



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS HEMBRAS EXPUESTAS A ESTRÉS CRÓNICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**IBT. DANIEL EDUARDO MUÑOZ MAYORGA**

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

Juriquilla, Querétaro a 16 de julio de 2020.



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 fue realizada en el Laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla bajo la supervisión de la Dra. María Teresa Morales Guzmán y fungiendo como Comité Tutor la Dra. Ana Clorinda Arias Álvarez y el Dr. Ataúlfo Martínez Torres. El autor recibió la beca de posgrado CONACyT con número de CVU/Recipiente: 662482/574065 y fue acreedor del Programa de Becas Mixtas de CONACyT y el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para realizar estancia de investigación en la University of California San Diego (UCSD) en el laboratorio del Dr. Robert A. Rissman (School of Medicine) y congresos internacionales (Alzheimer's Association International Conference 2017 y Society for Neuroscience Meeting 2018). Este trabajo de tesis contó con el apoyo financiero de los donativos de UNAM-DGAPA-PAPIIT IN204718 y CONACyT A1S8948.

Se agradece el apoyo técnico del personal del INB y UCSD :

Biol. María Eugenia Ramos Aguilar

Biol. Floyd Sarzosa

Dra. Alejandra Castilla León

M. en C. Leonor Casanova Rico

Dra. Deysi Gasca

## **Agradecimientos**

**Dra. María Teresa Morales Guzmán**

**Dr. Robert A. Rissman**

Dra. Ana Clorinda Arias Álvarez

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

A los miembros del laboratorio D-05 pasados y presentes. Especialmente a la Biol. María Eugenia Ramos Aguilar por el apoyo técnico con todos los diferentes experimentos. Al M. en C. César Solís por la ayuda a estandarizar la técnica de Western blot y conversaciones que enriquecieron el trabajo. A la Dra. Ilektra Anagnostou y el M. en C. Julio Daniel Reyes Mendoza por las conversaciones que enriquecieron el trabajo, revisar mis manuscritos para publicación, ayuda con análisis estadístico y diferentes experimentos. A todos los antes mencionados por su amistad y confianza. A todos los que directa o indirectamente participaron en la realización de esta tesis.

<b>i. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>ii. Abstract</b>	<b>2</b>
<b>1. Antecedentes</b>	<b>3</b>
1.1. Proteína tau	3
1.1.1. Función fisiológica de la proteína tau	3
1.1.2. Regulación de la fosforilación de tau	5
1.1.3. Tau y plasticidad neuronal	6
1.1.4. Patología de tau	7
1.1.5. Taupatías	9
1. 2. Hipocampo	11
1. 2 .1. Anatomía básica del hipocampo	11
1.2.2. Funciones asociadas con el hipocampo	17
1. 3 Estrés	18
1. 3. 1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y la respuesta al estrés	18
1.3.2. Hipocampo en estrés y envejecimiento	21
1.3.2 Estrés y la Enfermedad de Alzheimer	22
1.4 Fosforilación de tau en el hipocampo de la rata hembra, estrés y lactancia	24
1. 4. 1. Estrés y fosforilación de tau en el cerebro femenino	24
1.4.2. Estrés durante el periodo de lactancia y fosforilación de tau	26
<b>2. Justificación</b>	<b>29</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>30</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>30</b>
<b>5. Diseño experimental</b>	<b>31</b>
<b>6. Materiales y métodos</b>	<b>32</b>
6.1 Animales	32
6.2 Paradigma de estrés crónico	32
6.3 Western blot	33
6.3.1 Niveles de fosforilación general	33
6.3.2 Niveles de fosforilación en diferentes fracciones solubles	34
6.4 Anticuerpos	34
6.5 Perfusión y obtención de cortes	35

6.6 Inmunohistoquímica	35
6.7 Procesamiento de imágenes	36
6.8 Análisis morfológico	36
6.9 Determinación de la fase del ciclo estral	36
6.10 Análisis estadístico	37
<b>7. Resultados</b>	<b>38</b>
7.1 Niveles generales de fosforilación de tau a los 20 minutos y 24 horas después del último episodio de estrés	38
7.2. Efecto del estrés crónico en la fosforilación de tau en diferentes fracciones solubles	39
7.2.1. Efecto del estrés crónico 20 minutos después del último episodio de estrés	39
7.2.2. Efecto del estrés crónico 24 horas después del último episodio de estrés	41
7.3.- Efecto de la condición reproductiva y el estrés crónico en la cinasa GSK3	43
7.4. Localización y cuantificación de la fosforilación de tau en el hipocampo de ratas hembra expuestas a estrés crónico	49
7.4.1. Validación de anticuerpos PHF-1 y S422 en tejido de ratón triple transgénico	49
7.4.2. Localización de tau fosforilada usando el anticuerpo S422	52
7.4.3. Localización y cuantificación de tau fosforilada 20 minutos después del último episodio de estrés	55
7.4.4. Localización y cuantificación de tau fosforilada 24 horas después del último episodio de estrés.	57
7.5 Las ratas post-maternales son más sensibles a la interrupción del ciclo estral que las ratas vírgenes	59
<b>8. Discusión</b>	<b>60</b>
<b>9. Conclusión</b>	<b>66</b>
<b>10. Referencias</b>	<b>67</b>
<b>11. Publicaciones</b>	<b>76</b>

## **i. Resumen**

El sexo y la exposición a estrés crónico se han identificado como factores de riesgo para desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA). Aunque se ha demostrado que la EA es más frecuente en las mujeres, el sexo a menudo se pasa por alto en estudios, probablemente debido a la complejidad del estado hormonal. En ratas hembras, el estado reproductivo puede modular el conocido aumento de la fosforilación de tau (tau-P) causado por la exposición a estresores físicos y psicológicos agudos. Para probar la hipótesis de que el estado reproductivo puede afectar la tau-P del hipocampo inducida por el estrés crónico, grupos de ratas vírgenes, lactantes (4-5 días pp) y 1 con un mes después del destete (post-maternales) fueron sometidas a un episodio diario de estrés de restricción de movimiento por 30 minutos durante 14 días y se sacrificaron 20 min o 24 h después de su último episodio de estrés / manipulación. El análisis de Western blot de dos epítomos de tau-P bien caracterizados en la EA (AT8 y PHF-1) y el análisis de mecanismos de fosforilación (p. Ej. GSK3 $\beta$ ) mostraron que las ratas posmaternales estresadas aumentan la tau-P en comparación con las ratas lactantes estresadas 20 minutos después de su último episodio de estrés. Además, también se observó un aumento de tau-P 24 h después del último episodio de estrés en ratas posmaternales estresadas en comparación con sus controles no estresados en la fracción soluble en detergente. El análisis de GSK3 mostró un aumento en los niveles totales de GSK3 $\beta$  en ratas vírgenes y un aumento de los niveles inactivos de GSK3 $\beta$  en ratas post-maternales, lo que sugiere una respuesta de estrés diferente de tau-P después de que la rata ha pasado por la experiencia maternal. Curiosamente, las ratas post-maternales también presentaron una mayor variabilidad en sus ciclos estrales en respuesta al protocolo de estrés. Además de no haber diferencias en tau-P, las ratas lactantes no estresadas mostraron un aumento en GSK3 $\beta$  inactivo 24 h después del último episodio de manipulación. La detección inmunohistoquímica del epítopo PHF-1 reveló un aumento significativo de tau-P en el subcampo CA4 / hilar del hipocampo de ratas vírgenes y post-maternales expuestas a estrés crónico poco después de su último episodio de estrés. En general, las ratas lactantes no respondieron al estrés crónico de restricción. Estos resultados sugieren una mayor sensibilidad de las ratas vírgenes y post-maternales a la tau-P hipocampal inducida por el estrés crónico de restricción en comparación con las ratas lactantes. Debido a que no se encontraron diferencias en las ratas lactantes y se observó una respuesta exagerada en las ratas post-maternales, los resultados actuales apoyan la hipótesis de que la lactancia afecta el procesamiento de tau en el cerebro de la hembra.

## ii. Abstract

Sex and exposure to chronic stress have been identified as risk factors for developing Alzheimer's disease (AD). Although AD has been demonstrated to be more prevalent in females, sex is often overlooked in research studies, likely due to the complexity of the hormonal status. In female rats, the reproductive status can modulate the well-known increase in tau phosphorylation (pTau) caused by the exposure to acute physical and psychological stressors. To test the hypothesis that reproductive status can impact hippocampal pTau induced by chronic stress, cohorts of virgin, lactating (4-5 days pp), and 1-month post-weaned rats were subjected to a daily 30-minute episode of restraint stress for 14 days and were sacrificed either 20 min or 24 h after their last stress/handling episode. Western blot analysis of two well-characterized AD-relevant pTau epitopes (AT8 and PHF-1) and upstream pTau mechanisms (e.g. GSK3 $\beta$ ) analysis, showed that stressed post-maternal rats have increased pTau in comparison to stressed lactating rats 20 min after their last stress episode. Furthermore, an increase in pTau was also seen 24 h after the last stress episode in stressed post-maternal rats in comparison to their non-stressed controls in the detergent soluble fraction. GSK3 analysis showed an increase in total levels of GSK3 $\beta$  in virgin rats and an increase of inactive levels of GSK3 $\beta$  in post-maternal rats, which suggests a different stress response in pTau after the rat has gone through the maternal experience. Interestingly, post-maternal rats also presented the more variability in their estrous cycles in response to stress. Besides no differences in pTau, non-stressed lactating rats showed an increase in inactive GSK3 $\beta$  24 h after the last handling episode. Immunohistochemical detection of the PHF-1 epitope revealed increased pTau in the CA4/hilar subfield of the hippocampus of virgin and post-maternal rats exposed to chronic stress shortly after their last stress episode. Overall, lactating rats remained unresponsive to chronic restraint stress. These results suggest increased sensitivity of the virgin and post-maternal rats to hippocampal stress-induced pTau with chronic restraint stress compared to lactating rats. Because no differences were detected in response to stress by lactating rats and an exaggerated response was observed in post-maternal rats, current results support the hypothesis that lactation affects tau processing in the brain of the female.

## 1. Antecedentes

### 1.1. Proteína tau

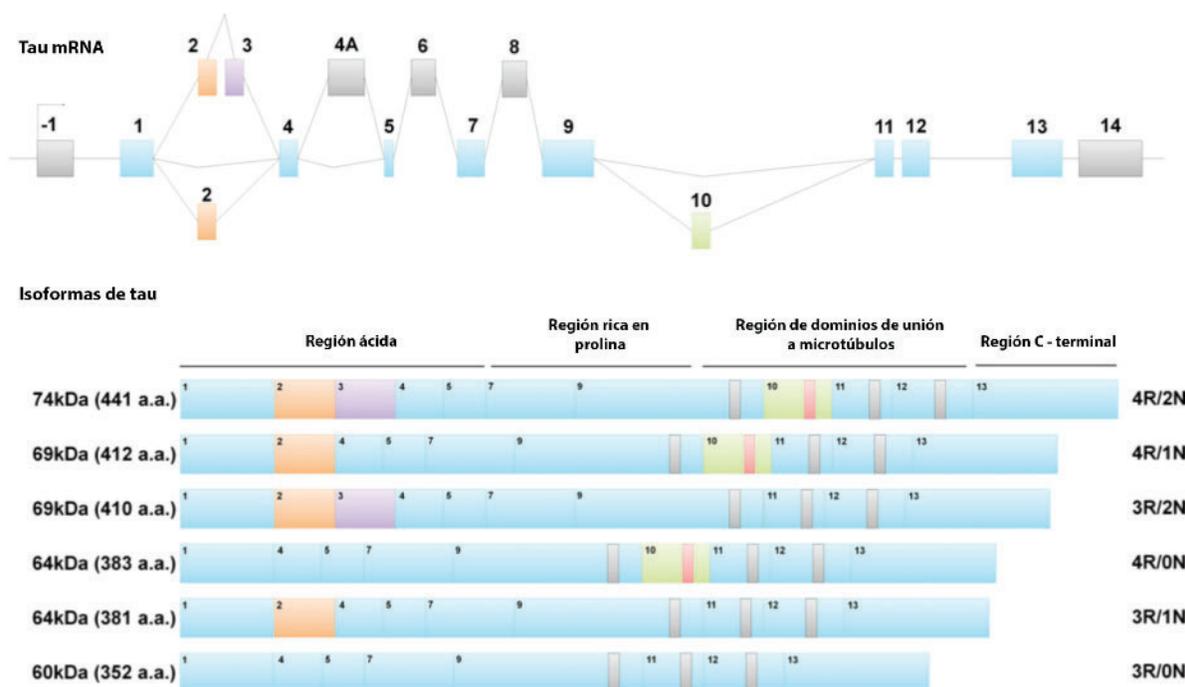
#### 1.1.1. Función fisiológica de la proteína tau

La proteína tau, se describe por primera vez en 1975 (Weingarten et. al., 1975), como una proteína que participa en la formación de microtúbulos por medio de su asociación con dímeros de tubulina a los que posteriormente promueve a que se agreguen en estructuras más complejas y precursoras de microtúbulos. Además de promover el ensamblaje de tubulina, tau puede estabilizar microtúbulos *in vivo*, los cuales a su vez son parte fundamental del citoesqueleto que provee de estructura a la neurona (Drubin et. al., 1986). Por otro lado, la proteína tau se encuentra casi de manera exclusiva en el SNC, donde está presente en los axones de neuronas de manera preferencial, aunque también puede encontrarse en dendritas, oligodendrocitos y astrocitos, estos últimos especialmente en condiciones patológicas específicas (Kosik & Fich, 1987; Ittner & Götz, 2010; Kahlson & Colodner, 2015).

La proteína tau tiene seis isoformas que son generadas por *splicing alternativo* de un único gen en el cromosoma 17 en el humano y en la rata; la cual es uno de los modelos animales más usados para estudiarla (Hanes et. al., 2009). Estas isoformas difieren en el contenido de tres o cuatro *repeats* o dominios de unión a microtúbulos y en uno, dos o ningún inserto de 29 aminoácidos en su parte N terminal (Kolarova et. al., 2012). Desde que se empezó a estudiar la proteína tau, se descubren sus principales funciones de promover el ensamblaje y estabilidad de los microtúbulos; actividad que está fuertemente relacionada con su grado de fosforilación y desfosforilación (Lindwall & Cole, 1984; Yamamoto et. al., 1988).

Principalmente, tau ha sido implicada en procesos de axogénesis, estructura y diferenciación axonal, las cuales están reguladas por el nivel de fosforilación de la proteína, que cambia durante el desarrollo; en cultivos de neuronas hipocampales el nivel de fosforilación es cuatro veces mayor en soma y dendritas inmaduras en comparación con el cono axonal (Garcia & Cleveland, 2000; Mandell & Banker, 1996).

Además, tau también ha sido relacionada con procesos de transporte de organelos y vesículas derivadas del aparato de Golgi (Stamer et. al., 2002; Rogers & Gelfand, 2000). Se sabe que tau interactúa con el complejo dinactina, lo cual tiene implicaciones en transporte axonal (Magnani et. al., 2007), y otras investigaciones relacionan la sobre-expresión de tau con el bloqueo en el tráfico de vesículas, interacción con el aparato de Golgi y bloqueo del transporte de mitocondria a los axones (Ebner et. al., 1998). Estas acciones pueden ser explicadas por el efecto de tau en la interacción de quinesina con los microtúbulos (Trinkzec et. al., 1999).



**Figura 1. Tau genera seis isoformas de un mismo gen por splicing alternativo.** En el sistema nervioso central de humanos y de ratas, los exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 and 13 (en azul) son transcritos de manera regular, a diferencia de los exones 1, 4A, 6, 8 and 14 (en gris) que no lo son. Los exones 2 (en naranja), 3 (en púrpura) y 10 (en verde) son sujetos a *splicing alternativo*. Asimismo, tau está dividida en cuatro regiones; región ácida, región rica en prolina (rica a su vez en sitios disponibles de fosforilación), región de dominio de repeats de unión a microtúbulos y la región C-terminal. En el diagrama se ilustran además los pesos moleculares de las seis isoformas posibles mediante este proceso. **Modificado de Martin et. al. 2013a.**

### 1.1.2. Regulación de la fosforilación de tau

Cerca del 20% de la proteína tau es fosforilable, o cerca de 80 residuos, por lo que normalmente se encuentra fosforilada en una proporción de 2-3 mol de fosfato/mol de proteína para cumplir con sus funciones óptimas (Tenreiro et. al., 2014; Iqbal et. al., 2005). De este modo, tau se encuentra en un constante equilibrio de fosforilación/desfosforilación, siendo su forma fosforilada la que promueve su disociación del microtúbulo y la desfosforilada la que promueve su función de asociación a tubulina y estabilización de microtúbulos (Lindwall & Cole, 1984). La fosforilación de la proteína tau es un proceso altamente dinámico que se basa en la interacción de cinasas y fosfatasas (Tenreiro et. al., 2014; Stoothoff & Johnson, 2005). Las cinasas pertenecen al grupo de enzimas conocidas como transferasas, ya que “transfieren” grupos fosfato de un donador de alta energía como ATP o GTP a los residuos de aminoácidos serina (S), treonina (T) y tirosina (Y) (Martin et. al., 2013a). Por otro lado, las fosfatasas son el antagonico de las cinasas al revertir la transferencia de los grupos fosfato en los residuos antes mencionados. Las fosfatasas envueltas en la regulación de tau pertenecen al grupo de las fosfatasas fosfoproteínas y fosfatasas tirosinas (Martin et. al., 2013b).

A pesar de que distintas y muy diversas cinasas fosforilan a tau, las más estudiadas y mejor descritas (ya sea por el número de residuos que fosforila o su relevancia patológica) son GSK3 (ambas isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ ), cdk5, MAPK (p38, ERK1/2, JNK), CK1 y MARK. De las cinasas mencionadas con anterioridad, GSK3 puede fosforilar 49 residuos de la proteína, cdk5 fosforila 11 residuos, p38 cuenta con 29 residuos putativos, ERK1/2 fosforila 16 residuos, JNK tiene 11 residuos, CK1, con sus diversas isoformas, fosforila 46 residuos y MARK fosforila residuos específicos en las regiones de asociación a microtúbulos (Martin et. al., 2013a). En lo que concierne a las fosfatasas, se sabe que las isoformas PP1, PP2A, PP2B y PP5 regulan la desfosforilación de tau, aunque se reporta que en el cerebro humano cerca de un 71% de la actividad de fosfatasas se debe a PP2A (reconocida como la principal fosfatasa de tau) y en un 11% a PP2B, lo que las ha hecho fosfatasas clave en el estudio de la fosforilación fisiológica y patológica de esta proteína (Liu et. al., 2005; Martin et. al., 2013b).

### **1.1.3. Tau y plasticidad neuronal**

Una de los primeros indicios de que la expresión y fosforilación de tau cumplen roles de plasticidad neuronal, vino de la observación de la regulación de la expresión de tau en el desarrollo. Lo anterior debido a que únicamente la isoforma más corta y altamente fosforilada es expresada en la etapa fetal restringida al compartimiento axonal, muy posiblemente para mantener la plasticidad necesaria para el desarrollo del cerebro (Nunez, 1988; Goedert et. al., 1993). La fosforilación de tau también puede ser inducida de forma reversible para adaptarse a retos fisiológicos menores a los mencionados con anterioridad. Específicamente, se ha observado hiperfosforilación de tau en ardillas durante el torpor de la hibernación que regresa a niveles normales una vez que éste pasa. Esto habla de un mecanismo de adaptación en el que la fosforilación es necesaria (Arendt et. al., 2003).

Además de los ejemplos anteriores, se sabe que durante el embarazo y la lactancia el cerebro de la hembra necesita de un alto grado de plasticidad para enfrentar los retos que la maternidad conlleva y aumentar la probabilidad de supervivencia de la camada (Kinsley & Lambert, 2006), y que estos cambios producidos por hormonas pueden afectar tanto proteínas asociadas al citoesqueleto; actina, MAPs y tau, como células gliales (Hansberg-Pastor et. al., 2015). En específico, se ha demostrado que la expresión y fosforilación de tau cambian durante el embarazo y los primeros días de lactancia en zonas como el hipotálamo, cerebelo e hipocampo (González-Arenas et. al., 2012) de la madre y que estos cambios son ocasionados por las fluctuaciones hormonales, especialmente de estrógenos y progesterona, que se presentan en estos estados (González-Arenas et. al., 2014).

Por otro lado, usando ratones transgénicos en los que se ha inducido una delección del gen de tau, se han observado deficiencias en aprendizaje, memoria e inducción de LTP que son desarrollados durante el envejecimiento (Biundo et al., 2018). Más aún, en animales en los que la delección no ha sido total, se pueden observar deficiencias en pruebas conductuales de aprendizaje y memoria a los 7 meses de edad, sugiriendo que reducciones parciales de la proteína también pueden tener efectos cognitivos

adversos (Biundo et al., 2018). Además de la expresión total de la proteína, se ha demostrado que la fosforilación en el sitio Ser<sup>396</sup> de la proteína es esencial para la depresión a largo plazo (LTD por sus siglas en inglés), aunque no se relacionó con LTP, que ha sido implicada en procesos de aprendizaje (Regan, et al., 2015). Se espera que el papel de tau en procesos de plasticidad neuronal sea descrito de manera más completa en los años por venir debido al auge de las intervenciones inmunoterapéuticas que tiene como blanco a tau y podrían afectar colateralmente sus funciones fisiológicas (Biundo, 2018; Bittar, 2018).

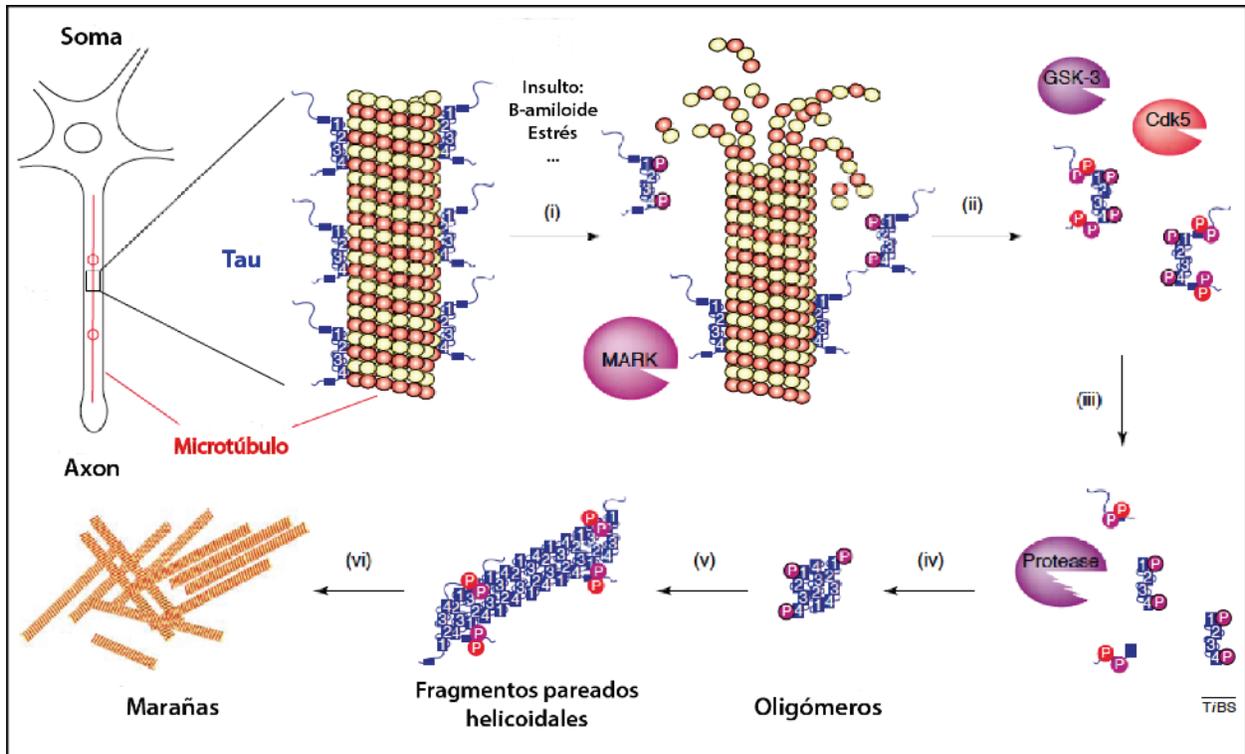
#### **1.1.4. Patología de tau**

La proteína tau es mejor conocida por su importancia clínica, ya que en su forma hiperfosforilada es el principal componente de los fragmentos pareados helicoidales, que conforman a su vez las marañas neurofibrilares; una de las lesiones características de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Iqbal et. al., 2005). Estas marañas neurofibrilares están compuestas por tau hiperfosforilada y agregada en polímeros que son insolubles (Iqbal et. al., 1984; Grundke-Iqbal et. al., 1986), y se sabe que contienen las seis isoformas de tau (Goedert et. al., 1989). Debido a que en las marañas neurofibrilares tau se encuentra hiperfosforilada, se ha propuesto que una alteración o trastorno en el proceso normal de fosforilación es un evento patogénico importante en la EA (Alonso et. al., 2001).

Debido a que la fosforilación es un proceso que ocurre de manera normal, las causas por las que se dispara la fosforilación y el límite de fosforilación para que tau presente propiedades neurotóxicas e insolubilidad aún no es bien entendido (Crespo-Biel et. al., 2012). Igualmente, se sabe que la hiperfosforilación de tau precede a su agregación, aunque también hay evidencia de que la hiperfosforilación por sí sola no es suficiente para formar agregados moleculares. Otras modificaciones post-traduccionales, el truncamiento de la proteína y la necesidad de cofactores todavía desconocidos parecen tener todos un rol en la agregación y formación de las marañas neurofibrilares (Wang & Mandelkow, 2016).

El estudio de moléculas implicadas en la fosforilación de tau, como GSK3 y cdk5, se ha relacionado fuertemente con procesos patológicos de la EA. En estudios acerca de GSK3, especialmente GSK3 $\beta$ , se ha observado que la degeneración hipocampal está mediada por la proteína tau; la cinasa colocaliza con las marañas neurofibrilares y la toxicidad ocasionada por placas de  $\beta$ -amiloide causan fosforilación de tau mediante esta cinasa (Martin et. al., 2013a). También se ha observado que ya que cinasas como cdk5 han fosforilado a tau, etiquetan a la proteína para favorecer su subsecuente fosforilación por GSK3. Además, en tejido *post-mortem* de individuos con EA, la actividad de la fosfatasa PP2A se encuentra reducida a la mitad y puede la actividad de GSK3 $\beta$  está aumentada (Martin et. al., 2013a; 2013b).

La proteína tau es hidrofílica, con poca estructura y altamente soluble, por lo que su agregación en marañas neurofibrilares insolubles resulta contraintuitiva y mucha investigación se ha enfocado en encontrar las condiciones que generan esta agregación (Mandelkow & Mandelkow, 2012). El consenso general es que el aumento en la fosforilación desasocia a tau del microtúbulo permitiéndole ser hiperfosforilada e interactuar con tau que también se encuentra desasociada del microtúbulo, es digerida por proteasas y forma oligómeros con propiedades neurotóxicas y que pueden secuestrar a tau normal y formar fragmentos pareados helicoidales y posteriormente marañas, cada paso involucra la pérdida gradual de solubilidad de tau (Iqbal et al., 2008; Ghag et al., 2018). Aunque en años recientes se han hecho avances en el descubrimiento y tratamiento de oligómeros tóxicos y solubles de tau (Bittar et al., 2018), el aumento en los niveles de fosforilación, especialmente en residuos específicos altamente caracterizados de la enfermedad y la pérdida de solubilidad siguen siendo usados como marcadores de la actividad patológica de tau (Iqbal et al., 2008; Mandelkow & Mandelkow, 2012).



**Figura 2. Formación de marañas neurofibrilares.** En la figura se observa el proceso por el cual tau en la parte superior izquierda se encuentra asociada al microtúbulo, cumpliendo su función canónica. Posteriormente es fosforilada, desasociada del microtúbulo e hiperfosforilada por cinasas como GSK3 y cdk5. En este punto, tau puede ser digerida por proteasas en fragmentos más propensos a agregarse en oligómeros que pueden secuestrar a tau normal y que culminan en la formación de las marañas neurofibrilares. **Modificado de Drewes, 2004.**

### 1.1.5. Taupatías

Además de la EA, la agregación de la proteína tau en marañas neurofibrilares se observa en otras patologías como la esclerosis lateral amiotrófica/complejo de demencia-parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal, demencia pugilística, trauma cerebral, Síndrome de Down, parkinsonismo post-encefálico, parálisis supra nuclear progresiva y en algunos casos en la enfermedad de Pick. Igualmente han sido descritas en el cerebro de pacientes con afecciones raras como el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, enfermedad de Hallervorden-Spatz, distrofia miotónica, enfermedad Niemann-Pick, panencefalitis esclerosante subaguda, entre otras condiciones (Buée et. al., 2000; Williams, 2006).

Entre los padecimientos neurodegenerativos que presentan como característica las marañas neurofibrilares están el grupo que se conoce como demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (abreviada DFTP-17). Estos son un grupo de síndromes neurodegenerativos y progresivos que inician cuando el paciente ya es adulto y que generan perturbaciones de comportamiento, cognitivas y motoras, en diferentes combinaciones (Williams, 2006). Este grupo de padecimientos ha sido relacionados con mutaciones en el gen de la proteína tau y generan, ya sea modificaciones en el *splicing alternativo* del exon 10 y por lo tanto afectan la proporción de tau 3R y 4R o mutaciones que afectan la interacción de tau con los microtúbulos (Buée et. al., 2000).

Asimismo, una característica en especial llamó la atención de los investigadores en el campo de la enfermedad de Alzheimer: la DFTP-17 causa neurodegeneración y demencia en la ausencia de las placas seniles, cuyo componente principal es la proteína  $\beta$ -amiloide. Esto abrió nuevas posibilidades en el campo de estudio de la enfermedad de Alzheimer ya que sugirió que la proteína tau podría estar implicada en la etiopatogénesis de la enfermedad, independientemente de la cascada amiloide. Aunque la interacción entre la cascada de tau y la cascada amiloide es aún discutida, el descubrimiento y caracterización de la DFTP-17 ha contribuido enormemente al estudio de los posibles mecanismos de agregación proteica y a la generación de modelos transgénicos de la patología de tau (Buée et. al., 2000; Götz & Ittner, 2008).

#### **1.1.6. Modelos animales de tau y sus mutaciones**

El descubrimiento de mutaciones patológicas como las mencionadas con la DFTP-17, en conjunto con otras como las relacionadas con la cascada amiloide, ha permitido la generación de diversos modelos transgénicos y estos a su vez han sido una herramienta invaluable para el estudio de la EA. La generación de ratones transgénicos ha arrojado descubrimientos acerca de la interacción de la proteína  $\beta$ -amiloide y tau, caracterización de especies tóxicas de ambas proteínas, mecanismos de neurotoxicidad, funciones biológicas, entre otras (Ke et. al., 2012; Götz & Ittner, 2008).

Los primeros modelos animales en desarrollarse fueron ratones *knock-out* de tau (carentes de la proteína tau), los cuales sorpresivamente no parecían tener ningún fenotipo aparente y solamente mostraron deficiencias motoras conforme envejecieron. El siguiente avance fue la expresión de las seis isoformas humanas en un ratón, el cual presentó fosforilación de tau tan pronto como a los dos meses de edad (Ke et. al., 2012). Por otro lado, el descubrimiento de diversas mutaciones humanas permitió la ingeniería genética de algunos modelos animales importantes para el estudio de la EA, entre ellos podemos destacar el triple transgénico, que replica las lesiones definitorias de la EA, que son las placas de  $\beta$ -amiloide y las marañas neurofibrilares descritas anteriormente (Oddo et al., 2003; Götz & Ittner, 2008).

## **1. 2. Hipocampo**

### **1. 2 .1. Anatomía básica del hipocampo**

El hipocampo es un área cerebral altamente compleja en su funcionamiento y organización que se asocia primordialmente con procesos de codificación, almacenamiento y recuperación de información, o de manera general, aprendizaje y memoria (Maras & Baram, 2012). La literatura difiere en su definición de lo que anatómicamente es el hipocampo, sin embargo a lo largo de este capítulo usaremos mayormente la definición de formación hipocampal que se encuentra en The Rat Nervous System (Paxinos, 2004; 2015), específicamente en los capítulos 21 y 20 respectivamente; Hippocampal Formation (Witter & Amaral, 2004 pp. 635-700; Cappaert, et al. 2015, pp. 511-560). La formación hipocampal (FH) comprende tres regiones: el giro dentado, el *hippocampus proper* (subdividido a su vez en tres regiones: CA1, CA2 y CA3) y el *subiculum*. Todas estas regiones se clasifican como la formación hipocampal ya que comparten la apariencia característica de tres capas celulares y la conectividad que comparten es altamente unidireccional; las células granulares del giro dentado proyectan a CA3, CA3 a CA1 y de CA1 al subiculum, además de la aferente principal del giro dentado que proviene de la corteza entorrinal que se conoce como vía perforante (Witter & Amaral, 2004).

En este capítulo nos enfocaremos en describir anatómicamente, y de manera breve, zonas concretas de la formación hipocampal; giro dentado y las regiones del *hippocampus proper* CA1, CA2, CA3 (Cappaert et al., 2015). Se debe aclarar que a lo largo de este trabajo usaremos el término CA4, originalmente acuñado por Llorenté de Nó en 1934, para referirnos a la región que Amaral define como *hilus* o capa polimórfica del giro dentado (1978). Existe controversia debido a la denominación que debe recibir esta región ya que es difícil determinar el límite de la capa piramidal proveniente de la región CA3 que se inserta en la capa granular del giro dentado y lo que Amaral denomina como capa polimórfica del mismo (Amaral, 1978; Witter & Amaral, 2004).

#### *Giro dentado y capa granular*

El giro dentado consta de tres capas celulares: la primera es la capa molecular, seguida de la capa granular que forma la característica estructura con forma de V y la capa polimórfica o *hilus* del giro dentado, pero como mencionamos anteriormente, definiremos como CA4. El tipo celular predominante en el giro dentado y especialmente la capa granular es la célula granular, ésta tiene una forma elíptica y mide aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de ancho por 16  $\mu\text{m}$  de alto. Estas células se encuentran organizadas muy cerca una de otra sin cobertura glial, lo que da lugar al denso empaque característico de esta zona con forma de V (Witter & Amaral, 2004).

En la misma capa granular, se encuentran las células en canasta que están atrapadas entre las células granulares y la región CA4. Las células en canasta tienen forma piramidal con cuerpos celulares de entre 25-30  $\mu\text{m}$  de diámetro y su nombre se debe a que sus axones forman plexos pericelulares que rodean el soma de las células granulares. Las células en canasta fueron descritas con la característica de una sola dendrita apical sin espinas dirigida a la capa molecular que se divide en varias ramas sin espinas y dos o tres dendritas basales que se ramifican y extienden al *hilus*. El segundo tipo de célula con canasta tiene un árbol dendrítico restringido al *hilus* y son reactivas a GABA y parvalbumina. Por otro lado, en la misma región que ocupan las células con canasta hay otros tipos celulares con diversas formas y configuraciones dendríticas, aunque todas comparten características estructurales como doblez en el

núcleo y extenso citoplasma somal. Se sabe que estas células son inmunoreactivas a GABA y lo más probable es que modulen la actividad de las células granulares (Cappaert, et al. 2015).

### *Capa molecular*

La capa molecular se encuentra mayormente ocupada por las dendritas de las células granulares, en canasta y algunas de la capa polimórfica, así como axones terminales de diferentes fuentes. Sin embargo, también pueden distinguirse otros tipos de células dentro de la capa molecular. El primer tipo son células con canasta de forma multipolar o triangular que parecen contribuir a los plexos con canasta de la capa granular. El segundo tipo son células que se parecen a las llamadas células candelabro o axoaxónicas de la neocorteza, estas tienen un árbol dendrítico que abarca el grueso de la capa molecular y las dendritas basales se encuentran ausentes o no bien desarrolladas. Estas células son inmunoreactivas a marcadores de GABA y es probable que provean una forma de control inhibitorio a la salida de las células granulares. Por último están las que se han denominado células de la capa molecular asociada con la vía perforante, MOPP por sus siglas en inglés, debido a la preferencia axonal que presentan por la capa molecular (Cappaert et al., 2015).

### *CA4*

La capa CA4 está formada por diversos tipos celulares, de los que en algunos casos se sabe muy poco, aunque el más común e interesante es la célula musgosa. Estas células tienen frecuentemente forma triangular o multipolar con cuerpos celulares entre 25-35  $\mu\text{m}$ . Las dendritas de las células musgosas pueden extenderse a la capa granular y a veces a la capa molecular, sin embargo nunca se extienden hacia la región adyacente de CA3. La característica más peculiar de las células musgosas es que sus dendritas proximales terminan en excrescencias espinosas (thorny excrescences, en inglés) que son los sitios de terminación de los axones de las fibras musgosas (Witter & Amaral, 2004; Cappaert et al., 2015).

Existen en CA4 células de tipo fusiforme, que se diferencian entre ellas comúnmente por el número y densidad de sus espinas. Las dendritas de este tipo celular corren de manera paralela a las capa granular del giro dentado y pueden extenderse por casi toda la longitud del ala del mismo. También existe un tipo de células pequeñas, redondas o multipolares, que dan lugar a un plexo estrellado de dendritas delgadas y sin espina y un plexo axonal local y ramificado. Se ha reportado que estas células envían axones al *hippocampus proper* (CA3, CA2, CA1) e incluso alcanzan el *subiculum*. Se han descrito además células multipolares de espinas largas con un árbol dendrítico confinado a CA4 y que proyectan a la capa molecular que parecen ser inervadas por las fibras musgosas. Por último las células candelabro que se encuentran confinadas en CA4 quizás reciben estimulación de las fibras musgosas y terminan su axón en los segmentos iniciales de las células musgosas (Witter & Amaral, 2004; Cappaert et al., 2015).

#### *Hipocampo (Hippocampus proper)*

El hipocampo, de acuerdo con Llorente de Nó, puede ser dividido en las regiones CA1, CA2 y CA3. La célula más abundante y emblemática del hipocampo es la célula piramidal, que forma el cuerno característico del hipocampo. Para dividir el hipocampo en estas regiones, se hace principalmente entre la región CA3 y CA1 por el tamaño de sus células, CA1 con las células más pequeñas y una diferencia clara en conectividad; las células de la región CA1 no reciben estimulación de las fibras musgosas provenientes del giro dentado. Por otro lado, la región CA2 ha sido un tanto controversial, aunque su denominación original se basó en el hecho de que es una región con células grandes como CA3, pero que no recibe estimulación de las fibras musgosas del giro dentado (Witter & Amaral, 2004). Evidencia reciente apoya la denominación de CA2 como un área hipocampal independiente (~250  $\mu\text{m}$ ) con diferencias funcionales y conectivas con las regiones CA1 y CA3 (Cappaert et al., 2015).

