aislado del hipocampo y de la corteza cerebral mediante una extracción con isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo y precipitación con

isopropanol. Los tejidos se homogenizaron con un politrón en TRIzol (reactivo que contiene tiocianato de guanidina y fenol) a 4°C (1 ml de TRIzol por cada 100 (Chomczynski et al., 1987). La concentración de RNA fue determinada por absorbancia a 260 nm y la integridad fue verificada por electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes al 1.1% en presencia de 2.2 M de formaldehído.

9.3.2. Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Una vez que se comprobó que el RNA se encontraba íntegro, se procedió a determinar las condiciones óptimas para realizar las amplificaciones por RT-PCR de un fragmento de la región del dominio central de MAP2.

Las concentraciones de los reactivos en la técnica de transcripción reversa (RT) fueron las siguientes:

	Concentración final
RNA total	10 µg (pulmón) 5 µg (útero)
Buffer RT	50 mM Tris-HCl (pH 8.3) 75 mM KCl 3 mM MgCl ₂
DTT	10 mM
dNTPs	0.5 mM de cada dNTP
RTM-MLV	400 unidades
Oligo dT	50 ng

La reacción se incubó a 37°C por 60 min. y posteriormente los productos obtenidos se congelaron a -20°C. De la reacción de RT, 10 µl fueron utilizados

para la PCR con el fin de amplificar un fragmento del gen de MAP2, mientras que los otros 10 µl del cDNA fueron utilizados para amplificar simultáneamente un fragmento del gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que se utilizó como un control de carga de RNA. Las secuencias de los oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento de MAP2 fueron 5'-[GGC TGG GTG GAA GGT CTG]-3' para el oligonucleótido sentido y 5'[TGG TTT TAC GGG TTG GCT G]3' para el oligonucleótido antisentido. Estos oligonucleótidos se diseñaron en nuestro laboratorio y limitan una secuencia del cDNA de MAP2 de la rata desde +1982 a +2499 con respecto al sitio de inicio de la traducción (Kindler et al., 1990). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de GAPDH fueron: 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' para el oligonucleótido sentido y 5'-[CAA TGC CAG CCC CAG CA]-3' para el oligonucleótido antisentido. Estos oligonucleótidos limitan una secuencia de cDNA de +517 a +969 con respecto al sitio de inicio de la traducción (Tso et al., 1985).

Para determinar la temperatura óptima de amplificación del gen de MAP2, se realizó una amplificación a diferentes temperaturas (54 a 60°C), con la finalidad de conocer cuál de ellas era la óptima de hibridación (T_m) del templado con los oligonucleótidos diseñados para MAP2. Como se observa en la figura 10, la T_m fue de 62°C. También se determinó el número de ciclos óptimo para realizar las amplificaciones del fragmento del gen MAP2 por PCR, éstas se llevaron a cabo a 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos. Lo anterior llevó a realizar la técnica de PCR a 25 ciclos, ya que con estos ciclos las amplificaciones obtenidas se encuentran en la fase exponencial de la curva (Fig. 10).

La reacción de PCR (50 μ l) incluyó: 10 μ l del cDNA previamente sintetizado y los reactivos utilizados en el PCR en las siguientes concentraciones:

	Concentración Final
Buffer PCR	20 mM Tris-HCl (pH=8.4) 50 mM KCl
MgCl ₂	1mM
dNTPs	0.2 mM
Oligo sentido	0.5 μ M
Oligo antisentido	0.5 μ M
TAQ DNA polimerasa (Perkin-Elmer, New Jersey)	2.5 unidades

Un control negativo sin RNA y otro sin RNA sometido a transcripción reversa fueron incluidos en todos los experimentos.

Después de un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, la reacción de PCR fue realizada durante 25 ciclos. El patrón de ciclos de amplificación para MAP2 y GAPDH fue: 95°C, 1 min; 62°C, 1 min; y 72°C, 1 min. Un ciclo final de extensión fue realizado a 72°C.

9.3.3. Electroforesis de los productos de RT-PCR

Todos los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio, se observaron en un transiluminador de rayos UV y la imagen fue capturada posteriormente en una película fotográfica Tipo 665 con negativo (Polaroid CO., Cambridge, MA).

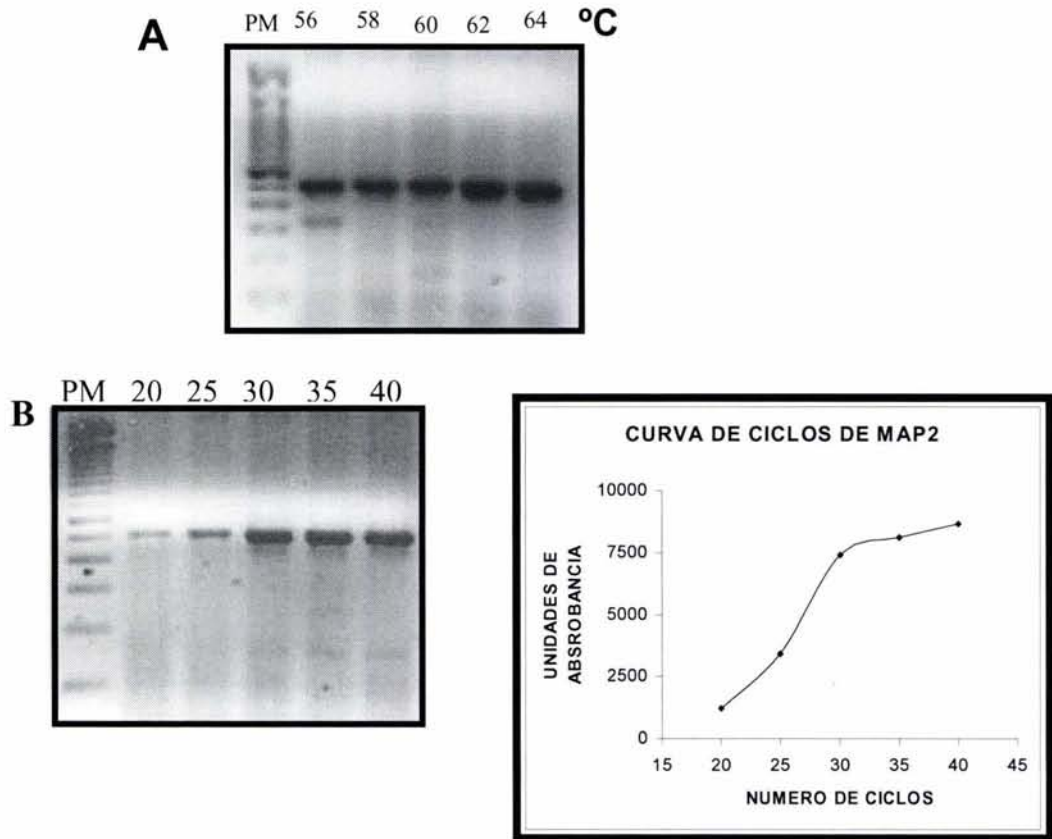


Fig. 10. Determinación de la temperatura de unión de los oligonucleótidos y del número de ciclos de amplificación para el gen de MAP2. Se realizó la técnica de RT-PCR para el gen de MAP2 a partir del RNA total del hipocampo de ratas hembra adultas ovariectomizadas tratadas con E2. La reacción de PCR se realizó a diferentes temperaturas 56-64°C (A) y diferente número de ciclos (20-40) (B) y la intensidad de las bandas del gen de MAP2 fue cuantificada por un análisis densitométrico.

9.4. Análisis inmunohistoquímico de la proteína MAP2 durante el ciclo estral de la rata.

9.4.1. Perfusión de animales y cortes cerebrales.

Las ratas que presentaron 4 ciclos regulares consecutivos fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y se perfundieron por vía intraventricular a

las 12 h y 19 h de cada día del ciclo estral con 250 ml de de solución salina (0.9%) seguido por una solución fijadora de paraformaldehído (10%) amortiguador de fosfatos (0.1 M a pH 7.4). Los cerebros fueron removidos y se dejaron en la solución fijadora por 24 h, después se transfirieron sucesivamente a gradientes de sacarosa (20% y 30%) en amortiguador de fosfatos 0.1 M por 24 h. Posteriormente se obtuvieron cortes coronales de 40 μ m utilizando un criostato y fueron procesados para realizar la tinción de Nissl o para realizar la inmunohistoquímica.

9.4.2. Inmunohistoquímica.

Para realizar la técnica inmunohistoquímica para MAP2, se realizó primero la tinción de Nissl (Violeta de cresilo 0.1%) en 6 cortes cerebrales de cada una de las ratas obtenidos a las 12 y 19 h en los diferentes días del ciclo estral, para determinar si el tejido presentaba las condiciones para realizar la técnica inmunohistoquímica.

Los cortes obtenidos a los que se les realizó la técnica inmunohistoquímica se dejaron durante 30 min en una solución de permeabilización y bloqueo de peroxidasas endógenas que contenía 0.25% triton X-100 y 0.3% H₂O₂ disueltos en amortiguador de fosfatos y salina (PBS). Al terminar este tiempo los cortes se dejaron bloqueando en albúmina-PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-MAP2 (3 μ g/ml, clone AP20, Boehringer, Mannheim) durante 24 h a 4°C. Después de este tiempo, los cortes se lavaron dos veces durante 5 min con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón (1:500) durante 2 h a

temperatura ambiente. Una vez concluida la incubación, los cortes se lavaron 2 veces más con PBS y se incubaron con el reactivo avidina/biotina (AB) (Vector, Burlingame, CA) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente la actividad de la peroxidasa fue revelada con 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobenzidina como sustrato. Los controles negativos consistieron en eliminar el anticuerpo primario del procedimiento.

9.4.3. Análisis de la distribución de MAP2 por inmunohistoquímica.

Cada uno de los cortes cerebrales de cada un de los días del ciclo estral fue analizado utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 (Melville, NY). Cada uno de los cortes fue observado a 100x, 200x, 400x y 1000x , en 3 diferentes campos del hipocampo y la corteza cerebral de cada una de los cortes durante los diferentes días del ciclo estral y se observó el patrón de las ramificaciones que fueron marcadas por el anticuerpo anti-MAP2.

9.5. Determinación de las concentraciones séricas de E2 y P4 por radioinmunoanálisis.

Las concentraciones séricas de E2 y P4 se determinaron mediante radioinmunoensayo (Camacho-Arroyo et al. 1998a), utilizando el kit Coat-A-Count (Diagnostics Products Corporation) con base en la técnica de fase sólida con ¹²⁵I, siguiendo el protocolo del fabricante. La sensibilidad de este método para la detección del E2 fue de 5 pg/ml y de 0.2 ng/ ml para la P4. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 5.3 y 8% para el E2; y de 6.5 y 10% para la P4, respectivamente.

9.6. Análisis de resultados de Western blot y RT-PCR

La intensidad de las bandas de MAP2 y tau en los experimentos de Western blot, así como la de las bandas de MAP2 y GAPDH en los experimentos de RT-PCR fue cuantificada por un análisis densitométrico mediante el programa "Scion Image program for Windows" (2000 Scion Corporation, NIH, USA). La expresión del gen de MAP2 y de las proteínas MAP2 y TAU fue normalizada respecto a los valores obtenidos de GAPDH y de α -tubulina respectivamente debido a que las concentraciones de E2 y P4 utilizadas en este trabajo no modifican la expresión del gen de GAPDH ni de la proteína α -tubulina (Guerra-Araiza et al. 2000; Ferreira et al., 1990; . El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de Análisis de Varianza de una sola vía seguida por una prueba de t de Student para los resultados obtenidos de los animales OVX y tratados con E2 y P4 y de Tukey para los resultados obtenidos durante el ciclo estral. El programa "Prism 2.01" (Graph Pad, CA) fue utilizado para obtener los valores de probabilidad.

RESULTADOS

10.1. Efectos del estradiol y de la progesterona en el contenido de MAP2 y Tau en el hipocampo y la corteza cerebral de la rata

En todos los experimentos de Western blot las formas de MAP2 de alto peso molecular correspondientes a MAP2A y MAP2B (270-280 kDa) fueron detectadas en el hipocampo y la corteza frontal.

En el hipocampo de la rata, un efecto dependiente de la dosis de E2 y P4, sobre el contenido de MAP2 fue observado (Fig. 11). En las ratas tratadas con el vehículo, el contenido de MAP2, fue bajo y se incrementó con las diferentes dosis de E2 y P4. Un incremento significativo (144, 165, y 159% sobre el vehículo) en el contenido de MAP2 se observó con las dosis de 2.5, 5.0 y 10.0 µg/100 g de peso corporal, de E2 en el hipocampo (Fig. 11A). La P4, aunque tuvo un efecto menor que el E₂ también presentó un efecto dosis dependiente ya que incrementó el contenido de MAP2 en el hipocampo (62, 64, y 67%) respecto al control con las dosis de 0.2, 0.4 y 0.8 mg/100 g de P4 respectivamente (Fig. 11A). Por otro lado, ni el E2 ni la P4 modificaron el contenido de MAP2 en la corteza frontal (Fig. 11B).

Las dosis de E2 y P4 que presentaron máximo efecto en los niveles de MAP2 fueron escogidas para evaluar los efectos combinados de estos esteroides.

El contenido de MAP2 aumentó significativamente (130, 118 y 125%) después de los tratamientos con E2, P4, y E2+P4, respectivamente comparados con el vehículo en el hipocampo de la rata (100%) (Fig. 12A). Por el contrario no se observaron cambios significativos en el contenido de MAP2 en la corteza frontal después de los tratamientos hormonales (Fig. 12B). De manera interesante se

observó que el contenido basal de MAP2 en el hipocampo de los animales tratados con vehículo fue menor comparado con el de la corteza frontal (Fig. 12).

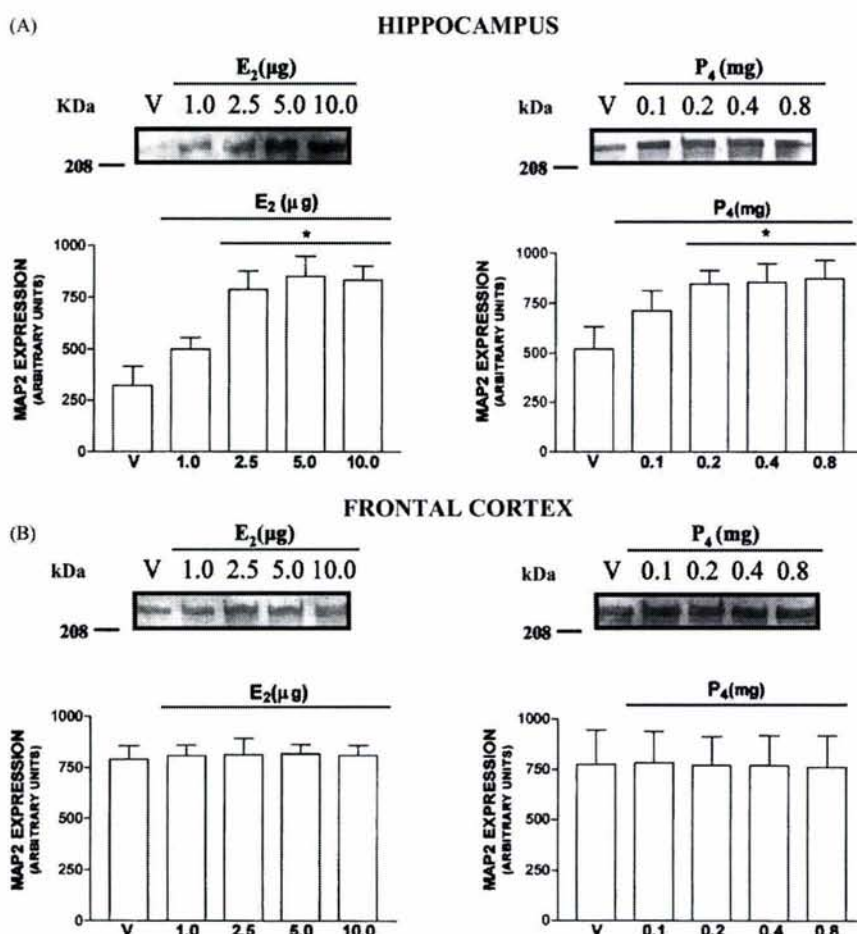


Fig.11. Contenido de la proteína MAP2 en el hipocampo y en la corteza frontal de la rata después de la administración de diferentes dosis de E2 y P4. Se muestra un experimento representativo de Western blot de MAP2 de la fracción citosólica termoestable del hipocampo (A) y de la corteza frontal (B) de ratas adultas ovariectomizadas y sacrificadas 24 h después del tratamiento con vehículo (V), 17β-estradiol (E2) (1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 μg/100 g de peso corporal), y P4 (0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg/100 g). Los histogramas muestran el análisis densitométrico del contenido de la proteína MAP2 de cada tratamiento (media ± E.S.) (n=3) *p<0.05 comparada con V.

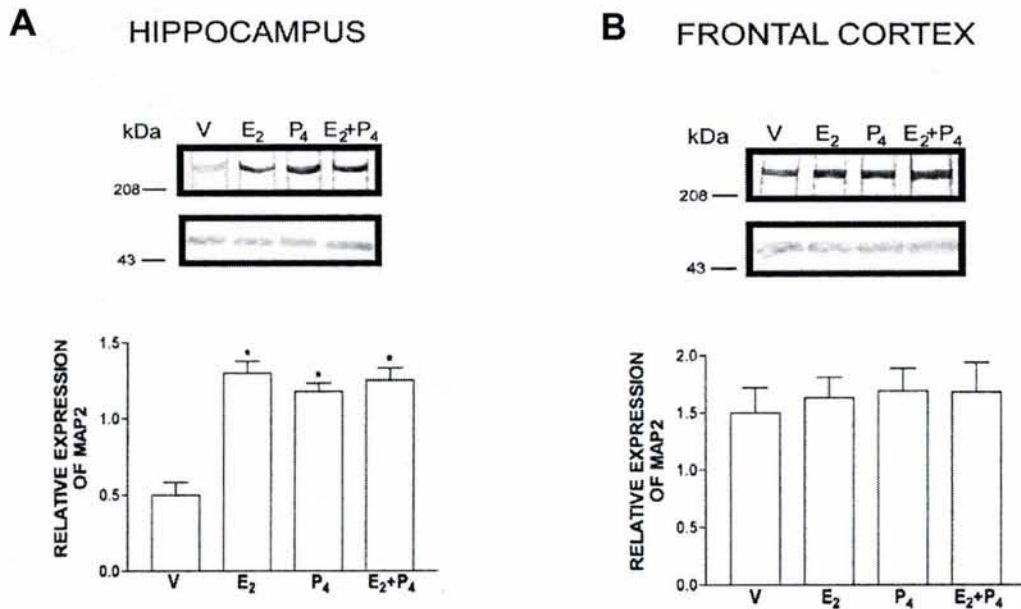


Fig. 12. Expresión de la proteína MAP2 en el hipocampo y en la corteza frontal de la rata después del tratamiento con E2 y P4. Western blot representativo de MAP2 (280 kDa) y tubulina (50 kDa) realizado a partir de la fracción citosólica termoestable del hipocampo (A) y de la corteza frontal (B) de ratas ovariectomizadas 24 h después del tratamiento con V, E2 (5 μ g/100g de peso corporal), P4 (0.4 mg/100g) y E2+P4 (5 μ g + 0.4 mg/100 g) (parte superior). El análisis densitométrico del contenido de la proteína MAP2 se muestra en la parte inferior. El contenido de MAP2 fue normalizado respecto al de tubulina. Media \pm E.S. (n=5). *P<0.05 comparado con V.

En el caso de la proteína Tau no se observaron modificaciones significativas después de los tratamientos con los esteroides ni en el hipocampo ni en la corteza frontal (Fig. 13).

