

139



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO SOBRE EL PAPEL DE LOS MICROTUBULOS Y DE SUS PROTEINAS ASOCIADAS MAP-2 Y TAU DURANTE LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR TAXOL EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA *IN VIVO*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :

OCTAVIO FABIAN MERCADO GOMEZ

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANA GORINDA ARIAS ALVAREZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2002



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Octavio Fabián
Mercado Gómez
FECHA: 2.5-09-02
FIRMA: [Firma]

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "ESTUDIO SOBRE EL PAPEL DE LOS MICRO-TUBULOS Y DE SUS PROTEINAS ASOCIADAS MAP-2 Y TAU DURANTE LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR TAXOL EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA IN VIVO".
realizado por OCTAVIO FABIAN MERCADO GOMEZ

con número de cuenta 9560309-4 , quién cubrió los créditos de la carrera de: BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ALVAREZ [Firma]

Propietario DRA. MARIA DE LOURDES MASSIEU TRIGO [Firma]

Propietario M. EN C. OCTAVIO CESAR GARCIA GONZALEZ [Firma]

Suplente DR. SILVESTRE DE JESUS ALAVEZ ESPIDIO [Firma]

Suplente DR. JESUS CHIMAL MONROY [Firma]

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.



Consejo Departamental de BIOLOGIA

[Firma]
M. EN C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a la Dra. Clorinda Arias por todo haberme recibido en su laboratorio y por el apoyo recibido tanto en conocimientos como en material para que se realizará este trabajo.

A mis sinodales, Dra. Lourdes Massieu, Dr. Jesús Chimal, M. en C. Octavio García y Dr. Silvestre Alavez por sus sugerencias y cometarios.

Al laboratorio de la Dra. Massieu, al Alberto y en especial a Tere Montiel por haberme enseñado muchas cosas (Gracias Tere).

A los compañeros de laboratorio, Xavier, Rosy, Paty, Andrea, Karina, Ricardo, en fin a todos les agradezco mucho por haberme aguantado y enseñado todo este tiempo.

Quiero agradecer de todo corazón a mi familia, a mi padre el Sr. Evaristo Cruz, a mi madre la Sra. Gertrudis Gómez y a mis hermanas Aída y Laura por haberme apoyado tanto en lo económico como el lo moral, gracias familia.

A mis compas de la Facultad de Ciencias, al Alfredo (Gordo), al Arturo (Mente), a Ángeles, al Pavka (Perro), al Bruno (Niño), al Alejandro (Kalusha), a Lilia, a Mariana, a Alfonso (Poncho), a Adrián, en fin a todo mundo con quien compartir buenos momentos tanto en los salones de clase como en el Pulpo.

A los compas de Biomédicas, Polo, Beto (El Diablo), a Chucho, a Gustavo, etc.

A mis compas de Tijuana (al Doc y al Paquito).

A un buen amigo de hace mucho tiempo, Javier.

Y a una persona muy especial que creyó un poco en mí. Gracias.

Abreviaturas:

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ADP: Difosfato de adenosina

ATP: Trifosfato de adenosina

B: hebra β

β AP: Proteína β amiloide

CA1: *Cornus Ammonis* 1

CA3: *Cornus Ammonis* 3

EA: Enfermedad de Alzheimer

FHA: Filamentos Helicoidales Apareados

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar de Glía

GDP: Difosfato de guanosina

GTP: Trifosfato de guanosina

γ -TuRC: complejo circular que contiene γ -tubulina

H: α hélice

i.p : Intraperitoneal

MT: Microtúbulo

MTs : Microtúbulos

MAPs: Proteína Asociada a los Microtúbulos

MAP2: Proteína Asociada a los Microtúbulos 2

MTOCs: Centro de Organización de los Microtúbulos

nmolas: nanomolas

PP1: Proteín Fosfatasa 1

PP2A: Proteín Fosfatasa 2 A

PP2B: Proteín Fosfatasa 2 B

SCa: Componente lento a

SCb: Componente lento b

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

Índice

Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
1.1 La enfermedad de Alzheimer.....	2
II. Composición del citoesqueleto neuronal.....	3
2.1 Microfilamentos.....	4
2.2 Neurofilamentos.....	5
2.3 Microtúbulos.....	6
2.3.1 Estructura de la tubulina.....	7
2.3.2 Isotipos de tubulina.....	9
2.3.3 Orientación de la tubulina.....	10
2.3.4 Nucleación de los microtúbulos.....	10
2.3.5 Interacción de los MT con otras proteínas.....	11
III. Proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs).....	12
3.1 MAP1A y MAP1B.....	12
3.2 MAP2.....	12
3.3 Tau.....	16
3.3.1 Funciones de Tau.....	19
3.3.2 Modificaciones post-traduccionales.....	20
3.3.3 Distribución celular.....	22
IV. Función del citoesqueleto.....	23
4.1 Polaridad neuronal.....	23
4.2 Transporte axonal.....	24
V. Alteraciones del citoesqueleto en la Enfermedad de Alzheimer.....	25
5.1 Filamentos helicoidales apareados.....	28
VI. Drogas que alteran la polimerización de microtúbulos y su uso experimental.....	30

6.1 Colchicina.....	30
6.2 Vinblastina.....	31
6.3 Taxol.....	31
VII. Hipótesis.....	34
VIII. Objetivo General.....	34
IX. Objetivos Particulares.....	34
X. Materiales y Métodos.....	35
10.1 Preparación del fármaco.....	35
10.2 Inyecciones estereotáxicas.....	35
10.3 Evaluación histológica.....	35
10.4 Inmunohistoquímica.....	36
10.5 Extracción de tau y MAP2.....	36
10.6 Electroforesis y Western blot.....	37
XI. Resultados.....	37
Efectos neurotóxicos del Taxol.....	37
Inmunoreactividad para MAP2.....	40
Inmunoreactividad para tau.....	41
Inmunoreactividad para GFAP.....	43
XII. Discusión.....	45
XIII. Conclusiones.....	50
XIV. Referencias Bibliográficas.....	51

RESUMEN:

En el sistema nervioso central, los microtúbulos participan en el crecimiento, el establecimiento de la polaridad, el desarrollo y mantenimiento de sinapsis, así como, la plasticidad y la muerte neuronal. En la Enfermedad de Alzheimer, la acumulación de formas hiperfosforiladas de la proteína asociada a microtúbulos tau, constituye las llamadas marañas neurofibrilares. Poco se sabe de las anormalidades neuronales que inducen cambios en la tau y la consecuente desestabilización de los microtúbulos, lo cual puede impedir el transporte axonal y llevar a la muerte neuronal. En función a lo anterior, en el presente trabajo estudiamos los efectos *in vivo* de una droga que estabiliza a los microtúbulos, el Taxol, ya que mimetiza algunos aspectos de la neurodegeneración como son la falla en el transporte axonal y un desarreglo progresivo del citoesqueleto neuronal, sobre sus posibles consecuencias en el metabolismo de la tau y de otra proteína asociada a microtúbulos, la MAP2. Se utilizaron ratas Wistar machos (250 g), y se inyectaron en el hipocampo dosis de 25, 50 y 100 nmolas de Taxol. Después de 3, 12, 24 h y 7 días posteriores a la inyección, se sacrificaron para un análisis histológico e inmunohistoquímico de las proteínas tau, MAP2 y GFAP. En otro grupo de animales, la región del hipocampo inyectada con Taxol (100 nmolas), se procesó para la extracción de fracciones enriquecidas de tau y MAP2 y su posterior análisis por Western-blot utilizando anticuerpos monoclonales dirigidas contra dichas proteínas (Tau-1 y MAP2). Nuestros resultados demuestran que el Taxol induce muerte neuronal en la región de CA1 del hipocampo de manera dosis dependiente que correlaciona con un incremento en la cantidad de tau, y MAP2. Por otro lado, también se estudió el estado de fosforilación de la proteína tau por medio de un anticuerpo que reconoce un epítipo fosforilado (P-tau, Ser 404), encontrando un incremento en la inmunotinción en los hipocampo inyectados con Taxol, lo que sugiere que alteraciones en la dinámica de los microtúbulos afectan el metabolismo y el estado de fosforilación de las MAPs principalmente tau.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las enfermedades neurodegenerativas más devastadoras que afecta a varios millones de pacientes en todo el mundo. Hasta el momento no hay ninguna prueba definitiva para su diagnóstico en vida del paciente ni tampoco existe un tratamiento efectivo.

Desde el punto de vista histopatológico, en la EA existe una importante pérdida neuronal y sináptica que es frecuentemente precedida por la aparición de depósitos intracelulares que constituyen las llamadas marañas neurofibrilares. Bioquímicamente, estas estructuras consisten en agregados de proteínas insolubles provenientes del citoesqueleto y se denominan filamentos helicoidales apareados (FHA). Otras lesiones que se encuentran en el cerebro de sujetos demenciados son las llamadas placas seniles o amiloideas, que consisten en grupos de neuritas distróficas y procesos celulares gliales que rodean un núcleo de proteína β -amiloide (β AP), de localización extracelular. Mientras que las placas seniles afectan principalmente áreas neocorticales de asociación, de una manera generalizada, las marañas neurofibrilares afectan primero y más intensamente regiones del sistema límbico y tienen una distribución en grupos.

Se han postulado varias hipótesis en relación con la etiología y la fisiopatología de la EA. Aunque algunas de ellas establecen la relación entre ciertas mutaciones de la proteína precursora del amiloide (PPA) y otras proteínas, el mecanismo por el cual la amiloidosis contribuye al mecanismo de la enfermedad se desconoce. Otras hipótesis toman como punto de partida la acumulación anormal de los FHA que conforman las marañas neurofibrilares (Arias, 1999).

Datos provenientes de varios laboratorios apoyan la hipótesis de que múltiples anomalías neuronales concurren de manera temprana en el inicio de la EA, junto con el desarrollo de la sintomatología clínica. El conocimiento del desarrollo de estos cambios neuronales y su impacto en el problema clínico pueden llegar a proveer herramientas para el desarrollo de estrategias de prevención o mejoramiento de la EA.

Un escenario plausible de eventos que pueden conducir a la muerte neuronal en la EA, podría iniciar con algún tipo de daño sináptico en cierto grupo de neuronas (excitotoxicidad, deficiencia energética, desregulación de la homeostasis del calcio, inducción de radicales libres), que generara en un inicio, una axotomía funcional lo cual, aunado a un incremento en los depósitos extracelulares de β AP, podría inducir señales alrededor de las placas de β AP en los sitios de lesión, produciendo la acumulación de factores tróficos o citocinas inflamatorias. Estos eventos formarían parte de uno o varios sistemas, que de manera crónica y con intensidad variable, dependiendo de la susceptibilidad genética y de factores aún no identificados, conducirían a la neurodegeneración y finalmente a la muerte neuronal. En este sentido se ha reportado una disminución en la densidad de sinapsis en la EA, cuya magnitud correlaciona con la deficiencia cognoscitiva (Arias, 1999).

II. COMPOSICIÓN DEL CITOESQUELETO NEURONAL

Desde los primeros estudios de microscopía electrónica en cerebro, se pudo observar dentro de los procesos neuronales de la célula nerviosa, la presencia de estructuras filamentosas que llenaban dichos compartimientos. Los neurotúbulos (microtúbulos) y neurofilamentos fueron observados en dendritas y axones y posteriormente se observaron la presencia de filamentos de actina (Fig.1). Estos componentes forman el mayor organelo celular que es crucial para la función neuronal. Las neuronas tienen complejas pero estereotipadas morfologías, que son características de cada tipo celular. El desarrollo y el mantenimiento de la morfología neuronal está determinada por la organización del citoesqueleto en el cerebro en desarrollo y en adultos y su regulación está dada por señales extracelulares e intracelulares.

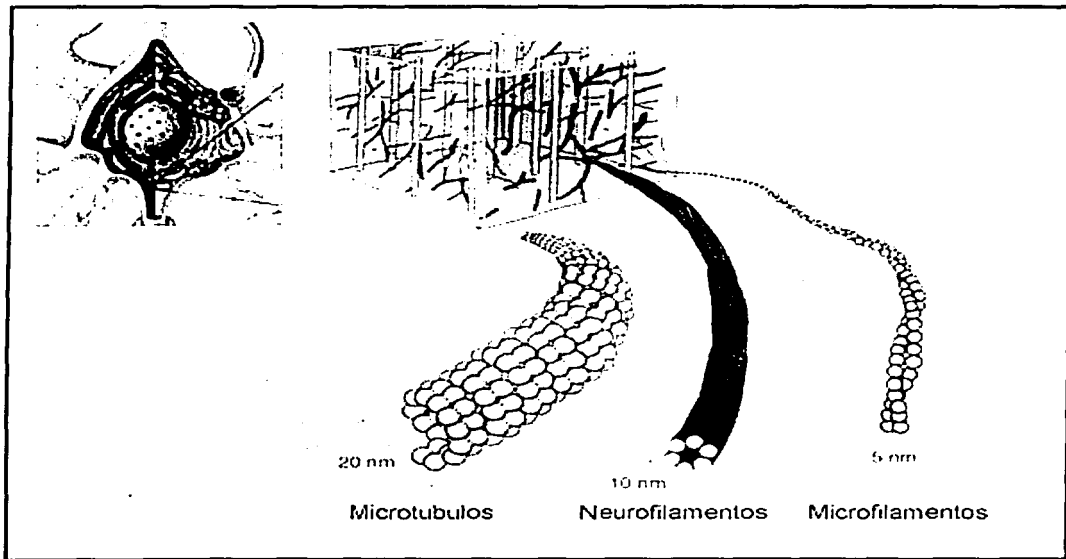


Figura1. Esquema que muestra los diferentes componentes del citoesqueleto neuronal. El arreglo de los microtúbulos, neurofilamentos y filamentos de actina le confieren estabilidad y soporte para el mantenimiento de la citoarquitectura neuronal. (Modificado de Bear *et al*, 2001).

2.1 Microfilamentos

Como en los filamentos del músculo, los microfilamentos están compuestos por monómeros de actina globular. La actina es el mayor constituyente de todas las células. En vertebrados superiores se expresan al menos seis diferentes genes de actina (Vandekerckhove y Weber, 1984). Dos de esos genes se localizan en diferentes cromosomas y dan origen a la β y γ actina citoplásmica (Erba *et al*, 1988), que son las isoformas que se encuentran en todas las células embrionarias y en células nerviosas. La actina neuronal es una mezcla de especies β y γ actina, esta última difiere de la α actina en pocos residuos aminoacídicos. Diversos estudios donde se ha aislado la actina, han mostrado que la proporción en la expresión de las dos isoformas (β/γ), es 1:1 en humanos y en cerebros de ratas es de 2:1 (Choo y Bray, 1978; Flanagan y Lin, 1979). Formas adicionales de actina

pueden ser detectadas por autoradiografía e inmunoprecipitación. Estas isoformas se originan de modificaciones postraduccionales de la actina (por ejemplo metilación, acetilación, fosforilación, etc). Gracias a técnicas cristalográficas se ha podido construir un modelo tridimensional de la molécula. Es una proteína globular bilobulada cuyas dimensiones 3.7 x 4.0 x 6.7 nm. El pequeño dominio contiene el amino y carboxilo terminal y el sitio de unión de miosina. La actina presenta un sitio de unión a trifosfato de adenosina (ATP), (Hirokawa, 1993).

2.2 Neurofilamentos

Los neurofilamentos y otras proteínas de filamentos intermedios tales como la periferina y la α -internexina están presentes en todo el proceso de axogénesis en mamíferos. Considerando el crecimiento axonal durante el desarrollo neuronal, que está influenciado por la acción combinada de proteínas asociadas a filamentos de actina y microtúbulos, se desconoce si los filamentos intermedios se requieren para el desarrollo del sistema nervioso en mamíferos. Una función reconocida de los neurofilamentos involucra el control del crecimiento radial de los axones mielinizados y por ende su velocidad de conducción (Julien, 1999). Sin embargo, no está muy claro cómo las subunidades individuales contribuyen *in vivo* el establecimiento de la red neuronal de filamentos intermedios y el control del calibre axonal.

Los neurofilamentos son los más abundantes de los tipos de filamentos intermedios en neuronas y comprenden tres subunidades. Durante la neurogénesis, las subunidades de neurofilamentos ligeros (NF-L; 61 kDa) y los neurofilamentos medios (NF-M; 90 kDa), son co-expresadas mientras que la expresión de la subunidad de neurofilamentos pesados (NF-H; 115 kDa), se presenta hasta el período postnatal. Estas tres proteínas comparten con otros miembros de la familia de filamentos intermedios, un dominio central de aproximadamente 310 aminoácidos, el cual está involucrado en el ensamble de los filamentos de 10 nm. Experimentos sobre regeneración de axones sugieren que el intercambio de subunidades tiene lugar en el axón (Okabe *et al*, 1993).

2.3 Microtúbulos

Los microtúbulos (MTs), de células no neuronales están involucrados en muchas funciones esenciales en todo el ciclo celular, incluyendo el transporte de materiales dentro de la célula misma y una apropiada progresión dentro de la división celular. En el caso de las neuronas del sistema nervioso central (SNC), los MTs participan en el crecimiento, establecimiento de la polaridad, desarrollo de sinapsis, formación y mantenimiento de la morfología neuronal, transporte axonal, así como, la plasticidad y la muerte neuronal. Muchas de esas actividades están asociadas con una reestructuración dinámica del citoesqueleto, como por ejemplo el alargamiento y acortamiento de MTs individuales, formación de mallas de MTs dentro de la célula, o aún el completo desensamble y reconstrucción de arreglos de los MTs.

En todas esas actividades, los MTs interactúan con una serie de proteínas y ligandos que se mueven a través de ellos, estabilizando o desestabilizando a los mismos y regulando los procesos dinámicos de diferentes maneras de acuerdo al tipo celular y más aún, dentro de un tiempo determinado del ciclo celular. Algunos ejemplos de estas proteínas pertenecen a la familia de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), que son objeto estudio, ya que una de sus principales funciones es promover la polimerización y una consecuente estabilización de los MTs (Hyams y Lloyd, 1994). Otro ejemplo de las interacciones entre MTs y proteínas, se refiere a una familia de motores moleculares llamadas kinesinas y dineínas que están involucradas en el transporte de elementos del citoesqueleto (proteínas del bajo peso molecular, vesículas, organelos subcelulares, etc.). En virtud de una intensa investigación, el conocimiento de ambas familias de proteínas ha ido creciendo hasta permitir entender con mayor detalle su función e interacción con los MTs (Hirokawa *et al*, 1998).

