



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA
PROTEÍNA TAU EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE
LA RATA DURANTE LA GESTACIÓN Y EL INICIO DE LA
LACTANCIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA GABRIELA PIÑA MEDINA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Marco Antonio Cerbón Cervantes

VOCAL: Ignacio Camacho Arroyo

SECRETARIO: Lidya Sumiko Morimoto Martínez

1er. SUPLENTE: Aliesha Araceli González Arenas

2° SUPLENTE: Olivia Tania Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 107, Edificio F, Facultad de Química, UNAM

Edificio F, Facultad de Química, Av. Universidad no. 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Distrito Federal 04510.

Asesor del tema:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Supervisor técnico:

Aliesha Araceli González Arenas

SUSTENTANTE:

Ana Gabriela Piña Medina

Agradecimientos

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN201908, DGAPA, UNAM México.

Una de las preguntas del millón... ¿Qué vas a ser cuando seas grande?... en medio de muchas dudas e incertidumbre decides, poniendo las esperanzas en lo que será tu futuro profesional y emprendes el gran camino...

Esta tesis, que representa uno de los grandes pilares en mi formación profesional se la dedico con todo mi corazón a mis padres Gabriel y Elena, quienes me enseñaron que con esfuerzo, dedicación y confianza se logran las metas y que siempre hay más de un camino para alcanzar los sueños, GRACIAS por todo su apoyo y por su gran esfuerzo por darme todo lo necesario.

A Alan, el mejor hermano que podría tener, gracias por regalarme tantos divertidos momentos, por todo el apoyo y buenos deseos.

A mi novio Mauricio, por su infinito apoyo, amor y paciencia, gracias por compartir esta gran aventura a mi lado, TE AMO.

Al resto de mi familia por mantenerse siempre al pendiente de mis pasos.

Gran parte de mi tiempo la compartí con un grupo de personas que día a día se ganaron mi corazón, La Banda 17, gracias a todos por los tantos magníficos momentos que me llevo para toda la vida, y dentro de ellos agradezco especialmente a Ximena y Thaly mis grandes amigas, a Diego, Lencho, Napo, El Gran Batasman, Andrés, Woody, Tarzán y Thalís Tween.

Mucho de esto no hubiera sido posible sin el gran apoyo de mi tutor, el Dr. Ignacio Camacho Arroyo y de la Dra. Aliesha González Arenas, gracias por todo el conocimiento y las grandes oportunidades que me han ofrecido, sin duda gracias a ustedes he encaminado mi futuro profesional en el maravilloso mundo de las neurociencias.

Gracias a todos mis compañeros en el laboratorio 107 Vale, Lilo, Grace, Tania, Tania Petite, Alejandro, Mike, grandes amigos con los que he compartido nuevas y enriquecedoras experiencias, al igual que divertidos y confortables momentos.

“El conocimiento es el resultado de jugar con lo que sabemos, es decir, con nuestros hechos. Una persona con conocimientos en ciencia no es como a veces creemos, una persona que acumula hechos, sino alguien que tiene la capacidad de jugar con lo que sabe, liberando su fantasía, cambiando un mundo de apariencias por un mundo de interés científico”

D.V. MacKinnon

D Nature of Creative

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
a. Características generales de la gestación	3
b. El Sistema Nervioso Central durante la gestación	8
i. El hipotálamo	11
ii. El área preóptica	11
iii. El hipocampo	12
iv. La corteza frontal	13
v. El cerebelo	14
c. Características del citoesqueleto	14
d. Proteína Tau	18
i. Fosforilación de la Proteína Tau	20
ii. Papel del estradiol y de la progesterona en la regulación de la expresión de Tau	22
4. Planteamiento del problema	23
5. Hipótesis	24
6. Objetivos	24
7. Metodología	24
a. Animales de experimentación	24
b. Extracción y cuantificación de proteínas	25

c. Western blot	25
d. Análisis densitométrico y estadístico	27
8. Resultados	28
9. Discusión	32
10. Conclusiones	38
11. Referencias	39

Abreviaturas

ACTH	Adrenocorticotropina
APO	Área preóptica
ATP	Trifosfato de adenosina
AVP	Arginina-vasopresina
CA (1,3)	Áreas Cornu Ammonis
Cdk5	Cinasa dependiente de ciclina
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
E2	Estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FI	Filamentos intermedios
GDP	Difosfato de guanosina
GSK3 β	Cinasa 3 β de la glicógeno sintetasa
GTP	Trifosfato de guanosina
HHA	Hipotálamo-hipófisis adrenal
MAP	Proteína asociada a microtúbulos
mPFC	Corteza prefrontal media
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
NF	Neurofilamentos
NFTs	Marañas neurofibrilares
P4	Progesterona
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RP	Receptor a progesterona
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
TBS	Tris buffer salino
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

Resumen

Variaciones importantes en las concentraciones hormonales de progesterona (P4) y estradiol (E2) que ocurren durante el embarazo, el parto y la lactancia pueden remodelar el cerebro femenino, modificando la forma de las neuronas en algunas regiones cerebrales y produciendo cambios estructurales. En roedores, algunas de estas regiones como el área preóptica (APO), la corteza frontal y el cerebelo están involucradas en la regulación de conductas maternas como son: la construcción del nido, el aseo de sus crías y la protección ante los depredadores. Sin embargo, otras regiones que se ven afectadas por el embarazo son las involucradas en el control de la memoria, el aprendizaje y de la respuesta al estrés como el hipocampo y el hipotálamo. Además de motivar a las hembras hacia el cuidado de sus crías, los cambios cerebrales inducidos por las hormonas pueden mejorar las habilidades de las madres en la búsqueda de alimento, dando a sus crías una mayor probabilidad de supervivencia. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos involucrados en estos procesos de plasticidad neuronal.

Estudios previos han demostrado que el E2 y la P4 son capaces de modificar el contenido de la proteína Tau y su estado de fosforilación, sin embargo no existe ningún trabajo en el que se haya caracterizado la expresión de la proteína Tau durante la gestación. La proteína Tau fosforilada, también conocida como FosfoTau participa en el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos, los cuales contribuyen al mantenimiento de la forma celular y sirven como vía de transporte de moléculas a través de los axones.

En este estudio se determinó el patrón de expresión de Tau y FosfoTau a los 2, 14, 18 y 21 días de la gestación y al día 2 de la lactancia en el Sistema Nervioso Central (SNC) de la rata por la técnica de Western blot. Los resultados obtenidos muestran que existen cambios en el contenido de Tau y FosfoTau durante el em-

barazo y la lactancia. En el hipotálamo y en el hipocampo aumenta el contenido de Tau y su fosforilación, mientras que en APO disminuyen al día 21 de la gestación. En la corteza también aumenta el contenido de Tau más no de FosfoTau y en el cerebelo disminuye el contenido de Tau, pero aumenta su fosforilación. Estos resultados sugieren que el patrón de expresión de la proteína Tau y su fosforilación varían durante la gestación y lactancia de manera tejido-específica en el SNC de la rata.

Introducción

El Sistema Nervioso Central (SNC) sufre muchos cambios a través del desarrollo de un organismo, estos cambios son necesarios para una adecuada modulación de señales, establecimientos de conductas e interacciones con el medio. El estradiol (E2) y la progesterona (P4) regulan una gran variedad de funciones como la diferenciación sexual en el cerebro, la ovulación, la conducta sexual, el ciclo de sueño-vigilia, el estado de ánimo, el aprendizaje, la memoria y la neuroprotección.

La plasticidad neuronal es una adaptación estructural de las neuronas para sus necesidades funcionales y requiere formas dinámicas del citoesqueleto cuyos componentes determinan la morfología neuronal, proporcionan un marco estructural para la función de las neuronas y son blanco de numerosas señales extracelulares.

El patrón de expresión de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) se ha correlacionado con cambios ultraestructurales inducidos por E2 y P4 en diferentes áreas del cerebro bajo diferentes edades y condiciones hormonales. En neuronas del hipotálamo medio basal mantenidas 4 días en cultivo, el E2 aumenta los niveles de la isoforma de la proteína Tau de 58 KDa, más no así de tubulina. Tau es un tipo de MAP que se expresa principalmente en axones donde promueve el ensamble de los microtúbulos, entre las modificaciones postraduccionales que presenta la proteína Tau se encuentra la fosforilación. La fosforilación de Tau es importante ya que en estado hiperfosforilado, promueve la formación de

filamentos helicoidales apareados que forman las marañas neurofibrilares características de la enfermedad de Alzheimer las cuales también han sido descritas en pacientes con síndrome de Down y en pacientes con la enfermedad de Parkinson que presentan demencia.

Se han reportado cambios morfológicos y funcionales en el cerebro de animales gestantes, observándose que existen modificaciones en la memoria espacial durante el embarazo en ratas, siendo esta mejor al principio y a la mitad del embarazo que al final de este periodo. De manera interesante, ratas preñadas presentan un mejor desempeño en tareas de memoria espacial en comparación con los animales no gestantes, pero no se conocen aun los mecanismos por los cuales se llevan a cabo estos procesos.

Antecedentes

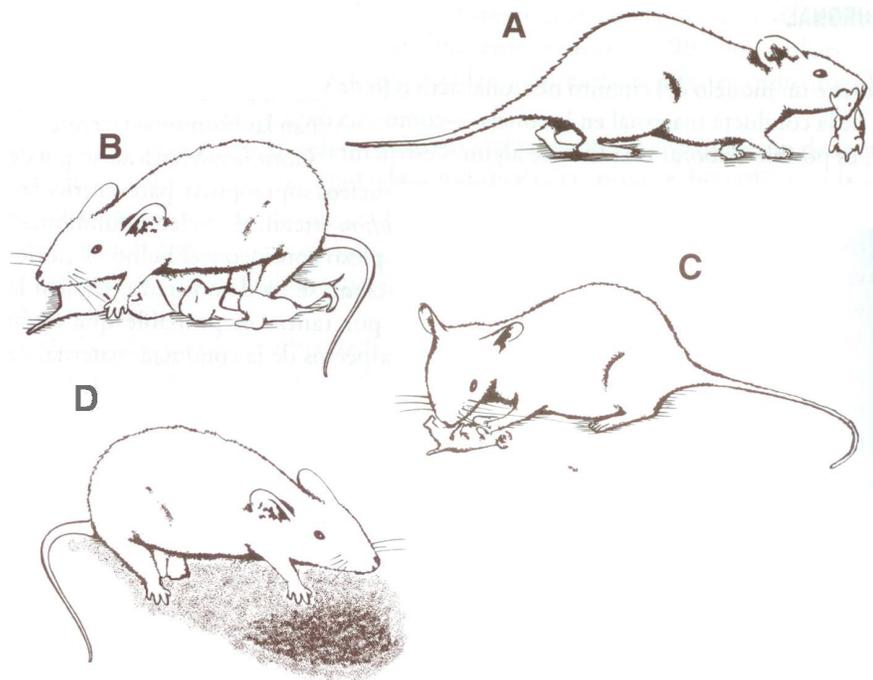
a. Características generales de la gestación

La gestación es una etapa que comprende desde la fecundación del óvulo hasta el momento del parto, Metcalfe y colaboradores la consideran como una serie de procesos integrados, resultando en el exitoso desarrollo y parto de uno o más miembros de la misma especie. Durante la gestación ocurren cambios fisiológicos y conductuales muy importantes para el éxito del producto. En los mamíferos, las crías son incapaces de tener una vida independiente al nacimiento; así los compromisos de la reproducción continúan después del parto involucrando la lactancia y el comportamiento maternal (Metcalfe, 1988).

En la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*) la gestación tiene una duración de 21- 22 días, y en el transcurso de ésta, se presentan diferentes tipos de conductas que han sido ampliamente estudiadas por el grupo de Rosenblatt (Rosenblatt, 1980; Rosenblatt *et al.*, 1988) entre otros. En la actualidad se consideran 4 principales comportamientos característicos de la conducta

maternal: el acarreamiento de las crías (cuando la madre mueve de lugar a las crías, con los incisivos generalmente, para devolver las crías al nido y no pierdan calor corporal), la construcción del nido (la madre busca el lugar apropiado y escarba generando un hueco en el cual estarán las crías), el lamido ano-genital (la madre estimula la zona ventro-genital de las crías para que éstas puedan orinar y no mueran por intoxicación, se observa durante las 2 primeras semanas post-parto) y el amamantamiento de las crías (se refiere a la postura encorvada que adquiere la madre cuando amamanta a las crías) (Numan & Stolzenberg, 2009) (Fig. 1).

Figura 1. Representación de las 4 principales características de la conducta maternal: A) el acarreamiento, B) el amamantamiento, C) el lamido ano-genital, D) la construcción del nido (modificado de Martínez-Gómez, 2002).