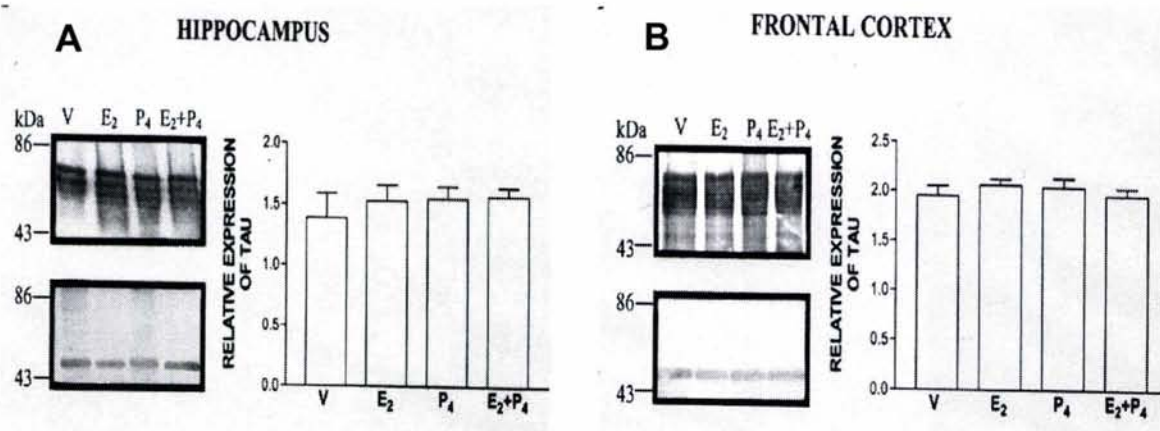


Fig. 13. Expresión de la proteína tau en el hipocampo y en la corteza frontal de la rata después del tratamiento con E2 (5 μ g/100g de peso corporal) y P4 (0.4 mg/100 g peso corporal). Se muestra un experimento representativo de Western blot de Tau (45-65 kDa) y α -tubulina (50 kDa) a partir de la fracción citosólica termoestable del hipocampo (A) y de la corteza frontal (B) de ratas ovariectomizadas tratadas como se señaló en la Fig. 12. El análisis densitométrico de la expresión de la isoforma de mayor peso molecular se muestra en el panel de la derecha. El contenido de tau fue normalizado respecto al contenido de α -tubulina. Media \pm E.S. (n=5) p<0.05.

10.2. Expresión del mRNA de MAP2 en el hipocampo y la corteza cerebral de la rata.

En todos los experimentos de RT-PCR se observaron bandas únicas de 517 y de 453 pb que correspondieron a los fragmentos esperados de los genes de MAP2 y GAPDH respectivamente (Fig. 14). No se observaron bandas de amplificación en los controles negativos y la expresión del gen de MAP2 no se modificó significativamente después de 24 h (Fig. 14). A tiempos más cortos (6 h y 12 h) tampoco hubo modificaciones en los niveles de RNAm de MAP2 después del tratamiento con los esteroides (Fig. 15). En la corteza frontal se observó una menor expresión del gen de MAP2 con respecto al hipocampo, sin embargo

ninguno de los tratamientos hormonales modifica la expresión de esta a las 6, 12 ó 24 h después del tratamiento (Fig. 16 y 17).

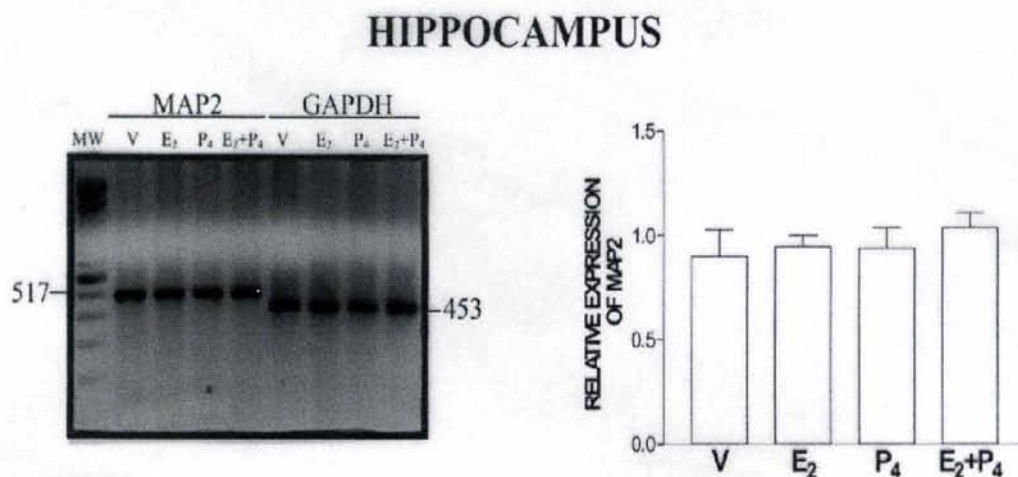


Fig. 14. Expresión del gen de MAP2 en el hipocampo de la rata 24 h después del tratamiento con E2 y P4. Se muestra un experimento representativo de un RT-PCR simultáneo de MAP2 y GAPDH realizado a partir del RNA total del hipocampo de ratas ovariectomizadas y tratadas como se señaló en la Fig. 12. Marcadores de peso molecular de 100 pb (PM) (panel izquierdo). El análisis densitométrico de la expresión del gen de MAP2 se muestra en el panel de la derecha. La expresión del gen de MAP2 fue corregida con base en la obtenida para GAPDH. Los resultados están expresados como Media \pm E.S (n=5).

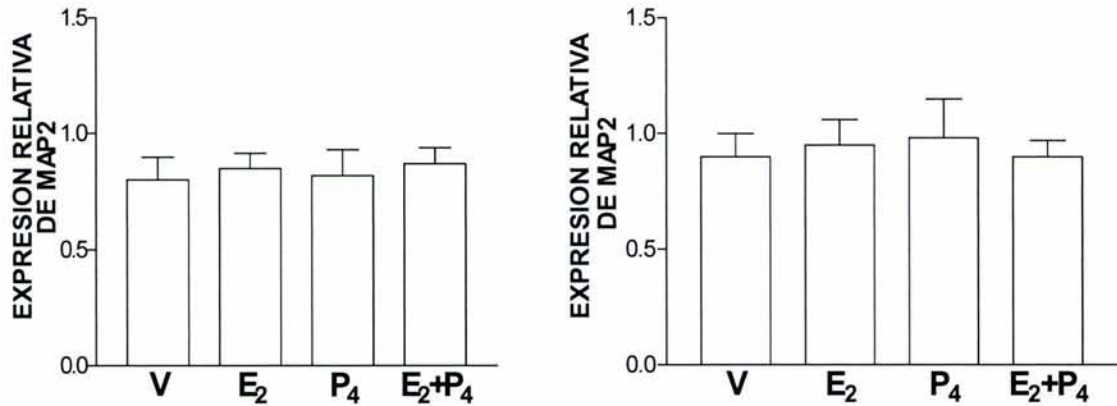


Fig. 15. Análisis densitométrico de la expresión del gen de MAP2 en el hipocampo a las 6 h (A) y 12 h (B), después de los tratamientos de E2 y P4. Los animales fueron tratados como en la Fig. 2. La expresión del gen de MAP2 fue corregida con base en la expresión obtenida para GAPDH. Los resultados están expresados como Media \pm E.S. (n=5).

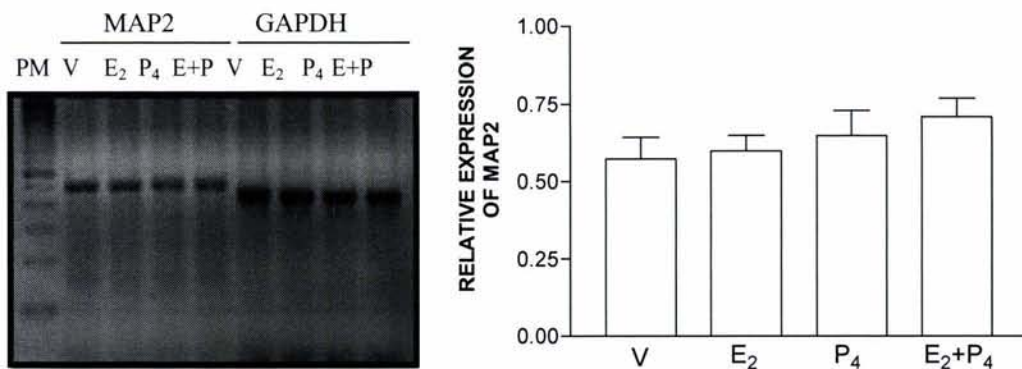


Fig. 16. Expresión del gen de MAP2 en la corteza cerebral de la rata 24 h después de los tratamiento con E2 y P4. Se muestra un experimento representativo de un RT-PCR simultáneo de MAP2 y GAPDH realizado a partir del RNA total de la corteza cerebral de ratas ovariectomizadas y tratadas como se señaló en la Fig. 12. Marcadores de peso molecular de 100 pb (PM) (panel izquierdo). El análisis densitométrico de la expresión del gen de MAP2 se muestra en el panel de la derecha. La expresión del gen de MAP2 fue corregida con base en la obtenida para GAPDH. Los resultados están expresados como Media \pm E.S (n=5).

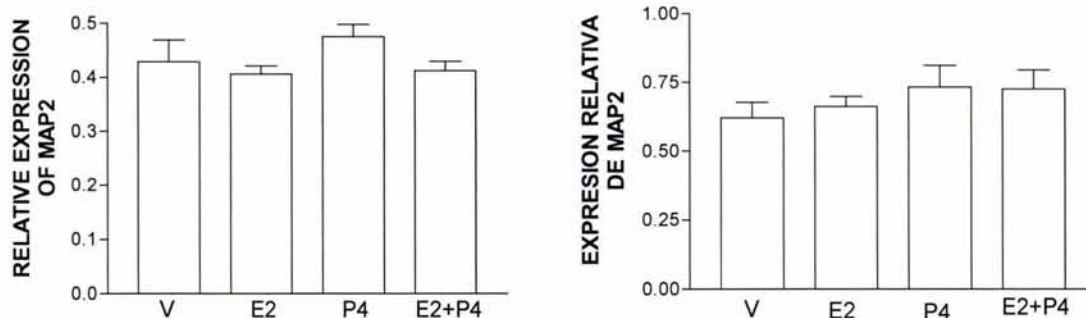


Fig. 17. Análisis densitométrico de la expresión del gen de MAP2 en la corteza cerebral a las 6 h (A) y 12 h (B), después de los tratamientos de E2 y P4. Los animales fueron tratados como en la Fig. 12. La expresión del gen de MAP2 fue corregida con base en la expresión obtenida para GAPDH. Los resultados están expresados como Media \pm E.S. (n=5).

10.3. Contenido de MAP2 y Tau en el hipocampo y la corteza cerebral de la rata durante el ciclo estral

Durante el ciclo estral, los resultados mostraron que el contenido de la proteína MAP2 en el hipocampo de la rata fue mayor durante el proestro manteniéndose altos en el estro y el metaestro y disminuyendo en el diestro (Fig. 18. A), sin presentar cambios en la corteza frontal (Fig. 18 B).

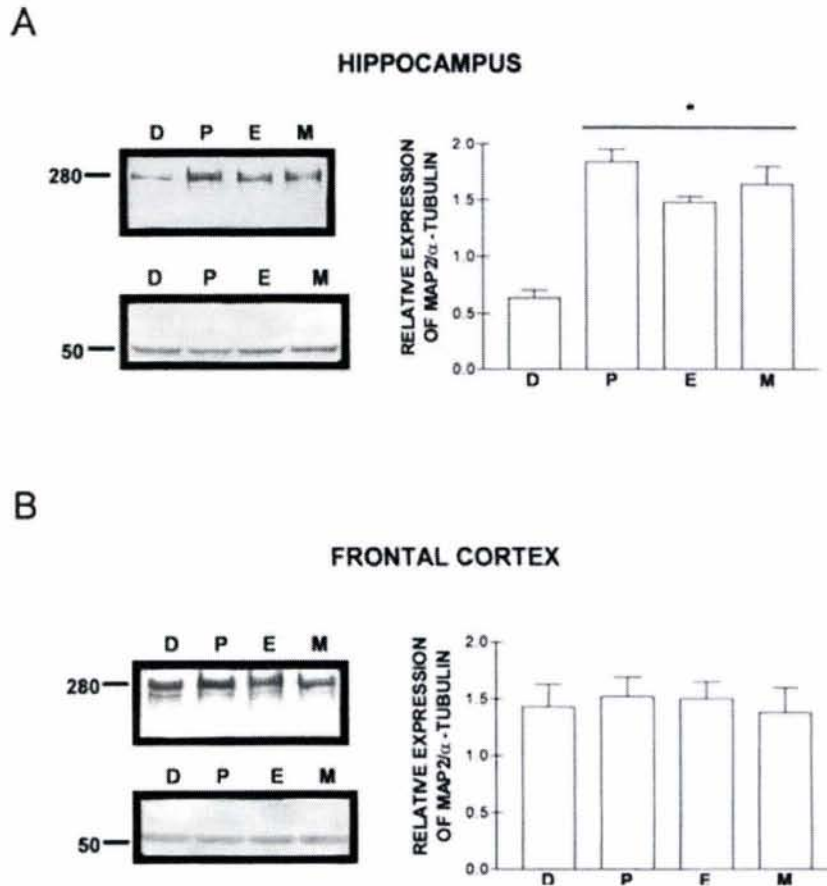


Fig. 18. Expresión de la proteína MAP2 en el hipocampo y en la corteza frontal durante el ciclo estral de la rata. Western blot representativo de MAP2 (280 kDa) y tubulina (50 kDa) realizado a partir de la fracción citosólica termoestable del hipocampo (A) y de la corteza frontal (B) de ratas sacrificadas a las 12 h del ciclo estral (lado izquierdo). Diestro (D), proestro (P), estro (E) y metaestro (M). El análisis densitométrico del contenido de la proteína MAP2 en cada fase del ciclo estral se muestra en el lado derecho. El contenido de MAP2 fue normalizado respecto al de α -tubulina. Media \pm E.S. (n=5). *P<0.05 comparado con el diestro (D).

Al evaluar la expresión de la proteína Tau en el hipocampo (Fig. 19A) y la corteza frontal (Fig. 19B) de la rata durante el ciclo estral los resultados obtenidos mostraron que no hay cambios significativos en la expresión relativa y que esta se

encuentra entre 1.8 y 2.1 en cualquiera de las regiones cerebrales estudiadas (Fig. 19).

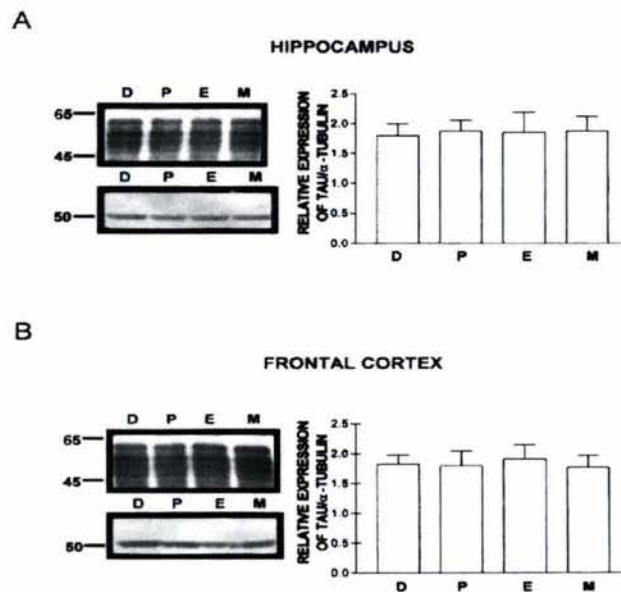


Fig. 19. Expresión de la proteína Tau en el hipocampo y en la corteza frontal durante el ciclo estral de la rata. Western blot representativo de Tau y tubulina (50 kDa) realizado a partir de la fracción citosólica termoestable del hipocampo (A) y de la corteza frontal (B) de ratas sacrificadas a las 12 h de cada día del ciclo estral (lado izquierdo). Diestro (D), proestro (P), estro (E) y metaestro (M). El análisis densitométrico del contenido de la proteína MAP2 en cada fase del ciclo estral se muestra en el lado derecho. El contenido de MAP2 fue normalizado respecto al de α -tubulina. Media \pm E.S. (n=5). *P<0.05 comparado con el diestro (D).

10.4. Distribución de la proteína MAP2 en el hipocampo de la rata durante el ciclo estral

Durante el ciclo estral en el proestro y el diestro, la inmunotinción para MAP2 fue observada en todas las regiones del hipocampo (Fig. 20).

En el diestro cuando las concentraciones de E2 y P4 fueron menores (Tabla 1), MAP2 fue localizada en las dendritas del estratum radiatum donde las dendritas fueron rectas y paralelas y prácticamente ausente en las dendritas apicales cercanas a los somas piramidales en la región CA1 (Fig. 20 A-C). Durante el proestro se observaron cambios evidentes en la inmunotinción de MAP2 en la región de CA1, cuando la concentración de E2 fue mayor (Tabla 1) respecto al diestro. En este día las dendritas fueron más gruesas y con una estructura en forma de rosario a lo largo del estratum radiatum de la región de CA1 (Fig. 20 D-F). Esta forma de rosario se debe a que en la misma dendrita se presentan zonas de engrosamiento y adelgazamiento alterno. En el estro y el metaestro en la región CA1 (Fig. 21), la inmunotinción de MAP2 fue similar a la observada durante el proestro aunque la estructura dendrítica en el estratum radiatum mostró la presencia de ramas gruesas y una disminución en la presencia de ramas delgadas tanto en el estro y metaestro (Fig. 21 A-C).

En la región CA3 del hipocampo, las dendritas presentan una apariencia más gruesa y son cortas en comparación con las de la región CA1. Este patrón es similar en los diferentes días del ciclo estral. La inmunotinción fue similar en los diferentes días del ciclo estral Fig. 22.