Los MTs están formados por la asociación de protofilamentos que a su vez, están formados por monómeros de α y β tubulina. La asociación de los protofilamentos se dispone en paralelo formando la pared cilíndrica del MT. Así, las interacciones longitudinales entre los dímeros de tubulina a lo largo de los protofilamentos son constantes en todos los polímeros. El número de

protofilamentos en un MT puede variar de 9 a 16 (Chrétien y Wade, 1991), lo que sugiere que hay un alto grado de flexibilidad en la asociación lateral entre protofilamentos y aún dentro de los MTs. Ya que todos los protofilamentos en un MT están dispuestos en paralelo, el MT tiene distinta polaridad. Las propiedades de los extremos positivo y negativo (*plus end*, *minus end*), difieren de muchas maneras y son importantes para su función.

Cada monómero de tubulina se une a un nucleótido de guanina. En el dímero de tubulina, la α tubulina esta siempre unida a un trifosfato de guanosina (GTP), en un sitio no intercambiable llamado el sitio-N, mientras que el nucleótido asociado a la β tubulina se encuentra en el sitio-E, ya que este último puede ser intercambiado libremente. En el dímero, solo la subunidad β tubulina intercambia GTP y un difosfato de guanosina (GDP), y por convención se refiere siempre el estado del dímero con referencia al nucleótido unido a β tubulina. La tubulina unida a GTP es indispensable para el ensamblaje, y la hidrólisis del GTP normalmente ocurre durante la polimerización, así que el cuerpo del MT contiene tubulina unida a GDP. En condiciones experimentales, los MTs que contienen análogos no hidrolizables de GTP son sumamente estables, sin embargo, en condiciones fisiológicas están unidos con GDP y estos últimos son inestables. Acorde con este modelo, para explicar la estabilidad en ausencia de ligandos estabilizadores endógenos, se ha propuesto que en las terminaciones mayor y menor se encuentra un capuchón de dímeros con GTP aún no hidrolizados que proporcionan estabilidad al MT evitando de este modo la despolimerización.

2.3.1 Estructura de la tubulina

Cada monómero de tubulina contiene 450 aminoácidos. Los monómeros α y β tubulina comparten una secuencia de 40 % de similitud y sus estructuras son muy similares con un peso molecular de ~50 kDa.

La estructura de la tubulina puede ser dividida en tres dominios. El dominio amino terminal (N-terminal) que comprende los aminoácidos 1-206, forman el dominio de unión a nucleótidos. Este segmento contiene un arreglo alternante de

hebras β -paralelas y α -hélices formando dominio de Rossmann (Rossmann *et al*, 1974), del cual pueden existir variantes en proteínas de unión a nucleótidos. Las hélices H1 y H2 están a un lado de la hoja β , mientras que las hélices H3, H4 y H5 están del otro lado. Las hebras B2 y B3 están muy poco definidas en el mapa de densidad en la cristalografía. Los residuos de las estructuras asa que conectan a H1 y B1, y H2 y B3, se encuentran incompletos ya que fueron definidos por mapas de densidad con resolución baja (Nogales *et al*, 1998).

La parte media de la secuencia de tubulina o dominio central, comprende los residuos 207-384, la cual no muestra casi ninguna secuencia de similitud con otras proteínas. Este dominio está involucrado en contactos laterales entre monómeros e inclusive entre protofilamentos. Esta región contiene una mezcla de estructura β -planar y 5 α -hélices a su alrededor. El dominio comienza con las hélices H6 y H7 seguido por una gran asa y la hélice H8 en la interfase longitudinal entre los monómeros. La hebra B7 interactúa con el dominio N-terminal. El asa que conecta B7 y H9 está más ordenada en la α -tubulina y es donde se piensa que ocurre los contactos laterales. Enseguida viene B8 y H10 sin cubrir al C-terminal de la α -tubulina y comprende una asa más corta dentro de B9. Finalmente, el asa entre B9 y B10 incluye una inserción de 8 residuos dentro de la subunidad α tubulina y en donde en la subunidad β tubulina se une el Taxol droga ampliamente utilizada en la quimioterapia contra una gran cantidad de neoplasias y cuyo efecto es la estabilización de los microtúbulos.

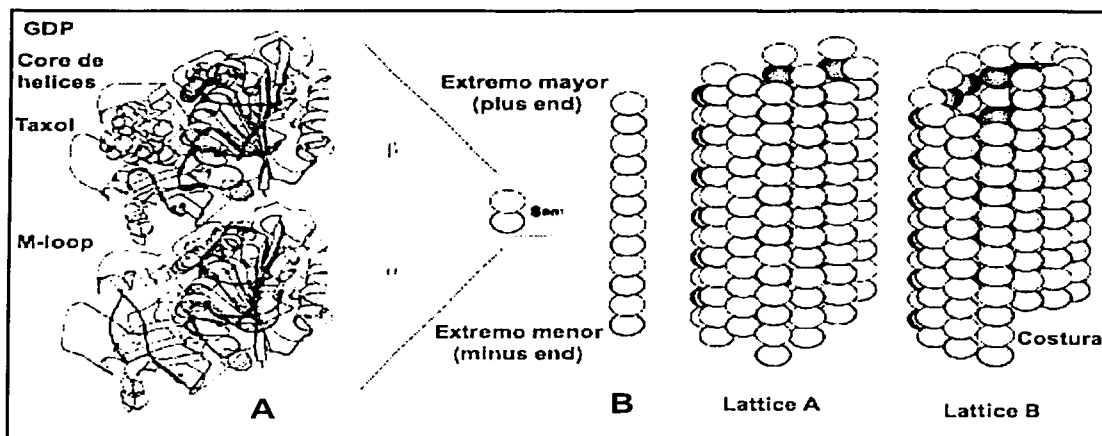


Figura 2. Modelo esquemático del microtúbulo y su estructura tridimensional. Los microtúbulos son polímeros formados por dímeros de α y β tubulina que se asocian linealmente dando lugar a los protofilamentos (B); estos a su vez se asocian lateralmente para formar a los microtúbulos y la cantidad varía de 9 a 16 en condiciones *in vitro* y 13 *in vivo*. En A se muestra la estructura tridimensional del dímmero de tubulina obtenido por donde se observa el dominio de unión del Taxol en el monómero de β tubulina. (Modificado de Nogales *et al*, 1998).

Un tercer dominio está conformado principalmente por dos largas hélices, el asa que las conecta y los residuos del carboxilo terminal (C-terminal). Este dominio está formado por las hélices H11 y H12. Estas hélices cubren los dominios previos, permaneciendo en la superficie de la molécula el cual ha sido identificado como la superficie externa del microtúbulo. Este segmento está probablemente involucrado en la unión de las proteínas asociadas a microtúbulos y los motores moleculares. El asa que conecta H11 y H12 es importante para la interacción con el monómero siguiente a lo largo del protofilamento (Nogales *et al*, 1998).

2.3.2 Isotipos de tubulina

La tubulina existe en diferentes formas isotópicas y su significado biológico aún es materia de debate en la comunidad científica. En células de mamífero hay cerca de seis genes para cada monómero de tubulina (Nogales, 2000). De

acuerdo con algunos estudios *in vitro* se ha observado que cada uno de estos isotipos confieren diferentes niveles de estabilidad relativa a los MTs (Schwarz *et al*, 1998). La mayoría de las diferencias entre los isotipos se localizan dentro de los últimos 15 residuos de la secuencia comprendiendo el C-terminal. La diferente estabilidad de los microtúbulos con diferentes composiciones de isotipos, parece ser importante en respuestas celulares contra drogas utilizadas como anticancerígenas. Se ha podido observar que células resistentes al tratamiento con Taxol pueden alterar la expresión de isotipos para la β tubulina (Ranganathan *et al*, 1998)

2.3.3 Orientación de la tubulina

De acuerdo con el modelo propuesto por Nogales *et al* (1998), las hélices de C-terminal forman las crestas de los protofilamentos en la superficie exterior y se piensa que las hélices H11 y H12 son las candidatas para la unión de los motores moleculares y las MAPs. En la superficie interna, el asa que corresponde a las hebras β S9-S10, presenta 8 residuos más en el monómero de la α tubulina; la zona correspondiente en la tubulina se encuentra en el sitio de unión al Taxol, por lo cual se ha propuesto que el Taxol puede estar mimetizando estos aminoácidos faltantes en el monómero de β tubulina, ejerciendo así su función estabilizadora (Nogales, 2000). La unión del Taxol en los MTs es tan rápida que no puede ser explicada por mecanismo de difusión simple de la molécula por las fenestraciones de las paredes de los MTs, ya que esta hipótesis es incompatible con estudios que miden parámetros cinéticos de unión. Un modelo hipotético que puede explicar esta rápida unión del Taxol en la superficie interna del MT involucra un posible respiradero ("breathing"), esto es, una apertura y cierre de la malla de MTs (Díaz *et al*, 1998).

2.3.4 Nucleación de los microtúbulos

Un fenómeno crucial para el comportamiento dinámico y su propia función de los MTs, es la nucleación en la célula a partir de los centros organizadores de los microtúbulos (MTOCs). Un papel esencial en la nucleación es realizado por la

γ -tubulina, una proteína homóloga a α y β tubulinas que se localiza en los MTOCs. De acuerdo con estudios de microscopía electrónica se ha mostrado que la γ -tubulina forma estructuras en anillo que sirven como templado para el crecimiento de los MTs (Moritz *et al*, 1995). La evidencia directa del papel de la γ -tubulina en la nucleación, ha sido demostrada en estudios *in vitro* usando complejos circulares que contienen γ -tubulina (γ -TuRC), (Zheng *et al*, 1995). En *Drosophila melanogaster* y en otros organismos superiores, la γ -tubulina existe en dos complejos uno de alto peso molecular (~2.2 MDa) y uno de bajo peso (~280 kDa), (Oegema *et al*, 1999). Parece ser que la interacción de los MTs con la γ tubulina en los MTOC, es por las subunidades α tubulina.

Hay dos principales modelos en la literatura que explican la nucleación. El primero esta basado en la forma y el tamaño del γ -TuRC, en el cual el anillo forma la primera vuelta para el crecimiento del MT sirviendo como templado para las interacciones longitudinales con los dímeros de α/β tubulina. El segundo es el modelo lateral, donde la γ -tubulina forma una estructura semejante a un protofilamento por autoasociación longitudinal y éste sirve como templado para las interacciones laterales con protofilamentos de α/β tubulina (Nogales, 2000).

2.3.5 Interacción de los MTs con otras proteínas

La tubulina interactúa con un gran número de proteínas para llevar a cabo su función. Algunas de esas proteínas modulan la estabilidad de los MTs, mientras que otras, son motores moleculares cuya función es transportar diferentes elementos a largo de los MTs. Estudios de cristalografía de rayos X, mostraron que los sitios de interacción se encuentran en la cara externa de los MTs. Se conoce que las MAPs tales como tau, MAP2 y MAP4, comparten un dominio de unión y que este interactúa fuertemente con la región C-terminal de la tubulina en la cara externa del microtúbulo. Recientemente se ha comprobado que tau se une a dos sitios distintos dentro de esta región, uno de ellos se encuentra en los últimos 12 residuos (Chau *et al*, 1998).

Muchas proteínas de la familia de las kinesinas se han visualizado gracias las reconstrucciones tridimensionales por microscopía electrónica (Arnal *et al*,

1996). Las reconstrucciones sugieren que existe una interacción con las hélices H11 y H12 del monómero β tubulina (Tucker y Goldstein, 1997), de manera similar a la interacción que existe con las MAPs.

III. PROTEÍNAS ASOCIADAS A LOS MICROTÚBULOS (MAPs)

3.1 MAP1A Y MAP1B

MAP1A y MAP1B son dos proteínas de alto peso molecular pertenecientes a la familia de las MAPs. Estas proteínas difieren de MAP2 y tau por presentar diferentes regiones de interacción con los MTs. MAP1A y MAP1B comparten una secuencia parcial homóloga y ambas son sintetizadas como poliproteínas acopladas a cadenas ligeras (MAP1B-LC1 de 34kDa y MAP1A-LC2 de 28 kDa respectivamente) (Mann y Hammarback, 1994). La proteína MAP1 purificada, contiene dos polipéptidos de bajo peso molecular (LC1,LC2) que corresponden a sus cadenas ligeras (Kusnetzov y Gelfand, 1987). La función de estas cadenas ligeras se desconoce.

MAP1B se une a los MTs por una serie de repeticiones básicas del tipo KKE y es también el mismo modo de unión de MAP1A. Sin embargo, a raíz de varios estudios (Faruki y Karsenti, 1994), se ha descubierto una nueva región de unión de MAP1A, el cual es único y más ácido que básico (Bokros *et al*, 1993). El estudio propone que MAP1A tiene una estructura helicoidal bipolar con cargas positivas y negativas separadas en dos lados.

3.2 MAP2

De las numerosas MAPs que copurifican con la tubulina en ciclos repetidos de ensamble-desensamblaje dependiente de temperatura, MAP2 y tau han sido las más estudiadas ampliamente. En particular, las proteínas de alto peso molecular MAP2 han merecido una considerable atención (Binder *et al*, 1985).

Las múltiples isoformas del gen de MAP2 expresadas en neuronas resultan de un empalme (splicing), alternativo del transcrito de ARNm, el cual se localiza en el cromosoma 2 y contiene alrededor de 20 exones (Neve *et al*, 1986; Goedert

et al, 1991; Shafit-Zagardo y Kalcheva, 1998). Las isoformas de MAP2 en cerebros de mamíferos se han dividido en dos grupos: a) MAP2 de alto peso molecular, que incluye a la MAP2A y la MAP2B, cuyos pesos moleculares oscilan entre 280 y 270 kDa respectivamente; y b) MAP2 de bajo peso molecular, el cual incluye MAP2C y MAP2D, cuyos pesos moleculares se encuentran alrededor de 70 y 75 kDa respectivamente. Las MAP2 de bajo peso molecular contienen las regiones amino terminal y carboxilo terminal de las MAP2 de alto peso molecular y carecen de un dominio central el cual es codificado por los exones 9 al 11 (Lewis *et al*, 1988). Ambos grupos de isoformas tienen tres o cuatro secuencias de repetición de 18 aminoácidos y espaciados por 13 a 14 aminoácidos, que constituyen del dominio de unión a la tubulina cercanos al extremo carboxilo de la proteína. La primera, segunda y tercera secuencia de repetición son codificadas por los exones 15, 17 y 18 respectivamente, mientras que los últimos descubrimientos apuntan a que la cuarta secuencia de repetición la codifica el exón 16 y se encuentra ausente en MAP2C (Doll *et al*, 1993).

Todas las isoformas de MAP2 tienen regiones ricas en prolina justo antes de los dominios de unión a la tubulina y se presume que estas regiones regulan su función (Ferralli *et al*, 1994; Gustke *et al*, 1994; Goode *et al*, 1997). Ambas regiones (la región rica en prolina y los dominios de unión a la tubulina), se encuentran relativamente bien conservadas en otras MAPs relacionadas tal es el caso de tau y MAP4 (Chapin y Bulinsky, 1992; Tokuraku *et al*, 1999).

La traducción de las isoformas de MAP2 empieza del sitio de traducción del exón 5 hasta el codón de terminación localizado en el exón 19. Así, los exones 1 al 5 que codifican para tres únicas regiones 5' sin traducir, están presentes en MAP2 de alto y bajo peso molecular, y el exón 19 contiene tres regiones 3' no traducidas con seis señales de poliadenilación (Kindler *et al*, 1996).

Las diferencias entre el peso molecular de MAP2A y MAP2B se deben a que MAP2A presenta una secuencia adicional de 83 aminoácidos codificados por el exón 8 (Chung *et al.*, 1996; Kalcheva *et al*, 1997). Aparentemente las proteínas MAP2 son moléculas no compactas que carecen de elementos definidos de estructura secundaria y esto explicaría su estabilidad y resistencia a la

desnaturalización térmica (Hernández *et al*, 1986). Varios estudios apuntan a que la región carboxilo terminal de MAP2 está fuertemente unida a los MTs, mientras que el resto de la molécula (llamado "dominio de proyección" y comprende la región amino terminal y el dominio central), se proyecta hacia fuera de la superficie de los MTs como un "brazo de extensión".

MAP2 se expresa en el SNC y es una de las proteínas más abundantes en el cerebro (Olmsted, 1986; Matus, 1988). Sin embargo, MAP2 también ha sido encontrada en ciertos tejidos no neuronales como el músculo esquelético y en algunos epitelios, en pequeñas cantidades (Valdivia *et al*, 1982). Estudios inmunocitoquímicos han mostrado que las MAP2 de alto peso no solo se encuentran concentradas en somas neuronales y en dendritas (Matus *et al*, 1981; DeCamilli *et al*, 1984; Huber y Matus, 1984), sino también en la mayoría de las células gliales y en estas últimas, se encuentran expresadas también las MAP2 de bajo peso molecular (Tucker *et al*, 1989; Doll *et al*, 1993). La mayoría de los axones no exhiben tinción con anti-MAP2 y de acuerdo con estudios de transporte axoplásmico en células retinales, no se ha podido detectar el transporte para esta proteína (Black y Kurdyla, 1983). La inmunoreactividad a MAP2 es aparente en ciertas subpoblaciones axonales del cerebro, mientras que algunos axones del sistema nervioso periférico se tiñen intensamente con anticuerpos monoclonales contra MAP2. Estas observaciones se apoyan por estudios bioquímicos en MTs purificados de materia blanca, los cuales demuestran la presencia de pequeñas cantidades de MAP2 (Vallee, 1982). Sin embargo, con esas notables excepciones, en la mayoría de los axones casi no se observa MAP2, indicando que esta proteína MAP2 es primariamente dendrítica (Frankfurter *et al*, 1983; DeCamilli *et al*, 1984; Papasozamenos *et al*, 1985). Las MAP2 de alto peso colocaliza con actina dentro de las espinas dendríticas y las densidades postsinápticas (Cáceres *et al*, 1984; Fifkova y Morales, 1992), en contraste con MAP2 de bajo peso molecular las cuales están ampliamente distribuidas en cada compartimiento neuronal (Tucker *et al*, 1989).