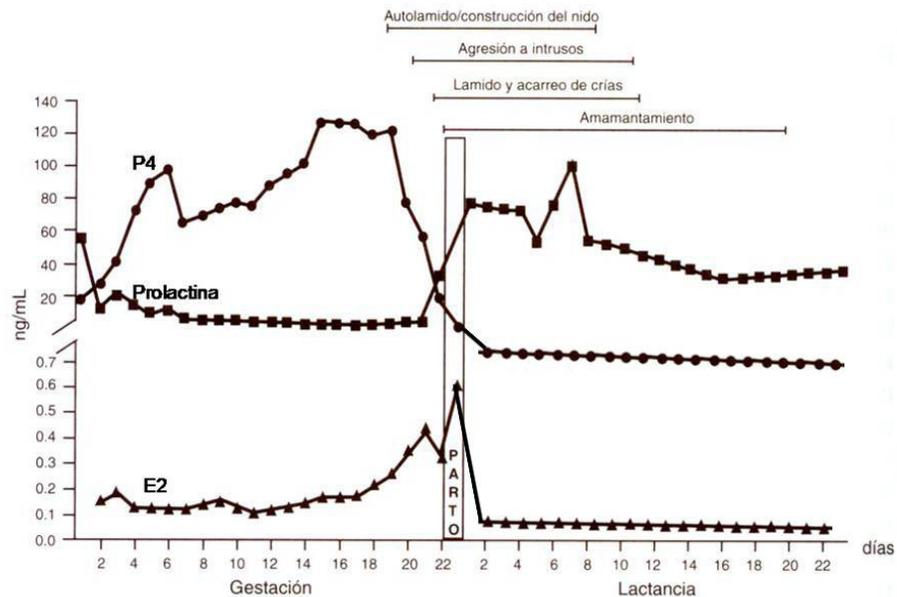
La exhibición recíproca de las respuestas hacia la madre, la estimulación de las glándulas mamarias, la emisión de sonidos y olores, y todo el conjunto de cambios fisiológicos y conductuales promueven la resistencia inmunológica, la maduración física, y el desarrollo emocional y social de las ratas jóvenes (Fleming *et al.*, 1999).

Además de los comportamientos antes mencionados, durante la gestación se presenta una conducta de agresividad ante los intrusos que se incrementa desde el día 16 hasta el día 19 y

que tiene un máximo justo antes del parto cuando inician las contracciones del útero (Matthews-Felton *et al.*, 1995).

Existen una gran cantidad de cambios fisiológicos que ocurren en la gestación, como el incremento de sales retenidas en el riñón, el aumento en el volumen plasmático, en la cantidad de eritrocitos, en el ritmo cardiaco, en el gasto calórico, la disminución del volumen máximo de inspiración, y una gran actividad del sistema neuroendócrino (Hodgen, 1988; Metcalfe, 1988; Risberg *et al.*, 2009). Dentro de las hormonas más importantes en la regulación de la gestación están el E2 y la P4 las cuales, en la rata, presentan un incremento en su concentración plasmática: el E2 de 50 pg/mL aproximadamente, como pico máximo en el ciclo estral, se eleva a más de 100 pg/mL en la gestación aumentando a más de 500 pg/mL al momento del parto; mientras que la concentración de P4, de 10 a 35 ng/mL durante el ciclo estral, se incrementa hasta 120 ng/mL en la gestación. El día del parto la concentración de P4 disminuye y se observa un pico significativo en la concentración de E2 (Fig. 2).

Figura 2. Esquema de las concentraciones plasmáticas de estradiol, progesterona y prolactina de la rata gestante y lactante. Arriba se indican algunas de las conductas que se presentan en estos periodos. (E2, estradiol; P4, progesterona) (Martínez-Gómez, 2002).



Los cambios hormonales que ocurren durante la gestación, principalmente de E2 y P4, son indispensables para que los pulmones, los riñones, el hígado, las glándulas adrenales y otros órganos del feto puedan madurar (Genuth, 2006).

La P4 es fundamental en el desarrollo de la gestación ya que mantiene las funciones de la placenta, engrosa el endometrio, disminuye las contracciones basales del útero, estimula el crecimiento de la glándula mamaria, fortalece el moco del cérvix que previene las infecciones, fortalece las paredes uterinas preparándolas para el trabajo de parto (Houdebine *et al.*, 1985; Mahesh *et al.*, 1996). Además se ha demostrado que los receptores a P4 (RP) son muy importantes en el desarrollo del epitelio ductal en la glándula mamaria y son esenciales para la diferenciación de los lóbulos alveolares que ocurre durante la gestación (Klopper, 1982; Seagroves *et al.*, 2000).

El incremento en el peso corporal de ratas gestantes se ha relacionado al efecto anoréxico que tiene el E2 y al efecto orexigénico de la P4. En el caso de la P4 se ha visto que ésta incrementa la ingesta de alimentos tanto en ratas ovariectomizadas como en las intactas (Augustine *et al.*, 2008).

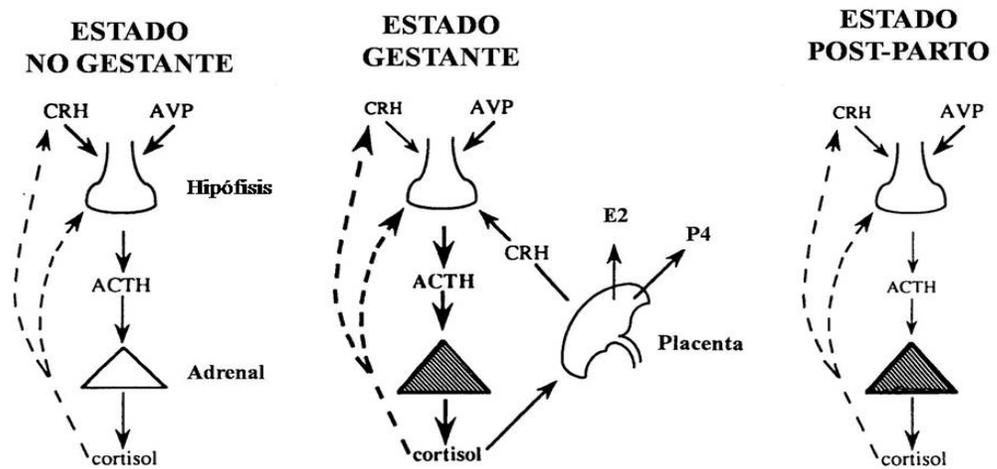
Se ha reportado que conductas, como el lamido ano-genital, están inicialmente bajo el control de hormonas, como el E2 y la P4. Aunque la importancia de estas hormonas en la conducta maternal disminuye después de la primer semana post-parto y posteriormente el comportamiento se mantiene gracias al aprendizaje y al reforzamiento (Fleming *et al.*, 1999).

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) tiene un papel muy importante en los cambios fisiológicos que ocurren en la gestación y la lactancia por que los cambios en la cantidad de adrenocorticotropina (ACTH) incrementan la concentración de cortisol promoviendo la síntesis de E2 y de P4 en la placenta, la cantidad de ACTH disminuye después del parto (Fig. 3). Durante la gestación los niveles de la hormona liberadora de corticotropina (CRH)

se incrementan notablemente ya que la placenta y las membranas fetales la producen, esta secreción se estimula por los estrógenos. En esta etapa la hipófisis incrementa su tamaño (30%) pero sus funciones permanecen intactas (Mastorakos & Ilias, 2003).

La gestación se establece y mantiene, durante la primera mitad de ésta, por las hormonas secretadas por la hipófisis, que a su vez actúan en los ovarios, pero en la segunda mitad de la gestación la placenta controla la acción sobre los ovarios inhibiendo la acción luteolítica hasta el final de la gestación, cuando inicia el parto (Taya & Greenwald, 1981). Los niveles elevados de estrógenos permiten el incremento de los niveles de la globulina de unión a corticosteroides resultando en una baja en el catabolismo del cortisol por el hígado y el incremento de la vida media de este en el plasma. Además las glándulas adrenales se hipertrofian (Mastorakos & Ilias, 2003).

Figura 3. Representación comparativa de eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) de ratas no gestantes, gestantes y en el estado post parto, CRH (hormona liberadora de corticotropina), AVP (arginina-vasopresina) ACTH (adrenocorticotropina), las áreas sombreadas significan hipertrofia de las adrenales (Mastorakos & Ilias, 2000).



En la etapa post-parto los niveles de cortisol disminuyen y el eje HHA vuelve al estado pre-gestante. En un estudio se mostró que a las 3 y 6 semanas post-parto hubo una supresión transitoria de la secreción de CRH recuperándose a la semana 12 (Magiakou *et al.*, 1996). Los cambios fisiológicos y conductuales a los que se enfrenta la madre durante el embarazo causan estrés en ella que se puede manifestar en conductas de ansiedad, lo anterior se comprobó usando el modelo de laberinto de cruz elevada, presentándose un incremento de la ansiedad desde el día 15 hasta el fin

de la gestación, aunque en el día 18 hubo una disminución que es comparable con el nivel de ansiedad de ratas vírgenes (Numan *et al.*, 1998).

La conducta maternal desaparece en el momento del destete que ocurre entre los días 22 y 28 post-parto, a pesar de que se conocen las variaciones hormonales durante la lactancia, aún no es claro si las hormonas sexuales participan directamente en la disminución de la conducta maternal cercana al destete (Martínez-Gómez, 2002). El efecto que puede llegar a tener la conducta maternal en el desarrollo de la descendencia ha sido ampliamente estudiado. El comportamiento materno es crítico en el desarrollo de diferentes componentes del SNC, se ha visto que el lamido ano-genital es muy importante para la maduración de eje HHA de la descendencia (Caldji *et al.*, 1998). También se ha visto que el comportamiento materno aumenta la densidad neuronal en el hipocampo de las madres, lo cual, a su vez, puede incrementar el aprendizaje espacial en ellas (Bredy *et al.*, 2003).

b. El Sistema Nervioso Central durante la gestación

El SNC es la parte del sistema nervioso que coordina muchas de las actividades del organismo y modula las diferentes conductas de un individuo y se compone, básicamente, por la médula espinal y el encéfalo, los cuales están protegidos por las meninges (Bear, 2007). El SNC tiene siete partes básicas: la médula espinal, el bulbo raquídeo, la protuberancia, el cerebelo, el mesencéfalo, el diencéfalo y los hemisferios cerebrales. El bulbo raquídeo, la protuberancia y el mesencéfalo se denominan en conjunto: tallo cerebral, el encéfalo anterior está conformado por el diencéfalo y los hemisferios cerebrales (Purves D., 2007).

La notable variedad del comportamiento animal, que depende en gran medida de la capacidad de relacionarse con el ambiente, depende de un sofisticado sistema de receptores sensoriales conectado a una organización neuronal altamente flexible, un cerebro que es capaz de discriminar una enorme variedad de los acontecimientos en el medio ambiente (Kandel ER. *et al.*, 2000). El

SNC tiene dos principales tipos de células: las células nerviosas o neuronas y las células de soporte llamadas neurogliales o gliales. En la figura 4 se muestran algunos tipos de morfología de las células del SNC (Purves D., 2007).

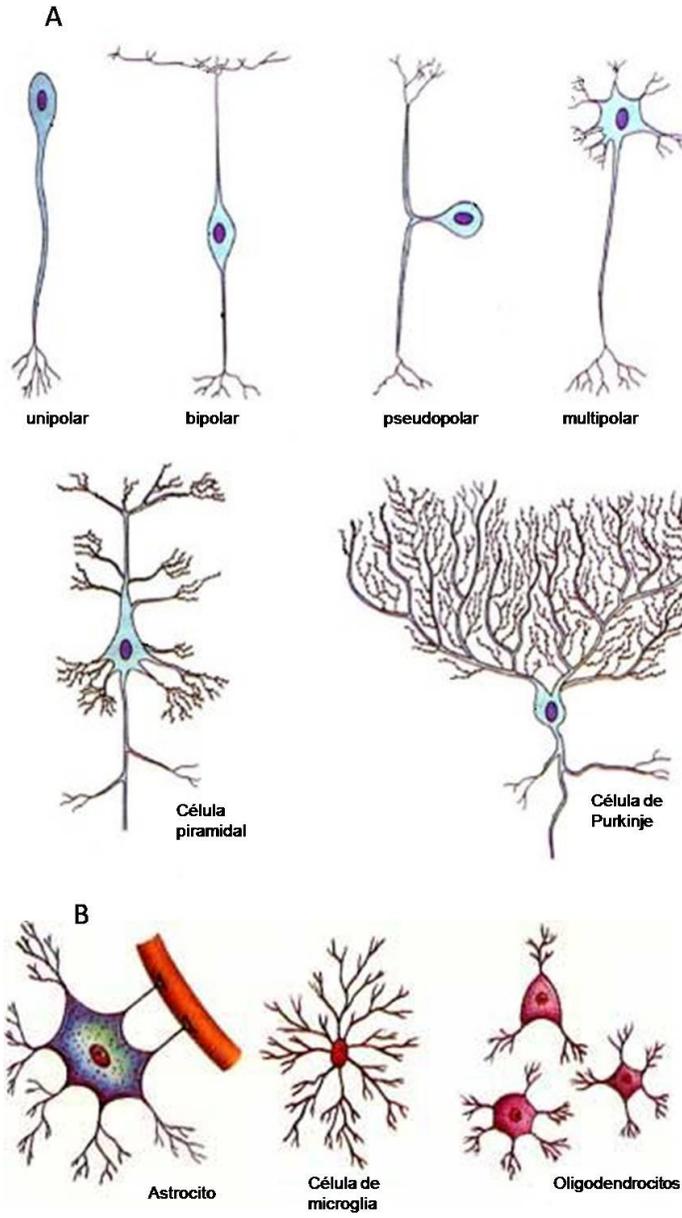


Figura 4. Algunos tipos de morfología de las células del SNC. A) Neuronas, B) células gliales (Bear, 2007).