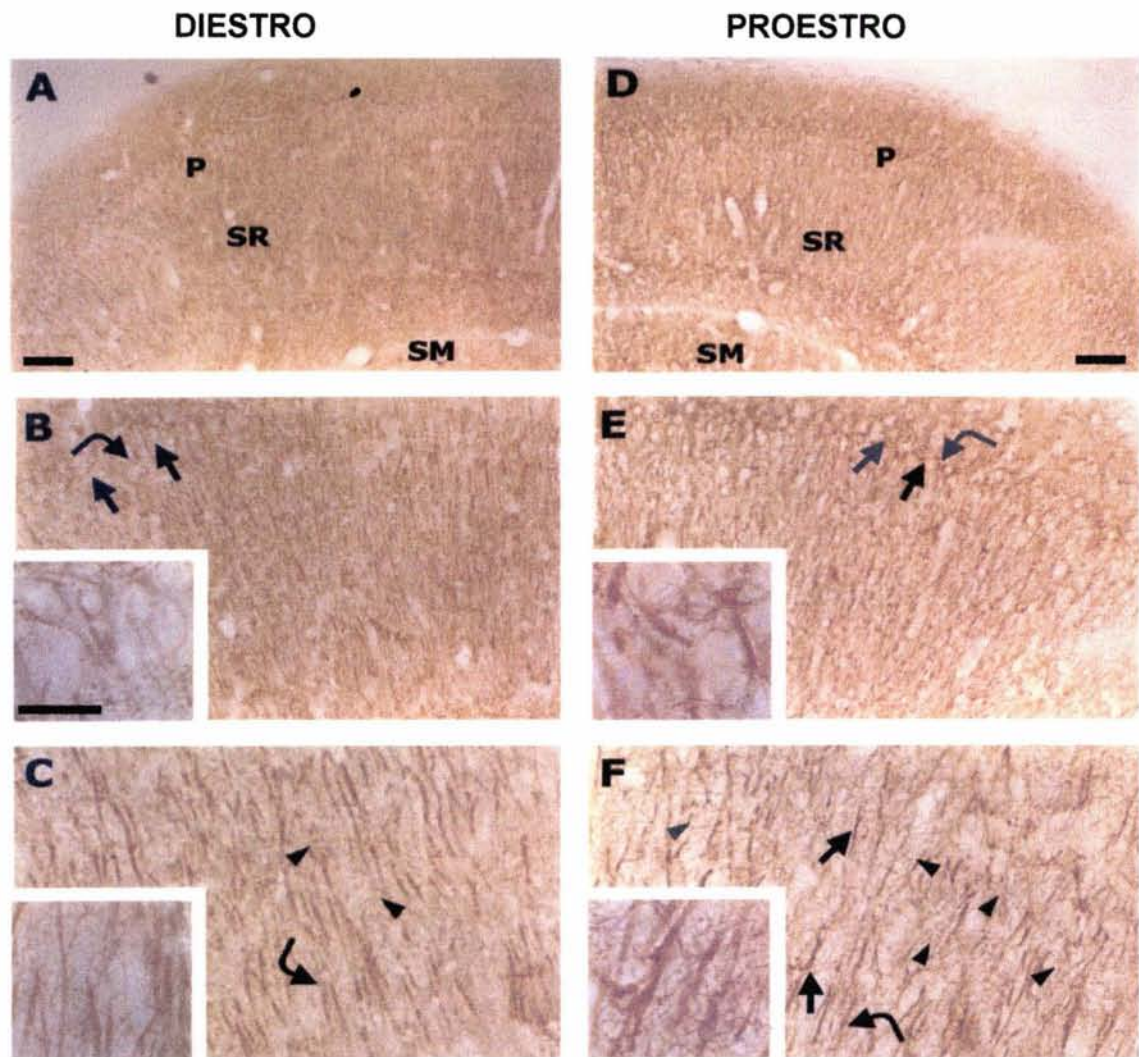


Fig. 20. Distribución de MAP2 en el hipocampo durante el diestro y proestro a las 12 h. Un incremento en la inmunotinción de MAP2 se muestra en el proestro (D-F) comparado con el diestro (A-C) (n=5). Durante el proestro los somas de las células piramidales de CA1 muestran una agregación de MAP2 en las dendritas apicales a diferencia del diestro (B y E) (flechas y flecha curva). Este detalle se muestra en los insertos en B y E (1000x). Durante el proestro, también se encontraron dendritas con apariencia de cuentas de rosario que se muestran en F (flechas) las cuales incluso presentan una tinción más intensa respecto al diestro y con ramificaciones abundantes (cabezas de flecha y flecha curva en F). En el diestro se muestra un patrón de ramificaciones dendríticas delgado (C) (flechas y flecha curva). Barras = 100 μm (A, D) y 10 μm en los insertos. **P**= stratum pyramidale; **SR** = stratum radiatum; **SM** = stratum lacunosum-moleculare. Cada micrografía es representativa de 5 animales independientes.

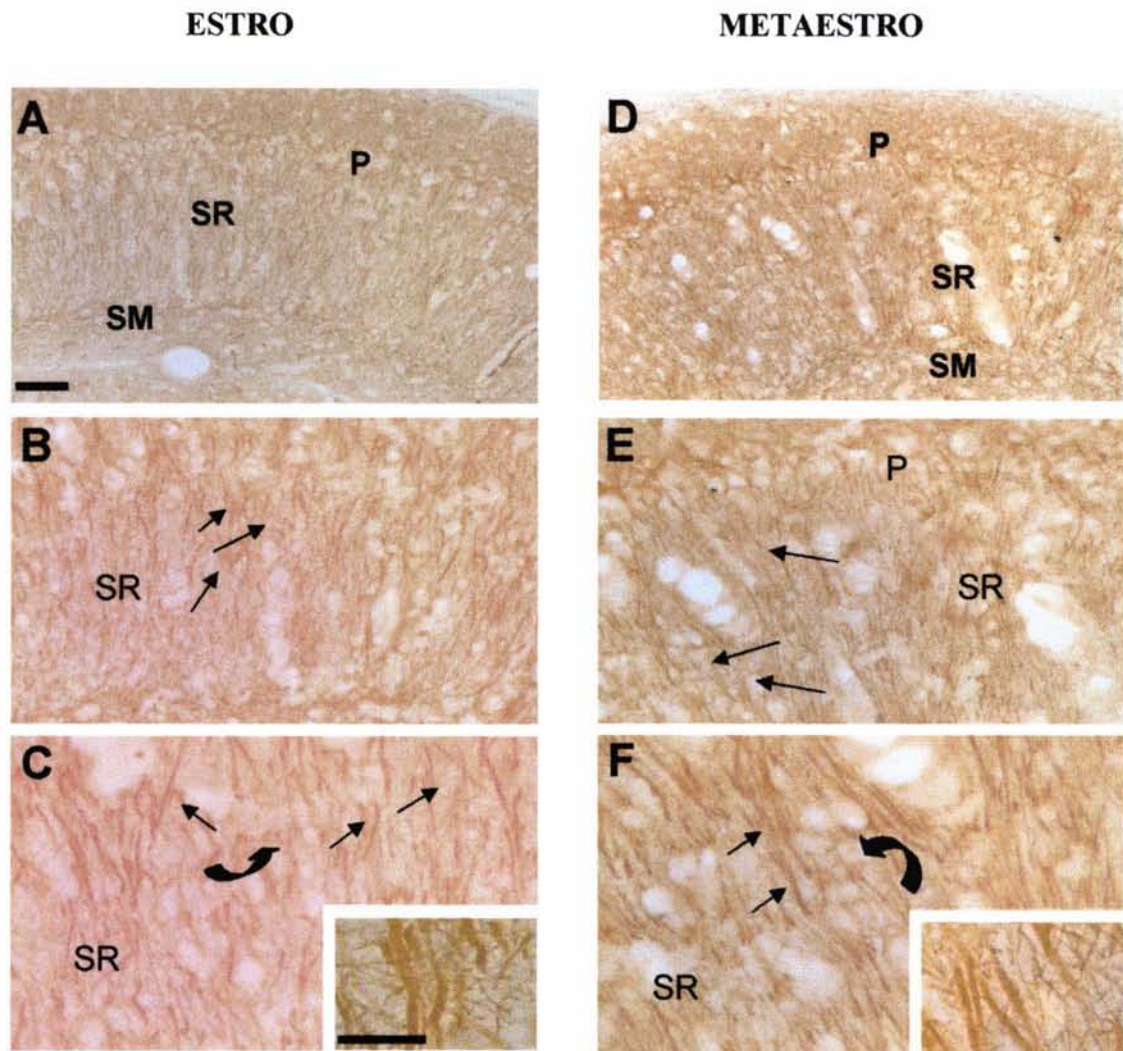


Fig. 21. Distribución de MAP2 en el hipocampo de la rata durante el estro y el metaestro a las 12 h. La distribución de MAP2 se muestra en el estro (A-C) comparado con el metaestro (D-F) (n=5). La inmunotinción es similar a la observada en el proestro y las dendritas observadas en el estro y metaestro presentan una apariencia más gruesa. (flechas) (B y E). La abundancia de las ramificaciones en el estro y metaestro es menor a la observada en el proestro (Fig. 20. F) y estas son más delgadas (inserto en C y F) (flechas y flecha curva). Barras= 100 μ m (A) y 10 μ m (insertos) **P**= stratum pyramidale; **SR** = stratum radiatum; **SM** = stratum lacunosum-moleculare. Cada micrografía es representativa de 5 animales independientes.

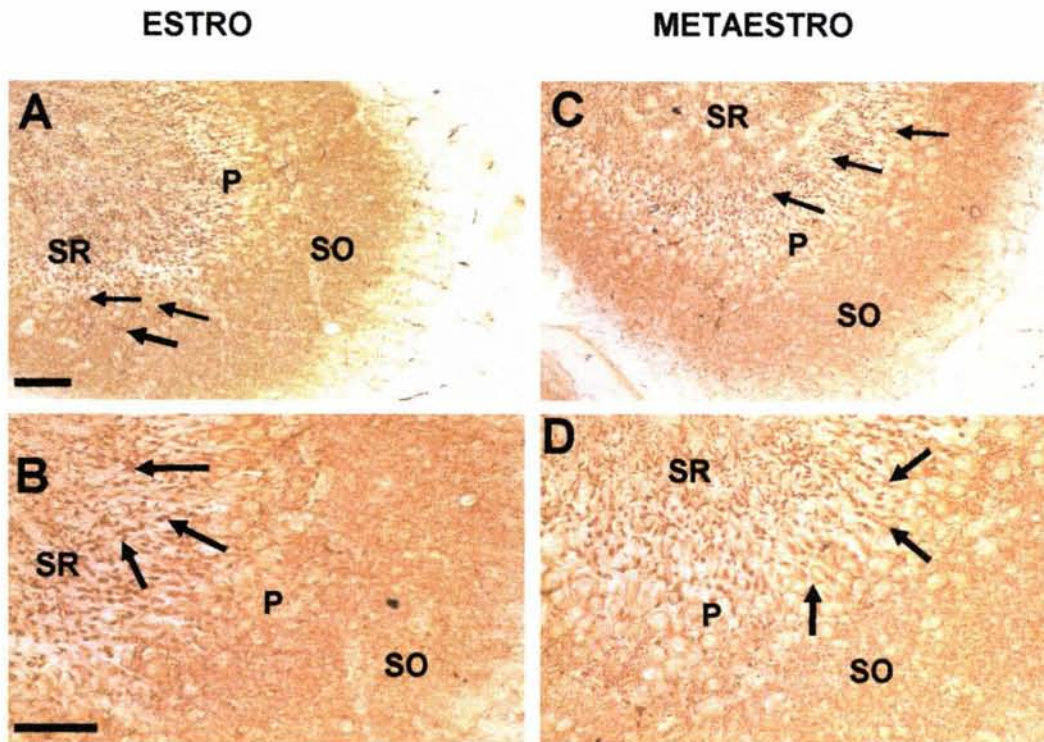


FIG. 22. Expresión de la proteína MAP2 en la región CA3 del hipocampo de la rata durante el estro y el metaestro a las 12 h. La inmunotinción para MAP2 durante el estro (A y B) y metaestro (C y D) mostró una agregación hacia las dendritas apicales del estratum radiatum (**SR**) las cuales a mayor aumento (200 X) se observan gruesas y cortas tanto en el estro (B) como en el metaestro (D). Barras= 100 μm (A) y 50 μm (B). **P**= stratum pyramidale; **SO**= stratum oriens; **SR** = stratum radiatum. Cada micrografía es representativa de 5 animales independientes.

Los resultados obtenidos de los animales sacrificados a las 19 h durante el ciclo estral, mostraron que en la región CA1 la inmunotinción de MAP2 durante el proestro presentó un ligero aumento en el estratum radiatum de CA1 en comparación con los demás días del ciclo estral (Fig. 23).

El análisis a mayor aumento (200X y 400X) en el estratum radiatum de CA1 durante los diferentes días del ciclo estral, mostró que las dendritas son gruesas y

con ramificaciones abundantes tanto en el diestro como en el proestro, (Fig. 23. C y F respectivamente (insertos 1000x)).

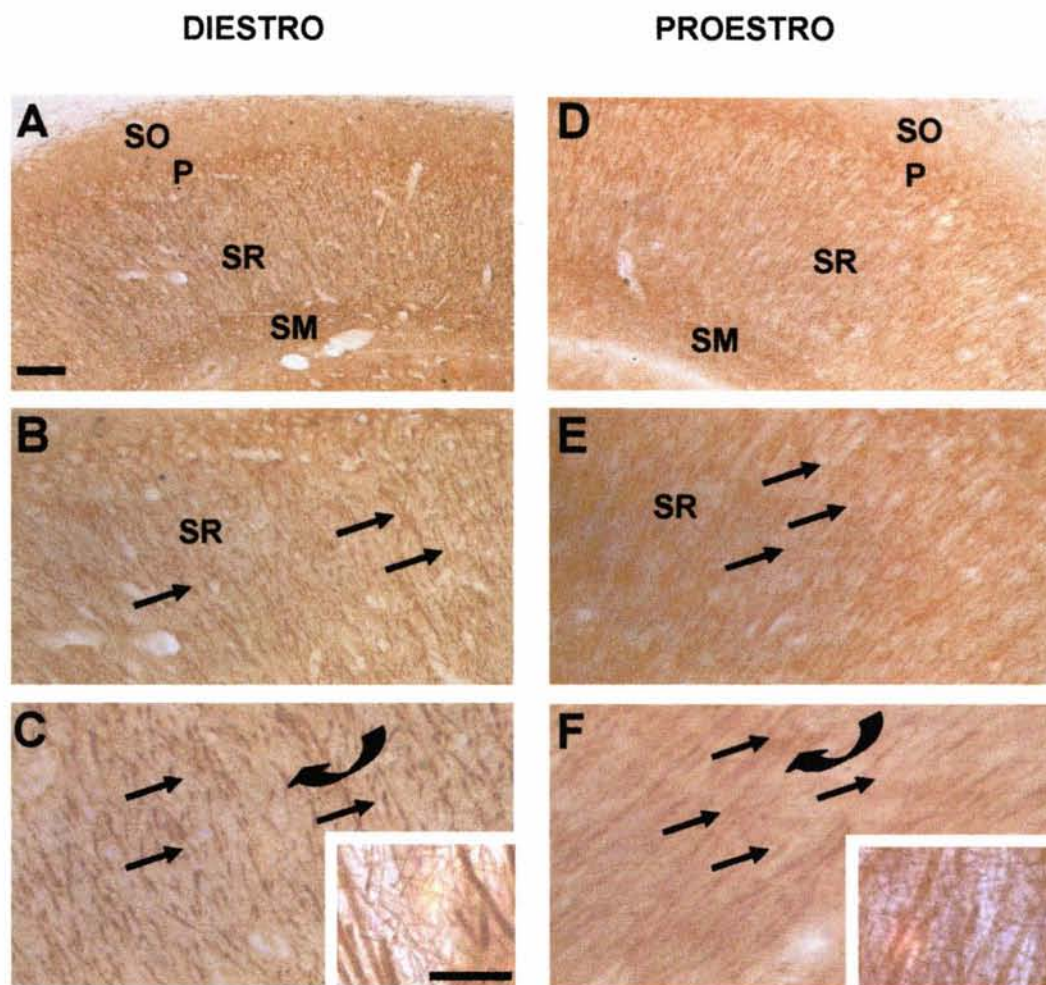


Fig. 23. Distribución de MAP2 en la región CA1 en el diestro y el proestro a las 19 h. Un incremento en la inmunotinción de MAP2 fue observado en el proestro (D-F) comparado con el diestro (A-C). Durante el diestro y el proestro se observaron dendritas gruesas y rectas y las dendritas apicales de las neuronas piramidales presentaron agregación de MAP2, (A y B. D y E respectivamente). En el estratum radiatum (SR), las dendritas gruesas presentan abundantes ramificaciones delgadas que se observan en ambos días del ciclo estral a mayor aumento (1000X) (flechas en B-C y E-F). Barras= 100 μm y 10 μm (insertos). **P**= stratum pyramidale; **SO**= stratum oriens; **SR** = stratum radiatum; **SM** = stratum lacunosum-moleculare. Cada micrografía es representativa de 5 animales independientes.

Durante el estro y el metaestro (Fig. 24) se observó la presencia de ramas gruesas sin embargo, las ramificaciones provenientes de éstas, son menos abundantes que en los otros días del ciclo estral lo cual se muestra a mayor aumento en los insertos (1000x) en la Fig. 24 C y F.

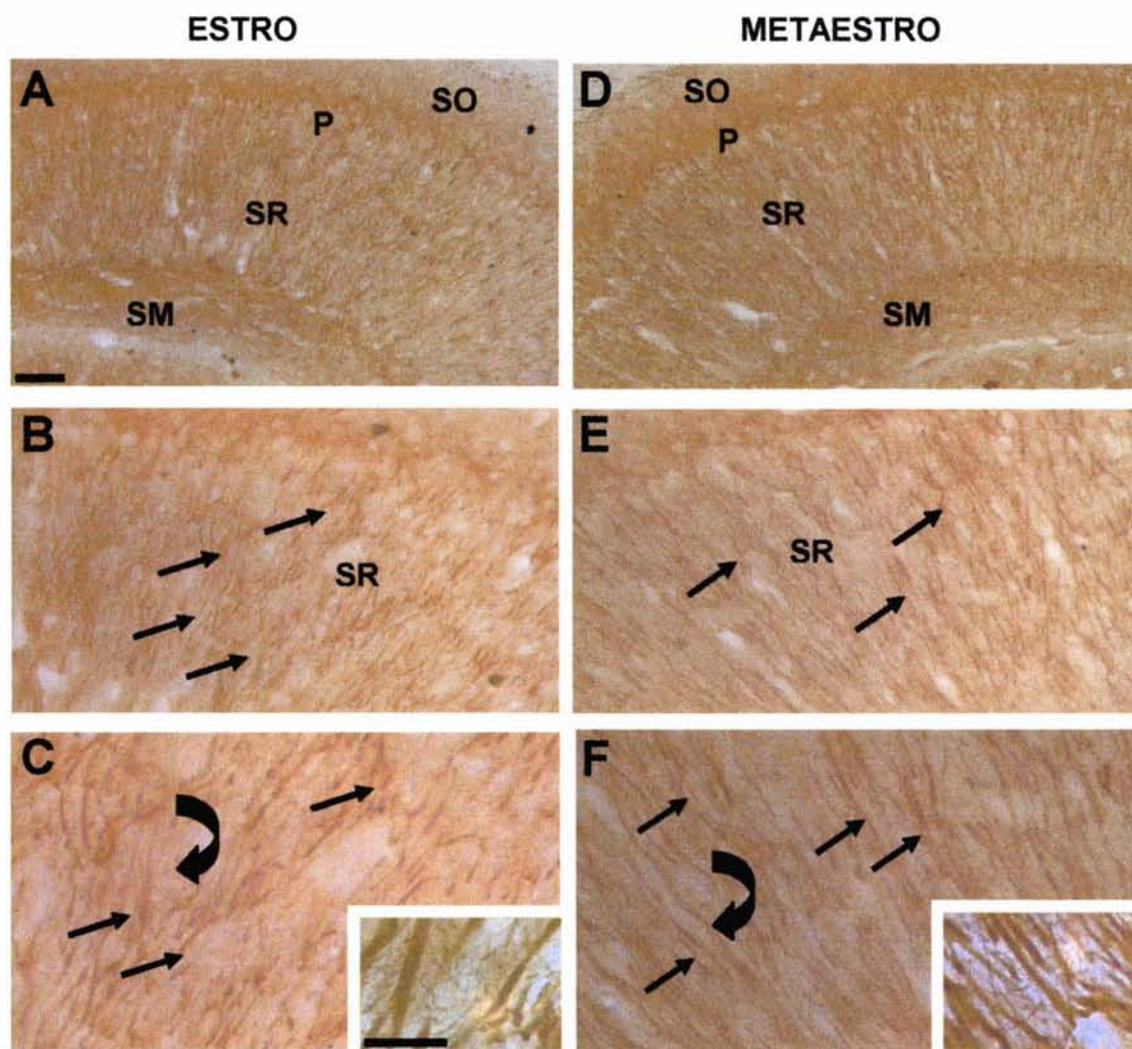


Fig. 24. Distribución de MAP2 en la región CA1 del hipocampo en el estro y el metaestro a las 19 h. Durante el estro y el metaestro las dendritas de la región CA1 son en apariencia gruesas (inserto en C) (flechas). En el estratum radiatum (SR), las dendritas gruesas muestran pocas ramificaciones y delgadas en ambos días del ciclo estral lo cual se muestra en un análisis a mayor aumento (1000X). Barras= 100 μm y 10 μm en insertos. **P**= stratum pyramidale; **SO**= stratum oriens; **SR** = stratum radiatum; **SM** = stratum lacunosum-moleculare. Cada micrografía es representativa de 5 animales independientes (B y E aumento a 200X).