El hipocampo tiene una organización laminar (por capas) que, en general, comparten todas las regiones hipocampales anteriormente mencionadas. La capa principal es la

capa piramidal o *stratum pyramidale*, que como su nombre lo indica, está formada por las células piramidales. La región angosta y prácticamente sin células que se encuentra a lo profundo de la capa piramidal se denomina *stratum oriens*. Por otro lado y exclusivamente en la región CA3, la delgada capa sin células justo arriba y que contiene a las fibras musgosas provenientes del giro dentado se denomina como *stratum lucidum*. En el punto distal final del *stratum lucidum* hay un ligero engrosamiento de esta capa donde las fibras musgosas se doblan temporalmente y que marca la frontera donde comienza CA2. Superficial al *stratum lucidum* e inmediatamente arriba de las regiones CA2 y CA1 se encuentra el *stratum radiatum*, donde se localizan las conexiones asociativas de CA3 a CA3 y las conexiones de las colaterales de Schaffer entre CA3 a CA1. la región conocida como *stratum lacunosum-moleculare*, que es la parte más superficial del hipocampo, es donde terminan las fibras de la vía perforante proveniente de la corteza entorrinal y aferentes de otras regiones (Cappaert et al., 2015).

Aunque la célula emblemática del *hippocampus proper* es la célula piramidal y usualmente las zonas hipocampales se dividen por las características de sus árbol es dendríticos, también existen otros tipos celulares. Entre estos se encuentran las células en canasta que tienen cuerpos celulares dentro de la capa piramidal del hipocampo y las definidas como interneuronas. Aunque el objetivo no es describir detalladamente a la población de interneuronas, es importante mencionar que se encuentran extensamente distribuidas en *stratum oriens*, *stratum radiatum* y *stratum lacunosum* del hipocampo y que su organización y contribución a la red de conexiones en el hipocampo aún no se entiende por completo (Witter & Amaral, 2004).

### CA3

La región hipocampal CA3 se divide a su vez en tres subcampos CA3a (distal), b (proximodistal intermedio) y c (proximal) con base en la variación de la longitud y organización dendrítica. CA3c tiene los árboles dendríticos más pequeños (~10 mm) en tanto CA3 a tiene los más grande (~16 mm). Alrededor del 42 -51% de los árboles dendríticos se encuentran en el *stratum oriens* y el porcentaje varía con la zona en el

*stratum lacunosum-moleculare*. Las dendritas en CA3c también muestran excrescencias espinosas que sugieren una mayor estimulación de las fibras musgosas provenientes del giro dentado (Cappaert et al., 2015).

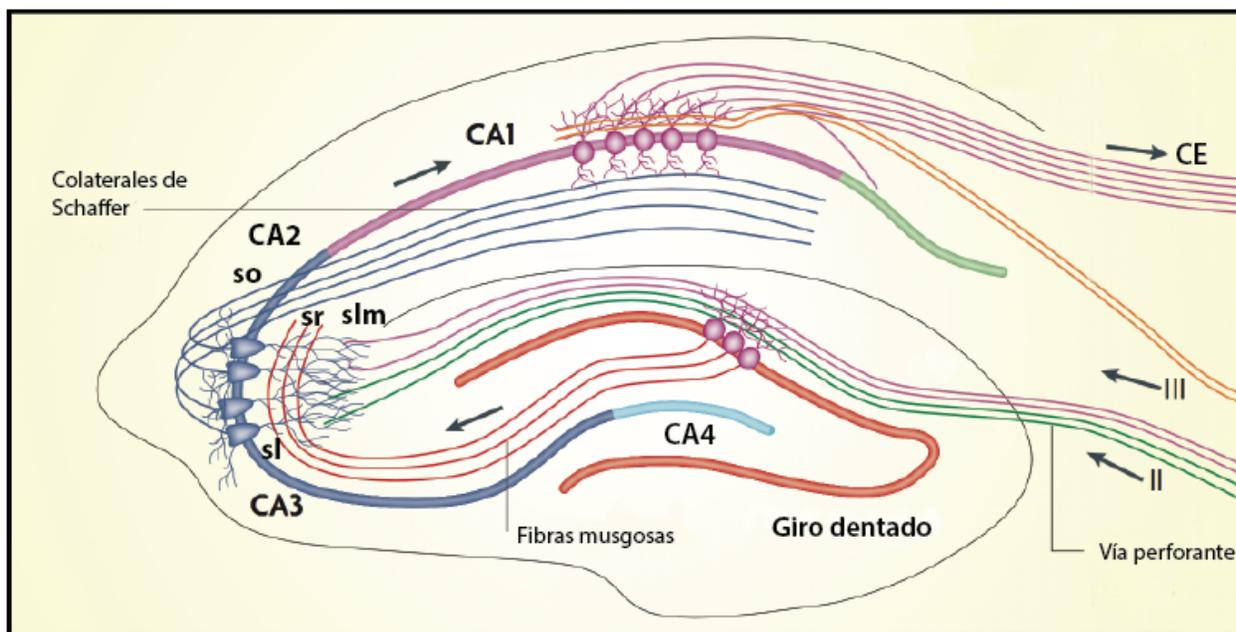
## CA2

Esta región, como se mencionó antes, consiste de células piramidales grandes como CA3 pero que aparentemente no reciben estimulación de las fibras musgosas y sus dendritas no tienen excrescencias espinosas. CA2 contiene una mezcla de células grandes como CA3 y células con árboles dendríticos pequeños como CA1, lo que hace que las fronteras con CA3 y CA1 sean difíciles de definir de manera citoarquitectónica. Las dendritas apicales de las células piramidales en CA2 se despliegan mayormente en el *stratum lacunosum moleculare* a diferencia de CA3. En CA2, la longitud del árbol dendrítico se encuentra mayormente en el *stratum oriens* (38%), *stratum radiatum* (31%) y *stratum lacunosum-moleculare* (31%) a diferencia de CA1 (Cappaert et al., 2015).

## CA1

Las células piramidales tienden a ser más pequeñas y homogéneas en la región CA1. Los árboles dendríticos tienen una longitud promedio de 13.5 mm y el 47% está localizado en el *stratum radiatum*, 34 % en el *stratum oriens* y 18% en el *stratum lacunosum-moleculare*. Las células piramidales de CA1 reciben el 92% de su estimulación gabaérgica en sus dendritas. La porción proximal recibe primordialmente de interneuronas gabaérgicas mientras que las porciones más distales tienen estimulaciones excitatorias (Cappaert et al., 2015).

Como nota final de esta sección sobre anatomía básica del hipocampo, se debe mencionar que no se definió la conectividad de la formación hipocámpal, ya que resultaría poco práctico para los efectos de esta tesis. Se refiere al lector al capítulo Hippocampal Formation en *The Rat Nervous System* (Paxinos, 2015) donde se encuentra una detallada descripción.



**Figura 3. Diagrama ilustrativo de las zonas del hipocampo en una sección coronal de cerebro de roedor.** En la figura se pueden observar las regiones que hemos descrito con anterioridad, de derecha a izquierda el giro dentado (en rojo) formado por sus características neuronas granulares, la zona CA4 que también se conoce como hilus del giro dentado y que parece ser una proyección de las neuronas piramidales de la región CA3. La región CA2 no está bien definida en colores pero su localización anatómica aproximada se ve en el diagrama. Por último, podemos ver la región CA1 con sus células piramidales. Las vía perforante que estimula al hipocampo proveniente de la corteza entorrinal también puede verse comunicándose con CA3 y CA1. so: *stratum oriens*, sl: *stratum lucidum*, sr: *stratum radiatum*, slm: *stratum lacunosum-moleculare*, CE: Corteza entorrinal. **Modificado de Deng et. al., 2010.**

### 1.2.2. Funciones asociadas con el hipocampo

Con lo descrito anteriormente, el hipocampo ha sido asociado con procesos de aprendizaje y memoria, además existe evidencia de que el hipocampo preferentemente adquiere y utiliza información de tipo espacial y contextual en ratas (Jarrard, 1993). No obstante, estudios en monos han sugerido que es incorrecto simplificar las funciones del hipocampo como sucede en los roedores y también debe tomarse en cuenta que participa en ciertos aspectos de la motivación, la respuesta al estrés (Maras & Baram, 2012), neurogénesis (Deng et. al., 2010) y algunas patologías (Jarrard, 1993).

Más específicamente, la región CA3 del hipocampo presenta una conectividad interna en mayor abundancia que otras regiones del hipocampo que se ha implicado en sus funciones de memoria y aprendizaje. Algunas subregiones de CA3 se especializan en la adquisición y codificación de información espacial, otras en su interacción con el giro dentado se concentran en el reconocimiento de patrones o con la región CA1 en el procesamiento y salida de información (Cherubini & Miles, 2015). Finalmente, es importante mencionar que CA3 genera picos de actividad theta y gamma para sus realizar sus funciones y es muy susceptible a los efectos del estrés (Maras & Baram, 2012; Cherubini & Miles, 2015).

Otro fenómeno interesante que ocurre en el hipocampo es la neurogénesis en la etapa adulta. En el giro dentado se lleva a cabo lo que conocemos como neurogénesis; el nacimiento de nuevas neuronas que posteriormente pasan a ser parte de la capa granular del giro dentado. A pesar de que aún se sabe poco de los roles que podrían jugar estas nuevas células, las hipótesis apuntan en torno a la incorporación de neuronas para ayudar al giro dentado en su función de reconocimiento de patrones, codificación, consolidación y reorganización de la memoria (Deng et. al., 2010).

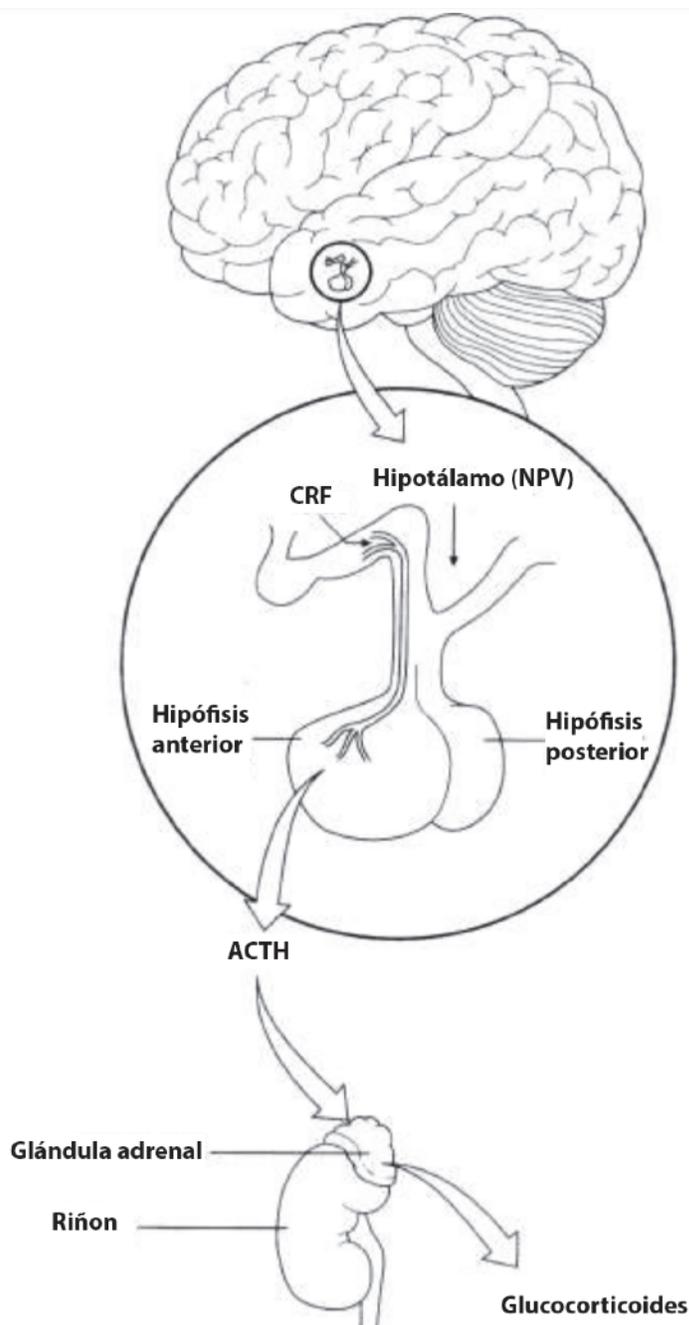
## **1. 3 Estrés**

### **1. 3. 1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y la respuesta al estrés**

El estrés puede ser definido de manera simple como un estado, real o percibido, de amenaza a la homeostasis de un organismo (Smith & Vale, 2006). Este estado puede tener componentes psicológicos y físicos que provocan la activación de sistemas endocrinos, nerviosos e inmunes, especialmente lo que se conoce como eje HPA (por sus siglas en inglés) que involucra al hipotálamo, la hipófisis y la glándula adrenal (López et. al., 1999; Smith & Vale, 2006). Es importante mencionar que si bien el eje recibe aferencias de estructuras límbicas y que hay interacción con neurotransmisores como serotonina que pueden regular su acción, el eje HPA integra todas las señales en una ruta común que comienza con las neuronas de la división medial parvocelular en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) (López et. al., 1999; Smith & Vale, 2006).

Estas neuronas en el NPV sintetizan el principal efector de la respuesta al estrés, que es el factor liberador de la corticotropina (CRF, por sus siglas en inglés). Estas neuronas proyectan a la eminencia media, donde liberan este péptido a circulación portal para acceder a la hipófisis anterior y estimular la secreción de ACTH (por sus siglas en inglés: hormona adrenocorticotrópica). La ACTH es liberada a la circulación sistémica, donde su blanco principal es la corteza adrenal para estimular la síntesis y secreción de glucocorticoides en la zona fasciculata (Smith & Vale, 2006). Este efecto es altamente específico por receptores tipo 2 que se ubican principalmente en esta capa de la corteza adrenal.

Son los glucocorticoides los efectores finales del eje HPA y ejercen su acción a través de receptores intracelulares que se encuentran distribuidos de manera ubicua. La activación de este sistema genera cambios adaptativos físicos y de comportamiento, a la vez que incrementan las posibilidades de sobrevivencia del individuo. Entre estos cambios se encuentran el incremento en el estado de alerta y vigilancia, cognición, atención, euforia y analgesia, además de cambios a la baja en funciones vegetativas como apetito y reproducción (Elenkov & Chrousos, 2006).



**Figura 4. Eje HHA.** El diagrama sintetiza las partes más importantes de la respuesta al estrés en el eje HHA presentadas en este capítulo. **Modificado del capítulo 3 “Glands, Gooseflesh and Hormones” en “Why Zebras Don’t Get Ulcers” de Sapolsky, R. (2004).**

### **1.3.2. Hipocampo en estrés y envejecimiento**

El hipocampo, además de ser el área central en los procesos de aprendizaje y memoria, también se encuentra implicado en la regulación de la respuesta al estrés, y a lo largo de la vida de un organismo presenta cambios que pueden explicarse en esta función. A pesar de que la respuesta al estrés está mayormente regulada por el conocido eje HPA, se sabe que existe una regulación importante de este eje por parte de estructuras límbicas como el hipocampo y la amígdala (Herman et. al., 2005). Gran parte de los estudios señalan que el hipocampo, en específico, cumple una función inhibitoria del eje HPA; impidiendo la activación del eje. Además de contener una gran cantidad de receptores a glucocorticoides, cuando existen lesiones hipocampales, la secreción de glucocorticoides es más pronunciada en la fase de recuperación a un estrés, lo que ha llevado a la proposición del hipocampo como un componente importante de la retroalimentación negativa del eje HPA (Herman et. al., 2005).

Se ha reportado que en humanos que padecen el Síndrome de Estrés Postraumático (SEP), entre sus diversos síntomas, presentan problemas de memoria y concentración, que se han correlacionado en imágenes de resonancia magnética con hipocampos más pequeños que sujetos control (Sapolsky, 2000). Por otro lado, en sujetos que padecen la enfermedad de Cushing, la cual genera altos niveles circulantes de glucocorticoides, se observa un encogimiento del hipocampo que es parcialmente reversible si los niveles de cortisol son controlados (Starkman, et. al. 1999). Por investigaciones posteriores, se sabe que este encogimiento puede deberse al exceso sostenido, también definido como estrés crónico, en la secreción de glucocorticoides, que ocasiona dificultades en aprendizaje y memoria, atrofia de procesos neuronales, inhibición de neurogénesis en adultos, e incluso neurotoxicidad. El área cerebral en la que se documentan estos efectos es el hipocampo, donde también se encuentra la mayor presencia de receptores a glucocorticoides (Sapolsky, 1999: Sapolsky, 2005).

Adicionalmente, existe evidencia de que durante la senescencia la adaptación al estrés se ve afectada de manera significativa e incluso en pacientes con la EA se observan cambios en la sensibilidad a glucocorticoides. En modelos animales, se ha demostrado

que roedores macho envejecidos presentan dificultades para terminar su respuesta al estrés, principalmente por la pérdida de receptores a glucocorticoides en el hipocampo y que niveles elevados de glucocorticoides pueden causar degeneración neuronal (Sapolsky, 1985). Es importante mencionar que la literatura que vincula al estrés y los glucocorticoides con el daño hipocampal es muy extensa y en constante cambio a la fecha. Sin embargo, en la última década también se han descrito las acciones perjudiciales al hipocampo por parte de CRF (que se describió anteriormente), especialmente en su relación con la EA y que se describen con detalle en el siguiente capítulo. Para una rápida y magistral revisión de la historia y literatura sobre el estrés y sus consecuencias adversas, especialmente estrés crónico, recomiendo el libro de Robert Sapolsky *“Why Zebras Don’t Get Ulcers”* y toda las publicaciones que su grupo y otros derivaron de estos descubrimientos, algunos de los cuales se citan aquí y que fueron fundamentales para la formación científica del autor.

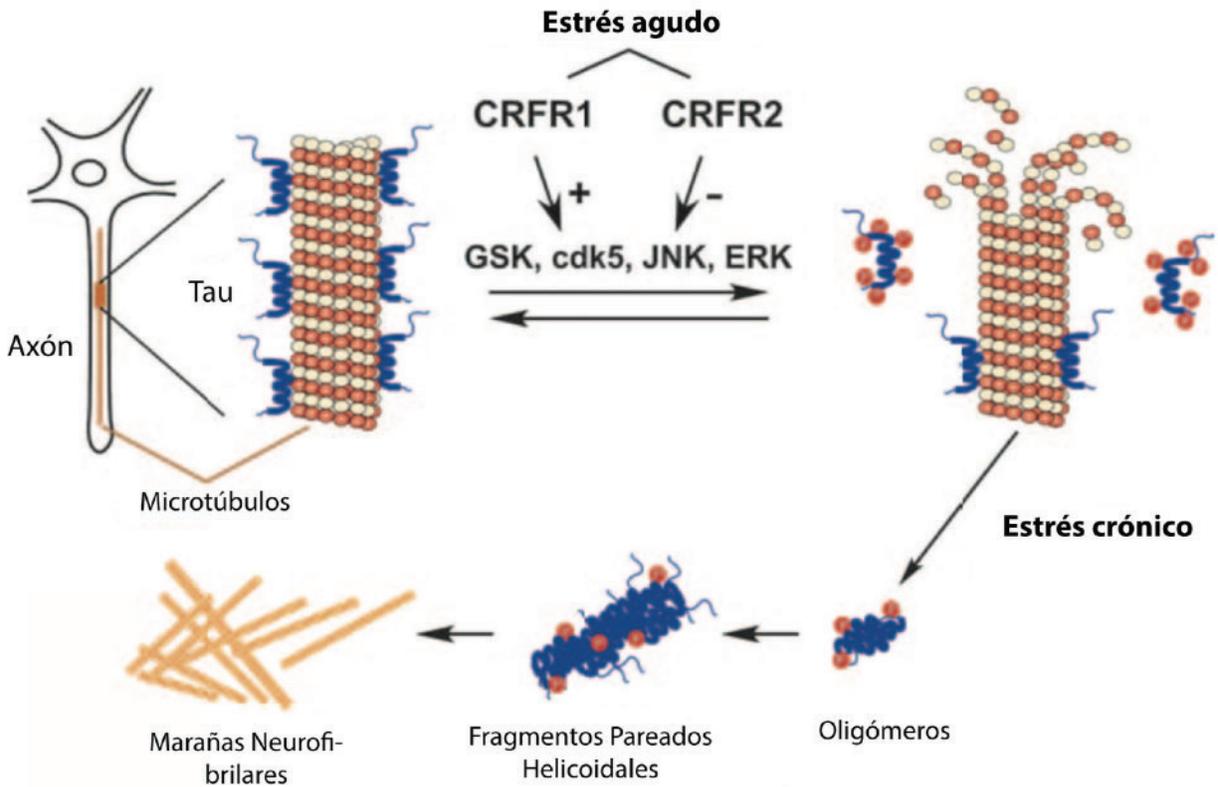
### **1.3.2 Estrés y la Enfermedad de Alzheimer**

En relación a la EA, se sabe que los niveles circulantes de glucocorticoides aumentan con la edad e incluso las personas que padecen la EA tiene niveles más altos que personas sanas de la misma edad (Masugi et. al., 1989). Además, el daño hipocampal visto en la enfermedad de Alzheimer se especula puede ocasionar mayor secreción de glucocorticoides al no permitir las funciones del hipocampo de actuar como sensor de la respuesta al estrés y a su vez inhibir al eje HPA (Sapolsky et. al., 1985). Diversos estudios posteriores han relacionado al estrés con la EA a todos los niveles del eje HPA y algunos proponen un “círculo vicioso” en el cual el estrés es a su vez factor de riesgo y consecuencia de la enfermedad (Justice, 2018). Usando una amplia variedad de modelos de estrés se han observado mayor expresión de APP (proteína precursora amiloide), fragmentos  $\beta$ -amiloide, mayor fosforilación de tau y mayor acumulación de ambas patologías de la EA, sin mencionar que diversos modelos transgénicos de la EA muestran alteraciones en su respuesta al estrés (Justice, 2018).

Diversos estresores de tipo físico, como ayuno y choque térmico, pueden disparar la fosforilación anormal de la proteína tau mediante la acción de fosfatasas dependientes

de cambios de temperatura (Rissman, 2010). Se ha demostrado que un estrés de tipo psicológico, en específico restricción de movimiento, induce la fosforilación y la insolubilidad de tau independientemente de la secreción de glucocorticoides y de manera casi exclusiva por el receptor CRFR1 (Rissman et al., 2007; Rissman, et al. 2011; Rissman et al., 2012). El hecho de que tau presente mayor insolubilidad después de un tratamiento de estrés crónico se puede traducir en que tau cambia a una forma potencialmente patogénica que podría secuestrar tau soluble (Rissman et al. 2007; Rissman et al., 2012).

Como se describió anteriormente (Figura 4), cuando una amenaza es percibida se dispara una respuesta a este estímulo proveniente de diferentes estructuras, incluidas estructuras límbicas como la amígdala que se integran en el hipotálamo que reacciona liberando CRF (Smith & Vale, 2006). En el caso del disparo de fosforilación descrito en Rissman et al., 2007, la restricción de movimiento ejerce sus efectos a través del CRFR1 que a su vez permite la activación de las cinasas GSK3, cdk5, JNK y ERK que son las mediadoras de este fenómeno transitorio. Cuando el mecanismo descrito se activa de manera crónica promueve el cambio tau a una forma insoluble (Rissman et al., 2007) y a su posterior agregación, como se ha detectado con microscopio electrónica usando el anticuerpo MC1 que detecta un cambio conformacional de tau en etapas tempranas de la EA (Rissman et al., 2012). Se ha demostrado además, que el CRF puede regular la producción de  $\beta$ -amiloide (Park et al., 2015) y su sobre-expresión ocasiona hiperfosforilación y agregación de tau en el hipocampo de ratones transgénicos, que puede ser disminuida por un bloqueador específico de CRFR1 (Campbell et al., 2015).



**Figura 5. Estrés actuando a través de CRFR1 para generar fosforilación de tau.** Diagrama de mecanismos mediante los cuales el estrés, a través del receptor CRFR1, podría promover la fosforilación y agregación patológicas de la proteína tau. **Modificado de Rissman et al., 2007.**

## 1.4 Fosforilación de tau en el hipocampo de la rata hembra, estrés y lactancia

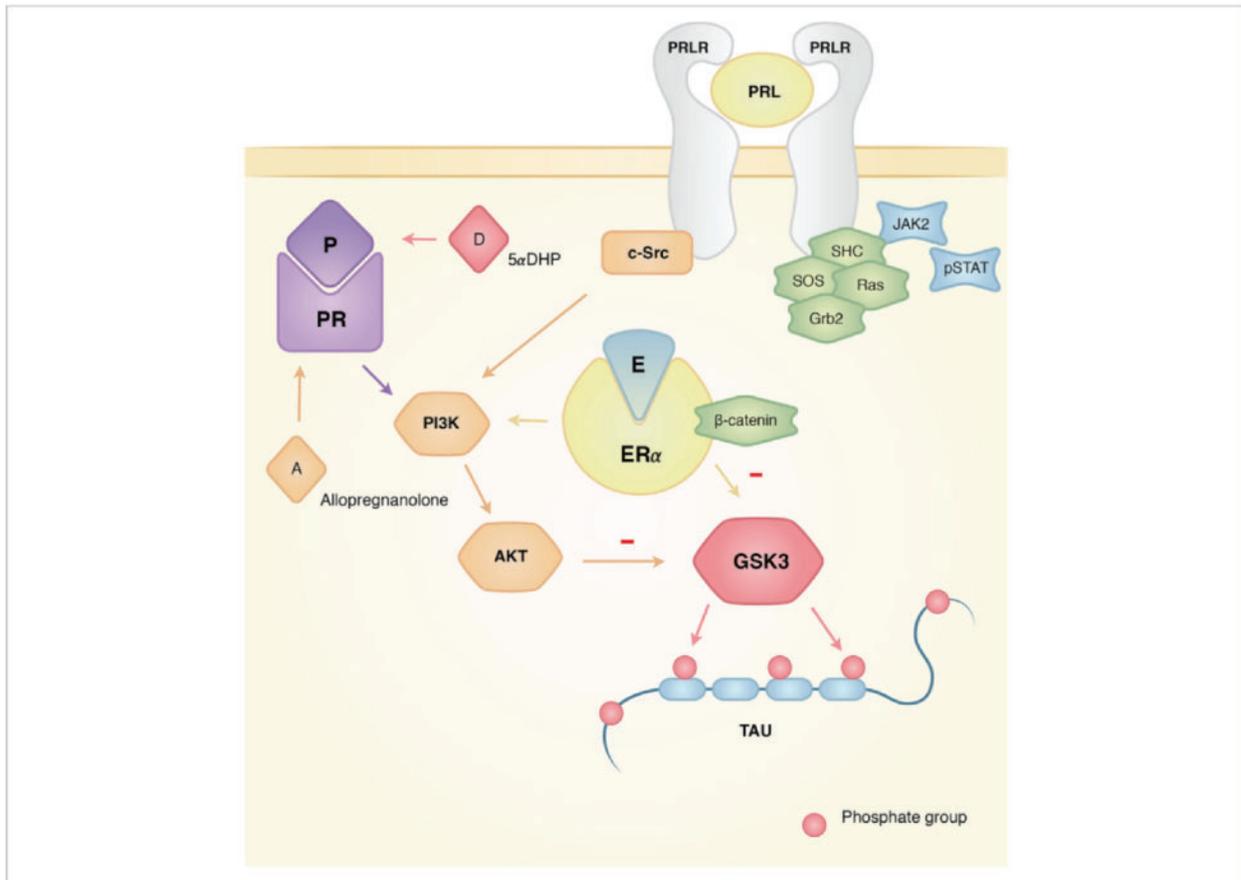
### 1. 4. 1. Estrés y fosforilación de tau en el cerebro femenino

La evidencia epidemiológica muestra que la prevalencia de la EA en mujeres es mayor; dos tercios (cerca de 70%) de las personas que padecen la enfermedad en Estados Unidos son mujeres (Alzheimer's Association, 2018). Aunque aún es un tema controversial, muchas investigaciones indican que la mayor prevalencia puede deberse a una interacción de diversos factores genéticos, metabólicos y hormonales (Snyder et al., 2016). Otros estudios postulan una interacción de hormonas como los estrógenos y progesterona con otros factores de riesgo como obesidad, neuroinflamación y

disfunción mitocondrial (Christensen & Pike, 2015; Grimm et. al., 2016; Moser & Pike, 2016).

Por otro lado, se sabe que existen diferencias debido al género en diversas enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas, incluyendo la EA (Melcangi et. al., 2016; Panzica & Melcangi, 2016). Un creciente número de investigaciones proponen una hipótesis novedosa en la que uno de los mecanismos que explican la mayor prevalencia de la EA en mujeres se debe a dimorfismos sexuales en la respuesta al estrés, que hacen a las mujeres más susceptibles de padecer la enfermedad al experimentar estrés, de manera crónica especialmente (Yan et. al., 2018). Aunque las acciones detrimentales de los glucocorticoides en el cerebro femenino están bien documentadas, la atención recientemente se ha centrado en estudios en roedores donde se muestran perfiles de respuesta al estrés diferentes entre machos y hembras, especialmente en la señalización de CRF con su receptor CRFR1 y que parecen ser exclusivos del estrés psicológico e independientes de secreción de glucocorticoides (Bangasser et. al., 2010; 2017; Yan et. al., 2018).

Múltiples estudios muestran que los estrógenos y la progesterona influyen el contenido y la fosforilación de tau en modelos animales transgénicos, cultivos neuronales y áreas cerebrales; especialmente el hipocampo (Muñoz-Mayorga et. al., 2018). Los cambios experimentados por las hembras a lo largo de su vida reproductiva, desde la pubertad hasta la experiencia maternal, con sus fluctuaciones hormonales características y sus efectos en tau podrían ayudar a entender las razones por las cuales las mujeres son más propensas a padecer la enfermedad de Alzheimer y bajo qué condiciones (Muñoz-Mayorga et. al., 2018).



**Figura 6. Posibles mecanismos de acción de estrógenos, progesterona y prolactina sobre la fosforilación de tau.** En la figura se muestran los mecanismos moleculares por los que estrógenos, progesterona y prolactina son capaces de regular la fosforilación de la proteína tau. Las tres hormonas tienen efectos documentados en la regulación de GSK3, en general como regulación inhibitoria. Dado el rol tan importante que juega GSK3 en el desarrollo de la EA, la ausencia o presencia de estas hormonas podría resultar en un mayor o menor riesgo a la enfermedad. Tomado de **Muñoz-Mayorga et. al., 2018**.

#### 1.4.2. Estrés durante el periodo de lactancia y fosforilación de tau

A lo largo de su vida, las hembras de los mamíferos experimentan cambios físicos importantes que pueden traducirse en adaptaciones cerebrales en regiones como el hipocampo (Kinsley & Lambert, 2006). Es importante mencionar que hay una correlación importante entre la historia reproductiva y cognición en mujeres; la pubertad, el uso de métodos anticonceptivos, mayor duración de vida reproductiva y un embarazo a una edad más avanzada se han relacionado con mejor desempeño cognitivo en la etapa de post-menopausia (Karim et. al., 2016). Además, en el

embarazo y la lactancia, el cerebro de las hembras de los mamíferos sufre diversas adaptaciones que culminan en cambios físicos y de comportamiento para asegurar el bienestar de la nueva descendencia. Durante esta fase también ocurren cambios en el hipocampo; densidad de espinas en el hipocampo y mejor desempeño en tareas de memoria espacial y aprendizaje (Kinsley & Lambert, 2006).

En el área CA1 del hipocampo, durante el inicio y al término del periodo post-parto, existe mayor densidad de espinas en hembras primíparas, que desaparece después del destete y está relacionado con menor habilidad espacial. No obstante, las ratas con más experiencias maternas muestran mayor densidad de espinas en CA1 después del destete. Además de esto, en el último periodo de post-parto, las ratas presentan menor complejidad y longitud dendrítica en CA3, lo que puede ayudar en habilidades espaciales. Por último, también existen muchos cambios complejos en el hipocampo durante el post-parto en lo referente a neurogénesis en el giro dentado (Galea et. al., 2013).

Específicamente el eje HPA, que regula la respuesta al estrés, tiene una actividad basal reducida en la fase final del embarazo y durante toda la lactancia. No obstante, el eje HPA también presenta una respuesta atenuada a diversos estímulos estresantes, tanto físicos como psicológicos. Este fenómeno es observable desde el día quince de embarazo, parto y lactancia hasta el destete. El eje HPA presenta diversos cambios a todos los niveles de respuesta como síntesis de ACTH y secreción de corticosterona. Aunque no se saben con exactitud las causas de este fenómeno, se sabe que existen cambios importantes en la retroalimentación noradrenérgica y los sistemas de oxitocina y prolactina (Brunton & Rusell, 2009).

Entre los cambios por los que existe una respuesta atenuada al estrés en la rata hembra en estas etapas reproductivas, se han propuesto los cambios en los sistemas de oxitocina y prolactina, ya que ambas hormonas cumplen funciones maternas importantes y tienen efectos ansiolíticos (Slattery & Neumann, 2008; Torner et al., 2002). En específico, los niveles de prolactina se elevan al final del embarazo y

permanecen altos durante la lactancia, para inducir sus acciones fisiológicas. Sin embargo, en modelos de roedores macho y hembras vírgenes, la administración de prolactina exógena también genera una respuesta atenuada del eje HPA a diversos estresores. Esto posiblemente aumentando la síntesis de su receptor para ejercer sus efectos ansiolíticos (Torner & Neumann, 2002).

Aunque en Rissman et al., (2007) observaron que la fosforilación de tau se dispara después de un episodio de estrés agudo (restricción de movimiento por 30 minutos) en el hipocampo de ratones macho, otros estudios apuntan a mecanismos más complejos en la rata hembra. En particular, al exponer a ratas hembras vírgenes, lactantes y post-maternales al un episodio de estrés agudo moderado, se observa una baja en la fosforilación de la proteína tau en la rata lactante en comparación con su control no estresado, fenómeno que no ocurre en las ratas vírgenes o ratas post-maternales. De manera concomitante, se observó un decremento en la cinasa GSK3 $\alpha$ , que podría explicar la menor fosforilación de la proteína tau (Steinmetz et. al., 2015).

Ya que la lactancia en las ratas hembras está caracterizada por un estado de hiperprolactinemia, este aumento en los niveles de prolactina puede explicar el cambio visto en GSK3 $\alpha$  y la fosforilación de tau (Steinmetz et. al., 2015). Se ha demostrado que la prolactina puede influir en la desactivación de GSK3 $\beta$  en células linfáticas W53 mediante la vía de Akt (Domínguez-Cáceres et. al., 2004), además de que GSK3 $\beta$  también ha sido identificada como una cinasa que marca el receptor de prolactin para su degradación en células cancerosas (Plotnikov et. al., 2008). Esto habla de un mecanismo en el que la prolactina desactiva la GSK3 $\beta$  para preservar sus receptores y que así vez afecta la fosforilación de tau de manera directa e independiente de la activación de los sistemas que regulan el estrés (Steinmetz et. al., 2015; Muñoz-Mayorga et. al., 2018).

## **2. Justificación**

Estudios como el que se desarrolla en esta tesis son fundamentales para profundizar nuestro entendimiento de los factores de riesgo que afectan específicamente a individuos del sexo femenino y en qué periodos pueden tener mayores consecuencias. A pesar de la importancia fundamental de la proteína tau por ser el principal componente de las marañas neurofibrilares, lesión característica de la EA, y de la mayor prevalencia de la misma en mujeres, aún no se entienden las interacciones entre la fosforilación de la proteína y los mecanismos y cambios específicos a lo largo de la vida de individuos del sexo femenino que afectan a la proteína, haciéndolas más propensas a desarrollar la enfermedad.

El estudio de los diferentes eventos en la vida de las mujeres y de modelos animales (hembras) como pubertad, embarazo, lactancia, experiencias maternas múltiples, su interacción, las hormonas que participan en la regulación de diferentes funciones relacionadas con estas etapas, y cómo afectan marcadores patológicos como la proteína tau al cerebro femenino es importante para poder avanzar a un mejor entendimiento de la EA y contribuir a encontrar posibles tratamientos.

### **3. Hipótesis**

La lactancia atenuará la fosforilación y la insolubilidad de la proteína tau en el hipocampo de ratas hembras inducida por la exposición crónica al estrés.

### **4. Objetivos**

Objetivo general

- Determinar si la lactancia modifica la fosforilación anormal y la solubilidad de la proteína tau en el hipocampo de ratas hembras expuestas a estrés crónico.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar si la lactancia modifica la fosforilación anormal de la proteína tau inducida por estrés crónico en el hipocampo de la rata hembra.
- 2.- Determinar si la lactancia modifica la solubilidad de la proteína tau inducida por estrés crónico en el hipocampo de la rata hembra.
- 3.- Determinar la localización anatómica de tau fosforilada en el hipocampo de la rata hembra expuesta a estrés crónico.

## 5. Diseño experimental

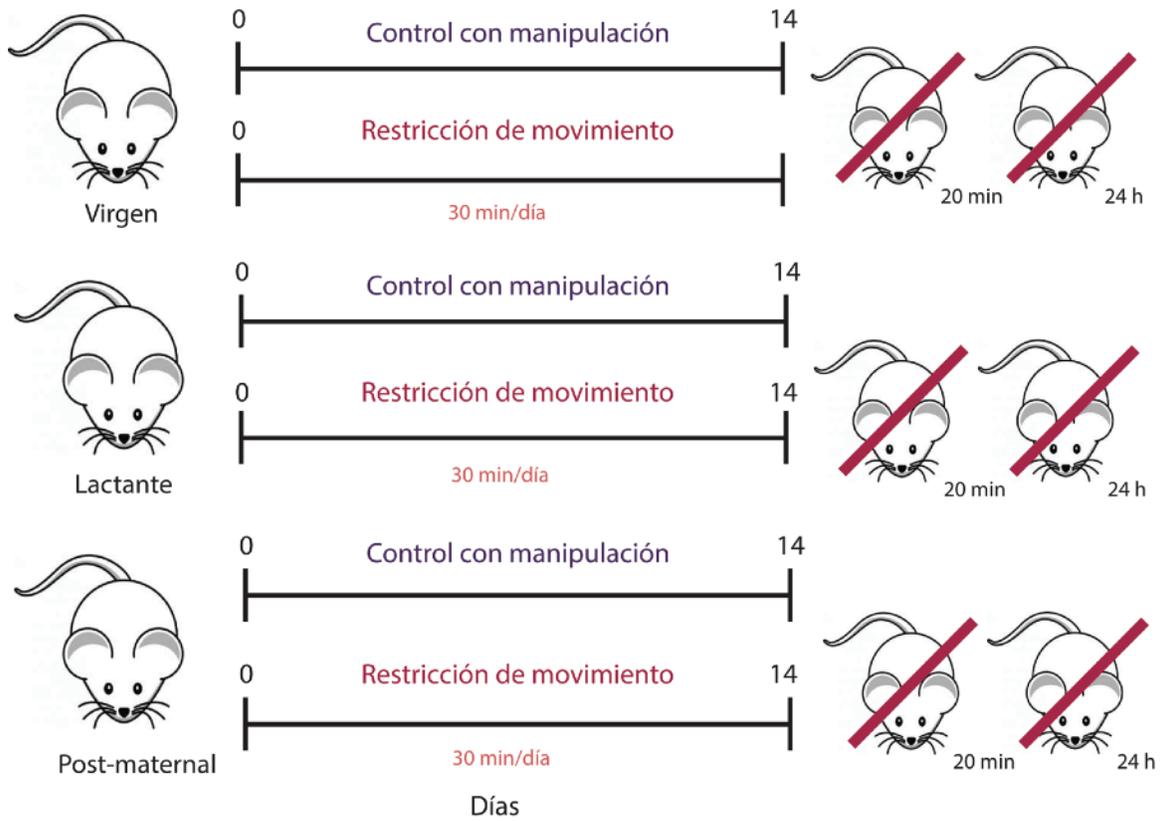


Figura 7. Diagrama representativo del diseño experimental

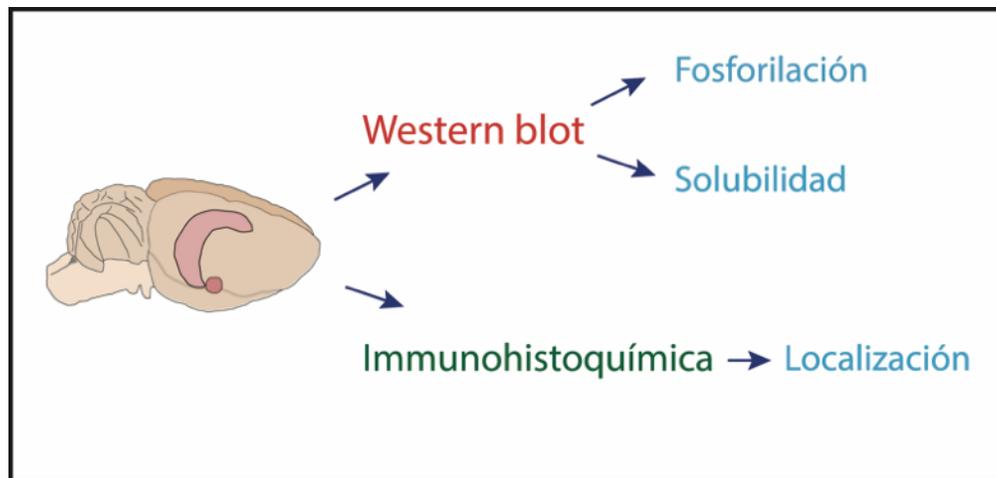


Figura 8. Diagrama representativo de las técnicas a usar en los hipocampos de las ratas controles y estresadas, como se describió en la figura anterior.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Animales**

En el presente estudio se utilizaron ratas Wistar hembra adultas (200 - 250 gr. de peso corporal) en tres condiciones reproductivas diferentes: vírgenes, lactantes primíparas (con camadas de 8 - 10 crías) y post-maternales (destetadas al día 21 post-parto un mes después del fin de su lactancia). Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de luz/oscuridad (12/12), temperatura controlada a 25 °C, con humedad del 40 - 50%, con agua y comida ad libitum en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla. El protocolo experimental (protocolo #49) fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso Animal del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los animales fueron manipulados de acuerdo con la Guía para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud.