Se han sugerido muchos mecanismos sobre las diferentes formas de compartimentalización de las isoformas de MAP2:

Compartimentalización de su ARNm. Ciertos ARNm son transportados de los somas neuronales hacia las dendritas donde son traducidos por mecanismos dependientes de citoesqueleto durante el desarrollo (Kleiman *et al*, 1994; Steward y Wallace, 1995). De manera interesante uno de esos ARNm codifica a las MAP2 de alto peso molecular en contraste con otro que codifica a las MAP2 de bajo peso molecular que están localizados exclusivamente en los somas de las neuronas (Tucker *et al*, 1989, Kleiman *et al*, 1994; Pei *et al*, 1998). Sin embargo, la presencia temprana del ARNm de MAP2 de alto peso molecular en conos de crecimiento dendrítico sugiere su contribución a la polarización neuronal (Crino y Eberwine, 1996). En algunos casos, la diferente localización de los ARNm es debido a la presencia de las regiones no traducidas 3' y 5' (Wilhelm y Vale, 1993). Sin embargo, las regiones no traducidas de los ARNm de las MAP2 de alto y bajo peso molecular son similares (Kalcheva *et al*, 1995; Kindler *et al*, 1996), sugiriendo que las regiones codificantes pueden ser responsables de su diferente compartimentalización.

Selectiva entrada en axones. Experimentos de transfección han demostrado que las MAP2 de alto peso molecular son incapaces de transportarse hacia el axón debido a la presencia de su dominio central (Hirokawa *et al*, 1996). Esto sugiere la existencia de un mecanismo selectivo en el segmento inicial de los axones que específicamente impide el acceso a estas proteínas dentro de los mismos. Este mecanismo sería dependiente de secuencia, ya que proteínas más grandes como la MAP1B son abundantes dentro de los axones.

Estabilidad de la proteína en compartimentos neuronales. Experimentos de microinyección han revelado que las MAP2 de alto peso molecular pueden estar inicialmente localizados en axones pero rápidamente desaparecen de este compartimento, llegando a estar exclusivamente presente en somas neuronales y dendritas. Esta desaparición de las MAP2 de alto peso molecular microinyectadas de los axones pueda deberse a una proteólisis específica dentro de los compartimentos neuronales (Okabe y Hirokawa, 1989).

La proteína MAP2 interactúa con los MTs debido a sus dominios de unión a la tubulina, asociándose con la región ácida del carboxilo terminal (Serrano *et al*,

1984; Cross *et al*, 1991). Una de las principales funciones de MAP2 es la de promover la polimerización de los MTs, así como la estabilización de los mismos gracias a esta interacción molecular con los dímeros de tubulina. Cabe recalcar que en diversos estudios se ha demostrado que las regiones adyacentes a los dominios de unión a la tubulina en especial la región rica en prolinas, puede favorecer la unión con los MTs y estabilizarlos (Ferralli *et al*, 1994; Gustke *et al*, 1994; Goode *et al*, 1997). Como consecuencia de la asociación de MAP2 con los MTs, estos últimos se estabilizan y su longitud se incrementa dando lugar a largos polímeros (Kowalski y Williams, 1993, Ávila y Díaz-Nido, 1994; Kalcheva *et al*, 1998). En presencia de MAP2 los MTs aún conservan sus propiedades dinámicas lo cual puede proporcionar una base molecular para la plasticidad morfológica (Pryer *et al*, 1992, Kaech *et al*, 1996). Además de su unión a tubulina la MAP2 también se puede unir a la actina lo que modifica la estabilidad de los microfilamentos (Selden y Polard, 1983; Pedrotti e Islam, 1997). De hecho una colocalización interesante de ambas proteínas ha sido observada en espinas dendríticas (Cáceres *et al*, 1984; Fikowa y Morales, 1992).

3.3 TAU

Esta proteína se encuentra en muchas especies tales como nemátodos, insectos, peces, roedores, bovinos, cabras, monos y en el humano (Kosik *et al*, 1987; Lee *et al*, 1988; Goedert *et al*, 1989a; Himmler *et al*, 1989; Goedert *et al*, 1996; Nelson *et al*, 1996; Liu *et al*, 1997).

En el humano, la proteína se localiza en neuronas y aún en células no neuronales usualmente en cantidades apreciables. La proteína tau también se expresa en células gliales, principalmente en condiciones patológicas (Chin y Goldman, 1996).

El gene humano que codifica a la proteína asociada a los microtúbulos tau es único y está localizado en el brazo largo del cromosoma 17 en la posición de la banda 17q21 (Neve *et al*, 1986). Está compuesto de cerca de 10 kb y contiene 16 exones. Los análisis de restricción y secuenciación del gene han mostrado la presencia de 2 islas CpG, una asociada con la región del promotor y la otra con el

exón 9 (Andreadis *et al*, 1992). La isla CpG en la región putativa del promotor se asemeja a los promotores específicos de neuronas previamente descritos. La secuencia de la región del promotor también revela una ausencia de la caja TATA y se cree que está relacionada con la presencia de múltiples sitios de iniciación, típicamente de genes consenso (housekeeping genes). Tres sitios de unión SP1 que son importantes para dirigir la iniciación de la transcripción de otros promotores TATA, también se encuentran en la proximidad del primer sitio de transcripción (Andreadis *et al*, 1996; Sadot *et al*, 1996).

El primer transcrito de tau contiene 16 exones. Sin embargo, tres de ellos (exones 4A, 6 y 8) nunca se encuentran presentes en algún ARNm de cerebro humano. Esos exones son específicos de proteínas tau del sistema nervioso periférico (SNP). El exón 4A se encuentra en SNP de bovino, humano y roedor con alto grado de homología. El ARNm con los exones 6 y 8 no ha sido descrito en humanos. Sin embargo, algunos transcritos con el exón 8 se han encontrado en cerebro de bovinos y de monos rhesus (Himmler *et al*, 1989; Nelson *et al*, 1996).

El exón -1 es parte del promotor, y es transcrito pero no traducido. Los exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 y 13 son exones constitutivos. El exón 14 se encuentra en el ARNm pero no se traduce y no aparece en la proteína. En cambio, los exones 2, 3 y 10 son procesados alternativamente y son específicos de cerebros de adulto (Goedert *et al*, 1989b; Andreadis *et al*, 1992; Sawa *et al*, 1994). El exón 3 nunca aparece independiente del exón 2. Así, el procesamiento alternativo de esos tres exones permite seis combinaciones (2-3-10-; 2+3-10-; 2+3+10-; 2-3-10+; 2+3-10+; 2+3+10+) (Andreadis *et al*, 1992). En el cerebro humano, el transcrito primario da origen a seis ARNm (Goedert *et al*, 1989a; Himmler *et al*, 1989).

Como ya se mencionó, en el cerebro, la proteína tau posee seis isoformas cuya longitud oscila entre 352 a 441 aminoácidos. Sus pesos moleculares se encuentran entre 45 a 65 kDa cuando se corren en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Cada variante de tau difiere una de la otra por la presencia de tres o cuatro regiones repetidas o dominios de unión en el extremo carboxilo terminal de la molécula y la ausencia o presencia de uno o dos inserciones de 29 aminoácidos en la parte amino terminal (Goedert *et al*, 1989b; Himmler *et al*, 1989; Kosik *et al*,

1989). Cada una de esas isoformas es probable que tenga diferentes papeles fisiológicos, ya que son expresadas diferencialmente durante el desarrollo. Por ejemplo, solo una isoforma de tau, caracterizada por la ausencia de inserciones en el amino terminal y la presencia de tres dominios de unión, está presente durante etapas fetales, mientras que las seis isoformas (con uno o dos inserciones en el amino terminal) aparecen en el adulto (Kosik *et al*, 1989; Goedert y Jakes, 1990). Así, las isoformas de tau probablemente tienen funciones específicas relacionadas con la ausencia o presencia de regiones codificadas por los exones 2, 3 y 10. No obstante, las seis isoformas pueden no estar igualmente expresadas en las neuronas. Por ejemplo, el ARNm de tau que contiene el exón 10 no aparece en células granulares del giro dentado del hipocampo (Goedert *et al*, 1989b). Estos datos muestran que las isoformas de tau pueden estar distribuidas diferencialmente en subpoblaciones neuronales.

Las dos secuencias de 29 aminoácidos codificadas por los exones 2 y 3 originan diferentes longitudes en la parte amino terminal de la proteína tau. Estas dos inserciones son altamente ácidos y seguidos por una región básica rica en prolinas. La parte amino terminal se conoce como el dominio de proyección ya que se proyecta de la superficie del MT y puede interactuar con otros elementos del citoesqueleto y de la membrana plasmática (Hirokawa *et al*, 1988; Brandt *et al*, 1995).

En ratones "knock out" que carecen del gen de tau, un incremento de la proteína asociada a los microtúbulos 1A (MAP1A), puede compensar la función de la proteína tau (Harada *et al*, 1994). Sin embargo, el diámetro del axón de algunas neuronas está particularmente afectado. Esto puede estar relacionado al largo particular del dominio amino terminal (conteniendo o no, secuencias de aminoácidos codificadas por los exones 2 o 3), de la proteína tau que es específica y solo se encuentran en axones. De hecho, los dominios de proyección de tau determinan el espacio entre los microtúbulos del axón y puede incrementar el diámetro del axón (Chen *et al*, 1992).

A diferencia del SNC, las neuronas periféricas a menudo proyectan un axón muy largo con un gran diámetro, se ha encontrado una secuencia adicional en el

amino terminal codificada por el exón 4A lo que genera una isoforma específica de tau llamada "tau de alto peso molecular" (Andreadis *et al*, 1992; Georgieff *et al*, 1993). Esos resultados sugieren a que las regiones del amino terminal son cruciales en la estabilización y organización de ciertos tipos de axones.

Además de su unión a la tubulina, la proteína tau se une a la espectrina, la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Liao *et al*, 1998) y a los filamentos de actina (Carlier *et al*, 1984). Por medio de estas interacciones, tau puede permitir a los MTs interconectarse con otros componentes del citoesqueleto tales como los neurofilamentos (Aamodt *et al*, 1984), lo que puede limitar la flexibilidad de los mismos (Matus, 1994). Por otro lado, hay evidencias en donde tau interactúa con organelos citoplasmáticos lo que puede permitir la unión entre los MTs y las mitocondrias (Rendon *et al*, 1990). El dominio de proyección también permite interacciones con la membrana de las neuronas (Brandt *et al*, 1995). Además, se han descrito otras proteínas que interactúan con tau y se unen a la región de unión a MTs, entre ellas encontramos a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Sontag *et al*, 1999).

3.3.1 Funciones de tau

La proteína tau se asocia a los MTs por los dominios de unión cercanas al carboxilo terminal. Estos dominios de unión a los MT (R1-R4), son codificados por los exones 9 al 12 (Lee *et al*, 1989). Las isoformas con tres o cuatro dominios están constituidos por repeticiones de 18 aminoácidos muy conservados (Lee *et al*, 1988; Goedert *et al*, 1989a; Lee *et al*, 1989), y separados por regiones de inter-repetición de 13 o 14 aminoácidos los cuales están menos conservados evolutivamente. La proteína tau es promotora de la polimerización de la tubulina *in vitro*, al igual que colabora en el transporte axonal (Cleveland *et al*, 1977; Bohm *et al*, 1990; Brandt y Lee, 1993). Se ha visto que tau incrementa el grado de polimerización de los MTs e inhibe su despolimerización (Drechsel *et al*, 1992). Algunos estudios han demostrado que las isoformas de tau en cerebros maduros con 4 repeticiones son más eficientes en promover el ensamble de los MTs que las isoformas fetales con 3 repeticiones (Goedert y Jakes, 1990; Butner y

Kirschner, 1991; Gustke *et al*, 1994), lo que hace que los MTs durante el desarrollo, cuando se requiere mayor plasticidad neuronal, sean más flexibles. Un hecho interesante es que la parte más potente para inducir la polimerización de los MT, se encuentra en la primera inter-región localizada entre el primer y segundo dominio de unión a los MTs, y más específicamente en la secuencia 274KVQIINKK₂₈₁ de la proteína. Esta primera inter-región se encuentra en isoformas con 4 dominios de unión a MTs, específica de adultos y responsable en las diferencias de afinidad de asociación de tau (isoformas con 3 o 4 dominios de unión), con los MTs (Goode y Feinstein, 1994; Panda *et al*, 1995).

Los dominios de unión a los MTs pueden también estar involucrados en otras funciones además de su ensamblaje. Evidencia reciente apoya un papel de los dominios de unión en la modulación del estado de fosforilación de la proteína tau. Una unión competitiva y directa se ha demostrado entre los residuos 224 al 236 de la proteína y los MTs por una parte, y por la otra con la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Sontag *et al*, 1999). Como consecuencia, los MTs pueden inhibir la actividad de la PP2A por competencia para unirse con tau por medio de los dominios de unión.

3.3.2 Modificaciones post-traduccionales

Glicosilación. La O-glicosilación es una modificación post-traducciona l dinámica y abundante que es caracterizada por la adición de un residuo de N-acetilglucosamina en los aminoácidos Ser o Thr cerca del residuo Pro (Haltiwanger *et al*, 1992). Aún cuando el significado funcional no es muy claro, parece estar implicado en la regulación transcripcional, activación celular, regulación del ciclo celular y en el apropiado ensamble de complejos proteicos multiméricos (Hart *et al*, 1996). Esta modificación es a menudo recíproca a la fosforilación (Holt *et al*, 1987). El número de sitios para la glicosilación de la proteína es más bajo que para los sitios de fosforilación y estos sitios específicos, o los cambios estequiométricos, pueden modular la función de tau. De hecho, la fosforilación y la glicosilación tienen efectos opuestos, por ejemplo, el efecto de la glicosilación de la proteína tau y otras MAPs sugiere un papel en mediar las

interacciones con la tubulina o puede jugar un papel en la localización subcelular y degradación de tau (Arnold *et al*, 1996).

Fosforilación. Se han descrito 79 sitios putativos de residuos Ser-Thr para su fosforilación en la isoforma más larga de tau. El uso de anticuerpos monoclonales dependientes de la fosforilación contra tau, aunado a otras técnicas, han podido demostrar al menos 30 sitios que se pueden fosforilar (Hasegawa *et al*, 1992; Lovestone y Reynolds, 1997). Casi todos esos sitios están localizados fuera de los dominios de unión a los MT con la excepción de la Ser262 (R1), Ser285 (inter-repetición R1-R2), Ser305 (inter-repetición R2-R3), Ser324 (3R), Ser352 (R4) y Ser356 (R4) (Goedert *et al*, 1989a; Seubert *et al*, 1995; Roder *et al*, 1997), (Fig.3). La mayoría de esos sitios son secuencias Ser-Pro o Thr-Pro. Los diferentes estados de fosforilación de tau es el resultado de la actividad de cinasas específicas y fosfatasas.

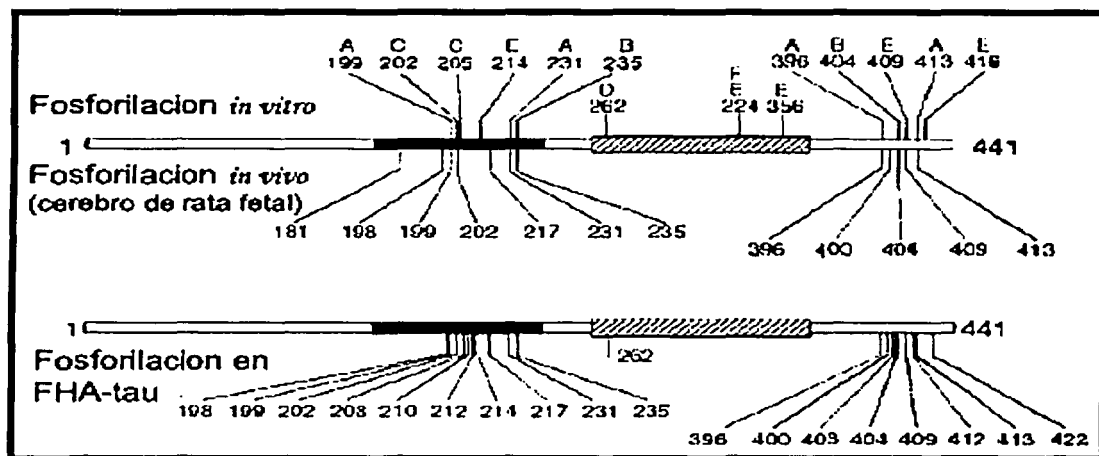


Figura 3. Sitios de fosforilación de la proteína tau. Se pueden observar los sitios específicos de fosforilación de la proteína tau (isoforma más larga de 441 residuos), tanto en condiciones *in vitro* e *in vivo*, y de tau extraída de pacientes con EA. Nótese que algunos sitios se encuentran fosforilados de manera muy similar en tau de cerebros de rata fetal y de proteína tau (FHA-tau), proveniente de pacientes con EA. (Modificado de Lovestone y Reynolds, 1997).

Como ya se mencionó, la proteína tau se asocia a los MTs por medio de los dominios de unión. Sin embargo, el ensamble de los mismos depende

parcialmente del estado de fosforilación ya que la proteína tau fosforilada es menos efectiva que la proteína desfosforilada en la polimerización de los MTs (Biernat *et al*, 1993; Bramblett *et al*, 1993). La fosforilación en la Ser262 dramáticamente reduce la afinidad de tau por la tubulina *in vitro* (Biernat *et al*, 1993). No obstante, este sitio que está presente en tau fetal y en algunos casos en adultos, al igual que en la proteína hiperfosforilada encontrada en las marañas neurofibrilares en la EA, es insuficiente para eliminar la unión con los MTs (Seubert *et al*, 1995). Datos recientes indican que el heptapéptido 224 KKVAVVR 230 localizado en la región rica en prolinas tiene una alta actividad de unión en combinación con las regiones de repetición (Goode *et al*, 1997), sugiriendo así, interacciones intramoleculares entre ambas regiones.

Fosforilación en el desarrollo. La fosforilación de tau es regulada en el desarrollo. Es alta en isoformas fetales y decrece con la edad debido a la activación de fosfatasas (Mawal-Dewan *et al*, 1994). La mayoría de los análisis de la expresión de los sitios de fosforilación durante en desarrollo y en la edad adulta derivan de estudios inmunohistoquímicos de tejido nervioso y Western blot. Extractos de cerebros fetales contienen tau altamente fosforilada en comparación con extracto de tau en cerebros de adulto y esta fosforilación muestra algunas similitudes en las propiedades de unión a microtúbulos con la tau encontrada en la EA, pero sin acumularse en fibrillas insolubles (Brion *et al*, 1993). La proteína tau fetal contiene 7 moles de fosfato en promedio mientras que en la enfermedad contiene 9 moles de fosfato por mol de tau (Ksiezak-Reding *et al*, 1992; Köpke *et al*, 1993).