Al igual que a las 12 h en CA3 no hubo cambios en la inmunotinción de MAP2 a lo largo del ciclo estral (Fig. 25).

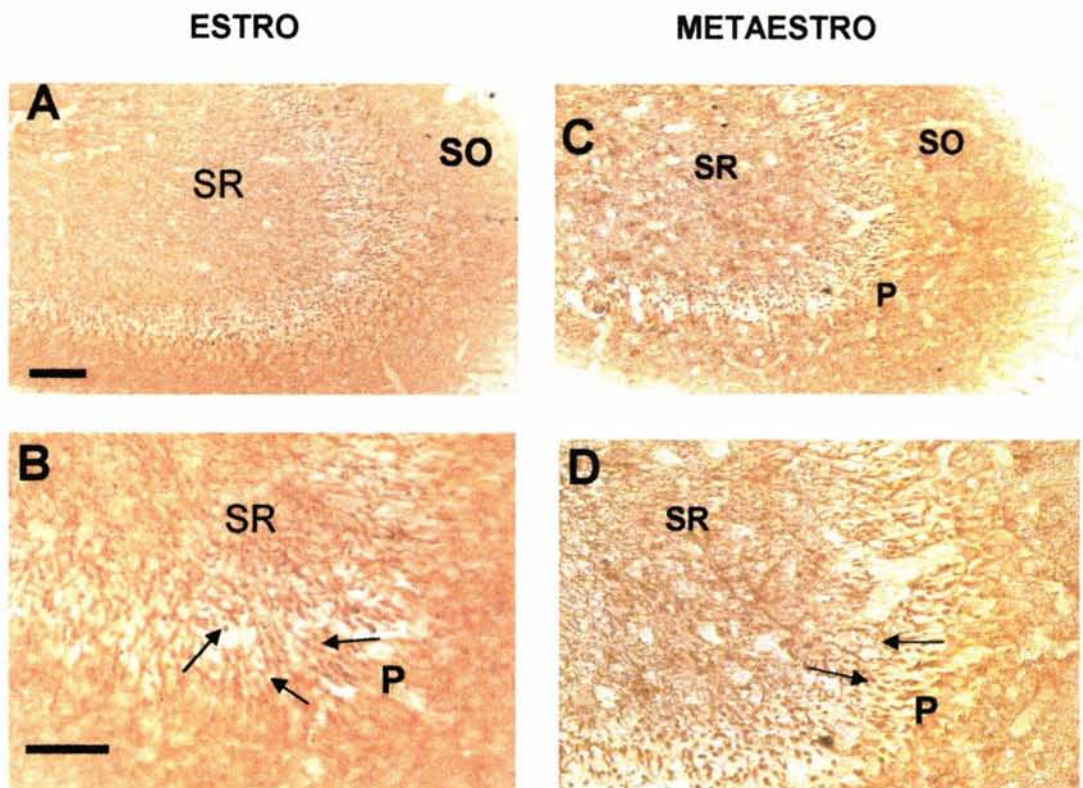


Fig. 25. Distribución de MAP2 en la región CA3 del hipocampo de la rata durante el estro (A-B) y durante el metaestro (C y D) a las 19 h. La inmunotinción para MAP2 durante el estro (A y B) y metaestro (C y D) mostró una agregación hacia las dendritas apicales del estratum radiatum (**SR**) las cuales a mayor aumento (200 X) se observan gruesas y cortas tanto en el estro (B) como en el metaestro (D). Escalas 100 μm (A) y 50 μm (B). **P**= stratum pyramidale; **SO**= stratum oriens; **SR** = stratum radiatum. Cada micrografía es representativa de 5 animales independientes.

10.5. Concentraciones séricas de E2 y P4 durante el ciclo estral

Las concentraciones séricas de E2 y P4 obtenidas a las 12 h de cada día del ciclo estral por radioinmunoanálisis se encuentran en la tabla 1, donde se muestra un aumento significativo en la concentración de E2 en el proestro (57.03 ± 6.38 pg/ml) respecto a los demás días del ciclo estral. Un aumento significativo en la concentración de P4 se registró en el metaestro (14.58 ± 2.40 ng/ml) a diferencia de los demás días del ciclo estral.

TABLA 1. Concentraciones séricas de E2 y P4 durante el ciclo estral.

	Estradiol (pg/ml)	Progesterona (ng/ml)
Diestro	12.95 ± 1.80	4.84 ± 1.10
Proestro	$57.03 \pm 6.38^*$	7.50 ± 0.80
Estro	15.23 ± 2.61	6.49 ± 3.38
Metaestro	14.34 ± 2.95	$14.58 \pm 2.40^*$

Los datos representan la media \pm ES de 5 animales/grupo (12 h). * $p < 0.05$ comparado con los otros días del ciclo estral.

XI. DISCUSIÓN

11.1. Regulación tejido-específica del contenido de la proteína MAP2 por estradiol y progesterona y durante el ciclo estral de la rata

En este trabajo se determinó que el E2 y la P4 regulan la expresión de MAP2 en el hipocampo de la rata. Las dosis empleadas en este trabajo fueron elegidas debido a que en trabajos previos se habían utilizado como inductoras de espinas dendríticas *in vivo* y por que producen concentraciones séricas similares a las reportadas durante el día del proestro del ciclo estral (Gould y Woolley, 1990; Guerra-Araiza et al., 2000).

Diversos estudios *in vitro* empleando diferentes tipos de cultivos celulares neuronales han mostrado que el E2 y la P4, modifican la morfología neuronal al regular la expresión de las proteínas MAPs (Ferreira et al., 1991; Lorenzo et al., 1992; Shah et al., 2003). Sin embargo, los efectos del E2 y la P4 *in vivo* sobre la expresión de las proteínas MAPs en el sistema nervioso central de la rata han sido poco estudiados (Gazzalley et al., 1996; Matsuno et al., 1997).

Los resultados obtenidos mostraron que existe una regulación de MAP2 por el E2 y la P4 región-específica ya que en el hipocampo se observó un aumento en el contenido de MAP2, no así en la corteza frontal donde ni el E2 ni la P4 tuvieron efectos significativos. Estos datos sugieren que existen factores que son específicos de cada tejido, que son regulados por el E2 y la P4 y que pueden participar en la regulación de MAP2. Entre los mejor caracterizados se encuentra el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) el cual es regulado por el E2 y la P4 en el hipocampo pero no en la corteza frontal de la rata (Gibbs, 1999). Respecto a la regulación de MAP2, se conoce que el factor de crecimiento similar

a la insulina (IGF-1) al actuar sobre su receptor induce la expresión de MAP2 en cultivos celulares de células hipotalámicas (Dueñas et al., 1996) y se ha reportado que el E2 aumenta la expresión del mRNA del IGF-1 en células de hipocampo inmortalizadas (Shingo y Kito, 2003).

Lo anterior sugiere que la regulación de MAP2 por el E2 y la P4 en el hipocampo puede estar relacionada con la presencia de estos factores neurotróficos. Por otro lado, se ha reportado que la serotonina es uno de los neurotransmisores que puede regular la expresión de MAP2 al unirse a su receptor (Whitaker-Azmitia et al., 1995). En relación con lo anterior se conoce que el tratamiento con el E2 y la P4 a dosis que producen niveles séricos similares a los que se presentan en el proestro incrementan la expresión del RNAm del receptor a serotonina en el hipocampo pero no en la corteza frontal (Birzniece et al., 2002).

Considerando que el E2 y la P4 presentan una influencia importante en la morfología del hipocampo aumentando el número de espinas dendríticas hasta en un 30% en la región CA1 del hipocampo en el proestro (Woolley y McEwen, 1990; Woolley y McEwen, 1993; Warren et al., 1995), en este trabajo se determinó la expresión de la proteína MAP2 durante el ciclo estral observándose que el contenido de MAP2 aumentó significativamente en el proestro.

Este aumento se mantiene durante el estro y el metaestro, lo cual podría estar relacionado con un efecto a largo plazo (24-48 h) del E2 y la P4 cuya concentración aumenta significativamente en el proestro. Este efecto sostenido se relaciona con el aumento observado en los animales ovariectomizados y tratados con E2 durante 2 días lo cual se demostró en la primera parte de este trabajo. Sin

embargo, considerando que existe una disminución significativa de espinas dendríticas durante el estro, otras proteínas pueden estar involucradas en la dinámica de las espinas dendríticas durante el ciclo estral (Kaech et al., 2001; Milner et al., 2003).

11.2. Regulación diferencial de la expresión del gen (mRNA) y de la proteína MAP2 en el hipocampo de la rata por el estradiol y la progesterona

Los resultados obtenidos respecto al incremento en el contenido de MAP2 por el E2 y la P4 en el hipocampo no se acompañan con un aumento en la expresión del RNAm de MAP2, lo cual sugiere que la regulación de MAP2 ocurre a nivel postranscripcional. Es interesante mencionar que el gen de MAP2 no presenta en su secuencia elementos de respuesta a E2 o P4 (Kastner et al., 1990; Kindler et al., 1990). Un efecto similar ha sido previamente observado en la regulación de la subunidad R1 del receptor a (NMDA) por el E2 en células piramidales de CA1 (Gazzaley et al., 1996).

El aumento en la expresión de MAP2, puede deberse también a un aumento en la traducción local de MAP2 inducida por el E2 y la P4 ya que el RNAm de MAP2 es uno de los pocos mensajeros que se presentan en las dendritas y existen evidencias de un incremento localizado de MAP2 inducido por la activación sináptica debido en parte a la síntesis local de proteínas (Steward et al., 1999; Langnaese, et al., 1999).

11.3. Distribución diferencial de la proteína MAP2 en el hipocampo durante el ciclo estral de la rata

Considerando que los efectos más importantes del E2 y la P4 en el hipocampo de la rata ocurren en las dendritas apicales de la región CA1 en el estratum radiatum (Woolley y McEwen, 1990; Woolley y McEwen, 1993; Leranth et al., 2004) era importante conocer si existía una distribución diferencial de la expresión de MAP2 en el hipocampo debido a los efectos localizados del E2 y la P4.

Pocos estudios han sido realizados respecto a la morfología o actividad sináptica a diferentes tiempos durante un mismo día del ciclo estral en el hipocampo de la rata (Luquin et al., 1992; Shors et al., 1998).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que durante el proestro la inmunotinción de las dendritas es mayor y éstas son en apariencia más gruesas y con mayor número de ramificaciones respecto a los demás días del ciclo estral a las 12 h. En algunos sitios del stratum radiatum incluso se observaron dendritas en forma de rosario que se conoce tienen una participación importante en el establecimiento de contactos sinápticos ya que aumentan la posibilidad de la presencia de ellos (Amaral y Witter, 1995). Este aumento en la inmunotinción, correlaciona con el aumento en la expresión de MAP2 observado mediante la técnica de Western blot de los animales sacrificados a las 12 h, este aumento puede también estar relacionado con el aumento en la concentración de E2 determinada mediante radioinmunoanálisis, la cual fue mayor durante el proestro respecto a los demás días del ciclo estral.

A las 19 h durante los diferentes días del ciclo estral se observó que la inmunotinción de MAP2 es similar a la observada durante el proestro a las 12 h, sin embargo, las ramificaciones observadas durante el diestro aparentemente aumentan respecto a las 12 h y este aumento se mantiene hasta la tarde del proestro, a diferencia de lo que ocurre en el estro y el metaestro de las 12 y 19 h donde se observó una disminución de las ramas dendríticas, aunque las que probablemente son ramas primarias son en apariencia más gruesas. Estos datos pueden estar relacionados con los reportados por Leranth y col. (2002), en donde al evaluar el diámetro de las dendritas primarias de monos hembra ovariectomizados éste fue mayor respecto a las hembras ovariectomizadas y tratadas con E2, no así en el diámetro de las ramas secundarias.

En la región CA3, tanto en los animales sacrificados a las 12 h como a las 19 h, se observó que las dendritas son gruesas y cortas hacia el inicio del estratum radiatum a lo largo del ciclo estral. Este patrón de inmunotinción es similar al reportado en ratas macho donde las ramas de las neuronas piramidales se encuentran intensamente teñidas (De Camilli et al., 1984; Matus, 1988; Arias et al., 1997). Esta región del hipocampo no presenta modificaciones en el número de espinas dendríticas ni en el número de ramas en el estratum radiatum o en el estratum oriens por el E2 y la P4 ni durante el ciclo estral (Gould et al., 1990; Woolley et al., 1990; Woolley y McEwen, 1993), lo que demuestra el efecto regional específico que presentan el E2 y la P4 en el hipocampo.

11.4. Regulación de la proteína Tau en el hipocampo por el E2 y la P4 y durante el ciclo estral

La expresión de Tau que es una proteína que preferencialmente se encuentra en axones, no se modificó por el tratamiento con el E2 o P4 o durante el ciclo estral en el hipocampo o la corteza frontal.

A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, Ferreira y Caceres (1991) han demostrado que el E2 incrementa el contenido de la proteína Tau en cultivos de neuronas hipotalámicas, sin embargo solo una de las isoformas de Tau (58 kDa), fue observada, a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo en donde se detectaron todas las isoformas de Tau. Por otro lado, se ha propuesto que uno de los mecanismos por los que ocurre la plasticidad neuronal mediada por esteroides y la interacción de éstos con MAPs, involucra la presencia de una región hidrofóbica y polar en el extremo N-terminal de estas, la cual está ausente en la proteína TAU (Murakami et al., 2000; Laurine et al., 2003).

Como se mencionó anteriormente, Tau presenta varias modificaciones postraduccionales entre las que se encuentra la fosforilación e incluso para esta condición se ha reportado que el E2 no modifica el estado de fosforilación en extractos de cerebro de rata (Papazosamenos et al., 1997).

11.5. Mecanismos de regulación de la expresión de MAP2 por E2 y P4

Los efectos del E2 y la P4 en la regulación del contenido de MAP2 puede involucrar tanto mecanismos genómicos como no genómicos. Aún cuando el hipocampo expresa poca abundancia de los RE varias evidencias indican que la isoforma β es la más abundante en la región CA1 del hipocampo. La isoforma α ha

sido localizada preferencialmente en el núcleo de las interneuronas y en sitios extranucleares particularmente en las espinas dendríticas en CA1, lo cual sugiere que el RE puede participar en los cambios de la morfología dendrítica (Shugrue et al., 1997; Alves et al., 2000; Milner et al., 2001). La presencia de las isoformas del RP (RPA y RPB), también ha sido documentada en las regiones estudiadas en este trabajo (Camacho-Arroyo et al., 1998a; Guerra-Araiza et al., 2000). La participación de los receptores a hormonas esteroides en la regulación de MAP2 ha sido demostrada por Dueñas y col (1996) en la que demostró que el antagonista del RE, ICI 182780 disminuye el número de neuronas inmunopositivas a MAP2 en cultivos de neuronas hipotalámicas así como también la extensión de los procesos neuronales inmunopositivos a MAP2. Sin embargo, un mecanismo indirecto mediado por el E2 y la P4 en la inducción de MAP2, está relacionado con la activación de los receptores a NMDA los cuales se conocen presentan una participación importante en los cambios de la citoarquitectura neuronal observados durante la potenciación a largo plazo y el crecimiento de las neuritas (Durand et al., 1996), lo que involucra directamente a los elementos del citoesqueleto. Lo anterior está reforzado por estudios de Woolley y McEwen (1994), en los que emplearon antagonistas del receptor a NMDA y observaron que los efectos inductores del E2 en la densidad de espinas dendríticas son inhibidos con estos antagonistas. Estos mismos resultados han sido reportados por Segal y Murphy (1996) en cultivos primarios de hipocampo.

Recientemente, se ha propuesto un mecanismo que regula la función de MAP2 por la interacción directa de los esteroides con la proteína. Este trabajo demostró que la dehidroepiandrosterona un precursor de la testosterona y del E2

se une MAP2C mediante interacciones hidrofóbicas y polares que se establecen únicamente en el extremo N-terminal de las MAPs, el cual comparten todas las isoformas de MAP2 pero no Tau, por lo que los esteroides además de la interacción con su receptor específico pueden participar en la plasticidad cerebral al asociarse a elementos del citoesqueleto (Laurine et al., 2003).

XII. CONCLUSIÓN

Los cambios en el contenido y la distribución neuronal de MAP2 están involucrados en las modificaciones morfológicas de las dendritas de la región CA1 del hipocampo de la rata y estos cambios están relacionados con las concentraciones de estradiol y progesterona tanto en condiciones de reemplazo hormonal como durante el ciclo estral.

XII. PERSPECTIVAS

*Conocer el patrón de distribución de MAP2 en la rata macho y compararlo con el de las hembras

*Estudiar los mecanismos celulares por los cuales el E2 y la P4 regulan el contenido de MAP2.

*Conocer si el aumento en el contenido de MAP2 debido al E2 y P4 depende de un aumento en la síntesis de la proteína o a una disminución en la degradación.

*Determinar el efecto de la administración tanto aguda como crónica del E2 y la P4 en la expresión de MAP2 en ratas ancianas de 20 a 24 meses de edad.

XIV. REFERENCIAS

- Adams, M. Fink, S. Shah, R. Janssen, W. Hayashi, S. Milner, T. McEwen, B and Morrison, J. Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor- α in the hippocampus of female rats. *J Neurosci*, 2002. 22: 3608-3614.
- Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. Molecular biology of the cell. 2002. Pp:908-970.
- Alves, S. McEwen, B. Hayashi. S. Estrogen-regulated progesterin receptors are found in the midbrain raphe but not hippocampus of estrogen receptor alpha (ER alpha) gene-disrupted mice. *J Comp Neurol*, 2000. 427:185-195.
- Amaral. D. G. Witter, M. P. Hippocampal Formation. The rat nervous system. Academic Press. U.S.A. 1995. Pp: 443-492.
- Arias, C. Arrieta, I. Massieu, L. Tapia, R. Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus in vivo. *Exp Brain Res*. 1997. 116:467-476.
- Arias, C. Sharma, N. Davies, P. Shafit-Zagardo. B. Okadaic acid induce early changes in microtubule associated protein 2 and phosphorylation prior to the neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem*. 1993. 61:673-682.
- Arnold, S. E. Lee, V. M. Gur, R. E. Trojanowski, J. Q. Abnormal expression of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in specific subfields of the hippocampal formation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. 88:10850-10854.

- Audesirk, T. Cabell, L. Dern, M. Audesirk, G. Enhancement of dendritic branching in cultured hippocampal neurons by 17 β -estradiol is mediated by nitric oxide. *Int J Devl Neuroscience*. 2003. 21:225-233.
- Avila, J. Domínguez, J. Díaz-Nido, J. Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int J Dev Biol*, 1994. 38:13-25.
- Barlett, W. P. Banker, G.A. 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture: Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci*. 1984. 4:1944-1953.
- Bonnefont, A. B. Muñoz, F. J. Inestrosa, N. C. Estrogen protects neural cells from the cytotoxicity induced by acetylcholin-esterase-amyloid complex. *FEBS Lett*, 1998. 441:220-224.
- Braak, H. Braak, E. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, 1991. 1:213-216.
- Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, 1976. 72:248-254.
- Bramley, T. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary:some unresolved issues. *Reproduction*. 2003. 125:3-15.
- Brandt, R. Leger, J. Lee, G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol*. 1995. 131:1327-1340.