### **6.2 Paradigma de estrés crónico**

El paradigma de estrés crónico consistió en colocar a los animales en un restrictor de acrílico, donde la cola queda fuera del restrictor pero el animal queda inmovilizado y no puede voltearse. Esta restricción dura 30 minutos y se aplica durante 14 días consecutivos. Al final de su último episodio de estrés, los animales fueron regresados a sus cajas por 20 minutos o 24 horas y sacrificados con una dosis letal de uretano (1.5-2 g/kg b.w. IP). Aunque existen reportes de que el uretano puede inducir la fosforilación de tau, esto ocurrió en un periodo de tiempo mucho más largo al usado en nuestro protocolo (Holscher et al., 2008). Posteriormente fueron procesados para extracción de tejido fresco o perfusión. El protocolo de estrés se aplicó a ratas lactantes a partir del día 4-5 post-parto y en las ratas post-maternales se aplicó 1 mes después del destete (destete al día 21 post-parto). Los controles de cada condición fueron animales en la misma condición reproductiva pero que fueron únicamente manipulados durante la duración del protocolo de restricción.

## 6.3 Western blot

### 6.3.1 Niveles de fosforilación general

A los 20 minutos o 24 horas después de la exposición a su último episodio de estrés los animales fueron anestesiados con uretano al 20% (Holscher et. al., 2008) e inmediatamente sacrificados por decapitación, el hipocampo rápidamente removido, colocado en hielo seco y almacenados a -70 °C hasta su procesamiento para homogenar. El tejido almacenado fue homogenado en buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA) (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.25% deoxicolato de sodio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 1 µM de ácido okadaico). Antes de la homogenización, se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasas PMSF, NaF (1mM) y cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas Halt al 1% (ThermoFisher Scientific). Después de homogenizar, las fracciones RIPA fueron obtenidas centrifugando a 18,000 x g por 20 minutos y el sobrenadante colectado. El contenido de proteína fue cuantificado por el método de Bradford. Las proteínas entonces fueron hervidas a 95 °C por 5 minutos en buffer de condiciones reductoras (SDS, BME y glicerol). 25 µg de proteína fueron separados en un gel de acrilamida al 10% por electroforesis y transferidos a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-húmeda a 20V por 45 minutos. Para evitar asociación no específica del anticuerpo la membrana fue bloqueada mediante la incubación en 5% de leche en TTBS por 30 minutos. Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario en 1% de leche en TTBS durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios fueron detectados con un anticuerpo secundario anti-ratón asociado a peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente (dilución 1:1000) y revelado usando un kit de quimio-luminiscencia. Las lecturas de intensidad de banda fueron hechas con el software ImageLab de BioRad. Las lecturas de intensidad de banda fueron normalizadas a la intensidad del control de carga.

### **6.3.2 Niveles de fosforilación en diferentes fracciones solubles**

Para el análisis de solubilidad se usó un protocolo previamente descrito (Rissman, 2007) en el cual el tejido hipocampal se homogeneizó primero en un buffer alto en sales RAB (G-Biosciences; 0.1 M MES, 0.75 M NaCl, 1 mM EGTA y 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>) con inhibidores de proteasas y fosfatasa en las concentraciones antes descritas (1%) y se centrifugó a 40,000 x g por 40 minutos. El sobrenadante fue recolectado y el pellet re-suspendido en buffer RIPA preparado como se describió anteriormente para obtener las fracciones solubles en detergente y centrifugado a 40,000 x g por 40 minutos y el sobrenadante recolectado. El contenido de proteína fue determinado usando un kit para cuantificación de proteínas BCA (Pierce Biotechnology, Rockford IL). Las proteínas posteriormente se hirvieron en buffer en condiciones reductoras que contenía SDS, BME y glicerol a 95°C por 5 minutos. Quince microgramos de proteína fueron separados en un gel de acrilamida al 10% por electroforesis y transferidos a una membrana de nitrocelulosa en un aparato de transferencia seca (iBlot2; Pierce Biotechnology, Rockford IL) a 25V por 7 minutos. La asociación no específica del anticuerpo fue bloqueada mediante la incubación en 5% de leche en TTBS por 30 minutos. Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario en 5% de albúmina bovina en TTBS durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios fueron detectados con un anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo asociado a peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente (dilución 1:1000) y revelado usando un kit de quimio-luminiscencia (Supersignal West Pico; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Las lecturas de intensidad de banda fueron hechas con el software ImageLab de BioRad y normalizadas al control virgen no estresada.

### **6.4 Anticuerpos**

Dos anticuerpos extensamente caracterizados fueron usados para evaluar la fosforilación hipocampal de tau usando Western blot en los residuos Ser<sup>202/Thr205</sup> (AT8, dilución 1: 500; MN1020. Invitrogen, Rockford, IL, USA) y Ser<sup>396/404</sup> (PHF-1, dilución 1: 1000; amablemente donado por el Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, Nueva York, USA). Para el análisis por inmunohistoquímica se usaron los anticuerpos específicos para los residuos Ser<sup>422</sup> (S422, dilución 1:1000; AB9664.

Millipore, Temecula, CA, USA) y Ser396/404 (PHF-1, dilución 1: 1000; amablemente donado por el Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, Nueva York, USA). Para la evaluación en la expresión y los niveles de actividad de la cinasa GSK3 se usaron anticuerpos específicos para niveles totales de GSK3 $\alpha/\beta$  (0011-A, dilución 1 : 1,000; sc-7291. Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, USA), GSK3 $\alpha/\beta$  activa (pY<sup>216</sup>, dilución 1 : 1,000; 612312. BD Biosciences) y GSK3 $\beta$  inactiva (pS9, dilution 1 : 1,000; 9336. Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) Se usaron como control de carga los anticuerpos para  $\alpha$ -tubulina (DM1A, dilución 1 : 5,000; T9026. Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y GAPDH (FL-335, dilución 1 : 2,000; sc-25778. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

### **6.5 Perfusión y obtención de cortes**

Después de la exposición a estrés crónico, los animales fueron anestesiados con una dosis letal de uretano al 20% e inmediatamente perfundidos vía intracardiaca con solución salina isotópica seguida de 250 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% (pH 9.5, 10 °C). Los cerebros fueron post-fijados durante 3 horas en PFA y posteriormente crioprotegidos en solución de sacarosa al 30% durante dos días a 4 °C. Posteriormente se colectaron 5 series de rebanadas coronales de 30  $\mu$ m de espesor. Los cortes se preservaron en solución crioprotectora a -20 °C hasta su procesamiento.

### **6.6 Inmunohistoquímica**

Para evaluar la localización de tau fosforilada en el hipocampo se usaron los anticuerpos S422 y PHF-1, que detectan fosforilación en los residuos Ser<sup>422</sup> y Ser<sup>396/404</sup> respectivamente, y cuya especificidad ha sido extensamente documentada. Se usaron los anticuerpos en secciones flotantes de hipocampo. En el caso del anticuerpo S422, peróxido de hidrógeno al 0.3% fue usado para neutralizar peróxidos endógenos y borohidrato de sodio al 0.1% se usó para reducir aldehídos libres reactivos. La reacción de revelado se llevó a cabo mediante una técnica de DAB peroxidasa mejorada por nickel (Vector Laboratories, Inc., CA, USA).

## **6.7 Procesamiento de imágenes**

Se observó la fosforilación de tau en el residuo Ser<sup>396/404</sup> usando el anticuerpo PHF-1 con un microscopio marca Zeiss LSM510 Meta y se tomaron fotomicrográficas de secciones representativas del hipocampo, especialmente el área CA3 y CA4, donde la señal fue visible. Las imágenes fueron tomadas con objetivos de 20x y 40x, con una cámara Nikon a nivel de microscopio.

## **6.8 Análisis morfológico**

Para analizar la fosforilación de tau por inmunohistoquímica, cinco microfotografías se tomaron en 5 secciones por animal en las áreas CA3 y CA4 del hipocampo con una extensión rostrocaudal aproximadamente entre Bregma -3.36 y Bregma -4.44. De las imágenes tomadas con un objetivo 20x se seleccionó una región de interés (RDI) rectangular de 213.12  $\mu\text{m}$  x 248.64  $\mu\text{m}$  (52,990.15  $\mu\text{m}^2$ ) que cubriese en su mayoría el área ocupada por la señal tanto en CA3 como en CA4. Posteriormente se seleccionó la señal usando el contraste de la imagen y transformando esta selección a colores binarios. El porcentaje de área que cubría la señal inmunopositiva en la RDI fue cuantificada usando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) y posteriormente comparada entre las diferentes condiciones.

## **6.9 Determinación de la fase del ciclo estral**

Se usó un grupo separado de ratas vírgenes y post-maternales para la determinación del ciclo estral con el objetivo de evitar la estimulación vaginal adicional en nuestros grupos con estrés. Durante el protocolo de estrés (14 días), las ratas se colocaron en el restrictor y se tomaron frotis vaginales. La secreción vaginal se recogió con una pipeta Pasteur de plástico llena con 1 ml de solución salina (NaCl 0.9%) insertando la punta en la vagina de la rata, tan superficialmente como fue posible. Se colocó fluido vaginal en portaobjetos de vidrio. El fluido vaginal se recogió con una pipeta limpia de cada rata y luego se analizó con un microscopio con lente 10x con la técnica de citología directa. El número y la duración de los ciclos estrales durante el protocolo de estrés se cuantificaron como cada vez que un día de proestro o diestro (debido a la corta

duración del proestro en la rata) fue seguido por un estro y la longitud se contó desde el primer día de diestro / metestro antes de este estro (Cora et al., 2015). Para cuantificar el porcentaje de días en una proporción alta de estrógeno / progesterona (E / P alta), el número de días que se pasó en proestro o estro se dividió por los 14 días del protocolo de estrés. Utilizamos la definición de E / P alta como se describió anteriormente en Broestl, et al., 2018 en la que los días dominantes en estrógenos o E / P alta son proestro y estro, y los días dominantes en progesterona o E / P baja son metestro y diestro. Los gráficos de los ciclos estrales se crearon usando Python 3.7 (Python Software Foundation. Python Language Reference).

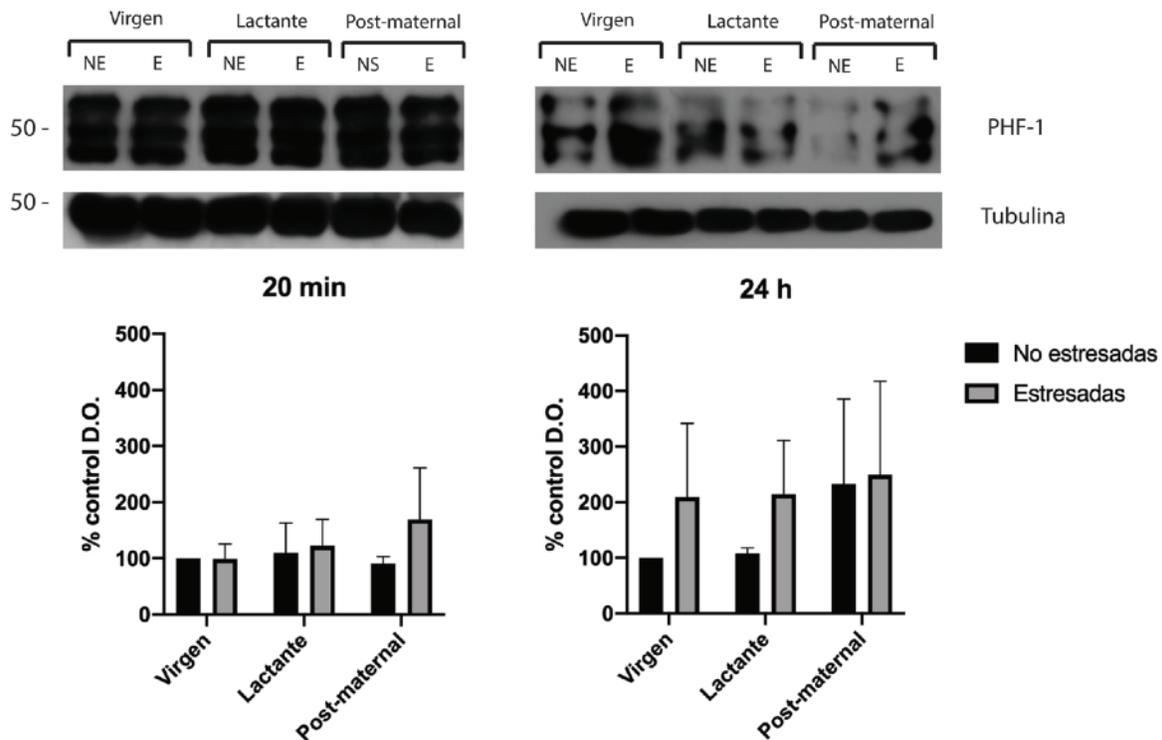
### **6.10 Análisis estadístico**

Las intensidades ópticas integradas de los Western blots fueron analizadas utilizando una ANOVA de dos vías (factor 1: condición reproductiva; factor 2: estrés) seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni únicamente en el factor que resultó significativo. Los resultados obtenidos se representan como gráficas de barras con promedios  $\pm$  SEM del porcentaje de los valores controles. Para el análisis de la fosforilación por inmunohistoquímica los porcentajes de área obtenidos se analizaron utilizando una ANOVA de dos vías con los mismos factores usados para el análisis por Western blot; seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni únicamente en el factor que resultó significativo. El número de ciclos estrales, la duración de los ciclos y el porcentaje de días en una proporción E/P alta se analizaron usando una prueba t-student. Todas las pruebas estadísticas se realizaron en el software PRISM 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Cada grupo control y experimental tuvo una N de 5 animales. Pruebas con resultados  $P < 0.05$  se consideraron como significativos.

## 7. Resultados

### 7.1 Niveles generales de fosforilación de tau a los 20 minutos y 24 horas después del último episodio de estrés

El análisis por Western blot de extractos de hipocampo utilizando buffer RIPA se usó para evaluar los cambios en los niveles generales de fosforilación de tau inducida por estrés. Como se muestra en la Figura 9, las ratas estresadas no mostraron diferencias significativas con respecto al control virgen no estresada en el epítipo de fosforilación de PHF-1, tanto a los 20 minutos como a las 24 horas posteriores al último episodio de estrés.



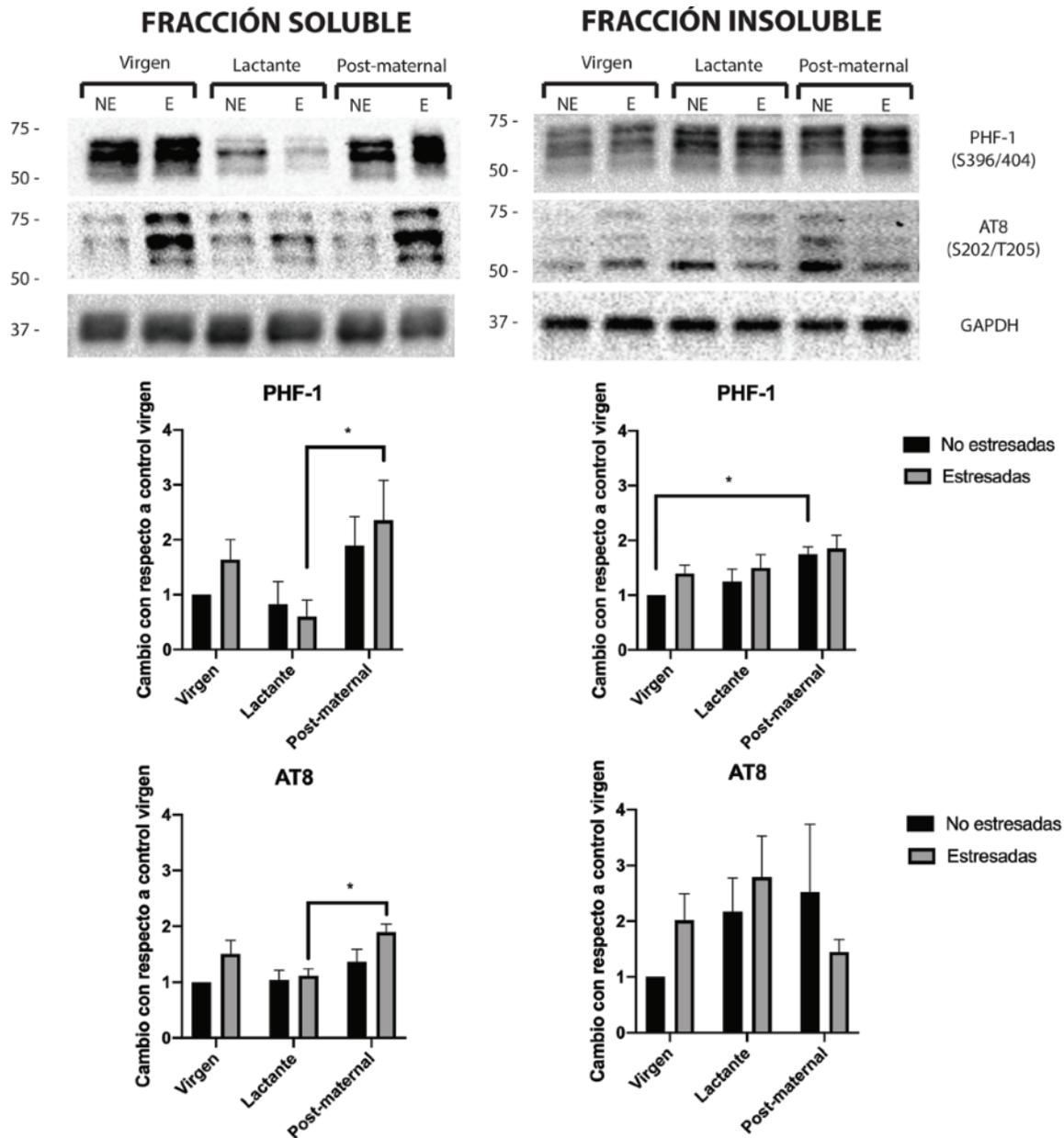
**Figura 9. Las ratas estresadas no muestran diferencias significativas con las ratas sin estrés después del último episodio de estrés.** Western blot representativo utilizando el anticuerpo PHF-1 dependiente de tau fosforilada en el hipocampo de ratas hembras en diferentes etapas reproductivas: ratas vírgenes, lactantes y post-maternales, y sacrificadas a los 20 min o 24 h después de su último episodio de estrés. No se encontraron diferencias significativas en todas las etapas reproductivas a los 20 minutos o 24 horas después del último episodio de estrés. Las barras representan promedios  $\pm$  SEM; \*  $P < 0.05$ ;  $N = 4$ .

## **7.2. Efecto del estrés crónico en la fosforilación de tau en diferentes fracciones solubles**

### **7.2.1. Efecto del estrés crónico 20 minutos después del último episodio de estrés**

Dado que el aumento de la fosforilación de tau después de un protocolo similar de estrés crónico (Rissman et. Al., 2007; Rissman et. Al., 2012) promueve la formación de agregados de tau-P y, por lo tanto, insolubilidad, se utilizó Western blot en muestras de hipocampo sometidas a extracción secuencial de fracciones solubles para evaluar la fosforilación y solubilidad de tau. Como se muestra en la Figura 10, el análisis factorial reveló una contribución significativa solo del factor de condición reproductiva, según lo evaluado con el anticuerpo PHF-1 ( $F_{2, 19} = 5.267$ ,  $P = 0.015$ ) y una contribución significativa de ambos factores según lo evaluado con el anticuerpo AT8 (factor condición reproductiva  $F_{2, 17} = 4.685$ ,  $P = 0.024$ ; factor estrés  $F_{1, 17} = 6.369$ ,  $P = 0.022$ ; interacción  $F_{2, 17} = 1.034$ , no significativo) en la fracción soluble a los 20 minutos después de la manipulación o último episodio de estrés. Como se muestra en la Figura 10A y B, las ratas post-maternales mostraron un aumento significativo de tau-P en comparación con las ratas lactantes estresadas evaluadas por los anticuerpos PHF-1 ( $P = 0.0259$ ) y AT8 ( $P = 0.0138$ ).

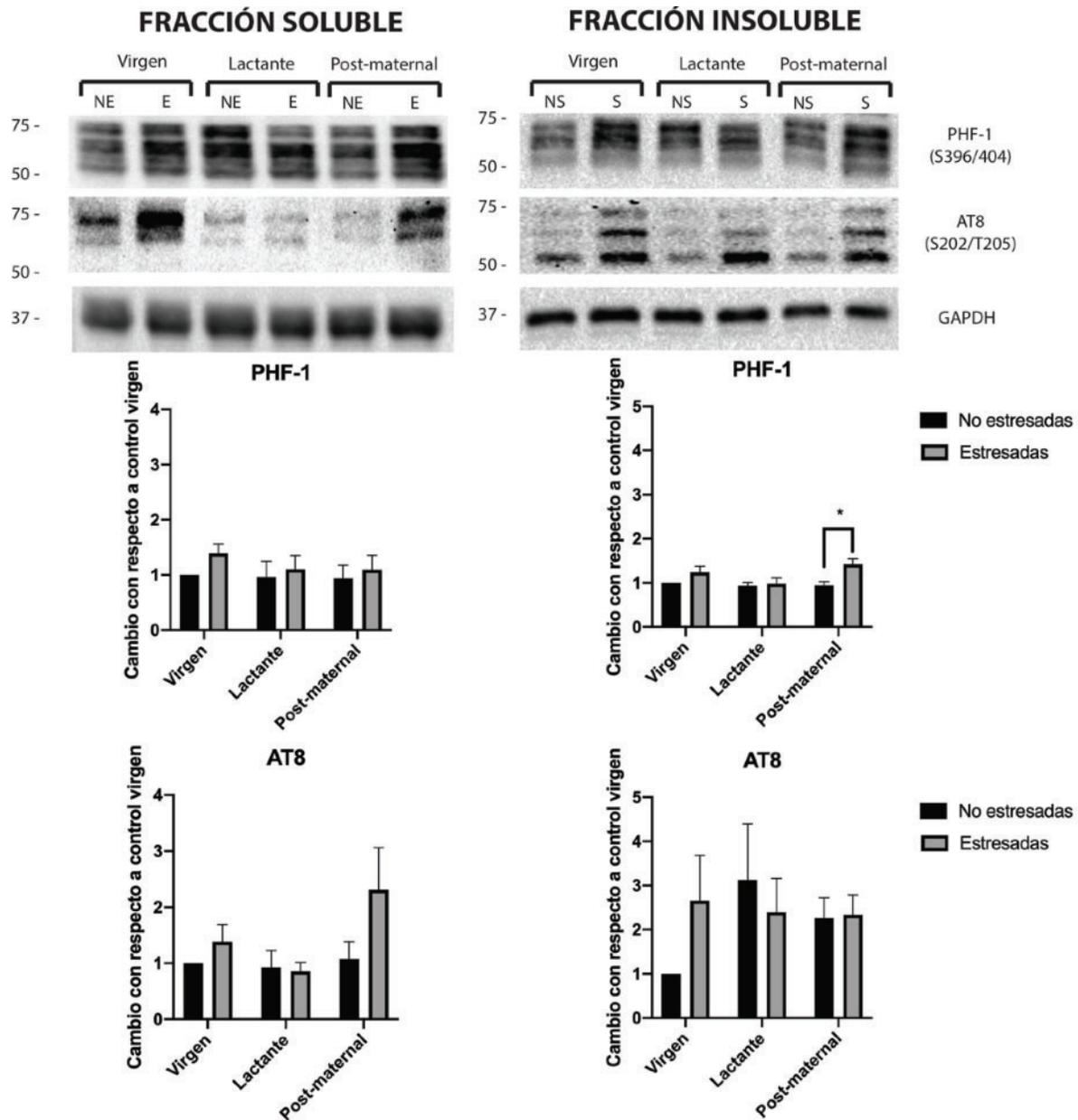
Además, el análisis factorial de la fracción insoluble evaluada por el anticuerpo PHF-1 mostró una contribución significativa solo del factor condición reproductiva ( $F_{2, 17} = 5.593$ ,  $P = 0.013$ ; factor estrés;  $F_{1, 18} = 2.687$ , no significativo) sin interacción entre factores ( $F_{2, 18} = 0.3053$ , no significativo). El análisis post-hoc reveló un aumento significativo de tau-P (Figura 10C) en ratas post-maternales no estresadas ( $P = 0.0316$ ) en comparación con los controles vírgenes no estresados.



**Figura 10. Las ratas post-maternas muestran un aumento significativo en la fosforilación de tau 20 minutos después del último episodio de estrés en la fracción soluble e insoluble.** Se sacrificaron ratas hembras en diferentes etapas reproductivas (virgen, lactante y post-maternales) 20 minutos después de su último episodio de estrés (E) o después de la manipulación / sin estrés (NE). A) Las ratas post-maternales estresadas tenían niveles de fosforilación significativamente más altos en comparación con las ratas lactantes estresadas según lo evaluado por los anticuerpos PHF-1 y AT8 en la fracción soluble. c) Las ratas post-maternales no estresadas presentaron significativamente más tau-P que las ratas vírgenes no estresadas según lo evaluado por PHF-1 en la fracción insoluble. No se encontraron diferencias significativas en las ratas lactantes estresadas en comparación con los controles no estresados en ningún tiempo de sacrificio. Los datos se presentan como porcentaje del grupo de control virgen (Promedios  $\pm$  SEM; \* P < 0.05; N = 4-5).

### **7.2.2. Efecto del estrés crónico 24 horas después del último episodio de estrés**

Cuando las fracciones soluble e insoluble se evaluaron 24 horas después del último episodio de estrés, el análisis factorial reveló una contribución significativa del factor estrés ( $F_{1, 19} = 8.116$ ,  $P = 0.010$ ) según lo evaluado por el epítipo PHF-1 únicamente en la fracción insoluble. Como se muestra en la Figura 11C, el análisis post-hoc mostró que las ratas post-maternales estresadas tenían significativamente más tau-P que sus controles no estresados ( $P = 0.0193$ ).

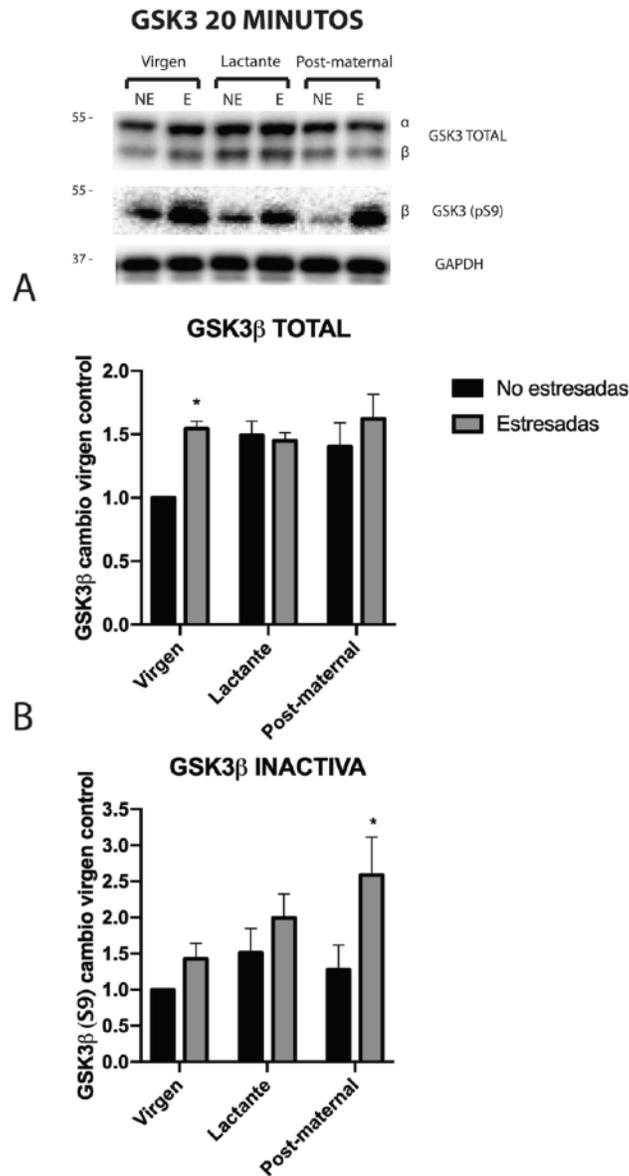


**Figura 11. Las ratas post-maternales estresadas muestran un aumento significativo en la fosforilación de tau 24 horas después del último episodio de estrés en la fracción insoluble.** Se sacrificaron ratas hembras en diferentes etapas reproductivas: ratas vírgenes, lactantes y post-maternales (destetadas 21 días después del parto) no estresadas / manipulación (NE) o 24 horas (E) después de su último episodio de estrés. Las ratas post-maternales estresadas tenían niveles de fosforilación significativamente más altos que sus controles no estresados en la fracción insoluble evaluada por el epítipo PHF-1. No se encontraron diferencias significativas en ratas vírgenes o lactantes estresadas en la fracción soluble o insoluble. Las barras representan promedios  $\pm$  SEM; \*  $P < 0,05$ ;  $N = 4 - 5$ .

### **7.3.- Efecto de la condición reproductiva y el estrés crónico en la cinasa GSK3**

Con el fin de investigar posibles mecanismos que expliquen la fosforilación inducida por estrés observada en ratas vírgenes y post-maternales estresadas, cambios en GSK3, una cinasa de tau bien caracterizada con activación en este modelo de estrés (Steinmetz et al., 2015), se midieron mediante Western blot de la fracción soluble. El análisis factorial mostró un efecto significativo únicamente del factor estrés ( $F_{1, 18} = 5.662$ ,  $P = .029$ ; factor condición reproductiva  $F_{2, 18} = 2.150$ , no significativo; interacción  $F_{2, 18} = 2.839$ , no significativo) en los niveles generales de GSK3 $\beta$  en ratas que fueron sacrificadas 20 minutos después de ser manipuladas o el último episodio de estrés. Como se muestra en la Figura 12A, las ratas vírgenes estresadas ( $P = 0.0178$ ) tuvieron niveles significativamente más altos de GSK3 $\beta$  total. Curiosamente, en el mismo tiempo de sacrificio, el análisis factorial reveló una contribución significativa del factor de estrés ( $F_{1, 17} = 6.658$ ,  $P = 0.019$ ; factor de condición reproductiva  $F_{2, 18} = 2.541$ , no significativo; interacción  $F_{2, 18} = 1.125$ , no significativo) cuando se evalúa mediante un anticuerpo específico para GSK3 $\beta$  fosforilada en Ser<sup>9</sup>, lo que hace que la cinasa se inactive, y donde el análisis post-hoc reveló que las ratas post-maternales estresadas tenían niveles significativamente mayores ( $P = 0.0357$ ) de GSK3 inactiva en comparación con sus controles no estresados (Figura 12B).

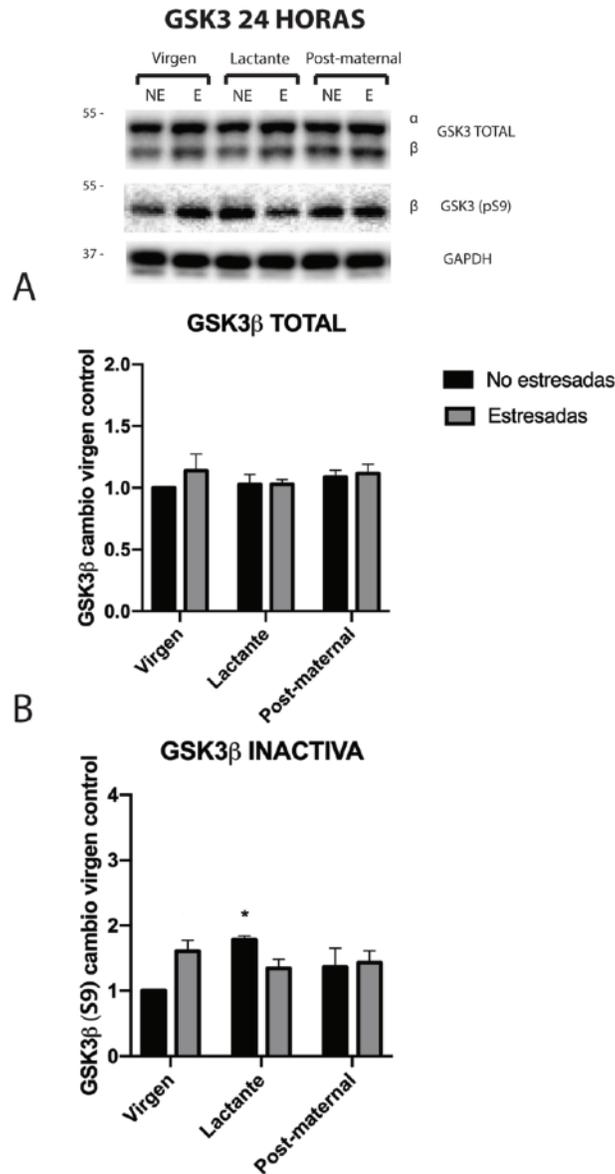
## FRACCIÓN SOLUBLE



**Figura 12.** Las ratas vírgenes estresadas muestran un aumento significativo en los niveles totales de GSK3β mientras que las ratas post-maternales estresadas muestran un aumento en GSK3β inactiva 20 minutos después del último episodio de estrés / manipulación. Western blot se realizó usando anticuerpos específicos para GSK3 para analizar posibles mecanismos de tau-p inducida por estrés en ratas vírgenes, lactantes y postmaternales sacrificadas 20 minutos después de la manipulación (NE) o su último episodio de estrés (E). (A) Ratas vírgenes estresadas mostraron un aumento significativo en los niveles totales de GSK3β 20 min después del último episodio de estrés. (B) Las ratas post-maternales estresadas mostraron un aumento significativo en GSK3β (S9). Los datos se presentan como porcentaje del grupo de control virgen (promedio ± SEM; \* P <0.05; N = 4-5).

Cuando se evaluó GSK3 $\beta$  inactiva 24 h después del último episodio de manipulación o estrés, se encontró una contribución significativa de la interacción condición reproductiva x estrés ( $F_{2, 18} = 4.935$ ,  $P = .020$ ), pero no de los factores de forma individual (factor de la etapa reproductiva  $F_{2, 18} = 1.263$ , no significativo; factor de estrés  $F_{1, 18} = 0.3455$ , no significativo). Como se muestra en la Figura 13B, se encontró un aumento significativo en GSK3 $\beta$  inactiva cuando las ratas lactantes no estresadas ( $P = 0.0112$ ) se compararon con los controles vírgenes no estresados. Curiosamente, las ratas vírgenes estresadas tenían una tendencia no significativa ( $P = 0.056$ ) para niveles mas altos de GSK3 $\beta$  inactiva en comparación con sus controles no estresados. No se encontraron diferencias significativas en GSK3 $\beta$  activa (Y<sup>216</sup>) en ninguna condición reproductiva o tiempo de sacrificio (Figura 14). No se encontraron diferencias significativas en GSK3 $\alpha$  (total o activa) en ninguna condición reproductiva o tiempo de sacrificio (Figura 15).

## FRACCIÓN SOLUBLE



**Figura 13 .Las ratas lactantes no estresadas muestran un aumento significativo en GSK3 $\beta$  inactivo 24 horas después del último episodio de estrés / manipulación.** Se realizó Western blot usando anticuerpos específicos para GSK3 para analizar posibles mecanismos de tau-P inducida por estrés en ratas vírgenes, lactantes y postmaternales sacrificadas 20 min o 24 h después de la manipulación (NE) o su último episodio de estrés (E). Las ratas lactantes no estresadas mostraron un aumento en GSK3 $\beta$  inactivo 24 h después de ser manipuladas. No se encontraron diferencias significativas en los niveles generales de GSK3 $\beta$  24 h después del último episodio de estrés. Los datos se presentan como porcentaje del grupo de control virgen (promedio  $\pm$  SEM; \* P < 0.05; N = 4-5).