3.3.3 Distribución celular

Tau es una fosfoproteína y gracias a la utilización del anticuerpo monoclonal Tau-1 que reconoce un epítoto no fosforilado se demostró su localización axonal. Sin embargo, el estado de fosforilación de tau es probablemente diferente de acuerdo a los compartimentos celulares donde se encuentra. Mientras que la inmunoreactividad de Tau-1 se observa en el compartimiento somatodendrítico de neuronas después de la desfosforilación, el marcado de los somas y dendritas con anticuerpos independientes de sitios

fosforilados como Alz-50, demuestran que la proteína se localiza en todos los compartimentos de las células nerviosas y no son exclusivamente proteínas axonales. Sin embargo, comparado con otras MAPs, la proteína tau está preferentemente en el axón (Binder *et al*, 1985).

IV. FUNCIONES DEL CITOESQUELETO

4.1 Polaridad neuronal

La elucidación de los mecanismos moleculares responsables del establecimiento de la polaridad estructural de las neuronas es uno de los focos de atención de los neurobiólogos. Una de las primeras etapas en la morfogénesis consiste en el crecimiento de neuritas y su diferenciación en dendritas y axones (Sánchez *et al*, 2000).

Las neuronas primarias en cultivos disociados son capaces de recapitular algunos aspectos de su morfología *in vivo*. Una de las características morfológicas de algunas neuronas disociadas es su habilidad de elaborar dos distintas poblaciones de neuritas, lo cuales tienen características de axones y dendritas (Cáceres *et al*, 1991). El desarrollo de la polaridad neuronal fue caracterizado primero en detalle en cultivos de neuronas hipocampales (Barlett y Banker, 1984). Dichos investigadores demostraron que las neuronas en cultivo fueron capaces de generar morfologías axonales y dendríticas. Esta segregación ocurre en cultivos de baja densidad sin contacto célula-célula y sobre una matriz de polilisina. Las propiedades distintivas de esos "axones" y "dendritas", incluyen su estructura sináptica, receptores, canales iónicos, contenido ribosomal, presencia de elementos de Golgi y la composición del citoesqueleto son conservadas en cultivo (Kosik y Cáceres, 1991). La MAP2, un marcador somatodendrítico (Matus *et al*, 1981; Miller *et al*, 1982), solo aparece en somas y dendritas en cultivos de neuronas después de que maduran (Cáceres *et al*, 1986; Kosik y Finch, 1987). Un aspecto interesante de la localización diferencial de las MAPs en neuronas se refiere a la diferente orientación de los MTs en los axones y dendritas. En el axón, los MTs tienen sus extremos positivos (*plus ends*) alineadas distantemente

(Heidemann *et al*, 1981; Burton y Paige, 1981); mientras que una orientación mezclada prevalece en la porción medial de las dendritas (Baas *et al*, 1988).

4.2 Transporte axonal

El transporte axonal comprende dos clases de movimiento: 1) el transporte axoplásmico "rápido" y 2) el transporte axoplásmico "lento", cada uno con subcomponentes que difieren en velocidad y composición. El transporte axoplásmico rápido tiene como función, el movimiento de los organelos y de proteínas a través del axón (Fig. 4) y podemos distinguir a su vez dos tipos de transporte: el transporte anterógrado y el transporte retrogrado. Ambos se diferencian entre sí, ya que el transporte anterógrado es el responsable del movimiento pequeñas vesículas del soma y organelos hacia las terminaciones axónicas mientras que el transporte retrogrado opera en dirección inversa, con una velocidad de 2.3-4.6 $\mu\text{m/s}$ para el primero y 2.3 $\mu\text{m/s}$ para el segundo. En el primer tipo están involucradas los motores moleculares llamadas kinesinas y estas son responsables del movimiento hacia el extremo positivo (*plus end*), de los microtúbulos lo cual, para el caso del axón, significa que el movimiento de vesículas va del soma celular hacia las terminales del axón.

Las kinesinas comprenden una superfamilia que se han encontrado en varios tipos celulares y organismos (Bloom, 1992), presentando una peso molecular de 380 kDa. Es un heterotetrámero conteniendo dos cadenas pesadas de alrededor de 125 kDa y dos cadenas ligeras de 64 kDa (Cyr y Brady, 1992). La molécula es elongada y presenta dos cabezas globulares en su parte N-terminal, en estos dominios contiene sitios de unión para los MTs y para ATP.

Las dineínas son los motores moleculares involucradas en el transporte retrogrado de vesículas grandes. Esta proteína tiene un peso molecular aproximado de 1000 kDa y consiste en dos cadenas pesadas de 400 kDa formando dos cabezas globulares que contienen 4 sitios de unión para ATP. Estas cadenas están unidas por tallos a un dominio basal formado por un número de cadenas ligeras de 53 a 74 kDa, presumiblemente la región basal es responsable de la asociación con los organelos.

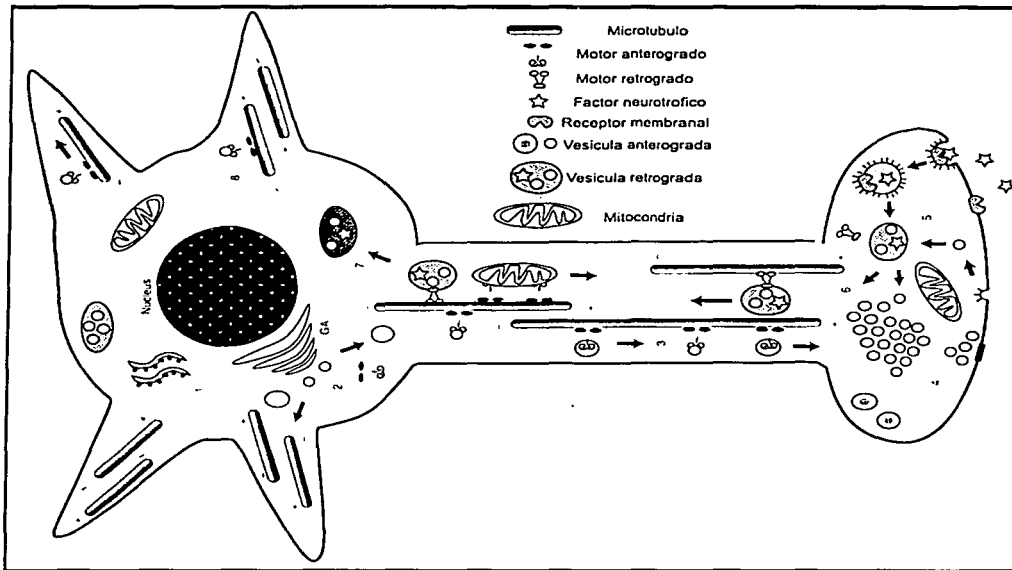


Figura 4. Esquema que representa el transporte axonal rápido dentro de una célula nerviosa. Se observa como los diferentes motores moleculares transportan pequeñas vesículas y organelos celulares del soma hacia la terminal axónica (transporte anterógrado), al igual que vesículas dirigiéndose en dirección opuesta (transporte retrogrado). (Modificado de Zigmund *et al*, 1999).

El transporte axonal lento transporta principalmente proteínas citoplasmáticas de elementos del citoesqueleto. Dentro del transporte lento se pueden distinguir dos componentes lentos (SC), el SCa y el SCb. En el SCa las proteínas principalmente transportadas son neurofilamentos y proteínas del MT, junto con una pequeña porción de espectrina a una velocidad de (0.002-0.01 $\mu\text{m/s}$). El SCb se mueve de 5 a 10 (0.02-0.09 $\mu\text{m/s}$) veces más rápido que el SCa, este tipo de transporte involucra el movimiento de proteínas como la actina, clatrina, espectrina y algunas proteínas acarreadoras (Amos y Amos, 1991).

V. ALTERACIONES DEL CITOESQUELETO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA) el citoesqueleto de un gran número de neuronas se desagrega progresivamente y se

reemplaza por haces de filamentos helicoidales apareados (FHA). Estos FHA se asocian produciendo las marañas neurofibrilares que se localizan principalmente en el cuerpo neuronal y llenan casi todo el citoplasma de las células afectadas (Fig.5). También se observan acumulaciones de FHA en las neuritas distróficas que rodean los acúmulos extracelulares de proteína amiloide de las placas neuríticas (placas seniles). Una tercera localización ocurre en neuritas y en el neuropilo de la corteza telencefálica, donde se forman los llamados hilillos de neuropilo. La presencia de marañas neurofibrilares se ha correlacionado con el grado de demencia (Arriagada *et al*, 1992).

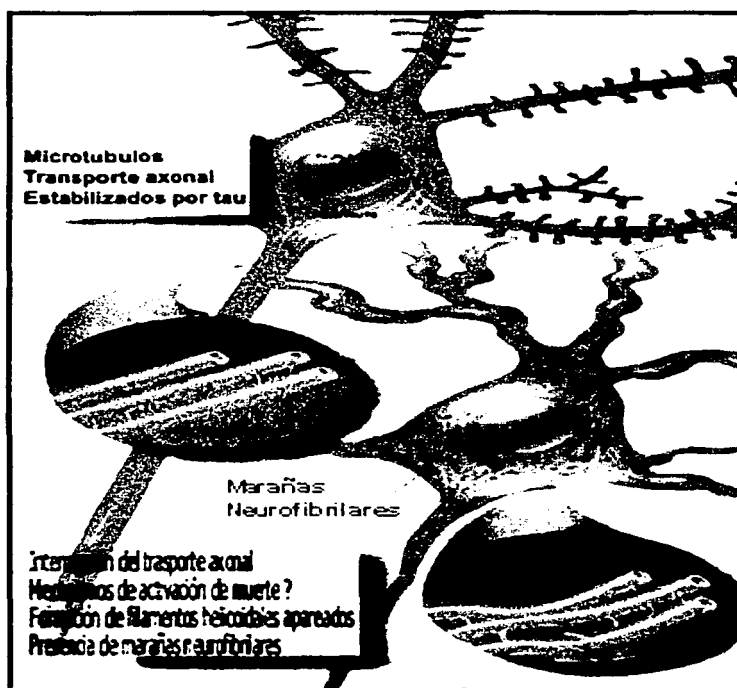


Figura 5. Esquema que muestra al citoesqueleto, en especial los MTs, de una neurona sana y de una neurona patológica mostrando un progresivo desarreglo de su citoesqueleto. Nótese que en esta última la proteína tau (marcada en azul), ya no cumple con su función estabilizadora y ahora se encuentra autoensamblada formando las marañas neurofibrilares. (Modificado de St. George-Hyslop, 2000).

Los estudios sobre la composición bioquímica de los FHA se han dificultado por su escasa solubilidad en detergentes y su gran resistencia a la proteólisis. Los procedimientos convencionales para el estudio de los FHA combinan su extracción de fracciones de tejido crudo obtenidos de individuos fallecidos con EA, la digestión con proteasas y su ulterior separación por centrifugación en gradientes de sacarosa y CsCl. El patrón de polipéptidos y su inmunorreactividad cruzada parecen indicar que la proteína tau forma parte importante de su composición. Así mismo se han podido secuenciar fragmentos de otras proteínas asociadas a microtúbulos, como MAP2 y otras no relacionadas con el citoesqueleto, como en el caso de la proteína ubiquitina involucrada en el sistema de degradación por proteosoma (Mori *et al*, 1987).

La tau se ha considerado un marcador importante en la EA, en virtud de que es el principal componente bioquímico encontrado en los FHA. En estas estructuras, la tau, que normalmente contiene 2 o 3 moles de fosfato, aparece hiperfosforilada, con 6 a 9 moles de fosfato por mol de tau (Ksiezak-Reding, *et al*, 1992; Köpke *et al*, 1993). Todas las isoformas de tau aisladas de cerebros de pacientes con EA contiene más fosfatos que las 6 isoformas normales. Las isoformas anormales de tau parecen idénticas (en composición y secuencia de aminoácidos), al grupo de proteínas específicas de la EA denominadas como A68. Las A68 difieren de la tau del adulto normal con respecto al grado y a los sitios de fosforilación lo que disminuye su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (Grundke-Iqbal *et al*, 1986). La producción de proteína A68 disminuye enormemente su capacidad para unirse a los MTs precisamente en aquellas regiones del cerebro que contiene niveles altos de A68 y numerosas lesiones neurofibrilares.

Entre las cinasas que fosforilan a la proteína tau, existen dos grandes grupos: 1) las cinasas dirigidas por prolinas (PDPK) y 2) las cinasas no dirigidas por prolinas (NPDPK). En las primeras podemos mencionar a la glucógeno sintasa cinasa (GSK3), las cinasas dependientes de ciclinas (Cdc2 y Cdk5) y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (Hanger *et al*, 1992; Vulliet *et al*, 1992). Entre las segundas destacan por ejemplo, la proteína cinasa dependiente de

AMPC (PKA), la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa reguladora de la afinidad de los microtúbulos (MARK), la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMPK II) (Johnson, 1992; Correas *et al*, 1992; Drewes *et al*, 1997; Jicha *et al*, 1999). Las fosforilación por PDPK tiene lugar principalmente en la región rica en prolinas y en la región C-terminal, mientras que las modificaciones mediadas por NPKK se presentan en la región de unión a microtúbulos en secuencias KXGS.

La proteína tau se puede desfosforilar por medio de fosfatasas *in vitro* como la proteína fosfatasa 1 (PP1), la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la proteína fosfatasa 2B (PP2B, calcineurina). Estas fosfatasas están ampliamente distribuidas en el cerebro (Ingebritsen y Cohen, 1983). La inhibición de las fosfatasas (por ejemplo PP2A) genera un incremento en la fosforilación en algunos sitios de tau (Ser199/Ser202, Ser235) en cultivos neuronales y en rebanadas de hipocampo (Arias *et al*, 1993; Harris *et al*, 1993), mientras que inhibición de la PP2B permiten la fosforilación en otros sitios (Ser396, Ser404) (Saito *et al*, 1995). Esto sugiere que la PP2A y la PP2B están involucradas en la desfosforilación de diferentes sitios en la proteína tau.

5.1 Filamentos helicoidales apareados

Generalmente se acepta que las 6 isoformas de tau están presentes en los FHA (Jakes *et al*, 1991). De acuerdo con resultados provenientes por degradación proteica y con anticuerpos específicos, se sugiere que los FHA están formados por un núcleo estructural o "core" que contiene tau con tres repeticiones, mientras que el resto de tau (la parte N-terminal y C-terminal), forma una envoltura lisa o "fuzzy coat" que puede ser removida por proteasas. La proteína tau se encuentra hiperfosforilada en los FHA (Grundke-Iqbal *et al*, 1986; Morishima-Kawashima *et al*, 1995). La hiperfosforilación de tau en la EA puede estar relacionada con un incremento en la actividad de proteínas cinasas o con un decremento en la actividad de las fosfatasas (Trojanowski y Lee, 1995). Muchos factores que inducen el ensamblaje de tau se han estudiado en los últimos años. La parte media del C-terminal que incluye un dominio de repetición forma los FHA en forma

más eficiente que toda la proteína entera (Wille *et al*, 1992), consistente con su posición en el núcleo de los FHA en la EA. El ensamble procede más rápido si las proteínas están entrecruzadas formando dímeros por oxidación de sus grupos tioles formando puentes disulfuro en la cisteína 322, lo que sugiere que los dímeros de cisteínas son importantes en la formación de "bloques" para la nucleación de los FHA (Schweers *et al*, 1995). Se ha visto también que los polianiones aumentan la eficacia de ensamble, presumiblemente por compensar las cargas positivas de tau. Entre los polianiones propuestos están, componentes extracelulares tales como la heparina (Pérez *et al*, 1996) o factores intracelulares como el ARN o péptidos acídicos como el poliglutamato (Kampers *et al*, 1996; Friedhoff, *et al*, 1998). (Fig. 6).

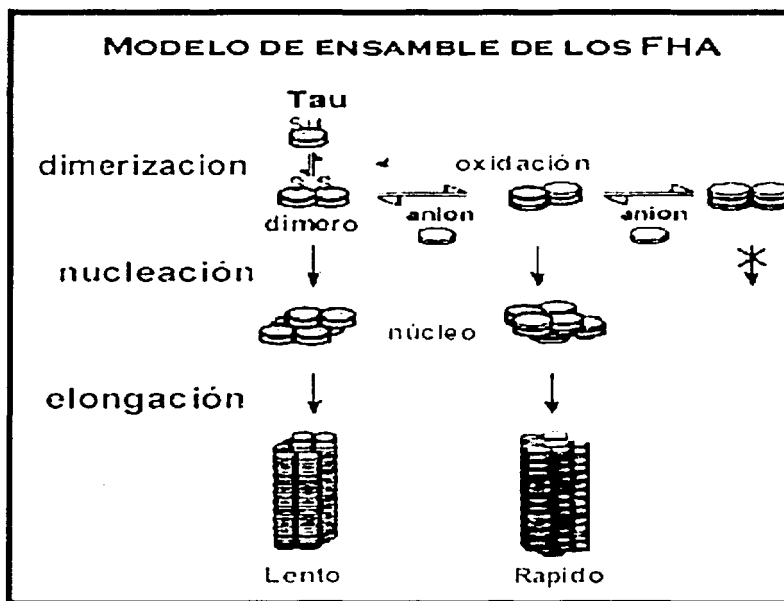


Figura 6. Modelo hipotético del ensamble de la proteína tau en FHA. Hipótesis recientes, indican que la oxidación de los grupos tioles de la cisteína 322 de la proteína tau, pueden formar dímeros por medio de puentes disulfuro y estos dímeros pueden servir como centros de nucleación. Además de la oxidación se ha propuesto que algunos polianiones tales como la heparina, ARN o péptidos acídicos aumentan la eficacia del ensamble para la formación de los FHA. (Modificado de Friedhoff *et al*, 1998).

VI. DROGAS QUE ALTERAN LA POLIMERIZACIÓN DE MICROTÚBULOS Y SU USO EXPERIMENTAL

En los últimos años se han descubierto numerosos ligandos a los monómeros de tubulina con propiedades antimitóticas y con potencial anticancerígeno. De acuerdo a los sitios de unión dentro de la tubulina, los agentes se pueden clasificar en 3 grandes grupos: 1) drogas que se unen al sitio de la colchicina, 2) al sitio de la vinblastina y 3) al sitio del Taxol. Funcionalmente esos ligandos antimitóticos pueden ser separados en dos grupos: 1) los que inhiben el ensamble de los MTs (miembros de la familia de la colchicina y vinblastina), y 2) los que promueven su ensamble y estabilización (miembros de la familia del Taxol). No obstante estas diferencias, la principal acción de esos agentes parece detener la mitosis, ya que inhiben la inestabilidad dinámica de los MTs a bajas concentraciones (Nogales, 2000).