- Buddle, M. Eberhardt, E. Ciminello, L. H. Levin, T. Wing, R. DiPasquale, K. Raley-Susman, K. M. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) associates with the NMDA receptor and is spatially redistributed within rat hippocampal neurons after oxygen-glucose deprivation. *Brain Res.* 2003. 978:38-50.
- Buée, L. Thierry, B. Buée-Scherrer, V. Delacourte, A. Hof, P. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorder. *Brain Res.* 2000. 33:95-130.
- Burger, H. G. Androgen production in women. *Fertil Steril.* 2002. 77. Suppl 4:S3-5.
- Caceres A, Kosik K. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature.* 1990. 343: 461-463.
- Calixto González, E. Brailowsky, S. Neuroesteroides. Neuromoduladores de la excitabilidad cerebral. *Gac Med Méx.* 1999. 134:69-84.
- Camacho-Arroyo, I. Guerra-Araiza, C. Cerbón, M. A. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *NeuroReport* 1998a.9:3993-3996.
- Camacho-Arroyo, I. Guerra-Araiza, C. Domínguez, R. Mendoza-Rodríguez, A. C. Cruz E. M. Cerbón, M. A. C-fos expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during proestrus. *Life Sci.* 1998b.62:1153-1159.
- Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression and progesterone actions in the brain. *Recent Res Devel.* 2003. 1:221-242.
- Chen, J. Kanai, Y. Cowan, N. J. Hirokawa, N. Projection domain of MAP2 and tau determine spacing between microtubules in dendrites and axons. *Nature.* 1992. 360:674-677.

- Chomczynski, P. Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. 162:156-159.
- Choo, Q. L. Bray, D. Two forms of neuronal action. *J. Neurochem*. 1978. 31:217-224.
- Chrétien, D. Wadde, S. 1991. New data on the microtubule surface lattice. *Biol Cell*. 1991. 71:161-174.
- Chung, W. J. Kindeler, S. Seidenbecher, C. Garner, C. C. MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J Neurochem*. 1996. 66:1279-1281.
- Dalkin, A. C. Paul, S. J. Haisenleder, D. J. Ortolano, G. A. Yasin, M. Marshall, J. C. Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J Endocrinol*. 1992. 132:39-45.
- De Camilli, P. Miller, P. Navone, F. Theurkauf, W. E. Vallee, R. B. Distribution fo the microtubule associated protein 2 (MAP-2) in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience*. 1984. 11:819-846.
- Dinsmore A, Solomon F. Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell*. 1991. 64:817-826.
- Dueñas, M. Torres-Aleman, I. Naftolin, F. García-Segura L. M. Interaction of insulin-like growth factor-I and Estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation. *Neuroscience*. 1996. 74:531-539.
- Durand, G. V. Kovalchuck, Y. Konnerth, A. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature*. 1996. 381:71-75.

- Evans, R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988. 240: 889-895.
- Faruki, S. Karsenti, E. Purification of microtubule proteins from *Xenopus* eggs extracts. Identification of a 230 kDa MAP4-like protein. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1994. 28:108-118.
- Ferreira, A and Caceres, A. Estrogen-enhanced neurite growth: Evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J. Neurosci*, 1991.11:392-400.
- Foy, M. R. Y Teyler, T.J. 17β and 17β -estradiol in hippocampus. *Brain Res Bull*, 1983. 10:735-739.
- Francon, J. Lennon, A. M. Fellous, A. Mareck, a. Pierre, M Nunez, J. Heterogeneity of microtubule-associated proteins and brain development. *Eur J Biochem*. 1982. 128:465-471.
- Freeman, M. E. The ovarian cycle of the rat. In Knobil, E. y Neill, J. The physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 1988. Pp. 1893-1928.
- Frye, C. A. Vongher, J. M. Progesterone has rapid and membrane effects in the facilitation of female mouse sexual behavior. *Brain Res*, 1999. 815:259-269.
- García-Segura, L.M. Azcoitia, I. DonCarlos, L.L. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*, 2001. 63:29-60
- Gavin, R.H. Microtubule-microfilament synergy in the cytoskeleton. *Int Rev Cytol*, 1997. 173:207-242.
- Gazzalley, A. H.; Siegel, S. J.; Kordower, J. H.; Mufson, E. J.; Morrison, J. H. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in rat hippocampus. *J. Neurosci*. 1996. 16:6830-6838.

- Gazzalley, A. Kay, S. Benson, D. L. Dendritic spine plasticity in hippocampus. *Neurosci.* 2002. 111:853-862.
- Geddes, J.W. Monaghan, D.T. Lott, I.T. Kim, R.C. Chui. H.C. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer disease. *Science*, 1985. 230:1179-1181.
- Georgieff, I. S. Liem, R. K. Couchie, D. Mavilia, C. Nunez, J. Shelanski, M. L. Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous system. *J Cell Sci.* 1993. 105:729-735.
- Gibbs, R. B. Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. *Brain Res*, 1998. 787:259-268.
- Goedert, M. Spillantini, M. G. Potier, M. C. Ulrich, J. Crowther, R. A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats : differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 1989. 8:393-399.
- Gollapudi, L and Oblinger, M. Estrogen effects on neurite outgrowth and cytoskeletal gene expression in ER α -transfected PC12 cell lines. *Exp. Neurol.* 2001.171:308-316.
- González-Billault, C. Engelke, M. Jiménez-Mateos, E. Wandosell, F. Cáceres, A and Avila J. Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res*, 2002. 67:713-719.
- González-Vidal, M.D. Cervera-Gaviria, M. Ruelas, R. Escobar, A. Moralí, G. Cervantes, M. Progesterone: Protective effects on the cat hippocampal

- neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. Arch Med Res, 1998. 29:117-124.
- Good, M. Day, M. Muir, J. L. Cyclic changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 regio. Eur J Neurosci. 1999. 11:4476-4480.
- Gore-Langton, R. E., Armstrong, D. T. Follicular steroidogenesis and its control. In: Physiology of Reproduction. In Knobil, E. y Neill, J. The physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 1988. Pp. 331-335.
- Gould, E. Wolley, C. S. Frankfurt M. McEwen B. S. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. J Neurosci, 1990. 10:1286-1291.
- Graham, J. D. Clarke, C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. Endocr Rev. 1997. 18:502-519.
- Green, P. S. Simpkins, J. W. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. Int J Dev Neurosci. 2000. 18:347-358.
- Guerra-Araiza, C. Cerbón, M.A. Morimoto, S. Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. Life Sci, 2000. 66: 1743-52.
- Hafner, H. Behrens, S. De Vry, J. Garraz, W.F. An animal model for effects of estradiol o dopamine-mediated behavior implications for sex differces in schizophrenia. Psychiatry Res, 1991. 38:125-134.
- Harada, A. Oguchi, K. Okabe, S. Kuno, J. Terrada, S. Ohshima, R. Hirokawa, N. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. Nature. 1994. 364:488-491.

- Harada, A. Teng J. Takei Y. Oguchi K. Hirokawa N. 2002. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* 158:541-549.
- Heideman, S. R. Landers, J. M. Hamborg, M. A. Polarity orientation of axonal microtubules. *J Cell Biol*. 1981. 91:661-665.
- Henderson, W. W. Paganini-Hill, A. Emanuel, C.K. Dunn, M.E. Buckwalter, J.G. Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and non-demented control subjects. *Arch Neurol*, 1994. 51:896-900.
- Herzog, W. Weber. K. Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization in vitro. *Eur J Biochem*, 1978. 92:1-8.
- Hirokawa, N. Shiomura, Y. Okabe, S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell Biol*, 1988. 107:1449-1459.
- Holscher, C. Time, space and hippocampal functions. *Rev Neurosci*. 2003. 14:253-284.
- Hsue, A. J. Adashi, E. Y. Jones, P. B. Welsh, T. H. Jr. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*. 1984. 5:76-127.
- Hutchison, J. S. Nelson, P. B. Zeleznik, A J. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology*. 1986. 119:1964-1971.

- Johnson, G. V. Wy Joje, R. S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. 1992. *J Neurosci Res.* 33:505-512.
- Kaech, S. Parmar, H. Roelandse, M. Bornmann, C and Matus, A. Cytoskeletal microdifferentiation: A mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001. 98: 7086-7092.
- Kandel, E. R. Schwartz, J. H. Jessell, T. M. Principles of neural science. McGraw-Hill Co. U.S.A. 2000. 1169-1247.
- Kastner, P. Krust, A. Turcotte, B. Stropp, U. Tora, L. Gronemeyer, H. and Chambon P. Two distinct estrogen regulated promoters generate transcripts encoding the two functionall different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*, 1990. 9: 1603-1614.
- Kindler, S. Garner, C. C. Four repeat MAP2 isoforms in human and rat brain. *Mol Brain Res*, 1994. 26:218-224.
- Kindler, S. Schwanke, B. Schulz, B. Garner, C.C. Complete cDNA sequence encoding rat high and low molecular weight MAP2. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 2822.
- Kosik, K. S. Cáceres, A. Tau protein and the establishment o fan axonal morphology. *J Cell Sci supp.* 1991. 15:69-74.
- Kosik, K. S. Orecchio, L. D. Bakalis, S. Neve, R. L. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron.* 1989. 2:1389-1397.

- Langnaese, K. Seidenbecher, C. Wex, H. Seidel, B. Hartung, K. Appeltauer, U. Garner, A. Voss, B. Mueller, B. Garner, C.C. Gundelfinger, E.D.. Protein components of a rat brain synaptic junctional protein preparation. *Mol Brain Res*, 1999. 42:118-122.
- Laurine, E. Lafitte, D. Grégoire, C. Séréé, E. Loret, E. Douillar, S. Michael, B. Briand, C. Verdier, J-M. Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. 2003. 278:29979-29986.
- Leranth, Cs. Hajszan, T. MacLusky, H. J. Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal of ovariectomized female rats. *J Neurosci*. 2004. 24:495-499.
- Leranth, Cs. Petnehazy, O. MacLusky, N. J. Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci*. 2003. 23:1588-1592.
- Leranth, Cs. Shanabrough, M. Redmond, E. D. Gonadal hormones are responsible for maintaining the integrity of spine synapses in the CA1 hippocampal subfield of female nonhuman primates. *J Comp Neurol*. 2002. 447:34-42.
- Li, Ch. Brake, W., G. Romeo, R. D. Dunlop, J. C. Gordon, M. Buzescu, R. Magarinos, A. M. Allen, P. B. Greengard, P. Luine, V. McEwen, B. Estrogens alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2004. 101:2185-2190.

- Lorenzo, A. Díaz, H. Carrer, H and Cáceres, A. Amygdala neurons in vitro: Neurite growth and effects of estradiol. *J Neurosci Res.* 1992. 33:418-435.
- Majewska, M.D., Harrison, N.L. Schwartz, R. D. Barker, J. L Y Paul, S. M. Steroid hormone metabolites and barbiturate like modulators of the GABA receptor. *Science*, 1986. 232:1004-1007.
- Matsuno, A. Takekoshi, S. Sanno, N. Utsunomiya, H. Ohsugi, Y Saito, N. Kanemitsu, H. Tamura, A. Nagashima, T. Osamura, R.Y. Watanabe, K. Modulation of protein kinases and microtubule-associated proteins and changes in ultrastructure in female rat pituitary cells: effects of estrogen and bromocriptine, *J Histochem Cytochem*, 1997. 45:805-813.
- Matus, A. Microtubule-Associated Proteins: Their potential role in determining neuronal morphology. *Ann Rev Neurosci*, 1988. 11:29-44.
- McEwen, B. Akama, K. Alves, S. Brake, W. Bulloch, K. Lee, S. Li, Ch. Yuen, G and Milner, T. Tracking the estrogen receptor in neurons: Implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2001. 98:7093-7100.
- McEwen, B. Tanapat, P and Weiland, N. Inhibition of dendritic spine induction on hippocampal CA1 pyramidal neurons by nonsteroidal estrogen antagonist in female rats. *Endocrinol*, 1999. 140:1044-1047.
- Mellon, S. H. Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994. 78:1003-1008.
- Morales, M. Fifkova E. Distribution of MAP2 in dendritic spines and its colocalization with actin. An immunogold electron-microscope study. *Cell Tis Res*, 1989. 256: 447-456.

- Murakami, K. Fellous, A. Balieu, E.E. Robel. P. Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000. 97: 3579-3584.
- Murphy, D and Segal, M. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci*, 1996. 16:4059-4068.
- Murphy, D and Segal, M. Progesterone prevents estradiol-induced dendritic spine formation in cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology*, 2000. 72: 133-43.
- Murphy, D. Cole, N and Segal, M. Brain –derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95: 11412-11417.
- Neve, R. L. Harris, P. Kosisk, K. S. Kurnit, D. M. Donion, T. A. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein 2. *Molec Brain Res*, 1986. 1:271-280.
- Nogales, E. Structural insights into microtubule function. *Ann Rev Biochem*. 2000. 69:277-302.
- Obar, R. A. Dingus, J. Bayley, H. Vallee, R. B. The RII subunit of cAMP-dependent protein kinase binds to a common amino-terminal domain in microtubule-associated proteins 2A, 2B and 2C. *Neuron*, 1989. 3:639-645.
- Paganini-Hill, A. Henderson V. W. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol*. 1994. 140:256-261.

- Papasozomenos, S.H. The heat shock-induced hyperphosphorylation of tau is estrogen-independent and prevented by androgens: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. 94:6612-6617.
- Patrone, C. Pollio, G. Vegeto, E. Enmark, E. Curtis, I. Gustafsson, J. And Maggi, A. Estradiol induces differential neuronal phenotypes by activating estrogen receptor α or β *Endocrinol*, 2000. 141:1839-1845.
- Paxinos, G. Watson. C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney; Academic Press. 1986.
- Pedrotti, B Islam, K. Estramustine phosphate but not estramustine inhibits the interaction of microtubule-associate protein 2 (MAP2) with actin filaments. *FEBS Lett*. 1997. 403:123-126.
- Perrot-Applanat, M. David-Ferreira, J. F. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. *Cell Tissue Res*. 1982. 223:1511-1519.
- Pryer, N. K. Wilker, R. A. Skee, V. P. Bourns, B. D. Soboeiro, M. F. Salmon, E. D. Brain microtubule-associated protein modulate microtubule dynamics instability in vitro. Real time observations using video microscopy. *J Cell Sci*. 1992. 103:965-973.
- Ramírez, V. D y Beyer, C. The ovarian cycle of the rabbit: its neuroendocrine control. In Knobil, E. y Neill, J. The physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 1988. Pp. 585-611.

- Reagan. R.F. Guo, Y. Estrogens attenuate neuronal injury due to hemoglobin chemical hypoxia and excitatory amino acids in murine cortical cultures. *Brain Res*, 1997. 764:133-140.
- Rendon, A. Jung, D. Jancsik, V. Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochem J*. 1990. 269:555-601.
- Reyna-Neyra A, Camacho-Arroyo I, Ferrera P, Arias C. 2002. Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein content in the rat hippocampus. *Brain Res Bull* 58:607-612.
- Rissanen A. Puolivali J. Van Groen J. T. Rickkinen, P. In mice tonic estrogen replacement therapy improves non-spatial and spatial memory in a water maze task. *NeuroReport*, 1999. 10:1369-1372.
- Rissman, E. Heck, A. Leonard, J. Shupnik, M and Gustafsson, J. A. Disruption estrogen receptor b gene impairs spatial learning in female mice. *Proc Natl Acad Sci*, 2002. 99: 3996-4001.
- Roder, H. M. Fracasso, R. P. Hoffman, F. J. Witowsky, J. A. Davis, G. Pellegrino, C. B. Phosphorylation-dependent monoclonal Tau antibodies do not reliably report phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase 2 at specific sites. *J Biol Chem*. 1997. 272:4509-4515.
- Roof, R. L. Duvdevani, R. Braswell, L. Stein, D. G. Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rat. *Exp Neurol*, 1994. 129:64-69.

- Rozovsky, I. Wei, M. Stone, D. J. Zanjani, H. Anderson, C. P. Morgan, t. e. Finch, C. E. Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. *Endocrinology*. 2002. 143:636-646.
- Rudick, Ch and Woolley, C. Estrogen regulates functional inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells in the adult female rat. *J Neurosci*, 2001. 21:6532-6543.
- Sánchez, C. Díaz-Nido, J Avila. J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol*, 2000. 61:133-168.
- Selden, S. C. Pollard, T. D. Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J Biol Cell*. 1983. 258:7064-7071.
- Shah, R. D. Anderson, K. L. Rapoport, M. Ferreira, A. Estrogen-induced changes in the microtubular system correlate with a decreased susceptibility of aging neurons to beta amyloid neurotoxicity. *Mol Cell Neurosci*. 2003. 24:503-516.
- Shi, J. Panickar, K.S. Yang, S. H. Rabbani, O. Day A. L. Simpkins, J. W. Estrogens attenuates over-expression of beta-amyloid precursor protein messenger RNA in an animal model focal ischemia. *Brain Res*, 1998. 810:87-92.
- Shors, T. Chua, Ch and Falduto, J. Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus. *J Neurosci*, 2001, 21:6292-6297.

- Shughrue, P.J. Lane, M.V. Merchenthaler, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 1997. 388:507-525.
- Smith, S. S. Progesterone administration attenuates excitatory amino acid responses of cerebellar Purkinje cells. *Neurosci*, 1991. 2:309-320.
- Solomon, F. Neuronal cytoskeleton and growth. *Current Opinion in Neurobiology*, 1992. 2:613-617.
- Steward, O and Halpain, S. Lamina-specific synaptic activation causes domain-specific alterations in dendritic immunostaining for MAP2 and CAM kinase II. *J Neurosci*, 1999. 19:7834-7845.
- Stone, D. J. Rozovsky, I. Morgan, T. E. Anderson, C. P. Lopez, L. M. Shick, J. Finch, C. E. Effect of age on gene expression during estrogen-induced synaptic sprouting in the female rat. *Exp Neurol*. 2000. 165:46-57.
- Sudo, S. Wen, T. C. Desaki, J. Mastsuda, S. Tanaka, J. Arai, T. Maeda, N. Sahanaka, N. α -Estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil. *Neurosci Res*, 1997. 29:345-354.
- Tso, J.Y. Sun, S.H. Kao, T.H. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res*, 1985. 13:2485-2502.
- Tucker, R. Matus, A. Microtubule-associated proteins characteristic of embryonic brain are found in the adult mammalian retina. *Dev Biol*. 1988. 130:423-434.

- Ukena, K. Kohchi, C. Tsutsui, K. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology*. 1999. 140:805-813.
- Vongher, J.M. Frye. C.A. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav*, 1999. 64:777-785.
- Weaver, C. E. Park-Chung, M. Gibbs, T. T. Farb, D. H. 17 β -estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res*, 1997. 761:338-341.
- Weisz, J. Ward, I. L. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology*. 1980. 106:306-316.
- Whitaker-Azmitia, P. M. Borella, A. Raio, N. Serotonin depletion in the adult rat causes loss of the dendritic marker MAP-2. A new animal model of schizophrenia? *Neuropsychopharmacology*. 1995. 12:269-72
- Woolley, C. S. Gould, E. Frankfurt M. McEwen B. S. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density in adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, 1990. 10:4035-4039.
- Woolley, C. S. McEwen, B.S. Roles of estradiol and progesterone regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol*, 1993. 336:293-306.
- Woolley, C.S. McEwen. B.S. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-Methyl D-Aspartate receptor-dependent mechanism. *J Neurosci*, 1994. 14:7680-7687.

- Yanagahara, T. Yoshimine, T. Morimoto, K. Yamamoto, K. Homburger, H.
Immunohistochemical investigation of cerebral ischemia in gerbils. *J
Neuropathol Exp Neurol.* 1985. 44:204-215.
- Yankova, M. Hart, S. A. Woolley, C. S. Estrogen increase synaptic connectivity
between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal
cells: A serial electron-microscopic study. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2001.
98:3525-3530.
- Zwain, I. H. Yen, S. S. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and
neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* 1999. 140:3843-
3852.