# FRACCIÓN SOLUBLE

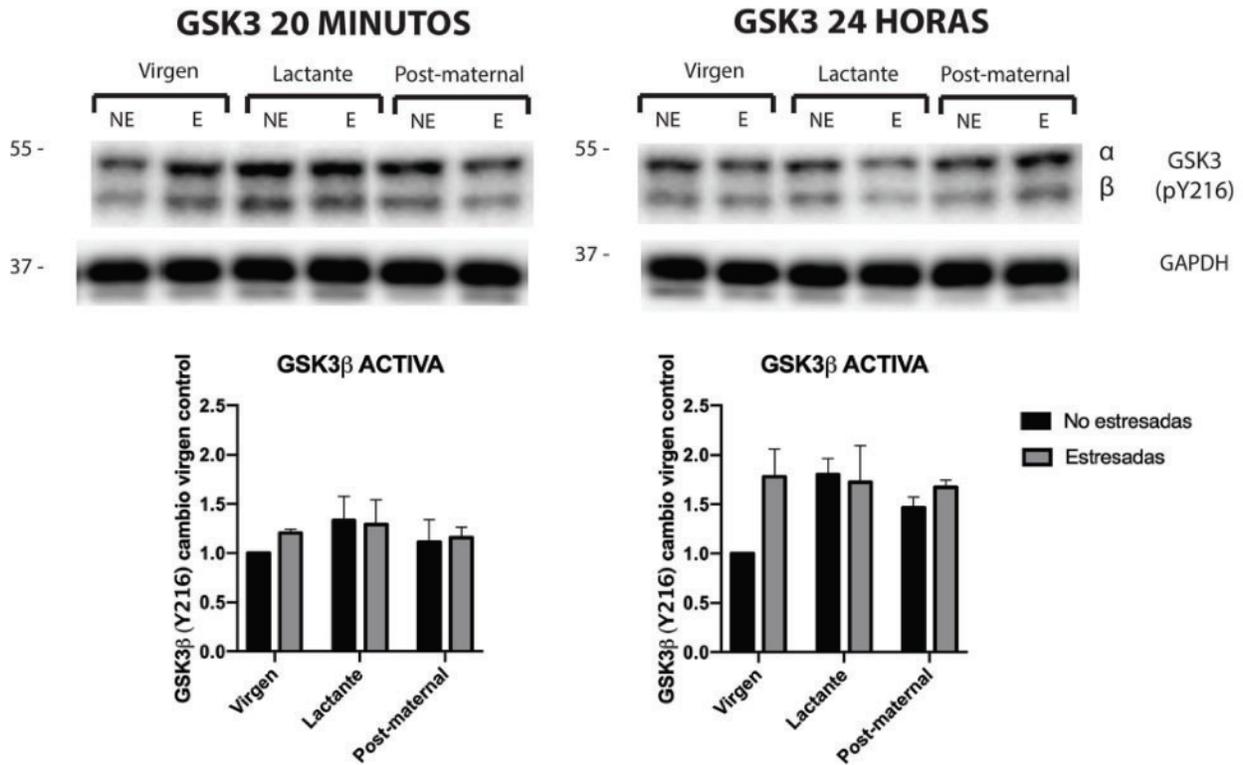


Figura 14. Los niveles de GSK3β activa no se vieron significativamente afectados por el protocolo de estrés crónico por restricción en ninguna condición reproductiva o tiempo de sacrificio. Se sacrificaron ratas hembras en diferentes etapas reproductivas (virgen, lactante y post-maternal) ya sea 20 minutos o 24 horas después de su último episodio de estrés (E) o después de la manipulación / sin estrés (NE). Los datos se presentan como porcentaje del grupo de control virgen (promedio ± SEM; N = 4 - 5).

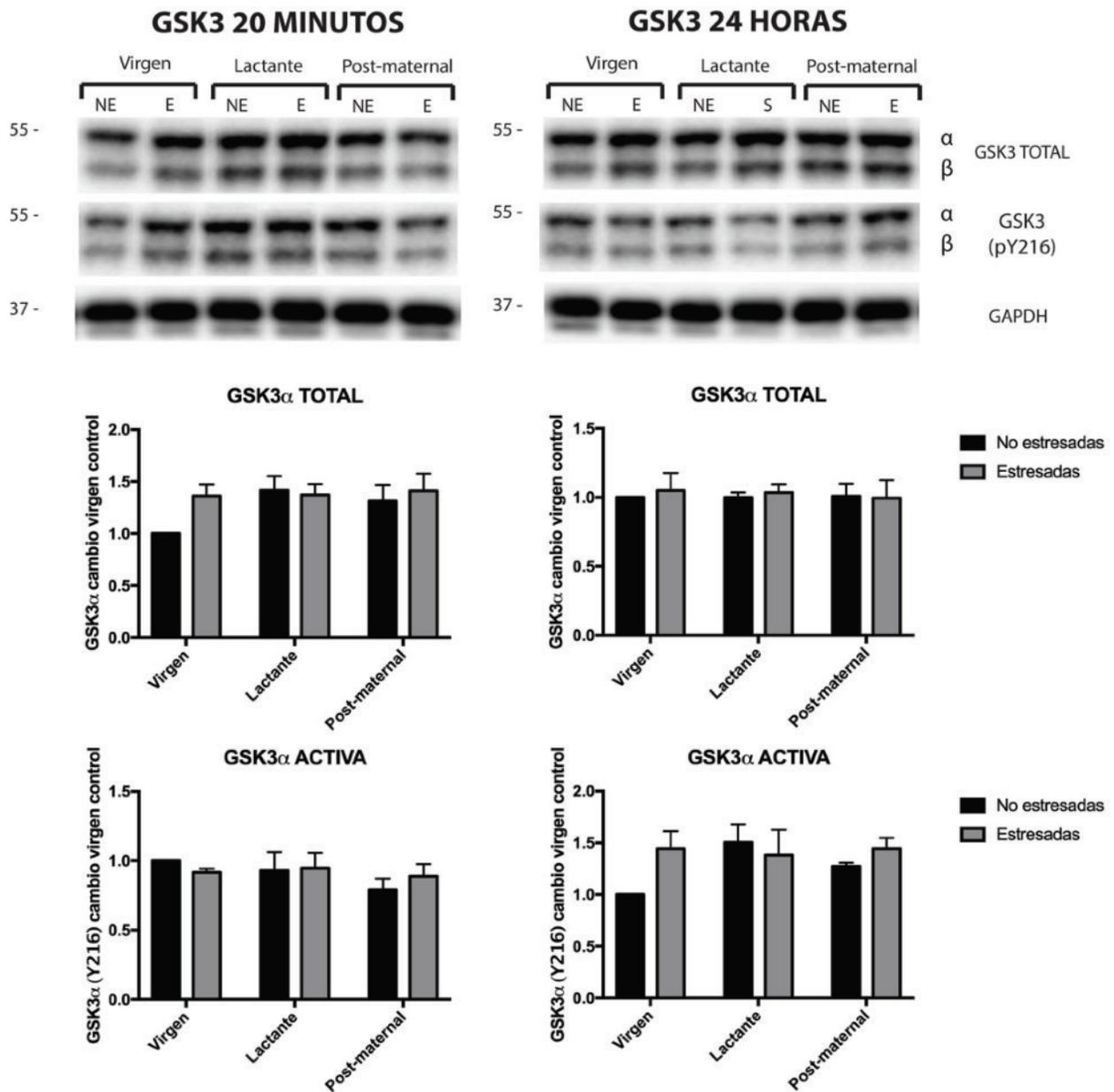


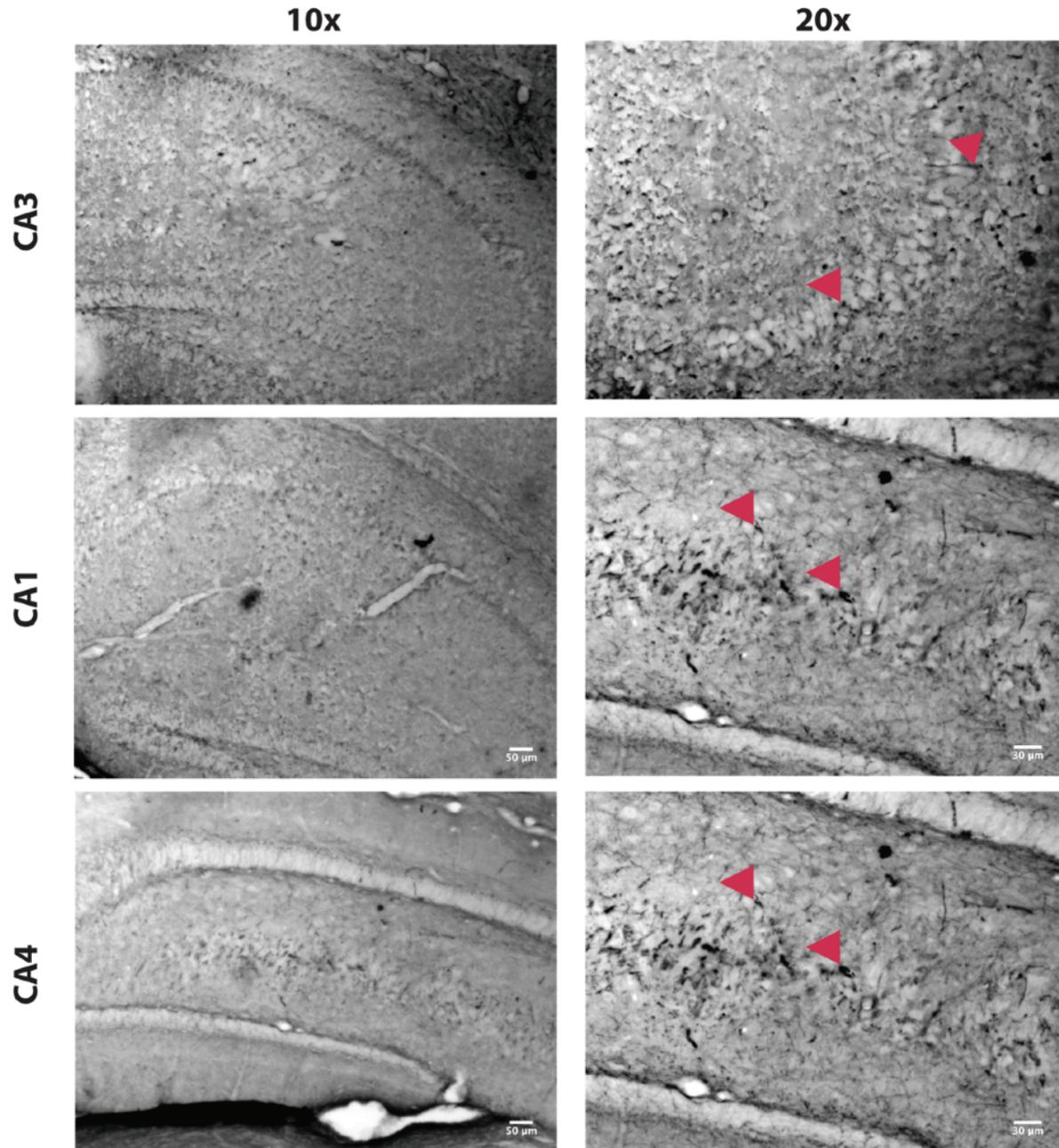
Figura 15. Los niveles de GSK3 $\alpha$  total o activa no se vieron significativamente afectados por el protocolo de estrés crónico por restricción en ninguna condición reproductiva o tiempo de sacrificio. Se sacrificaron ratas hembras en diferentes etapas reproductivas (virgen, lactante y post-maternal) ya sea 20 minutos o 24 horas después de su último episodio de estrés (E) o después de la manipulación / sin estrés (NE). Los datos se presentan como porcentaje del grupo de control virgen (promedio  $\pm$  SEM; N = 4 - 5).

## **7.4. Localización y cuantificación de la fosforilación de tau en el hipocampo de ratas hembra expuestas a estrés crónico**

### **7.4.1. Validación de anticuerpos PHF-1 y S422 en tejido de ratón triple transgénico**

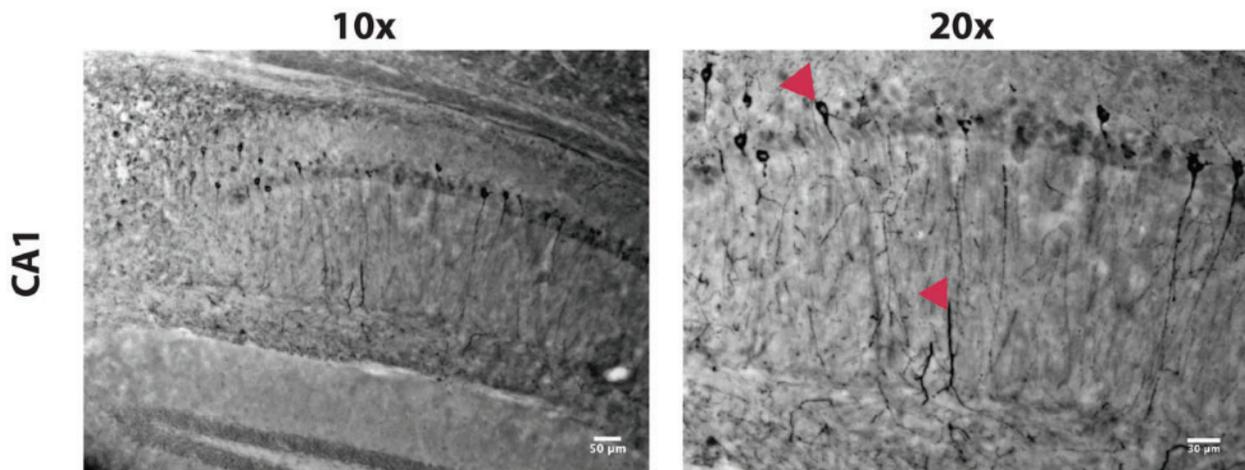
Se usó tejido de ratón triple transgénico (ampliamente conocido como 3xTg) como control positivo de nuestra técnica de inmunohistoquímica y los anticuerpos que decidimos usar para la misma. El ratón triple transgénico (3xTg) combina la expresión de las mutaciones APP<sup>swe</sup> y de tau P301L en un ratón con un background de mutación PSEN1<sup>M146V/-</sup> y que en conjunto recapitula detalladamente la patología de la EA (Oddo et. al., 2003; Götz & Ittner et. al, 2008). Se ha documentado que la detección de tau hiperfosforilada y agregada en NFTs puede ser detectada entre los 12 y 18 meses de edad del animal con anticuerpos como PHF-1 (Oddo et. al., 2003).

Como se muestra en la Figura 16, las fotomicrografías en cortes sagitales de ratón 3xTg a los 18 meses de edad muestran la detección de hiperfosforilación de tau con el anticuerpo PHF-1 (que detecta fosforilación en los residuos Ser<sup>396/404</sup>) en la regiones CA1, CA3 y CA4 (hilus del GD).



**Figura 16. El anticuerpo PHF-1 detecta tau fosforilada en las regiones CA1, CA3 y CA4 del hipocampo de un ratón 3xTg.** Tejido de ratón triple transgénico a los 18 meses de edad fue usado para validar que el anticuerpo detecta fosforilación de tau. Como se aprecia en la figura, el anticuerpo es capaz de detectar tau hiperfosforilada en tres regiones del hipocampo. Barra de escala 10x = 50 µm; barra de escala 20x = 30 µm.

En el caso del anticuerpo S422 (que detecta fosforilación en el residuo Ser<sup>422</sup>), como muestra la Figura 17 usando el mismo tejido de ratón transgénico, se puede observar que el anticuerpo marca preferencialmente y muy clara la región CA1 del hipocampo. Ambas marcas son consistentes con reportes anteriores y validan la correcta función de ambos anticuerpos.



**Figura 17. El anticuerpo S422 detecta tau fosforilada preferentemente en la región CA1 del hipocampo de un ratón 3xTg.** Tejido de ratón triple transgénico a los 18 meses de edad fue usado para validar la función del S422. Como se aprecia en la figura, el anticuerpo es capaz de detectar tau hiperfosforilada preferentemente en la región CA1 del hipocampo. Barra de escala 10x = 50 µm; barra de escala 20x = 30 µm.

#### **7.4.2. Localización de tau fosforilada usando el anticuerpo S422**

Al tiempo que se validaron y evaluaron los anticuerpos para inmunohistoquímica, se realizó la detección y cuantificación preliminar de tau-P con el anticuerpo S<sup>422</sup> usando el tejido de ratas hembras controles y expuestas a estrés crónico en todas las condiciones reproductivas. Con este anticuerpo se realizó la definición de la extensión del área de interés usado en nuestros experimentos posteriores con anticuerpo PHF-1.

Como se muestra en la Figura 18, fue posible detectar fosforilación de tau con el anticuerpo S422 en el área CA3 y CA4 del hipocampo, que es totalmente consistente con la distribución y marcaje del anticuerpo PHF-1. Este marcado será definido y discutido con más detalle más adelante. Además, como se observa en la Figura 18, un análisis preliminar de comparación de pares por una prueba t-student, muestra que las ratas vírgenes estresadas presentaron mayor porcentaje de área inmunoreactiva de S422 en el área CA3 del hipocampo que sus controles no estresados 20 minutos después de su último episodio de estrés ( $P = 0.0437$ ). No se detectaron diferencias significativas en las ratas lactantes o post-maternales al mismo tiempo de sacrificio en el área CA3. No se detectaron diferencias significativas en el área CA4 entre las diferentes condiciones reproductivas.

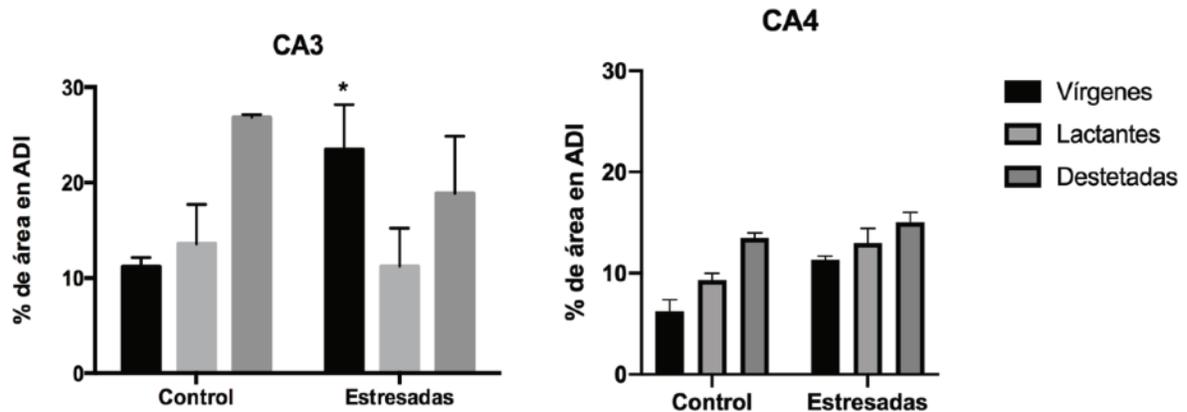
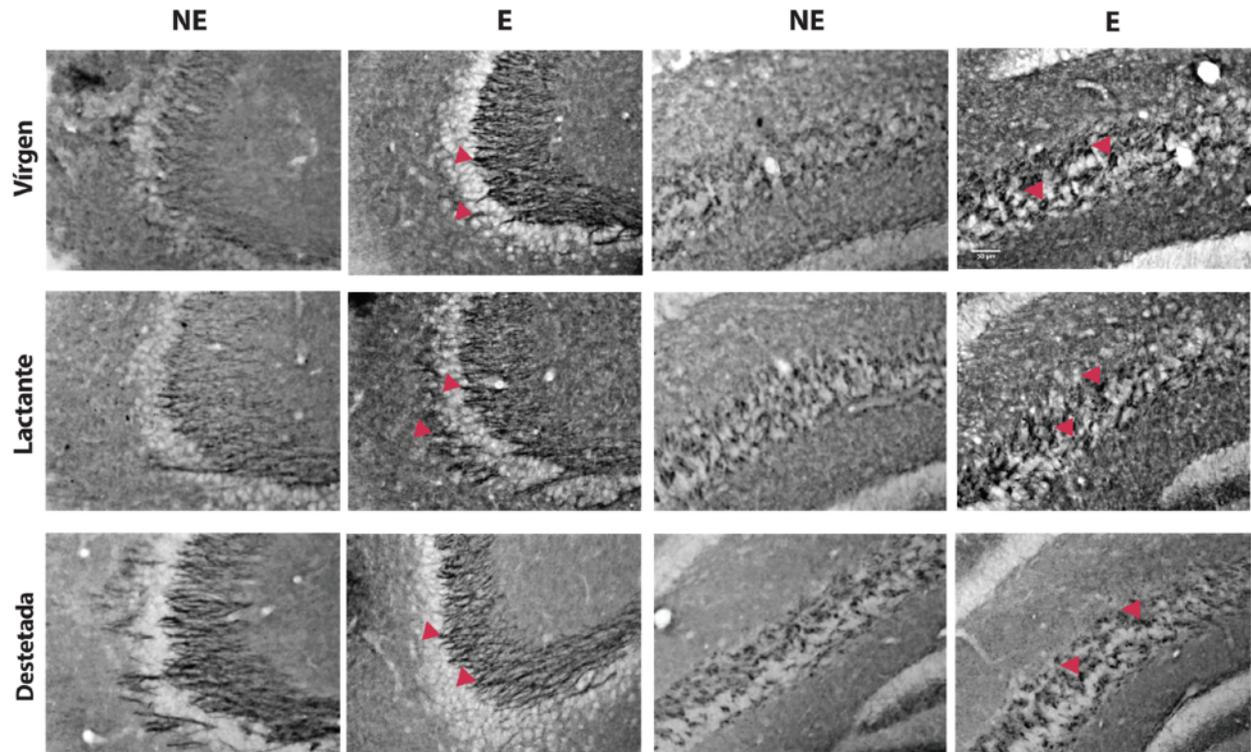
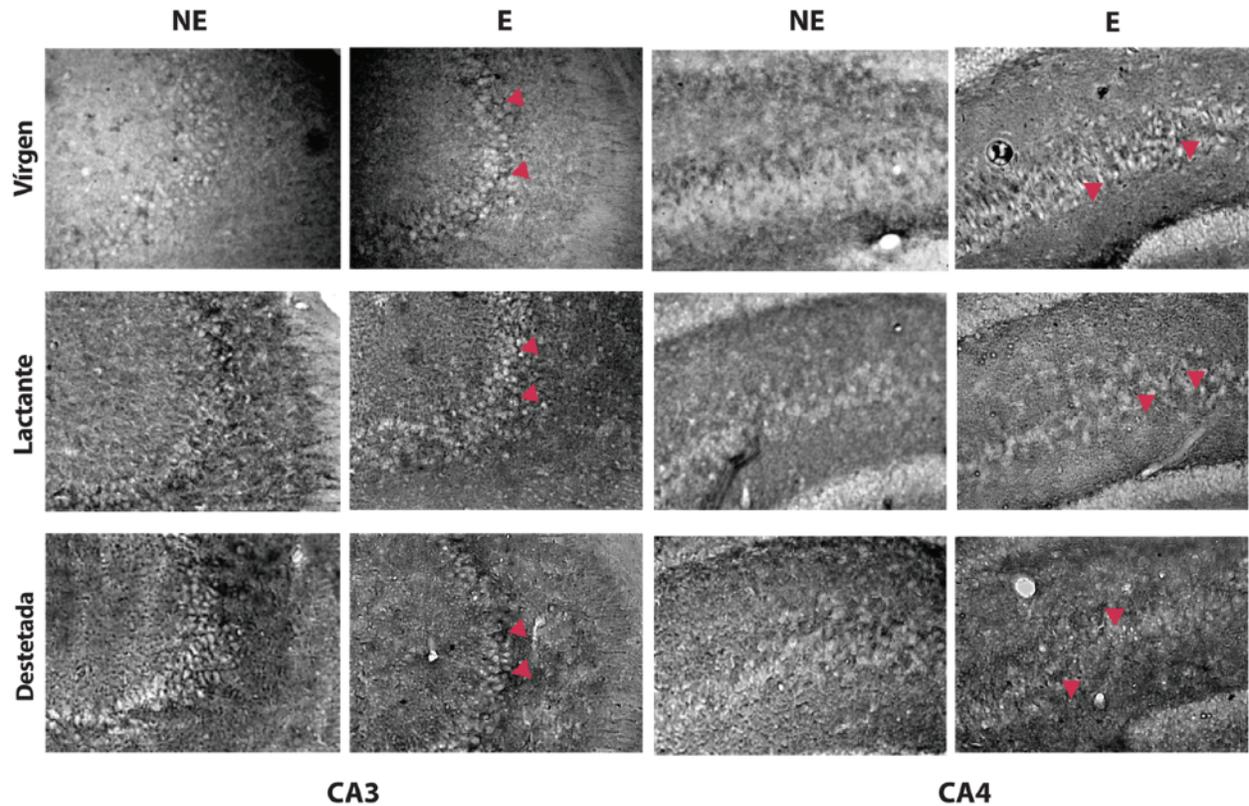


Figura 18. El estrés crónico aumentó significativamente la inmunoreactividad de tau fosforilada en el subcampo CA3 de ratas vírgenes 20 minutos después del último episodio de estrés evaluada con el anticuerpo S422. Fotomicrografías representativas y la cuantificación correspondiente demuestran la inmunorreactividad positiva a tau-P (S422) en los subcampos del hipocampo CA3 y CA4 de ratas estresadas y no estresadas (control) en las diferentes etapas reproductivas. No encontramos diferencias significativas en la inmunorreactividad de tau-P en ratas lactantes y ratas post-maternales a los 20 minutos después de la última episodio de estrés. Las barras representan promedios  $\pm$  SEM; \*  $P < 0.05$ ;  $N = 2-4$ .

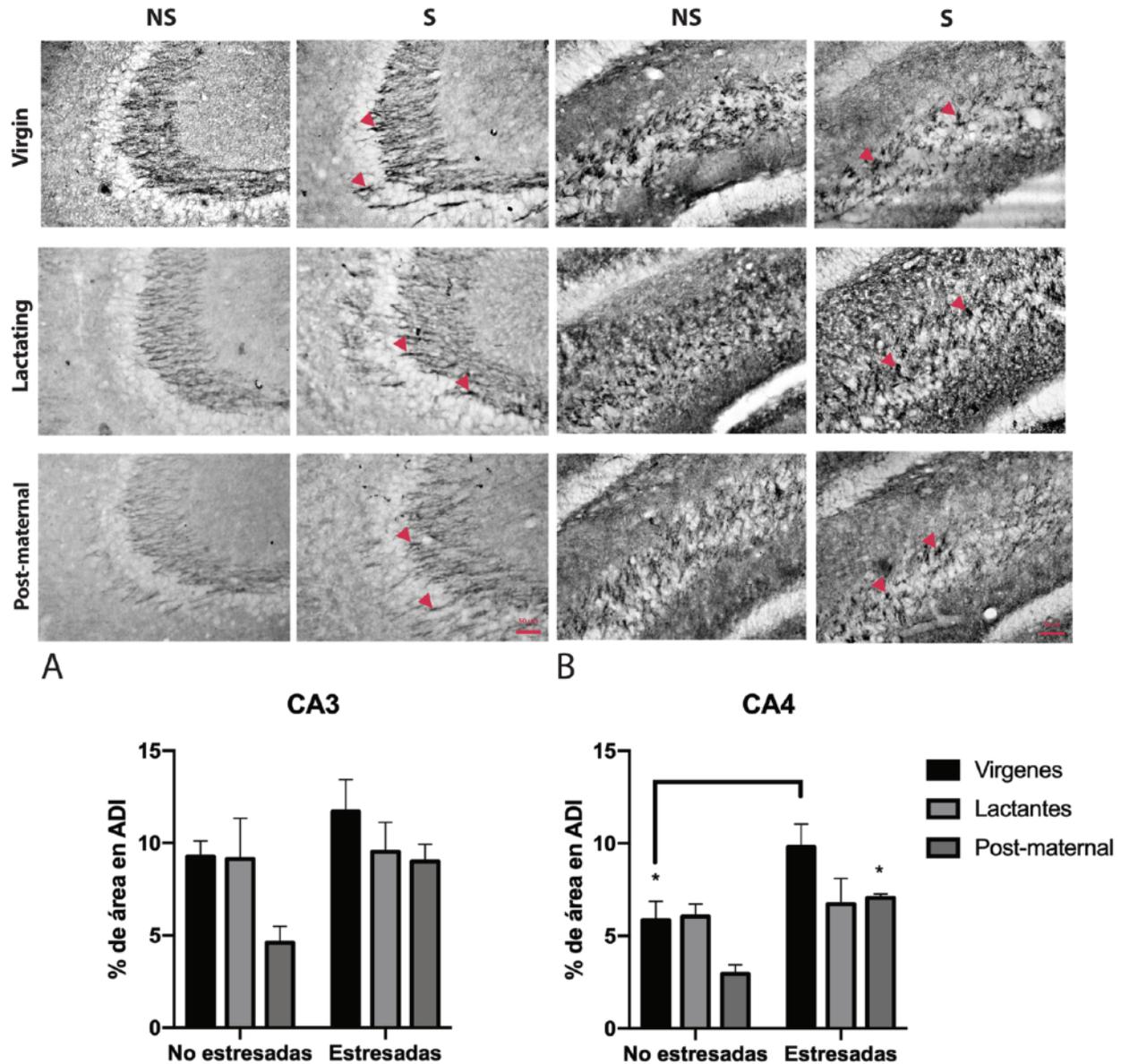
Las ratas sacrificadas 24 horas antes de su último episodio de estrés se encontró la misma distribución de la marca de inmunoreactividad de tau fosforilada aunque visualmente en un grado mucho menor al observado en las ratas sacrificadas 20 minutos después de su último episodio de estrés, como se observa en la Figura 19. No se hicieron pruebas estadísticas en este grupo por el bajo número de sujetos.



**Figura 19. La marca de tau fosforilada se mantiene en una menor proporción en las regiones CA3 y CA4 del hipocampo de ratas hembras controles y estresadas 24 después del último episodio de estrés.** Fotomicrografías representativas demuestran la inmunorreactividad positiva de tau fosforilada (S422) en los subcampos del hipocampo CA3 y CA4 de ratas estresadas y no estresadas (control) en las diferentes etapas reproductivas. No se realizó cuantificación correspondiente a estos sujetos y por lo tanto tampoco pruebas estadísticas; N =1-2.

### 7.4.3. Localización y cuantificación de tau fosforilada 20 minutos después del último episodio de estrés

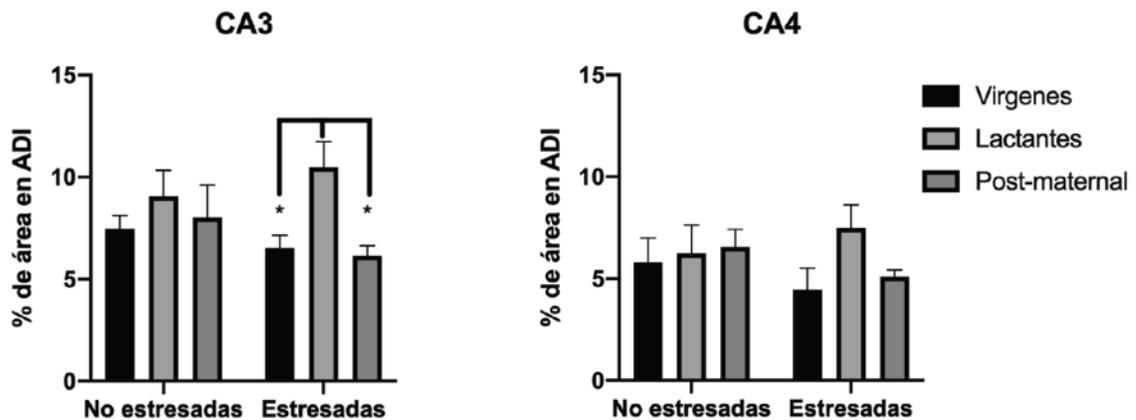
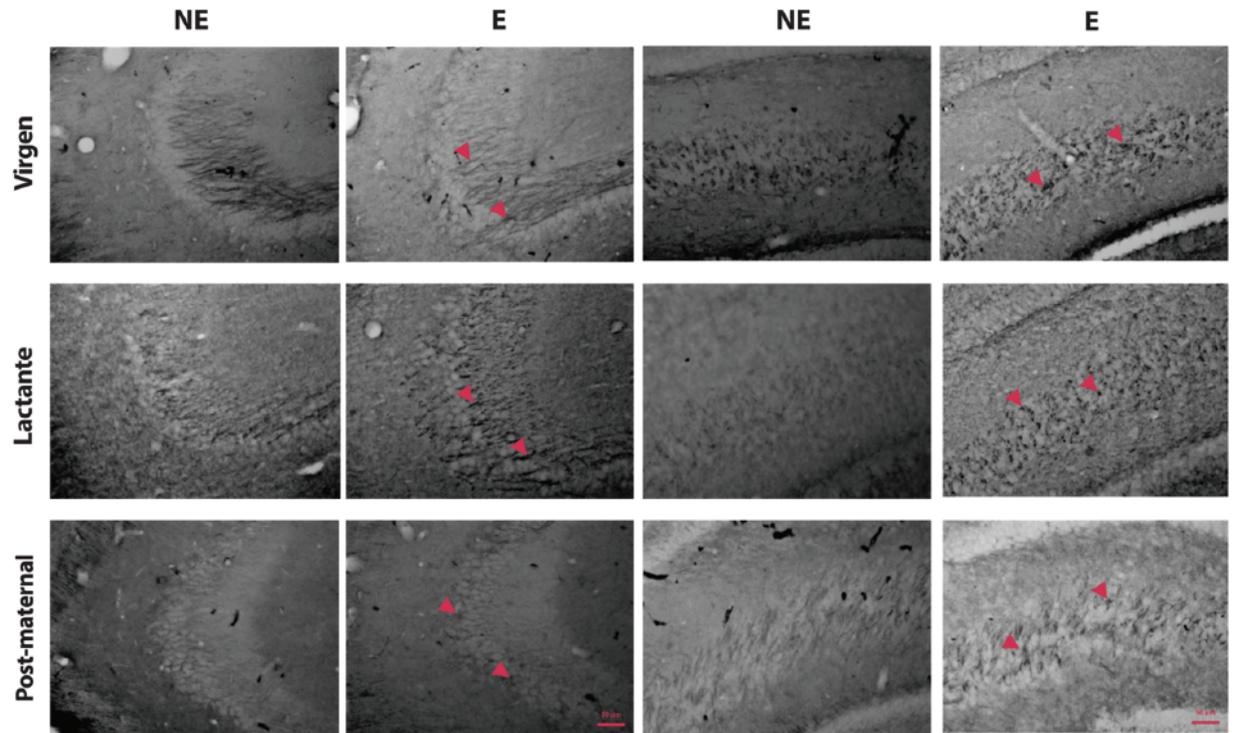
Nuevamente, la técnica de inmunohistoquímica se utilizó para evaluar la localización anatómica de tau-P y cambios ocasionados por la experiencia reproductiva usando el anticuerpo PHF1 que marca el epítipo Ser<sup>396 / 404</sup> de tau. Las fotomicrografías representativas en las Figuras 20 y 21 muestran que la distribución de la fosforilación de tau en el hipocampo de ratas hembra está restringida a las áreas CA3 y CA4 y que es totalmente consistente con el anticuerpo S422. Ambos anticuerpo mostraron un marcado fibrilar muy robusto en los axones de las fibras musgosas que se proyectan hacia la capa celular piramidal del *cornu ammonis* en CA3, en el *stratum lucidum* y *stratum radiatum*. La marca en CA4 es principalmente puntuada, con un puñado de cuerpos celulares positivos para PHF-1, y no se extiende hacia la capa granular del giro dentado (GD). Esta región contiene principalmente células musgosas. El análisis factorial reveló una contribución significativa de ambos factores, pero no la interacción entre ellos (factor condición reproductiva  $F_{2, 22} = 3.824$ ,  $P = 0.038$ ; factor estrés  $F_{1, 22} = 12.52$ ,  $P = 0.002$ ; interacción  $F_{2, 22} = 1.931$ ,  $P = 0.1688$ , no significativo). Como se muestra en la Figura 20B, las ratas vírgenes estresadas ( $P = 0.0247$ ) y post-maternales ( $P = 0.0420$ ) mostraron un aumento significativo en el porcentaje de área positiva a tau-P en comparación con sus controles sin estrés 20 minutos después del último episodio de estrés únicamente en CA4. No se detectaron cambios significativos en ratas lactantes 20 minutos después de su último episodio de estrés en comparación con sus controles no estresados. No se detectaron cambios significativos en el área CA3 (Figura 20A) en ninguna de las condiciones reproductivas evaluadas por el análisis factorial para ninguno de los factores, aunque es evidente una tendencia hacia los mismos resultados que los encontrados en el área de CA4 (factor de condición reproductiva  $F_{2, 22} = 2.786$ ,  $P = 0.0834$ ; factor de estrés  $F_{1, 22} = 3.652$ ,  $P = 0.0691$ ; interacción  $F_{2, 22} = 0.8080$ ,  $P = 0.4585$ ).



**Figura 20.** El estrés crónico aumentó significativamente la inmunoreactividad de tau-P en el subcampo hipocampal CA4 de ratas vírgenes y post-maternales estresadas sacrificadas 20 minutos después de su último episodio de estrés en comparación con sus controles no estresados. Fotomicrografías representativas y cuantificación correspondiente que demuestran la inmunoreactividad positiva de tau-P (PHF-1) en los subcampos del hipocampo CA3 y CA4 de ratas estresadas y no estresadas (control) en diferentes etapas reproductivas (virgen, lactante y post-maternal). Las ratas vírgenes y post-maternales estresadas tuvieron un área significativamente mayor de inmunoreactividad para tau-P en el subcampo CA4 en comparación con sus respectivos controles no estresados. No encontramos diferencias significativas en la inmunoreactividad de tau-P en ratas lactantes estresadas 20 minutos después de su último episodio de estrés en el subcampo CA4 en comparación con los controles no estresados. No se encontraron diferencias significativas en el subcampo CA3 en ninguna condición reproductiva. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM; \*  $P < 0,05$ ;  $N = 4-5$ . Barra de escala = 50  $\mu$ m.