La organización celular básica de las neuronas se asemeja a la de otras células; sin embargo, se distinguen con claridad por la especialización para la comunicación intracelular. El signo más evidente de especialización neuronal para la comunicación es la

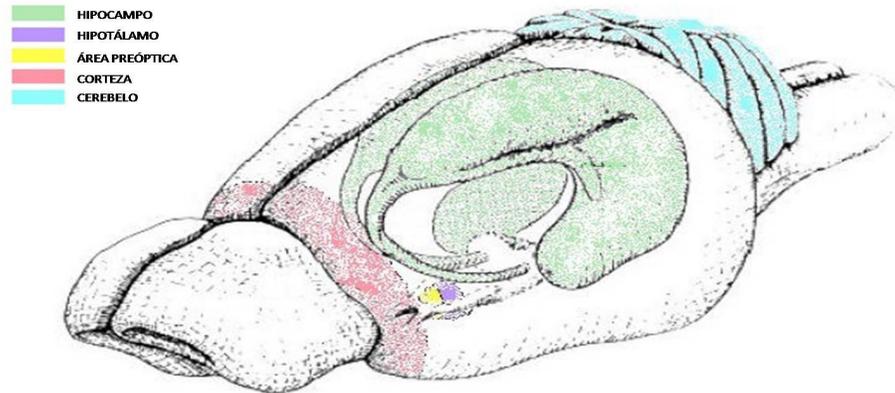
ramificación extensa de las neuronas. El aspecto más sobresaliente de esta ramificación en las células nerviosas típicas es la arborización compleja de dendritas que surgen del cuerpo de la célula neuronal, también llamadas ramas dendríticas o prolongaciones dendríticas. Las dendritas son el blanco primario de las eferencias sinápticas desde otras neuronas y también se distinguen por su alto contenido en ribosomas y proteínas específicas de citoesqueleto que reflejan su función en la recepción y en la integración de la información proveniente de otras neuronas (Purves D., 2007).

La información transmitida por las sinapsis a las dendritas es recibida e integrada en el origen del axón, porción de la célula nerviosa especializada en conducción de señales hacia el sitio siguiente de interacción sináptica. El axón es una extensión singular del cuerpo de las células neuronales que puede viajar varios micrómetros. Además, el axón posee un citoesqueleto característico cuyos elementos son fundamentales para su integridad funcional (Purves D., 2007).

El SNC presenta muchos cambios a través del desarrollo de un organismo. Estos cambios son necesarios para un adecuado manejo de la información, establecimiento de conductas e interacciones con el medio. A los cambios en los que involucran alteraciones morfológicas en las células del SNC, ya sea por el reacomodo de conexiones sinápticas, la neurogénesis o el cambio en células gliales, se le conoce como plasticidad cerebral, la cual es indispensable en la funcionalidad del SNC en sus diferentes áreas (Magistretti, 2006; Toro & Deakin, 2007).

El SNC sufre modificaciones importantes durante la gestación. Así, se ha observado que diferentes regiones del cerebro son fundamentales en el desarrollo y mantenimiento de la gestación tales como el hipocampo y el área preóptica (APO) (Kinsley, 2008). En la figura 5 se muestran algunas áreas que participan en la manifestación de diferentes conductas en la gestación.

Figura 5. Esquema del cerebro de rata. Se diferencia las áreas del cerebro que podrían estar relacionadas con la conducta maternal.



i. El Hipotálamo

El hipotálamo se localiza en la base del cerebro y constituye la prolongación rostroventral del tallo cerebral, se halla situado por debajo del tálamo. En el eje rostrocausal se distinguen las regiones preóptica, anterior, tuberal y mamilar. El hipotálamo participa en la regulación de procesos asociados con el mantenimiento de la homeostasis y los ritmos biológicos, además de que es una región donde se integran procesos que controlan la alimentación, la ingestión de agua, la reproducción, el sueño y la conducta materna (Aguilar Roblero, 2002; Bear MF *et al.*, 2007).

ii. El área preóptica

El área preóptica (APO) es uno de los núcleos que conforman al hipotálamo, se encuentra en la parte más rostral del mismo, entre el diencefalo y el telencefalo justo en la base del encéfalo. El APO recibe información de la mayoría de las modalidades sensoriales, y es por eso que integra la información medio ambiental. El APO, en general es el centro de regulación de muchas funciones autonómicas como la temperatura corporal, la sed, el hambre, el comportamiento sexual y maternal (Aguilar Roblero, 2002; Balthartz & Ball, 2007; Bear MF *et al.*, 2007).

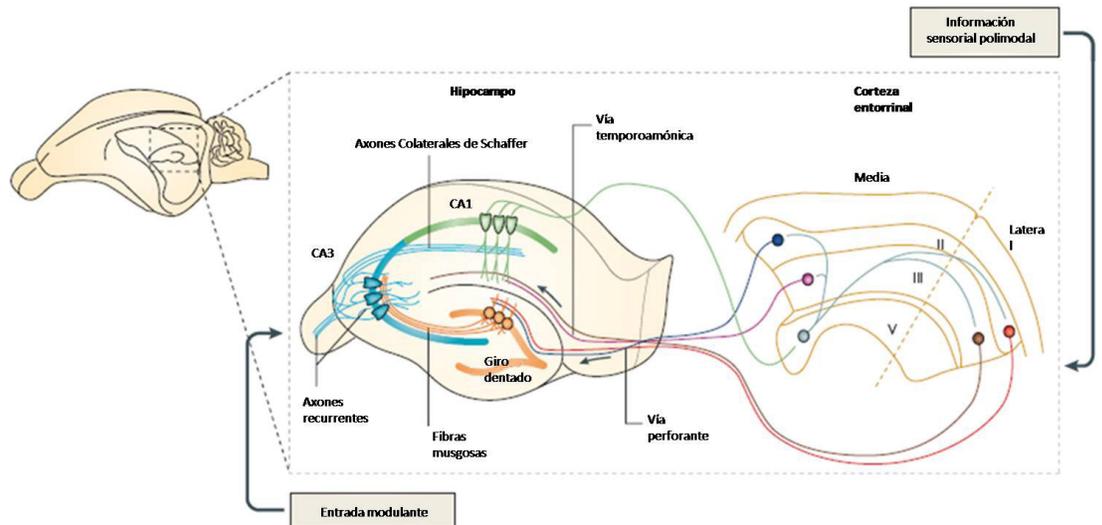
El APO es fundamental para el establecimiento de la conducta materna durante el embarazo. Se ha reportado que al inducir daño específico en esta región la manifestación de la conducta materna no se presenta, además la administración de E2 o de prolactina en el APO estimula la manifestación de esta conducta (Numan, 1988; Bridges *et al.*, 1990). Lesiones en el APO media de rata inducidas por el ácido N-metil aspártico bloquean la construcción del nido (Kalinichev *et al.*, 2000).

iii. El Hipocampo

El hipocampo es una estructura simétrica y bilateral, semejante a una corteza primitiva compuesta sólo por 3 capas de células, se localiza en la cara interna del lóbulo temporal a lo largo de la circunvolución que lleva su nombre, participa en la orientación y el aprendizaje espacial, en la formación de memoria a corto plazo y su consolidación, motivo por el cual tiene un papel fundamental en el establecimiento de la conducta materna (Aguilar Roblero, 2002; Bear MF *et al.*, 2007).

En el hipocampo, la información llega desde la corteza entorrinal, se comunica con el giro dentado, éste transmite hacia CA3 y después a CA1, tal como se indica en la figura 6 (la información también puede llegar de las conexiones que tiene con el septum).

Figura 6. Flujo sináptico del hipocampo. Los impulsos viajan desde la corteza entorrinal hacia el giro dentado por la vía perforante luego hacia la región CA3 y luego a CA1; también puede viajar hacia CA3 a través de la vía temporoamónica. Al final los impulsos pueden viajar de vuelta a la corteza entorrinal. (Neves *et al.*, 2008).



iv. La corteza frontal

La corteza frontal es la corteza de asociación que está ubicada en el lóbulo frontal. A pesar de que la corteza no puede ser considerada como una entidad anatómica o funcionalmente homogénea, es factible distinguir láminas y columnas como patrones básicos de su organización. Hay 6 láminas paralelas a la superficie, caracterizadas por el tamaño o densidad de las neuronas que contienen. Por otra parte, las columnas constituyen la unidad básica de procesamiento de información ya que varias láminas se conectan entre sí conformando un eje vertical (Aguilar Roblero, 2002; Bear MF *et al.*, 2007).

Particularmente, la corteza frontal no puede ser definida por la entrada de información de un sistema sensorial predominante. Krettek y Price realizaron un estudio a profundidad de la citoarquitectura de la corteza frontal diferenciando 4 áreas principales: el área precentral, área rostral prelímbica, el área orbital, y el área insular agranular (Krettek & Price, 1977). Tiempo después Kolb agrupó las diferentes áreas y sub-áreas en 3 zonas intentando relacionarlas con las aferencias y eferencias de éstas: zona frontal media (mPFC), zona frontal ventral y la zona motora y pre-motora (Kolb, 1984).

Se ha visto que la mPFC, que corresponde al área rostral prelímbica, es importante en la manifestación de la conducta materna durante el embarazo y la construcción del nido ya que cuando se realizaron lesiones en esta zona del cerebro estas conductas fueron alteradas (Stamm, 1955). Esta zona es muy importante porque tiene aferencias hacia las regiones de los núcleos ventro medial y medio dorsal y la zona del medialis anterior en el tálamo. También se ha reportado que contribuye a la toma de decisiones, a la supervisión, al auto-control, al cambio de tareas y a la secuencia de comportamiento (Dalley *et al.*, 2004). Afonso y colaboradores evaluaron la participación de la mPFC en el comportamiento materno induciendo lesiones con N-metil aspartato. Ellos encon-

traron que solo las conductas del lamido anogenital y del acarreo fueron alteradas mientras que la construcción del nido fue similar al compararlos con el grupo control (Afonso *et al.*, 2007).

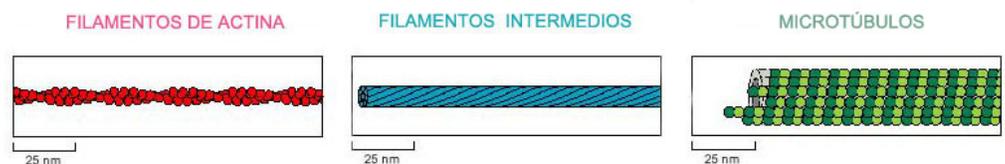
v. El cerebelo

El cerebelo se localiza dorsal al tallo cerebral, está dividido en varios lóbulos separados entre sí por fisuras. Se divide en tres regiones, arquicerebelo (más antigua y mejor conservada), paleocerebelo y neocerebelo (más reciente en la filogenia). El cerebelo se encuentra íntimamente relacionado con todas las regiones involucradas en el movimiento y desempeña una importante función como coordinador e integrador de la actividad motora voluntaria e involuntaria. El cerebelo puede detectar errores en el movimiento antes de que se ejecuten ya que posee aferencias y eferencias hacia la corteza, el tallo cerebral y la médula espinal. También se ha relacionado al cerebelo con el lenguaje y procesos de aprendizaje y memoria asociados con habilidades motoras (Aguilar Roblero, 2002; Bear MF *et al.*, 2007).

c. Características del citoesqueleto

El citoesqueleto es el principal determinante intrínseco de la forma de las neuronas y es el responsable de la distribución asimétrica de los organelos en el citoplasma. Está constituido por tres estructuras filamentosas: los filamentos de actina, los filamentos intermedios (en las neuronas, neurofilamentos) y los microtúbulos (Figura 7). Estos filamentos y sus proteínas asociadas representan aproximadamente el 25% del total de las proteínas neuronales (Kandel ER., 2000).

Figura 7. Componentes del citoesqueleto (Alberts B., 2008).



Los filamentos de actina o microfilamentos están formados por una doble cadena de actina denominada actina F (filamentosa). La actina es la proteína del citoesqueleto más abundante en todas las células, en las neuronas están presentes dos isoformas que son la β y γ -actina cuya proporción en el cerebro de la rata es de 2:1. Los filamentos de actina se encuentran en la zona proximal a la membrana y determinan en parte la flexibilidad de la membrana en una célula. Esta proteína presenta diversas modificaciones postraduccionales que dan origen a formas adicionales de actina las cuales presentan una estructura globular bilobulada (Choo & Bray, 1978; Flanagan & Lin, 1979).

Los filamentos intermedios (IF) del citoesqueleto presentan diferentes proteínas dependiendo el tejido que se esté estudiando. En las neuronas existen otro tipo de IF, los cuales se expresan diferencialmente en el desarrollo, se conoce que en la neurogénesis, las subunidades de neurofilamentos ligeros (NF-L) y medios (NF-M) de 61 y 90 kDa respectivamente son coexpresadas, mientras que la expresión de la subunidad de neurofilamentos pesados (NF-H) de 115 kDa se presenta hasta el período postnatal (Lee & Cleveland, 1996).