XV. ARTÍCULOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE TESIS

Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein 2 content in the rat hippocampus

Andrea Reyna-Neyra,^{1,2} Ignacio Camacho-Arroyo,² Patricia Ferrera¹ and Clorinda Arias^{1*}

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas; and

²Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México

[Received 25 February 2002; Revised 6 May 2002; Accepted 31 May 2002]

ABSTRACT: The molecular mechanisms involved in the regulation of synaptic plasticity and neuroprotection by estradiol (E₂) and progesterone (P₄) are unknown. Because these processes involve changes in cytoskeleton organization, we studied the effects of E₂ and P₄ in the expression of two cytoskeletal proteins: microtubule associated protein 2 (MAP2) and tau in the hippocampus and the frontal cortex of ovariectomized adult rats. While tau expression was unaffected by E₂ and P₄, an increase in MAP2 protein content in the hippocampus but not in the cortex was observed after E₂ and P₄ treatments. Interestingly, these steroids did not modify MAP2 mRNA content in the hippocampus. These data suggest that MAP2 is involved in the structural changes induced by E₂ and P₄ in the rat hippocampus, and that MAP2 expression is regulated by these steroid hormones at a posttranscriptional level.

© 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

KEY WORDS: Estradiol, Progesterone, Hippocampus, MAP2, Tau, Cytoskeleton.

INTRODUCTION

Estradiol (E₂) and progesterone (P₄) participate in the regulation of several functions of the brain [3,23]. It has been reported that E₂ increases the density of dendritic spines and induces the formation of excitatory synapses in the rat hippocampus [14,36], thus modulating long-term potentiation [6,35]. E₂ enhances compensatory sprouting in response to entorhinal cortex lesion, and a replacement therapy based on estrogens reduces the risk of Alzheimer's disease (AD) [10]. An acute (5 h) P₄ treatment enhances the dendritic spine formation in the rat hippocampus induced by E₂ [14]. P₄ also diminishes neuronal loss produced by ischemia in the rat hippocampus [13]. The combined treatment of E₂ and P₄ has a neuroprotective role against damage induced by intrahippocampal colchicine infusions in the rat [34].

The neuronal cytoskeleton is prominent in the development of neuritic processes, polarity, and in the establishment and maintenance of synaptogenesis. Microtubules and their associated proteins (MAPs) play a significant role in the promotion of neurite extension, the induction of distinctive morphology between axons and dendrites [29], neuronal plasticity and neurodegeneration [2].

In the adult brain two high molecular mass protein (280 kDa), MAP2a and MAP2b, have been identified in dendrites and neuronal cell bodies where they are mainly associated with microtubules [2,21], as well as with actin in spines and postsynaptic densities [9,19]. Tau protein consists of a family of developmentally regulated polypeptides (45–55 kDa), preferentially located in axons, which have been involved in the formation of neurofibrillary tangles in AD [2].

Because the molecular mechanisms involved in the regulation of synaptic plasticity and neuroprotection by E₂ and P₄ are unknown, and these processes may involve the participation of cytoskeletal proteins such as MAP2 and tau, the aim of the present study was to evaluate whether E₂ and P₄ modify the expression of these proteins in the rat hippocampus and the cerebral cortex *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Surgery and Hormone Treatments

Eighty adult female Wistar rats (220–250 g) were maintained under a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 0600 h) with food and water *ad libitum*. Animals were ovariectomized under ketamine (Galen, S.A. México) anesthesia (80 mg/kg). Two weeks later they were randomly assigned ($n = 5$) to the following s.c. treatments: (1) daily administration of vehicle (corn oil) for 2 days, (2) E₂ (1.0, 2.5, 5.0 or 10.0 μ g/100 g) for 2 days, (3) P₄ (0.1, 0.2, 0.4 or 0.8 mg/100 g), and (4) E₂ (5.0 μ g/100 g) administered as above followed by P₄ (0.4 mg/100 g) on day 3. These steroid doses produce similar physiological serum levels to those found on proestrus day. Twenty-four hours after the last dose the hippocampus and the frontal cerebral cortex were excised according to the Atlas of Paxinos and Watson [28] and immediately processed for protein extraction. In the case of gene expression experiments, other groups of rats ($n = 5$) treated as described before were used, and brain regions were excised 6, 12, and 24 h after the last dose.

Electrophoresis and Immunoblot

Heat-stable cytoplasm proteins were obtained according to the method of Herzog and Weber [16]. The total amount of protein was determined by a Bio-Rad (Richmond, CA) analytical procedure.

* Address for correspondence: Dr. Clorinda Arias, Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510 México DF, México. Fax: +52-55-56223897; E-mail: carias@servidor.unam.mx

Five micrograms of protein from the hippocampus and the frontal cerebral cortex were loaded in a 5–10% gradient SDS-PAGE and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane. After 2 h incubation in PBS solution containing 5% albumin, blots were incubated with monoclonal antibodies against MAP2 (5 μ g/ml, clone AP20, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and tau (1 μ g/ml; tau-1, clone PC1C6, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), overnight at 4°C. Blots were then washed three times with PBS (5 min each), incubated with an anti-mouse IgG (1:500) and revealed with the ABC-biotin-avidin-peroxidase kit (Vector, Burlingame, CA), with diaminobenzidine tetrahydrochloride as substrate. Negative controls consisted in eliminating the primary antibody from the procedure. The intensity of MAP2 and tau bands in immunoblots was quantified by densitometry using Scion Image program for Windows 2000 (Scion Corporation, NIH, USA). MAP2 and tau densitometric values were normalized to those obtained using an antibody against all isoforms of α -tubulin (1 μ g/ml, Clone DM 1A, St. Louis, MO) [7], used as an internal control.

RNA Isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated from each region with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent (Gibco-BRL, Inc., NY) [5]. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde.

Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA as previously described [4]. Ten microliters of RT reaction were subjected to PCR in order to amplify a MAP2 gene fragment, and the other 10 μ l of the cDNA were used to simultaneously amplify a fragment of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene which was used as internal control. The sequences of the specific primers for MAP2 amplification fragment were 5'-[GGC TGG GTG GAA GGT CTG]-3' in the sense primer and 5'-[TGG TTT TAC GGG TTG GCT G]-3' in the antisense. These primers flanked the rat MAP2 cDNA sequence from +1982 to +2499 relative to the start site of translation [18].

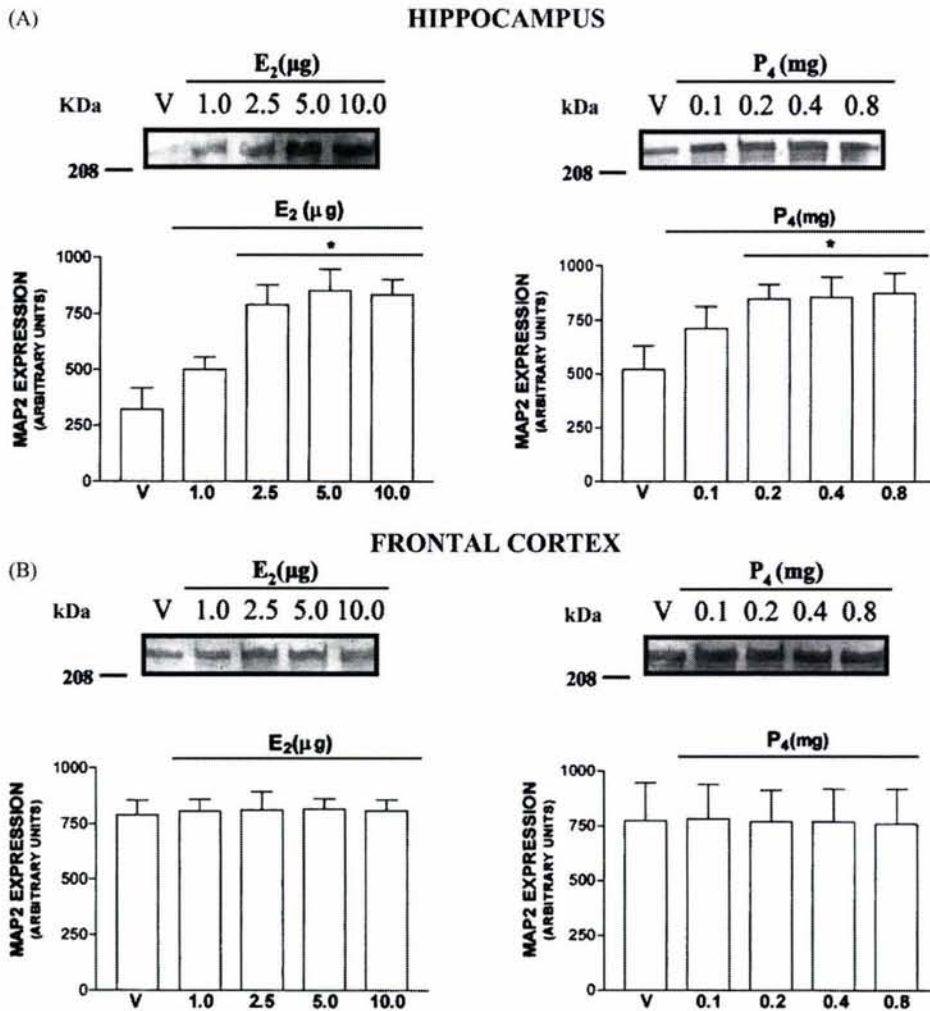


FIG. 1. MAP2 protein content in the hippocampus and the frontal cortex of the rat after different doses of E₂ and P₄. Representative Western blots of MAP2 from cytoplasmic protein fraction of (A) the hippocampus and (B) the frontal cortex of ovariectomized adult rats 24 h after the treatment with vehicle (V), E₂ at 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 μ g/100 g, and P₄ at 0.1, 0.2, 0.4, and 0.8 mg/100 g are shown. The histograms show the densitometric analysis of MAP2 protein of each treatment (mean \pm SEM) from three independent animals; (*) $p < 0.05$ compared with V.

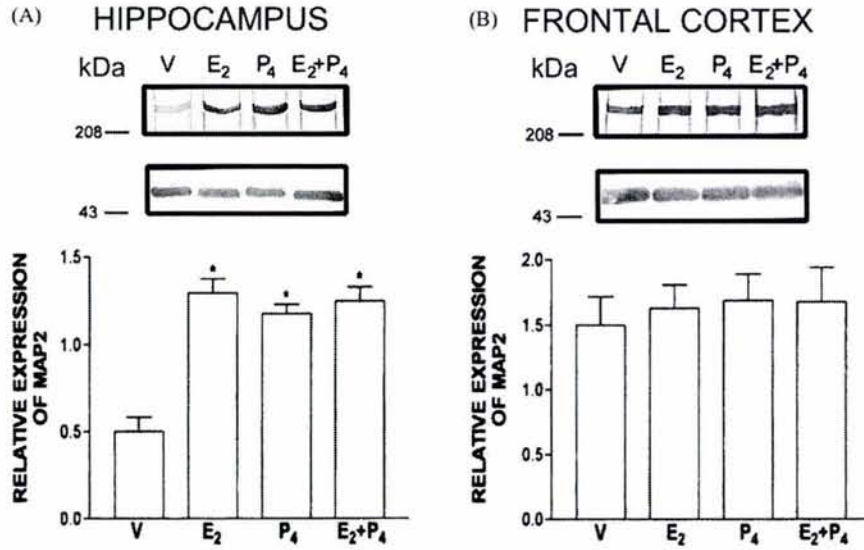


FIG. 2. MAP2 protein expression in the hippocampus and the frontal cortex of the rat after steroid hormone treatments. A representative Western blot of MAP2 and α -tubulin from cytoplasm protein fraction of (A) the hippocampus and (B) the frontal cortex of ovariectomized adult rats 24 h after the treatment with V, E₂, P₄, and E₂ + P₄ is shown. The histograms show the densitometric analysis of MAP2 protein relative expression in each treatment normalized with respect to α -tubulin content (mean \pm SEM) from five independent animals; (*) $p < 0.05$ compared with V.

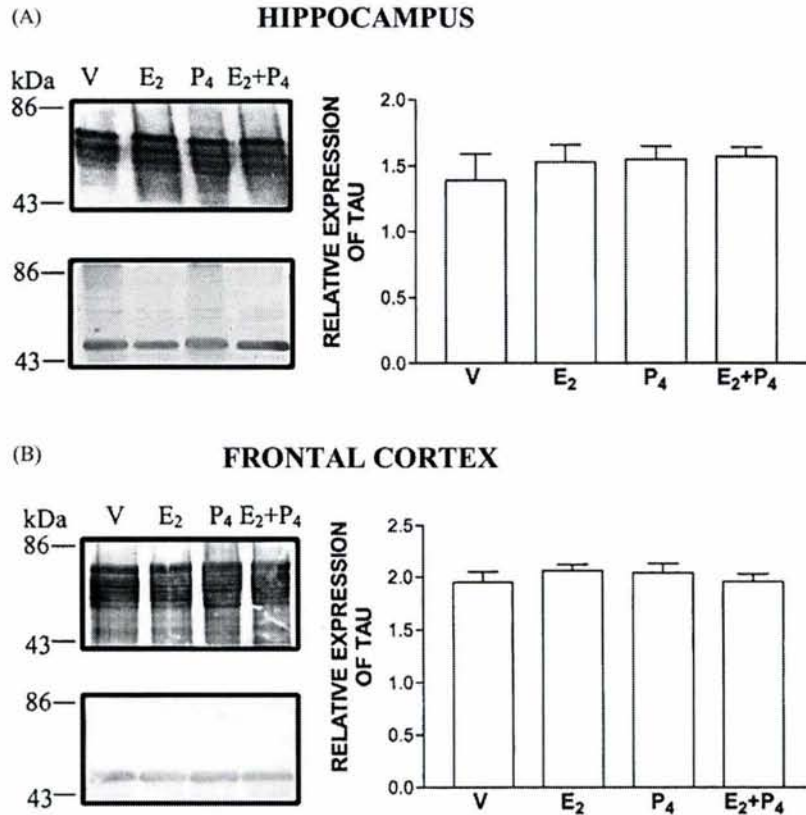


FIG. 3. Tau protein expression in the hippocampus and the frontal cortex of the rat after steroid hormone treatments. A representative Western blot of tau and α -tubulin from cytoplasm protein fraction of (A) the hippocampus and (B) the frontal cortex of ovariectomized adult rats treated as in Fig. 1. The histograms represent the normalized content of the highest molecular weight isoform of tau with respect to that of α -tubulin (mean \pm SEM) from five independent animals.

The primers used for GAPDH amplification were 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' in the sense and 5'-[CAA TGC CAG CCC CAG CA]-3' in the antisense. These primers flanked the rat GAPDH cDNA sequence from +517 to +969 relative to the start site of translation [32]. The 50 μ l PCR reaction included: 10 μ l of previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μ M of each primer, and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ). Negative controls without RNA and with nonretrotranscribed RNA were included in all the experiments. After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, the PCR reaction was performed for 25 cycles. The cycle profile for MAP2 and GAPDH genes amplification was: 95°C, 1 min; 62°C, 1 min; and 72°C, 1 min. A final extension cycle was performed at 72°C. The number of performed cycles, previously determined, was within the exponential phase of the amplification process. All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. A total of 25 μ l of PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The image was captured under a UV transilluminator with a Type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA). The intensity of MAP2 and GAPDH bands in RT-PCR was quantified by densitometry using Scion Image program for Windows 2000 (Scion Corporation, NIH, USA). MAP2 gene expression level was normalized to that of GAPDH.

Statistical Analysis

Data were analyzed by using a one-way ANOVA followed by a Student's *t* test. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values.

RESULTS

We assessed MAP2 and tau protein content as well as MAP2 gene expression in the hippocampus and the frontal cortex of ovariectomized rats treated with E₂ and P₄ by Western blot and RT-PCR.

The dose-response effects of steroids on MAP2 content in both hippocampus and frontal cortex are shown in Fig. 1. In vehicle-treated rats MAP2 content is low, and it was increased with different doses of E₂ and P₄. A significant increase (144, 165, and 159% over control) in MAP2 content was observed with the doses

of 2.5, 5.0, and 10.0 μ g/100 g of E₂ in the hippocampus (Fig. 1A). P₄ also induced a dose-dependent increase in MAP2 levels in the hippocampus that was 62, 64, and 67% over control after 0.2, 0.4, and 0.8 mg/100 g of P₄ (Fig. 1A). Interestingly, neither E₂ nor P₄ modify MAP2 content in the frontal cortex (Fig. 1B). The doses of E₂ and P₄ that elicited maximal effects on MAP2 levels were chosen to evaluate the effects of the combined treatment of these steroids. These results were normalized with respect to α -tubulin content (Fig. 2). The detected increase in MAP2 protein content in the hippocampus was 1.3, 1.18, and 1.25 in relative units after E₂, P₄, and E₂ + P₄ as compared with the vehicle-injected animals (0.5 relative units) (Fig. 2A). As it has been shown in Fig. 1, no significant changes in MAP2 protein content were observed in the frontal cortex after hormonal treatments (Fig. 2B). Tau content was not significantly modified by steroid treatments in either the hippocampus or the frontal cortex (Fig. 3).

To determine whether steroid-induced changes in MAP2 protein were associated with an increase in MAP2 gene expression, we performed a series of experiments to determine MAP2 mRNA content by RT-PCR. In these experiments single bands of 517 and 453 bp corresponding to the expected size fragments of MAP2 and GAPDH, respectively were obtained (Fig. 4). No bands were observed in the negative controls. The identity of each PCR product was previously confirmed by nucleotide sequencing (data not shown). Interestingly, MAP2 gene expression did not exhibit significant changes after 6, 12, (not shown) or 24 h of steroid treatments in any region (Fig. 4).

DISCUSSION

Our results demonstrate that E₂ and P₄ significantly increase MAP2 protein content in the rat hippocampus in ovariectomized rats at doses that regulate physiological processes in the brain [3,14]. Although MAP2 induction by E₂ has been previously observed in rat pituitary cells [20], this is the first evidence about the regulation of MAP2 content by steroid hormones in the adult rat brain. MAPs regulate microtubule lattice formation and dynamics; hence they determine neuronal shape and control the balance between rigidity and plasticity in neuronal processes. MAP2 can also bind to actin and modifies microfilament stability in dendritic spines [9].

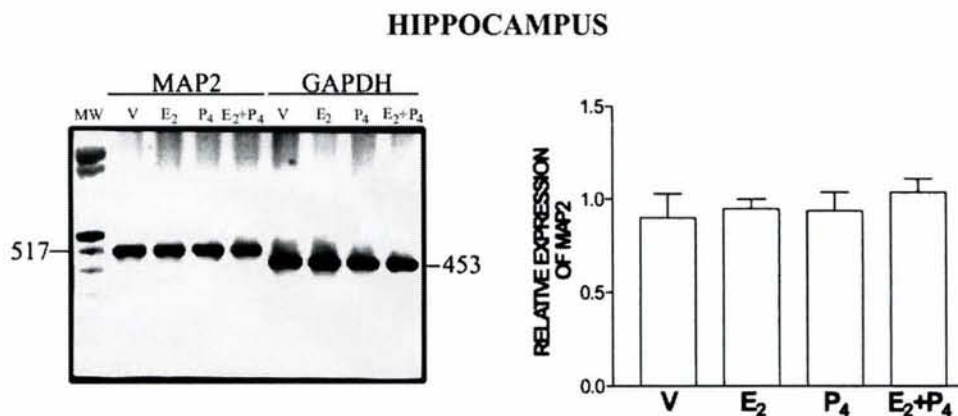


FIG. 4. MAP2 gene expression in the hippocampus of the rat after steroid hormone treatments. A representative assay of a simultaneous MAP2 and GAPDH RT-PCR from total RNA of the hippocampus of ovariectomized adult rats treated as in Fig. 1. Molecular weight marker of 100bp DNA ladder (MW) (left panel). The densitometric analysis of MAP2 gene expression is depicted in the right panel. MAP2 gene expression was corrected for that of GAPDH. Results are expressed as mean \pm SEM (*n* = 5).