#### **7.4.4. Localización y cuantificación de tau fosforilada 24 horas después del último episodio de estrés.**

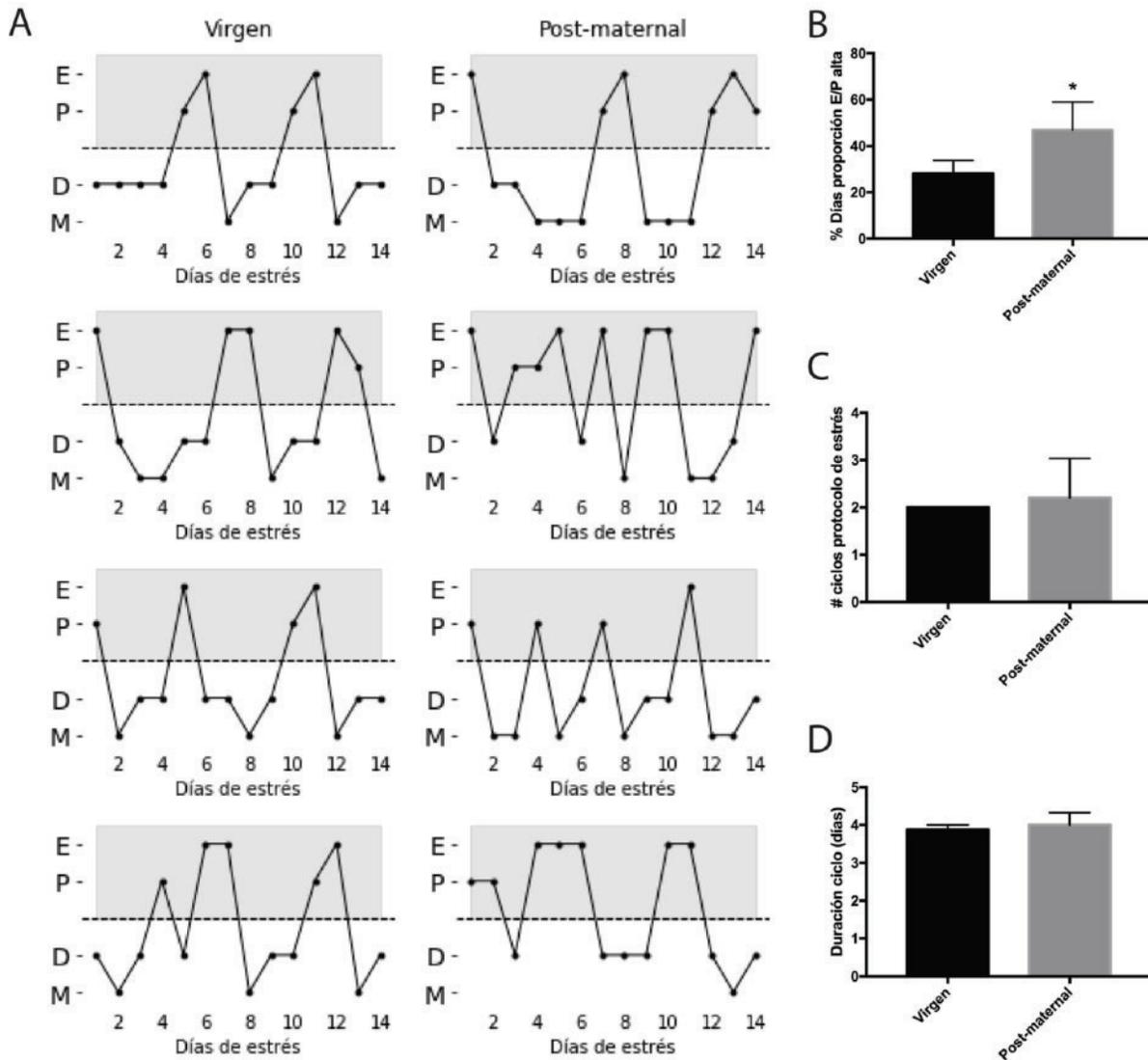
Por otro lado, el análisis factorial 24 horas después del último episodio de estrés mostró solo una contribución significativa del factor condición reproductiva ( $F_{2, 20} = 4.538$ ,  $P = 0.0237$ ) pero no para el factor de estrés ( $F_{1, 20} = 0.2887$ , no significativo) o la interacción ( $F_{2, 20} = 1.299$ , no significativo). La Figura 21A muestra que las ratas lactantes estresadas tuvieron un aumento significativo en el porcentaje de área de inmunoreactividad a tau-P en comparación con las ratas vírgenes estresadas ( $P = 0.0288$ ) y posmaternas ( $P = 0.0236$ ) 24 h después de su último episodio de estrés. No se detectaron cambios significativos en ratas lactantes en comparación con sus controles no estresados. No se detectaron cambios significativos en el área de CA4 (Figura 21B) en ninguna de las condiciones reproductivas.



**Figura 21.** El estrés crónico aumentó significativamente la inmunoreactividad de tau-P en el subcampo hipocampal CA3 de ratas lactantes sacrificadas 24 horas después del último episodio de estrés en comparación con las ratas vírgenes y post-maternales estresadas. Fotomicrografías representativas y la cuantificación correspondiente que demuestra la inmunoreactividad positiva de tau-P (PHF-1) en los subcampos del hipocampo CA3 y CA4 de ratas estresadas y no estresadas (control) en diferentes etapas reproductivas (virgen, lactante y post-maternal). Las ratas lactantes estresadas presentaron un área de inmunoreactividad significativamente mayor para tau-P que las ratas vírgenes y destetadas estresadas en el subcampo CA3. No encontramos diferencias significativas en la inmunoreactividad de tau-P en ningún grupo en comparación con sus controles no estresados en CA3. No se encontraron diferencias significativas en el subcampo CA4 en ninguna condición reproductiva. Las barras representan los promedios  $\pm$  SEM; \*  $P < 0,05$ ;  $N = 4-5$ . Barra de escala = 50  $\mu$ m.

## 7.5 Las ratas post-maternales son más sensibles a la interrupción del ciclo estral que las ratas vírgenes

La citología vaginal directa a lo largo del protocolo de estrés se utilizó para evaluar si el estrés afectó o abolió por completo el ciclo estral. Como se muestra en la Figura 22A, este protocolo de estrés crónico no suprime el ciclo estral. Además, las ratas post-maternales presentaron la mayor variación individual en el número de sus ciclos estrales (Figura 22C) y pasaron un porcentaje de días significativamente mayor ( $P = 0.0259$ ) en E / P alta (Figura 21B) que las ratas vírgenes durante el protocolo de estrés.



**Figura 22. Las ratas post-maternales pasaron un porcentaje significativamente mayor de días en etapas del ciclo con una proporción E / P alta.** Los gráficos muestra la etapa del ciclo estral de ratas vírgenes y post-maternales durante los 14 días del protocolo de estrés. A) Las ratas postmaternales mostraron ciclos erráticos durante el protocolo de estrés, aunque el ciclo no se suprimió por completo. B) Las ratas post-maternales pasaron un porcentaje significativamente mayor en días con etapas del ciclo con una alta proporción de estrógeno / progesterona (E / P alta). Abreviaturas: M = Metestro, D = Diestro, P = Proestro, E = Estro. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM; \*  $P < 0,05$ ; N = 4 - 5.

## 8. Discusión

### *La tau-P en el hipocampo de las ratas post-maternales aumentó después del estrés crónico de restricción*

Se ha demostrado previamente que el estrés crónico de restricción puede disparar tau-P e inducir insolubilidad y agregación de tau, que puede ser potencialmente patogénica (Rissman et al., 2007; Rissman et al., 2012). Nuestros grupos también han demostrado que ratas lactantes expuestas a un solo episodio de estrés de restricción muestran un fenómeno de desfosforilación, acompañado de la reducción de los niveles generales de GSK3 $\alpha$  (Steinmetz et al., 2015). El presente trabajo se centró en la exposición crónica a este mismo factor estresante y los hallazgos fueron un aumento significativo en tau-P en ratas post-maternales en la fracción soluble 20 minutos después del último episodio de estrés en comparación con las ratas lactantes estresadas. Curiosamente, las ratas post-maternales no estresadas tuvieron significativamente más tau-P en la fracción insoluble en comparación con los controles vírgenes no estresados, discutimos esto más a fondo posteriormente. Lo más importante, las ratas post-maternales estresadas mostraron un aumento significativo en tau-P 24 h después del último episodio de estrés en comparación con sus controles no estresados en la fracción insoluble. El hecho de que las ratas post-maternales estresadas mostraron niveles de tau-P aumentados en la fracción soluble, que se traduce en la fracción insoluble, indica que la tau-P sostenida en respuesta al estrés crónico promueve el cambio de tau a una fracción soluble en detergente donde se encuentra el grueso de tau fosforilada de manera aberrante en PHFs y NTFs en la EA (Iqbal et al., 1984; 1994, Rissman et al. 2007; 2012).

El hecho de que encontramos un aumento significativo en GSK3 $\beta$  inactiva 20 minutos después del último episodio de estrés en ratas post-maternales estresadas a pesar del claro aumento en tau-P sugiere fuertemente que este podría ser un mecanismo que intenta prevenir tau-P desencadenada por el estrés crónico, pero que se ve superado por la acción de otras cinasas o la falla de los mecanismos de fosfatasa (como PP2A) que pueden contribuir a la tau-P sostenida y su acumulación en la fracción insoluble. Las cinasas como ERK 1/2 y JNK aumentan después del estrés de restricción en ratones machos y contribuyen a la tau-P inducida por el estrés (Rissman et al., 2007).

Nuestros datos actuales de GSK3 sugieren que un aumento en los niveles totales de GSK3 $\beta$  20 minutos después del último episodio de estrés potencialmente explican la fosforilación inducida por estrés observada en ratas vírgenes 20 minutos después de su último episodio de estrés por inmunohistoquímica. Este aumento no fue significativo cuando analizamos por Western blot. Además, las ratas vírgenes estresadas también muestran una tendencia hacia un aumento de GSK3 $\beta$  inactiva, en comparación con los controles vírgenes no estresados 24 h después del último episodio de manipulación / estrés. En conjunto, estas observaciones sugieren que las ratas vírgenes se ven afectadas por el protocolo de estrés crónico, pero podrían activar mecanismos para reducir tau-P en respuesta compensatoria.

Sorprendentemente, todas estas observaciones no ocurrieron en madres lactantes. Las ratas lactantes estresadas no mostraron diferencias significativas en ningún momento en tau-P en comparación con sus controles no estresados con ninguna de nuestras técnicas, lo que sugiere que pueden amortiguar los efectos del tratamiento de restricción crónica en tau-P pero no revertirlos como se observó usando un episodio de estrés agudo (Steinmetz et al., 2015). Veinticuatro horas después del último episodio de estrés, se observó un aumento significativo de GSK3 $\beta$  inactiva (fosforilada en Ser<sup>9</sup>) en ratas lactantes no estresadas. Estos resultados sugieren que la lactancia activa mecanismos por sí misma y en respuesta al estrés que disminuyen la susceptibilidad a tau-P inducida por estrés pero sólo mientras este período dure y mediante la regulación de la actividad de GSK3.

*El área CA4 en el hipocampo de ratas hembras vírgenes y post-maternales es más susceptible a los efectos del estrés crónico*

La marca observada es consistente con un estudio previo de tau endógena en ratones machos usando un anticuerpo independiente de fosforilación y en el cual tau se encontró principalmente en axones no mielinizados, no en compartimentos dendríticos o sinapsis, y en menor grado en oligodendrocitos (Kubo et al., 2018). Además, el

segundo análisis inmunohistoquímico que se realizó con el anticuerpo dependiente de fosforilación S422 reveló un patrón idéntico y resultados similares en ratas hembra, lo que comprueba la especificidad del marcaje. Estudios previos que utilizaron estrés de restricción o la sobreexpresión del receptor del factor liberador de corticotropina (CRFR) encontraron significativamente más marcadores de neurodegeneración (Jeong et al., 2006) y tau-P (Rissman et al., 2007, Rissman et al., 2012, Campbell et al., 2015) en CA1, CA3 y el GD, especialmente CA4. No encontramos tau-P en el área CA1 o la capa molecular del GD como algunos de los informes mencionados anteriormente que utilizan el mismo anticuerpo y estresor, lo que indica que las ratas hembras responden de manera diferente en comparación con los ratones machos. Existe evidencia de que el género, el sexo y el estado reproductivo pueden influir en la respuesta a diferentes factores estresantes y el reclutamiento de diferentes circuitos y vías bioquímicas activadas por ellos, lo que explica esta diferencia con estudios anteriores (Bangasser et al., 2010; Bangasser et al., 2017; Salvatore et al., 2018; Rincón-Cortés et al., 2019).

Los datos inmunohistoquímicos de las ratas sacrificadas 20 minutos después del último episodio de estrés respaldan nuestros datos bioquímicos que indican que las ratas vírgenes y post-maternales son más susceptibles a los efectos del estrés crónico de restricción. La zona del hipocampo CA4 es donde los efectos del estrés son más significativos. Aunque los efectos del estrés crónico en esta zona aún no se comprenden bien, se sabe que la neurogénesis en el GD se ve afectada negativamente por el estrés y la administración de glucocorticoides (Snyder et al., 2011; Schoenfeld y Gould, 2012). Además, la evidencia sugiere que la disminución de la neurogénesis podría traducirse en cambios en la atrofia de CA3 y el volumen del hipocampo (Schoenfeld et al., 2017). Las ratas post-maternales no estresadas tuvieron niveles significativamente más altos de tau-P que las ratas vírgenes no estresadas según lo analizado por Western blot, aunque no se observó lo mismo cuando se midió por inmunohistoquímica. A pesar de que los anticuerpos empleados en el Western blot y la inmunohistoquímica son los mismos, los dos métodos son diferentes. Mientras que este último detecta el antígeno directamente en el tejido fijo en regiones específicas del

hipocampo, las proteínas preparadas para Western blot se someten a una extracción y a diversos pasos antes de ser expuestas al anticuerpo.

Otro punto importante a considerar como diferencias en las técnicas, es el hecho de que no pudimos encontrar diferencias significativas entre los diferentes tiempos de sacrificio ni condiciones reproductivas en nuestros grupos en los que se utilizó extracción únicamente con buffer RIPA. Esto puede deberse a que tau se encuentra en un balance constante de fosforilación/desfosforilación y que la extracción fraccionada de fracciones solubles y solubles en detergente evalúan mejor este balance para visualizar los cambios que sufre tau en vez que extraer el grueso de tau soluble/insoluble.

Curiosamente, las ratas lactantes estresadas tuvieron significativamente más tau-P en CA3 24 h después del último episodio de estrés en comparación con las ratas vírgenes y destetadas estresadas. Creemos que este resultado aparentemente conflictivo se debe a que está disponible una tau más soluble para que el anticuerpo la detecte en ratas lactantes, en contraste con las ratas vírgenes y post-maternales, donde la proteína podría estar cambiando cada vez más a una forma insoluble que el anticuerpo no puede detectar fácilmente. Este mecanismo se ha propuesto previamente en estudios con el mismo protocolo de restricción en ratones machos (Rissman et al., 2007; Rissman et al., 2012) y destaca aún más el hecho de que los mecanismos de tau-P se ven alterados durante la lactancia.

#### *Hormonas y la fosforilación de tau inducida por estrés crónico*

Aunque no se midieron los niveles de corticosterona (un parámetro canónico de la respuesta al estrés en roedores), tenemos razones para creer que la corticosterona no está involucrada de manera crucial en la tau-P inducida por estrés de restricción de movimiento, ya que ratones machos adrenalectomizados aún muestran esta respuesta (Rissman et al., 2007). Además, en un estudio anterior que utilizó un episodio agudo de estrés de restricción, no se encontraron diferencias en los niveles de corticosterona

entre ratas hembras estresadas y no estresadas (Steinmetz et al., 2015). En cuanto a la habituación al estrés, nuestros resultados generales, la variación en el ciclo estral y nuestras propias observaciones (micción y defecación) durante el protocolo de estrés respaldan el hecho de que nuestras ratas no experimentaron habituación (Girotti et al., 2006). En este estudio, observamos que las ratas vírgenes y post-maternales tienen un aumento de tau-P inducida por el estrés y que las ratas post-maternales parecen ser las más sensibles a estos efectos, ya que acumulan tau en una fracción insoluble y potencialmente patogénica. Está bien documentado que las hormonas, como el estrógeno y la progesterona (y sus metabolitos), pueden influir en tau-P en diferentes modelos experimentales que generalmente proponen acciones protectoras para ambas hormonas (para una revisión mas completa ver Muñoz-Mayorga et al., 2018). Diferencias en los niveles circulantes de estas hormonas podrían explicar la menor o mayor sensibilidad al protocolo de estrés.

Durante el protocolo de estrés, las ratas post-maternales tuvieron la mayor variación individual en el número de ciclos estrales, variando de 1 a 3 en contraste con los 2 ciclos observados en ratas vírgenes. Además, las ratas post-maternales estresadas pasaron un porcentaje significativamente mayor de días en etapas de ciclo dominantes en estrógenos (proporción de E/P alta) en respuesta al protocolo de estrés en comparación con las ratas vírgenes estresadas. Ratonas hembras de un modelo de EA pasaron un mayor porcentaje de días en E/P alta en comparación con los controles no transgénicos (Broestl et al., 2018). Además, las ratonas en días con una E / P alta presentaron alteraciones de redes neuronales, deterioro cognitivo y una mayor producción de beta amiloide patogénico (A $\beta$ 1-42) en comparación con los sujetos en E/ P baja o gonadectomizados (Broestl et al., 2018 ) Curiosamente, no se observaron cambios en los niveles de tau total ni tau fosforilada (PHF-1) en este estudio.

De acuerdo a nuestros datos, la experiencia maternal produce un impacto en el cerebro de la rata que la hace más susceptible a los efectos de la tau-P inducida por el estrés. Algunos estudios señalan al número de embarazos como un factor de riesgo para la EA en humanos (Ptok et al., 2002; Colucci et al., 2006) y un estudio interesante que evalúa

anticuerpos de tau dependientes de fosforilación y su correlación con las etapas de Braak observó que todo el tejido cerebral examinado en las etapas Braak V / VI pertenecía a mujeres (Neddens et al., 2018). Otros estudios correlacionan el embarazo tardío con un mejor desempeño cognitivo (Fox et al., 2013) y períodos prolongados de lactancia materna con un riesgo reducido de desarrollar EA (Karim et al., 2016). En roedores se ha reportado que el número de experiencias maternas tiene un efecto positivo sobre el envejecimiento cerebral (Gatewood et al., 2005). Más investigación es necesaria para aclarar estas observaciones.

La disminución de la sensibilidad de la madre lactante a diversos estresores (Brunton et al., 2008), en el que la oxitocina y la prolactina, juegan un papel importante ha sido ampliamente documentada (Torner & Neumann, 2002). Se sabe que los altos niveles de prolactina durante el período de lactancia contribuyen a la hiporeactividad al estrés característica de este estado (Torner & Neumann 2002; Torner et al., 2002). Previamente hemos propuesto que uno de los mecanismos por los cuales la prolactina podría proteger a la rata lactante de los efectos del estrés de restricción es aumentando la actividad de la vía Akt que puede fosforilar GSK3 en el residuo Ser<sup>9</sup>, que inactiva a la cinasa, evitando el marcado del receptor de prolactina para degradación y a su vez previniendo la tau-P inducida por el estrés (Domínguez-Cáceres et al., 2004; Plotnikov et al., 2008; Steinmetz et al., 2015; Muñoz-Mayorga et al., 2018). Aunque nuestros resultados bioquímicos se ajustan y respaldan el mecanismo antes mencionado, estas observaciones, hasta nuestro estudio, se realizaron en células linfoides y de cáncer de mama (Domínguez-Caceres et al., 2004; Plotnikov et al., 2008). Por lo tanto, se necesita más investigación para demostrar su existencia en el cerebro. Este estudio y otros se basan en la literatura existente y sientan las bases para seguir investigando la prolactina como un posible regulador de fosforilación de tau. No obstante, aún no se entiende completamente cómo la prolactina regula la respuesta al estrés en diferentes regiones del cerebro, y no se puede excluir la contribución de otras vías celulares que involucren la regulación de fosfatasa o la interacción con los receptores CRFR en el hipocampo.

Debido a la gran importancia reproductiva de la experiencia maternal (Arbeitman, 2019), la variedad de hormonas involucradas, como la alopregnanolona al final del embarazo y la prolactina durante la lactancia, resultan en una disminución de la respuesta al estrés (Brunton et al., 2008; Sze & Brunton , 2019). Además, se ha informado que la progesterona aumenta entre los días 12 y 16 de lactancia (Vanoye-Carlo et al., 2008) y la oxitocina posee acciones ansiolíticas bien documentadas y presenta altos niveles durante la lactancia (Brunton et al., 2008). Por todo lo anterior, debemos enfatizar el hecho de que consideramos el período de lactancia completo, sus cambios hormonales y la interacción entre ellos los que resultan en cambios de tau-P durante este período, por lo que podrían estar involucrados varios mecanismos hormonales aún desconocidos.

## **9. Conclusión**

En conjunto, nuestros resultados muestran que la lactancia disminuye los efectos del estrés crónico en tau-P en el hipocampo únicamente mientras dura esta etapa; posteriormente, la hembra es más vulnerable a tau-P inducida por estrés. El hecho de que las ratas lactantes sean más resistentes a tau-P inducida por estrés puede tener profundas implicaciones fisiológicas, como un citoesqueleto más estable y una mejor comunicación sináptica necesaria en el cerebro maternal para el cuidado de la descendencia. Se necesitan más estudios que se centren en el proceso general de envejecimiento femenino, maternidades múltiples y diferentes factores estresantes para comprender mejor cómo estos cambios se traducen en un mayor o menor riesgo de desarrollar enfermedades neurológicas, especialmente la EA.

## 10. Referencias

1. Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S. y Kirschner, M.W. (1975). A protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proc. Nat. Acad.*, 72(5), 1858-1862.
2. Drubin, D.G. & Kirschner, M.W. (1986). Tau Protein Function in Living Cells. *The Journal of Cell Biology* 103(6), 2739-2746.
3. Binder, L.I., Frankfurter, A. y Rebhun, L.I. (1985). The Distribution of Tau in the Mammalian Central Nervous System. 101, 1371-1378.
4. Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J. y Ripova, D. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 1-13.
5. Lindwall, G. & David Cole, R. (1984). Phosphorylation Affects the Ability of Tau Protein to Promote Microtubule Assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(8), 5301-5305.
6. Yamamoto, H., Saito, Y., Fukunaga, K., Nishimura, H. y Miyamoto, E. (1988). Dephosphorylation of Microtubule Proteins by Brain Protein Phosphatases 1 and 2A, and its Effect on Microtubule Assembly. *Journal of Neurochemistry*, 50(5), 1614-1623.
7. Garcia, M. & Cleveland, D.W. (2000). Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 41-48.
8. Mandell, J.W. & Banker, G.A. (1996). A Spatial Gradient of Tau Protein Phosphorylation in Nascent Axons. *The Journal of Neuroscience*, 16(18), 5727-5740.
9. Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. y Mandelkow, E.-M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *The Journal of Cell Biology*, 156(6), 1051-1063.
10. Rogers, S.L. & Gelfand, V. I. (2000). Membrane trafficking, organelle transport and the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 12, 57-62.
11. Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L.A. y Spillantini, M.G. (2007). Interaction of tau protein with the dynactin complex. *The EMBO Journal*, 26, 4546-4554.
12. Ebnet, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., Mandelkow, E.-M. y Mandelkow, E. Overexpression of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease. *The Journal of Cell Biology*, 143(3), 777-794.
13. Trinczek, B., Ebnet, A., Mandelkow, E.-M. y Mandelkow, E. (1999). Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in

- microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *Journal of Cell Science*, 112, 2355-2367.
14. Hanes, J., Zilka, N., Bartkova, M., Caletkova, M., Dobrota, D., Novak, M. (2009). Rat tau proteome consists of six tau isoforms: implication for animal models of human tauopathies. *Journal of Neurochemistry*, 109, 1167-1176.
  15. Iqbal, K., Alonso, A del C., Chen, S., Chohan, M.O., El-Akkad, E., Gong, C., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H, Grundke-Iqbal, I. (2005). Tau pathology in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739, 198 - 210.
  16. Tenreiro, S., Eckermann, K., Outeiro, T.F. (2014). Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7 42), 1-30.
  17. Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews*, 17, 5-21.
  18. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein T (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 4913-4917.
  19. Iqbal, K., Zaidi, T., Thompson, C.H., Merz, P.A., Wisniewski, H.M. (1984). Alzheimer Paired Helical Filaments: Bulk Isolation, Solubility and Protein Composition. *Acta Neuropathologica*, 62, 167-177.
  20. Iqbal, K., Alonso, A del C., Grundke-Iqbal, I. (2008). Cytosolic Abnormally Hyperphosphorylated Tau But Not Paired Helical Filaments Sequester Normal MAPs and Inhibit Microtubule Assembly. *J Alzheimers Dis*, 14(4): 365–370.
  21. Ghag, G., Bhatt, N., Cantu, DV., Guerrero-Munoz, MJ., Ellsworth, A., Sengupta, U., Kaye, R. (2018). Soluble tau aggregates, not large fibrils, are the toxic species that display seeding and cross-seeding behavior. *PROTEIN SCI*, 27:1901–1909.
  22. Mandelkow, EM & Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2:a006247.
  23. Buée, L., Bussièrè, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, 33, 95-130.
  24. Williams, D.R. (2006). Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau.
  25. Götz, J., & Ittner, L.M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews*, 9, 532-544.

26. Ke, Y.D., Suchowerska, A.K. van der Hoven, J., De Silva, D.M., Wu, C.W., van Eersel, J., Ittner, A., Ittner, L.M. (2012). Lessons from Tau-Deficient Mice. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 1-8.
27. Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of into tangles of paired helical filaments straight filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6923–6928.
28. Kahlson, M. A. & Colodner, K. J. (2015). Glial tau pathology in tauopathies: functional consequences. *Journal of Experimental Neuroscience*, 9(S2), 43-50.
29. Kosik, K. S. & Finch, E. A. (1987). MAP2 and Tau Segregate into Dendritic and Axonal Domains After the Elaboration of Morphologically Distinct Neurites: An Immunocytochemical Study of Cultured Rat Cerebrum. *The Journal of Neuroscience*, 7(10), 3142-3153.
30. Ittner, L. M. & Götz, J. (2010). Amyloid- $\beta$  and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(2), 65-72. <https://doi.org/10.1038/nrn2967>.
31. Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M.L., Yardin, C., Terro, F. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research reviews*, 12(1), 289-309. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003>.
32. Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M.L., Yardin, C., Terro, F. (2013). Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing Research reviews*, 12(1), 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.008>.
33. Nunez, J. (1988). Immature and mature variants of MAP2 and tau proteins and neuronal plasticity. *Trends in Neuroscience*, 11(11), 477-479.
34. Kinsley, C. H. & Lambert, K.G. (2006, January). The Maternal Brain. *Scientific American*. 72-79.
35. Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Piña-Medina, A. G., Camacho-Arroyo, I. (2015). Sex Hormones Regulate Cytoskeletal Proteins involved in Brain Plasticity. *Frontiers in Psychiatry*, 6(165), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00165>.
36. González-Arenas, A., Piña-Medina, A. G., González-Flores, O., Gómora-Arrati, P., Carrillo-Martínez, G. E., Balandrán-Ruíz, M. A., Camacho-Arroyo, I. (2012). Expression pattern of Tau in the rat brain during pregnancy and the beginning of lactation. *Brain Research Bulletin*, 89(3-4), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.07.011>.
37. González-Arenas, A., Piña-Medina, A. G., González-Flores, O., Galván-Rosas, A., Gómora-Arrati, P., Camacho-Arroyo, I. (2014). Sex hormones and

expression pattern of cytoskeletal proteins in the rat brain throughout pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 139, 154-158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.005>.

38. Biundo, F., Del Prete D., Zhang, H., Arancio, O., D'Adamio L. (2018). A role for tau in learning, memory and synaptic plasticity. *Sci. Rep.* 8(3184), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21596-3>.
39. Regan, P., Piers, T., Yi, J-H., Kim, D-H., Huh, S., Park, S.J., Ryu, JH, Whitcomb, D.J., Cho, K. (2015) Tau Phosphorylation at Serine 396 Residue Is Required for Hippocampal LTD. *J. Neurosci. Res.*, 35(12), 4804 – 4812. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015>.
40. Bittar, A., Sengupta, U., Kaye, R. (2018). Prospects for strain-specific immunotherapy in Alzheimer's disease and tauopathies. *NPJ VACCINES*, 3(9)
41. Crespo-Biel, N., Theunis, C., Van Leuven, F. (2012). Protein Tau: Prime Cause of Synaptic and Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, Article ID 251426, 13 pages. <http://doi:10.1155/2012/251426>.
42. Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4), 519-526.
43. Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R.A., Six, J., Lübke, U., Vandermeeren, M., Cras, P., Trojanowsky, J. Q., Lee, V. M. (1993). The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 90 (11), 5066-5070.
44. Stoothof, W. H. and Johnson, G. V. (2005). Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim. Biophys. Acta.* 1739:2-3, 280-297.
45. Arendt, T., Stieler, J., Strijkstra, A. M., Hut, R. A., Rüdiger, J., Van der Zee, E. A., et. al. (2003). Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J. Neurosci.* 23:18, 6972– 6981.
46. Maras, P.M., Baram, T.Z. (2012). Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends in Neurosciences* , 35(5), 315-324.
47. Jarrard, L.E. (1993). On the Role of the Hippocampus in Learning and Memory in the Rat. *Behavioral and Neural Biology*, 60, 9-26.
48. Paxinos, G. (ed.) (2015). *The Rat Nervous System*. Fourth Edition. USA: Elsevier Academic Press.
49. Witter, M.P. & Amaral, D.G.. (2004). The Hippocampal Formation. En *The Rat Nervous System* (635-704). USA: Elsevier Academic Press.

50. Cappaert, N.L.M., van Strien, N.M., Witter, M.P. (2015). The Hippocampal Formation. En *The Rat Nervous System* (511-573). USA: Elsevier Academic Press.
51. Amaral, D.G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*, 182, 4 Pt. 2, 851-914.
52. Cherubini & Miles. (2015). The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Front Cell Neurosci.* 9:19.
53. Deng W., Aimone, J.B., Cage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Rev. Neur.* 11.
54. Lopez, J.F., Akil, H., Watson, S. J. (1999). Neural Circuits Mediating Stress. *Biol Psychiatry.*, 46(46), 1461–1471.
55. Smith, S. M. & Vale, W.W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci.*, 8(4), 383-395.
56. Elenkov, I. J. & Chrousos, G.P. (2006). Stress System – Organization, Physiology and Immunoregulation. *Neuroimmunomodulation*, 13, 257-267.
57. Sapolsky, RM. (2001). Glands, Gooseflesh and Hormones. In *Why Zebras Don't Get Ulcers*. (pp. 19-36). New York: W. H. Freeman and Company.
58. Herman, J.P., Ostrander, M. M., Mueller, N.K., Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 29, 1201–1213.
59. Sapolsky, R. M., Krey, L. C., McEwen, B. S. (1985). Prolonged Glucocorticoid Exposure Reduces Hippocampal Neuron Number: Implications for Aging. *The Journal of Neuroscience.* 5(5), 1222-1227.
60. Sapolsky, R. M. (1999). Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Experimental Gerontology*, 34, 721–732.
61. Sapolsky RM. Glucocorticoids and Hippocampal Atrophy in Neuropsychiatric Disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57(10):925–935. doi:10.1001/archpsyc.57.10.925
62. Sapolsky, RM. (2005). Stress and Your Shrinking Brain. In *Monkeyluv* (pp. 97-108). New York: Scribner.
63. Starkman, MN., Giordani, B., Gebarski, SS., Berent, S., Schork, MA., Schteingart DE. Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry.* 1999; 46(12): 1595-602.
64. Masugi F, Ogihara T, Sakaguchi K, Otsuka A, Tsuchiya Y, Morimoto S, Kumahara Y, Saeki S, Nishide M. (1989). High plasma levels of cortisol in

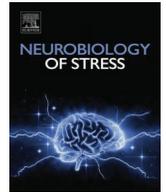
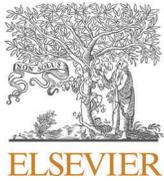
- patients with senile dementia of the Alzheimer's type. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 11(11), 707-10.
65. Justice, N. J. (2018). The relationship between stress and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Stress*, 8, 127-133.
  66. Park, H., Ran, Y., Jung, J. I., Holmes, O., Price, A.R., Smithson, L., Ceballos-Díaz, C., Han, C., Wolfe, M.S., Daaka, Y., Ryabinin, A.E., Kim, S., Hauger, R.L., Golde, T.E., Felsenstein, K.M. (2015). The stress response neuropeptide CRF increases amyloid- $\beta$  production by regulating  $\gamma$ -secretase activity. *The EMBO Journal*, 34(12), 1674-1686.
  67. Rissman, R. A. (2010) Stress-Induced Tau Phosphorylation: Functional Neuroplasticity or Neuronal Vulnerability? *J. Alzheimers Dis.* 18:2, 453–457.
  68. Rissman, R.A., Staup, M.A., Roe Lee, A., Justice, N.J., Rice, K.C., Vale, W., Sawchenko, P.E. (2012). Corticotropin-releasing factor receptor-dependent effects of repeated stress on tau phosphorylation, solubility, and aggregation. *PNAS*, 109(16), 6277-6282.
  69. Rissman, R. A., Lee, K., Vale, W., Sawchenko, P.E. (2007). Corticotropin-Releasing Factor Receptors Differentially Regulate Stress-Induced Tau Phosphorylation. *J. Neurosci.* 27:24, doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5173-06.2007.
  70. Melcangi, R. C., Giatti, S., García-Segura, L. M. (2016). Levels and actions of neuroactive steroids in the nervous system under physiological and pathological conditions: Sex-specific features. *Neurosci Biobehav Rev.* 67. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.09.023.
  71. Panzica, G. and Melcangi, R. C. (2016). Structural and molecular brain sexual differences: A tool to understand sex differences in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 67. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.04.017.
  72. Alzheimer Association. (2018). Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's and Dementia*, 12(4).
  73. Snyder, H. M., Asthana, S., Bain, L., Brinton, R., Craft, S., Dubal, D. B. et al. (2016). Sex biology contributions to vulnerability to Alzheimer's disease: A think tank convened by the Women's Alzheimer's Research Initiative. *Alzheimers Dement.* 12:11. doi.org/10.1016/j.jalz.2016.08.004.
  74. Grimm, A., Mensah-Nyagan, A.G., Eckert, A. (2016). Alzheimer, mitochondria and gender. *Neurosci Biobehav Rev.* 67. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.04.012.
  75. Moser, V.A. & Pike, C.J. (2016). Obesity and sex interact in the regulation of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 67. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.08.021. Epub 2015 Dec 18.
  76. Muñoz-Mayorga D., Guerra-Araiza C., Torner L., Morales T. (2018). Tau Phosphorylation in Female Neurodegeneration: Role of Estrogens, Progesterone, and Prolactin. *Front. Endocrinol.* 19, 133.

77. Karim, R., Dang, H., Henderson, V.W., Hodis, H.N., John, J. S., Brinton, R. D. et. al. (2016). Effect of Reproductive History and Exogenous Hormone Use on Cognitive Function in Mid- and Late Life. *J Am Geriatr Soc.* 64:12. [doi.org/10.1111/jgs.14658](https://doi.org/10.1111/jgs.14658).
78. Christensen, A. & Pike, C.J. (2015). Menopause, obesity and inflammation: interactive risk factors for Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(130).
79. Galea, L. A., Wainwright, S. R., Roes, M. M., Duarte-Guterman, P. , Chow, C. and Hamson, D. K. (2013), Sex, Hormones and Neurogenesis in the Hippocampus: Hormonal Modulation of Neurogenesis and Potential Functional Implications. *J Neuroendocrinol*, 25: 1039-1061. doi:10.1111/jne.12070
80. Yan Y., Domínguez, S., Fisher, D.W., Dong, H. (2018). Sex differences in chronic stress responses and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Stress*, 8, 120-126.
81. Bangasser, D.A., Curtis, A., Reyes, B.A.S., Bethea, T.T., Parastatidis, I., Ischiropoulos, H., Van Bockstaele, E.J., Valentino, R.J. (2010). Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. *Molecular Psychiatry*, 15, 896–904.
82. Bangasser, D. A., Dong, H., Carroll, J., Plona, Z., Ding, H., Rodríguez, L., McKennan, C., Csernansky, J. G., Seeholzer, S.H., Valentino, R.J. (2017). Corticotropin-releasing factor overexpression gives rise to sex differences in Alzheimer's disease-related signaling. *Molecular Psychiatry* (2017) 22, 1126–1133.
83. Brunton, P. & Russell, J. A. (2009). The expectant brain: adapting for motherhood. *Nat. Rev. Neurosci.* 9:1. doi.org/10.1038/nrn2280.
84. Slattery, D.A. & Neumann, I.D. (2008). No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. *J Physiol.* 586(2):377-85.
85. Torner, L. and Neumann, I. (2002). The Brain Prolactin System: Involvement in Stress Response Adaptations in Lactation. *Stress.* 5:4, 249–257.
86. Torner L, Toschi N, Nava G, Clapp C, Neumann ID. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neurosci* 2002; 15(8); 1381-1389.
87. Steinmetz, D., Ramos, E., Campbell, S.N., Morales, T., Rissman, R.A. (2015). Reproductive Stage and Modulation of Stress-Induced Tau Phosphorylation in Female Rats. *J. Neuroendocrinol.* 27:11, 827–834.
88. Domínguez-Cáceres, M. A., García-Martínez, J. M., Calcabrini, A., González, L., Porque, P., León, J. et. al. (2004). Prolactin induces c-Myc expression and cell

- survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene*. 23:44, 7378–7390.
89. Plotnikov, A., Li, Y., Tran, T. H., Tang, W., Palazzo, J. P., Rui, H. et. al. (2008). Oncogene-mediated inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta impairs degradation of prolactin receptor. *Cancer Res.*, 68:5, 1354-1361.
  90. Holscher, C., van Aalten, L., Sutherland, C. (2008). Anaesthesia generates neuronal insulin resistance by inducing hypothermia. *BMC Neuroscience*, 9.
  91. Cora, M.C., Kooistra, L., Travlos, G. 2015. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol. Pathol.* 43: 776-793. doi: 10.1177/0192623315570339.
  92. Broestl, L., Worden K., Moreno A.J., Davis E.J., Wang, D., Garay, B., Singh, T., Verret, L., Palop, J.J., Dubal, D.B. 2018. Ovarian Cycle Stages Modulate Alzheimer- Related Cognitive and Brain Network Alterations in Female Mice. *eNeuro*. 5(6):1-18. doi.org/10.1523/ENEURO.0132-17.2018
  93. Oddo, S. Caccamo, A., Shepherd, J.D., Mattson, M. P., Akbari, Y., LaFerla, F.M. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*. (2003). 39(3): 409-421.
  94. Iqbal, K., Alonso, A.C., Gong, C.X., Khatoon, S., Singh, T.J., Grundke-Iqbal, I. 1994. Mechanism of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 9:119 –123.
  95. Kubo A, Misonou H, Matsuyama M, Nomori A, Wada-Kakuda S, Takashima A, Kawata M, Murayama S, Ihara Y, Miyasaka T. Distribution of endogenous normal tau in the mouse brain. *J Comp Neurol*. (2019) 527, 985–998. DOI: 10.1002/cne.24577
  96. Jeong YH, Park CH, Yoo J, Shin KY, Ahn S, Kim H, Lee S, Emson PC, Suh Y. Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APP<sub>V7171</sub>-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *FASEB J*. (2006) 6, 729-31.
  97. Salvatore M, Wiersielis KR, Luz S, Waxler DE, Bhatnagar S, Bangasser DA. Sex differences in circuits activated by corticotropin releasing factor in rats. *Horm. Behav.* (2018) 97, 145-153. doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.10.004.
  98. Rincón-Cortés M, Herman JP, Lupien S, Maguire J, Shansky RM. Stress: Influence of sex, reproductive status and gender. *Neurobiol Stress* 2019; 10: 1-6.
  99. Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior. *Nature* 2011; 476(7361): 458-461. doi: 10.1038/nature10287.
  100. Schoenfeld TJ, Gould E. Stress, stress hormones and adult neurogenesis. *Exp Neurol* 2012; 233: 12-21.

101. Schoenfeld TJ, McCausland HC, Morris HD, Padmanaban V, Cameron HA. Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. *Biol Psychiatry* 2017; 82: 914-923.
102. Girotti, M., Pace, T.W.W., Gaylord, R.I., Rubin, R.A., Herman, J.P., Spencer, R.L. 2006. Habituation to Repeated Restraint Stress Is Associated with Lack of Stress-Induced C-Fos Expression in Primary Sensory Processing Areas of the Rat Brain. *Neuroscience*. 138(4):1067-1081. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.12.002.
103. Ptok U, Barkow K, Heun R. Fertility and number of children in patients with Alzheimer's disease. *Arch Women's Ment Health* 2002; 5: 83-86.
104. Colucci M, Cammarata S, Assini A, Croce R, Clerici F, Novello C, Mazzella L, Dagnino N, Mariani C, Tanganelli P. The number of pregnancies is a risk factor for Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 2006; 13: 1374-1377.
105. Neddens, J., Temmel, M., Flunkert, S., Kerschbaumer, B., Hoeller, C., Loeffler, T., Niederkofler, V., Daum, G., Attems, J., Hutter-Paier, B. 2018. Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 6:52. doi.org/10.1186/s40478-018-0557-6.
106. Fox M, Berzuini C, Knapp LA. Maternal breastfeeding history and Alzheimer's disease risk. *J Alzheimers Dis* 2013 37(4):809–21. doi:10.3233/JAD-130152.
107. Gatewood JD, Morgan MD, Eaton M, McNamara IM, Stevens LF, Macbeth AH, Meyer EA, Lomas LM, Kozub FJ, Lamber KG, Kinsley CH. Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. *Brain Res Bull* 2005; 66: 91-98.
108. Arbeitman, M.N. 2019. Maternal Experience Leads to Lasting Gene Expression Changes in Some Regions of the Mouse Brain. *G3 (Bethesda)*, 9: 2623-2628.
109. Brunton, P.J., Russell, J.A. and Douglas, A.J., 2008. Adaptive Responses of the Maternal Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis during Pregnancy and Lactation. *J Neuroendocrinol.* 20: 764-776. doi:[10.1111/j.1365-2826.2008.01735.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01735.x)
110. Sze, Y. & Brunton, P. 2019. Sex, stress and steroids. *Eur J Neurosci.* 2019:00:1–29. doi: 10.1111/ejn.14615.
111. Vanoye-Carlo, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza-Rodríguez, A., Cerbón, M. 2008. Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *HORM BEHAV*, 53: 112-123.