6.1 Colchicina

La colchicina fue la primera droga conocida que se podía unir a la tubulina, de hecho la tubulina fue aislada originalmente por su habilidad de unirse a esta droga. La colchicina inhibe la formación de los MTs y en concentraciones altas, los despolimeriza. Las evidencias indican que la colchicina interactúa con ambos monómeros de tubulina, aunque algunos datos sugieren que la principal interacción es con β -tubulina (Uppuluri *et al*, 1993). Estudios de mapeo molecular apuntan que el posible sitio de unión o "binding pocket" se encuentra entre la interfase monómero-monómero dentro del dímero (Uppuluri *et al*, 1993; Downing y Nogales, 1998). La colchicina puede unirse de una manera bifásica; el primer paso es rápido pero débil, seguido de un segundo paso, el cual es lento pero fuerte (Garland, 1978). Este comportamiento indica que la colchicina induce cambios conformacionales en la tubulina. La localización del sitio de unión en la interfase entre los monómeros puede explicar el mecanismo de acción, el cual al unirse la

droga causa distorsión en la estructura del dímero lo que inhibe su polimerización (Nogales, 2000; Downing, 2000) (Fig. 7).

6.2 Vinblastina

La vinblastina fue identificada hace algunos años como otra droga que inhibe la división celular interfiriendo con la función normal del citoesqueleto. Como con la colchicina, el efecto a bajas concentraciones es detener la estabilidad dinámica mas que romper a los MTs (Wilson *et al*, 1999). Sin embargo, a altas concentraciones, la vinblastina rompe a los MTs. El sitio de unión de la vinblastina se ha caracterizado y comprende los residuos 177-215 en la β -tubulina (Rai y Wolff, 1996). Este sitio de unión se encuentra en una pequeña región en la superficie del dímero y está expuesto al extremo positivo del MT lo que hace pensar que el mecanismo de acción es que al unirse la droga a su sitio, inhibiría la elongación del protofilamento evitando de esta manera la polimerización (Fig. 7).

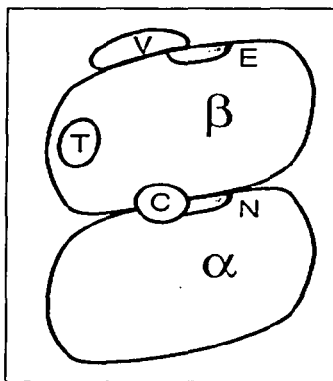


Figura 7. Esquema que representa los sitios de unión de algunas drogas al MT. El sitio de unión de la colchicina (C) se encuentra en interfase del dímero, mientras que el del Taxol (T) se encuentra en el dominio central del monómero de β tubulina. El sitio de los alcaloide vinca (V) se encuentra en el extremo positivo (*plus end*) del MT. E es el sitio intercambiable a GTP, mientras que N es el sitio de unión no intercambiable de GTP. (Modificado de Nogales, 2000)

6.3 Taxol

La historia de la droga antineoplásica paclitaxel (Taxol), empezó en 1963 con el descubrimiento de que extractos provenientes de la corteza del tejo del

pacífico *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae), mostraba actividad citotóxica y antileucémica. Pero fue hasta el año de 1971 que Wani y colaboradores anunciaron que el constituyente activo era el diterpenoide Taxol (Wani *et al*, 1971).

El Taxol es un miembro de la clase de los taxanos diterpenoides de los que en la actualidad hay mas de 300 miembros descritos. La estructura del Taxol difiere de otros compuestos conocidos por tener una cadena lateral de β -fenilisoerina esterificando la posición del C-13 y un inusual anillo de oxetano (Fig. 8). En 1978 Fuchs y Johnson reportaron que el Taxol actuaba como agente antimitótico, y en 1979 Schiff y Horwitz reportó que actuaba promoviendo un ensamble irreversible de tubulina a MTs (Schiff *et al*, 1979). Al mismo tiempo que se hacia este descubrimiento, el Taxol fue el primer compuesto conocido como promotor del ensamble de los MTs. El Taxol es una droga efectiva contra varios tipos de cáncer como por ejemplo: cáncer de mama, ovario, de vejiga, de pulmón, entre otros (Horwitz, 1992; Sackett y Fojo, 1997).

El Taxol preferentemente se une a los MTs, mas que a los dímeros de tubulina, en sitios distintos de otras drogas antimitóticas como la colchicina o la vinblastina (Sackett y Fojo, 1997). La estructura cristalográfica de la tubulina muestra un sitio de unión por heterodímero afectando la interacción entre los protofilamentos (Nogales, 1995), (Figs. 1 y 7). El efecto más visible del Taxol es la formación de paquetes o "bundles" de MTs en células durante la interfase, estos MTs se encuentran más cercanos entre sí, lo que sugiere que el Taxol interfiere con el mecanismo que regula el espaciamiento de los MTs. El mecanismo de acción del Taxol es diferente al de otras drogas antimitóticas ya que incrementa la polimerización y la estabilización de los microtúbulos y suprimiendo la inestabilidad dinámica de alargamiento o acortamiento de los microtúbulos modificando el equilibrio entre los dímeros de tubulina y el polímero a favor de este último y permitiendo un detención de la mitosis en células somáticas (Schiff y Horwitz, 1980; Jordan y Wilson, 1998).

El Taxol es una potente droga anti-neoplásica, que ejerce su actividad interfiriendo e inhibiendo la formación del huso mitótico. A diferencia de otros inhibidores mitóticos como por ejemplo, los alcaloides vinca, que despolimeriza a

los microtúbulos, el Taxol ejerce su efecto aumentando la polimerización de la tubulina, resultando así, en microtúbulos extremadamente estables y no funcionales. Una principal desventaja en el uso del Taxol en la quimioterapia es que causa neuropatía periférica. Aún cuando múltiples causas pueden explicar la neuropatía inducida por Taxol, la hipótesis más probable pudiera ser que al tener los MTs un papel importante en el proceso de transporte axonal, el tratamiento con Taxol podría interferir con el transporte y liberación de neurotransmisores y/o neuropéptidos causando neuropatía (Boer *et al*, 1995).

En los últimos años el Taxol se ha utilizado para estudiar sus efectos en el SNC. Existen reportes indicando que el Taxol altera el transporte axonal en cultivos de ganglios dorsales de embriones de pollo (Theiss y Meller, 2000) observando que dicha droga reduce dramáticamente el transporte axonal anterógrado, al igual que el transporte axonal retrógrado (Nennesmo y Reinholt, 1988). En estos estudios se observaron severas alteraciones en la morfología celular, formándose paquetes o "bundles" de MTs descritos también en otros sistemas celulares (Schiff y Horwitz, 1980) y alterando la distribución de las MAPs concentrándose principalmente en los somas neuronales (las MAPs tales como MAP2 y tau, se encuentra en dendritas y en axones respectivamente), lo cual podría ser un reflejo del daño al transporte de las MAPs por un daño primario al sistema de microtúbulos (Theiss y Meller, 2000).

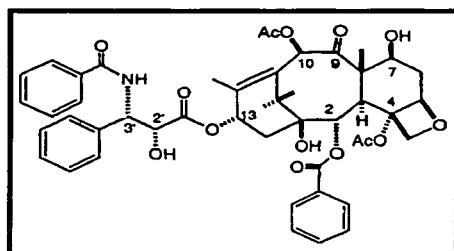


Figura 8. Estructura química del Taxol.

VII. HIPÓTESIS

La estabilización sostenida de los microtúbulos por Taxol producirá muerte neuronal y alterará el recambio y composición bioquímica de algunas de sus proteínas asociadas como MAP2 y tau.

VIII. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del Taxol sobre el recambio de las proteínas asociadas a microtúbulos MAP2 y tau y sus consecuencias en la viabilidad neuronal en el hipocampo de la rata *in vivo*.

IX. OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Por medio de microinyecciones estereotáxicas de Taxol en el hipocampo de la rata valorar el papel de la estabilización de los MTs en la muerte neuronal, realizando:

- a) un estudio dosis-respuesta.
- b) un curso temporal del establecimiento de la lesión.

2.- Estudiar las consecuencias sobre el recambio de tau y MAP2 como resultado de la estabilización de los microtúbulos *in vivo*, particularmente su contenido, redistribución y grado de fosforilación.

3.- Analizar por técnicas histológicas convencionales e inmunohistoquímica los posibles cambios, tanto en proteínas asociadas a microtúbulos como MAP2 y tau y en marcadores moleculares de glía (proteína ácida fibrilar de glía o GFAP), producidas por Taxol a diferentes tiempos y a diferentes dosis.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Preparación del fármaco. El paclitaxel (Taxol[™] Sigma-Aldrich, Chemie) se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO Sigma-Aldrich, Chemie), y posteriormente se prepararon diferentes dosis: 25, 50 y 100 nanomolas respectivamente. Estas cantidades se usaron para el estudio dosis-respuesta y observar el posible efecto neurotóxico del Taxol, mientras que para el curso temporal se utilizó la dosis más alta (100 nmolas), inyectando una sola vez y evaluando histológicamente a 3, 12, 24 h y 7 días posteriores a la inyección.

10.2 Inyecciones estereotáxicas. Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (250 g), las cuales se mantuvieron en cajas de acrílico con alimento y agua *ad libitum*, con un ciclo de luz / oscuridad 12/12. Al momento de la cirugía, los animales se anestesiaron con una mezcla de halotano 4% en 95% O₂/5% CO₂, que paulatinamente se fue reduciendo hasta llegar al 1%. La inyección se realizó siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1986), para hipocampo, en la región de CA1: anteroposterior (AP) -3.6, lateral (L) -2.0, y vertical (V) -2.5. Después se inyectó 1 µl de DMSO en ratas controles y en otro grupo de animales se inyectó 1 µl del fármaco Taxol a diferentes dosis por medio de una bomba (kdScientific USA), a una velocidad de 1 µl/min.

10.3 Evaluación histológica. Para el curso temporal, después de 3, 12, 24 h y 7 días posteriores a la inyección, las ratas fueron anestesiadas por medio de una sobre dosis de pentobarbital i.p., y perfundidas transcárdiacamente con 250 ml de solución salina (0.9%) seguido por 200 ml de una solución de paraformaldehído (4%) en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.4). Los cerebros fueron removidos y transferidos a gradientes de sacarosa (20% 24 h y 30% 48 horas), posteriormente se cortaron secciones coronales de 40 µm en un crióstato y se tiñeron con violeta de cresilo para su posterior análisis. Para el caso de la dosis respuesta, se realizó el mismo procedimiento y la perfusión se llevó a cabo a las 24 h posteriores a la inyección con todas las dosis estudiadas.

Prueba estadística:

En los cortes teñidos con violeta de cresilo de la dosis respuesta, se midió el área de lesión con un microscopio óptico acoplado a un sistema de análisis de imágenes (Macintosh NIH Image 1.6). El volumen se calculó midiendo el área de lesión, después se hizo una suma de las mediciones obtenidas y se procedió a multiplicar el número de cortes medidos por su grosor (40 μm). Después se realizó una prueba estadística de ANOVA seguida de una prueba de Fisher con el programa Statview (Statnet, Bélgica).

10.4 Inmunohistoquímica. Se realizó inmunohistoquímica para diferentes proteínas asociadas a microtúbulos y marcadores moleculares de glía. Los anticuerpos que se utilizaron son anticuerpos monoclonales para MAP-2, Tau -1 y GFAP. Cortes de 40 μm de espesor se incubaron con una solución de 0.2% H_2O_2 + 0.3% Tritón X-100-Buffer de fosfatos-salina (PBS), por 30 minutos para permeabilizar y bloquear endoperoxidas. Se dejó bloquear con 5% albúmina-PBS por 1 hora. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y después de 2 subsecuentes lavados con PBS de 5 min cada uno, se incubaron con el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón, 1:500), por 2 horas a temperatura ambiente. Después de ese tiempo se lavaron 2 veces más con PBS y se incubaron con el reactivo avidina/biotina (AB), durante 1 h. Después de 2 lavados de 5 min con PBS se reveló con diaminobenzidina (DAB).

10.5 Extracción de Tau y MAP2. Homogenados totales de hipocampo se procesaron en 100 μl de buffer PIPES (80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM MgCl_2 y 100 mM de PIPES (ácido (2-etanosulfonil)-N-N'-piperazina, pH 6.8), e inhibidores de proteasas. Se centrifugó el homogenado a 12,000 x g por 20 min, se descartó el pellet y al sobrenadante se añadió 2-mercaptoetanol y NaCl a una concentración final de 2%. Después se centrifugó 12,000 x g por 20 min, se descartó el pellet, y se mantuvo en hielo por 30 min. Posteriormente se puso a hervir la muestra por 5 min. Gracias a este procedimiento se obtuvo una fracción

termoestable rica en MAPs. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (kit para ensayo de proteína de BioRad).

10.6 Electroforésis y Western-blot. Se colocaron 5 μg de proteína obtenida de la manera indicada anteriormente en geles de poliacrilamida-SDS al 8%. Las muestras se mezclaron con buffer en condiciones de reducción con mercaptoetanol y azul de bromofenol. Después se hirvieron las muestras por 5 minutos y se cargaron en los geles. Los geles se corrieron a 25 mA en buffer de Tris-glicina-SDS, durante 1.5 horas.

Los geles fueron equilibrados con buffer de transferencia (Tris, glicina y metanol al 20%), durante 15 minutos al igual que la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la transferencia se llevó a cabo durante 1h 15 min de 200-250 mA y una vez obtenida la membrana, se dejó bloqueando con 5% albúmina-PBS por 2 h. Pasado este tiempo, se incubó con anticuerpos monoclonales de MAP2 1:500 (Chemicon Inc), Tau-1 1:500 (Boehringer Mannheim) y un anticuerpo policlonal P-tau (Ser 404) 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), en 5% albúmina-PBS por toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó 3 veces la membrana con PBS durante 5 min y después se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón o anti-cabra por 2 h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente 3 veces durante 5 min y se incubó con la mezcla AB durante 1 h a temperatura ambiente, la membrana se reveló con diaminobenzidina

XI. RESULTADOS

Efectos neurotóxicos del Taxol

La inyección de un 1 μl intrahipocampal de una dosis de 100 nmolas de Taxol indujo una serie de cambios celulares en la región CA1 del hipocampo y en la lámina dorsal del giro dentado. Estos cambios se presentaron desde las primeras 3 h y consistieron en un adelgazamiento de la capa de células piramidales de CA1 y en algunos casos de las células granulares del giro dentado, y en un cambio en la forma de las neuronas de redondeada (Fig. 9A, control) a

alargada (Fig. 9B). Estos cambios se observaron con la tinción de Nissl. 12 h posteriores a la inyección del Taxol, los cambios morfológicos neuronales progresaron y los núcleos de las células aparecieron picnóticos (Fig. 9C). 24 h después de la inyección el patrón de pérdida celular fue más evidente (Fig. 9D).

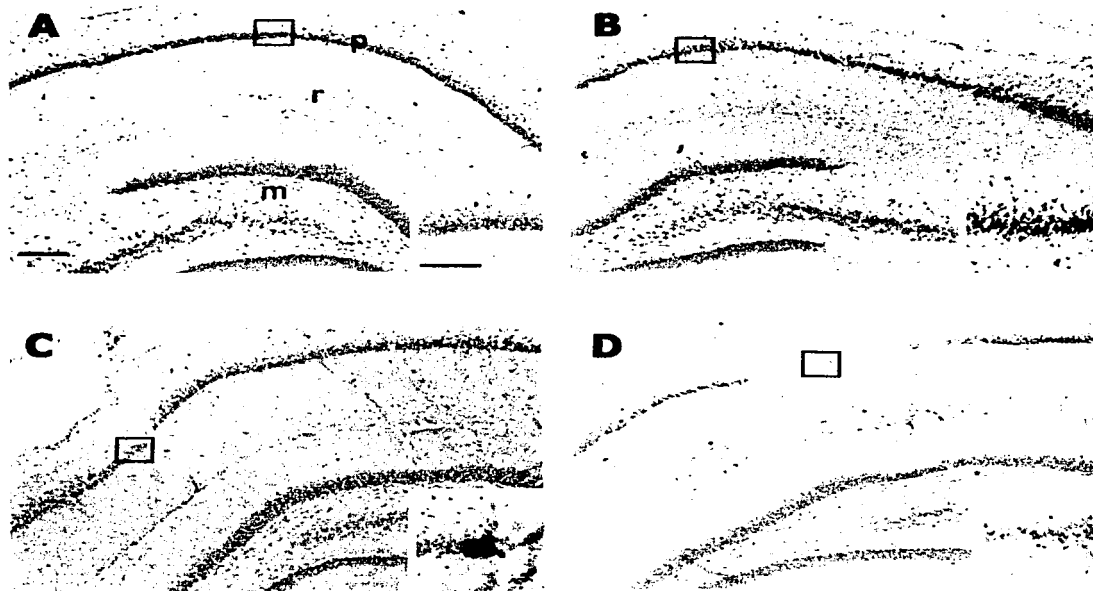


Figura 9. Curso temporal de los cambios en la morfología neuronal del hipocampo de la rata inyectado con Taxol 100 nmolas, observados con tinción de Nissl. En A se muestra un hipocampo contralateral; B, 3 h después de la inyección; C, 12 h y D, 24 h después de la inyección. Imágenes representativas de 3-7 experimentos. Los recuadros muestran la ampliación de la zona de daño. p = *stratum pyramidale*; r = *stratum radiatum*; m = *stratum lacunosum-moleculare*. Aumentos 40x (barra = 200 μ m) y 100x (barra = 100 μ m).

Como se muestra en la figuras 10 y 11, la intensidad de los efectos neurotóxicos del Taxol, 24 h después de su inyección, dependieron de la dosis empleada. Prácticamente no se observó daño con la dosis menor de 25 nmolas (Fig. 10B). 50 nmolas de Taxol produjeron un claro efecto neurotóxico que se vio

incrementado con la dosis de 100 nmolas (Fig. 10C, 10D). Los animales controles, inyectados con el vehículo (DMSO), presentaron un pequeño daño que se vio rodeando el tracto de la aguja de inyección y muy similar al producido con la dosis de 25 nmolas (Fig. 10A). Cabe destacar que aunque la dosis más alta (100 nmolas), fue la única estadísticamente significativa, se pudo observar una clara tendencia de un mayor volumen de lesión a medida que se aumenta la dosis (Fig. 11).