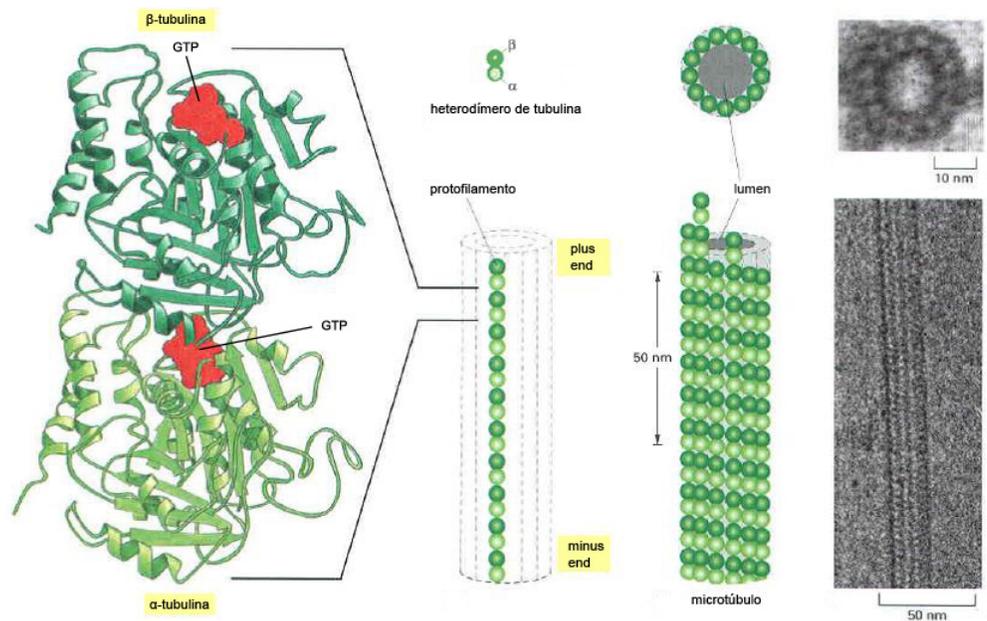
Los microtúbulos están conformados por heterodímeros de α y β -tubulina conformando protofilamentos que a su vez conforman la pared cilíndrica del microtúbulo. El número de protofilamentos puede variar de 9 a 16 *in vitro* y solo 13 *in vivo* (Chretien & Wade, 1991; Nogales *et al.*, 1998). Los microtúbulos presentan una organización en haces y su polaridad es distinta, presentando un extremo más (+) (*plus end*) de crecimiento rápido y un extremo menos (-) (*minus end*) de crecimiento lento los cuales son determinantes en la función del microtúbulo (Figura 8) (Alberts B., 2008).

La formación de un microtúbulo requiere de monómeros de tubulina (α y β) que presentan 40% de similitud en su secuencia, contienen 450 aminoácidos y su peso molecular es de 50 kDa. Una vez que éstos se dimerizan pueden formar un microtúbulo para lo cual, en la etapa inicial (nucleación) se requiere de la presencia

de la γ -tubulina la cual se ubica en el centro organizador de microtúbulos (MTOC) constituyendo un anillo que sirve como el sitio iniciador de la unión de dímeros de tubulina (Alberts B., 2008).

La α -tubulina siempre se encuentra asociada a un trifosfato de guanosina (GTP) en un sitio no intercambiable (sitio-N), a diferencia de la β -tubulina que presenta un sitio-E donde el GTP puede ser intercambiado por difosfato de guanosina (GDP). La unión de GTP a la tubulina, es determinante en la formación de un microtúbulo ya que favorece la asociación de monómeros adyacentes y el crecimiento (polimerización) del microtúbulo (Meurer-Grob *et al.*, 2001).

Figura 8. Estructura de un microtúbulo y sus subunidades. La molécula de GTP en el monómero de α -tubulina está estrechamente unida y es considerada una parte integral de la proteína. Sin embargo, la molécula de GTP en el monómero de β -tubulina está menos unida y tiene un importante papel en la dinámica de filamentos (Alberts B., 2008).



El dominio central de la tubulina está constituido por los aminoácidos 207-384 y presenta el dominio de unión entre monómeros y protofilamentos. Hacia el dominio carboxilo terminal (C-terminal) constituido por los aminoácidos 384-450 se encuentra el sitio de unión a proteínas motoras y proteínas estructurales asociadas a microtúbulos (Nogales *et al.*, 1998).

Las proteínas motoras asociadas a los microtúbulos están representadas por las kinesinas y dineínas, las cuales regulan el transporte de organelos y proteínas a través del microtúbulo por

un mecanismo dependiente de ATP. Las proteínas estructurales asociadas a microtúbulos están representadas por la catanina, la estatmina, mientras que entre las proteínas que promueven el ensamblaje de microtúbulos denominadas MAPs están MAP1A, MAP1B, MAP2 y Tau (Sanchez *et al.*, 2000). Estas proteínas tienen como diferencia principal la secuencia de interacción con los microtúbulos. MAP1A y MAP1B se unen a los microtúbulos por una secuencia que presenta repeticiones de aminoácidos del tipo (KKE) (lisina, lisina y ácido glutámico) (Faruki & Karsenti, 1994). MAP2 y Tau, presentan 3 a 4 repeticiones de 18 aminoácidos separadas por interrepeticiones de 13 ó 14 aminoácidos hacia el extremo C-terminal que conforman el dominio de unión a la tubulina.

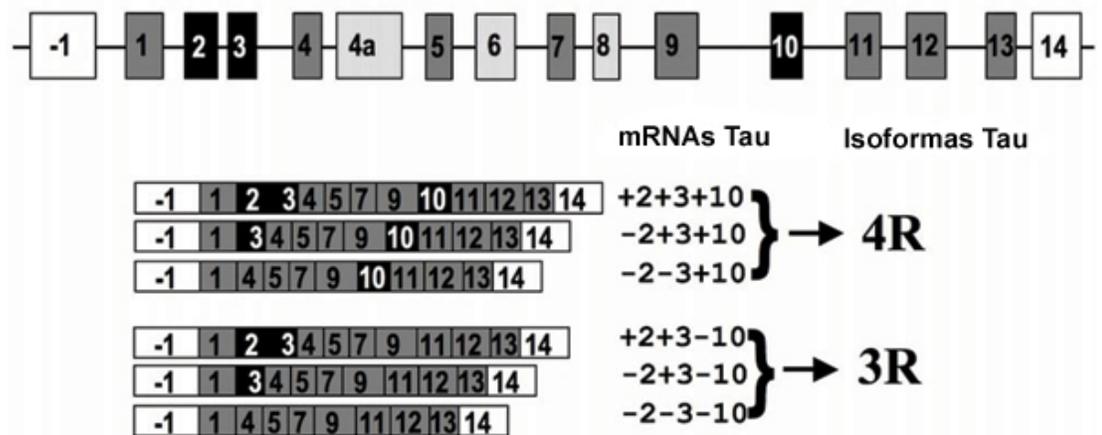
Las MAPs participan en la organización de la estructura del citoplasma de las neuronas al estabilizar los microtúbulos y promover su polimerización. Estas proteínas en su mayoría, son termoestables y presentan diferentes sitios que son susceptibles de ser fosforilados o glicosilados promoviendo así la unión y la estabilización de los microtúbulos (Garner *et al.*, 1988; Avila *et al.*, 1994). La fosforilación de estas proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más importantes que afecta la capacidad de las MAPs para unirse a los microtúbulos ya que a mayor número de grupos fosfato unidos, menor es la capacidad de unión (Avila *et al.*, 1994).

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

d. Proteína Tau

Tau forma parte de la familia de MAPs, y se expresa principalmente en los axones de las neuronas. La clonación y secuenciación del gen de Tau ha demostrado que existen seis isoformas generadas por procesamiento alternativo de un solo gen, el cual se encuentra en el cromosoma 17 en la posición 17q21 y presenta 16 exones (Kosik *et al.*, 1989). En la figura 9 se encuentra representada la estructura genómica de Tau así como sus productos del procesamiento alternativo.

Figura 9. Estructura del gen de Tau y sus productos de empalme alternativo. El gen de Tau tiene 16 exones, el primer exón (-1) es parte del promotor. Los exones 4A, 6 y 8 no se expresan en el cerebro humano. Los exones 2, 3 y 10 se empalman alternativamente produciendo seis diferentes mRNAs. El mRNA con o sin el exón 10 codifica para la proteína Tau con cuatro repetidos (4R) o con tres repetidos (3R), respectivamente (Zhou *et al.*, 2008).



Solo dos isoformas de Tau han sido identificadas en el cerebro de la rata en etapas prenatales. En el cerebro de la rata adulta, se han identificado de cuatro a seis isoformas (Francon *et al.*, 1982). Las isoformas de Tau presentan entre 353 a 441 aminoácidos y sus pesos moleculares van de 45 a 65 kDa. Tau puede presentar diferentes modificaciones postraduccionales como son fosforilaciones o glicosilaciones que son determinantes en la función de esta proteína.

La proteína Tau se une a los microtúbulos por medio de 4 regiones repetidas codificadas por los exones 9 a 12 que se disponen hacia el extremo C-terminal. Durante la etapa adulta, el

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

Tau presenta una expresión diferencial de sus isoformas durante el desarrollo en el cerebro de la rata. La isoforma llamada Tau juvenil (Tau J) cuya estructura carece de los exones 2,3 y 10 que se presenta desde etapas embrionarias y hasta aproximadamente los 20 días del desarrollo postnatal, periodo durante el cual se observa un intenso crecimiento de las neuritas en la que Tau J podría ser necesaria para construir los axones en crecimiento. La expresión de esta isoforma disminuye considerablemente y no se presenta durante la etapa adulta en la que las otras isoformas conocidas de Tau contribuyen a la estabilización de los axones (Francon *et al.*, 1982; Tucker & Matus, 1988).

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

i. Fosforilación de la Proteína Tau

Entre las modificaciones postraduccionales que presenta la proteína Tau se encuentra la fosforilación. La isoforma más grande de Tau humana contiene 441 residuos, incluyendo 79 residuos putativos de serina y treonina y 5 residuos de tirosina localizados en dos regiones ricas de prolina (Johnson & Stoothoff, 2004). La fosforilación de estos residuos afecta la unión de Tau a los microtúbulos provocando disfunción que finalmente resulta en la muerte celular (Goedert *et al.*, 1989a; Johnson & Stoothoff, 2004; Hernandez & Avila, 2007).

En el cerebro normal el equilibrio entre fosforilación y desfosforilación de Tau origina cambios estructurales y conformacionales, lo que regula la estabilidad del citoesqueleto y consecuentemente la morfología axonal. Estudios previos han demostrado que el proceso de fosforilación/desfosforilación puede controlar no sólo la funcionalidad biológica de Tau, sino también de otras proteínas que forman parte del citoesqueleto en plaquetas y endotelio como es la filamina, filamina no muscular o ABP-280 (Jay & Stracher, 1997; Jay D. *et al.*, 2000).

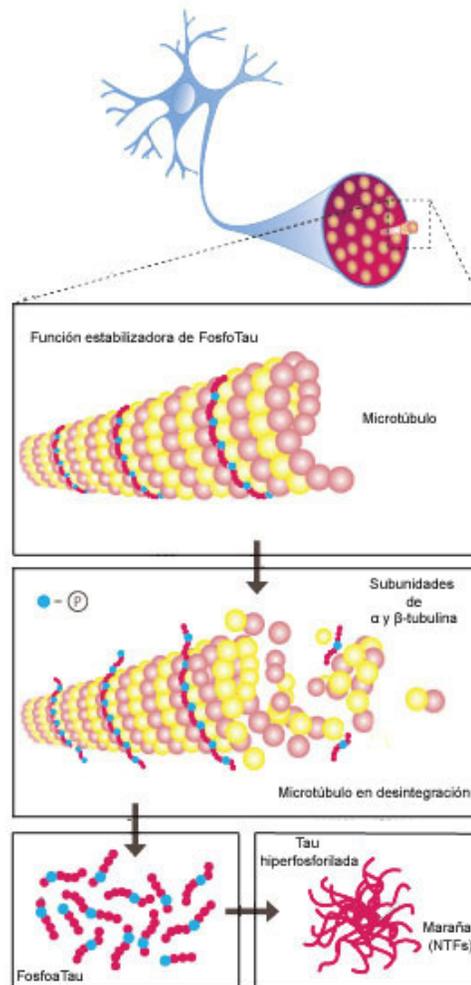
El estado de fosforilación de Tau es importante ya que en estado hiperfosforilado, (más de nueve grupos fosfato asociados a la proteína) promueve la formación de filamentos helicoidales apareados que forman las marañas neurofibrilares características de la enfermedad de Alzheimer las cuales también han sido descritas en pacientes con síndrome de Down y en pacientes con la enfermedad de Parkinson que presentan demencia (Buee *et al.*, 2000; Braak *et al.*, 2006). Durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, Tau comienza a fosforilarse en múltiples sitios para dar lugar a las marañas neurofibrilares (NFTs por sus siglas en inglés) en la figura 10 se muestra una representación esquemática de la función estabilizadora de FosfoTau en los microtúbulos y del estado hiperfosforilado de la proteína.

La hiperfosforilación de Tau es el resultado del desequilibrio

de la acción de diferentes cinasas y fosfatasa. Las principales cinasas involucradas en las modificaciones de Tau han sido divididas en dos grupos: proteínas cinasas dirigidas a prolina o motivos prolina-serina/treonina (P-ST), como son las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), cinasa 3 β de la glicógeno sintetasa (GSK3 β), cinasa tau-tubulina, cinasa dependiente de ciclina (cdc2 y cdk5), cinasas activadas por estrés (SAPK) y cinasas que fosforilan motivos distintos de P-ST, las cuales incluyen cinasa reguladora de afinidad a microtúbulos (MARK), proteína cinasa II dependiente de Ca⁺/calmodulina (CaMPK II), proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y cinasa II de la caseína (Buee *et al.*, 2000).