# 11. Publicaciones



## Reproductive status impact on tau phosphorylation induced by chronic stress

Daniel Muñoz-Mayorga<sup>a</sup>, Robert A. Rissman<sup>b,c</sup>, Teresa Morales<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

<sup>b</sup> Department of Neurosciences, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

<sup>c</sup> Veterans Affairs San Diego Healthcare System, La Jolla, CA, USA

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Hippocampus  
Female rat  
PHF-1  
AT8  
Restraint stress

### ABSTRACT

Sex and exposure to chronic stress have been identified as risk factors for developing Alzheimer's disease (AD). Although AD has been demonstrated to be more prevalent in females, sex is often overlooked in research studies, likely due to the complexity of the hormonal status. In female rats, the reproductive status can modulate the well-known increase in tau phosphorylation (pTau) caused by the exposure to acute physical and psychological stressors. To test the hypothesis that reproductive status can impact hippocampal pTau induced by chronic stress, cohorts of virgin, lactating (4–5 days pp), and post-maternal (1-month post-weaned) rats were subjected to a daily 30-min episode of restraint stress for 14 days and were sacrificed either 20 min or 24 h after their last stress/handling episode. Western blot analysis of two well-characterized AD-relevant pTau epitopes (AT8 and PHF-1) and upstream pTau mechanisms (e.g. GSK3 $\beta$ ) analysis, showed that stressed post-maternal rats have increased pTau in comparison to stressed lactating rats 20 min after their last stress episode. Furthermore, an increase in pTau was also seen 24 h after the last stress episode in stressed post-maternal rats in comparison to their non-stressed controls in the detergent-soluble fraction. GSK3 analysis showed an increase in total levels of GSK3 $\beta$  in virgin rats and an increase of inactive levels of GSK3 $\beta$  in post-maternal rats, which suggests a different stress response in pTau after the rat has gone through the maternal experience. Interestingly, post-maternal rats also presented the more variability in their estrous cycles in response to stress. Besides no differences in pTau, non-stressed lactating rats showed an increase in inactive GSK3 $\beta$  24 h after the last handling episode. Immunohistochemical detection of the PHF-1 epitope revealed increased pTau in the CA4/hilar subfield of the hippocampus of virgin and post-maternal rats exposed to chronic stress shortly after their last stress episode. Overall, lactating rats remained unresponsive to chronic restraint stress. These results suggest increased sensitivity of the virgin and post-maternal rats to hippocampal stress-induced pTau with chronic restraint stress compared to lactating rats. Because no differences were detected in response to stress by lactating rats and an exaggerated response was observed in post-maternal rats, current results support the hypothesis that lactation affects tau processing in the brain of the female.

### 1. Introduction

Disregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) axis has been widely implicated as a risk factor for the precipitation and development of Alzheimer's disease (AD), with the corticotropin-releasing factor (CRF) signaling cascade emerging as a prominent player in the last decade alongside glucocorticoids (Rissman et al., 2007, 2012; Carroll et al., 2011a; Campbell et al., 2015). Studies on male rodents show that tau phosphorylation (pTau) increases in response to a variety of stressors (Rissman, 2010) and the exposure to a single episode

of restraint stress transiently induces pTau in the hippocampus (Rissman et al., 2007). Moreover, chronic restraint stress increases pTau in insoluble fractions that induces pathogenic-like changes in tau (Rissman et al., 2007, 2012) and hyperphosphorylation in various AD models (Carroll et al., 2011a, 2011b).

It is estimated that around 70% of patients with AD are women (Alzheimer's Association, 2016). The basis for this prevalence points towards an interplay of different risk factors in which ovarian and other hormones play a prominent role (Christensen and Pike, 2015; Snyder et al., 2016; Grimm et al., 2016; Moser and Pike, 2016). At the same

\* Corresponding author. Institute for Neurobiology, National Autonomous University of Mexico, Boulevard Juriquilla 3001, 76230, Queretaro, Qro, Mexico.  
E-mail address: [marter@unam.mx](mailto:marter@unam.mx) (T. Morales).

<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100241>

Received 27 February 2020; Received in revised form 10 July 2020; Accepted 11 July 2020

Available online 20 July 2020

2352-2895/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

time, a growing body of evidence shows that females might have an inherent vulnerability to stress-related psychiatric disorders and, hence, to developing AD (Bangasser and Valentino, 2014; Yan et al., 2018). Biochemical changes occur in the brain of the female due to reproductive status. Among them, a diminished response to diverse stressors has been reported during late pregnancy and lactation (Brunton and Russell, 2009; Sze and Brunton, 2019). There is also evidence that hormones such as estrogen, progesterone, allopregnanolone and potentially prolactin can influence pTau in a wide variety of experimental models (Irwin and Brinton, 2014; Muñoz-Mayorga et al., 2018). Furthermore, changes in the expression of tau and its phosphorylation levels have been documented during pregnancy and early lactation in a tissue-dependent manner in the brain (González-Arenas et al., 2012).

We previously reported that during lactation, a decrease in pTau (dephosphorylation phenomena) occurs in response to an acute exposure to restraint stress, coupled with a reduction in overall levels of glycogen synthase kinase 3- $\alpha$  (GSK3 $\alpha$ ) (Steinmetz et al., 2015). Since chronic restraint stress has been shown to increase pTau and its change towards insolubility in males, its consequences in females at different reproductive stages might offer a deeper understanding of the role that maternal hormones and female vulnerability play in chronic stress and AD development. Due to diminished stress responses and pTau in the dam after acute stress (Steinmetz et al., 2015), in the present study we hypothesize that the hippocampus of the mother will show diminished pTau in soluble and insoluble fractions when exposed to chronic restraint stress.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult (250–300 g) virgin, lactating or post-maternal (1-month post-weaned) female Wistar rats were housed individually under a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 8:00 h), controlled temperature (20–23 °C), and with food (Purina Rodent Laboratory Chow 5001) and water ad libitum. One day after parturition, litter sizes were culled to 8–10 pups. The chronic stress treatment started at postpartum day 5 for lactating rats or at 1 month after weaning (post-maternal rats, weaning at 21 days postpartum). The Animal Care and Use Committee of the Institute of Neurobiology at the National Autonomous University of Mexico (INB-UNAM) approved all experimental protocols. Animals were handled in accordance with Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999 and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.2. Chronic restraint stress protocol

Virgin, lactating and post-maternal rats were placed in flat-bottom acrylic restrainers with ventilation (543-RR and 544-RR, Plas-Labs, Inc., Lansing, MI) for a daily episode of 30 min of restraint for 14 days and were sacrificed either 20 min or 24 h after the last restraint episode. Control rats of each reproductive condition were handled daily but not restrained. Each experimental and control group included an N of 4–5 animals. Importantly, virgin and post-maternal rats were not monitored with vaginal smears to avoid any effect of cervix stimulation during our stress protocol. Separate groups of rats were selected for this purpose.

### 2.3. Western blot analysis

Rats were deeply anesthetized with a lethal dose of urethane (1.5–2 g/kg bw, IP). Urethane has been shown to influence pTau although in a much longer time frame than the one used in this study (Holscher et al., 2008). Immediately after sedation, animals were decapitated, and the hippocampus was rapidly dissected and frozen on dry ice. For analysis of pTau and solubility, hippocampal tissues were homogenized using sequential fractionation of RAB and RIPA extracts as described

previously (Rissman et al., 2007). Before homogenization, protease (PMSF and NaF) and phosphatase (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and okadaic acid) inhibitors were added at a concentration of 1 mM. Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) was added for a final concentration of 1%. Protein concentrations were determined using a BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford IL). Proteins were then boiled in sample buffer containing SDS, BME and glycerol at 95 °C for 5 min. Fifteen  $\mu$ g of protein were then separated by 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane using the iBlot2 system, 25 V for 7 min (0.2  $\mu$ m iBlot2 Transfer Stack, Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Nonspecific binding was blocked by incubating membranes in 5% milk-Tris buffered saline containing Tween 20 (TBS-T) for 30 min. Membranes were incubated with primary antibodies diluted in 5% albumin-TBST overnight at 4 °C. The primary antibodies were then detected by anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase-linked secondary antibodies for 1 h (dilution 1:1000; EMD Biosciences, La Jolla, CA, USA) and developed using an enhanced chemiluminescence Western blot detection kit (Supersignal West Pico; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Quantitative band intensity readings were obtained using ImageLab Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). All readings were normalized to non-stressed virgin standard band intensity readings.

### 2.4. Antibodies

Two well-characterized antibodies were used to probe for specific phosphorylated residues on rat hippocampal tau: S202/T205 (AT8, dilution 1:500; MN1020. Invitrogen, Rockford, IL, USA) and S396/404 (PHF-1, dilution 1:1000; gift from Dr P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA). For expression and activity of GSK3 kinase antibodies specific for total GSK3 $\alpha/\beta$  (0011-A, dilution 1: 1000; sc-7291. Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, USA), active GSK3 $\beta$  (pY216, dilution 1:1000; 612312. BD Biosciences) and inactive GSK3 $\beta$  (pS9, dilution 1:1000; 9336. Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) were used. Antibody PHF-1, which probes for phosphorylation in residues Ser396 and Ser 404 (PHF-1, dilution 1:10,000; gift from Dr P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA) was used to assess the anatomical localization of pTau by immunohistochemistry. GAPDH (FL-335, dilution 1:2000; sc-25778. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used as protein-loading control.

### 2.5. Immunohistochemistry

A separate set of rats in the different experimental groups were anesthetized with a lethal dose of urethane (1.5–2 g/kg bw, IP), perfused with 0.9% saline (100 ml) and 4% paraformaldehyde (in sodium phosphate buffer, 250 ml) and brain tissue was processed for immunohistochemistry as described previously (Rissman et al., 2007). Coronal sections 30  $\mu$ m thick, corresponding to the rostro-caudal extension of the dorsal hippocampus were cut on a freezing-sliding microtome and stored at –20 °C in antifreeze solution (30% ethylene glycol and 20% glycerol in 0.05 M sodium phosphate buffer) until use. PHF-1 antibody (dilution 1:10,000) was used to probe for pTau on free-floating sections of rat hippocampus. The staining reaction was carried out using a nickel-enhanced DAB Peroxidase Substrate kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Photomicrographs were taken using an LSM510 Meta microscope with a 20x objective for morphological analysis and quantification of pTau.

### 2.6. Morphological analysis

To quantify pTau labeling in the hippocampus, five photomicrographs were taken from five different coronal sections per animal in a rostro-caudal extension of Bregma –3.36 to –4.44. The label for pTau antibody was detected in CA3 and CA4 hippocampal subfields. Then, a

region of interest (ROI) of  $213.12 \mu\text{m} \times 248.64 \mu\text{m}$  ( $52,990.15 \mu\text{m}^2$ ) was selected, and the percentage of area occupied by the antibody signal was quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

### 2.7. Estrous cycle phase determination

To avoid the additional vaginal stimulation to experimental rats, a separate set of virgin and post-maternal rats was selected for estrous cycle determination. During the stress protocol (14 days), rats were placed in the restrainer and vaginal smears were taken. Vaginal secretion was collected with a plastic Pasteur pipette filled with approximately 1 mL of saline (NaCl 0.9%) by inserting the tip into the rat vagina. Vaginal smear was placed on glass slides. Vaginal fluid was collected with a clean pipette for each rat and analyzed under a light microscope with 10x objective lens as a wet mount preparation (direct cytology). The number and length of estrous cycles during the stress protocol were quantified as every time that proestrus or diestrus (due to the short duration of proestrus in the rat) was followed by a successful estrus and the length was counted from the first diestrus/metestrus before estrus (Cora et al., 2015). To quantify the percentage of days in a high ratio of estrogen/progesterone (High E/P), the number of days spent in either proestrus or estrus was divided by the 14 days of the stress protocol. We used the High E/P definition as described previously (Broestl et al., 2018) in which estrogen-dominant or High E/P days are proestrus and estrus, and progesterone-dominant or Low E/P days are metestrus and diestrus. Graphs of the cycles were created using Python 3.7 (Python Software Foundation. Python Language Reference).

### 2.8. Statistical analysis

Integrated intensity readings from Western blots were analyzed using a two-way ANOVA (factor one: reproductive condition; factor two: stress) followed by a Bonferroni post-hoc test only in the factor that resulted significant. Data (percent of control values) were plotted on bar graphs, with data expressed as the mean  $\pm$  SEM. For analysis of pTau by immunohistochemistry, percent of area of positive label was analyzed by a two-way ANOVA (factor one: reproductive condition; factor two: stress) followed by a Bonferroni post-hoc test only in the factor that resulted significant. Data were plotted on bar graphs, with data (percent of positive area) expressed as the mean  $\pm$  SEM. Number of cycles, length of cycles and the percent of days in High E/P ratio were analyzed using a Student t-test. Data were plotted on bar graphs, with data expressed as the mean  $\pm$  SEM. Prism 8 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used to run all the statistical tests.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Post-maternal rats present increased tau phosphorylation in response to the chronic restraint protocol

Because pathologically phosphorylated tau is sequestered into insoluble cellular fractions (Iqbal et al., 1994) and chronic restraint stress promotes pTau increases and accumulation in insoluble and potentially pathogenic tau (Rissman et al., 2007, 2012); Western blot in sequentially fractionated hippocampal extracts was used to evaluate pTau in soluble and detergent-soluble fractions. Factorial analysis revealed a significant contribution only from the reproductive condition factor, as evaluated with the PHF-1 antibody (F2, 19 = 5.267,  $P = 0.015$ ) and a significant contribution from both factors as evaluated with the AT8 antibody (reproductive condition factor F2, 17 = 4.685,  $P = 0.024$ ; stress factor F1, 17 = 6.369,  $P = 0.022$ ; interaction F2, 17 = 1.034, not significant), in the soluble fraction 20 min after handling or last stress episode. As shown in Fig. 1A and B, post-maternal rats showed a significant increase in pTau when compared to stressed lactating rats as evaluated by both PHF-1 ( $P = 0.0259$ ) and AT8 ( $P = 0.0138$ ) antibodies.

Furthermore, factorial analysis of the insoluble fraction, as evaluated by the PHF-1 antibody, showed a significant contribution only from the reproductive condition factor (F2, 17 = 5.593,  $P = 0.013$ ; stress factor; F1, 18 = 2.687, not significant) with no interaction among factors (F2, 18 = 0.3053, not significant). Post-hoc analysis revealed a significant increase in pTau (Fig. 1C) in non-stressed post-maternal rats ( $P = 0.0316$ ) in comparison to non-stressed virgin controls.

When the soluble and insoluble fractions were evaluated 24 h after the last stress episode, the factorial analysis revealed a significant contribution only from stress factor (F1, 19 = 8.116,  $P = 0.010$ ) as evaluated by the PHF-1 antibody. As shown in Fig. 2C, post-hoc analysis showed that stressed post-maternal rats had significantly more pTau than their non-stressed controls in the insoluble fraction ( $P = 0.0193$ ).

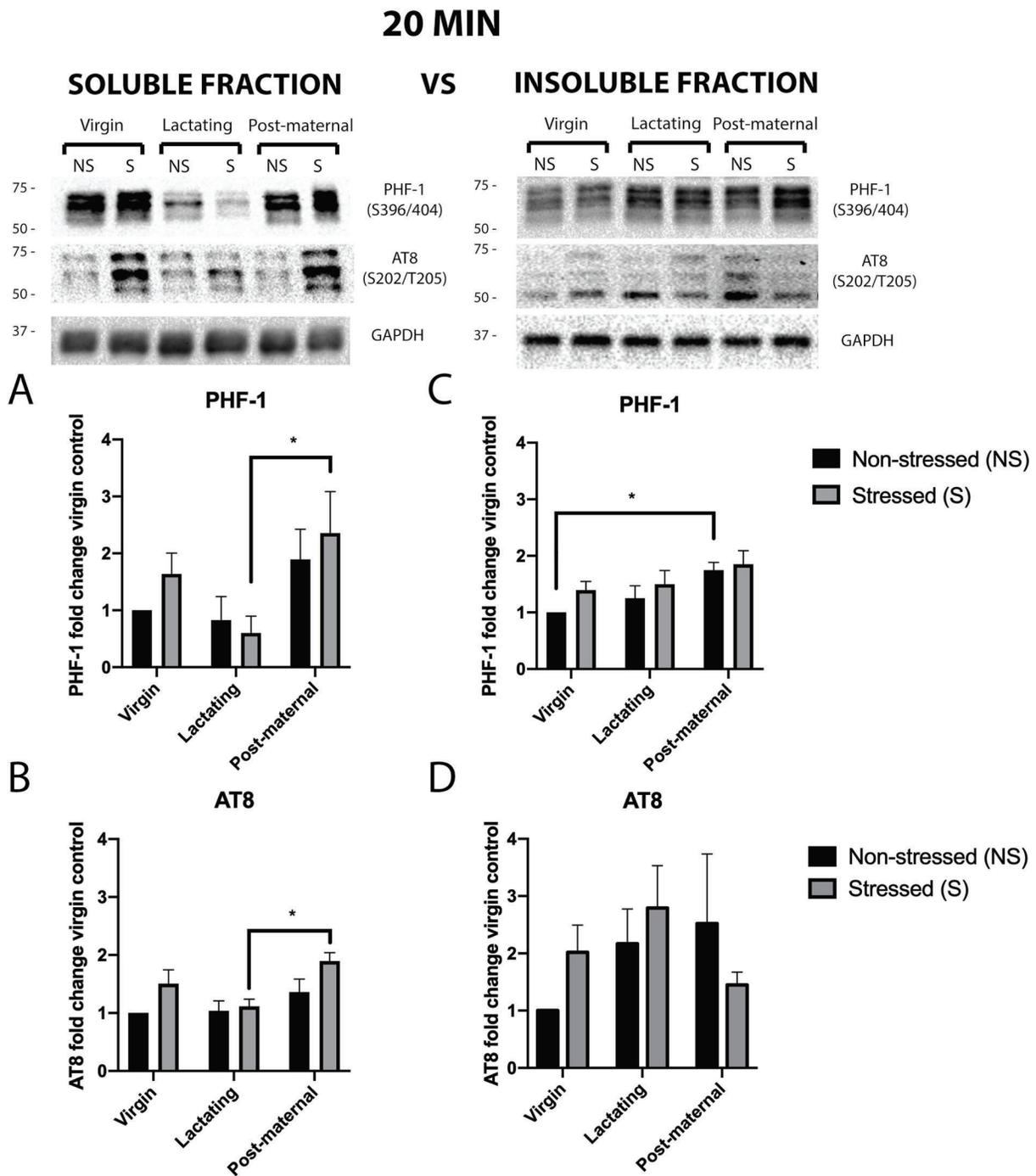
### 3.2. GSK3 modulation by reproductive condition and chronic stress in the hippocampus of the female rat

To investigate possible mechanisms for the stress-induced phosphorylation seen in post-maternal rats, changes in GSK3, a well-characterized tau kinase with activation in this stress model (Steinmetz et al., 2015), were measured by Western blot in the soluble fraction. Factorial analysis showed a significant effect of only the stress factor (F1, 18 = 5.662,  $P = 0.029$ ; reproductive condition factor F2, 18 = 2.150, not significant; interaction F2, 18 = 2.839, not significant) in the overall levels of GSK3 $\beta$  in rats that were sacrificed 20 min after handling or the last stress episode. As shown in Fig. 3A, stressed virgin rats ( $P = 0.0178$ ) had significantly higher levels of total GSK3 $\beta$ . Interestingly, at the same time point, the factorial analysis revealed a significant contribution from the stress factor (F1, 17 = 6.658,  $P = 0.019$ ; reproductive condition factor F2, 18 = 2.541, not significant; interaction F2, 18 = 1.125, not significant) when evaluated by a specific antibody for GSK3 $\beta$  phosphorylated in Ser<sup>9</sup>, which renders the kinase inactive, where post-hoc analysis revealed that stressed post-maternal rats had significantly ( $P = 0.0357$ ) higher levels of inactive GSK3 in comparison with their non-stressed controls (Fig. 3B).

When inactive GSK3 $\beta$  was evaluated 24 h after the last handling or stress episode, a significant contribution was found from the interaction reproductive condition x stress (F2, 18 = 4.935,  $P = 0.020$ ), but not from the individual factors (reproductive stage factor F2, 18 = 1.263, not significant; stress factor F1, 18 = 0.3455, not significant). As shown in Fig. 4B, a significant increase was found in inactive GSK3 $\beta$  when non-stressed lactating rats ( $P = 0.0112$ ) were compared with non-stressed virgin controls. Interestingly, stressed virgin rats had a non-significant tendency ( $P = 0.056$ ) towards higher levels of inactive GSK3 $\beta$  when compared with their non-stressed controls. No significant differences were found in active GSK3 $\beta$  (Y<sup>216</sup>) at any reproductive condition or time point (Supplementary Fig. 1). No differences were found in GSK3 $\alpha$  (total, active, inactive) in any reproductive condition or time point.

### 3.3. Tau phosphorylation is restricted to areas CA3 and CA4 differentially affected by chronic stress and reproductive condition

Immunohistochemical staining was used to evaluate the anatomical localization of labeling and changes in the amount of pTau with a well-characterized antibody (PHF-1) that probes for the epitope Ser396/404. Representative photomicrographs in Fig. 5 and Fig. 6 show that the distribution of tau phosphorylation in the hippocampus of female rats is restricted to CA3 and CA4 areas. The PHF-1 antibody showed robust fibrillar labeling in the axons of the mossy fibers projecting to the pyramidal cell layer of the Cornu Ammonis in CA3, in *stratum lucidum* and *stratum radiatum*. The labeling in CA4 is mostly punctuate, with a handful of PHF-1-positive cell bodies, and does not extend into the granular layer of the dentate gyrus (DG). This region mostly contains mossy cells. Factorial analysis revealed a significant contribution of both factors, but not the interaction between them (reproductive condition factor F2, 22 = 3.824,  $P = 0.038$ ; stress factor F1, 22 = 12.52,  $P = 0.002$ ;



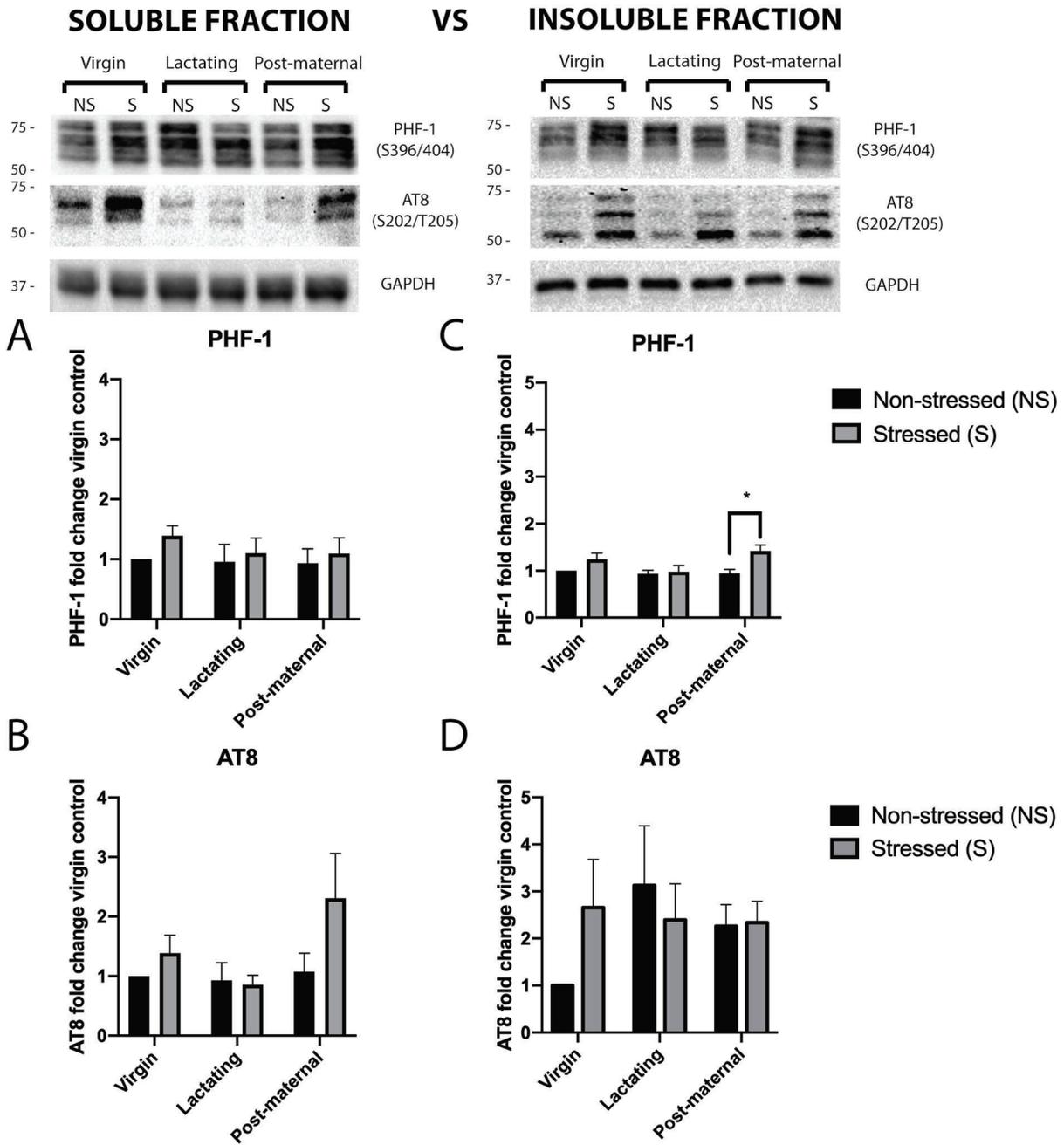
**Fig. 1.** Post-maternal rats show a significant increase in tau phosphorylation 20 min after the last stress episode in the soluble and insoluble fraction. Female rats in different reproductive stages (virgin, lactating and post-maternal) were sacrificed 20 min after their last stress episode (S) or after handling/no stress (NS). Stressed post-maternal rats had significantly higher phosphorylation levels when compared to stressed lactating rats as evaluated by both the PHF-1 and AT8 antibodies in the soluble fraction. Non-stressed post-maternal rats presented significantly more pTau than non-stressed virgin rats as evaluated by PHF-1 in the insoluble fraction. No significant differences were found in stressed lactating rats when compared to non-stressed controls at any time point. Data are presented as percent of virgin control group (Means  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ ;  $N = 4-5$ ).

interaction  $F_{2, 22} = 1.931$ ,  $P = 0.1688$ , not significant). As shown in Fig. 5B, stressed virgin ( $P = 0.0247$ ) and post-maternal rats ( $P = 0.0420$ ) showed a significant increase in the percentage of immunoreactive area in comparison with their unstressed controls 20 min after the last stress episode only in the CA4 area. No significant changes were detected in lactating rats 20 min after their last stress episode with their non-stressed controls. No significant changes were detected in the CA3 area (Fig. 5A) in any of the reproductive conditions as evaluated by the

factorial analysis, although a tendency towards the same results as CA4 area are evident (reproductive condition factor  $F_{2, 22} = 2.786$ ,  $P = 0.0834$ ; stress factor  $F_{1, 22} = 3.652$ ,  $P = 0.0691$ ; interaction  $F_{2, 22} = 0.8080$ ,  $P = 0.4585$ ).

On the other hand, the factorial analysis 24 h after the last stress episode showed only a significant contribution of reproductive condition factor ( $F_{2, 20} = 4.538$ ,  $P = 0.0237$ ) but not for stress factor ( $F_{1, 20} = 0.2887$ , not significant) or the interaction ( $F_{2, 20} = 1.299$ , not

## 24 HOURS



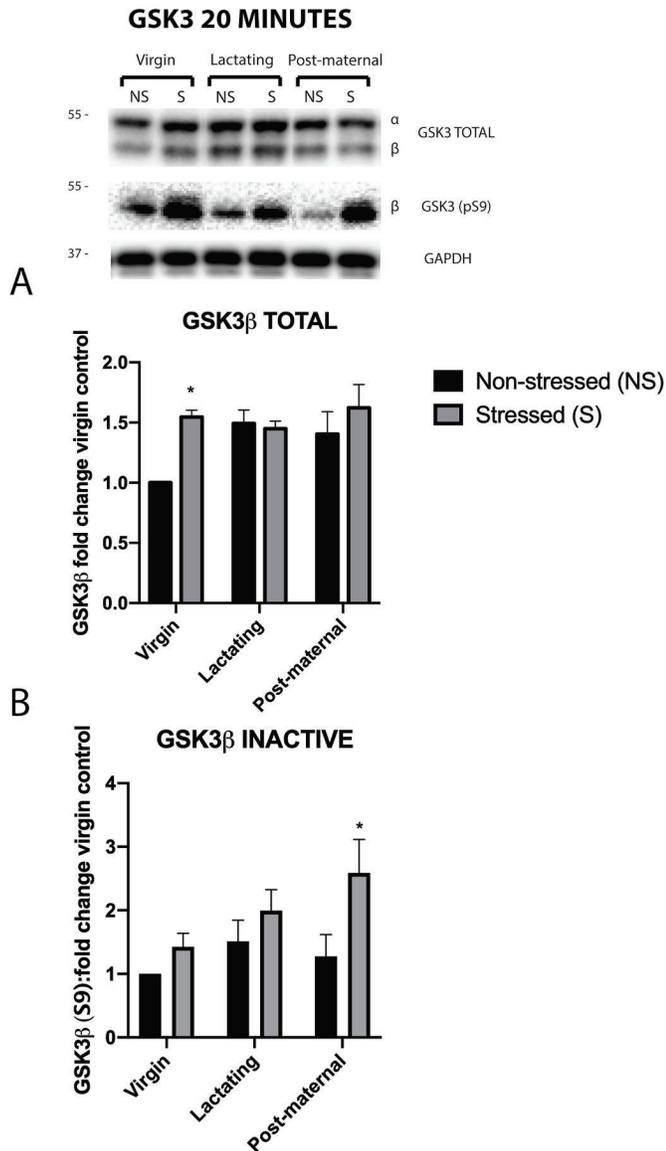
**Fig. 2.** Stressed post-maternal rats show a significant increase in tau phosphorylation 24 h after the last stress episode in the insoluble fraction. Female rats in different reproductive stages (virgin, lactating and post-maternal) were sacrificed at either handling (NS) or 24 h (S) after their last stress episode. Stressed post-maternal rats had significantly higher phosphorylation levels than their non-stressed controls in the insoluble fraction as evaluated by the PHF-1 epitope. No significant differences were found in stressed virgin or lactating rats at either the soluble or insoluble fraction. Bars represent mean  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ ;  $N = 4-5$ .

significant). Fig. 6A shows that stressed lactating rats had a significant increase in the pTau immunoreactivity area percentage in comparison with stressed virgin ( $P = 0.0288$ ) and post-maternal ( $P = 0.0236$ ) rats 24 h after their last stress episode. No significant changes were detected in lactating rats in comparison with their non-stressed controls. No significant changes were detected in the CA4 area (Fig. 6B) in any of the reproductive conditions at this time point.

### 3.4. Post-maternal rats showed more individual variability in estrous cycle than virgin rats

Vaginal cytology in wet mount preparations throughout the stress protocol was used to evaluate if stress affected or altogether abolished the estrous cycle. As shown in Fig. 7A, this chronic stress protocol does not suppress the estrous cycle. Furthermore, post-maternal rats presented the most individual variation in the number of their estrous cycles (Fig. 7C) and spent a significantly higher ( $P = 0.0259$ ) percentage of days in High E/P ratio (Fig. 7B) than virgin rats during the stress

## SOLUBLE FRACTION



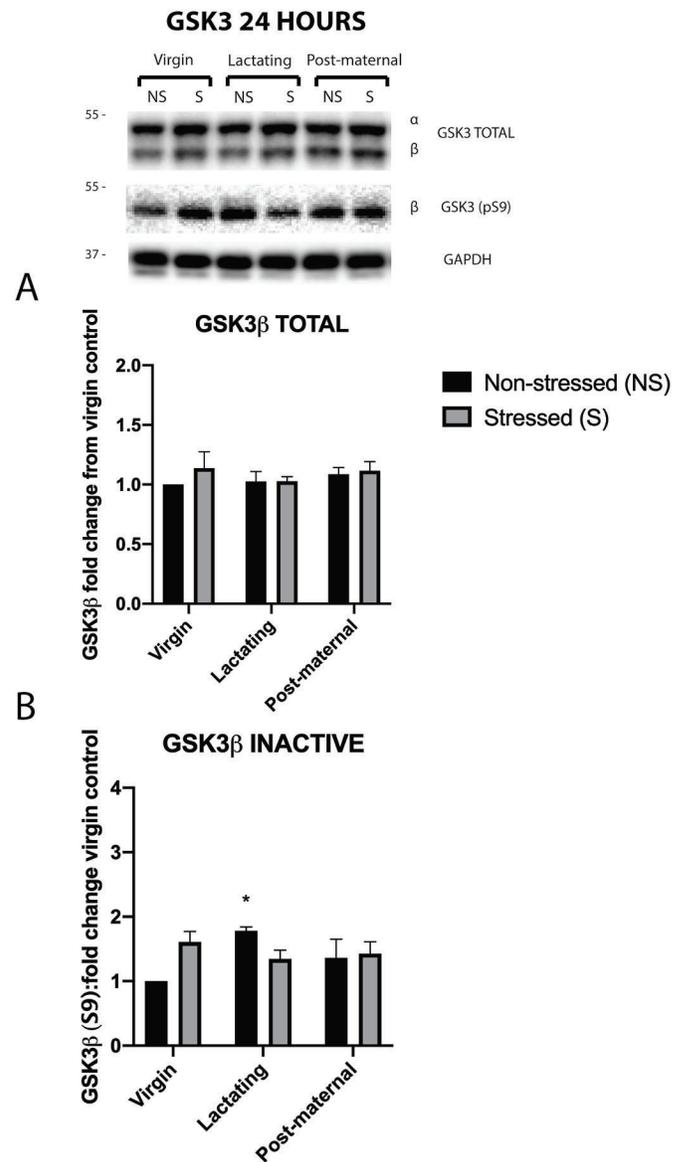
**Fig. 3.** Stressed virgin rats show a significant increase in total levels of GSK3β whereas stressed post-maternal show increased inactive GSK3β 20 min after the last stress/handling episode. Western blot was performed using antibodies specific to GSK3 to analyze possible mechanisms of stress-induced pTau in virgin, lactating and post-maternal rats sacrificed 20 min after either handling (NS) or their last stress episode (S). (A) Stressed virgin rats and showed a significant increase in the overall levels of GSK3β 20 min after the last handling or stress episode. (B) Stressed post-maternal rats showed a significant increase in GSK3β(S9) at the same time point. Data are presented as percent of virgin control group (mean ± SEM; \*P < 0.05; N = 4–5).

protocol.

## 4. Discussion

In this study we tested the hypothesis that female rats undergoing lactation have diminished pTau responses in both soluble and insoluble fractions after chronic restraint stress. Our findings are that i) stressed virgin and post-maternal rats showed increased pTau in response to chronic restraint stress; ii) GSK3β levels and activity are affected by the reproductive condition and chronic restraint treatment; and iii) the CA4 subfield in the hippocampus is the most sensitive to chronic restraint

## SOLUBLE FRACTION

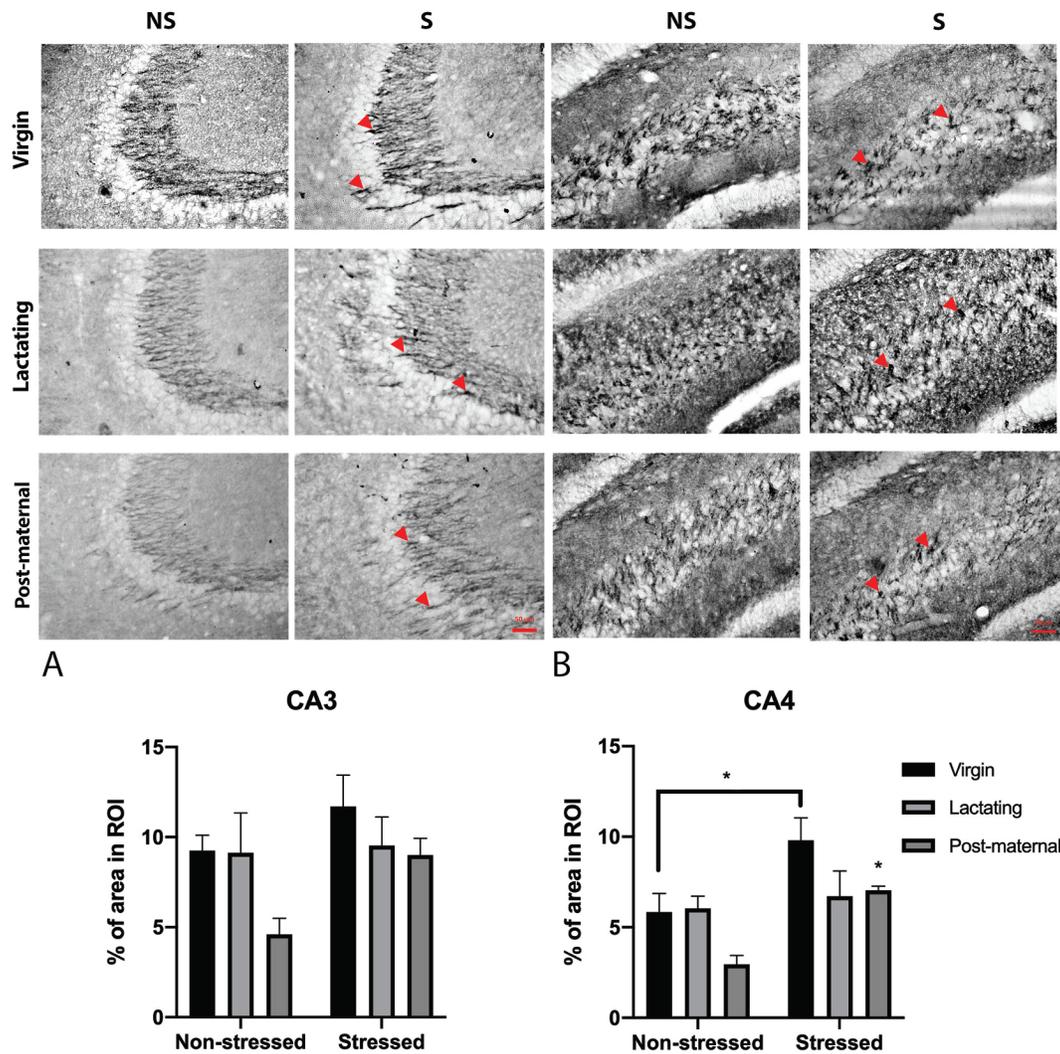


**Fig. 4.** Non-stressed lactating rats show a significant increase in inactive GSK3β 24 h after the last stress/handling episode. Western blot was performed using antibodies specific to GSK3 to analyze possible mechanisms of stress-induced pTau in virgin, lactating and post-maternal rats sacrificed 20 min or 24 h after either handling (NS) or their last stress episode (S). Non-stressed lactating rats showed an increase in inactive GSK3β 24 h after handling or the last stress episode. No significant differences were found in overall GSK3β levels 24 h after the last stress episode. Data are presented as percent of virgin control group (mean ± SEM; \*P < 0.05; N = 4–5).

stress in female rats.