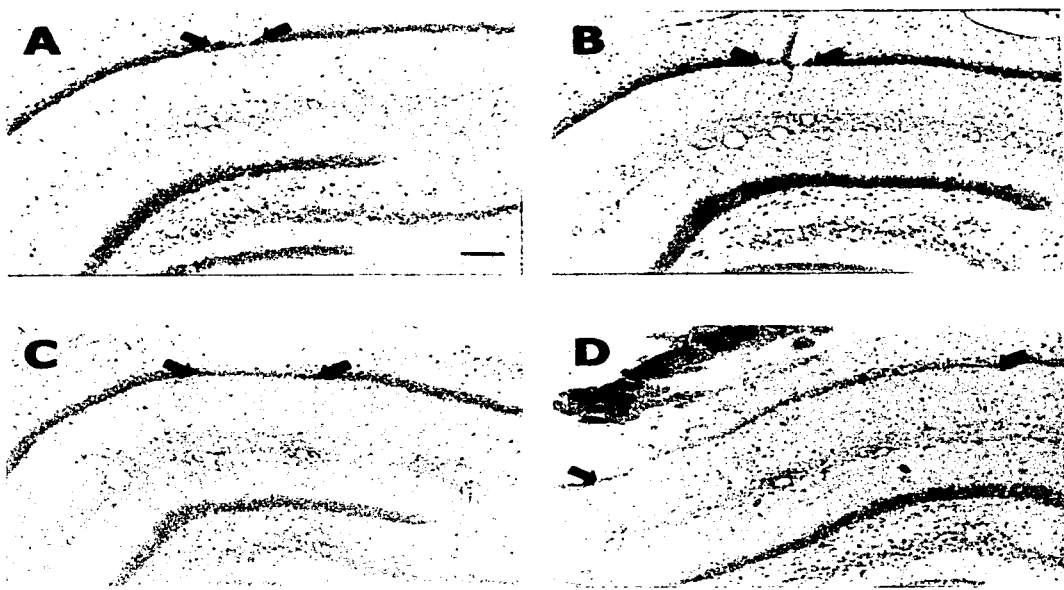


Figura 10. Dosis-respuesta de los efectos del Taxol en el hipocampo de la rata 24 h posteriores a la inyección. En A se muestra un hipocampo inyectado con vehículo (DMSO); B, 25 nmolas; C, 50 nmolas y D, 100 nmolas de Taxol. Imágenes representativas de 3-7 experimentos. Las flechas indican el comienzo y el final de la lesión. Aumento 40x (barra = 200 μ m).

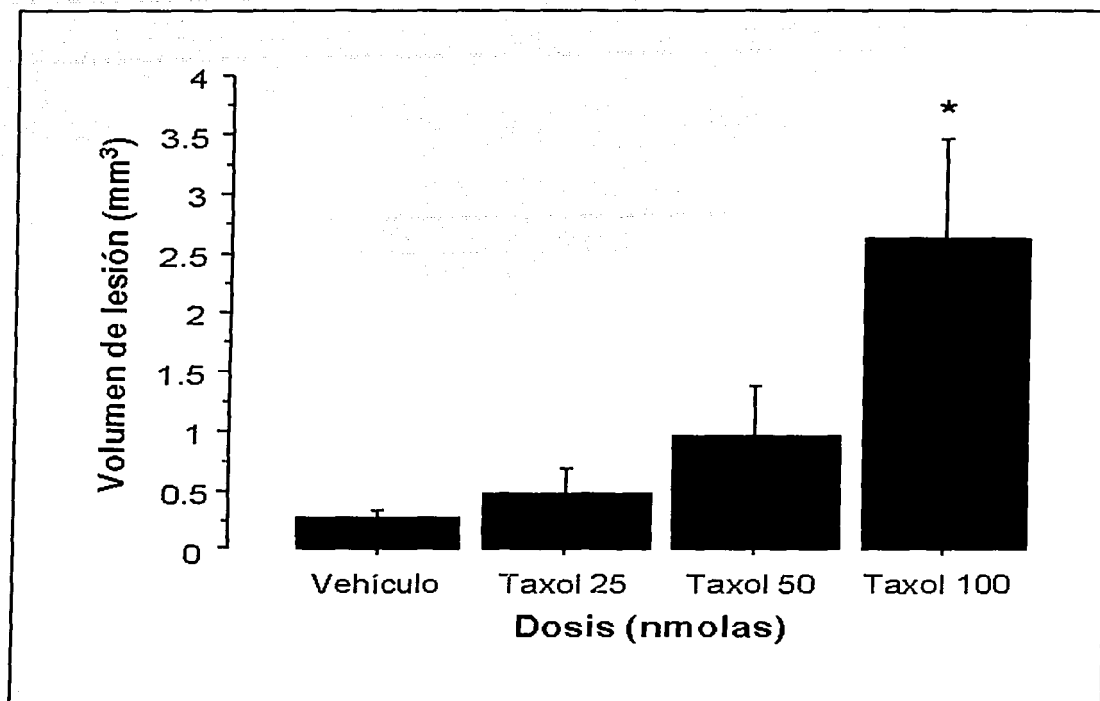


Figura 11. Gráfica que representa los efectos neurotóxicos del Taxol. Se observa una tendencia de mayor aumento en el volumen de lesión de manera dosis-dependiente. La inyección con Taxol a la dosis más alta (100 nmolas), es estadísticamente diferente en comparación con la lesión producida por el vehículo (DMSO) ($p=0.0137$), y con la dosis de 25 nmolas ($p=0.0226$), en cambio no hay diferencias significativas con la dosis de 50 nmolas ($p=0.0603$), ($P < 0.05$).

Inmunoreactividad para MAP2

El patrón de distribución de la inmunoreactividad para MAP2 ha sido descrito ampliamente por varios autores (DeCamilli *et al*, 1984; Arias *et al*, 1997) y consistente con estos reportes, observamos que se localiza principalmente en el campo de dendritas del *stratum radiatum* y está prácticamente ausente en los somas de la capa de células piramidales (Fig. 12A). Después de una dosis de 100 nmolas de Taxol se observaron cambios notables en la distribución y contenido de esta proteína. Estos cambios consistieron en una pérdida de la inmunoreactividad

en el *stratum radiatum* de CA1 a un tiempo tan temprano como 3 h después de la inyección del Taxol (datos no mostrados) y persistió a las 24 h (Fig. 12B). En todos los tiempos estudiados fue también posible observar muchas neuritas distróficas y, en algunos casos, una redistribución de MAP2 hacía los somas neuronales (Fig. 12B). El análisis por Western-blot mostrado en la figura 15, sugiere que, a pesar de la pérdida de MAP2 que se observa en la zona de inyección con Taxol, existe un ligero incremento en su contenido total.

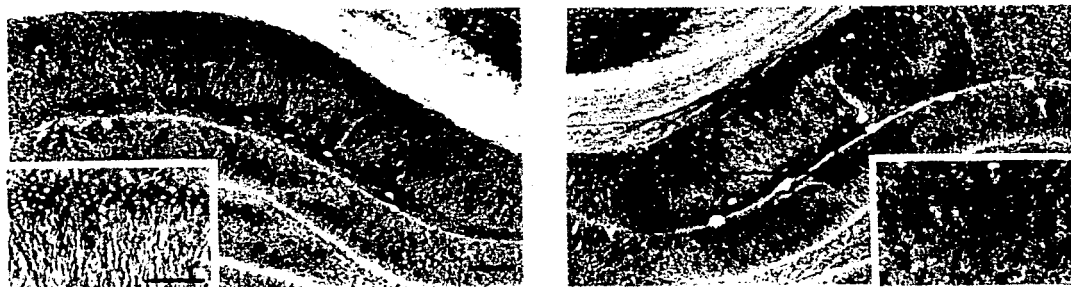


Figura 12. Análisis inmunohistoquímico de los cambios en el patrón de distribución de la proteína asociada a microtúbulos MAP2, 24 h después de la inyección intrahipocampal de 100 nmolas de Taxol. A, patrón de distribución normal de MAP2; B, cambios en el contenido y distribución de MAP2. Los recuadros muestran un aumento a 100x de los cambios observados en MAP2. Imágenes representativas de 4 experimentos. Los recuadros muestran la amplificación de la zona tomada. p = *stratum piramidale*; r = *stratum radiatum*; m = *stratum lacunosum-moleculare*. Aumentos 40x (barra = 200 μ m) y 100x (barra = 100 μ m).

Immunoreactividad para Tau

La proteína tau se encuentra localizada en axones y en el hipocampo de ratas controles el patrón de distribución de la inmunoreactividad para tau fue muy similar a los reportes de la literatura. El teñido de tau fue más evidente en el neurópilo y casi no se observó en los somas neuronales. Dentro de la capa molecular del giro dentado, la inmunoreactividad para tau fue muy intensa en las capas moleculares internas y medias y relativamente intensa en la lámina molecular externa. A través de la fisura hipocampal en CA1, el teñido para tau fue relativamente uniforme en el *stratum lacunosum-moleculare*, el *stratum radiatum* y

el *stratum oriens*. Los cuerpos neuronales en el *stratum pyramidale* se observaron rodeados de inmunotinción tau (Fig. 13A, panel izquierdo).

En los animales tratados con 100 nmolas de Taxol y 24 horas posteriores a la inyección de esta droga, la inmunoreactividad para tau, utilizando el anticuerpo Tau-1, mostró un aumento en todos los campos de la formación hipocampal (Fig. 13A, panel derecho). Después de 7 días del tratamiento con Taxol, se observó un rebrote de axones localizado en el *stratum oriens* de la región de CA3, correspondiente a la vía de fibras musgosas que conecta células granulares del giro dentado hacia CA3 (Fig. 13B, panel derecho).

El análisis por Western-blot reveló un ligero incremento de la inmunoreactividad para tau con el anticuerpo Tau-1 y un ligero incremento en los sitios de fosforilación con el anticuerpo P-tau que reconoce a la serina 404 (Fig. 15).

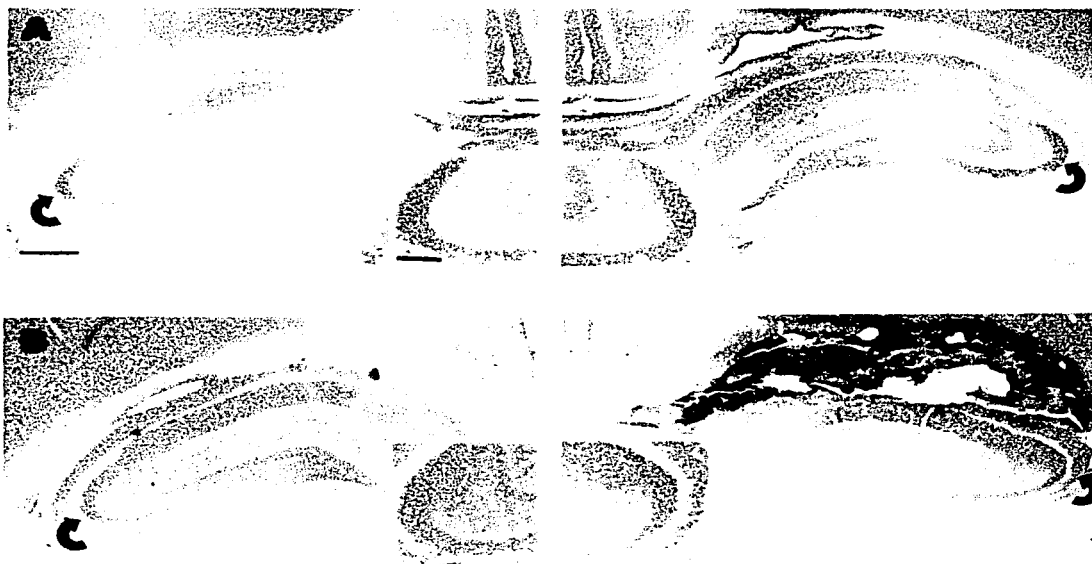


Figura 13. Análisis inmunohistoquímico de los cambios en la proteína tau 24 h (A) y 7 días (B) después de la inyección de 100 nmolas de Taxol. En los dos casos se muestra la imágenes del hipocampo inyectado (derecha) y el contralateral (izquierda), así como un aumento del *stratum oriens* de la región CA3. Imágenes representativas de 4 experimentos. Las flechas indican la zona de amplificación. Aumentos 20x (barra = 500 μ m) y 40x (barra = 200 μ m).

Immunoreactividad para GFAP

En esta parte del trabajo se exploró la respuesta glial después de una lesión inducida por Taxol. Para esto se estudió por inmunohistoquímica la distribución de un marcador de proteína glial que forma parte del citoesqueleto de los astrocitos: la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). El patrón de distribución de glía en el hipocampo de ratas controles fue muy similar al reportado por otros autores (Dugar *et al*, 1998), (Fig. 14A). 24 horas después de la inyección de 100 nmolas de Taxol se pueden visualizar algunos astrocitos reactivos rodeando el sitio de la lesión. Sin embargo, esencialmente el hallazgo más constante fue una reducción en el número de astrocitos alrededor del sitio de muerte neuronal a todos los tiempos estudiados (se muestra a las 24 horas, Fig. 14B), y una intensa acumulación astrocítica cerca del centro de la lesión neuronal hacia los 7 días de la lesión (Fig. 14D), comparada con el hipocampo contralateral (Fig. 14C).

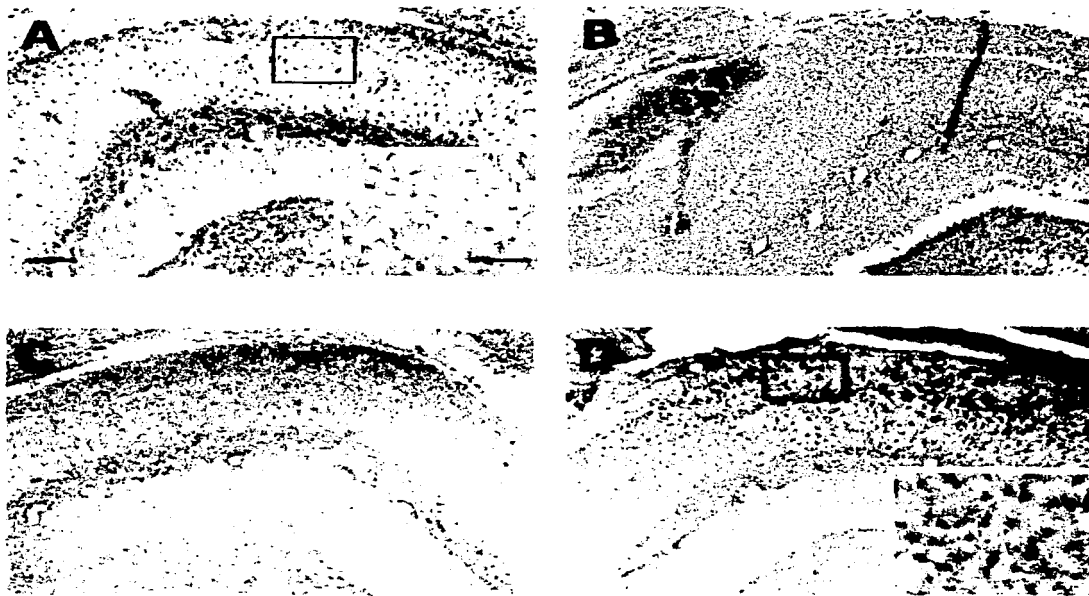


Figura 14. Análisis inmunohistoquímico de los cambios en el patrón de distribución de la glía utilizando el anticuerpo contra GFAP 24 h (A y B) y 7 días (C y D) después de la inyección de 100

nmolas de Taxol. A, distribución normal de astrocitos en el hipocampo contralateral; B, hipocampo inyectado; C, hipocampo contralateral; D, hipocampo inyectado. Imágenes representativas de 4 experimentos. Los recuadros muestran la zona de amplificación. Aumentos 40x (barra = 200 μm) y 100x (barra = 100 μm).

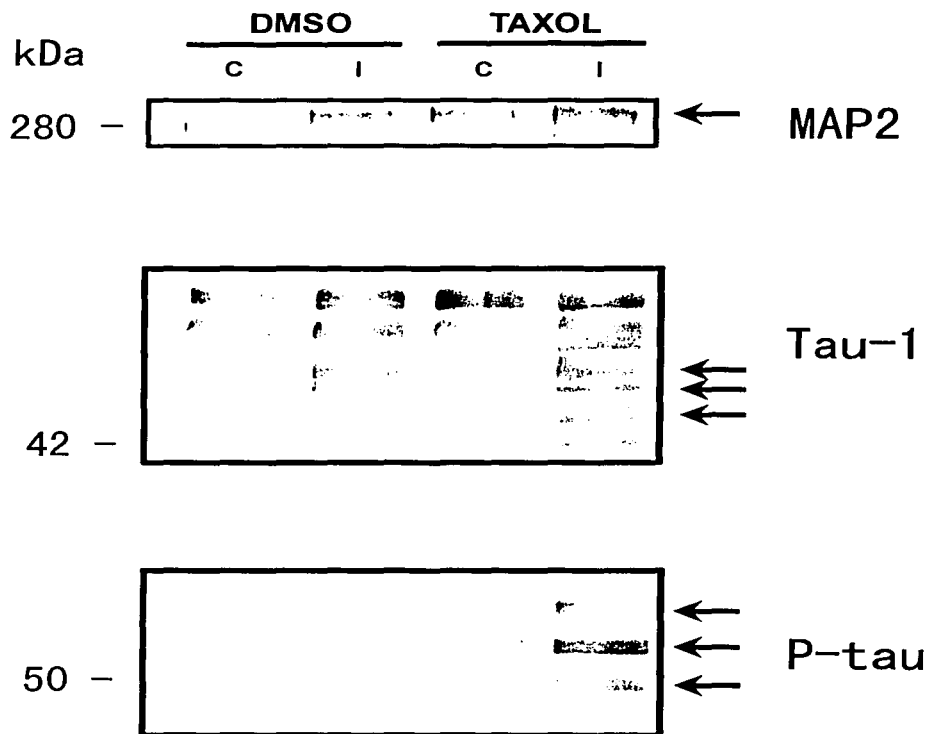


Figura 15. Análisis por Western-blot de los cambios en el contenido de las proteínas MAP2, tau y tau fosforilada. Las flechas indican los breves cambios observados en el contenido de MAP2, tau (Tau-1) y tau fosforilada (P-tau), 24 h después de la inyección de Taxol 100 nmolas, comparados con la inyección de vehículo (DMSO). C, hipocampo contralateral, I, hipocampo inyectado. Estos resultados representan 2 experimentos preliminares para cada condición.

XII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió el efecto neurotóxico del Taxol en el hipocampo de la rata adulta *in vivo*, particularmente en células piramidales de la región CA1 y sus consecuencias en los niveles y distribución de proteínas del citoesqueleto neuronal (MAP2 y tau), así como de la glía (GFAP).