The expression of tau, a protein preferentially located in axons, was not modified by steroid hormones either in the hippocampus or the frontal cortex. In accordance with our results it has been previously reported that E₂ does not modify tau phosphorylation status in rat cerebral extracts [27]. These results suggest that steroid hormones effects in cytoskeletal organization in hippocampal neurons mainly occur in dendrites where MAP2 regulate microtubule organization.

The increase in MAP2 content by E₂ and P₄ may contribute to the changes in dendritic spine density observed both on proestrus day and in hippocampal cell cultures after steroids treatment [26,36].

The increase in MAP2 protein content after steroid hormone treatments was observed in the hippocampus but not in the frontal cortex, suggesting that tissue-specific factors are involved in MAP2 regulation by steroids. In relation to this tissue-specific effect it has been shown that both E₂ and P₄ modify brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus but not in the frontal cortex [11].

The effects of steroid hormones in MAP2 protein levels could involve both genomic and nongenomic mechanisms. Several evidences indicate that hippocampal cells poorly express estrogen receptor isoforms (ER α and ER β). ER α is mainly located in hippocampal interneurons whereas ER β is more abundant in subfield CA1 of the hippocampus [22,30]. Both ER isoforms could participate in the spine dendritic formation during the estrous cycle.

It has been recently reported that ER α exhibits an extranuclear localization within dendritic spines on CA1 cells, suggesting that E₂ can also exert its effects in the hippocampus through nongenomic mechanisms [24].

The presence of both progesterone receptor (PR) isoforms (PR-A and PR-B) has also been demonstrated in the hippocampus and the frontal cortex of the rat [4,15]. PR-A gene expression is regulated by E₂ in the hippocampus of ovariectomized adult rats [4] but not in the hippocampus of knockout ER α mice [1]. Because PR expression is very low in the hippocampus of ovariectomized rats, it is possible that the effects of P₄ alone upon MAP2 are mediated through other mechanisms that do not involve classical PR.

Interestingly, it has been reported that steroids regulate microtubules organization in hippocampal cell cultures. Pregnenolone, a P₄ precursor, increases both the rate and the extent of MAP2-induced tubulin assembly, whereas P₄ counteracts these pregnenolone effects [25]. We did not observe significant changes in tubulin content after steroid treatments in any region. In accordance with this result, it has been observed that in hypothalamic cultures tubulin levels did not increase after a chronic E₂ treatment, whereas an increase in the amount of MAP2 bound to the microtubules was observed [7]. Thus, steroids can modify hippocampal morphology by increasing both polymerization of microtubules and MAP2 content. However, changes in dendrite morphology induced by steroid administration or during estrous cycle may be mechanistically related to the expression and stabilization of several proteins. In fact, dendritic spines elongation is dependent on protein synthesis [33], and it has been recently reported that E₂ induces the expression of peripherin, a cytoskeletal protein, in PC12 cell line [12]. Although in the present work we only focused on MAP2 protein due to its abundance and its stabilizing role in dendrites, we cannot rule out that other proteins are regulated by steroids in dendrites.

The increase in MAP2 protein content induced by E₂ and P₄ in the hippocampus was not accompanied with an increase in its mRNA content suggesting a posttranscriptional effect of these steroids. Interestingly, neither E₂ nor P₄ response elements have been found in MAP2 gene [17,18]. A possible effect on local MAP2 translation induced by steroids could contribute to the increase in

MAP2 protein. This posttranscriptional effect has been previously observed in the regulation of the *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor subunit, NR1, by E₂ in CA1 pyramidal cells [8].

However, at the moment it is not known whether the increase in MAP2 protein by E₂ and P₄ is due to a local increase in MAP2 protein synthesis or to a reduction in its degradation. MAP2 is a protein whose mRNA is present in dendrites, and evidence exists for a located increase in MAP2 after synaptic activation caused in part by local protein synthesis [31].

Ovarian steroids could also regulate cytoskeletal elements by an indirect mechanism probably mediated through excitatory amino acids receptors such as NMDA receptor which has been involved in cytoarchitectural changes observed during long-term potentiation and neurite outgrowth [6]. Supporting this notion it has been reported that E₂ increases the sensitivity of hippocampal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input and that the increase in dendritic spines produced by E₂ in ovariectomized adult rats is blocked by NMDA receptor antagonists [37].

The present results suggest that MAP2 changes should contribute to some of the effects of ovarian steroids in dendritic dynamics in the hippocampus.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conacyt (27512M) and PAIP (6190-07), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We also thank Flora García-Formentí from CELE, UNAM for the revision of the English manuscript.

REFERENCES

- Alves, S.; McEwen, B.; Hayashi, S. Estrogen-regulated progesterone receptors are found in the midbrain raphe but not hippocampus of estrogen receptor alpha (ER alpha) gene-disrupted mice. *J. Comp. Neurol.* 427:185-195; 2000.
- Arias, C.; Sharma, N.; Davies, P.; Shafit-Zagardo, B. Okadaic acid induce early changes in microtubule associated protein 2 and τ phosphorylation prior to the neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J. Neurochem.* 61:673-682; 1993.
- Camacho-Arroyo, I.; Pasapera, A. M.; Pérez-Palacios, G.; Cerbón, M. A. Progesterone and its metabolites in the functions of the central nervous system. *Rev. Invest. Clin.* 47:329-340; 1995.
- Camacho-Arroyo, I.; Guerra-Araiza, C.; Cerbón, M. A. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9:3993-3996; 1998.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159; 1987.
- Durand, G. M.; Kovalchuk, Y.; Konnerth, A. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381:71-75; 1996.
- Ferreira, A.; Caceres, A. Estrogen-enhanced neurite growth: Evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J. Neurosci.* 11:392-400; 1991.
- Gazzaley, A. H.; Siegel, S. J.; Kordower, J. H.; Mufson, E. J.; Morrison, J. H. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 16:6830-6838; 1996.
- Gavin, R. H. Microtubule-microfilament synergy in the cytoskeleton. *Int. Rev. Cytol.* 173:207-242; 1997.
- Geddes, J. W.; Monaghan, D. T.; Lott, I. T.; Kim, R. C.; Chui, H. C. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer disease. *Science* 230:1179-1181; 1985.
- Gibbs, R. B. Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res.* 844:20-27; 1999.
- Gollapudi, L.; Oblinger, M. Estrogen effects on neurite outgrowth and cytoskeletal gene expression in ER α -transfected PC12 cell lines. *Exp. Neurol.* 171:308-316; 2001.

13. González-Vidal, M. D.; Cervera-Gaviria, M.; Ruelas, R.; Escobar, A.; Morali, G.; Cervantes, M. Progesterone: Protective effects on the rat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch. Med. Res.* 29:117–124; 1998.
14. Gould, E.; Woolley, C.; Frankfurt, M.; McEwen, B. S. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J. Neurosci.* 10:1286–1291; 1990.
15. Guerra-Araiza, C.; Cerbón, M. A.; Morimoto, S.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci.* 66:1743–1752; 2000.
16. Herzog, W.; Weber, K. Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 92:1–8; 1978.
17. Kastner, P.; Krust, A.; Turcotte, B.; Stropp, U.; Tora, L.; Gronemeyer, H.; Chambon, P. Two distinct estrogen regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9:1603–1614; 1990.
18. Kindler, S.; Schwanke, B.; Schulz, B.; Garner, C. C. Complete cDNA sequence encoding rat high and low molecular weight MAP2. *Nucleic Acids Res.* 18:2822; 1990.
19. Langnaese, K.; Seidenbecher, C.; Wex, H.; Seidel, B.; Hartung, K.; Appeltauer, U.; Garner, A.; Voss, B.; Mueller, B.; Garner, C. C.; Gundelfinger, E. D. Protein components of a rat brain synaptic junctional protein preparation. *Mol. Brain Res.* 42:118–122; 1996.
20. Matsuno, A.; Takekoshi, S.; Sanno, N.; Utsunomiya, H.; Ohsugi, Y.; Saito, N.; Kanemitsu, H.; Tamura, A.; Nagashima, T.; Osamura, R. Y.; Watanabe, K. Modulation of protein kinases and microtubule-associated proteins and changes in ultrastructure in female rat pituitary cells: Effects of estrogen and bromocriptine. *J. Histochem. Cytochem.* 45:805–813; 1997.
21. Matus, A. Microtubule-associated proteins: Their potential role in determining neuronal morphology. *Annu. Rev. Neurosci.* 11:29–44; 1988.
22. McEwen, B.; Akama, K.; Alves, S.; Brake, W. G.; Bulloch, K.; Lee, S.; Li, C.; Yuen, G.; Milner, T. A. Tracking the estrogen receptor in neurons: Implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:7093–7100; 2001.
23. McEwen, B. Estrogens effects on the brain: Multiple sites and molecular mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 91:2785–2801; 2001.
24. Milner, T. A.; McEwen, B. S.; Hayashi, S.; Li, C. J.; Reagan, L. P.; Alves, S. E. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J. Comp. Neurol.* 429:355–371; 2001.
25. Murakami, K.; Fellous, A.; Balieu, E. E.; Robel, P. Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:3579–3584; 2000.
26. Murphy, D.; Segal, M. Progesterone prevents estradiol-induced dendritic spine formation in cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* 72:133–143; 2000.
27. Pappasozomenos, S. H. The heat shock-induced hyperphosphorylation of τ is estrogen-independent and prevented by androgens: Implications for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:6612–6617; 1997.
28. Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press; 1986.
29. Sánchez, C.; Díaz-Nido, J.; Avila, J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.* 61:133–168; 2000.
30. Shughrue, P. J.; Lane, M. V.; Merchenthaler, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388:507–525; 1997.
31. Steward, O.; Halpain, S. Lamina-specific synaptic activation causes domain-specific alterations in dendrites immunostaining for MAP2 and CAM kinase II. *J. Neurosci.* 19:7834–7845; 1999.
32. Tso, J. Y.; Sun, S. H.; Kao, T. H. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: Genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 13:2485–2502; 1985.
33. Vanderklish, P. W.; Edelman, G. M. Dendritic spines elongate after stimulation of group I metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:1639–1644; 2002.
34. Vongher, J. M.; Frye, C. A. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64:777–785; 1999.
35. Warren, S. G.; Humphreys, A. G.; Kuraska, J. M.; Greenough, W. T. LTP varies across the estrous cycle: Enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res.* 703:26–30; 1995.
36. Woolley, C. S.; McEwen, B. S. Roles of estradiol and progesterone regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J. Comp. Neurol.* 336:293–306; 1993.
37. Woolley, C. S.; McEwen, B. S. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an *N*-methyl-*D*-aspartate receptor-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 14:7680–7687; 1994.

Changes in the Content and Distribution of Microtubule Associated Protein 2 in the Hippocampus of the Rat during the Estrous Cycle

Andrea Reyna-Neyra,^{1,2} Clorinda Arias,² Patricia Ferrera,² Sumiko Morimoto,³ Ignacio Camacho-Arroyo¹

¹ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

² Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

³ Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición, 14000 México D.F., México

Received 18 September 2003; accepted 20 January 2004

ABSTRACT: The molecular mechanisms involved in the regulation of synaptic plasticity in the hippocampus during the estrous cycle of the rat are not completely understood. Because this process implicates changes in neuronal cytoskeleton organization, we analyzed the content of microtubule associated protein 2 (MAP2) and Tau in the hippocampus and the frontal cortex of the rat by Western blot, as well as the hippocampal distribution of MAP2 during the estrous cycle by immunohistochemistry. In the hippocampus the lowest content of MAP2 was found on diestrus day, and it significantly increased at proestrus. This increase was maintained on estrus and metestrus days. In the frontal cortex MAP2 content did not significantly change during the estrous cycle. In contrast, the

content of Tau did not vary during the estrous cycle in either the hippocampus or the frontal cortex. The immunohistochemical analysis showed an increase in dendrite thickness and in dendritic branching in the CA1 region on proestrus day, as well as an aggregation of MAP2 in apical dendrites near to pyramidal somata on this day in comparison with diestrus. We suggest that changes in the content and neuronal distribution of MAP2 are involved in the structural changes that occur in the hippocampus of the rat during the estrous cycle, and that these variations are related to changes in estradiol and progesterone levels.

© 2004 Wiley Periodicals, Inc. *J Neurobiol* 00: 000–000, 2004

Keywords: hippocampus; MAP2; estradiol; progesterone; synaptic plasticity

INTRODUCTION

Estradiol (E₂) and progesterone (P₄) modulate the morphology and function of dendrites in the adult

hippocampus of rats (Woolley et al., 1990; Gould et al., 1990; McEwen, 2001), and exert neuroprotective effects in this structure (Vongher and Frye, 1999; García-Segura et al., 2001; Green and Simpkins, 2000; Cervantes et al., 2002).

It has been reported that E₂ increases the density of dendritic spines and induces the formation of excitatory synapses in the rat hippocampus (Gould et al., 1990; Woolley and McEwen, 1993), thus modulating long-term potentiation (Warren et al., 1995; Durand et al., 1996). In CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus the dendritic spine density is 30% higher on proestrus day than on estrus day (Woolley et al., 1990); however,

Correspondence to: I. Camacho-Arroyo (igcamacho55@hotmail.com).

Contract grant sponsor: PAIP; contract grant number: 6190-07.

Contract grant sponsor: CONACyT; contract grant number: 27512M.

Contract grant sponsor: Facultad de Química.

Contract grant sponsor: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

© 2004 Wiley Periodicals, Inc.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/neu.20042

the molecular mechanisms involved in these changes are not completely understood.

In the neuronal cytoskeleton, the microtubules and their associated proteins (MAPs) play a key role in the development of axons and dendrites. In the adult brain MAP2a and MAP2b (280 and 270 kDa, respectively) are the most abundant MAPs in dendrites and they participate in dendritic outgrowth and branching, postlesion dendritic remodeling, and the establishment and maintenance of synaptogenesis (Johnson and Jope, 1992; Matus, 1988; Sánchez et al., 2000). Besides, MAP2 knockout mice exhibit a diminution in the length of dendrites in the hippocampus compared with those of wild-type mice (Harada et al., 2002). Tau protein (45–65 kDa), another class of MAP, is preferentially located in axons and it has been involved in the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease (Wood et al., 1986; Kosik et al., 1988).

E₂ has been reported to increase neurite production in hypothalamic and amygdala neurons *in vitro*, associated with an increase in MAP2 expression (Dueñas et al., 1996; Lorenzo et al., 1992). In hypothalamic neurons in culture, E₂ also increases Tau expression (Ferreira and Caceres, 1991). In the hippocampus the content of MAP2 but not that of Tau is increased after E₂ and P₄ treatments in ovariectomized rats (Reyna-Neyra et al., 2002).

The aim of this study was to evaluate MAP2 and Tau content and distribution in the hippocampus during the estrous cycle, which presents marked physiological variation in E₂ and P₄ levels.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty adult female Wistar rats (220–250 g) maintained under a 14:10 h light/dark cycle, lights on from 06:00 to 20:00, with food and water available *ad libitum*, which presented at least four regular 4 day estrous cycles, as determined by daily vaginal smears, were used. Twenty rats (five/each day) were killed at 12:00 h on each day of the estrous cycle, and the hippocampus (subiculum, Amon's horn, and dentate gyrus) and the frontal cortex were excised according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). All regions were immediately processed for protein extraction and electrophoresis.

Electrophoresis and Immunoblot

Heat-stable cytoplasm proteins were obtained according to the method of Herzog and Weber (1978). The total

amount of protein was determined by a Bio-Rad (Richmond, CA) analytical procedure. Five micrograms of protein from the hippocampus and the frontal cerebral cortex were loaded in a 5–10% gradient SDS-PAGE and subsequently transferred to nitrocellulose membrane. After 2 h incubation in PBS solution containing 5% albumin, blots were incubated with monoclonal antibodies against MAP2 (5 µg/mL, clone AP20; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and Tau (1 µg/mL Tau-1, clone PC1C6; Boehringer Mannheim) overnight at 4°C. Blots were then washed three times with PBS (5 min each), incubated with an antimouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz, CA), and detected by chemiluminescence. Negative controls consisted of eliminating the primary antibody from the procedure. The intensity of MAP2 and Tau bands in immunoblots was quantified by densitometry using Scion Image program for Windows 2000 (Scion Corporation, NIH, USA). MAP2 and Tau densitometric values were normalized to those obtained using an antibody against all isoforms of α -tubulin (1 µg/mL; Clone DM 1A, St. Louis, MO; Ferreira and Caceres, 1991), used as an internal control.

Immunohistochemistry

Twenty rats that presented at least four regular 4 day estrous cycles, as determined by daily vaginal smears, were used. The brains from these animals were processed for the immunohistochemical analysis as indicated below.

Rats were anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 0.9% saline followed by fixative (10% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). Brains were removed and left in fixative for 24 h. They were transferred successively to 20 and 30% sucrose (24 h each). Coronal sections (40 µm) were cut in a cryostat and processed by immunohistochemistry.

Free-floating sections were incubated at room temperature for 30 min in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.25% Triton X-100 and 0.3% H₂O₂. Then, sections were left overnight at 4°C in 5% albumin-PBS. Sections were incubated with 5% albumin-PBS solution containing the MAP2 primary monoclonal antibody (3 µg/mL, clone AP20; Boehringer Mannheim) for 24 h at 4°C. Sections were washed twice with PBS (5 min each) and incubated with the secondary antibody antimouse IgG (1:500) and the ABC-biotin-avidin-peroxidase kit (Vector, Burlingame, CA). Peroxidase activity was revealed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride as substrate. Negative controls consisted of eliminating the primary antibody for the procedure. Sections were observed using a Nikon Eclipse E600 microscope (Melville, NY).

Radioimmunoassay for E₂ and P₄

Serum E₂ and P₄ concentrations were measured by radioimmunoassay as previously described (Camacho-Arroyo et

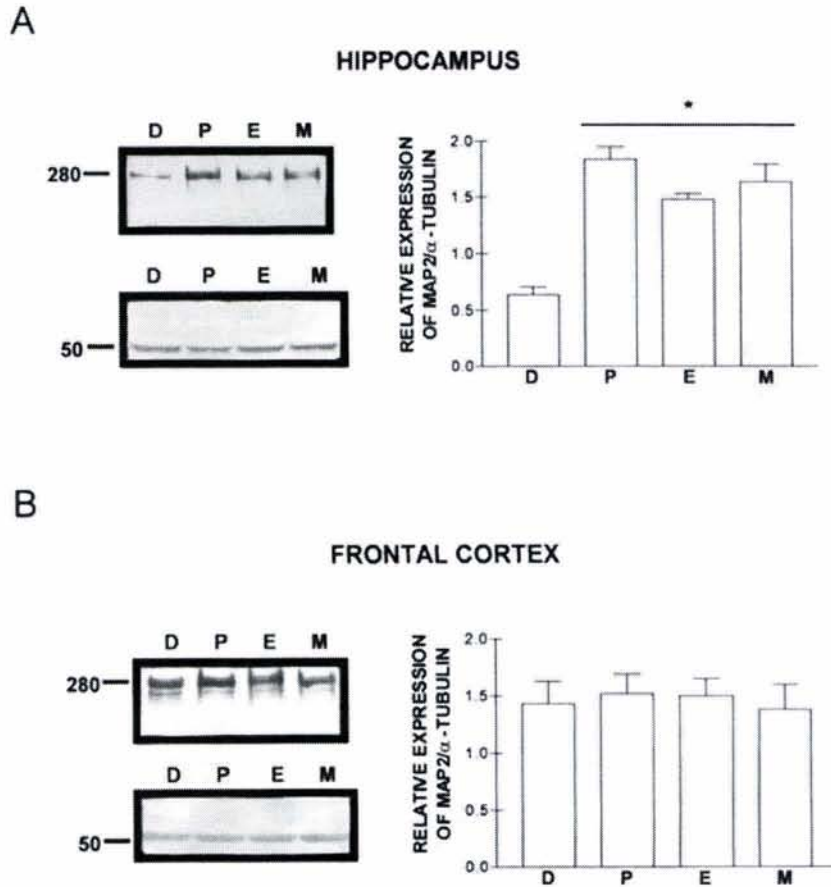


Figure 1 MAP2 protein expression in the hippocampus and the frontal cortex of the rat during the estrous cycle. A representative Western blot of MAP2 from heat-stable cytoplasm protein fraction of the hippocampus (A) and the frontal cortex (B) during the estrous cycle is shown (left panel). Diestrus (D), proestrus (P), estrus (E), and metestrus (M). The histograms (right panel) show the densitometric analysis of MAP2 protein expression in each phase of the estrous cycle. MAP2 protein content was corrected for that of α -tubulin (mean \pm SEM) from five independent animals. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test was performed. * $p < 0.05$ compared with (D).

al., 1998b), using the solid-phase ^{125}I technique with the Coat-A-Count kit (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA), following the method described by the manufacturer. Sensitivity for E_2 and P_4 with this method was 5.0 pg/mL and 0.02 ng/mL, respectively. The intra- and inter-assay coefficients of variations were 5.3 and 8% for E_2 and 6.5 and 10% for P_4 , respectively.