La desfosforilación de FosfoTau está mediada principalmente por proteínas fosfatasa (PPs) entre las que PP2A es considerada la principal fosfatasa de Tau *in vivo* (Gong *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005).

Figura 10. Representación esquemática de la función estabilizadora de FosfoTau en los microtúbulos y del estado hiperfosforilado de la proteína (modificado de (Biotechacademy.dk, 2011)).



ii. Papel del E2 y de la P4 en la regulación de la expresión de las proteínas MAPs

La evidencia de los efectos del E2 y la P4 en la regulación de las MAPs, está relacionada principalmente con estudios realizados *in vitro*. Estos estudios han demostrado que el E2 aumenta la expresión de Tau pero no de tubulina en cultivos hipotalámicos (Ferreira & Caceres, 1991; Duenas *et al.*, 1996). Recientemente se demostró que en cultivos primarios de neuronas de hipocampo tratadas una dosis 10 nM de E2 se induce un aumento en el número de espinas dendríticas y en el número de ramificaciones dendríticas pero no en la longitud o en el número de ramas del axón (Audesirk *et al.*, 2003).

En cultivos de neuronas maduras de hipocampo tratadas con E2 se ha observado un aumento en la expresión de MAP2C, en conjunto con el aumento en microtúbulos inestables que participan en la polaridad neuronal (Shah *et al.*, 2003). Estudios *in vivo* utilizando homogenados de hipófisis de ratas tratadas con E2 han mostrado que éste induce la expresión de MAP2 y Tau, pero no de tubulina (Matsuno *et al.*, 1997).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento con P4 a ratas ovariectomizadas a corto plazo disminuye el contenido de MAP2 en la corteza prefrontal, mientras un tratamiento a largo plazo incrementa el contenido de MAP2 en esta región y en el hipocampo, e incrementa el contenido Tau en la corteza frontal. También se observa que el E2 aumenta el contenido MAP2 en el hipocampo (Camacho-Arroyo *et al.*, 2011)

En cuanto al efecto de la P4 en la fosforilación de distintas proteínas, se sabe que modula la actividad de cinasas como ERK, PI3K y GSK3 (Singh, 2001; Nilsen & Brinton, 2003; Ballare *et al.*, 2006; Guerra-Araiza *et al.*, 2007; Dressing *et al.*, 2009; Guerra-Araiza *et al.*, 2009). Estas cinasas participan en la acción de la P4 en la diferenciación, función neuronal, conducta reproductiva y en la neuroprotección. Particularmente se ha reportado que la P4 está involucrada en la fosforilación de Tau (Carroll *et al.*, 2007;

Guerra-Araiza *et al.*, 2007). Según datos que reportan Zhang y colaboradores el E2 también es capaz de modificar el estado de fosforilación de Tau (Zhang & Simpkins, 2010).

Otros estudios en nuestro laboratorio demuestran que existe un patrón de expresión diferencial de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que es la principal proteína de FI en astrocitos diferenciados y es importante en la modulación de la motilidad del astrocito y proporciona su forma y estabilidad estructural, en el cerebro de la rata durante la gestación y el inicio de la lactancia y que esta expresión diferencial puede estar asociada con cambios en la función del cerebro durante este estado reproductivo (Gomora-Arrati *et al.*, 2010)

Planteamiento del problema

Los procesos involucrados en la regulación de la plasticidad sináptica en el SNC de madres gestantes y lactantes que son fundamentales para la posterior supervivencia de las crías, implican cambios en la organización del citoesqueleto neuronal.

El patrón de las MAPs se ha visto correlacionado con cambios ultraestructurales inducidos por E2 y P4 en diferentes áreas del cerebro a diferentes edades y bajo distintas condiciones hormonales. Estudios previos han demostrado que en neuronas del hipotálamo, el E2 aumenta los niveles de Tau, más no así de tubulina.

En la gestación los niveles de E2 y P4 se encuentran elevados y se sabe que el contenido de las MAPs puede ser modificado por estas dos hormonas esteroides, sin embargo, se desconoce si el contenido de Tau y su estado de fosforilación se modifican durante el embarazo en el SNC de la rata. Por lo que en este trabajo se estudiará el patrón de expresión de Tau y su fosforilación durante la gestación y al inicio de la lactancia en el hipotálamo, el APO, el hipocampo, la corteza frontal y el cerebelo de la rata. Esta información es indispensable para entender los mecanismos a través de los cuales actúan las hormonas sexuales en el SNC durante la gestación.

Hipótesis

Ya que la expresión de Tau y su fosforilación pueden ser reguladas por E2 y P4, se espera que el contenido de Tau y la forma fosforilada de ésta se modifiquen durante la gestación y el inicio de la lactancia en el SNC de la rata.

Objetivo

Conocer el patrón de expresión de la proteína Tau total y su forma fosforilada en el hipotálamo, el APO, el hipocampo, la corteza frontal y el cerebelo a los 2, 14, 18 y 21 días de gestación y al día 2 de la lactancia de la rata.

Metodología

a. Animales de experimentación

A lo largo de este estudio se utilizaron ratas hembra adultas de 230 – 250 g de peso de la cepa Sprague Dawley que se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 horas, con agua y comida *ad libitum* a 22°C de temperatura ambiente.

Las hembras fueron apareadas con un macho experto y a los 2, 14, 18 y 21 días de la gestación y a los 2 días de la lactancia (n=4 ratas por grupo) se sacrificaron por decapitación y se diseccionaron el hipotálamo, el APO, el hipocampo, la corteza frontal y el cerebelo. Todas las regiones fueron procesadas inmediatamente para la extracción de proteínas totales.

b. Extracción y cuantificación de proteínas

Se realizó la extracción de las proteínas totales de las diferentes regiones del SNC de las ratas gestantes y lactantes mediante la técnica que se explica a continuación:

1. En tubos estériles, se homogenizaron los tejidos en estudio en 1 mL de solución amortiguadora de lisis Ripa (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton 1%, SDS 1%, aprotinina 2 µg/mL PMSF 1 mM y EDTA 1 mM).
2. Las muestras homogenizadas se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se depositó en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL.

La concentración se determinó por un método espectrofotométrico con un Nanodrop, el cual midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. El aparato está acoplado a un software que calcula directamente la concentración de las proteínas en las muestras.

c. Western blot

Para cada muestra se preparó el volumen necesario para cargar 100 µg de proteína total mezclándolo con el amortiguador de carga (Tris base 50 mM, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, bromofenol 0.1%, glicerol 10%) en una relación 1:1 volumen-volumen y se hirvieron durante 5 minutos.

Se depositaron 100 µg de proteína total en un gel desnaturante de poliacrilamida al 7.5%, las proteínas fueron separadas por electroforesis a 90 volts por 3 horas. Enseguida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 60 mA por membrana durante 2.5 horas en una cámara de transferencia semihúmeda. Posteriormente se incubó con un agente bloqueador de membrana (General Electric) en TBS 1x (NaCl, Tris,-Base, pH 7.4) + Tween 0.1% durante 2 horas.

Se incubó con el anticuerpo primario, anti-Tau (Cell Signaling) en una dilución 1:1000 (concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o con el anticuerpo primario anti-Tau [(phospho S396, abcam)] que reconoce específicamente la serina 396 fosforilada ya que se ha encontrado que éste es un sitio crítico para el ensamblaje de microtúbulos en una dilución 1:1000 (concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una solución de TBS + Tween 0.1%. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (IgG-HRP) (Santa Cruz) o con el anticuerpo secundario anti-conejo (Santa Cruz) respectivamente en una dilución de 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS + Tween 0.1% y las membranas se colocaron en TBS para continuar con la detección.

Las proteínas que fueron reconocidas por el anticuerpo primario se detectaron mediante una técnica de quimioluminiscencia de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Con este sistema el peróxido de luminol y un activador son sustratos de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario que cuando reacciona genera una señal de luminiscencia que se puede cuantificar utilizando placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada, se utilizó una proteína cuyo contenido no se modifica en la etapa de estudio, en este caso α -tubulina. Se realizó un lavado con glicina acida (0.1 M, pH 2.5) por 30 minutos a 60°C. Se bloqueó con una solución de leche al 5% en TBS. Se incubó con anti-tubulina (Sigma) en una dilución de 1:10000 toda la noche. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS + Tween 0.1%. Se incubó con anticuerpo anti-ratón (Santa Cruz) en una dilución de 1:5000 durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS + Tween 0.1% y se utilizó el método de alta sensibilidad antes descrito.

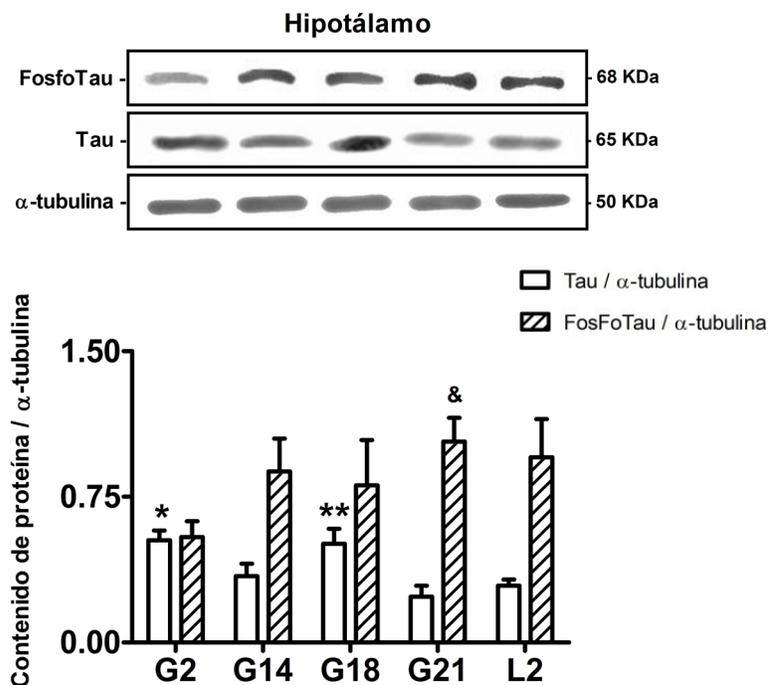
d. Análisis densitométrico y estadístico

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico para cuantificar las bandas que corresponden al contenido de Tau, FosfoTau y α -tubulina mediante el programa *Scion Image*. El valor que arrojó el programa para densitometría para Tau y FosfoTau fue dividido entre el valor para α -tubulina para corregir el error de carga. A los datos obtenidos se les aplicó una ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de *t-student*, se utilizó el programa GraphPad Prism 5 para calcular los valores de probabilidad.

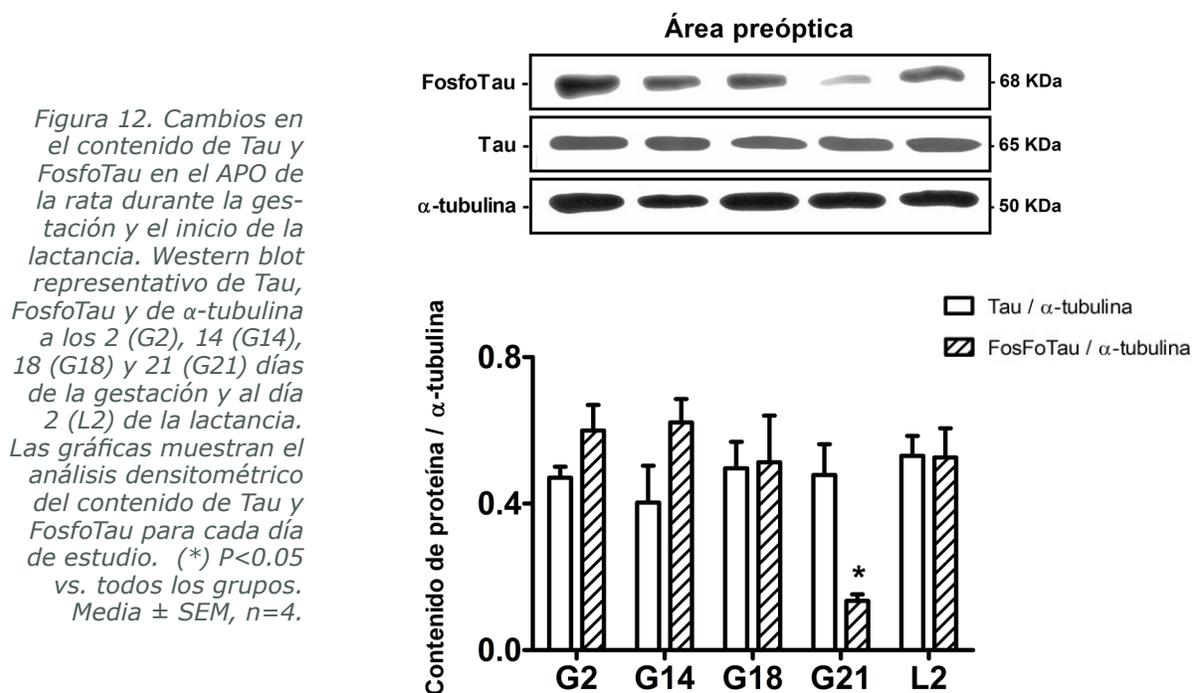
Resultados

En este estudio se caracterizó el patrón de expresión de la proteína Tau así como de su forma fosforilada, es decir FosfoTau durante la gestación y el inicio de la lactancia. En el hipotálamo se observó un aumento significativo en el contenido de Tau en los días 2 y 18 de la gestación en comparación con los días 14 y 21 de la gestación y el día 2 de la lactancia. El contenido de FosfoTau aumentó significativamente el día 21 del periodo gestante (Fig. 11).