### 4.1. pTau in the hippocampus of post-maternal rats increased after chronic restraint stress

It has been demonstrated previously that chronic restraint stress can trigger pTau and induce a change towards insolubility and tau aggregation, which can be potentially pathogenic (Rissman et al., 2007, 2012). Our groups have also shown that lactating rats exposed to a single episode of restraint stress show a dephosphorylation phenomenon, coupled with reduction of overall levels of GSK3α (Steinmetz et al.,



**Fig. 5.** Chronic stress significantly increased pTau immunoreactivity in the CA4 subfield of stressed virgin and post-maternal rats sacrificed 20 min after their last stress episode in comparison to their non-stressed controls. Representative photomicrographs and corresponding quantification demonstrating positive immunoreactivity of pTau (PHF-1) in the CA3 and CA4 hippocampal subfields of stressed and non-stressed rats (control) at different reproductive stages (virgin, lactating and post-maternal). Stressed virgin and post-maternal rats had a significantly larger area of immunoreactivity for pTau in the CA4 subfield in comparison with their respective non-stressed controls. We found no significant differences in pTau immunoreactivity in stressed lactating rats 20 min following their last stress episode in the CA4 subfield in comparison with non-stressed controls. No significant differences were found in the CA3 subfield at any reproductive condition. Bars represent mean  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ ;  $N = 4-5$ . Scale bar = 50  $\mu$ m.

2015). The present study focused on the chronic exposure to the same stressor and found a significant increase in pTau in post-maternal rats in the soluble fraction 20 min after the last stress episode in comparison with stressed lactating rats. Interestingly, non-stressed post-maternal rats had significantly more pTau in the insoluble fraction when compared to non-stressed virgin controls. Most importantly, stressed post-maternal rats showed a significant increase in pTau 24 h after the last stress episode in comparison with their non-stressed controls in the insoluble fraction. The fact that stressed post-maternal rats showed increased pTau levels in the soluble fraction, which translates to the insoluble fraction, indicates that the sustained pTau in response to repeated stress promotes the change of tau to a detergent-soluble fraction where the bulk of aberrantly phosphorylated tau in paired helical fragments (PHF) and neurofibrillary tangles (NFT) resides in AD (Iqbal et al., 1984, 1994, Rissman et al., 2007, 2012).

The fact that we found a significant increase in inactive GSK3 $\beta$  20 min after the last stress episode in stressed post-maternal rats despite the clear pTau increase strongly suggests that this might be a mechanism trying to prevent pTau triggered by chronic stress, but it is surpassed by

the action of other kinases or the failure of phosphatase mechanisms (such as PP2A) that may contribute to the sustained pTau and its accumulation in the insoluble fraction. Kinases such as ERK 1/2 and JNK, are increased after restraint stress in male mice and contribute to stress-induced pTau (Rissman et al., 2007).

At this point, it is important to acknowledge the small sample size as a limitation to our study. Our current GSK3 $\beta$  data suggests that an increase in overall levels of GSK3 $\beta$  20 min after the last stress episode may play a role in the stress-induced phosphorylation observed in virgin rats 20 min after their last stress episode by immunohistochemistry. This increase was not found significant by Western blot. Furthermore, stressed virgin rats also show a tendency towards an increase in inactive GSK3 $\beta$ , in comparison to non-stressed virgin controls 24 h after the last handling/stress episode. Taken together, these observations suggest that virgin rats are affected by stress but might be able to activate mechanisms to reduce pTau in response to chronic stress.

Remarkably, these observations were not seen in lactating dams. Stressed lactating rats showed no significant differences at any time point in pTau in comparison to their non-stressed controls with any of

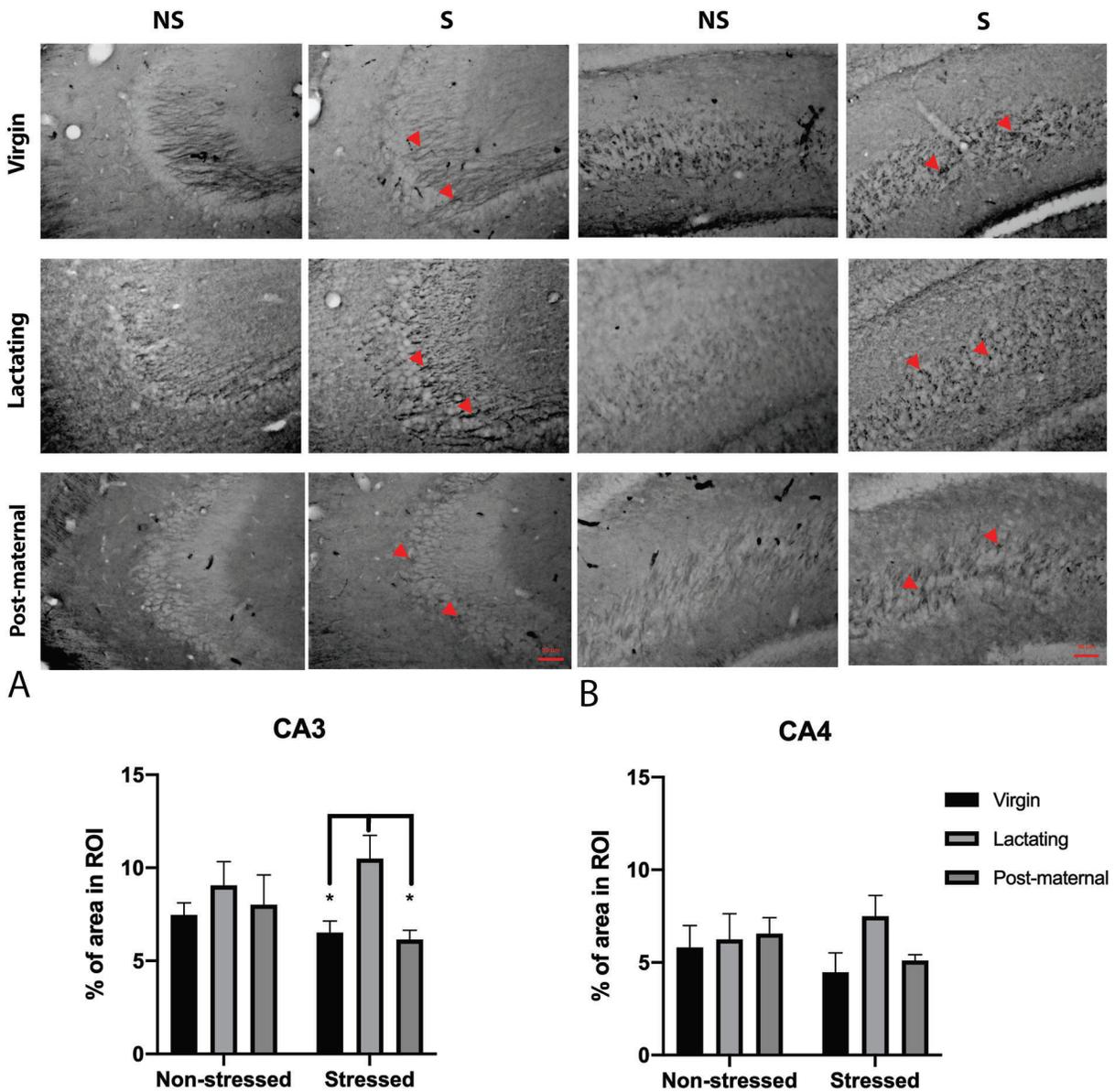


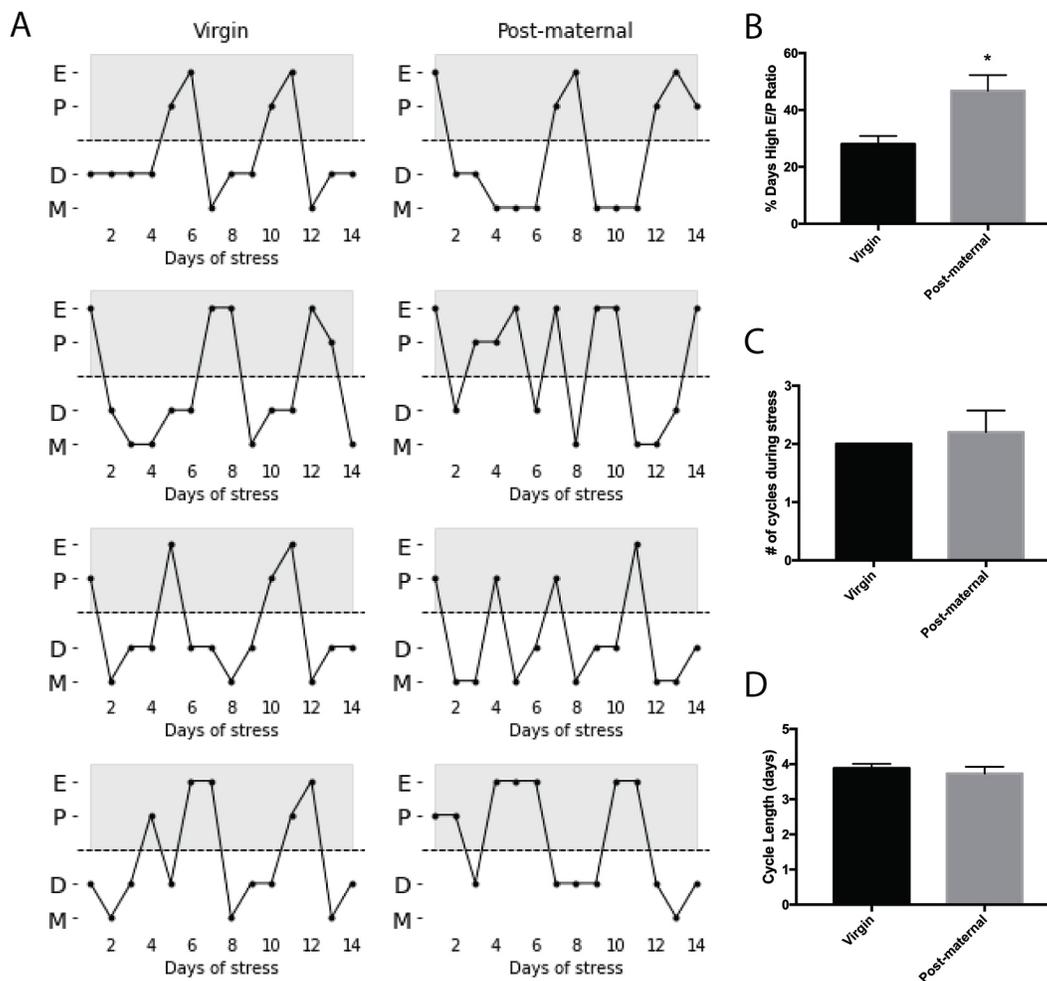
Fig. 6. Chronic stress significantly increased p-tau immunoreactivity in the CA3 subfield of lactating rats sacrificed 24 h after the last stress episode compared to stressed virgin and post-maternal rats. Representative photomicrographs and corresponding quantification demonstrating positive immunoreactivity of pTau (PHF-1) in the CA3 and CA4 hippocampal subfields of stressed and non-stressed rats (control) at different reproductive stages (virgin, lactating and post-maternal). Stressed lactating rats had a significantly larger area of immunoreactivity for pTau than stressed virgin and post-maternal rats in the CA3 subfield. We found no significant differences in pTau immunoreactivity in any group compared to their non-stressed controls in CA3. No significant differences were found in the CA4 subfield at any reproductive condition. Bars represent mean  $\pm$  SEM; \*P < 0.05; N = 4–5. Scale bar = 50  $\mu$ m.

our techniques, which suggests that they can buffer the effects of the chronic restraint treatment in pTau but not reverse them as observed using an acute stress episode (Steinmetz et al., 2015). Twenty-four hours after the last stress episode, a significant increase in inactive GSK3 $\beta$  (phosphorylated in Ser9) was seen in non-stressed lactating rats. These results suggest that lactation activates mechanisms by itself and in response to stress that diminish their susceptibility to pTau but only as long as this period lasts by the regulation of GSK3 activity.

4.2. The CA4 area in the hippocampus of virgin and post-maternal female rats is more susceptible to the effects of chronic restraint stress

The labeling pattern observed is in concordance with a previous study of endogenous tau in male mice using a phosphorylation-independent antibody and in which tau was mostly found in non-

myelinated axons, not in dendritic compartments or synapses, and to a lesser degree in oligodendrocytes (Kubo et al., 2018). A second immunohistochemical analysis was performed with another phosphorylation-dependent antibody (S422), with an identical pattern and similar results (data not shown). Previous studies using restraint stress or corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) overexpression report significantly more markers of neurodegeneration (Jeong et al., 2006) and pTau (Rissman et al., 2007, 2012; Campbell et al., 2015) in CA1, CA3 and the DG, specially CA4. We did not find pTau in the CA1 subfield or the molecular layer of the DG like some of the aforementioned reports using the same antibody and stressor, which indicates that female rats respond differently in comparison with male mice. There is evidence that gender, sex and reproductive status can influence the response to different stressors and the recruitment of different circuitries and biochemical pathways activated by them, thus explaining



**Fig. 7.** Post-maternal rats spent significantly higher percentage of days in stages of the cycle with a high ratio of estrogen/progesterone (High E/P). The graph shows the stage of the estrous cycle for virgin and post-maternal rats during the 14 days of the stress protocol. A) Post-maternal rats showed erratic cycles during the stress protocol although the cycle was not abolished completely. B) Post-maternal rats spent significantly higher percentage of days in stages of the cycle with a High E/P. Abbreviations: M = Metestrus, D = Diestrus, P = Proestrus, E = Estrus. Bars represent mean  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ ;  $N = 4-5$ .

this difference with previous studies (Bangasser et al., 2010, 2017; Salvatore et al., 2018; Rincón-Cortés et al., 2019).

The immunohistochemical data from rats sacrificed 20 min after the last stress episode support our biochemical data indicating that virgin and post-maternal rats are more susceptible to the effects of chronic restraint stress. The CA4 hippocampal subfield is where the stress effects are most significant. Although the effects of chronic stress in this subfield are still not well understood, it is known that neurogenesis in the DG is negatively affected by stress and glucocorticoid administration (Snyder et al., 2011; Schoenfeld and Gould, 2012). Furthermore, evidence suggests that decreased neurogenesis could translate to changes in CA3 atrophy and hippocampal volume (Schoenfeld et al., 2017). Non-stressed post-maternal rats had significantly higher levels of pTau than non-stressed virgin rats as analyzed by Western blot, although the same was not observed as measured by immunohistochemistry. Despite the antibodies employed for Western blot and immunohistochemistry are the same, the two methods are different. Whereas this last one is detecting the antigen directly in the fixed tissue at specific regions of the hippocampus, for Western blot proteins undergo an extraction and further steps before being exposed to the antibody.

Interestingly, stressed lactating rats had significantly more pTau in CA3 24 h after the last stress episode in comparison with both stressed virgin and post-maternal rats. We believe that this seemingly conflicting result is due to more soluble tau being available for the antibody to detect in lactating rats, in contrast with virgin and post-maternal rats

where tau might be increasingly changing into an insoluble form not easily detected by the antibody. This mechanism has been proposed previously in studies with the same restraint protocol in male mice (Rissman et al., 2007, 2012) and further highlights the fact that pTau mechanisms are altered during lactation.

#### 4.3. Hormones and response to chronic restraint stress

Although corticosterone levels (a canonical parameter of the stress response) were not measured, we have reasons to believe that corticosterone is not pivotally involved in stressed-induced pTau, as adrenalectomized males still show this response (Rissman et al., 2007). Moreover, in a previous study using an acute episode of restraint stress, no differences were found in corticosterone levels between stressed and non-stressed rats (Steinmetz et al., 2015). As for stress habituation, our overall results, the variation in estrous cycle and our own observations (urination and defecation) during the stress protocol support the fact that our rats did not experience habituation (Girotti et al., 2006). It is well documented that hormones, such as estrogen and progesterone (and its metabolites), can influence pTau in different experimental models generally proposing protective actions for both hormones (reviewed in Muñoz-Mayorga et al., 2018). In this study, we observed that virgin and post-maternal rats have a stress-induced increase in pTau and that post-maternal rats seem to be the most sensitive to these effects, as they accumulate tau in an insoluble and potentially pathogenic

fraction.

During the stress protocol, post-maternal rats had the most individual variation in estrous cycle number, ranging from 1 to 3 in contrast to the 2 cycles observed in virgin rats. Furthermore, stressed post-maternal rats spent a significantly higher percentage of days in estrogen-dominant (High E/P ratio) cycle stages in response to the stress protocol when compared to stressed virgin rats. Females of an AD model spent a higher percentage of days in a High E/P ratio when compared to non-transgenic controls (Broestl et al., 2018). Furthermore, subjects in days with a High E/P ratio had neural network alterations, cognitive impairment and higher production of pathogenic beta amyloid (A $\beta$ 1-42) when compared to subjects in Low E/P ratio or gonadectomized (Broestl et al., 2018). Interestingly, no changes in total tau or phosphorylated tau (PHF-1) were observed in this study.

According to our data, the maternal experience seems to render the rat brain more susceptible to the effects of stress-induced pTau. Some studies point to the number of pregnancies as a risk factor for AD in humans (Ptok et al., 2002; Colucci et al., 2006) and an interesting study evaluating phosphorylation-dependent tau antibodies and their correlation with Braak stages observed that all of the brain tissue examined in Braak stages V/VI came from women (Neddens et al., 2018). Other studies correlate late pregnancy with better cognitive performance (Fox et al., 2013) and prolonged periods of breastfeeding with a reduced risk of developing AD (Karim et al., 2016). In rodents it has been reported that the number of maternal experiences has a positive effect on brain aging (Gatewood et al., 2005). Further research is needed to clarify these observations.

The decreased sensitivity of the lactating dam to stressors (Brunton et al., 2008), in which oxytocin and prolactin, play an important role has been widely documented (Törner and Neumann, 2002). High levels of prolactin during the lactation period are known to contribute to the stress hyporesponsiveness characteristic of this state (Törner and Neumann, 2002; Törner et al., 2002). We have previously proposed that one of the mechanisms by which prolactin could protect the lactating rat from the effects of restraint stress is by increasing the activity of the Akt pathway that can phosphorylate GSK3 in the residue Ser9, which inactivates the kinase, preventing it from tagging the prolactin receptor for degradation and also preventing stress-induced pTau (Domínguez-Cáceres et al., 2004; Plotnikov et al., 2008; Steinmetz et al., 2015; Muñoz-Mayorga et al., 2018). Although our biochemical results fit and support the aforementioned mechanism, these observations, until our study, were done in lymphoid and breast cancer cells (Domínguez-Cáceres et al., 2004; Plotnikov et al., 2008). Thus, more research is needed to prove its existence in the brain. This study and others build upon the existing literature and lay the foundation to keep researching prolactin as a potential regulator of tau phosphorylation. Notwithstanding, how prolactin regulates the stress response in different brain regions is not well understood, and the contribution of other cellular pathways involving phosphatase regulation or interaction with CRFR receptors in the hippocampus cannot be excluded.

Due to the paramount reproductive importance of the maternal experience (Arbeitman, 2019), the array of hormones involved such as allopregnanolone in late pregnancy and prolactin during lactation, result in a decreased response to stress (Brunton et al., 2008; Sze and Brunton, 2019). Furthermore, progesterone has been reported to increase between days 12 and 16 of lactation (Vanoye-Carlo et al., 2008) and oxytocin possesses documented anxiolytic actions and has high levels during lactation (Brunton et al., 2008). We must now stress the fact that it is the entire lactation period, its associated hormonal changes and the interplay between them that result in pTau changes during this period, so several yet unknown hormonal mechanisms might be involved.

Overall, our results show that lactation diminishes the effects of chronic stress on hippocampal pTau only for as long as this stage lasts; subsequently, the female is more vulnerable to stress-induced pTau. The fact that lactating rats are more resistant to stress-induced pTau can

have profound physiological implications, such as a more stable cytoskeleton and synaptic communication needed in the maternal brain for the care of the offspring. Further studies focusing on the overall female aging process, multiple maternities and different stressors are needed to better understand how these changes translate into an increased or decreased risk for developing neurological diseases, especially AD.

#### Data sharing

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### Declaration of competing interest

The authors of the manuscript have no conflicts of interest to declare.

#### CRediT authorship contribution statement

**Daniel Muñoz-Mayorga:** Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Robert A. Rissman:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Teresa Morales:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - review & editing, Funding acquisition.

#### Acknowledgements

These studies were supported by grants IN204718 from UNAM-DGAPA-PAPIIT and A1S8948 from CONACYT to Dr. Teresa Morales; and BX003040, AG018440 and AG065385 from National Institutes of Health to Dr. Robert Rissman. This work is part of Daniel Muñoz-Mayorga's PhD studies in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). DMM studies were supported by CONACyT scholarship (CVU/Recipient: 662482/574065), CONACyT Becas Mixtas scholarship program and UNAM Programa de Apoyo para los Estudios de Posgrado. The authors are grateful to Jessica Gonzalez for proofreading the English version of this manuscript, Biol. Eugenia Ramos for technical assistance, Julio Reyes-Mendoza for statistical assistance and helpful discussions, Dr. Martín García and Dr. Alejandra Castilla assistance for animal care. We thank to Dr. Peter Davies (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA) for the generous donation of the PHF-1 antibody.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100241>.

#### References

- Arbeitman, M.N., 2019. Maternal experience leads to lasting gene expression changes in some regions of the mouse brain. *G3 (Bethesda)* 9, 2623–2628.
- Bangasser, D.A., Curtis, A., Reyes, B.A.S., Bethea, T.T., Parastatidis, I., Ischiropoulos, H., Van Bockstaele, E.J., Valentino, R.J., 2010. Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. *Mol. Psychiatr.* 15 (9), 896–904. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.66>.
- Bangasser, D.A., Valentino, R.J., 2014. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. *Front. Neuroendocrinol.* 35 (3), 303–319. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.03.008>.
- Bangasser, D.A., Dong, H., Carroll, J., Plona, Z., Ding, H., Rodriguez, L., McKennan, C., Csernansky, J.G., Seeholzer, S.h., Valentino, R.J., 2017. Corticotropin-releasing factor overexpression gives rise to sex differences in Alzheimer's disease-related signaling. *Mol. Psychiatr.* 22 (8), 1126–1133. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.185>.
- Broestl, L., Worden, K., Moreno, A.J., Davis, E.J., Wang, D., Garay, B., Singh, T., Verret, L., Palop, J.J., Dubal, D.B., 2018. Ovarian cycle stages modulate alzheimer-related cognitive and brain network alterations in female mice. *eNeuro* 5 (6), 1–18. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0132-17.2018>.
- Brunton, P.J., Russell, J.A., Douglas, A.J., 2008. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal Axis during pregnancy and lactation.

- J. Neuroendocrinol. 20, 764–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01735.x>.
- Brunton, P., Russell, J.A., 2009. The expectant brain: adapting for motherhood. *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (1), 11–25. <https://doi.org/10.1038/nrn2280>.
- Campbell, S.N., Zhang, C., Monte, L., Roe, A.D., Rice, K.C., Tache, Y., Masliah, E., Rissman, R.A., 2015. Increased tau phosphorylation and aggregation in the hippocampus of mice overexpressing corticotropin-releasing factor. *J. Alzheimers Dis* 43, 967–976.
- Carroll, J.C., Iba, M., Bangasser, D.A., Valentino, R.J., James, M.J., Brunden, K.R., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., 2011a. Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy. *J. Neurosci.* 31 (40), 14436–14449. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3836-11.2011>.
- Carroll, J.C., Rosario, E.R., Villamagna, A., Pike, C.J., 2011b. Continuous and cyclic progesterone differentially interact with estradiol in the regulation of Alzheimer-like pathology in female 3xTg transgenic Alzheimer's disease mice. *Endocrinology* 151 (6), 2713–2722. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1487>.
- Christensen, A., Pike, C.J., 2015. Menopause, obesity and inflammation: interactive risk factors for Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 7, 130. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00130>.
- Colucci, M., Cammarata, S., Assini, A., Croce, R., Clerici, F., Novello, C., Mazzella, L., Dagnino, N., Mariani, C., Tanganelli, P., 2006. The number of pregnancies is a risk factor for Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 13, 1374–1377.
- Cora, M.C., Kooistra, L., Travlos, G., 2015. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol. Pathol.* 43, 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>.
- Domínguez-Cáceres, M.A., García-Martínez, J.M., Calcabrini, A., González, L., Porque, P., León, J., 2004. Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene* 23 (44), 7378–7390. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208002>.
- Fox, M., Berzuini, C., Knapp, L.A., 2013. Maternal breastfeeding history and Alzheimer's disease risk. *J. Alzheimers Dis* 37 (4), 809–821. <https://doi.org/10.3233/JAD-130152>, 2013.
- Gatewood, J.D., Morgan, M.D., Eaton, M., McNamara, I.M., Stevens, L.F., Macbeth, A.H., Meyer, E.A., Lomas, L.M., Kozub, F.J., Lambert, K.G., Kinsley, C.H., 2005. Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. *Brain Res. Bull.* 66, 91–98.
- Girotti, M., Pace, T.W.W., Gaylord, R.I., Rubin, R.A., Herman, J.P., Spencer, R.L., 2006. Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced C-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience* 138 (4), 1067–1081. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.002>.
- González-Arenas, A., Piña-Medina, A.G., González-Flores, O., Gómora-Arrati, P., Carrillo-Martínez, G.E., Balandrán-Ruíz, M.A., 2012. Expression pattern of Tau in the rat brain during pregnancy and the beginning of lactation. *Brain Res. Bull.* 89, 3–4. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.07.011>.
- Grimm, A., Mensah-Nyagan, A.G., Eckert, A., 2016. Alzheimer, mitochondria and gender. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 67, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.04.012>.
- Holscher, C., van Aalten, L., Sutherland, C., 2008. Anaesthesia generates neuronal insulin resistance by inducing hypothermia. *BMC Neurosci.* 9 (100).
- Iqbal, K., Zaidi, T., Thompson, C.H., Merz, P.A., Wisniewski, H.M., 1984. Alzheimer paired helical filaments: bulk isolation, solubility, and protein composition. *Acta Neuropathol.* 62, 167–177.
- Iqbal, K., Alonso, A.C., Gong, C.X., Khatoon, S., Singh, T.J., Grundke-Iqbal, I., 1994. Mechanism of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 9, 119–123.
- Irwin, R.W., Brinton, R.D., 2014. Allopregnanolone as regenerative therapeutic for Alzheimer's disease: translational development and clinical promise. *Prog. Neurobiol.* 113, 40–55.
- Jeong, Y.H., Park, C.H., Yoo, J., Shin, K.Y., Ahn, S., Kim, H., Lee, S.H., Emson, P.C., Soo, Y., 2006. Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APP<sub>V717</sub>-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *Faseb. J.* 6, 729–731.
- Karim, R., Dang, H., Henderson, V.W., Hodis, H.N., John, J.S., Brinton, R.D., 2016. Effect of reproductive history and exogenous hormone use on cognitive function in mid- and late life. *J. Am. Geriatr. Soc.* 64, 12. <https://doi.org/10.1111/jgs.14658>.
- Kubo, A., Misonou, H., Matsumaya, M., Nomori, A., Wada-Kakuda, S., Takashima, A., Kawata, M., Murayama, S., Ihara, Y., Miyasaka, T., 2018. Distribution of endogenous normal tau in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 527, 985–998.
- Moser, V.A., Pike, C.J., 2016. Obesity and sex interact in the regulation of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 67, 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.08.021>.
- Muñoz-Mayorga, D., Guerra-Araiza, C., Torner, L., Morales, T., 2018. Tau phosphorylation in female neurodegeneration: role of estrogens, progesterone, and prolactin. *Front. Endocrinol.* 9, 133. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00133>.
- Neddens, J., Temmel, M., Flunkert, S., Kerschbaumer, B., Hoeller, C., Loeffler, T., Niederkofler, V., Daum, G., Attems, J., Hutter-Paier, B., 2018. Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 52. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0557-6>.
- Plotnikov, A., Li, Y., Tran, T.H., Tang, W., Palazzo, J.P., Rui, H., 2008. Oncogene-mediated inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta impairs degradation of prolactin receptor. *Canc. Res.* 68 (5), 1354–1361. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6094>.
- Ptok, U., Barkow, K., Heun, R., 2002. Fertility and number of children in patients with Alzheimer's disease. *Arch. Wom. Ment. Health* 5, 83–86.
- Rincón-Cortés, M., Herman, J.P., Lupien, S., Maguire, J., Shansky, R.M., 2019. Stress: influence of sex, reproductive status and gender. *Neurobiol. Stress* 10, 1–6, 2019.
- Rissman, R.A., Lee, K., Vale, W., Sawchenko, P.E., 2007. Corticotropin-releasing factor receptors differentially regulate stress-induced tau phosphorylation. *J. Neurosci.* 27 (24), 6552–6562. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5173-06.2007>.
- Rissman, R.A., 2010. Stress-induced tau phosphorylation: functional neuroplasticity or neuronal vulnerability? *J. Alzheimers Dis* 18 (2), 453–457. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1153>.
- Rissman, R.A., Staup, M.A., Lee, A.R., Justice, N.J., Rice, K.C., Vale, W., Sawchenko, P.E., 2012. Corticotropin-releasing factor receptor-dependent effects of repeated stress on tau phosphorylation, solubility, and aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 6277–6282.
- Salvatore, M., Wiersielis, K.R., Luz, S., Waxler, D.E., Bhatnagar, S., Bangasser, D.A., 2018. Sex differences in circuits activated by corticotropin releasing factor in rats. *Horm. Behav.* 97, 145–153.
- Schoenfeld, T.J., Gould, E., 2012. Stress, stress hormones and adult neurogenesis. *Exp. Neurol.* 233, 12–21.
- Schoenfeld, T.J., McCausland, H.C., Morris, H.D., Padmanaban, V., Cameron, H.A., 2017. Stress and loss of adult neurogenesis differentially reduce hippocampal volume. *Biol. Psychiatr.* 82, 914–923.
- Snyder, J.S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., Cameron, H.A., 2011. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior. *Nature* 476 (7361), 458–461. <https://doi.org/10.1038/nature10287>.
- Snyder, H.M., Asthana, S., Bain, L., Brinton, R., Craft, S., Dubal, D.B., 2016. Sex biology contributions to vulnerability to Alzheimer's disease: a think tank convened by the Women's Alzheimer's Research Initiative. *Alzheimers Dement* 12, 11. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.08.004>.
- Steinmetz, D., Ramos, E., Campbell, S.N., Morales, T., Rissman, R.A., 2015. Reproductive stage and modulation of stress-induced tau phosphorylation in female rats. *J. Neuroendocrinol.* 27 (11), 827–834. <https://doi.org/10.1111/jne.12323>.
- Sze, Y., Brunton, P., 2019. Sex, stress and steroids. *Eur. J. Neurosci.* 1–29. <https://doi.org/10.1111/ejn.14615>, 2019:00.
- Torner, L., Neumann, I.D., 2002. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* 5 (4), 249–257.
- Torner, L., Toschi, N., Nava, G., Clapp, C., Neumann, I.D., 2002. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur. J. Neurosci.* 15 (8), 1381–1389.
- Vanoye-Carlo, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza-Rodríguez, A., Cerbón, M., 2008. Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Horm. Behav.* 53, 112–123.
- Yan, Y., Dominguez, S., Fisher, D.W., Dong, H., 2018. Sex differences in chronic stress responses and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Stress* 8, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.yjnstr.2018.03.002>.



# Tau Phosphorylation in Female Neurodegeneration: Role of Estrogens, Progesterone, and Prolactin

Daniel Muñoz-Mayorga<sup>1</sup>, Christian Guerra-Araiza<sup>2</sup>, Luz Torner<sup>3</sup> and Teresa Morales<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico, <sup>2</sup>Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico, <sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Alfonso Abizaid,  
Carleton University, Canada

### Reviewed by:

Barbara Woodside,  
Concordia University, Canada

Ben Nephew,  
Tufts University Cummings School of  
Veterinary Medicine, United States

### \*Correspondence:

Teresa Morales  
marter@unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Neuroendocrine Science,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 13 December 2017

**Accepted:** 14 March 2018

**Published:** 28 March 2018

### Citation:

Muñoz-Mayorga D, Guerra-Araiza C,  
Torner L and Morales T (2018) Tau  
Phosphorylation in Female  
Neurodegeneration: Role  
of Estrogens, Progesterone,  
and Prolactin.  
*Front. Endocrinol.* 9:133.  
doi: 10.3389/fendo.2018.00133

Sex differences are important to consider when studying different psychiatric, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease (AD). These disorders can be affected by dimorphic changes in the central nervous system and be influenced by sex-specific hormones and neuroactive steroids. In fact, AD is more prevalent in women than in men. One of the main characteristics of AD is the formation of neurofibrillary tangles, composed of the phosphoprotein Tau, and neuronal loss in specific brain regions. The scope of this work is to review the existing evidence on how a set of hormones (estrogen, progesterone, and prolactin) affect tau phosphorylation in the brain of females under both physiological and pathological conditions.

**Keywords:** tau phosphorylation, estrogen, progesterone, prolactin, hippocampus, neuroprotection, neurodegenerative disease, reproduction

## INTRODUCTION

Tau protein, named after its ability to induce tubule formation (1), is a phosphoprotein that is almost exclusively found in neurons, and it has six molecular isoforms derived from the alternative splicing of a single gene (2). Tau is mostly found in the axon (3, 4), but its presence has also been reported in dendrites, oligodendrocytes, and astrocytes (5–7).

The relevance of tau in a number of neurodegenerative diseases, especially Alzheimer's disease (AD), has been widely documented (8). When in hyperphosphorylated state (p-Tau), tau aggregates to form neurofibrillary tangles (NFTs), a hallmark of AD (9). Currently, the triggers and threshold for tau to change into an aggregated pathogenic promotor are not well understood (10). Since only a small percentage of AD cases have a genetic background, research has led to the identification of risk factors, among the most studied are: age (the greatest risk factor), proneness to experience stress (11, 12), anxiety and depression (13), head injury, lack of physical exercise, obesity (14), low education level (15), and sex (16).

Sex differences are present across several psychiatric, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders, including AD (17, 18). Moreover, females undergo hormonal changes throughout life, which affect p-Tau (19). Among these changes, reproductive conditions such as puberty, the use of hormonal contraceptive methods, length of reproductive life, and pregnancy at late age have shown to correlate with better cognitive performance in postmenopausal stage (20). More importantly, breastfeeding is related to a reduced risk to develop AD, especially when performed for

a prolonged period (21). Likewise, maternal experience results in better performance in hippocampus-dependent learning tasks (22) and acute stress during lactation induces a decrease in hippocampal p-Tau compared to unstressed controls in rats (23). The following sections will focus on the role of a specific set of hormones (i.e., estrogen, progesterone, and prolactin) and its consequences for p-Tau.

## REGULATION OF TAU PHOSPHORYLATION

Tau phosphorylation is not only relevant to AD, but it is also a process that occurs in physiological conditions. The most emblematic function of tau is the ability to bind and stabilize microtubules by copolymerization with tubulin. This function is tightly regulated by the phosphorylation state of tau: when in a more dephosphorylated state, tau is more efficient at promoting microtubule formation (24). As a consequence of this hallmark function, tau also participates in axogenesis, axonal transport, neurite extension processes (25, 26), and coordinated phosphorylation and dephosphorylation within the microtubule has been proposed as a step for neurite outgrowth (27).

Tau phosphorylation is a dynamic process that relies on the interaction of different kinases (enzymes adding phosphate groups to serine, S; threonine, T; and tyrosine, Y) and phosphatases (enzymes removing phosphate groups from S, T, and Y) (28). In spite of the large number of kinases that phosphorylate tau protein, just a few have been implicated as prominent players in abnormal tau processing *in vivo*, such as glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) and cdk-5 (29). Regarding phosphatases, tau can be dephosphorylated by PP1, PP2A, PP2B, and PP5 (28–30). Phosphatase activity in normal brains is due to PP2A in 71% and PP2B in 11% of the cases, making PP2A a major brain and tau phosphatase (30). In AD, the activity of PP2A is reduced by half and that causes tau hyperphosphorylation and memory deficits, while increasing GSK3 $\beta$  activity (28).

The most studied tau kinases in the field of AD are GSK3, cdk5, mitogen-activated protein kinase (MAPK) (p38, ERK1/2, JNK), CK1, and MARK. GSK3 is able to phosphorylate 42 sites of tau, 29 of which are found in brains with AD (31). GSK3 refers to two homologous proteins that are paralogs: GSK3 $\alpha$  and GSK3 $\beta$ . The catalytic sites of both are identical except for a glycine-rich N-terminal region in the GSK3 $\alpha$ , which is absent in the GSK3 $\beta$  paralog. The mechanisms regulating their expression are not well understood and some differential actions in synaptic plasticity and disease are known. More research is needed to clarify the role of each paralog in different physiological and pathological pathways (**Figure 1**) [see Ref. (32) for review].

P-tau has been implicated in neuronal plasticity. For example, its most phosphorylated isoform is expressed in fetal stages (2), reversible and transient hyperphosphorylation occurs during hibernation and deep anesthesia in squirrels (33), and pregnancy and lactation alter tau expression and p-Tau in rats (34). Regarding AD, cognitive and memory impairment have been correlated with synapse loss in the prefrontal cortex (35) and in other brain areas (36) of AD patients, along with presence of tau NFTs (37).

Immunization of 3xTg-AD mice against the N-terminal domain of tau decreased p-Tau and reduced the cognitive deficits in reference memory, as observed in the Morris water maze (38).

Studies using GSK3 $\beta$  show that hippocampal degeneration is mediated by p-Tau, which presents colocalization with the aforementioned NFTs. Besides, the increased GSK3 $\beta$  activity by AB peptides also causes tau hyperphosphorylation in the hippocampus of rodents (31), while inhibition of GSK3 $\beta$  can protect neurons from AB toxicity. Moreover, once cdk5 phosphorylates tau, it primes the protein to be more efficiently phosphorylated by GSK3 $\beta$  (31) showing that interactions among enzymes that regulate p-tau should be taken into account (**Figure 1**).