Statistical Analysis

Data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test. The Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values.

RESULTS

MAP2 and Tau Content in the Hippocampus and the Frontal Cortex

We assessed MAP2 and Tau protein content in the hippocampus and the frontal cortex during the estrous cycle of the rat by Western blot. In all immunoblots a single band (280 kDa) corresponding to MAP2 was observed during the estrous cycle.

In the hippocampus the lowest content of MAP2 was found on diestrus day (0.6 relative units) and it significantly increased at proestrus (1.7 relative units). This increase was maintained on estrus (1.3 relative units) and metestrus days (1.4 relative units) [Fig. 1(A)]. In the frontal cortex, no significant changes in

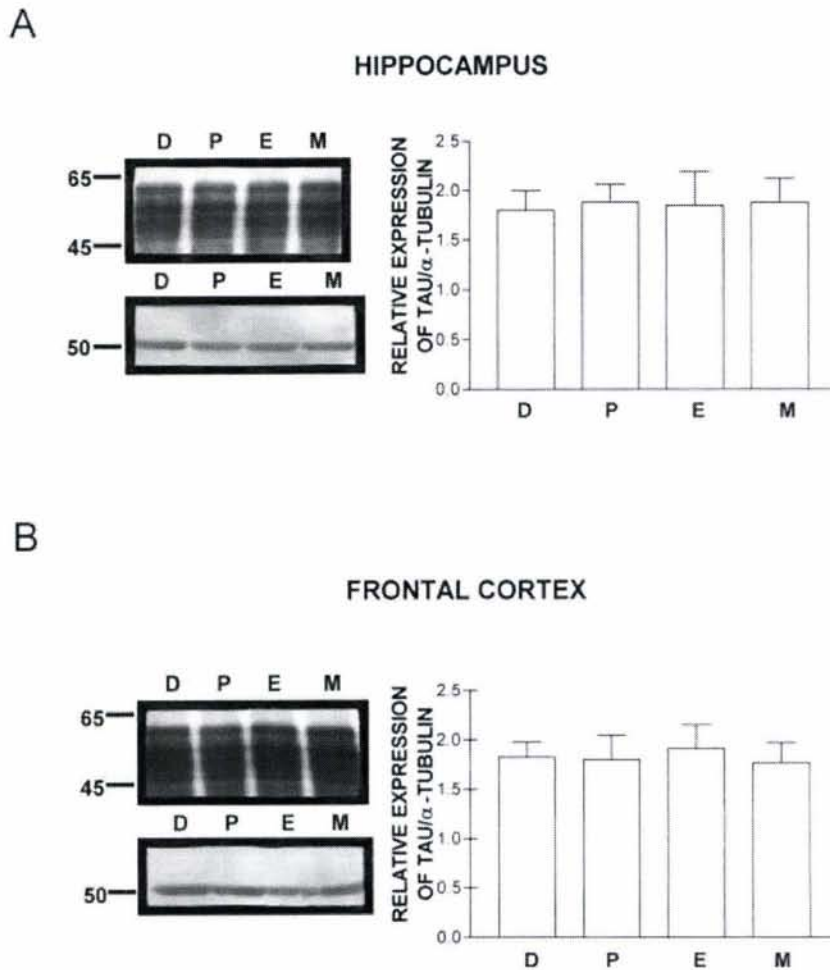


Figure 2 Tau protein expression in the hippocampus and the frontal cortex of the rat during the estrous cycle. A representative Western blot of tau from heat-stable cytoplasm protein fraction of the hippocampus (A) and the frontal cortex (B) during the estrous cycle is shown (left panel). Diestrus (D), proestrus (P), estrus (E), and metaestrus (M). The histograms (right panel) show the densitometric analysis of tau protein expression in each phase of the estrous cycle. Tau protein content was corrected for that of α -tubulin (mean \pm SEM) from five independent animals.

MAP2 protein content were observed during the estrous cycle [Fig. 1(B)]. Tau protein content did not significantly change during the estrous cycle in either the hippocampus or the frontal cortex (Fig. 2).

MAP2 Distribution in the CA1 Hippocampal Region

In female rats on diestrus and proestrus days, MAP2 immunoreactivity was observed in the dendritic fields of all hippocampal regions, mainly in the apical dendrites of the CA1 pyramidal neurons in the stratum radiatum and their branches in the stratum moleculare (Fig. 3).

On diestrus day, when E_2 and P_4 levels were the

lowest (Table 1), MAP2 was mostly located in the dendritic field of the stratum radiatum where dendrites were straight and parallel, and practically absent in apical dendrites near to pyramidal neuronal somata in the CA1 region [Fig. 3(A–C)]. Notable changes in MAP2 immunostaining were observed in the CA1 field on proestrus, when E_2 levels were the highest (Table 1). On this day the dendrites were thicker and beaded along the stratum radiatum of the CA1 region as well as with a more intense MAP2 immunostaining as compared with diestrus (Fig. 3). Interestingly, some apical dendrites near neuronal pyramidal somata showed MAP2 aggregation (Fig. 3). In negative controls no MAP2 immunostaining was observed (data not shown).

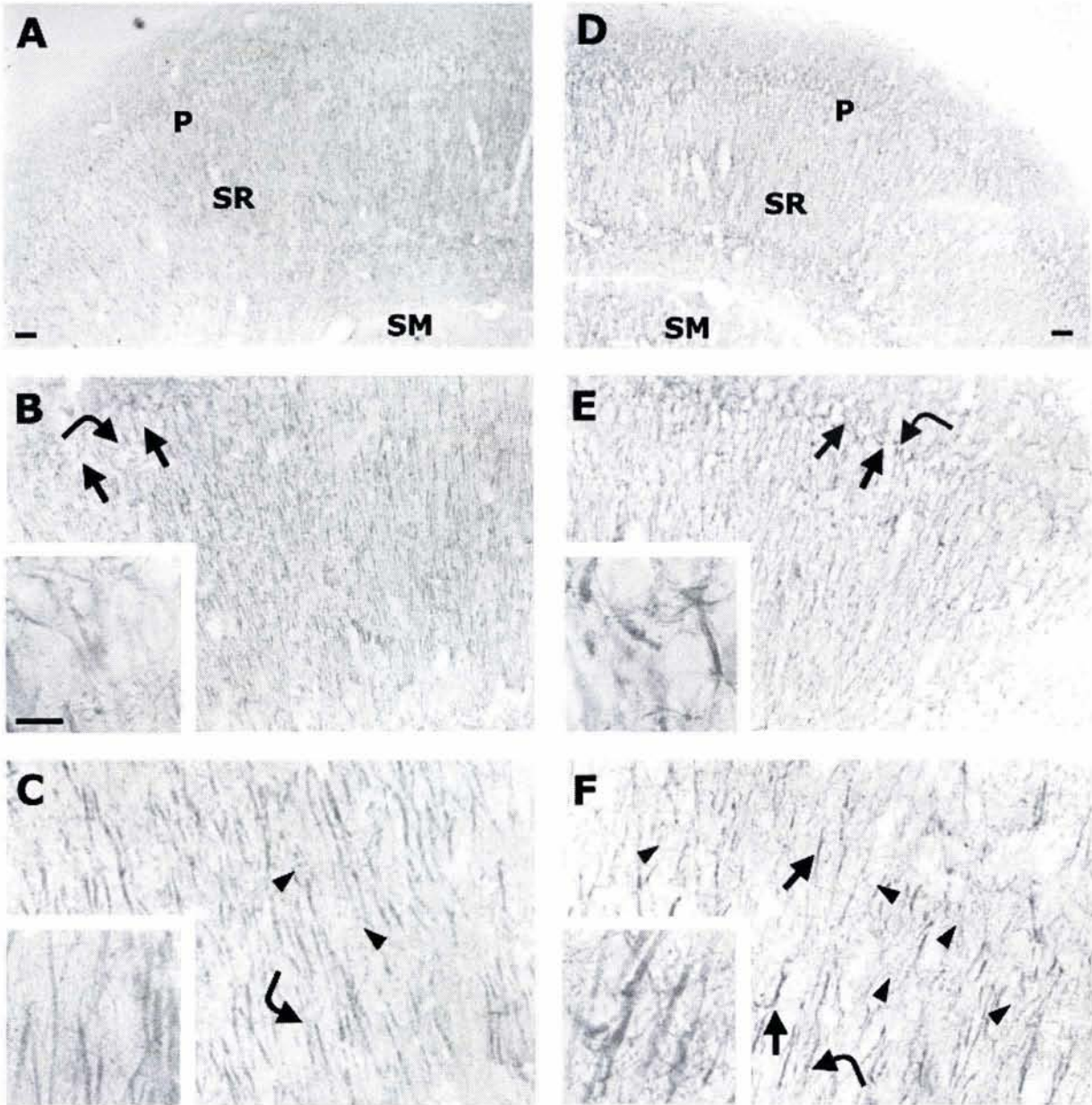


Figure 3 MAP2 distribution in hippocampal CA1 region on diestrus and proestrus days. An increase in MAP2 immunostaining is observed on proestrus day (D–F) as compared with diestrus (A–C). Note the lack of MAP2 near neuronal somata on diestrus day [arrows and curved arrow in (B)], in contrast with the aggregation of this protein in apical dendrites near neuronal somata on proestrus day [arrows and curved arrow in (E)]. This detail is shown in inserts (1000X) in (B) and (E). At a higher magnification (400X) dendrites appear beaded [arrows in (F)] and with a more intense staining on proestrus day. A pattern of thin and abundant dendrite branching is observed [arrowheads and curved arrow in (F)] on proestrus day compared with diestrus day (C). A higher magnification (1000X) of this pattern is shown in the inserts in (C) and (F). Scale bars = 100 μm (A,D) and 10 μm in inserts. P, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SM, stratum lacunosum-moleculare. Each micrograph is representative of five independent animals.

Table 1 Estradiol and Progesterone Levels during the Estrous Cycle

	Estradiol (pg/mL)	Progesterone (ng/mL)
Diestrus	12.95 ± 1.80	4.84 ± 1.10
Proestrus	57.03 ± 6.38*	7.50 ± 0.80
Estrus	15.23 ± 2.61	6.49 ± 3.38
Metestrus	14.34 ± 2.95	14.58 ± 2.40*

Data are presented as mean ± SEM of five animals/group.

* $p < 0.05$ as compared to the other days of the cycle.

DISCUSSION

Our results demonstrate that MAP2 protein content varies in the hippocampus of the rat during the estrous cycle, accompanied with changes in the pattern of dendritic branching in CA1 neurons. MAP2 has been implicated in the outgrowth and the establishment of neuronal polarity because it regulates microtubule lattice formation and dynamics; hence it determines neuronal shape, controls the balance between rigidity and plasticity in neuronal processes, and participates in dendrite branching (Sánchez et al., 2000). In the CA1 region of the hippocampus of MAP2-deficient mice, apical dendrites were shorter than those of wild-type animals (Harada et al., 2002).

Although changes in dendritic spines in the hippocampus during estrus cycle have been extensively studied (Good et al., 1999; Woolley et al., 1990; Warren et al., 1995), in this work we demonstrated that an increase in dendrite thickness and a dendritic branching occurs in the CA1 region of the hippocampus at proestrus.

It has been reported that MAP2 seems to be preferentially located at the shaft of dendrites, where MAP2 may have the capacity to regulate morphological plasticity at a slow rate, compared with rapid morphological changes regulated by actin in dendritic spines *in vitro* (Kaech et al., 2001). Thus, MAP2 could regulate the morphological changes observed in hippocampal dendrites during the estrous cycle in a period of 24 h (diestrus to proestrus).

It has been reported that E₂ induces neurite production in hypothalamic and amygdala neurons in culture, and that this effect is associated with an increase in MAP2 expression (Dueñas et al., 1996; Lorenzo et al., 1992). In rodent models of hippocampal deafferentation that occurs in Alzheimer's disease, dendritic outgrowth is enhanced by E₂ in ovariectomized rats (Stone et al., 2000; Rosovsky et al., 2002). We provide evidence that dendritic branching occurs

in the rat hippocampus on proestrus day when the levels of E₂ are the highest. The increase in dendrite branching and thickness correlates with the increase in the content of MAP2 protein detected by Western blot.

Recently, we have demonstrated that E₂ and P₄ significantly increase MAP2 protein content in the rat hippocampus in ovariectomized rats at doses that regulate synaptic plasticity in the hippocampus (Reyna-Neyra et al., 2002). The increase in MAP2 expression observed during proestrus day is maintained during estrus and metestrus probably due to a long-term effect (24–48 h) of E₂ and P₄ that present a significant increase during proestrus. However, the density of dendritic spines diminishes on estrus after its increase on proestrus, suggesting that other proteins, apart from MAP2, participate in the dynamic of dendritic spines in the hippocampus during the estrous cycle. The distribution pattern of MAP2 immunoreactivity in the hippocampus on diestrus day was similar to that previously reported in ovariectomized rats (Gazzaley et al., 1996).

Changes in MAP2 protein content were observed in the hippocampus but not in the frontal cortex during the estrous cycle, suggesting that tissue-specific factors are involved in MAP2 regulation by steroids. In line with this suggestion, the treatments with E₂ and P₄ at doses that produce similar physiological serum levels to those of proestrus day increase serotonin receptor mRNA expression in the hippocampus but not in the frontal cortex (Birzniece et al., 2002).

Ovarian steroids could regulate cytoskeletal elements by a direct mechanism through the interaction with their receptors that have been located in the hippocampus (Shugrue et al., 1997; Milner et al., 2001; Camacho-Arroyo et al., 1998a; Guerra-Araiza et al., 2000). In hypothalamic cultures it has been demonstrated by Dueñas et al. (1996) that the estrogen receptor antagonist ICI 182780 diminishes the number of MAP2 immunoreactive neurons and the extension of immunoreactive neuronal processes. An indirect mechanism probably mediated by excitatory amino acid receptors, such as NMDA receptor, which has been involved in cytoarchitectural changes observed during long-term potentiation and neurite outgrowth (Durand et al., 1996), could be involved in the regulation of cytoskeleton proteins. The highest degree of potentiation related with learning and spatial memory has been reported on proestrus day (Warren et al., 1995).

In contrast with MAP2, the content of Tau, a protein preferentially located in axons, did not vary during the estrous cycle in either the hippocampus or

the frontal cortex. These results are in line with recently published data (Reyna-Neyra et al., 2002), where it was demonstrated that E₂ and P₄ administered to ovariectomized rats did not modify Tau content. On the contrary, Ferreira and Caceres (1991) have shown that E₂ increases Tau protein levels in hypothalamic neurons *in vitro*. These differences could be due to the presence of tissue-specific factors involved in the regulation of Tau. In fact, in hypothalamic cultures only one Tau isoform, which migrates in a position similar to that of the 58 kDa isoform, was detected, whereas we found all Tau isoforms in the hippocampus. The present results suggest that MAP2 contributes to some of the effects of ovarian steroids observed in dendritic dynamics in the hippocampus during the estrous cycle.

We thank Flora García-Formentí from CELE, UNAM for the revision of the English manuscript and Suemy Escobedo for assistance with the photographs.

REFERENCES

- Birzniece V, Johansson IM, Wang MD, Backstrom T, Olsson T. 2002. Ovarian hormone effects on 5-hydroxytryptamine (2A) and 5-hydroxytryptamine (2C) receptor mRNA expression in the ventral hippocampus and frontal cortex of female rats. *Neurosci Lett* 319:157–161.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA. 1998a. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *NeuroReport* 9:3993–3996.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Domínguez R, Mendoza-Rodríguez AC, Cruz EM, Cerbón MA. 1998b. C-fos expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during proestrus. *Life Sci* 62:1153–1159.
- Cervantes M, González-Vidal MD, Ruelas R, Escobar A, Morali G. 2002. Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res* 33:6–14.
- Dueñas M, Torres-Aleman I, Naftolin F, García-Segura LM. 1996. Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation. *Neurosci* 74:531–539.
- Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A. 1996. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381:71–75.
- Ferreira A, Caceres A. 1991. Estrogen-enhanced neurite growth: Evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J Neurosci* 11:392–400.
- García-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63:29–60.
- Gazzaley H, Siegel SJ, Kordower JH, Mufson EJ, Morrison JH. 1996. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in rat hippocampus. *J Neurosci* 16:6830–6838.
- Good M, Day M, Muir JL. 1999. Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci* 11:4476–4480.
- Gould E, Woolley C, Frankfurt M, McEwen BS. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10:1286–1291.
- Green PS, Simpkins JW. 2000. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci* 18:347–358.
- Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. 2000. Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci* 66:1743–1752.
- Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N. 2002. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* 158:541–549.
- Herzog W, Weber K. 1978. Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization *in vitro*. *Eur J Biochem* 92:1–8.
- Johnson GV, Jope RS. 1992. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J Neurosci Res* 33:505–512.
- Kaech S, Parmar H, Roelandse M, Bornmann C, Matus A. 2001. Cytoskeletal microdifferentiation: A mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7086–7092.
- Kosik K, Orecchio LD, Binder LI, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Lee G. 1988. Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron* 1:817–825.
- Lorenzo A, Diaz H, Carrer H, Caceres A. 1992. Amygdala neurons *in vitro*: neurite growth and effects of estradiol. *J Neurosci Res* 33:418–435.
- Matus A. 1988. Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci* 11:29–44.
- McEwen BS. 2001. Estrogens effects on the brain: multiples sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91:2785–2801.
- Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP, Alves SE. 2001. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol* 429:355–371.
- Paxinos G, Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press. p 81–89.
- Reyna-Neyra A, Camacho-Arroyo I, Ferrera P, Arias C. 2002. Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein content in the rat hippocampus. *Brain Res Bull* 58:607–612.
- Rozovsky I, Wei M, Stone DJ, Zanjani H, Anderson CP,

- Morgan TE, Finch CE. 2002. Estradiol (E_2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. *Endocrinology* 143:636–646.
- Sánchez C, Díaz-Nido J, Avila J. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61:133–168.
- Shugrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507–525.
- Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Lopez LM, Shick J, Finch CE. 2000. Effect of age on gene expression during estrogen-induced synaptic sprouting in the female rat. *Exp Neurol* 165:46–57.
- Vongher JM, Frye CA. 1999. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav* 64:777–785.
- Warren SG, Humphreys AG, Kuraska JM, Greenough WT. 1995. LTP varies across the estrous cycle: Enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res* 703:26–30.
- Wood JG, Mirra S, Pollock NJ, Binder LI. 1986. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4040–4043.
- Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS. 1990. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 10:4035–4039.
- Woolley CS, McEwen BS. 1993. Roles of estradiol and progesterone regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol* 336:293–306.