Figura 11. Cambios en el contenido de Tau y FosfoTau en el hipotálamo de la rata durante la gestación y el inicio de la lactancia. Western blot representativo de Tau, FosfoTau y de α -tubulina a los 2 (G2), 14 (G14), 18 (G18) y 21 (G21) días de la gestación y al día 2 (L2) de la lactancia. Las gráficas muestran el análisis densitométrico del contenido de Tau y FosfoTau para cada día de estudio. (*) $P < 0.05$ vs. G14, G21 y L2; (**) $P < 0.05$ vs. G21 y L2; (&) $P < 0.05$ vs. G2. Media \pm SEM, $n=4$.

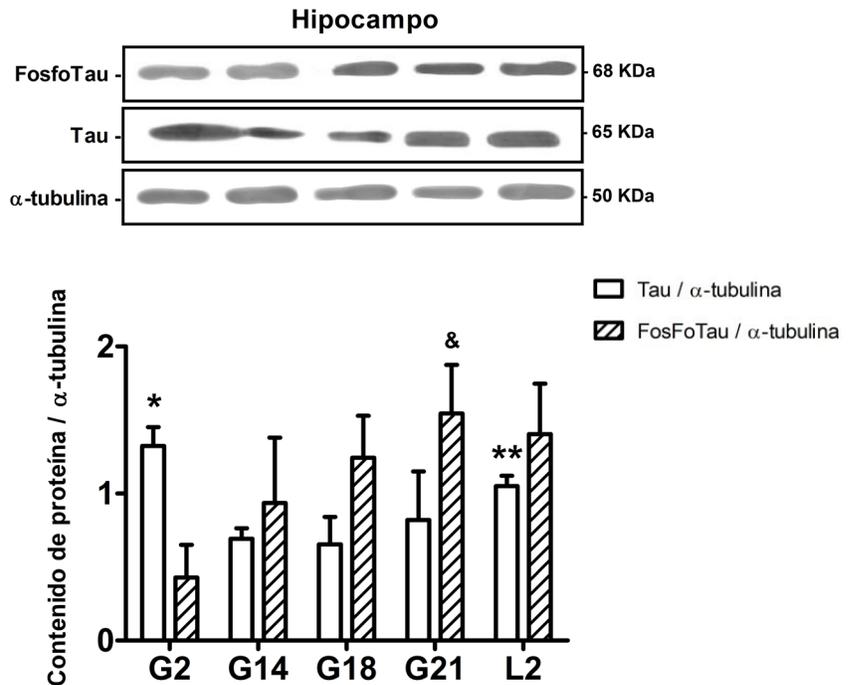


El contenido de Tau en el APO de ratas gestantes y lactantes no mostró cambios significativos, sin embargo, el contenido de FosfoTau presentó una disminución estadísticamente significativa el día 21 de la gestación en comparación con los días 2, 14 y 18 de la gestación y el día 2 de la lactancia (Fig. 12).



En el hipocampo de ratas gestantes el contenido de Tau disminuyó a partir del día 14 y se mantuvo relativamente constante hasta el día 21 de la gestación, sin embargo, al día 2 de la lactancia el contenido de Tau aumentó en comparación con los días 14, 18 y 21 de la gestación. El contenido de FosfoTau aumentó progresivamente mientras transcurre la gestación llegando a un máximo al día 21 de la gestación (Fig. 13).

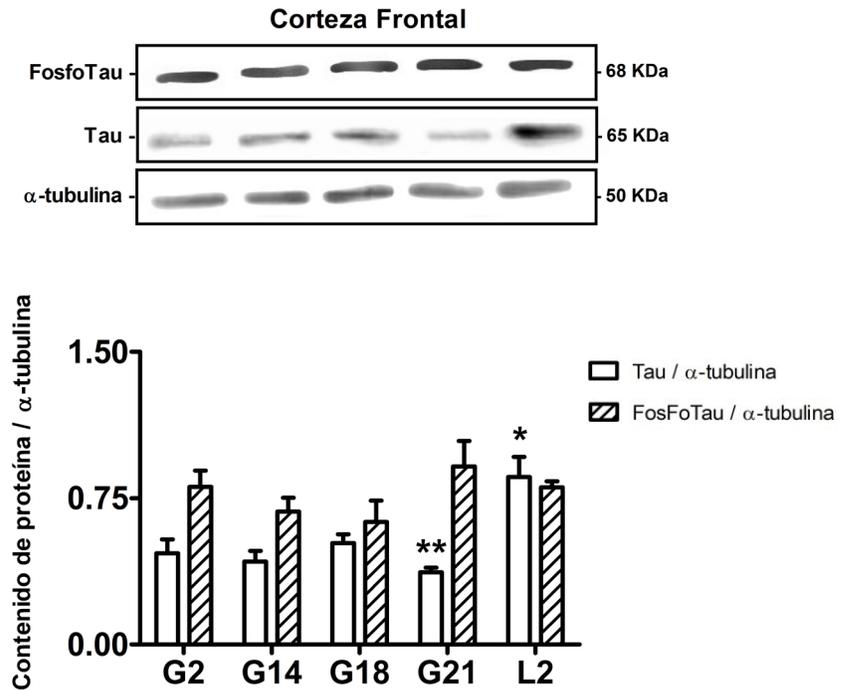
Figura 13. Cambios en el contenido de Tau y FosfoTau en el hipocampo de la rata durante la gestación y el inicio de la lactancia. Western blot representativo de Tau, FosfoTau y de α -tubulina a los 2 (G2), 14 (G14), 18 (G18) y 21 (G21) días de la gestación y al día 2 (L2) de la lactancia. Las gráficas muestran el análisis densitométrico del contenido de Tau y FosfoTau para cada día de estudio. (*) $P < 0.05$ vs. G14 y G18; (**) $P < 0.05$ vs. G14; (&) $P < 0.05$ vs. G2. Media \pm SEM, $n=4$.



El contenido de Tau al día 21 de la gestación disminuyó significativamente en la corteza cerebral de las ratas en comparación con los días 2, 14 y 18 de la gestación en los que el contenido de Tau se mantuvo constante. Así mismo, se observó un aumento significativo en el contenido de Tau al día 2 de la lactancia en comparación con la gestación. FosfoTau no mostró cambios significativos durante la gestación ni al día 2 de la lactancia (Fig. 14).

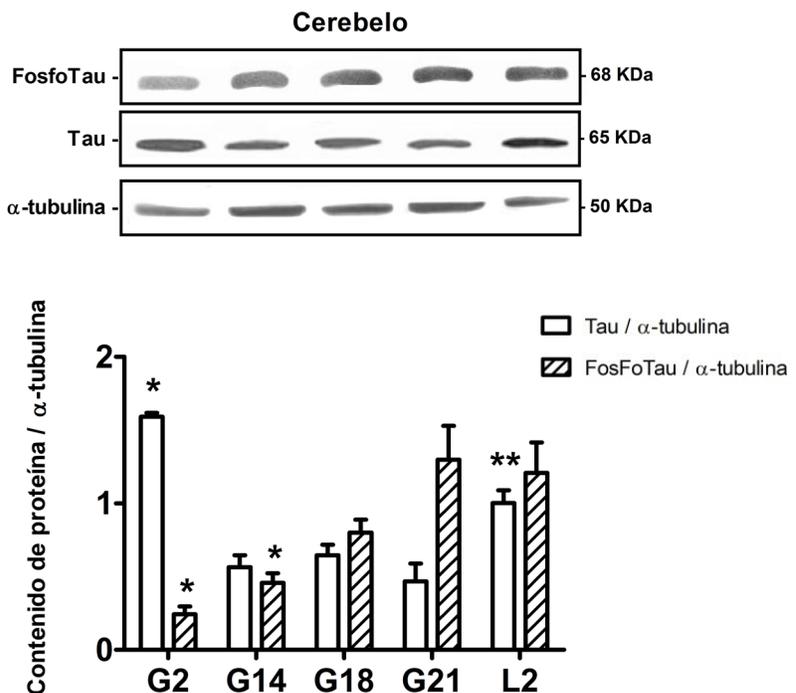
Finalmente, en el cerebelo el contenido de la proteína Tau disminuyó en el día 14 y se mantuvo hasta el día 21 comparado con el día 2 de la gestación. Se observó también, un incremento significativo en el contenido de Tau en el día 2 de la lactancia en comparación con los días 14, 18 y 21 de la gestación, mas no en comparación con el día 2 de la gestación. Similar a lo que se observó en el hipocampo, la proteína Tau fosforilada aumentó progresivamente conforme progresa la gestación, llegando a un máximo al día 21 de la gestación que se mantuvo al día 2 de la lactancia (Fig. 15).

Figura 14. Cambios en el contenido de Tau y FosfoTau en la corteza frontal de la rata durante la gestación y el inicio de la lactancia. Western blot representativo de Tau, FosfoTau y de α -tubulina a los 2 (G2), 14 (G14), 18 (G18) y 21 (G21) días de la gestación y al día 2 (L2) de la lactancia. Las gráficas muestran el análisis densitométrico del contenido de Tau y FosfoTau para cada día de estudio. (*) $P < 0.05$ vs. todos los grupos; (**) $P < 0.05$ vs. G18. Media \pm SEM, $n=4$.



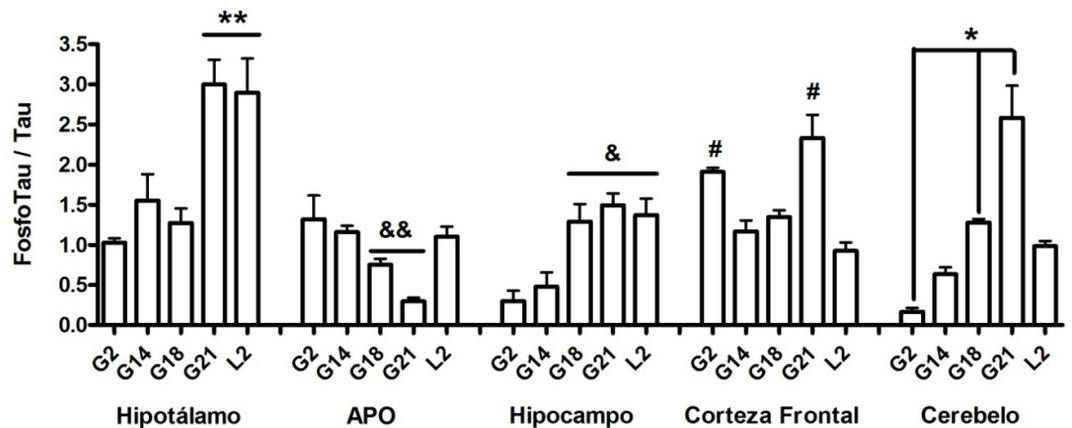
Teniendo en cuenta que la forma fosforilada de la proteína Tau es la que cumple con las funciones anteriormente descritas, una relación entre el contenido de la proteína fosforilada y Tau total podría brindar una mejor idea de lo que ocurre durante la gestación y el inicio de la lactancia con respecto no sólo al contenido de la proteína, sino que también a la actividad de Tau.

Figura 15. Cambios en el contenido de Tau y FosfoTau en el cerebelo de la rata durante la gestación y el inicio de la lactancia. Western blot representativo de Tau, FosfoTau y de α -tubulina a los 2 (G2), 14 (G14), 18 (G18) y 21 (G21) días de la gestación y al día 2 (L2) de la lactancia. Las gráficas muestran el análisis densitométrico del contenido de Tau y FosfoTau para cada día de estudio. (*) $P < 0.05$ vs. todos los grupos; (**) $P < 0.05$ vs. G21. Media \pm SEM, $n=4$.



En el hipotálamo de la rata la relación FosfoTau / Tau aumentó significativamente hacia el término de la gestación, es decir, al día 21, y este aumento se mantuvo el día 2 de la lactancia. En el APO en contraste con lo observado en el hipotálamo dicha relación disminuyó conforme progresa la gestación siendo significativamente diferente a partir del día 18, sin embargo, en el día 2 de la lactancia la relación entre la FosfoTau-Tau volvió a aumentar significativamente. En el hipocampo se observó que la relación aumenta significativamente a partir del día 18 de la gestación y se mantuvo así hasta el día 2 de la lactancia. En la corteza frontal se observó un aumento significativo de la relación en los días 2 y 21 de la gestación en comparación con los días 14 y 18 de la gestación y el día 2 de la lactancia. Por último, en el cerebelo se observó que la relación entre la proteína fosforilada y la total aumentó conforme progresa la gestación alcanzando un máximo el día 21 de la gestación y posteriormente en el día 2 de la lactancia, ésta disminuyó (Figura 16).