El Taxol ha sido extensamente usado como una droga antimitótica y por ende antineoplásica contra un amplio tipo de tumores, ya que el efecto que produce es aumentar la polimerización de la tubulina, lo que resulta en un huso mitótico no funcional y de esta manera evita la división de células tumorales (Rowinsky y Donehover, 1995). Una principal desventaja de esta droga en la quimioterapia son los efectos tóxicos colaterales en pacientes, que consisten principalmente en una neuropatía periférica (Lipton *et al*, 1989). La causa de la neuropatía periférica después del tratamiento con Taxol puede deberse a los efectos inhibidores de este compuesto sobre el transporte y liberación de neurotransmisores y/o neuropéptidos (Boer *et al*, 1995). Sin embargo, la toxicidad del Taxol en neuronas post-mitóticas del SNC no había sido evaluada anteriormente.

Algunos reportes sugieren que el Taxol es un potente agente estabilizador de los MTs al aumentar el ensamblaje de los microtúbulos desplazando el equilibrio entre los dímeros de tubulina y el polímero, a favor de este último (Schiff y Horwitz, 1980). Recientemente se ha propuesto que el Taxol no solo ejerce su efecto como estabilizador de los MTs, si no que puede tener otros efectos en otros blancos de la propia célula. Uno de ellos, es que puede hiperfosforilar a la proteína Bcl-2. Esta proteína cuando se fosforila en ciertos residuos no puede homodimerizarse con la proteína Bax (ambas proteínas están implicadas en eventos apoptóticos), lo que resulta en un incremento de los niveles de esta proteína activando mecanismos apoptóticos al perder su función anti-apoptótica (Haldar *et al*, 1996). El Taxol se ha utilizado como modelo de inducción de apoptosis, ya que al actuar directamente en los MTs, origina una detención de la

mitosis cuya consecuencia desencadena la muerte celular apoptótica para el caso de células somáticas y en células transformadas (Jordan y Wilson, 1998).

Se ha sugerido que las alteraciones que induce el Taxol en la dinámica de los MTs es suficiente para inducir muerte neuronal independiente de sus efectos sobre el ciclo celular (Figueroa-Masot *et al*, 2001).

En el presente trabajo queda demostrado que el Taxol es un agente tóxico sobre neuronas del hipocampo de la rata adulta, lo que apoya la noción de que el daño a los MTs por sí mismo es capaz de inducir muerte en neuronas post-mitóticas *in vivo*.

El papel de las proteínas asociadas a los MTs, MAP2 y tau por su papel estabilizador de los mismos, ha sido ampliamente estudiado, en particular por su relevancia al formar parte de las marañas neurofibrilares de la EA. Existen pocas evidencias acerca de, si la dinámica de los MTs repercute en algunos aspectos del metabolismo de estas proteínas. Esta cuestión es importante por el hecho de que en la EA un blanco importante de alteraciones que puede conducir a la muerte neuronal es el citoesqueleto y en particular los MTs, lo que, a su vez, podría participar en la inducción de las alteraciones bioquímicas de la proteína tau como consecuencia de alteraciones en el estado de polimerización/despolimerización de los MTs.

En células de neuroblastoma se ha demostrado que la estabilidad de los MTs puede regular la tasa de fosforilación de la proteína tau (Xie *et al*, 1998). De acuerdo con estos resultados, en el presente trabajo se demuestra que el tratamiento con Taxol influye tanto en el contenido de MAP2, aumentándolo, como en su redistribución de las dendritas hacia somas neuronales. Por otra parte el contenido de tau se incrementó, aumentó su grado de fosforilación y además, a tiempos largos, también se redistribuyó hacia somas neuronales.

La redistribución de MAP2 se correlacionó directamente con la muerte neuronal. En este sentido se ha reportado que en condiciones de excitotoxicidad o isquemia, en modelos *in vivo* y en el hipocampo de la rata, la MAP2 es un blanco sensible a la proteólisis (Pettigrew *et al*, 1996; Arias *et al*, 1997) y además, se redistribuye de su localización normal en dendritas hacia los somas neuronales

(Arias *et al*, 1997), probablemente debido a una disrupción de la función de los MTs (Pirollet *et al*, 1992). Además de la muerte neuronal observada, la zona de CA1 afectada por Taxol presentó alteraciones muy evidentes del árbol dendrítico localizado en el *stratum oriens*. Estas alteraciones consistieron en la presencia de neuritas en forma retraída y en espiral además de presentar signos de edema. Esto habla de que una alteración en la dinámica de los MTs altera sensiblemente la morfología del árbol dendrítico.

En el caso de la proteína tau, localizada preferentemente en axones, el hallazgo principal fue un aumento en su contenido total observada con el anticuerpo Tau-1 (este reconoce un epítope no fosforilado), así como un incremento en la fosforilación en alguna de sus isoformas, observada con un anticuerpo que reconoce un epítope fosforilado con respecto al control. Cabe destacar que la fosforilación de este sitio está presente y es un sitio muy específico de fosforilación anormal de la proteína tau en pacientes con la EA.

Para el caso de la inmunohistoquímica se puede observar un incremento en la inmunoreactividad con el anticuerpo Tau-1 en el lado inyectado comparado con el contra lateral. Aunque hasta el momento no tenemos una explicación de por qué la muerte neuronal en la región de CA1 se acompaña de un incremento en el contenido de tau en diferentes regiones del hipocampo, resulta interesante que cambios en la dinámica de los MTs ejerzan un efecto que se exprese con un aumento en el contenido de tau en axones de neuronas hipocampales.

En primer instancia una explicación lógica sería que el efecto del Taxol sea interactuando en el mismo sitio de unión de las MAPs dentro del MT, evitando su interacción y produciendo así, un incremento en la inmunoreactividad y en el contenido de la proteína tau, pero gracias a los trabajos de cristalografía de difracción de rayos X para conocer la estructura tridimensional de los MTs (Nogales *et al*, 1998), se ha caracterizado que el sitio de interacción del Taxol se localiza en el dominio central de la β -tubulina, mientras que el sitio de interacción de las MAPs se encuentra en el dominio C-terminal, por lo cual podemos descartar dicha explicación.

Explicaciones alternas podrían ser: 1) que el Taxol al interactuar en su sitio dentro de la β tubulina, ejerza un cambio conformacional dentro del monómero permitiendo así el posible "despegue" de la proteína tau cuya consecuencia final es el incremento en el contenido de esta proteína; 2) que este efecto sea por activación de una proteína cinasa que esté fosforilando sitios específicos dentro de la proteína, como por ejemplo, la Ser 262 presente en el segundo dominio de unión a MTs, que, al ser blanco de fosforilación, pueda reducir la unión de tau a los MTs como se demuestra en el trabajo de Biernat *et al* (1993), y esto impida a tau interactuar con el MT derivando en el despegue de la proteína del MT y aumentando una poza libre de tau; 3) que el Taxol tenga un efecto directo activando una fosfatasa en particular PP2; y que ésta remueva grupos fosfatos en sitios específicos, decrementando así, epítopes fosforilados (Ser 202, Thr 205 que reconoce el anticuerpo AT8). En este sentido se ha reportado que en células diferenciadas derivadas de un teratocarcinoma, cuando se les agrega drogas que despolimerizan a los MTs como son la colchicina o el nocodazol (Merrick *et al*, 1996), se observa un aumento en la inmunoreactividad que reconoce el anticuerpo Tau-1 lo mismo que en células de neuroblastoma tratadas con Taxol (Xie *et al*, 1998), sin que se incremente la cantidad de tau libre; 4) por último, el Taxol puede estar afectando la expresión del gen que codifica para esta MAP aumentando así su contenido total en la célula. Lo anterior puede sustentarse en algunos estudios que demuestran que el Taxol puede estar activando genes de respuesta temprana, incluyendo factores de transcripción con actividad de supresor de tumores (Moos y Fitzpatrick, 1998).

De manera interesante la acumulación de tau en las fibras musgosas nuevas de la región de CA3 a tiempos largos (7 días), pudiera indicar que al perderse los sitios de contacto entre las neuronas de CA3 hacia CA1, existe un efecto plástico compensatorio de los axones de esta región. Los cambios inducidos por Taxol en el contenido de tau también se acompañaron de un incremento en el estado de fosforilación de tres de las isoformas de esta proteína. El anticuerpo P-tau utilizado reconoce un epítipo fosforilado localizado en la Ser-404 que a su vez, se localiza cerca del carboxilo terminal de la tau flanqueando al

último dominio de unión a MTs (de la isoforma más larga). Los resultados obtenidos podrían sugerir que la estabilización sostenida de los MTs inducida por Taxol, modifica la unión de tau a éstos y desenmascara un sitio o sitios que son susceptibles de ser fosforilados. De manera muy interesante, en los estudios por Western-blot se observó un patrón de fosforilación de tau muy parecido a las 3 isoformas hiperfosforiladas observadas en la EA, que corresponden a pesos moleculares de: 55, 64 y 69 kDa, similares a las que experimentalmente, se encontraron en este trabajo (pesos moleculares de 50, 55 y 61 kDa, respectivamente).

La proteína GFAP es una proteína asociada al citoesqueleto de células gliales y en particular pertenece a la clase de los neurofilamentos intermedios, por lo que el Taxol no tendría por qué afectar directamente su contenido o redistribución. Sin embargo, utilizada como marcador de respuesta glial ante un daño neurotóxico, su acumulación en los astrocitos reactivos cerca del sitio de lesión por Taxol, indica la formación de una cicatriz glial. En los resultados del presente trabajo, resulta interesante señalar el hecho que, a diferencia de otro tipo de daño neuronal inducido por excitotoxinas, isquemia, etc, 24 h después de la administración de Taxol, se observó una zona de despoblación glial cerca del sitio de pérdida neuronal y solo en zonas adyacentes fue posible visualizar astrocitos reactivos. Otro dato interesante es que la morfología de las células astrocíticas es muy diferente a la que se observa en tejidos normales. Por lo general, los astrocitos presentan un soma pequeño con grandes ramificaciones, pero en astrocitos de hipocampos inyectados, esta morfología cambia radicalmente, observándose un soma muy prominente y con pocas ramificaciones.

La reacción astrocítica ante un daño en el SNC involucra la movilización y mitosis de este tipo de células para formar una verdadera cicatriz celular. La zona de despoblación glial puede deberse a los bien conocidos efectos citotóxicos del Taxol en células mitóticas ya que como se ha descrito anteriormente el Taxol inhibe la formación del huso mitótico impidiendo así su división celular. Estos resultados pudieran ser interesante de ser tomados en cuenta para el tratamiento de los tumores cancerosos derivados de la glía en el sistema nervioso central.

En conclusión los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que la dinámica de los MTs es muy importante para el mantenimiento de la morfología neuronal y para su funcionamiento y que, además, repercute en el metabolismo de sus proteínas asociadas como MAP2 y tau.

CONCLUSIONES:

El Taxol produjo muerte neuronal en la capa de células piramidales de CA1 del hipocampo de manera dosis dependiente, produciendo mucho mayor extensión de la lesión con la dosis más alta inyectada (100 nmolas), seguida de la dosis de 50 nmolas que tuvo un efecto neurotóxico menor y por último la dosis de 25 nmolas, cuyo daño fue similar a los controles inyectados con el vehículo (DMSO). Además, el daño inducido por Taxol se observó a partir de las primeras 3 horas después de la inyección, a las 12 horas se observaron neuronas con presencia de núcleos picnóticos y 24 horas después de la inyección, se observó un adelgazamiento importante de la capa de células piramidales de la región de CA1 y gran cantidad de núcleos picnóticos.

Con respecto a las preparaciones inmunohistoquímicas, existen cambios en las diferentes proteínas y marcadores estudiados (MAP2, tau y GFAP), ya que hay una mayor inmunoreactividad y marcado para MAP2 y tau. En el caso de MAP2, el Taxol indujo alteraciones morfológicas del árbol dendrítico consistentes en neuritas distróficas y su redistribución hacia el soma neuronal. El contenido de la proteína tau también se alteró a expensas de un incremento en la inmunoreactividad total para el anticuerpo Tau-1, y, en el caso de las ratas de 7 días, aparición de un marcado de las fibras musgosas que no se observa a las 24 h, en el *stratum oriens* de la región CA3. Para GFAP (marcador de células gliales), se observa una clara muerte celular al igual que en el caso de las neuronas, 24 h después del tratamiento, mientras que a los 7 días posteriores el Taxol indujo una gliosis reactiva muy intensa.

Por otro lado, el Taxol produjo cambios en el contenido de la proteína Tau y MAP2 en el análisis por Western-blot, en ratas inyectadas con Taxol utilizando la

dosis más alta con respecto al vehículo. De igual forma, el tratamiento con Taxol indujo un ligero incremento en la inmunotinción con el anticuerpo P-tau que reconoce un epítipo dependiente de fosforilación en ratas inyectadas con Taxol y produjo un patrón de bandas similar al observado en tau extraída de pacientes con Enfermedad de Alzheimer.

Todo lo anterior sugiere que el uso del Taxol en neuronas maduras del SNC puede proveer un modelo de neurodegeneración para el estudio de los cambios en el metabolismo y distribución celular de las MAPs, así como también, daño a nivel de citoesqueleto y falla en el transporte axonal, lo que a su vez puede ayudar a esclarecer algunos de los eventos tempranos que conducen a la formación de los FHA en la EA.

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Aamodt EJ y Williams RC. 1984. Microtubule-associated protein connect microtubules and neurofilaments *in vitro*. *Biochemistry*. 23: 6023-6031.

Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. 1992. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry*. 31: 3585-3593.

Andreadis A, Wagner BK, Broderick JA, Kosik KS. 1996 A tau promoter region without neuronal specificity. *J. Neurochem*. 66: 2257-2263.

Amos L y Amos B. 1991. Molecules of the Cytoskeleton. Ed. Macmillan. pp 253.

Arias C, Sharma N, Davies P and Shafit-Zagardo B. 1993. Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein MAP2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J. Neurochem*. 61:673-682.

Arias C, Arrieta I, Massieu L, Tapia R. 1997. Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus *in vivo*. *Exp. Brain Res*. 116:467-476.

Arias C. 1999. Enfermedad de Alzheimer, en: Enfermedades Neurogenerativas, Mecanismos Celulares y Moleculares. FCE, México pp 133-160.

Arnal I, Metz F, DeBonis S, Wade RH. 1996. Three-dimensional structure of functional motor proteins on microtubules. *Curr. Biol.* 6:1265-1270.

Arnold CS, Johnson GV, Cole R, Dong DL, Lee M, Hart GW. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271: 28741-28744.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 42:631-639.

Ávila J y Díaz-Nido J. 1994. Regulation of microtubule dynamics by microtubule associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int.J.Dev.Biol.* 38:13-25.

Baas P, Deitch JS, Black M, and Banker GA. 1988. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurones: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* 85:8335-8339.

Barlett WP y Banker GA. 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture: Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.* 4:1944-1953.

Bear M, Connors B, Paradisio M. 2001. Neuroscience: Exploring the Brain. 2^a edición. Ed. Lippincott Williams & Wilkins USA. pp 855.

Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules:

distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*. 11:153-163.

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI, 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell. Biol.* 101:1371-1378.

Black M, y Kurdyla J.T., 1983. Microtubule-associated protein of neurons. *J. Cell. Biol.* 97:1020-1028.

Bloom GS. 1992. Motor proteins for cytoplasmic microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:66-73.

Boer HH, Moorer-van D, Müller L, Kibur B, Heimans JJ, 1995. Ultrastructural neuropathologic effects of Taxol on neurons of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Neuro-oncol.* 25:49-57.

Bohm KJ, Vater W, Steinmetzer P, Kusnetsov SA, Rodionov VI, Gelfan VI, Unger E. 1990. Effect of MAP1, MAP2 and tau proteins on structural parameters of tubulin assembles. *Acta. Histochem. Suppl.* 39:357-364.

Bokros C, Hugdahl J, Hanesworth V, Murthy J, Morejohn L. 1993. Characterization of the reversible Taxol-induced polymerization and MAP binding regulatory domains of plant tubulin. *Plant. Cell.* 5:1063-1080.

Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VMY. 1993. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*. 10:1089-1099.

Brandt R y Lee G. 1993. The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. *J. Neurochem.* 61:997-1005.

Brandt R, Leger J, Lee G. 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell. Biol.* 131: 1327-1340.

Brion JP, Smith C, Couck AM, Gallo JM, Anderton BH. 1993. Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 61:2071-2080.

Burton PR y Paige JL. 1981. Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* 78:3269-3273.

Butner KA y Kirschner MW. 1991. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.* 115:717-730.

Cáceres A, Binder LI, Payne R, Bender P, Rebhun L and Steward O. 1984. Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J. Neurosci.* 4:394-410.

Cáceres A, Banker .A, and Binder LI. 1986. Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule associated protein 2 during development of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 6:714-722.

Cáceres A, Petrebic S, Kosik KS. 1991. The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultures cerebellar macroneurons. *J. Neurosci.* 11:1515-1523.

Carlier MF, Simon C, Cassoly R, Pradel LA. 1984. Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie.* 66:305-311.

Chapin SJ y Bulinski JC. 1992. Microtubule stabilization by assembly-promoting microtubule-associated proteins: a repeat performance. *Cytoskeleton*. 23:236-243

Chau MF, Radeke MJ, de Ines C, Barasoain I, Kohlstaedt LA, Feinstein SC. 1998. The microtubule-associated protein tau cross-links to two distinct sites on each alpha and beta tubulin monomer via separate domains. *Biochemistry*. 37:17692-17703.

Chen J, Kanai Y, Cowan N.J, Hirokawa N. 1992. Projection domain of MAP2 and tau determine spacing between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 360:674-677.

Chin SS y Goldman JE. 1996. Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55:499-508.

Choo QL y Bray D. 1978. Two forms of neuronal actin. *J. Neurochem.* 31:217-224.

Chrétien D y Wade 1991. New data on the microtubule surface lattice. *Biol. Cell.* 71:161-174. Erratum: *Biol. Cell.* 72:284.

Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC. 1996. MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J. Neurochem.* 66:1273-1281.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. 1977. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* 116:227-247.

Correas I, Díaz-Nido J, Ávila J. 1992. Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J. Biol. Chem.* 267:15721-15728.

Crino PB y Eberwine J. 1996. Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron*. 17:1173-1187.

Cross D, Dominguez J, Maccioni R., Ávila J. 1991. MAP1B y MAP2 binding sites at the C-terminus of beta-tubulin. Studies with synthetic tubulin peptides. *Biochemistry*. 30:4362-4366.

Cyr JL y Brady ST. 1992. Molecular motors in axonal transport. Cellular and molecular biology of kinesin. *Mol. Neurobiol.* 6:137-155.