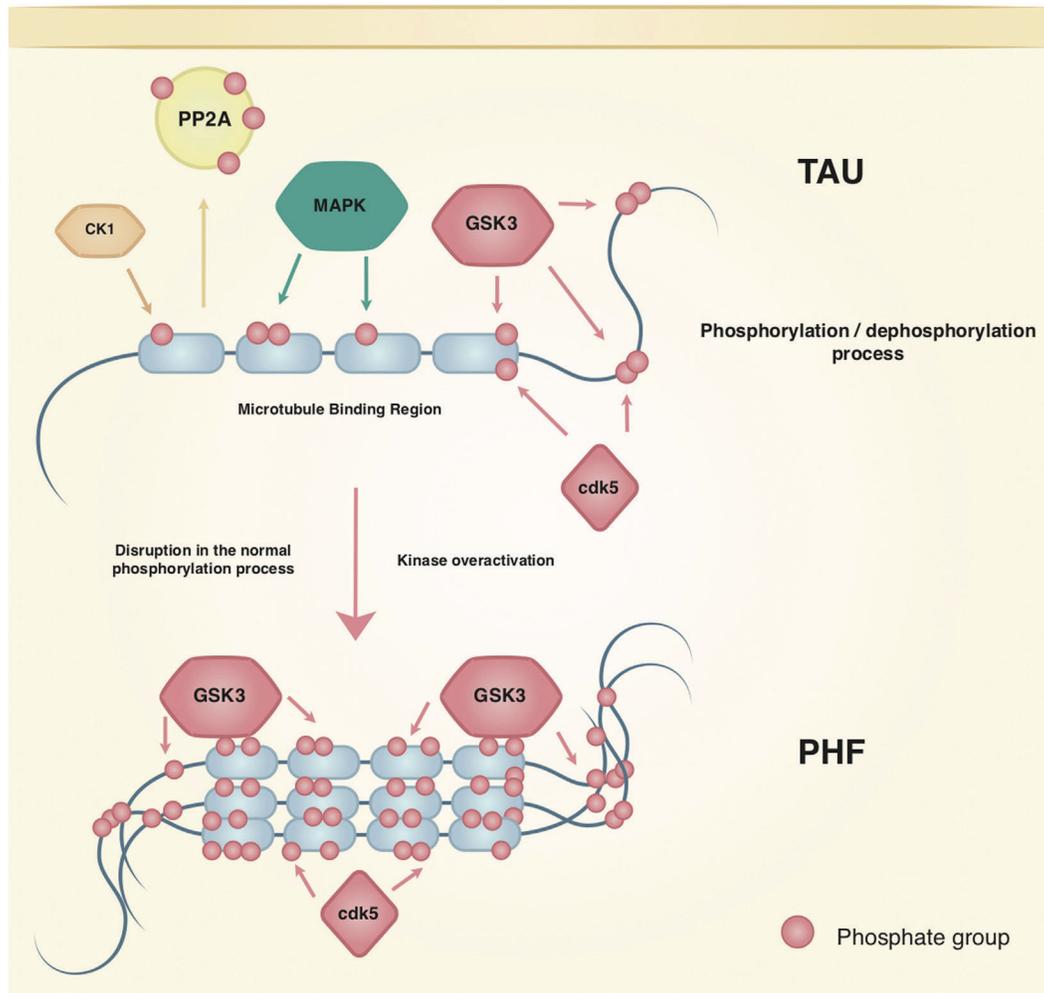
## HORMONE ACTIONS AND THEIR RELATION TO NEURODEGENERATIVE DISEASES AND TAU PHOSPHORYLATION

Epidemiological studies show a significantly higher prevalence of AD in women than in men, which is usually explained by the longer lifespan of women (39). A considerable amount of research shows that the higher frequency in women may be due to the interplay between age and sex, in which, factors such as genetics, metabolic changes, and hormones play a prominent role (40). Ovarian hormones, such as estrogens and progesterone, could interact with other risk factors (obesity, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, etc.) to develop AD (15, 41).

The notion of female sex as a risk factor for AD (16, 40) is also supported by studies using transgenic mouse models of AD where sex differences were documented, suggesting that females are more vulnerable to the neuropathology (16). In addition, the hippocampal response to stress shows that females are more vulnerable to tau (42) and AB pathology (43) than males.

In line with this, menopause, characterized by the loss of estrogens and progesterone due to aging, is strongly associated with a higher vulnerability to develop AD (16). The absence of ovarian hormones increases the age-induced p-Tau in the hippocampus of rats (44). Regarding estrogens, plasma levels of 17 $\beta$ -estradiol are lower in women with AD compared with age-matched controls and some estrogen-based approaches to reduce AD risk have been designed, although with contradictory results (19). Progesterone, also depleted in menopause, has known effects in AD neuropathology (45). Progesterone and its metabolites can exert neuroprotective actions by themselves (19, 46), although it can potentiate or block the protective effects of estrogens. In rats treated with estrogens, progesterone blocked estrogen-induced spatial memory improvement and neuroprotection from excitotoxic injury, among others. Such antagonistic mechanisms are not yet fully understood (19).

On the other hand, there is a strong correlation between reproductive history and cognition in postmenopausal women. Particularly, women who had their last pregnancy later in life showed better verbal and global cognitive performance (18). Furthermore, mothers outperform nulliparous rats in learning and memory tasks (47), and these positive changes may endure into senescence (19). During their lifetime, most females undergo radical physiological changes induced by the maternal experience (47).



**FIGURE 1** | Regulation of tau phosphorylation. Tau is a native phosphoprotein that relies on an equilibrium of phosphorylation and dephosphorylation to perform physiological and neuroplasticity processes. Tau most studied kinases and phosphatase are shown; kinases such as cdk5 and GSK3 have been related to the hallmark lesions in Alzheimer’s disease.

Hormones such as prolactin, oxytocin, and endorphins produce these changes, which fundamentally alter the functions of the HPA axis (48).

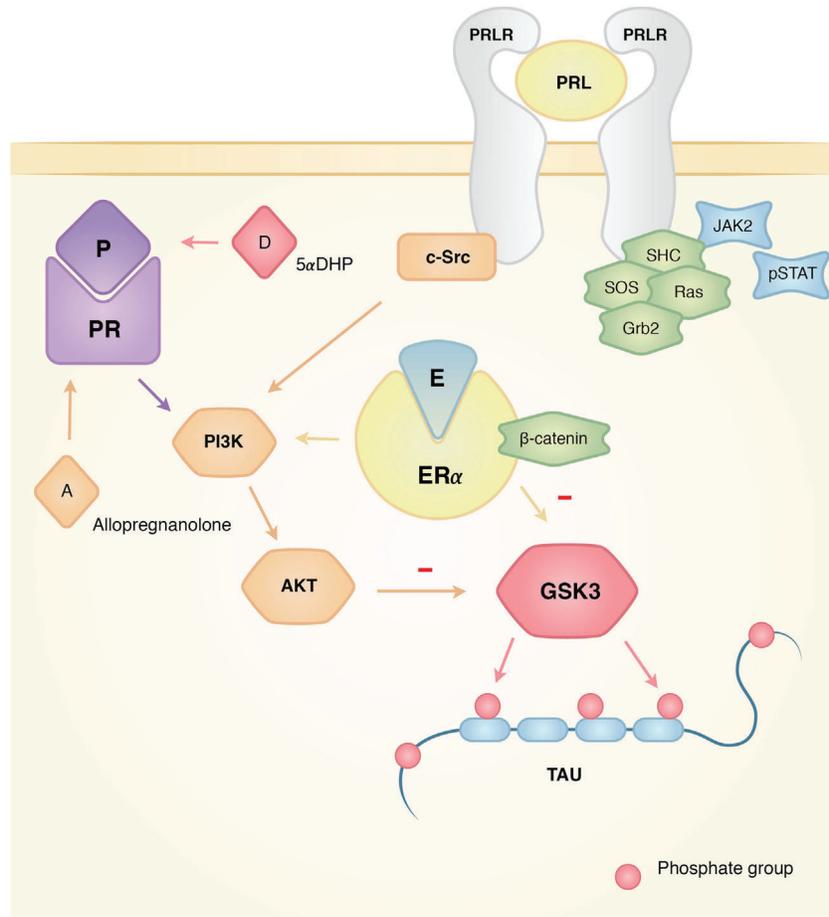
For such changes in the female brain to occur during the reproductive experience, a great deal of plasticity is required (47). This plasticity translates into changes in the cytoskeleton and microtubule-associated proteins, for example, Tau content in the hippocampus decreases throughout pregnancy, but the ratio of phosphorylated tau increases in pregnancy and lactation (24, 46). Estrogen, progesterone, the interplay between them, and other hormones (49, 50) are known to be involved in those changes.

### Estrogens

Estrogens have long been known to exert neuroprotective effects in different models of central nervous system diseases such as AD, Parkinson’s disease, and multiple sclerosis (51). Estrogens may exert their neuroprotective properties through estrogen receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ), which is known to interact with insulin-like

growth factor 1 receptor (IGF-1R), by incorporating itself into a macromolecular complex with the components of IGF-1R signaling (49). These include phosphoinositol 3 kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), GSK3 $\beta$ , and  $\beta$ -catenin. The activation of PI3K and Akt results in inhibition of GSK3 $\beta$  (by phosphorylation of the site Ser9), therefore, reducing p-Tau (52, 53) (Figure 2).

In the hippocampus of ovariectomized rats sacrificed 1 h after treatment with estradiol, GSK3 phosphorylation increases significantly in Ser<sup>9/21</sup>, a site that inactivates GSK3. In addition, there is less phosphorylation in the PHF-1 epitope, which recognizes phosphorylation in Ser<sup>396/404</sup>, a site observed in AD brains, both *in vivo* and *in vitro*. It was also observed that  $\beta$ -catenin, a key protein regulated by GSK-3 and located in the Wnt/wingless pathway, co-immunoprecipitated with ER $\alpha$ . These results support the idea that a multi-complex between ER- $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin, and GSK3 is formed to modulate the activity of GSK3, and in turn, tau phosphorylation, through the Wnt and Akt pathways (52, 54).



**FIGURE 2 |** Actions of estrogen, progesterone, and prolactin on tau phosphorylation. Interacting mechanisms of hormone action that affect the dynamics of tau phosphorylation. The three hormones have documented activity in the activation of Akt that makes GSK3 inactive, which results in the inhibition of tau phosphorylation for this particular kinase. Since GSK3 has been linked in the pathological development of Alzheimer’s disease (AD), the interplay between these hormones, their pathways, and GSK3 might explain why the absence of hormones could account for the higher risk of developing AD. On the other hand, the presence of hormones like prolactin might prove neuroprotective for the neurodegeneration of the female brain.

In N2a cell cultures (neuroblastoma cell line) treated with Wortmannin and GF-109203X to induce GSK3β activation and p-Tau, the treatment with 17β-estradiol resulted in attenuated p-Tau at sites Ser<sup>396/404</sup>, Thr<sup>231</sup>, Thr<sup>205</sup>, and Ser<sup>199/202</sup> (55). Furthermore, when a transient deactivation of Akt (the upstream regulator of GSK3β) was induced, 17β-estradiol increased the levels of GSK3β phosphorylated in Ser<sup>9</sup>, which suggests that estrogens can also target GSK3β directly and affect tau phosphorylation without the upstream effector Akt, in addition to the pathway described above (55).

*In vitro* studies in human neuroblastoma and primary rat cortical neuron showed that treatment with estradiol increased tau dephosphorylation as assessed with Tau-1 antibody, which recognizes a proline-directed non-phosphorylated site of tau (56). Moreover, when tau hyperphosphorylation was induced by okadaic acid in differentiated human neuroblastoma cells, treatment with estradiol for 24 h decreased p-Tau measured by 12E8 tau antibody (which recognizes phosphorylation in Ser<sup>262</sup> within the microtubule-binding region and is not a proline-directed site)

(56). Estrogen treatment also affected p-Tau in both undifferentiated and differentiated neuroblastoma cells (56). According to this study, the ER receptor seems to be involved in these effects, likely *via* the Akt pathway [see above, Ref. (52, 53)].

On the other hand, when using *in vivo* models of AD, the neuroprotective actions of estrogens are mainly related to AB production and clearance [see Ref. (45) for review]. Nevertheless, in a study using 3xTg-AD transgenic female mice that develop the complete AD neuropathology, the ovariectomized group that was treated with estrogens and progesterone showed a robust decrease in AT8 immunoreactivity, which detects tau phosphorylated at sites Ser/Thr<sup>202/205</sup>, in hippocampal neurons. This result shows that the combination of the hormones can regulate AD neuropathology and their absence could be deleterious (57).

Finally, when ovariectomized female rats were chronically treated with estrogen, progesterone, and tibolone (TIB) (a widely prescribed synthetic steroid with estrogenic, progestogenic, and androgenic actions), less p-Tau in the epitope PHF-1 and more dephosphorylation in the antibody Tau-1 was detected, in both

the hippocampus and the cerebellum (58). In this particular study, no changes were detected in GSK3 $\beta$  Ser<sup>9</sup> in the hippocampus, in contrast to the findings in the cerebellum, suggesting the involvement of different pathways or a region-specific action for this enzyme.

## Progesterone

Like estrogens, progesterone is a hormone that is mainly synthesized in the ovary and exerts neuroprotective effects in several models of disease such as AD, stroke, and traumatic brain injury (59, 60). Progesterone can elicit its neuroprotective effects through progesterone receptors (PR) A and B. Interestingly, PR-A can also modulate the activity of PR-B, ER (which might explain its antagonistic or synergistic effects when administered with estradiol) and the glucocorticoid receptor. It has also been shown that progesterone can activate signal transduction pathways such as cAMP/PKA, MAPK (ERK1/2), and PI-3K/Akt (60) (Figure 2).

In relation to tau, progesterone, and its metabolites, DHP (5- $\alpha$ -dihydroprogesterone) and THP (3- $\alpha$ , 5- $\alpha$ -tetrahydroprogesterone, also known as allopregnanolone) have been shown to significantly reduce tau protein expression in the rat cerebellum (46). Moreover, progesterone induces tau phosphorylation in the epitope Tau-1 and PHF-1 (sites Ser<sup>396/404</sup>) in the same structure, but this effect is not present when DHP or THP are administered. Since the epitope Ser262 (not phosphorylated by GSK3) was unaffected by progesterone treatment, while the epitope PHF-1 (phosphorylated by GSK3) responded to the same treatment, this implies that GSK3 is a possible candidate for the described progesterone effects (46).

Also, in the study by Carroll (57) mentioned earlier, p-Tau decreased significantly when ovariectomized female 3xTg mice were treated with progesterone and a progesterone/estrogens cocktail, as observed by immunoreactivity to the AT8 antibody in CA1 and subiculum subfields of the hippocampus. Based on these results, the authors suggest that the observed effect could be due to the regulation of GSK3 $\beta$  by progesterone (46).

On the other hand, treatment with physiological levels of progesterone 24 h prior to sacrifice increased the expression of the catalytic and regulatory subunits of PI3K and the phosphorylation of Akt in the hypothalamus, hippocampus, and cerebellum of ovariectomized rats. This effect was partially mimicked by progesterone-reduced metabolites DHP and allopregnanolone in the hypothalamus and hippocampus, but not in the cerebellum (61). This study provides a likely pathway for the decrease in p-Tau by Akt phosphorylation, upstream to the inactivation of GSK3 $\beta$  in both cerebellum (46) and hippocampus (57). Also, progesterone increases the levels of the phosphatase PP2A phosphorylated in Y<sup>307</sup>, which inactivates this enzyme, in hippocampus and cerebellum (62).

It is worth noting that when estradiol was given prior to progesterone, an increase in Y<sup>307</sup> phosphorylation was seen only in the cerebellum, which suggests that the regulation of PP2A by progesterone is region specific (62) and that a complex interplay between estrogens and progesterone regulates kinases and phosphatases (61, 62). Furthermore, exposure to either continuous or cyclic treatment of progesterone induced significantly less AT8

immunoreactive neurons in the 3xTg-AD model compared to their respective controls (63).

In ovariectomized female rats exposed to a 60-day treatment of estrogens, progesterone, or TIB, all compounds resulted in a significant decrease of p-Tau in the PHF-1 epitope and in higher levels of dephosphorylated tau in the hippocampus, as measured with Tau-1 antibody. However, progesterone had no effect in the cerebellum, and no differences in Ser<sup>9</sup> phosphorylation were seen in GSK3 $\beta$  (58). Previous studies have shown reduced phosphorylation in the cerebellum coupled with changes in GSK3 $\beta$  activity after an acute treatment with progesterone (46). However, the chronic administration of progesterone that results in less phosphorylation could be mediated by other kinase mechanisms, such as ERK or cdk5, or by the involvement of phosphatases such as PP2A (58, 62).

A recent study using low and high doses of TIB showed decreased p-Tau in the PHF-1 epitope in the hippocampus of male aged rats through the regulation of PI3K/Akt and cdk5/p35/p25 pathways (64). Whether these pathways also mediate the action of TIB in the hippocampus of females is unknown. It is important to mention that both allopregnanolone and TIB have been proposed as neuroprotective agents, and that allopregnanolone is currently considered as a candidate therapeutic agent in patients with AD and postpartum depression, another risk factor of AD (13, 65–67).

## Prolactin

Prolactin is a pituitary hormone that is primarily involved in milk synthesis and maternal behavior (68). Beyond these well-known functions, it has been shown that prolactin provides neuroprotection to the hippocampus in the kainic model of epilepsy (69, 70) and attenuates the neuroendocrine responses to stress (71, 72). There is evidence that breastfeeding lowers the risk to develop AD in humans (21), and tau expression undergoes changes during pregnancy along with an increase in P-Tau in several brain areas of rats throughout pregnancy until day 2 of lactation (27). These data point to the maternal experience as a regulator of tau phosphorylation, being prolactin a likely candidate for promoting these changes due to its elevated concentration during lactation and its actions inhibiting the HPA axis (72). We found that exposure to one episode of restraint stress significantly reduced p-Tau in the hippocampus of lactating dams compared to virgin or postweaned rats. This decrease was coupled with reduced detection of GSK3 $\alpha$  (23).

Given that lactation is considered a hyperprolactinemic state, it is possible that the elevated levels of prolactin affect signaling pathways related to kinases that regulate p-Tau (Figure 2). Previous studies using male mice subjected to the same stress protocol showed increased p-Tau insolubility in the hippocampus (73), which reinforces the view that prolactin could regulate aspects of tau phosphorylation in the hippocampus.

Prolactin exerts its effects through prolactin receptors (PRL-R) *via* long, intermediate, and short isoforms encoded by a single gene. After homodimerization of the PRL-R, long-long homodimers can activate second messenger pathways, particularly the JAK–signal transducer and activator of transcription signaling

cascade. Short–short homodimers activate the MAPK pathway and, finally, long and short heterodimers are known to block PRL-R signaling and modulate its effects (74).

Although a direct link between prolactin and p-Tau has not been investigated, evidence from prolactin pathways involving GSK3 $\beta$  suggests that the hormone influences p-Tau. In W53 lymphoid cells, prolactin increases the activity of the Akt pathway, thereby phosphorylating GSK3 $\beta$  in Ser9 causing its deactivation (75). On the other hand, a study using breast cancer cell lines identified GSK3 $\beta$  as a kinase of the prolactin receptor at Ser349; this phosphorylation site labels the prolactin receptor for degradation (76).

## FUTURE PERSPECTIVES

The fact that diverse results in the AD field have surfaced between males and females at different ages, reproductive stages, and in response to different stimuli points toward a new direction in sex-related AD research (23, 45, 77) (Table 1). Thus, detailed attention must be given to the study of aging, different reproductive stages and hormones involved, and the interplay with other risk factors in females (21, 77).

A considerable amount of studies shows that estrogens and progesterone play an important role in regulating p-Tau in different conditions. However, the evidence about prolactin influencing p-Tau is still missing despite the importance of this hormone in reproductive life. Moreover, it is important to have thorough knowledge of how puberty, the estrous cycle, pregnancy, lactation, and maternal experience affect p-Tau, since all of these life events are characterized by hormonal fluctuations that cause fundamental changes in the female's brain.

Also, it is extremely important to acknowledge that inflammation plays a critical role in the development of AD, through interactions with risk factors, such as obesity and depression, and with the hormones described above (13, 15, 41, 78). Further research needs to address inflammation in relation to other risk factors and markers of the disease (12, 15, 23)

## REFERENCES

- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1975) 72(5):1858–62. doi:10.1073/pnas.72.5.1858
- Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis* (2012) 2012:731526. doi:10.1155/2012/731526
- Binder L, Frankfurter A, Rebhuhn L. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* (1985) 101:1371–8. doi:10.1083/jcb.101.4.1371
- Trojanowsky JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VM-Y. Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem* (1989) 37(2):209–15. doi:10.1177/37.2.2492045
- Kosik KS, Finch EA. MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J Neurosci* (1987) 7(10):3142–53.
- Ittner LM, Götz J. Amyloid- $\beta$  and tau – a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* (2010) 12:2. doi:10.1038/nrn2967
- Kahlson MA, Colodner KJ. Glial tau pathology in tauopathies: functional consequences. *J Exp Neurosci* (2016) 9(S2):43–50. doi:10.4137/JEN.S25515

**TABLE 1** | Phosphorylation sites in tau influenced by estrogen, progesterone, and prolactin.

Hormone	Phosphorylation site	Reference
Estrogens	Ser396/404	(54–57)
	Ser262	
	Ser202/Thr205	
	Thr231, Thr205, Ser199/202	
Progesterone	Ser396/404	(46, 57, 63)
	Ser202/Thr205	
Prolactin*	Ser396/404, Ser202/Thr205*	Steinmetz et al.* (23)

\*It must be noted that the evidence about prolactin influencing these phosphorylation sites is not direct and needs more research.

to elucidate why females appear to be protected from injury and neurodegeneration during lactation and more vulnerable during menopause.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DM-M, CG-A, LT, and TM wrote and edited the review article. DM-M and TM created the figures.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Jessica González Norris and Ilektra Anagnostou for editing the English version of this manuscript, and Fernanda Muñoz-Niembro for graphic design.

## FUNDING

Cited research supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT to TM (IN202315, IN204718). DM-M is a graduate student of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas UNAM, supported by CONACyT scholarship (CVU/Recipient: 662482/574065). CG-A received Scholarship of Excellence in Research by Fundación IMSS.

- Buée L, Bussière T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* (2002) 33(1):95–130. doi:10.1016/S0165-0173(00)00019-9
- Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of into tangles of paired helical filaments straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98(12):6923–8. doi:10.1073/pnas.121119298
- Crespo-Biel N, Theunis C, Van Leuven F. Protein tau: prime cause of synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* (2012) 2012:251426. doi:10.1155/2012/251426
- Rissman RA. Stress-induced tau phosphorylation: functional neuroplasticity or neuronal vulnerability? *J Alzheimers Dis* (2010) 18(2):453–7. doi:10.3233/JAD-2009-1153
- Johansson L, Guo X, Waern M, Östling S, Gustafson D, Bengtsson C, et al. Midlife psychological stress and risk of dementia: a 35-year longitudinal population study. *Brain* (2010) 133:2217–24. doi:10.1093/brain/awq116
- Chi S, Yu JT, Tan MS, Tan L. Depression in Alzheimer's disease: epidemiology, mechanisms, and management. *J Alzheimers Dis* (2014) 42(3):739–55. doi:10.3233/JAD-140324
- Letteneur L, Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Ott A, Copeland JRM, et al. Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference. EURODEM pooled analyses. *Am J Epidemiol* (2000) 151(11):1064–71. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a010149

15. Moser VA, Pike CJ. Obesity and sex interact in the regulation of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev* (2016) 67:102–16. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.08.021
16. Vest RS, Pike CJ. Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. *Horm Behav* (2013) 63:2. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.04.006
17. Melcangi RC, Giatti S, Garcia-Segura LM. Levels and actions of neuroactive steroids in the nervous system under physiological and pathological conditions: sex-specific features. *Neurosci Biobehav Rev* (2016) 67:25–40. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.09.023
18. Panzica G, Melcangi RC. Structural and molecular brain sexual differences: a tool to understand sex differences in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev* (2016) 67:2–8. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.04.017
19. Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron A. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol* (2009) 30(2):239–58. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.015
20. Fox M, Berzuini C, Knapp LA. Maternal breastfeeding history and Alzheimer's disease risk. *J Alzheimers Dis* (2013) 37(4):809–21. doi:10.3233/JAD-130152
21. Karim R, Dang H, Henderson VW, Hodis HN, John JS, Brinton RD, et al. Effect of reproductive history and exogenous hormone use on cognitive function in mid- and late life. *J Am Geriatr Soc* (2016) 64:12. doi:10.1111/jgs.14658
22. Gatewood JD, Morgan MD, Eaton M, McNamara IM, Stevens LF, Macbeth AH, et al. Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. *Brain Res Bull* (2005) 66(2):91–8. doi:10.1016/j.brainresbull.2005.03.016
23. Steinmetz D, Ramos E, Campbell SN, Morales T, Rissman RA. Reproductive stage and modulation of stress-induced tau phosphorylation in female rats. *J Neuroendocrinol* (2015) 27(11):827–34. doi:10.1111/jne.12323
24. Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* (1984) 259(8):5301–5.
25. Johnson GV, Stoothof WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* (2004) 117:5721–9. doi:10.1242/jcs.01558
26. Caceres A, Potrebic S, Kosik KS. The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* (1991) 11:1515–23.
27. Stoothof WH, Johnson GV. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1739(2–3):280–97. doi:10.1016/j.bbadis.2004.06.017
28. Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, et al. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing Res Rev* (2013) 12:39–49. doi:10.1016/j.arr.2012.06.008
29. Tenreiro S, Eckermann K, Outeiro TF. Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Front Mol Neurosci* (2014) 7:42. doi:10.3389/fnmol.2014.00042
30. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* (2005) 22:1942–50. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x
31. Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, et al. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* (2013) 12(1):289–309. doi:10.1016/j.arr.2012.06.003
32. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther* (2015) 148:114–31. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.016
33. Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rüdiger J, Van der Zee EA, et al. Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci* (2003) 23(18):6972–81.
34. González-Arenas A, Piña-Medina AG, González-Flores O, Gómora-Arrati P, Carrillo-Martínez GE, Balandrán-Ruiz MA, et al. Expression pattern of Tau in the rat brain during pregnancy and the beginning of lactation. *Brain Res Bull* (2012) 89:3–4. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.07.011
35. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* (1990) 27(5):457–64. doi:10.1002/ana.410270502
36. Caramelli P, Robitaille Y, Laroche-Chollette A, Nitrini R, Gauvreau D, Joannette Y, et al. Structural correlates of cognitive deficits in a selected group of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* (1998) 11(4):184–90.
37. Giannakopoulos P, Herrmann F, Bussièrè T, Bouras C, Kövari E, Perl D, et al. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* (2003) 60:1495–500. doi:10.1212/01.WNL.0000063311.58879.01
38. Dai CL, Chen X, Kazim SF, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I, et al. Passive immunization targeting the N-terminal projection domain of tau decreases tau pathology and improves cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease and tauopathies. *J Neural Transm (Vienna)* (2015) 122:4. doi:10.1007/s00702-014-1315-y
39. Alzheimer Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* (2016) 12(4):459–509.
40. Snyder HM, Asthana S, Bain L, Brinton R, Craft S, Dubal DB, et al. Sex biology contributions to vulnerability to Alzheimer's disease: a think tank convened by the Women's Alzheimer's Research Initiative. *Alzheimers Dement* (2016) 12:11. doi:10.1016/j.jalz.2016.08.004
41. Grimm A, Mensah-Nyagan AG, Eckert A. Alzheimer, mitochondria and gender. *Neurosci Biobehav Rev* (2016) 67:89–101. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.04.012
42. Sotiropoulos I, Silva J, Kimura T, Rodrigues AJ, Costa P, Almeida OF, et al. Female hippocampus vulnerability to environmental stress, a precipitating factor in Tau aggregation pathology. *J Alzheimers Dis* (2015) 43:3. doi:10.3233/JAD-140693
43. Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M. Sex-and brain region-specific acceleration of amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Brain* (2010) 3(34):1–11. doi:10.1186/1756-6606-3-34
44. Picazo O, Espinosa-Raya J, Briones-Aranda A, Cerbón M. Ovariectomy increases the age-induced hyperphosphorylation of Tau at hippocampal CA1. *Cogn Process* (2016) 17:4. doi:10.1007/s10339-016-0768-3
45. Barron AM, Pike CJ. Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Front Biosci* (2012) 4:976–97.
46. Guerra-Araiza C, Amorim MA, Camacho-Arroyo I, Garcia-Segura LM. Effects of progesterone and its reduced metabolites, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and the microtubule-associated protein tau in the rat cerebellum. *Dev Neurobiol* (2007) 67(4):510–20. doi:10.1002/dneu.20383
47. Kinsley CH, Bardi M, Karelina K, Rima B, Christon L, Friedenberg J, et al. Motherhood induces and maintains behavioral and neural plasticity across the lifespan in the rat. *Arch Sex Behav* (2008) 37(1):43–56. doi:10.1007/s10508-007-9277-x
48. Brunton P, Russell JA. The expectant brain: adapting for motherhood. *Nat Rev Neurosci* (2009) 9(1):11–25. doi:10.1038/nrn2280
49. Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Piña-Medina AG, Camacho-Arroyo I. Sex hormones regulate cytoskeletal proteins involved in brain plasticity. *Front Psychiatry* (2015) 6:165. doi:10.3389/fpsy.2015.00165
50. González-Arenas A, Piña-Medina AG, González-Flores O, Galván-Rosas A, Gómora-Arrati P, Camacho-Arroyo I. Sex hormones and expression pattern of cytoskeletal proteins in the rat brain throughout pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2014) 139:154–8. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.01.005
51. García-Segura LM, Balthazart J. Steroids and neuroprotection: new advances. *Front Neuroendocrinol* (2009) 30:v–ix. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.006
52. Azcoitia I, Arevalo MA, De Nicola AE, Garcia-Segura LM. Neuroprotective actions of estradiol revisited. *Trends Endocrinol Metab* (2011) 22:12. doi:10.1016/j.tem.2011.08.002
53. Goodenough S, Schleusner D, Pietrzik C, Skutella T, Behl C. Glycogen synthase kinase 3beta links neuroprotection by 17beta-estradiol to key Alzheimer processes. *Neuroscience* (2005) 13(23):581–9. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.12.029
54. Cardona-Gomez P, Perez M, Avila J, Garcia-Segura LM, Wandosell F. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* (2004) 25(3):363–73. doi:10.1016/j.mcn.2003.10.008
55. Shi HR, Zhu LQ, Wang SH, Liu XA, Tian Q, Zhang Q, et al. 17beta-estradiol attenuates glycogen synthase kinase-3beta activation and tau hyperphosphorylation in Akt-independent manner. *J Neural Transm (Vienna)* (2008) 115(6):879–88. doi:10.1007/s00702-008-0021-z
56. Alvarez-de-la-Rosa M, Silva I, Nilsen J, Pérez MM, Garcia-Segura LM, Avila J, et al. Estradiol prevents neural tau hyperphosphorylation characteristic of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* (2005) 1052:210–24. doi:10.1196/annals.1347.016
57. Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, et al. Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female

- 3xTg-AD mice. *J Neurosci* (2007) 27(48):13357–65. doi:10.1523/JNEUROSCI.2718-07.2007
58. Pinto-Almazán R, Calzada-Mendoza CC, Campos-Lara MG, Guerra-Araiza C. Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat. *J Neurosci Res* (2012) 90:4. doi:10.1002/jnr.22808
  59. Stein DG, Wright DW, Kellerman AL. Does progesterone have neuroprotective properties. *Ann Emerg Med* (2008) 51(2):164–72. doi:10.1016/j.annemergmed.2007.05.001
  60. Singh M, Chang S. Progesterone and neuroprotection. *Horm Behav* (2013) 63:2. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.06.003
  61. Guerra-Araiza C, Amorim MA, Pinto-Almazán R, González-Arenas A, Campos MG, Garcia-Segura LM. Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. *J Neurosci Res* (2009) 87(2):470–81. doi:10.1002/jnr.21848
  62. Amorim MA, Guerra-Araiza C, Pernia O, da Cruz e Silva EF, Garcia-Segura LM. Progesterone regulates the phosphorylation of protein phosphatases in the brain. *J Neurosci Res* (2010) 88:13. doi:10.1002/jnr.22442
  63. Carroll JC, Rosario ER, Villamagna A, Pike CJ. Continuous and cyclic progesterone differentially interact with estradiol in the regulation of Alzheimer-like pathology in female 3xtransgenic-Alzheimer's disease mice. *Endocrinology* (2010) 151:6. doi:10.1210/en.2009-1487
  64. Neri-Gómez T, Espinosa-Raya J, Díaz-Cintra S, Segura-Urbe J, Orozco-Suárez S, Gallardo JM, et al. Tibolone modulates neuronal plasticity through regulating Tau, GSK3 $\beta$ /Akt/PI3K pathway and CDK5 p35/p25 complexes in the hippocampus of aged male mice. *Neural Regen Res* (2017) 12(4):588–95. doi:10.4103/1673-5374.205098
  65. Irwin RW, Diaz-Brinton R. Allopregnanolone as regenerative therapeutic for Alzheimer's disease: translational development and clinical promise. *Prog Neurobiol* (2014) 113:40–55. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.08.004
  66. Pinto-Almazán R, Segura-Urbe JJ, Farfán-García ED, Guerra-Araiza C. Effects of tibolone on the central nervous system: clinical and experimental approaches. *Biomed Res Int* (2017) 2017:8630764. doi:10.1155/2017/8630764
  67. Osborne LM, Gispén F, Sanyal A, Yenokyan G, Meilman S, Payne JL. Lower allopregnanolone during pregnancy predicts postpartum depression: an exploratory study. *Psychoneuroendocrinology* (2017) 79:116–21. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.02.012
  68. Grattan DR. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction* (2002) 123(4):497–506. doi:10.1530/rep.0.1230497
  69. Tejadilla D, Cerbón M, Morales T. Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience* (2010) 169(3):1178–85. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.05.074
  70. Reyes-Mendoza J, Morales T. Post-treatment with prolactin protects hippocampal CA1 neurons of the ovariectomized female rat against kainic acid-induced neurodegeneration. *Neuroscience* (2016) 328:58–68. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.04.030
  71. Torner L, Neumann I. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* (2002) 5(4):249–57. doi:10.1080/1025389021000048638
  72. Torner L. Actions of prolactin in the brain: from physiological adaptations to stress and neurogenesis to psychopathology. *Front Endocrinol* (2016) 7:25. doi:10.3389/fendo.2016.00025
  73. Rissman RA, Lee K, Vale W, Sawchenko PE. Corticotropin-releasing factor receptors differentially regulate stress-induced tau phosphorylation. *J Neurosci* (2007) 27(24):6552–62. doi:10.1523/JNEUROSCI.5173-06.2007
  74. Torner L, Karg S, Blume A, Kandasamy M, Kuhn HG, Winkler J, et al. Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J Neurosci* (2009) 29(6):1826–33. doi:10.1523/JNEUROSCI.3178-08.2009
  75. Domínguez-Cáceres MA, García-Martínez JM, Calcabrini A, González L, Porque P, León J, et al. Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene* (2004) 23(44):7378–90. doi:10.1038/sj.onc.1208002
  76. Plotnikov A, Li Y, Tran TH, Tang W, Palazzo JP, Rui H, et al. Oncogene-mediated inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta impairs degradation of prolactin receptor. *Cancer Res* (2008) 68(5):1354–61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6094
  77. Dubal DB, Broestl L, Worden K. Sex and gonadal hormones in mouse models of Alzheimer's disease: what is relevant to the human condition? *Biol Sex Differ* (2012) 3(24):1–17. doi:10.1186/2042-6410-3-24
  78. Uchoa MF, Moser VA, Pike CJ. Interactions between inflammation, sex steroids, and Alzheimer's disease risk factors. *Front Neuroendocrinol* (2016) 43:60–82. doi:10.1016/j.yfrne.2016.09.001

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Muñoz-Mayorga, Guerra-Araiza, Torner and Morales. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Proteomics profiling of neuronal exosomes identifies novel markers that induce functional impairment in vivo

*Charisse N. Winston<sup>1</sup>, Saranya Canchi<sup>1</sup>, James J. Moresco<sup>2</sup>, Carolina Fernández-Costa<sup>2</sup>, Daniel Muñoz-Mayorga<sup>1,5</sup>, Kenneth D. Kuhn<sup>1</sup>, Anthony Adame<sup>1</sup>, Bahar Salehi<sup>1</sup>, Jazmin Florio<sup>1</sup>, Michael Mante<sup>1</sup>, Eliezer Masliah<sup>4</sup>, John R. Yates III<sup>2</sup>, Robert A. Rissman<sup>\*1,3</sup>*

<sup>1</sup>Department of Neurosciences, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA,

<sup>2</sup>Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA,

<sup>3</sup>VA San Diego Healthcare System, La Jolla, CA, USA, <sup>4</sup>Division of Neuroscience and Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Aging/NIH, Bethesda, Maryland, USA.

<sup>5</sup>Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México.

\*Correspondence to: Robert A. Rissman, Ph.D., Department of Neurosciences, UCSD School of Medicine, 9500 Gilman Drive, MTF 309 M/C 0624, La Jolla, CA 92093-0624; Tel: 858-246-0140; Fax: 858-246-0139; Email: [rrissman@ucsd.edu](mailto:rrissman@ucsd.edu)

**Classification**

Biological Sciences/Neuroscience

**Keywords**

exosomes, functional impairment, proteomic profiling, biomarkers, Alzheimer's disease

## Author Contributions

CW and RR designed the study. CW evaluated the patients and animal studies. CFC and JJM conducted Mass spectrometry. SC and JY conducted proteomic profiling and pathway analyses. CW, DMM, KK, MM, AA, JF, BS performed all laboratory work. CW, SC, and RR wrote the manuscript. CN, SC, EM, and RR edited the manuscript.

## Funding

This work was supported by NIH grants to RR (AG0518440, AG051848, AG058533), the Extreme Science and Engineering Discovery Environment (XSEDE) Jetstream at Indiana University through allocation #TG-IBN180008. Work performed by CFC, JJM and JRY were supported by the National Center for Research Resources (5P41RR011823). This work is part of DMM PhD studies in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). DMM was supported by CONACyT scholarship (CVU/Recipient: 662482/574065), CONACyT Becas Mixtas scholarship program, and Programa de Apoyo para los Estudios de Posgrado (PAEP).

## Author Emails

<i>Charisse N. Winston</i>	<i>chwinston@health.ucsd.edu</i>
<i>Saranya Canchi</i>	<i>scanchi@health.ucsd.edu</i>
<i>James J. Moresco</i>	<i>james.moresco@utsouthwestern.edu</i>
<i>Carolina Fernández-Costa</i>	<i>carolfc@scripps.edu</i>
<i>Daniel M. Mayorga</i>	<i>danmu.31@gmail.com</i>
<i>Kenneth D. Kuhn</i>	<i>kdkuhn@health.ucsd.edu</i>
<i>Anthony Adame</i>	<i>asadame@health.ucsd.edu</i>
<i>Bahar Salehi</i>	<i>Bahars13@yahoo.com</i>
<i>Jazmin Florio</i>	<i>jflorio@health.ucsd.edu</i>
<i>Michael Mante</i>	<i>mmante@health.ucsd.edu</i>
<i>Eliezer Masliah</i>	<i>eliezer.masliah@nih.gov</i>
<i>John Yates III</i>	<i>jyates@scripps.edu</i>
<i>Robert A. Rissman</i>	<i>rrissman@ucsd.edu</i>

## This PDF file includes:

- Main Text
- Figures 1 to 6
- Supplemental Figures 1 to 3
- Tables 1 to 2
- References