Figura 16. Variación en la relación de FosfoTau/Tau en el hipotálamo, el APO, el hipocampo, la corteza frontal y el cerebelo de ratas a los 2 (G2), 14 (G14), 18 (G18) y 21 (G21) días de la gestación y al día 2 (L2) de la lactancia. Las gráficas muestran una relación entre el contenido de Tau y su fosforilación en los días de estudio (**) $P < 0.05$ vs. todos los otros grupos; (&&) $P < 0.05$ vs. todos los otros grupos; (&) $P < 0.05$ vs. todos los otros grupos; (#) $P < 0.05$ vs. todos los otros grupos; (*) $P < 0.05$ vs. todos los otros grupos. Media \pm SEM, $n=4$.



Discusión

En este trabajo se demostró patrón diferencial de expresión y fosforilación de la proteína Tau en algunas regiones del cerebro durante la gestación y el inicio de la lactancia. La expresión diferencial en el contenido de la proteína así como en el contenido de FosfoTau observado en las áreas de estudio sugieren que factores tejido-específicos participan en la regulación de la expresión de Tau así como de su fosforilación.

Diversos cambios en la función y organización del cerebro han sido observados durante la gestación, incluyendo modificaciones en la memoria y aprendizaje (Galea *et al.*, 2000; Keyser-Marcus *et al.*, 2001; Shingo *et al.*, 2003; Furuta & Bridges, 2005).

Matsuno y colaboradores encontraron que en ratas hembra adultas tratadas con E2 aumenta la expresión de Tau en la glándula pituitaria (Matsuno *et al.*, 1997). En este trabajo se obtuvieron resultados similares en algunas regiones cerebrales, ya que se observó un aumento en el contenido de Tau en el hipotálamo en los días 2 y 18 de la gestación, en el hipocampo y en el cerebelo al segundo día de la gestación y en la corteza frontal observamos también niveles más altos los días 2, 14 y 18 de la gestación. Estas modificaciones en la expresión de Tau podrían estar relacionadas con el incremento en las concentraciones de E2 observadas durante la gestación, las cuales son mayores incluso comparándolas con las concentraciones que se alcanzan en el pico máximo en el proestro durante el ciclo estral (Rosenblatt *et al.*, 1988). Por otra parte, podría ser que el aumento en la expresión de la proteína Tau en el hipocampo, la corteza frontal y en el cerebelo el día 2 de la lactancia esté relacionado con cambios en las concentraciones de otras hormonas como por ejemplo la prolactina, que se incrementa considerablemente después del parto, o incluso a la respuesta de estímulos externos como la interacción entre la madre y las crías.

Se analizó el contenido de Tau y FosfoTau los días 2, 14, 18 y

21 de la gestación por los marcados cambios en las concentraciones de E2 y P4 observados en estos días. En el día 2 los niveles de E2 y P4 son bajos. La secreción ovárica de P4 aumenta alrededor del día 14, el mayor nivel de P4 se observa entre los días 16-18, con una evidente disminución en el día 21 y un incremento significativo de los niveles de E2 en este día (Rosenblatt *et al.*, 1988).

Es interesante observar que en ninguna de las regiones de estudio se observaron niveles elevados de la proteína Tau en el día 21 de la gestación, día en el que el E2 alcanza los niveles más altos durante todo el embarazo en ratas, este dato de manera preliminar nos llevaría a sospechar que las modificaciones en la expresión de esta proteína se producen a concentraciones bajas de esta hormona y no en concentraciones muy altas, fenómeno contrario al que se observa en cuanto al contenido de la proteína fosforilada, ya que la mayor parte de los cambios observados suceden en este día.

La capacidad de Tau de ensamblar a los microtúbulos es regulada post-traduccionalmente por la fosforilación en serina/treonina. La hiperfosforilación de estos residuos afecta la unión de Tau a los microtúbulos provocando disfunción que finalmente podría resultar en la muerte celular (Goedert *et al.*, 1989a; Johnson & Stoothoff, 2004; Hernandez & Avila, 2007). En este trabajo se encontraron importantes cambios en el contenido FosfoTau en la mayoría de las regiones estudiadas.

En los resultados mostrados en este trabajo se observa una expresión diferencial de la proteína Tau fosforilada en cada una de las regiones en estudio. Se sabe que el E2 y la P4 son capaces de modificar la fosforilación de la proteína Tau, como se ha observado en algunos trabajos como en los de Carroll y colaboradores o en los de Guerra-Araiza en donde se demuestra que la P4 aumenta la fosforilación de Tau, o en los estudios de Zhang y Simpkins que mencionan que el E2 es capaz de disminuir el contenido de Fosfo-Tau (Zhang & Simpkins, 2010; Carroll *et al.*, 2007; Guerra-Araiza *et al.*, 2007).

En el hipotálamo e hipocampo es evidente un aumento en el contenido de FosfoTau en el día 21 de la gestación que podría estar relacionado con las concentraciones de P4 alcanzadas durante este día, por el contrario, de manera muy interesante en el mismo día pero en el APO el contenido de FosfoTau disminuyó en comparación con el resto de la gestación y el inicio de la lactancia. La disminución del contenido de FosfoTau en al APO coincide con resultados obtenidos por Zhang y colaboradores que han demostrado que el E2 es capaz de prevenir la fosforilación de Tau (Zhang & Simpkins, 2010).

En el cerebelo se observó que la expresión de FosfoTau aumentó conforme progresa la gestación, lo cual puede estar relacionado con el incremento en las concentraciones de P4 que ocurren durante la gestación, siendo máximas entre los días 16-18. Este resultado se relaciona con datos en los que reportan que la P4 aumenta la fosforilación de Tau (Carroll *et al.*, 2007; Guerra-Araiza *et al.*, 2007).

Tau puede fosforilarse en múltiples sitios, sin embargo, se sabe que la fosforilación en la serina 396 es un sitio crítico para el ensamblaje de microtúbulos y ésta puede ser fosforilada por cinasas como JNK, p38, protein cinasa Tau I (TPKI) y protein cinasa Tau II (TPKII) por lo que decidimos detectar esta serina fosforilada en nuestro estudio (Evans David B. *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2000).

Aunque muchas proteínas cinasas son capaces de fosforilar Tau *in vitro*, se cree que solo algunas como GSK3 β o TPK I y cdk5 o TPK II son las que realizan la fosforilación *in vivo*, fueron aisladas por primera vez de microtúbulos de cerebro bovino por lo que son las más estudiadas (Ishiguro *et al.*, 1992; Ishiguro *et al.*, 1993; Uchida *et al.*, 1994). Por el momento no podemos saber cuál o cuáles son las proteínas cinasas que podrían fosforilar a Tau durante el embarazo, sin embargo, se ha encontrado que la P4 y sus metabolitos pueden estar involucrados en la fosforilación de Tau y en la actividad de GSK3 β en el cerebro y que el E2 puede preve-

nir la fosforilación de Tau vía cdk5 (Amorim *et al.*, 2010; Zhang & Simpkins, 2010; Guerra-Araiza *et al.*, 2007; Guerra-Araiza *et al.*, 2009).

Finalmente, la relación entre FosfoTau y Tau nos podría indicar el contenido de proteína que se encuentra interactuando con los microtúbulos y muy probablemente originando cambios estructurales en el SNC durante la gestación y el inicio de la lactancia y que podrían estar relacionados con la conducta maternal que se observa en la rata. En el hipotálamo de la rata encontramos que esta relación aumenta significativamente en el día 21 y este aumento se mantiene al día 2 de la lactancia, lo cual puede estar relacionado con los procesos que ocurren en algunos núcleos hipotalámicos durante la gestación, como lo reportan Purves y colaboradores para el núcleo supraóptico (Purves D., 2007). El hipotálamo participa en la regulación de procesos asociados con el mantenimiento de la homeostasis y los ritmos biológicos, además de que es una región donde se integran procesos que controlan la alimentación, la ingesta de agua, la reproducción y el sueño que se ven modificados durante la gestación y en mayor grado unos días antes del momento del parto, y es muy probable que el incremento en la relación FosfoTau / Tau en el día 21 de la gestación y 2 de la lactancia estén relacionados con estos procesos (Aguilar Roblero, 2002; Bear MF *et al.*, 2007).

Por otra parte se sabe que la agresión es un proceso emocional en donde está involucrado el hipotálamo, entre otras regiones cerebrales (Olivier & Mos, 1992). Además, se ha reportado que hacia el final de la gestación la madre presenta un comportamiento agresivo que Mathews y colaboradores observaron y que podría estar relacionado con el incremento en la relación FosfoTau / Tau que se observó el día 21 de la gestación y el día 2 de la lactancia (Matthews-Felton *et al.*, 1995).

Se sabe que lesiones en el APO medial bloquean la construcción del nido, además el APO es en general el centro de regulación de muchas funciones autonómicas como la temperatura corporal y la sed, que son de gran importancia para el cuidado

y supervivencia tanto de la madre como de las crías, por lo que es necesario una remodelación sináptica en esta área. Se ha observado que la construcción del nido empieza aproximadamente alrededor del día 18 de la gestación, por lo que podemos sugerir que esta remodelación sináptica está relacionada con la disminución de la relación FosfoTau / Tau que se observó en los días 18 y 21 de la gestación (Kalinichev *et al.*, 2000; Aguilar Roblero, 2002; Balthazart & Ball, 2007; Bear MF *et al.*, 2007).

En el hipocampo se observó que la relación FosfoTau / Tau aumenta significativamente a partir del día 18 de la gestación y se mantiene así hasta el día 2 de la lactancia, durante esta etapa la madre debe memorizar sitios de abastecimiento para alimentarse por lo que el incremento en la relación FosfoTau / Tau podría estar relacionado con la actividad sináptica en el hipocampo en esta etapa. Estos resultados apoyan los trabajos de Kinsley y colaboradores en los que se ha demostrado que ratas madre resuelven en un menor tiempo laberintos en comparación con ratas vírgenes (Kinsley *et al.*, 1999).

En la corteza frontal se observó un aumento significativo de la relación FosfoTau / Tau los días 2 y 21 de la gestación en comparación con los días 14 y 18 y el día 2 de la lactancia. A pesar de que la corteza no tiene una entrada sensorial predominante, existe una región relacionada con el comportamiento materno durante la gestación que es la mPFC que, entre otras funciones, interviene en el proceso de atención. Es probable que los cambios observados en la relación FosfoTau / Tau al final de la gestación puedan estar relacionados con las conductas del lamido anogenital y del acarreo que son alteradas al inducir lesiones con N-metil aspartato en la mPFC (Afonso *et al.*, 2007).

Por último en el cerebelo se observa que la relación entre la proteína Tau fosforilada y Tau total aumentó conforme progresa la gestación alcanzando un máximo el día 21 de la gestación. Este incremento podría estar relacionado con la memoria motriz, la cual sabemos que es indispensable por ejemplo para la construcción del nido. También se ha relacionado al cerebelo con procesos de

aprendizaje y memoria asociados con habilidades motoras, estas dos habilidades son necesarias para la supervivencia de la madre y de las crías (Aguilar Roblero, 2002; Bear MF *et al.*, 2007).

Los cambios que ocurren en el contenido de Tau y FosfoTau podrían ser útiles en la comprensión del proceso de la plasticidad neuronal en el llamado cerebro maternal.

Conclusiones

- Existen cambios en el contenido de Tau y FosfoTau en el cerebro de la rata durante la gestación y el inicio de la lactancia.
- El patrón del contenido de Tau y FosfoTau varían de manera tejido-específica en el SNC de la rata durante la gestación y el inicio de la lactancia.

Referencias

- Afonso VM, Sison M, Lovic V & Fleming AS. (2007). Medial prefrontal cortex lesions in the female rat affect sexual and maternal behavior and their sequential organization. *Behavioral neuroscience* **121**, 515-526.
- Aguilar Roblero R, Escobar Briones, C. (2002). Organización anatómica y funcional del sistema nervioso. *Motivación y Conducta*, ed. Aguilar Roblero EB, C., pp. 13-37. Manual Moderno, México.
- Alberts Bruce. (2008). *Molecular Biology of The Cell*. Fifth Ed. pp. 965-1052. Garland Science, New York.
- Amorim MA, Guerra-Araiza C, Pernia O, da Cruz e Silva EF & Garcia-Segura LM. (2010). Progesterone regulates the phosphorylation of protein phosphatases in the brain. *Journal of neuroscience research* **88**, 2826-2832.
- Audesirk T., Cabell L., Kern M., Audesirk G. (2003). Beta-estradiol influences differentiation of hippocampal neurons in vitro through an estrogen receptor-mediated process. *Neuroscience* **121**, 927-34
- Augustine RA, Ladyman SR & Grattan DR. (2008). From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *Journal of Physiology* **586**, 387-397.
- Avila J, Dominguez J & Diaz-Nido J. (1994). Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *International Journal of Developmental Biology* **38**, 13-25.
- Balthazart J & Ball GF. (2007). Topography in the preoptic region: differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. *Frontiers in Neuroendocrinology* **28**, 161-178.
- Ballare C, Vallejo G, Vicent GP, Saragueta P & Beato M. (2006). Progesterone signaling in breast and endometrium. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **102**, 2-10.