DeCamilli P, Miller EP, Navone F and Vallee RB. 1984. Distribution of microtubule-associated protein MAP2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neurosci.* 11:819-846.

Díaz JF, Valpuesta JM, Chacon P, Diakun G, Andreu JM. 1998. Changes in microtubule protofilament number induced by Taxol binding to an easily accessible site. Internal microtubule dynamics. *J. Biol. Chem.* 273:33803-33810.

Doll T, Meichsner M, Riederer BM, Honegger P, Matus A. 1993. An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J. Cell. Sci.* 106:633-639.

Downing KH y Nogales E. 1998. Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:785-791.

Downing KH. 2000. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16:89-111.

Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell.* 3:1141-1151.

Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1997. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*. 89:297-308.

Dugar A, Patanow C, O'Callaghan JP, Lakoski JM. 1998. Immunohistochemical localization and quantification of glial fibrillary acidic protein and synaptosomal-associated protein (mol.wt 25000) in the ageing hippocampus following administration of 5,7-dihydroxytryptamine. *Neuroscience*. 85:123-133.

Erba HP, Eddy R, Shows T, Kedes L, Gunning P. 1988. Structure, chromosome location, and expression of the human gamma-actin gene: differential evolution, location, and expression of the cytoskeletal beta and gamma-actin genes. *Mol. Cell. Biol.* 8:1775-89.

Faruki S y Karsenti E. 1994. Purification of microtubule proteins from *Xenopus* eggs extracts. Identification of a 230 kDa MAP4-like protein. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 28:108-118.

Ferralli J, Doll T, Matus A. 1994. Sequence analysis of MAP2 function in living cells. *J. Cell. Sci.* 107:3115-3125.

Fifkova E y Morales M. 1992. Actin matrix of dendritic spines, synaptic plasticity, and long-term potentiation. *Int. Rev. Cytol.* 139:267-307.

Figueroa-Masot XA, Hetman M, Higgins MJ, Kokot N, Xia Z. 2001. Taxol induces apoptosis in cortical neurons by a mechanism independent of Bcl-2 phosphorylation. *J. Neurosci.* 21:4657-4667.

Flanagan MD y Lin S. 1979. Comparative studies on the characteristic properties of two forms of brain actin separable by isoelectric focussing. *J. Neurochem.* 32:1037-1046.

- Frankfurter A, Binder LI, Payne R and Rebhun I. 1983. Immunohistochemical localization of tubulin and the high molecular weight microtubule-associated protein (MAP1 and MAP2) in the developing cerebellum. *Neurosci Abstr.* 9:851-900.
- Friedhoff P, von Bergen M, Mandelkow EM, Davies P, Mandelkow E. 1998. A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:15712-15717.
- Fuchs DA y Johnson RK. 1978. Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent from *Taxus brevifolia*, acts as a mitotic spindle poison. *Cancer. Treat. Rep.* 62:1219-1222.
- Garland DL. 1978. Kinetics and mechanism of colchicine binding to tubulin: evidence for ligand-induced conformational change. *Biochemistry.* 17:4266-4272.
- Georgieff IS, Liem RK, Couchie D, Mavilia C, Nunez J, Shelanski ML. 1993. Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous system. *J. Cell. Sci.* 105:729-735.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. 1989a. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 3:519-526.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. 1989b. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO. J.* 8:393-399.
- Goedert M y Jakes R. 1990 Expression of separates isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO. J.* 9:4225-4230.

Goedert M, Crowther RA, Garner CC. 1991 Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci.* 14:193-199.

Goedert M, Baur CP, Ahringer J, Jakes R, Hasegawa M, Spillantini M.G, Smith M.J, Hill F. 1996. PTL-1 a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell. Sci.* 2661-2672.

Goode BL y Feinstein SC. 1994. Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J. Cell. Biol.* 124:769-782.

Goode BL, Denis P, Panda D, Radeke M, Miller H, Wilson L, Feinstein S. 1997. Functional interactions between the proline-rich an repeat regions of tau enhance microtubule binding an assembly. *Mol. Biol. Cell.* 8:353-365.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4913-4917.

Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1994. Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry.* 33:9511-9522.

Haldar S, Basu A, and Croce CM.1996. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer. Res.* 56:1253-1255.

Haltiwanger RS, Kelly WG, Roquemore E.P, Bomberg MA, Dong LY, Kreppel L, Chou TY, Hart GW. 1992. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic. *Biochem. Soc. Trans.* 20:264-269.

Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. 1992. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localization of the kinase. *Neurosci. Lett.* 147:58-62.

Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima R, Hirokawa N. 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*. 364:488-491.

Hart GW, Kreppel LK, Comer FI, Arnold CS, Snow DM, Ye Z, Cheng X, DellaManna D, Caine DS, Earles BJ, Akimoto Y, Cole RN, Hayes BK. 1996. O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology* 6: 711-716.

Harris KA, Oyler GA, Doolittle GM, Vincent I, and Billingsley ML. 1993. Okadaic acid induces hyperphosphorylated forms of tau protein in human brain slices. *Ann. Neurol.* 33:77-87.

Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara K. 1992. Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 267:17047-17054.

Heidemann SR, Landers JM, and Hamborg MA. 1981. Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell. Biol.* 91:661-665.

Hernández MA, Ávila J, Andreu JM. 1986. Physicochemical characterization of the heat-stable microtubule-associated protein MAP2. *Eur. J. Biochem.* 154:41-48.

Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW Jr. 1989. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 9:1381-1388.

Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. 1988. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding of microtubules. *J. Cell. Biol.* 107: 1449-1459.

Hirokawa N. 1993. Neuronal Cytoskeleton. Ed. CRC Press. USA. pp590.

Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Harada R, Kanai Y. 1996. Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J. Cell. Biol.* 132: 667-679.

Hirokawa N, Noda Y, Okada Y. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:60-73.

Holt GD, Haltiwanger RS, Torres CR, Hart GW. 1987. Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. *J. Biol. Chem.* 262: 14847-14850.

Horwitz SB, 1992. Mechanism of action of Taxol. *TIPS* 13:134-136.

Huber G y Matus A. 1984. Differences in the cellular distribution of two microtubule-associated protein, MAP1 and MAP2: in rat brain. *J. Neurosci.* 4:151-160.

Hyams JS y Lloyd CW.eds.1994. Microtubules. New York. Wiley-Liss. 439pp.

Ingebritsen T.S y Cohen P. 1983. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science.* 221:331-338.

Jakes R, Novak M, Davison M, Wischik CM. 1991. Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO. J.* 10:2725-2729.

Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P. 1999. cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 19:7486-7494.

Johnson GV. 1992. Differential phosphorylation of tau by AMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. *J. Neurochem.* 59:2056-2062.

Jordan MA y Wilson L. 1998. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:123-130.

Julien JP. 1999. Neurofilament functions in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9:554-560.

Kaech S, Ludin B, Matus A. 1996. Cytoskeletal plasticity in cells expressing neuronal microtubule-associated proteins. *Neuron.* 17:1189-1199.

Kalcheva N, Albala J, O'Guin K, Rubino H, Garner C, Shafit-Zagardo B. 1995. Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP2) and characterization of additional MAP2 isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10894-10898.

Kalcheva N, Weidenheim K.M, Kress Y, Shafit-Zagardo B. 1997. Expression of microtubule-associated protein 2a and other novel microtubule-associated protein 2 transcripts in human fetal spinal cord. *J. Neurochem.* 68:383-391.

Kalcheva N, Rockwood J.M, Kress Y, Steiner A, Shafit-Zagardo B. 1998. Molecular and functional characteristics of MAP2a: ability of MAP2a versus MAP2b to induce stable microtubules. In COS cells. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 40:272-285.

Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1996. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS. Lett.* 399:344-349.

Kindler S, Muller R, Chung W.J, Garner CC. 1996. Molecular characterization of dendritically localized transcripts encoding MAP2. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 36: 63-69.

Kleiman R, Banker G, Steward O, 1994. Development of subcellular mRNA compartmentation in hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 14: 1130-1140.

Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 1993. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 268:24374-24384.

Kosik KS y Finch EA. 1987. MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: a immunocytochemical study. *J. Neurosci.* 7:3142-3153.

Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron.* 2:1389-1397.

Kosik KS y Cáceres A. 1991. Tau protein and the establishment of an axonal morphology. *J. Cell. Sci. Suppl.* 15:69-74.

Kowalski RJ, y Williams RJ. 1993. Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *J. Biol. Chem.* 268:9847-9855.

Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH. 1992. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain. Res.* 597:209-219.

Lee G, Cowan N, Kirschner M, 1988. The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science.* 239:285-288.

Lee G, Neve RL, Kosik KS, 1989. The microtubule binding domain of tau protein *Neuron* 2:1615-1624.

Lewis SA, Wang DH, Cowan NJ. 1988. Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science.* 242:936-939.

Liao H, Li Y, Brautigam DL, Gundersen GG. 1998. Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *J. Biol. Chem.* 273:21901-21908.

Lipton RB, Apfel MC, Dutcher JP, Rosenber R, Kaplan J, Berger A, Einzig AI, Wiernik P, Schaumburg HH. 1989. Taxol produces a predominantly sensory neuropathy. *Neurology.* 39:368-373.

Liu WK, Xia J, Ma D, Faber DS, Fischer I. 1997. Tau-like proteins in the nervous system of gold fish. *Neurochem. Res.* 22: 1511-1516.

Lovestone S y Reynolds CH. 1997. The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience.* 78: 309-324.

Mann SS y Hammarback JA, 1994. Molecular characterization of light chain-3, a microtubule-binding subunit of MAP1A y MAP1B. *J. Biol. Chem.* 269:11492-11497

Matus A, Bernhardt R and Hugh-Jones T. 1981. High molecular weight microtubule-associated proteins are preferentially associated with dendritic microtubules in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:3010-3014.

Matus A. 1988. Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu. Rev. Neurosci.* 11:29-44.

Matus A. 1994. Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends. Neurosci.* 17: 19-22.

Mawal-Dewan M, Henley J, Van de Voorde A, Trojanowsky JQ, Lee VMY. 1994. The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 269:30981-30987.

Merrick SE, Demoise DC, Lee VM. 1996. Site-specific dephosphorylation of tau protein at Ser202/Thr205 in response to microtubule depolymerization in cultured human neurons involves protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 271:5589-5594.

Miller P, Walter V, Therkauf WE, Vallee R.B and DeCamilli P. 1982. Frozen tissue sections as an experimental system to reveal specific binding sites for the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein Kinase in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:5562-5566.

Moos PJ y Fitzpatrick FA. 1998. Taxanes propagate apoptosis via two cell populations with distinctive cytological and molecular traits. *Cell. Growth. Differ.* 9:687-97.

Mori H, Kondo J, Ihara Y. 1987. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science.* 235:1641-1644.

Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y, 1995. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.* 270: 823-829.

Moritz M, Braunfeld MB, Sedat JW, Alberts B, Agard DA.1995. Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature.* 378:638-640.

Nelson PT, Stefansson K, Gulcher J, Saper CB. 1996. Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem.* 97:1622-1632.

Nennesmo I y Reinholt FP.1988. Effects of intraneural injection of Taxol on retrograde axonal transport and morphology of corresponding nerve cell bodies. *Virchows Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 55:241-246.

Neve R. L, Harris P, Kosik KS, Kurnit D.M, Donlon T.A. 1986. Identification of cDNA clones for human microtubule-associated protein tau and chromosomal

localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain. Res.* 387:271-280.

Nogales E, Wolf SG, Downing KH. 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* 391:199-203.

Nogales E, 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.* 69:277-302.

Oegema K, Wiese C, Martin OC, Milligan RA, Iwamatsu A, Mitchison TJ, Zheng Y. 1999. Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J. Cell. Biol.* 144:721-733.

Okabe S y Hirokawa N. 1989. Rapid turnover of microtubule-associated protein MAP2 in the axon revealed by microinjection of biotinylated MAP2 into cultured neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4127-4137.

Okabe S, Miyasaki H, Hirokawa N. 1993. Dynamics of neuronal intermediate filaments. *J. Cell. Biol.* 121:375-386.

Olmsted JB. 1986. Microtubule-associated proteins. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2:421-457.

Panda D, Goode BL, Feinstein SC, Wilson L, 1995. Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule binding domains of tau. *Biochemistry.* 34:11117-11127.

Papasozamenos S, Binder LI, Bender P.K, and Payne R. 1985. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) within axons of spinal motor neurons: associations with microtubules and neurofilaments in normal and beta, beta'-iminodipropionitile-treated axons. *J. Cell. Biol.* 100:74-85.

Paxinos G y Watson C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Sidney.

Pedrotti B e Islam K. 1997. Estramustine phosphate but not estramustine inhibits the interaction of microtubule-associated protein 2 (MAP2) with actin filaments. *FEBS. Lett.* 403:123-126.

Pei Q, Burnet PJW, Zetterstrom TSC. 1998. Changes in mRNA abundance of microtubule-associated proteins in the rat brain following electroconvulsive shock. *Neuroreport.* 9:391-394.

Pérez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E, Ávila J. 1996. Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J. Neurochem.* 67:1183-1190.

Pettigrew LC, Holtz ML, Craddock SD, Minger SL, Hall N, Geddes JW. 1996. Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 16:1189-202.

Pirollet F, Derancourt J, Haiech J, Job D, Margolis RL. 1992. Ca^{2+} -calmodulin regulated effectors of microtubule stability in bovine brain. *Biochemistry.* 31:8849-55.

Pryer NK, Walker RA, Skeen VP, Bourns BD, Soboeiro MF, Salmon ED. 1992. Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamics instability *in vitro*. Real time observations using video microscopy. *J. Cell. Sci.* 103:965-973.

Rai SS y Wolff J. 1996. Localization of the vinblastine-binding site on beta-tubulin. *J. Biol. Chem.* 271:14707-14711.

Ranganathan S, Benetatos CA, Colarusso PJ, Dexter DW, Hudes GR. 1998. Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br. J. Cancer.* 77:562-566.

Rendon A, Jung D, Jancsik V. 1990. Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochem. J.* 269: 555-601.

Roder HM, Fracasso RP, Hoffman FJ, Witowsky JA, Davis G, Pellegrino CB, 1997. Phosphorylation-dependent monoclonal Tau antibodies do not reliably report phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase 2 at specific sites. *J. Biol. Chem.* 272:4509-4515.

Rossmann MG, Moras D, Olsen KW. 1974. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature.* 250:194-199.

Rowinsky EK y Donehover RC. 1995. Paclitaxel (Taxol). *N. Engl. J. Med.* 32:1004-1014.

Sackett D y Fojo T. 1997. Taxanes. *Cancer. Chemother. Biol. Response. Modif.* 17:59-79.

Sadot E, Heicklen-Klein A, Barg J, Lazarovici P, Ginzburg I, 1996. Identification of a tau promoter region mediating tissue-specific-regulated expression in PC12 cells. *J. Mol. Biol.* 256: 805-812.

Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Kishimoto T, Hisanada S. 1995. *In situ* dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons *FEBS. Lett.* 376:238-242.

Sánchez C, Díaz-Nido J, Ávila J. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.* 61:133-168.

Sawa A, Oyama F, Matsushita M, Ihara Y, 1994. Molecular diversity at the carboxyl terminus of human and rat tau. *Mol. Brain. Res.* 27:111-117.

Selden SC y Pollard TD. 1983. Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Cell.* 258:7064-7071.

Serrano L. Ávila J, Maccioni RB. 1984. Controlled proteolysis of tubulin by subtilisin: localization of the site for MAP2 interaction. *Biochemistry.* 23:4675-4681.

Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ. 1995. Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J. Biol. Chem.* 270:18917-18922.

Shafit-Zagardo B y Kalcheva N. 1998. Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. *Mol. Neurobiol.* 16:149-162.

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. 1979 . Promotion of microtubule assembly *in vitro* by Taxol. *Nature.* 277:665-667.

Šchiff, PB y Horwitz SB. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 77:1561-1565.

Schwarz PM, Liggins JR, Ludueña RF. 1998. Beta-tubulin isotypes purified from bovine brain have different relative stabilities. *Biochemistry.* 37:4687-4692.

Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E. 1995. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the *in vitro* assembly of paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8463-8467.

Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL, Mumby MC, Bloom GS, 1999. Molecular interactions among protein

phosphatase 2A, Tau and Microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and development of taupathies. *J. Biol. Chem.* 274: 25490-25498.

Steward O y Wallace CS. 1995. mRNA distribution within dendrites: relationship to afferent innervation. *J. Neurobiol.* 26:447-449.

St George-Hyslop PH. 2000. Piecing Together Alzheimer's. *Sci Am.* 283:76-83

Theiss C y Meller K. 2000. Taxol impairs anterograde axonal transport of microinjected horseradish peroxidase in dorsal root ganglia neurons *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 299:213-224.

Tokuraku K, Katsuki M, Nakagawa H, Kotani S. 1999. A new model for microtubule-associated protein (MAP)-induced microtubule assembly: the Pro-rich region of Map4 promotes nucleation of microtubule assembly *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 259:158-166.

Trojanowski JQ y Lee VM. 1995. Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB. J.* 9:1570-1576.

Tucker RP, Garner CC, Matus A. 1989. *In situ* localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron.* 2:1245-1256.

Tucker C y Goldstein LS. 1997. Probing the kinesin-microtubule interaction. *J. Biol. Chem.* 272:9481-9488.

Uppuluri S, Knipling L, Sackett DL, Wolff J. 1993. Localization of the colchicine-binding site of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:11598-11602.

Valdivia MM, Ávila J, Coll J, Colaco C, Sandoval IV. 1982. Quantitation and characterization of the microtubule associated MAP2 in porcine tissues and its

isolation from porcine (PK15) and human (HeLa) cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105:1241-1249.

Vallee RB. 1982. A Taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins. *J. Cell. Biol.* 92:435-442.

Vandekerckhove J y Weber K. 1984. Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J. Mol. Biol.* 179:391-413.

Vulliet R, Halloran SM, Braun RK, Smith AJ, Lee G. 1992. Proline-directed phosphorylation of human Tau protein. *J. Biol. Chem.* 267:22570-22574.

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93:2325-2327.

Wille H, Drewes G, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1992. Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau *in vitro*. *J. Cell. Biol.* 118:573-584.

Wilhelm J.E, Vale R.D. 1993. RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J. Cell. Biol.* 123:269-274.

Wilson L, Panda D, Jordan MA. 1999. Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell. Struc. Funct.* 24:329-335.

Xie H, Litersky JM, Hartigan JA, Jope RS, Johnson GV. 1998. The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain. Res.* 798:173-183.

Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*. 378:578-583.

Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC. 1999. *Fundamentals of Neuroscience*. Ed. Academic Press. New York USA. pp 454.