- Bear MF, Connors, Barry W., Paradiso, Michael A. (2007). *Neuroscience: exploring the brain*. Third ed. pp. 857. Lippincott Williams & Wilkins. EUA.
- Biotechacademy.(2011). Alzheimers sygdom. Patologi. http://www.biotechacademy.dk/Bioindex/Drughunters/alzheimers_sygdom/patologi.aspx.
- Braak H, Rub U, Schultz C & Del Tredici K. (2006). Vulnerability of cortical neurons to Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Alzheimer's Disease* **9**, 35-44.
- Brandt R, Leger J & Lee G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *Journal of Cell Biology* **131**, 1327-1340.
- Bredy TW, Grant RJ, Champagne DL & Meaney MJ. (2003). Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *European Journal of Neuroscience* **18**, 2903-2909.
- Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE & Lupini CE. (1990). Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8003-8007.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A & Hof PR. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews* **33**, 95-130.
- Caceres A, Potrebic S & Kosik KS. (1991). The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *Journal of Neuroscience* **11**, 1515-1523.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM & Meaney MJ. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5335-5340.
- Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Arenas A, Espinosa-Raya J, Pina-Medina AG & Picazo O. (2011). Short- and long-term treatment with estradiol or progesterone modifies the expression of GFAP, MAP2 and Tau in prefrontal cortex and hippocampus. *Life sciences* **89**, 123-128.

- Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM & Pike CJ. (2007). Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *Journal of Neuroscience* **27**, 13357-13365.
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ & Hirokawa N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* **360**, 674-677.
- Choo QL & Bray D. (1978). Two forms of neuronal actin. *Journal of Neurochemistry* **31**, 217-224.
- Chretien D & Wade RH. (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biology of the Cell* **71**, 161-174.
- Dalley JW, Cardinal RN & Robbins TW. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **28**, 771-784.
- Dinsmore JH & Solomon F. (1991). Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* **64**, 817-826.
- Dressing GE, Hagan CR, Knutson TP, Daniel AR & Lange CA. (2009). Progesterone receptors act as sensors for mitogenic protein kinases in breast cancer models. *Endocrine-related Cancer* **16**, 351-361.
- Duenas M, Torres-Aleman I, Naftolin F & Garcia-Segura LM. (1996). Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation. *Neuroscience* **74**, 531-539.
- Evans David B. KBR, Keshab Bhattacharya, Darrell R. Thomsen, Mark E. Gurney and Satish K. Sharma. (2000). Tau Phosphorylation at Serine 396 and Serine 404 by Human Recombinant Tau Protein Kinase II Inhibits Tau's Ability to Promote Microtubule Assembly. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 24977-24983.
- Faruki S & Karsenti E. (1994). Purification of microtubule proteins from *Xenopus* egg extracts: identification of a 230K MAP4-like protein. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **28**, 108-118.

- Ferreira A, Caceres A. (1991). Estrogen enhanced neurite growth: Evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *Journal of Neuroscience* **11**, 392-400.
- Flanagan MD & Lin S. (1979). Comparative studies on the characteristic properties of two forms of brain actin separable by isoelectric focussing. *Journal of Neurochemistry* **32**, 1037-1046.
- Fleming AS, O'Day DH & Kraemer GW. (1999). Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **23**, 673-685.
- Francon J, Lennon AM, Fellous A, Mareck A, Pierre M & Nunez J. (1982). Heterogeneity of microtubule-associated proteins and brain development. *European Journal of Biochemistry* **129**, 465-471.
- Furuta M & Bridges RS. (2005). Gestation-induced cell proliferation in the rat brain. *Developmental Brain Research* **156**, 61-66.
- Galea LA, Ormerod BK, Sampath S, Kostaras X, Wilkie DM & Phelps MT. (2000). Spatial working memory and hippocampal size across pregnancy in rats. *Hormones and Behavior* **37**, 86-95.
- Garner CC, Brugg B & Matus A. (1988). A 70-kilodalton microtubule-associated protein (MAP2c), related to MAP2. *Journal of Neurochemistry* **50**, 609-615.
- Genuth SM. (2006). Reproducción femenina. *Fisiología*, ed. Levy K, Bruce M., Stanton, Bruce A., pp. 739-745. Elsevier, España.
- 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 systems. *Journal of Cell Science* **105 (Pt 3)**, 729-737.
- 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 journal* **8**, 393-399.
- Gomora-Arrati P, Gonzalez-Arenas A, Balandran-Ruiz MA, Mendoza-Magana ML, Gonzalez-Flores O & Camacho-Arroyo I. (2010). Changes in the content of GFAP in the rat brain during pregnancy and the beginning of lactation. *Neuroscience Letters* **484**, 197-200.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I & Iqbal K. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 5535-5544.
- Gonzalez-Billault C, Owen R, Gordon-Weeks PR & Avila J. (2002). Microtubule-associated protein 1B is involved in the initial stages of axonogenesis in peripheral nervous system cultured neurons. *Brain Research* **943**, 56-67.
- Guerra-Araiza C, Amorim MA, Camacho-Arroyo I & Garcia-Segura LM. (2007). Effects of progesterone and its reduced metabolites, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and the microtubule-associated protein tau in the rat cerebellum. *Developmental Neurobiology* **67**, 510-520.
- Guerra-Araiza C, Amorim MA, Pinto-Almazan R, Gonzalez-Arenas A, Campos MG & Garcia-Segura LM. (2009). Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research* **87**, 470-481.
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T & Hirokawa N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* **369**, 488-491.
- Hernandez F & Avila J. (2007). Tauopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 2219- 2233.

- Hirokawa N, Shiomura Y & Okabe S. (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *Journal of Cell Biology* **107**, 1449-1459.
- Hodgen GD. (1988). *The Physiology of Reproduction*, ed. Knobil E. Raven, pp. 2503. New York.
- Houdebine LM, Djiane J, Dusanter-Fourt I, Martel P, Kelly PA, Devinoy E & Servely JL. (1985). Hormonal action controlling mammary activity. *Journal of Dairy Science* **68**, 489-500.
- Ishiguro K, Takamatsu M, Tomizawa K, Omori A, Takahashi M, Arioka M, Uchida T & Imahori K. (1992). Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *The Journal of biological chemistry* **267**, 10897-10901.
- Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T & Imahori K. (1993). Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS letters* **325**, 167-172.
- Jancsik V, Filliol D, Felter S & Rendon A. (1989). Binding of microtubule-associated proteins (MAPs) to rat brain mitochondria: a comparative study of the binding of MAP2, its microtubule-binding and projection domains, and tau proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **14**, 372-381.
- Jay D & Stracher A. (1997). Expression in Escherichia coli, phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase and proteolysis by calpain of a 71-kDa domain of human endothelial actin binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **232**, 555-558.
- Jay D GJ, Lara JE, Medina MA, Ibarra LM. (2000). Determination of a cAMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation Site in the C-Terminal Region of Human Endothelial Actin-Binding Protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **377**, 80-84.
- Johnson GV & Stoothoff WH. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science* **117**, 5721-5729.

- Kalinichev M, Rosenblatt JS & Morrell JI. (2000). The medial preoptic area, necessary for adult maternal behavior in rats, is only partially established as a component of the neural circuit that supports maternal behavior in juvenile rats. *Behavioral Neuroscience* **114**, 196-210.
- Kandel ER., Schwartz JH, Jessell T M. (2000). *Principles of Neural Science*. ed. McGraw-Hill, pp. 1414. New York.
- Keyser-Marcus L, Stafisso-Sandoz G, Gerecke K, Jasnow A, Nightingale L, Lambert KG, Gatewood J & Kinsley CH. (2001). Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. *Brain Research Bulletin* **55**, 737-745.
- Kinsley Craig H., Madonia Lisa, Gifford Gordon W., Tureski Kara, Griffin Garrett R., Lowry Catherine, Williams Jamison, Collins Jennifer, McLearnie Heather and Lambert. Kelly G. (1999). Motherhood improves learning and memory. *Nature*, 137-138.
- Kinsley CH. (2008). The neuroplastic maternal brain. *Hormones and Behavior* **54**, 1-4.
- Klopper A, Fuchs Fritz. (1982). Progesterona. *Endocrinología de la Gestación*. pp. 126-129. ed. Salvat, Barcelona, España.
- Kolb B. (1984). Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Research* **320**, 65-98.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S & Neve RL. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* **2**, 1389-1397.
- Krettek JE & Price JL. (1977). The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **171**, 157-191.
- Lee MK & Cleveland DW. (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annual Review of Neuroscience* **19**, 187-217.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K & Gong CX. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *European Journal of Neuroscience* **22**, 1942-1950.

- Magiakou MA, Mastorakos G, Rabin D, Margioris AN, Dubbert B, Calogero AE, Tsigos C, Munson PJ & Chrousos GP. (1996). The maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the third trimester of human pregnancy. *Clinical Endocrinology* **44**, 419-428.
- Magistretti PJ. (2006). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Journal of Experimental Biology* **209**, 2304-2311.
- Mahesh VB, Brann DW & Hendry LB. (1996). Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **56**, 209-219.
- Martínez-Gomez M, Cruz Gómez, Y., Lucio Lucio, R. A., Hudson Thomson, R. (2002). Conducta Maternal. *Motivación y Conducta*, ed. Escobar Briones RAAR, pp. 299-317. El Manual Moderno, México.
- Mastorakos G & Ilias I. (2000). Maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and the postpartum period. Postpartum-related disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* **900**, 95-106.
- Mastorakos G & Ilias I. (2003). Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Annals of the New York Academy of Sciences* **997**, 136-149.
- Matsuno A, Takekoshi S, Sanno N, Utsunomiya H, Ohsugi Y, Saito N, Kanemitsu H, Tamura A, Nagashima T, Osamura RY & Watanabe K. (1997). Modulation of protein kinases and microtubule-associated proteins and changes in ultrastructure in female rat pituitary cells: effects of estrogen and bromocriptine. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **45**, 805-813.
- Matthews-Felton T, Corodimas KP, Rosenblatt JS & Morrell JI. (1995). Lateral habenula neurons are necessary for the hormonal onset of maternal behavior and for the display of postpartum estrus in naturally parturient female rats. *Behavioral Neuroscience* **109**, 1172-1188.
- Metcalfe. (1988). *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. Raven, pp 2503. New York.
- Meurer-Grob P, Kasparian J & Wade RH. (2001). Microtubule structure at improved resolution. *Biochemistry* **40**, 8000-8008.

- Neves G, Cooke SF & Bliss TV. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews* **9**, 65-75.
- Nilsen J & Brinton RD. (2003). Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10506-10511.
- Nogales E, Wolf SG & Downing KH. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199-203.
- Numan M. (1988). Neural basis of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* **13**, 47-62.
- Numan M, Numan MJ, Marzella SR & Palumbo A. (1998). Expression of c-fos, fos B, and egr-1 in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis during maternal behavior in rats. *Brain Research* **792**, 348-352.
- Numan M & Stolzenberg DS. (2009). Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Frontiers in Neuroendocrinology* **30**, 46-64.
- Olivier B & Mos J. (1992). Rodent models of aggressive behavior and serotonergic drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **16**, 847-870.
- Purves D. (2007). *Neurociencia*. Tercera ed. pp 852. Editorial Médica Panamericana. México.
- Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR & Anderton BH. (2000). Phosphorylation sites on tau identified by nano-electrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *Journal of Neurochemistry* **74**, 1587-1595.
- Risberg A, Olsson K, Lyrenas S & Sjoquist M. (2009). Plasma vasopressin, oxytocin, estradiol, and progesterone related to water and sodium excretion in normal pregnancy and gestational hypertension. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **88**, 639-646.

- Rosenblatt JS. (1980). Hormonal and nonhormonal regulation of maternal behavior: a theoretical survey. *Reproduction, Nutrition, Development* **20**, 791-800.
- Rosenblatt JS, Mayer AD & Giordano AL. (1988). Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* **13**, 29-46.
- Sánchez C, Diaz-Nido J & Avila J. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology* **61**, 133-168.
- Seagroves TN, Lydon JP, Hovey RC, Vonderhaar BK & Rosen JM. (2000). C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. *Molecular Endocrinology* **14**, 359-368.
- Shah RD, Anderson KL, Rapoport M & Ferreira A. (2003). Estrogen-induced changes in the microtubular system correlate with a decreased susceptibility of aging neurons to beta amyloid neurotoxicity. *Molecular and Cellular Neurosciences* **24**, 503-516.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC & Weiss S. (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* **299**, 117-120.
- Singh M. (2001). Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine* **14**, 407-415.
- Stamm JS. (1955). The function of the median cerebral cortex in maternal behavior of rats. *Journal of Comparative Physiological Psychology* **48**, 347-356.
- Taya K & Greenwald GS. (1981). Effect of hypophysectomy on day 12 of pregnancy on ovarian steroidogenesis in the rat. *Biology of Reproduction* **25**, 692-698.
- Toro CT & Deakin JF. (2007). Adult neurogenesis and schizophrenia: a window on abnormal early brain development? *Schizophrenia Research* **90**, 1-14.

- Tucker RP & Matus AI. (1988). Microtubule-associated proteins characteristic of embryonic brain are found in the adult mammalian retina. *Developmental Biology* **130**, 423-434.
- Uchida T, Ishiguro K, Ohnuma J, Takamatsu M, Yonekura S & Imahori K. (1994). Precursor of cdk5 activator, the 23 kDa subunit of tau protein kinase II: its sequence and developmental change in brain. *FEBS letters* **355**, 35-40.
- Zhang Z & Simpkins JW. (2010). Okadaic acid induces tau phosphorylation in SH-SY5Y cells in an estrogen-preventable manner. *Brain research* **1345**, 176-181.
- Zhou J, Yu Q & Zou T. (2008). Alternative splicing of exon 10 in the tau gene as a target for treatment of tauopathies. *BMC neuroscience* **9 Suppl 2**, S10.